

국내 소비되는 봄나물의 Trienzyme 추출법을 적용한 엽산 함량 분석

- 연구노트 -

김보민 · 김소민 · 오지연 · 조영숙 · 김세나 · 최용민

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과

Total Folate Contents of 15 Edible Plants Consumed in Korea Using Trienzyme Extraction Method

Bo Min Kim, So-Min Kim, Ji Yeon Oh, Young-Sook Cho, Se-Na Kim, and Youngmin Choi

Functional Food and Nutrition Division, Department Agro-Food Resource, National Academy
of Agricultural Science, Rural Development Administration

ABSTRACT Trienzyme digestion (AOAC Official Method 2004.05) procedure using protease, α -amylase, and chicken pancreas conjugase was evaluated to determine its usefulness in the microbiological quantitation of total folate in foods. Folate values obtained by alkali hydrolysis (Korean Food Standards Codex) were compared to those obtained by the trienzyme method for four certified reference materials (CRM) representing diverse matrixes. Trienzyme treatment increased measurable folate from most CRM compared to levels found after alkali hydrolysis. The largest increases were observed with CRM 487 (pig liver, 5.8-fold) and CRM 121 (whole meal flour, 3.1-fold) after trienzyme digestion. Using trienzyme digestion method, total folate contents of raw and blanched edible plants were determined. *Eleutherococcus senticosus* (146.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) showed the highest total folate content, followed by *Aster glehni* F. Schmidt (142.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and *Ledebouriella seseloides* H. Wolff (140.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) on a wet weight basis. Blanching of samples resulted in an insignificant decrease in folate content for five samples and 11~63% reduction for nine samples. Our finding suggests that trienzyme digestion method is accurate for the determination of food folate in leafy vegetables.

Key words: folate, edible plant, trienzyme, alkali hydrolysis, microbiological assay

서 론

엽산(folate)은 체내 대사과정에서 메틸기를 전달하는 조효소 역할을 하는 수용성 비타민으로 DNA 합성과 아미노산 대사에 필수적인 역할을 한다. 특히 산모의 엽산 영양상태가 좋지 않은 경우 태아의 신경관 손상으로 인한 기형아 출산율이 증가하는 것으로 알려져 있다(1). 이와 같이 엽산이 체내 대사과정을 위해 매우 중요한 역할을 하는 비타민으로 알려짐에 따라 국내외에서는 엽산의 섭취 실태와 그 결핍증에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(2-4). 한국인의 엽산 영양 실태를 조사한 연구 결과, 식품으로부터 공급되는 엽산 섭취량이 권장량에 비해 낮았음에도 불구하고 실제 적혈구의 엽산 농도는 정상으로 유지되고 있었다(5). 이와 같이 한국인의 엽산 섭취량이 과소평가 되는 이유 중 하나가 국내 식품 엽산 함량의 신뢰도 있는 분석 데이터베이스의 부족이다.

엽산은 식품 중에 그 형태가 매우 다양하고 소량 존재하기

때문에 분석하기 어려운 비타민이다. 현재 AOAC 방법에서는 자연식품에 존재하는 엽산을 분석하기 위해 trienzyme 추출법을 적용한 미생물학적 정량법을 권장하며(6), 식품공전에서는 암모니아 추출법(7)을 적용한 미생물학적 정량법을 각각 제시하고 있다. 엽산은 식품에서 유리된 형태로 존재하기보다는 단백질 및 당 구조체와 결합되어 있기 때문에 효과적인 추출을 통한 신뢰도 있는 분석치를 생산하기 위해 분석시료의 매트릭스에 따라 protease와 α -amylase가 사용된다. 또한 분석에 사용되는 *Lactobacillus casei*(*spp.* rhamnosus) ATCC 7469는 엽산 분자 내의 glutamic acid 중합체를 가수분해하는 효소를 발현하지 못하기 때문에 *L. casei*가 식품의 엽산을 대사에 이용할 수 있도록 추출과정에서 glutamic acid 잔기를 가수분해하는 conjugase(γ -glutamyl hydrolase)의 사용이 필수적이다(8).

