

## Trienzyme Extraction-Microplate Assay를 이용한 한국 차례 및 제사 음식의 엽산 분석 및 검증

박수진<sup>1</sup> · 정범균<sup>1</sup> · 정재은<sup>1</sup> · 김현영<sup>1</sup> · 정길락<sup>2</sup> · 황은정<sup>3</sup> · 윤성원<sup>4</sup> · 현태선<sup>3</sup> · 이준수<sup>5</sup> · 천지연<sup>1</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 식품공학과, <sup>2</sup>통영시농업기술센터, <sup>3</sup>충북대학교 식품영양학과  
<sup>4</sup>고려대학교 보건과학대학 보건과학연구소, <sup>5</sup>충북대학교 식품공학과

### Validation of Trienzyme Extraction-Microplate Assay for Folate in Korean Ancestral Rite Food

Su-Jin Park<sup>1</sup>, Beom-Gyun Jeong<sup>1</sup>, Jae Eun Jung<sup>1</sup>, Hyeon-Young Kim<sup>1</sup>, Gil-Rak Jung<sup>2</sup>,  
Eun-Jung Hwang<sup>3</sup>, Sung-Won Yoon<sup>4</sup>, Taisun Hyun<sup>3</sup>, Junsoo Lee<sup>5</sup>, and Jiyeon Chun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Suncheon National University

<sup>2</sup>Tongyeong Agricultural Technology Center

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition and <sup>5</sup>Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

<sup>4</sup>Research Institute of Health Sciences, Korea University

**ABSTRACT** Trienzyme extraction coupled with microplate assay (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*) was validated and applied for the determination of folate (vitamin B<sub>9</sub>) in Korean ancestral rite foods. Foods included five *Guk* (*Tang*), eleven *Sookchaes*, eight *Jeoks*, nine *Jeons*, six *Jjims*, and twenty desserts. Folate was detected in all samples: *Guk* (*Tang*) 4.62~18.84, *Sookchae* 6.13~48.40, *Jeok* 5.49~49.50, *Jeon* 6.96~30.77, *Jjim* 10.34~38.88, and desserts 3.33~49.55 µg/100 g. The lowest folate content was observed in *Sikhye* (3.33 µg/100 g), whereas the highest was observed in *Songhwa-dasik* (49.55 µg/100 g). Folate analyses of certified reference materials, BCR-121 (whole meal flour) and BCR-487 (pig liver), showed good recoveries of 90.0% (0.45 mg/kg) and 92.4% (12.3 mg/kg), respectively. The recoveries (96.0 to 106.2%) obtained by analyzing eight spiked samples with different matrices also showed good accuracy. Both repeatability and reproducibility were less than 5%, indicating good precision. The quality control chart (n>30) obtained by running commercial folate fortified-wheat flour once a week for about 10 months showed that all assays were under control. All validation method and analytical quality control results showed that folate contents in Korean ancestral rite foods produced by microplate assay were reliable enough to be used for the construction of a national folate database.

**Key words:** folate, trienzyme extraction, microplate assay, Korean ancestral rite food, method validation

## 서 론

엽산은 수용성 비타민 B 그룹 중 하나로 체내에서 비타민 활성을 나타내는 pteric acid의 모든 유도체를 일컫는다(1,2). 엽산은 DNA, RNA 및 단백질 구성요소의 합성 반응, 조혈과정, 인체 대사과정의 정상적인 기능 유지에 필요한 영양소로 섭취 부족 시 빈혈과 관련된 생리적 증세가 나타난다(3,4). 또한 호모시스테인의 상승은 폐색성 혈관 질환의 위험인자로 알려져 있으며 임신부의 엽산 결핍은 태아의 신경관 결함(neural tube defect)의 발생과 높은 상관성이 있음이 보고되었다(5). 엽산 급원식품은 녹색 잎이 많은 채소,

간, 두류, 달걀노른자, 효모 등으로 한국식단의 경우 엽산 섭취가 문제가 되지 않는 것으로 평가되지만 우리나라 임신부 및 수유부, 정상 성인 여성의 엽산 섭취량은 높지 않은 것으로 보고되고 있어 식품이나 보충제를 이용한 충분한 섭취가 필요한 것으로 보고되고 있다(2,6,7).