본 연구에서는 국내 엽산 분석 데이터의 질·양적 향상을 위해 첫째, 엽채류 매트릭스에 대한 엽산 분석을 위해 AOAC법의 trienzyme 추출법과 식품공전의 암모니아 가수분해법을 비교·분석하고 둘째, 엽채류에 있어 trienzyme 추출법의 검증에 대해 국제표준인증물질(CRM, certified reference material)을 분석하고 정밀성과 정확성을 측정하였다. 마지막으로 검증된 추출법을 적용하여 시판 봄나물의

Received 15 September 2014; Accepted 21 October 2014

Corresponding author: Youngmin Choi, Functional Food and Nutrition Division, Department Agro-Food Resource, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk 565-851, Korea
E-mail: ychoi2@korea.kr, Phone: +82-63-238-3684

총 엽산 함량을 *L. casei*를 이용한 미생물학적 정량법을 적용하여 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료 처리

분석시료인 15종의 시판 봄나물[가죽나물(*Ailanthus altissima*(Mill.) Swingle), 참두릅(*Aralia elata*), 갯기름(*Ledebouria seseloides*(Hoffm.) H. Wolff), 오가피순(*Eleutherococcus senticosus*(Rupr. & Maxim.) Maxim.), 세발나물(*Spergularia marina*(L.) Griseb.), 곤드레(*Cirsium setidens* Nakai), 민들레(*Taraxacum mongolicum*), 고들빼기(*Crepidiastrum keiskeanum*(Maxim.) Nakai), 부지깽이(*Aster glehni* F. Schmidt), 돌미나리(*Oenanthe javanica*(Blume) DC.), 시금치(*Spinacia oleracea* L.), 쪽(*Artemisia asiatica*), 비름나물(*Amaranthus viridis* L.), 어수리(*Heracleum dissectum* Ledeb.), 참취(*Aster scaber* Thunb.)]은 수원지역의 대형 할인점 및 농수산물 도매시장에서 2013년 4월에 구입하여 사용하였다. 나물 생시료는 이물질을 제거하기 위해 증류수에 2번 세척하고 키친타올을 이용하여 물기를 제거하였다. 시료 균질화를 위해 약 1.5 cm 이하로 세절한 뒤 마쇄(1,500 rpm, Robot Coupe Blixer 6, Jackson, MS, USA)하고 질소 충전하여 -70°C에 보관하여 사용하였다. 데친 나물 시료는 수세 후 시료 무게의 10배 부피의 증류수에서 100°C에서 30초간 데친 후 증류수를 이용하여 냉각하고 키친타올을 이용하여 물기를 제거한 뒤 생시료와 동일하게 균질화하여 -70°C에 보관하였다. Folic acid 표준품(F8798)과 엽산 추출에 사용된 protease(P5147, ca 3.5 units/mg solid), α -amylase(A9857, ca 150 units/mg protein)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, conjugase(0.0015 nmol/min/mg) 조효소인 닭 채장 동결건조 분말은 Pel-Freez Biologicals(Rogers, AR, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Trienzyme 추출법에 의한 엽산 분석

삼각플라스크에 분석 시료 약 1 g과 0.1 M phosphate buffer(pH 7.8, 1% ascorbic acid) 및 증류수를 각각 가하고 100°C에서 15분간 열처리 및 냉각하였다. 사용 전 바로 제조한 protease 용액(2 mg/mL) 1 mL를 가하여 37°C에서 3시간 반응시키고 100°C에서 5분간 열처리하여 protease를 불활성화시켰다. 동일 플라스크에 α -amylase 용액(20 mg/mL) 1 mL를 넣고 37°C에서 2시간 반응을 진행한 뒤 conjugase 용액(5 mg/mL) 4 mL를 가하여 16시간 가수분해하였다. 효소반응을 정지시키기 위해 100°C에서 5분간 열처리 하고 추출액의 pH를 4.5로 조정하여 100 mL로 정용하여 정량 시료로 사용하였다. 추출물의 엽산 정량은 *L. casei*(spp. rhamnosus, ATCC 7469)를 이용한 미생물학적 방법에 의해 실시하였다(6).

암모니아 가수분해법에 의한 엽산 분석

삼각플라스크에 분석 시료 약 1 g, 증류수 70 mL, 10% 암모니아수 2 mL를 각각 가하여 121°C에서 15분 가열하였다. 이 추출액의 pH를 6.8로 조정하여 100 mL로 정용하여 여과 멸균한 뒤 정량 시료로 사용하였다. 추출물의 엽산 정량은 trienzyme 추출법에서 사용한 방법과 동일하게 미생물학적 방법을 적용하였다(7).

미생물학적 분석방법의 검증

엽산 표준용액(200 μ g/mL)을 희석하여 시료에 spiking 하고 trienzyme 추출법에 따라 전처리하고 미생물학적 방법에 의한 정량 값을 이용하여 회수율을 구하였다. 분석법의 반복성을 평가하기 위해 시료 추출부터 분석까지 하루 3반복 실험을 하였으며, 재현성은 3일간 동일 실험을 반복 수행하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였으며 그 결과는 SAS 9.1(SAS Institute, Cary, NC, USA) Software를 이용하여 (paired *t*-test) 유의수준 5%로 검정하였다.

결과 및 고찰

추출방법에 따른 엽산 함량 비교

엽산 분석에 있어 trienzyme 추출법은 열처리한 시료에 protease, α -amylase, conjugase를 각각 사용하는 방법으로 protease와 α -amylase는 식품의 단백질과 탄수화물 조직에 결합되어 있는 엽산 유도체를 유리시키기 위해 사용된다(6). 자연계에 존재하는 엽산은 pteridine 링 구조에 para-aminobenzoic acid와 glutamic acid 잔기가 2개에서 10개까지 결합된 polyglutamate 형태이다. Conjugase는 polyglutamate 형태의 엽산을 mono- 혹은 diglutamate 형태로 가수분해함으로써 정량시험에 사용되는 미생물인 *L. casei*가 엽산을 생장에 이용할 수 있도록 한다(8). De Souza와 Eitenmiller(9)에 의해 trienzyme 추출법 소개된 이후로 효소 추출법은 엽산 분석 전문가에 의해 널리 사용되어 왔고 AOAC법에도 적용되었다. 현재 식품공전에서는 엽산 추출을 위해 암모니아 가수분해법을 적용하고 있다.

따라서 본 연구에서는 엽채류 엽산 분석에 있어 정확도 높은 추출법을 결정하기 위해 매트릭스별 국제표준인증물질 4종과 시금치, 돌미나리를 대표 시료로 선정하고 AOAC의 trienzyme 추출법과 식품공전의 암모니아 가수분해법을 비교 분석하였다. 연구 결과 SRM 1849a(infant formula)를 제외한 CRM 485(mixed vegetable), CRM 487(pig liver), CRM 121(wholemeal flour), 시금치, 돌미나리 시료에서 암모니아 가수분해법보다 효소추출법을 사용할 경우 엽산 함량이 시료에 따라 1.2에서 5.8배까지 증가하였다(Table 1).

Table 1. Comparison of trienzyme extraction to alkali hydrolysis method(unit: $\mu\text{g}/100\text{ g}$)

Samples	Certified value	Trienzyme treatment ¹⁾	Alkali hydrolysis ²⁾	Fold increase
CRM ³⁾ 485 (mixed vegetables)	315.0 \pm 28.0	281.5 \pm 10.8	234.1 \pm 6.1*	1.2
CRM 487 (pig liver)	1,330.0 \pm 130.0	1,373.0 \pm 15.2	236.0 \pm 9.1*	5.8
CRM 121 (wholemeal flour)	50.0 \pm 7.0	39.8 \pm 1.5	12.7 \pm 0.4*	3.1
SRM ⁴⁾ 1849a (infant/adult nutritional formula)	229.3 \pm 6.2	239.6 \pm 2.3	231.5 \pm 1.3	1.0
Spinach	— ⁵⁾	119.0 \pm 2.9	97.1 \pm 5.5*	1.2
Wild parsley	—	71.2 \pm 0.8	22.43 \pm 3.4*	3.2

¹⁾Trienzyme extraction method: protease 3 hr, α -amylase 2 hr, conjugase 16 hr.²⁾Heat treatment at 121°C for 15 min after alkali hydrolysis (10% ammonia).³⁾CRM=certified reference material.⁴⁾SRM=standard reference material.⁵⁾Values are not assigned.*Mean values are significantly different from those of the trienzyme treatment (paired *t*-tests: $P<0.05$, $n=5$).