한국영양학회의 분류방법에 따른 국내 음식군별 섭취빈도를 보면 밥류 72.7%, 국 및 탕류 25.1%, 속채류 20.6%, 찜류 7.2%, 전 및 부침류 5.5%, 튀김류 5.5%, 떡류 1.3% 순으로 자주 섭취하고 있는 것으로 분석된다(8). 차례 및 제사 음식은 현대에서 자주 섭취하고 있는 모든 식단을 고루 포함하고 있는 한상차림으로 제사는 돌아가신 조상을 추모하는 기일에, 차례는 근래에 설날, 한식, 추석의 민속명절에 차례지게 되는데 이러한 상차림은 우리나라 기본 영양 수준을 평가하기에 좋은 상차림이라 할 수 있다. 현재 국내 식품의 엽산 데이터베이스는 농촌진흥청이 주기적으로 개정하

Received 7 January 2015; Accepted 11 February 2015

Corresponding author: Jiyeon Chun, Department of Food Engineering, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea

E-mail: cjyfall@suncheon.ac.kr, Phone: +82-61-750-3258

고 있는 식품성분표와 식품의약품안전처에서 구축하고 있는 식품영양성분 데이터베이스를 뽑을 수 있다. 최근에 개정된 식품성분표 제8 개정판의 경우 엽산 함량이 제외된 상태이며, 제7 개정판은 미국의 USDA 식품성분표, 일본의 식품성분표 및 FAO(Food and Agriculture Organization)와 HEW(Department of Health, Education and Welfare, USA)가 공동 발행한 동아시아 지역용 식품성분표의 자료를 상당수 사용하고 있으며, 국내에서 분석된 데이터의 경우 검증 없이 산발적으로 이루어진 것이 많아 데이터의 신뢰도에 대한 문제가 제기되고 있다. 따라서 한국 식단으로부터 섭취할 수 있는 엽산 수준에 대한 정보 구축을 위해서는 검증된 엽산 분석법을 이용한 분석과 분석 품질관리를 통한 데이터베이스 구축이 필요하다.

엽산 분석법은 크게 enzyme protein binding assay (EPBA), high performance liquid chromatography(HPLC) 및 미생물학적 방법(microbiological assay)으로 나눌 수 있다(9). EPBA는 민감하고 빠른 분석법이라는 장점이 있지만 키트의 유통기한이 짧고 실험자에 의해 결과값이 상당히 차이가 나며, di-와 polyglutamates 분석에 적합하지 않은 단점을 가지고 있다(2). HPLC법은 신뢰할 수 있는 분석법이며 엽산 이성질체에 대한 높은 특이성이 입증되었으나 모든 이성질체에 대한 표준물질을 필요로 하고, HPLC 및 미생물학적 방법을 비교 분석한 결과 HPLC로 분석한 방법이 미생물학적 방법보다 훨씬 낮은(30~40%) 결과를 나타낸다고 보고되어 있다(10). 미생물학적 분석법의 경우 엽산 분석 시 시간과 노동력이 필요하고 숙련도가 필요함에도 불구하고 mono-부터 polyglutamates(n≥3)까지 측정 가능하고, 엽산 농도에 반응하는 균주가 매우 민감하여 sub-nanogram 수준까지 측정할 수 있어 식품 속 엽산을 분석하는 방법으로 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(2,11).

본 연구에서는 trienzyme(protease, α-amylase, conjugase) 추출과 *Lactobacillus casei* subsp. *rahanosus* (ATCC 7469)를 이용한 microplate 분석법을 검증하고 이를 이용한 국내 차레·제사 음식의 엽산 함량 분석 및 분석 품질관리를 수행함으로 신뢰도 높은 국내 식품의 엽산 데이터베이스 구축을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

실험에 사용된 표준품 folic acid와 추출에 사용된 protease와 α-amylase는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, folate conjugase(chicken pancreas)는 Pel-Freeze Biologicals(Rogers, AR, USA)에서 구입하였다. Folic acid casei medium, Lactobacilli agar AOAC, Lactobacilli broth AOAC는 Difco(Beckton-Dickinson, Sparks, MD, USA)에서, *Lactobacillus casei* subsp. *rahanosus*(ATCC 7469)는 ATCC(Manas-

sas, VA, USA)에서 구입하였다. 기타 사용된 시약은 GR 등급 이상을 사용하였으며, 증류수는 water purification system(Aqua Max™-Ultra, Young Lin Instrument Co., Anyang, Korea)으로 정제된 물을 사용하였다.