식품공전의 암모니아 가수분해법은 추출시간이 짧고 추출과정이 단순하기 때문에 범용적 사용이 가능한 것이 장점이다. 또한 엽산 유도체 중 합성 형태인 folic acid(pteroylglutamic acid)는 pH 12에서도 안정한 화합물이기 때문에 (10) 영양 강화 밀가루, 시리얼 등에 첨가된 folic acid를 분석하는 데 적합한 추출방법이다. 실험 결과에 나타난 바와 같이 SRM 1849a의 경우 trienzyme 추출법과 암모니아 가수분해법에 의한 분석치의 차이가 없었다. 이는 SRM 1849a 표준인증물질의 경우 folic acid가 영양 강화되어 free form으로 존재하여 protease나 conjugase를 사용할 필요가 없고 알칼리 조건에도 안정하기 때문이다. 하지만 나머지 세 표준인증물질 분석 결과에 나타난 바와 같이 식품에 존재하는 천연 엽산(folate)은 folic acid보다 추출 조건에 민감하고 특히 pH 4~8 사이에서 안정한 화합물이기 때문에 (8,10) 암모니아 가수분해법을 적용하면 그 함량이 과소평가될 수 있다. 따라서 나물 등 식품에 함유된 천연 엽산 분석에는 trienzyme 추출법 적용이 필요하다.

Trienzyme 추출방법의 검증

본 연구에서는 엽채류에 있어 trienzyme 추출법의 검증을 위해 시금치를 대표 시료로 선정하고 정확도(회수율)와 정밀도(반복성, 재현성)를 각각 측정하여 Table 2에 나타내었다. 시금치 엽산 함량의 100%가 되는 농도로 엽산 표준용액(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 spiking 하고 시료와 동일한 추출 과정을 사용하여 미생물학적 분석법을 적용하여 정량하였다. 실험 결과 시금치의 엽산 회수율은 102.8%로 나타났다. 또한 반복성을 측정하기 위해 하루 3반복 실험을 실시하였으며 재

현성은 3일간 동일 실험을 반복 수행하였다. 실험 결과 반복성의 변이계수(CV%, coefficient of variation)는 5% 이하였으며 재현성의 경우 15.1%로 나타났다.

Trienzyme 추출방법을 적용한 나물의 엽산 함량

Trienzyme 추출법을 적용하여 분석한 봄나물(생것, 데친것)의 엽산 함량은 Table 3에 나타내었다. 15개의 분석시료 중 습물 기준(wet weight basis) 나물 생시료의 경우 오가피(146.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), 부지깅이(142.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), 갯기름(140.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)이 높은 엽산 함량을 나타내었다. 반면 건물 기준(dry weight basis)을 적용한 절대량 비교에서는 민들레(1,643.0 $\mu\text{g}/\text{g}$), 시금치(1,284.8 $\mu\text{g}/\text{g}$), 비름나물(1,222.5 $\mu\text{g}/\text{g}$)이 높은 엽산 함량을 나타내었다. 본 연구의 분석치와 선행연구와의 비교 분석이 필요하나 국내 소비 식품에 대한 엽산 분석 자료가 매우 부족한 실정이라서 시금치를 제외한 시료에 대한 분석 결과를 비교할 수 없었다. Yon과 Hyun(11)은 한국 상용 식품 엽산 분석 연구에서 시금치를 각각 다른 장소에서 수집한 뒤 평균 함량을 293.6 \pm 109.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 보고하였다. 미국 USDA의 영양성분 데이터베이스(12)에는 시금치의 엽산 함량이 194.0 \pm 35.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 본 연구 결과보다 높게 보고되어 있다. 위와 같은 함량 차이는 재배조건, 품종 등에 의한 차이에서 비롯된 것으로 생각되며 추후 분석 값의 대표성을 위해서는 통계적 기법에 의한 수집 지역 및 품종 선택이 필요한 것으로 생각된다.