### 시료 준비

본 연구에서 분석한 총 59종의 차레 및 제사 음식은 식약처에서 문화체육관광부 국립민속박물관 등의 웹 자료와 명절 관련 문헌 등을 기초로 하여 선정한 대표음식으로 국 및 탕류 5종(토란국, 어탕, 탕국, 소탕, 육탕), 숙채류 11종(미나리나물, 콩나물, 무나물, 시금치나물, 시래기나물, 탕평채, 숙주나물, 도라지나물, 가지나물, 취나물, 고사리나물), 적 및 전류 17종(홍합산적, 고구마전, 호박전, 가자미전, 두부전, 버섯전, 계적, 배추전, 미나리전, 부추전, 홍어적, 낙지적, 돔배기적, 소라산적, 쥐포전, 오징어산적, 소고기산적), 찜류 7종(도미찜, 참꼬막찜, 병어찜, 조기찜, 민어찜, 문어숙회, 전어찜), 그리고 후식류 19종(송화다식, 녹두시루떡, 수수팥떡, 깨송편, 부꾸미, 북어포, 메밀전병, 콩송편, 깨경단, 기피편, 매작과, 수수떡, 콩경단, 유과, 수정과, 약과, 대구포, 산자, 식혜)을 포함한다. 시료는 수도권에 위치한 제사 음식 업체 12곳을 선정하여 조리 후 당일 얼음팩과 함께 포장된 상태로 NLS(National Lab System) center로 배송되어 국물을 포함한 한 끼의 식사로 제공된 모든 시료를 균질화한 다음 소포장하여 -70°C 보관하며 시료 분석에 사용하였다. 시료의 엽산 분석은 독립적으로 3회 분석한 후 평균값으로 나타내었고, 결과값은 상대표준편차(relative standard deviation, RSD) 50% 이하와 다음 식을 이용한 Q-value 0.94 미만의 값을 사용하였다(11).

$$Q\text{-value} = \frac{|x_1 - x_2|}{W}$$

$x_1$ : the questionable value

$x_2$ : the closest value to  $x_1$

W: the highest value - the lowest value

품질관리를 위해 구입한 상업용 밀가루(Q-One fortified flour, Samyang Co., Seoul, Korea)는 소분하여 밀봉하고 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하며 품질관리(quality control, QC) 시료로 사용하였다.

### Trienzyme을 이용한 엽산 추출

엽산 추출은 Chun 등(12)의 방법에 따라 protease, α-amylase, folate conjugase(chicken pancreas)를 모두 처리한 trienzyme 추출방법을 이용하였으며, 모든 시험은 검체와 효소 자체 내인성 엽산의 값을 빼주기 위해 공시험을 동시에 실시하였다. 지방 함량이 5% 이상인 시료의 경우 삼각플라스크에 시료 0.5~1 g을 쥬 후 hexane 20 mL를 가하여 실온에서 10분간 shaking incubator(HB-201SF, Han-baek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 혼합하고

지방이 용해된 hexane을 제거한 다음 시료 추출에 사용하였다. 지방이 제거된 시료는 phosphate buffer(pH 7.8) 20 mL와 증류수 30 mL를 가한 뒤 100°C의 항온수조(WB-20M, Jeio Tech, Daejeon, Korea)에서 15분간 열탕 처리하였다. 실온으로 식힌 후 phosphate buffer(pH 7.8) 10 mL와 protease 용액(2 mg/mL) 1 mL를 가하고, 90 rpm, 37°C shaking incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후 100°C에서 5분간 끓여 반응을 정지시켰다. 실온으로 식힌 다음  $\alpha$ -amylase solution(20 mg/mL) 1 mL와 toluene 0.5 mL를 가하고 37°C shaking incubator에 2시간 반응시켰다. 여기에 conjugase solution(5 mg/mL, pH 7.8 assay buffer) 4 mL를 가한 후 37°C shaking incubator에 최대 16시간 반응시킨 다음 100°C에서 5분간 열탕 처리하여 효소를 불활성화 시켰다. 시료 추출액은 pH를 4.5로 조정한 후 100 mL로 정용하고 여과지(Whatman No.1, GE Healthcare, Amersham, UK)로 여과한 뒤 여과액을 microplate assay를 위한 추출액으로 사용하였다.

#### Microplate assay

엽산 함량 분석은 *L. casei*가 엽산의 농도에 따라 생육하는 정도를 측정하는 미생물학적 방법(12)을 이용하였으며, 시료 추출액의 회석과 균주배양속도 측정은 microplate reader(Eon, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하였다. *L. casei*는 microplate assay 당일 depletion media(lactobacilli broth : folic acid casei medium=1:1)에 접종한 후 600 nm에서 측정된 흡광도 값이 1.0 이상이 되도록 37°C에서 배양 및 활성화한 다음(약 6시간) microplate assay를 위한 균주로 사용하였다. 시료 추출액, ascorbic acid(1 mg/mL) 그리고 엽산 표준용액(2 ng/mL)은 microplate assay 이전에 0.45  $\mu$ m membrane filter (DISMIC<sup>®</sup>-13CP, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 뒤 사용하였다. 모든 microplate에는 엽산 표준용액, 시료 추출액, QC 시료 추출액, blank 시료를 포함하도록 디자인하고 각 시료액은 멸균증류수를 이용하여 150  $\mu$ L가 되도록 6단계로 희석하였다. Folic acid casei 배지는 배지 5 mL당 *L. casei* 25  $\mu$ L와 ascorbic acid 용액(1 g/10 mL) 50  $\mu$ L를 가하여 준비한 후 각 microplate 96 well에 150  $\mu$ L씩 가하였다. 12-channel 피펫을 이용하여 각 well의 시료를 잘 혼합한 후 뚜껑을 덮고 37°C incubator에서 18~20시간 배양하였다. 배양된 microplate는 피펫으로 96 well 반응액을 잘 혼합한 다음 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액의 농도(0.003~0.200 ng/mL)에 따른 *L. casei*의 성장곡선은 데이터 분석 소프트웨어(Gen5, BioTek Instruments)를 사용하여 검량곡선을 그린 후 각 시료의 OD값과 비교하여 계산한 다음  $\mu$ g/100 g으로 나타내었다.

#### 분석법 검증

분석법 검증은 AOAC 가이드라인(13)과 ICH의 실험실 분석법 검증 가이드라인(14)에 준한 방법에 따라 검증하였으며 검증방법은 다음과 같다. 정확성의 검증은 인증표준물질(certified reference materials, CRM)을 분석하여 참값의 근접성을 확인하는 방법과 시료에 표준용액을 첨가한 후 회수율(recovery)을 측정하는 두 가지 방법을 이용하여 검증하였다. 인증표준물질은 European Commission(EC)에서 개발한 BCR(communitary bureau of references)-121 whole meal flour와 BCR-487 pig's liver를 Resource Technology사(Laramie, WY, USA)에서 구입하여 시료 분석 후 EC에서 제시한 참값과 분석으로 얻어진 측정값을 이용하여 정확성을 계산하였다. 회수율 시험법은 시료의 엽산 함량 수준의 80~120%가 되도록 엽산 표준용액을 가한 spike 시료를 일반 시료와 함께 분석한 후 다음 식을 이용하여 최종 회수율을 계산하였다.

$$\text{Recovery (\%)} = 100 \times (C_{\text{spiked sample}} - C_{\text{sample}}) / C_{\text{standard}}$$

$C_{\text{spiked sample}}$ : 표준물질을 첨가한 시료(spiked sample)의 엽산 함량( $\mu$ g/100 g)

$C_{\text{sample}}$ : 표준물질을 첨가하지 않은 시료의 엽산 함량 ( $\mu$ g/100 g)

$C_{\text{standard}}$ : Spiked sample에 첨가한 엽산 표준물질의 양 ( $\mu$ g/100 g)

정밀성 검증은 QC 시료를 추출부터 분석까지 하루에 독립적으로 5회 3반복으로 분석하여 repeatability(inter-day precision,  $RSD_I$ )를 계산하였고, 5일간 하루에 한 번씩 3반복으로 실험한 reproducibility(intra-day precision,  $RSD_R$ )를 계산하여 정밀성을 평가하였다(13).

#### 분석 품질관리

단일 실험실 분석 품질관리는 Chun 등(12)과 AOAC 가이드라인(13)을 참고하여 수행하였다. 본 연구가 진행되는 약 10개월 동안 시료를 분석할 때마다 QC 시료를 함께 반복적으로 분석하여 분석 결과값을 품질관리도(QC chart)로 작성하였다. 관리 한계선의 설정은 QC 시료를 초기에 10번 이상 분석하여 상대표준편차 5% 안에 들어가는 10개의 값을 선택하여 이들의 평균값을 기준값으로 하고, 평균 $\pm$ 평균 $\times$ 0.1을 관리 상·하한선(upper and lower control line, UCL and LCL), 평균 $\pm$ 평균 $\times$ 0.2를 조치 상·하한선(upper and lower action line, UAL and LAL)으로 설정하여 관리하였다.

## 결과 및 고찰

#### 분석법 검증

Trienzyme 추출 및 *L. casei*를 이용한 microplate 분석법 검증을 위하여 먼저 정확성(accuracy)과 정밀성(preci-

**Table 1.** Accuracy of trienzyme extraction coupled with *Lactobacillus casei* microplate method for folate analysis

CRM sample <sup>1)</sup>	Folate content (mg/kg)		Recovery (%)
	Certified value <sup>2)</sup>	Analytical value <sup>3)</sup>	
BCR-121	0.50±0.07	0.45±0.01	90.0
BCR-487	13.3±1.3	12.3±0.4	92.4

<sup>1)</sup>CRM: certified reference materials, BCR: community bureau of references (Bureau Communautaire de Références), BCR-121: whole meal flour, BCR-487: pig's liver.

<sup>2)</sup>The folate content certified by EC (European Commission).

<sup>3)</sup>The analytical folate value obtained by microbiological assay.

sion) 지표를 분석하였다. CRM을 이용하여 분석한 뒤 인증값과 분석값을 비교하기 위해 BCR-121과 BCR-487이 사용되었다. Trienzyme 방법으로 추출하고 microplate assay법으로 엽산 함량을 측정된 결과(Table 1) 각각 0.45±0.01 mg/kg과 12.3±0.4 mg/kg으로 측정되었다. 이 분석값은 EC에서 제시하는 인증값인 0.50±0.07 mg/kg과 13.3±1.3 mg/kg의 값과 비교할 때 90.0~92.4%의 정확성을 나타내었다.