가죽나물, 참두릅, 세발나물, 돌미나리, 참취나물을 100°C에서 30초간 데쳤을 경우 엽산 함량은 차이가 없었으며 ($P>0.05$), 갯기름나물을 제외한 나머지 9개 시료에서는 엽산 함량이 11~63% 감소하였다(건물 기준 비교). 갯기름나물의 경우 생시료(764.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 건물중)에 비해 데친 시료의 함량(1,611.5 $\mu\text{g}/\text{g}$, 건물중)이 약 2배 증가하였는데, 이는 열처리에 의해 갯기름나물의 세포벽이 분해되어 엽산의 추출효율이 높아졌기 때문인 것으로 생각된다. 기존 연구 결과에 의하면 일부 식물 matrix에 존재하는 carotenoid, tocopherol, polyphenol 성분이 열처리에 의해 그 함량이

Table 2. Precision and recovery for spinach samples

Parameters ¹⁾	Precision		Accuracy
	Repeatability	Reproducibility	Recovery (%)
Mean	109.3	115.5	102.8
SD	1.0	17.5	7.8
CV (%)	0.9	15.1	7.6

¹⁾Mean, $n=3$ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$); SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

Table 3. Folate retention in 15 edible plants following a blanching procedure

Family	Scientific name	Part	Raw			Blanched ¹⁾			Fold decrease (%)
			Wet weight basis (µg/100 g) ²⁾	Dry weight basis (µg/g)	Wet weight basis (µg/100 g)	Dry weight basis (µg/g)	Dry weight basis (µg/g)		
Amaranthaceae	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Leaf, stem	115.2±10.3	1,222.5±109.2	54.7±3.2	636.6±37.4	48*		
Aptiaceae	<i>Heracleum dissectum</i> Ledeb.	Leaf, stem	76.5±6.3	934.8±77.9	55.9±4.5	833.9±67.2	11*		
Aptiaceae	<i>Ledebouria seseloides</i> (Hoffm.) H. Wolff	Leaf	140.4±0.5	764.9±2.6	261.9±7.2	1,611.5±44.5	-111*		
Aptiaceae	<i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC.	Leaf, stem	56.9±2.8	623.4±30.4	56.1±1.0	645.9±11.1	-4		
Araliaceae	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	Young leaf, stem	106.4±1.9	659.2±11.6	93.8±1.9	652.4±13.4	1		
Araliaceae	<i>Aralia elata</i>	Young leaf, stem	109.0±9.6	691.0±60.9	87.5±2.9	601.9±20.1	13		
Araliaceae	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim.	Young leaf, stem	146.9±0.9	742.2±4.6	99.1±1.3	539.0±7.3	27**		
Asteraceae	<i>Artemisia asiatica</i>	Leaf, stem	110.0±9.6	855.0±74.8	39.8±7.0	354.4±62.4	59*		
Asteraceae	<i>Aster scaber</i> Thunb.	Leaf, stem	49.3±3.0	609.2±37.5	29.5±15.4	451.0±69.3	26		
Asteraceae	<i>Crepidiastrum keiskeanum</i> (Maxim.) Nakai	Leaf	66.7±3.6	648.1±35.5	57.6±2.7	499.6±23.6	23*		
Asteraceae	<i>Taraxacum mongolicum</i>	Leaf	111.3±4.7	1,643.0±69.6	60.3±2.9	605.8±29.3	63**		
Caryophyllaceae	<i>Spergularia marina</i> (L.) Griseb.	Leaf	77.2±9.7	985.5±123.4	64.8±4.0	879.9±53.6	11		
Chenopodiaceae	<i>Spinacia oleracea</i> L.	Leaf, stem	119.0±2.9	1,284.8±31.6	94.4±0.9	1,106.1±10.1	14*		
Compositae	<i>Aster glehni</i> F. Schmidt	Leaf, stem	142.8±3.9	942.7±25.7	111.6±2.5	740.8±16.9	21**		
Compositae	<i>Cirsium setidens</i> Nakai	Leaf, stem	53.0±2.2	828.3±34.8	58.1±3.9	505.6±34.7	39**		

¹⁾Samples were blanched at 100°C for 30 sec.

²⁾Mean value are significantly different from those of the raw foods (paired t-test: *P<0.05, **P<0.001).

증가하며, 이는 열처리에 의한 산화효소 불활성화 및 세포벽 분해에 따른 추출효율 증가로 보고되고 있다(13,14). 본 연구에서는 갯기름나물에 대해 단일 열처리 조건을 적용하였으므로 추후 다양한 열처리 처리 조건(온도, 시간)에 따른 엽산 함량 변화 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 국내 엽산 분석 데이터의 질적·양적 향상을 위해 첫째, AOAC법의 trienzyme 추출법과 식품공전의 암모니아 가수분해법을 비교 분석하고 둘째, 엽채류에 있어 trienzyme 추출법의 검증을 위해 국제표준인증물질을 분석하고 정밀성과 정확성을 측정하였다. 마지막으로 검증된 추출법을 적용하여 시판 봄나물(생것, 데친것)의 총 엽산 함량을 *L. casei*를 이용한 미생물학적 정량법을 적용하여 비교 분석하였다. 연구 결과 CRM 485(mixed vegetable), CRM 487(pig liver), CRM 121(wholemeal flour), 시금치, 돌미나리의 경우 암모니아 추출법보다 trienzyme 추출법을 적용할 경우 엽산 함량이 시료에 따라 1.2에서 5.8배까지 증가하였다. 따라서 나물 등 엽채류 식품에 함유된 천연 엽산 분석에는 trienzyme 추출법 적용이 필요한 것으로 생각된다. Trienzyme 추출법을 적용하여 분석한 봄나물(생것, 데친것)의 엽산 함량은 습물 기준(wet weight basis) 나물 생시료의 경우 오가피(146.9 µg/100 g), 부지깥이(142.8 µg/100 g), 갯기름(140.4 µg/100 g)의 엽산 함량이 15개의 분석시료 중 높은 값을 나타내었다. 반면 건물 기준(dry weight basis)을 적용한 절대량 비교에서는 민들레(1,643.0 µg/g), 시금치(1,284.8 µg/g), 비름나물(1,222.5 µg/g) 순으로 높은 엽산 함량을 나타내었다. 가축나물, 참두릅, 세발나물, 돌미나리, 참취나물 경우 100°C에서 30초간 데쳤을 때 엽산 함량은 차이가 없었으며(P>0.05) 갯기름나물을 제외한 나머지 9개 시료에서는 엽산 함량이 11~63% 감소하였다(건물 기준 비교). 본 연구에 적용된 엽산 trienzyme 추출법은 상대적으로 부족한 국내 다소비 식품의 엽산 분석 연구에 활용될 것으로 생각되며 나아가 국가표준식품성분표 작성을 위한 엽산 데이터베이스 구축의 기초 자료가 될 것이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009593)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Gropper SS, Smith JL, Groff JL. 2005. *Advanced nutrition and human metabolism*. 4th ed. Thomson Wadsworth, Belmont, CA, USA. p 301-315.
- Blom HJ, Smulders Y. 2011. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*

- 34: 75-81.
3. Green R. 2011. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* 94: 666S-672S.
 4. Kim HJ, Kim H, Kim KN, Kim G, Son JI, Kim SY, Chang N. 2011. Relationship among plasma homocysteine, folate, vitamin B₁₂ and nutrient intake and neurocognitive function in the elderly. *Korean J Nutr* 44: 498-506.
 5. Hyun TS, Han YH, Lim EY. 1999. Blood folate level determined by a microplate reader and folate intake measured by a weighed food record. *Korean J Community Nutr* 4: 512-520.
 6. DeVries JW, Rader JI, Keagy PM, Hudson CA, Angyal G, Arcot J, Castelli M, Doreanu N, Hudson C, Lawrence P, Martin J, Peace R, Rosner L, Strandler HS, Szpylka J, van den Berg H, Wo C, Wurz C. 2005. Microbiological assay-trienzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study. *J AOAC Int* 88: 5-15.
 7. Ministry of Food and Drug Safety. 2012. *Korean Food Standards Codex*. Korean Food Industry Association, Seoul, Korea. p 97-106.
 8. Eitenmiller RR, Landen WO. 1998. *Vitamin analysis for the health and food science*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 411-466.
 9. De Souza S, Eitenmiller R. 1990. Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay. *J Micronutr Anal* 7: 37-57.
 10. De Brouwer V, Zhang GF, Storozhenko S, Straeten DV, Lambert WE. 2007. pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochem Anal* 18: 496-508.
 11. Yon M, Hyun T. 2005. Additional data for the folate database for foods common in Korea. *Korean J Nutr* 28: 586-604.
 12. National Nutrient Database for Standard Reference Release 27. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/> (accessed Aug 2014).
 13. Hwang ES, Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE. 2012. Effects of heat treatment on the carotenoid and tocopherol composition of tomato. *J Food Sci* 77: C1109-C1114.
 14. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.