한편 각 군을 대표하는 시료로 북어포, 참꼬막찜, 호박전, 홍합산적, 미나리나물, 녹두시루떡, 송화다식, 토란국을 선정하고 여기에 각 시료 엽산 함량의 80~120% 농도 수준이 되도록 엽산 표준용액을 가한 spike 시료를 함께 분석하여 회수율을 구한 결과 96.0~104.7%를 얻었다(Table 2). AOAC(13)는 정확성을 나타내는 지표인 회수율에 대한 수용 가능한 범위를 시료의 농도 수준이 100 µg/100 g, 1 µg/100 g인 경우에 각각 75~120%, 70~125%를 충족시켜야 한다고 제시하고 있다. 본 연구에서 사용된 시료들의 엽산 함량이 100 µg/100 g 이하 범위의 농도 수준이라는 것을 감안했을 때, 96.0~104.7%의 회수율은 AOAC 가이드라인(13) 기준을 충족시키는 수준으로 높은 정확성을 보이는 것

**Table 2.** Recovery of trienzyme extraction coupled with *L. casei* microplate method for folate analysis

Sample (n=8)	Recovery (%)	RSD (%) <sup>1)</sup>
Bukeo-po (dried pollack)	96.5±4.3	4.4
Cham-kkomak-jjim (steamed granular ark)	99.3±1.9	1.9
Hobak-jeon (pan-fried zucchini with flour and egg)	96.0±0.2	0.2
Honghab-jeok (pan-fried mussel)	97.6±0.0	0.0
Minari-namul (blanched and seasoned waterdrop wort)	101.5±1.6	1.6
Nokdu-siruttok (rice-cake coated with mungbean flour)	104.7±0.5	0.5
Songhwa-dasik (pine pollen mixed with honey)	102.5±0.5	0.4
Toran-guk (taro soup)	101.5±2.5	2.5
Mean	100.0±3.1	1.4
Range	96.0~104.7	0.0~4.4

<sup>1)</sup>Relative standard deviation (%)=(SD/mean)×100.

**Table 3.** Precision of trienzyme extraction coupled *L. casei* microplate method for folate analysis

Parameters <sup>1)</sup>	Precision	
	Repeatability (RSD <sub>r</sub> ) <sup>2)</sup>	Reproducibility (RSD <sub>R</sub> ) <sup>3)</sup>
Mean (µg/100 g)	169.00	170.47
SD	4.91	8.47
RSD (%)	2.90	4.97

<sup>1)</sup>SD: standard deviation, RSD: relative standard deviation (%)=(SD/mean)×100.

<sup>2)</sup>Repeatability refers to the results of independent 5 determinations in triplicates obtained by analyzing a QC sample five times on the same day.

<sup>3)</sup>Reproducibility refers to the results of independent 5 determinations in triplicates obtained by analyzing a QC sample once a day for 5 days.

을 확인할 수 있었다. 또한 다양한 매트릭스를 가진 시료의 회수율을 측정된 실험에서 측정한 모든 평균값의 RSD값이 AOAC 가이드라인(13)이 요구하는 5% 이하의 값을 보여 수용 가능한 재현성을 보이는 분석법임을 확인할 수 있었다.

정밀성 검증은 RSD<sub>r</sub>과 RSD<sub>R</sub>을 측정하여 비교 분석한 결과 모두 5% 미만의 값을 보였다(Table 3). 이는 엽산 농도가 1 µg/g 수준인 시료로부터 엽산을 분석하는 경우 신뢰도 확보를 위한 RSD<sub>r</sub>과 RSD<sub>R</sub>의 수용 범위가 각각 8%와 16% 이하로 제시한 AOAC 가이드라인을 충족시키는 수준으로 상당히 좋은 정밀성을 가지는 것으로 평가된다.

### 국류 및 탕류의 엽산 함량

국류 및 탕류는 제사에 쓰이는 일반적인 3탕(육탕, 어탕, 소탕)과 차례에 쓰이는 국 2종(탕국, 토란국)의 엽산 함량을 분석하여 결과를 Table 4에 나타내었다. 시료 간의 엽산 함량 차이는 크게 나지 않았으며, 4.62~18.84 µg/100 g의 범위를 나타내었다. 총 5종의 국과 탕 중에서 엽산 함량이 가장 높은 것은 18.84 µg/100 g을 나타낸 토란국이었으며 가장 낮은 값은 4.62 µg/100 g으로 무와 두부가 주재료인 소탕으로 나타났다. 토란국에 사용되는 주재료인 토란은 엽산 함량이 9.9 µg/100 g(15)~30 µg/100 g(16)인 것으로 보고되고 있으며, 어탕, 육탕, 탕국, 소탕에 모두 사용되는 무의 경우

**Table 4.** Folate content of the *Guk (Tang)* prepared for the Korean ancestral rites<sup>1)</sup>

<i>Guk (Tang)</i> (n=5)	Main ingredients	Folate content (µg/100 g)	%RNI <sup>2)</sup>
<i>Toran-guk</i>	Taro	18.84±9.30	4.7
<i>Eo-tang</i>	Fish, radish	13.30±0.64	3.3
<i>Yuk-tang</i>	Beef, radish	5.46±0.66	1.4
<i>Tang-guk</i>	Tofu, beef, radish	5.44±1.16	1.4
<i>So-tang</i>	Tofu, radish	4.62±1.37	1.2
Mean		9.53±6.29	2.4
Range		4.62~18.84	1.2~4.7

<sup>1)</sup>*Guk (Tang)* indicates stew prepared with vegetables or meat.

<sup>2)</sup>%RNI=recommended nutrient intake of folate for Korean adult.

Kim(17)은 40.3 µg/100 g, 식품성분표(16)는 조선무 뿌리 9.1 µg/100 g, 왜무 뿌리 53 µg/100 g으로 보고하여 종류별로 차이를 나타내는 것으로 보인다. 한국인의 엽산 일일 권장섭취량(recommended nutrient intake, RNI)이 성인 400 µg DFE(dietary folate equivalents), 임신부 600 µg DFE인 것과 비교할 때(18) 의례 음식의 국 및 탕류의 섭취를 통하여 섭취되는 엽산의 양은 일일권장량의 약 1.2~4.7% 정도를 섭취할 수 있는 것으로 보인다. 엽산은 수용성 비타민으로 국이나 탕류의 제조 시 국물로 유출될 수 있어 국물의 섭취가 엽산 섭취에 기여할 수 있을 것으로 보이나 본 연구에서 분석된 국 및 탕류의 엽산 함량은 건물이 아닌 식품으로 제공되는 음식 자체를 모두 균질화하여 분석한 결과로 사람의 식성에 따라 국물을 모두 먹는 사람과 그렇지 않은 사람들과는 엽산 섭취량에 차이가 있을 수도 있을 것으로 보인다.

#### 나물류(숙채류)의 엽산 함량

취, 도라지, 가지, 고사리, 콩나물, 미나리, 무, 숙주, 시금치, 시래기를 포함한 10종의 나물과 탕평채의 엽산 함량을 분석하여 Table 5에 나타내었다. 숙채에 사용된 채소류(미나리, 콩나물, 무, 시금치, 숙주, 가지, 고사리)는 대부분 엽산 함량이 풍부한 재료로 생채 기준 약 32.0~196.2 µg/100 g 수준의 엽산을 함유하고 있는 것으로 보고되어 있다(16). 특히 시금치는 엽산 함량이 높은 식품 중 하나로 알려져 있는데 본 연구에서 분석한 시금치나물의 경우 엽산 함량이 25.82 µg/100 g, 기타 엽산 함량이 풍부한 채소를 이용한 숙채류의 경우 6.13~48.40 µg/100 g의 범위로 원재료의 엽산 함량에 비하여 매우 낮은 함량을 나타내었다. 이는 나물을 만들기 위해 채소류를 데치는 과정에서 삶은 물로 수용성 엽산이 유출되기 때문인 것으로 보인다. Min(19)은 엽산 함량이 188.4 µg/100 g인 시금치를 끓는 물에 넣고 3분 동안 조리하였을 때 시금치의 엽산 함량이 생 시금치의 12.6% 수준인 23.8 µg/100 g으로 급격하게 감소되었으며, 조리시

간이 길어질수록 수용성 엽산이 조리수로 유출되어 엽산 손실률이 크게 증가되었다고 보고하였다. 숙채 중 엽산 잔존율을 증가시키기 위해서는 나물을 만들 때 데치는 시간을 짧게 하거나 볶는 조리법을 이용하여 유출되는 수분이 나물에 재 흡수될 수 있도록 하는 조리법이 엽산의 손실을 최소화할 것으로 생각된다. 본 연구에서 분석된 숙채류의 섭취는 엽산 일일 권장 섭취량의 1.5~12.1%의 수준으로 생채류에 비해 매우 낮은 수준으로 엽산을 섭취할 수 있는 것으로 보인다.

#### 적류 및 전류의 엽산 함량

제사 음식 중 적류 9종(홍합, 계, 홍어, 낙지, 돔배기, 소라, 오징어, 쥐포, 소고기) 및 전류 8종(고구마, 호박, 가자미, 두부, 버섯, 배추, 미나리, 부추)의 엽산 함량을 분석한 결과는 각각 Table 6, 7과 같다. 주로 동물성 재료로 만드는 적류의 엽산 함량은 5.49~49.50 µg/100 g, 식물성 재료를 주로 사용하는 전류의 경우 6.96~30.77 µg/100 g의 범위를 나타내어 엽산의 경우 동물성과 식물성 재료로부터 고루 섭취할 수 있는 영양소임을 알 수 있다. 본 연구에서 분석한 한국 의례 음식에 이용되는 적류 9종 중에서 홍합산적이 49.50 µg/100 g으로 가장 높은 엽산 함량을 보였으며 다음으로 계, 돔배기, 홍어, 소라, 낙지, 소고기, 쥐포, 오징어 적의 순으로 높게 나타났다. 전류 8종 중에서는 두부전이 30.77 µg/100 g으로 엽산 함량이 가장 높았고 그다음으로 고구마, 호박, 배추, 부추, 버섯, 가자미, 미나리 순으로 높게 나타났다.

한편 *L. casei*는 지방 성분이 존재 시 성장촉진의 요인으로 작용하여 엽산 함량에 따른 성장도를 측정하는 미생물학적 분석법으로 지방 함량이 높은 시료를 분석하는 경우 본래 함량보다 높게 측정될 수 있기 때문에 추출단계 이전에 지방을 제거하는 것이 필요하다(20-22). 본 실험에서 분석한 적류와 전류의 경우는 모두 기름을 사용하는 조리법을 이용하는 식단으로 조리 중 흡수된 지방이 분석에 영향을 미칠 수 있기 때문에 모든 시료를 hexane을 이용하여 지방을 미리 제거한 다음 trienzyme으로 엽산을 추출하여 지방에 의한

**Table 5.** Folate content of the *Sukchae* (*Namul*) prepared for the Korean ancestral rites<sup>1)</sup>

<i>Sukchae</i> ( <i>Namul</i> ) (n=11)	Main ingredients	Folate content (µg/100 g)	%RNI <sup>2)</sup>
<i>Minari-namul</i>	Water dropwort	48.40±16.65	12.1
<i>Kong-namul</i>	Bean sprout	34.94±10.49	8.7
<i>Sigeumchi-namul</i>	Spinach	25.82±7.43	6.5
<i>Mu-namul</i>	Radish	25.41±2.52	6.4
<i>Sukju-namul</i>	Mung bean sprout	21.27±10.22	5.3
<i>Siraegi-namul</i>	Dried radish leave	11.32±3.26	2.8
<i>Gaji-namul</i>	Eggplant	10.41±4.57	2.6
<i>Tangpyeongchae</i>	Mung bean jelly, beef	10.26±0.69	2.6
<i>Doraji-namul</i>	Roots of bellflower ( <i>Platycodon grandiflorum</i> )	8.32±1.86	2.1
<i>Chwi-namul</i>	Fragrant edible wild aster ( <i>Aster scaber</i> )	7.75±5.13	1.9
<i>Gosari-namul</i>	Bracken ( <i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>Latiusculum</i> )	6.13±1.90	1.5
Mean		19.09±13.52	4.8
Range		6.13~48.40	1.5~12.1

<sup>1)</sup>*Sukchae* indicates blanched and seasoned vegetables.

<sup>2)</sup>%RNI=recommended nutrient intake of folate for Korean adult.

**Table 6.** Folate content of *Jeok* prepared for the Korean ancestral rites<sup>1)</sup>

<i>Jeok</i> (n=9)	Main ingredients	Folate content (µg/100 g)	%RNI <sup>2)</sup>
<i>Honghab-jeok</i>	Mussel, soy sauce, sugar	49.50±23.86	12.4
<i>Gye-jeok</i>	Chicken	23.76±8.30	5.9
<i>Dombaegi-jeok</i>	Shark, soy sauce, sugar	19.56±10.37	4.9
<i>Hong-eo-jeok</i>	Skate	14.92±7.13	3.7
<i>Sora-jeok</i>	Turban shell, soy sauce, sugar	12.12±2.30	3.0
<i>Nakji-jeok</i>	Small octopus	11.46±3.75	2.9
<i>Sogogi-jeok</i>	Beef, soy sauce, sugar	9.82±4.43	2.5
<i>Jwipo-jeok</i>	Dried filefish, flour, egg	6.96±3.45	1.7
<i>Ojingeo-jeok</i>	Squid, soy sauce, sugar	5.49±1.34	1.4
Mean		18.33±13.82	4.6
Range		5.49~49.50	1.4~12.4

<sup>1)</sup>*Jeok* indicates steamed or pan-fried meat coated with soy sauce and sugar.

<sup>2)</sup>%RNI=recommended nutrient intake of folate for Korean adult.

**Table 7.** Folate content of *Jeon* prepared for the Korean ancestral rites<sup>1)</sup>

<i>Jeon</i> (n=8)	Main ingredients	Folate content (µg/100 g)	%RNI <sup>2)</sup>
<i>Dubu-jeon</i>	Tofu, flour, egg	30.77±14.98	7.7
<i>Goguma-jeon</i>	Sweet potato, flour, egg	24.90±6.98	6.2
<i>Hobak-jeon</i>	Zucchini, flour, egg	22.21±6.36	5.6
<i>Baechu-jeon</i>	Kimchi cabbage, flour, egg	21.31±4.91	5.3
<i>Buchu-jeon</i>	Korean leek, flour, egg	19.99±6.32	5.0
<i>Beoseot-jeon</i>	Mushroom, flour, egg	19.53±3.23	4.9
<i>Gajami-jeon</i>	Flatfish, flour, egg	18.61±12.49	4.7
<i>Minari-jeon</i>	Water dropwort, flour, egg	17.81±4.21	4.5
Mean		20.23±6.36	5.1
Range		6.96~30.77	1.7~7.7

<sup>1)</sup>*Jeon* indicates pan-fried vegetables with egg and flour paste.

<sup>2)</sup>%RNI=recommended nutrient intake of folate for Korean adult.

분석값의 상승요인을 제거하였다. Kim(15)의 연구에서 보고한 조리하기 전의 소고기 살코기 4.1 µg/100 g, 닭 4.6 µg/100 g, 버섯 13.1 µg/100 g 등의 값에 비하여 본 연구에서 분석한 조리된 전류와 적류의 엽산 함량은 이보다 다소 높게 나타났다. 식품의 재료 특성에 따라서도 엽산의 함량에 차이가 있을 수 있으나 적류와 전류와 같이 고온의 기름에서 조리되는 식품의 경우 물에서 삶는 조리법에 비하여 조리수로 손실되는 엽산 함량이 낮고 비교적 고온에서 안정한 엽산의 특성으로 인하여 조리된 식품 중의 엽산 잔존율이 높은 것으로 보인다. 본 연구에서 분석한 한국 의례에 이용되는 적류 및 전류의 섭취는 한국 성인 일일 권장 섭취량의 각각 1.4~12.4%와 1.7~7.7% 수준으로 엽산을 공급하는 급원이 될 수 있을 것으로 보인다.

#### 찜류의 엽산 함량

총 7가지 찜류(도미, 참꼬막, 병어, 조기, 민어, 문어, 전어) 중의 엽산 함량을 분석한 결과 10.34~38.88 µg/100 g의 범위를 나타내었다(Table 8). 이 중에서 전어찜이 10.34 µg/100 g으로 가장 낮은 엽산 함량을 보였으며, 도미찜과 참꼬막찜의 경우 각각 38.88 µg/100 g과 38.85 µg/100 g으로 전어찜에 비하여 약 4배 높은 수준으로 가장 높은 함량을

나타내었다. 본 연구에서 분석한 찜류의 엽산 함량은 식품성분표(14)에서 보고하는 꼬막 23.7 µg/100 g, 병어 7 µg/100 g, 민어 6 µg/100 g, 문어 4 µg/100 g, 전어 8 µg/100 g의 엽산 함량에 비하여 상당히 높은 수준으로 최고 5배 이상까지 함량이 높은 것을 확인하였으며 이는 의례 음식의 찜류 조리 시 증기로 찌서 익히는 방법의 경우 식재료 중의 엽산 잔존율을 높일 수 있는 조리법인 것으로 보인다. 이러한 찜류의 섭취는 한국인 엽산 일일 권장 섭취량의 약 2.6~9.7%

**Table 8.** Folate content of *Jjim* prepared for the Korean ancestral rites<sup>1)</sup>

<i>Jjim</i> (n=7)	Main ingredients	Folate content (µg/100 g)	%RNI <sup>2)</sup>
<i>Domi-jjim</i>	Sea bream	38.88±14.77	9.7
<i>Cham-kkomak-jjim</i>	Granular ark	38.85±20.84	9.7
<i>Byeong-eo-jjim</i>	Pomfret	38.78±18.65	9.7
<i>Mineo-jjim</i>	Croaker	29.44±20.62	7.4
<i>Jogi-jjim</i>	Yellow corbina	25.79±6.67	6.4
<i>Muneo-jjim</i>	Octopus	13.08±4.57	3.3
<i>Jeoneo-jjim</i>	Gizzard shad	10.34±2.28	2.6
Mean		27.88±12.21	7.0
Range		10.34~38.88	2.6~9.7

<sup>1)</sup>*Jjim* indicates steamed foods.

<sup>2)</sup>%RNI=recommended nutrient intake of folate for Korean adult.

를 섭취할 수 있는 것으로 나타났는데, 이는 의례 음식군 중에서 가장 높은 엽산 공급원이 되는 식단인 것으로 보인다.

### 후식류의 엽산 함량

총 떡 10종(부꾸미, 경단(깨), 송편(깨), 기피편, 경단(콩), 송편(콩), 메밀전병, 녹두시루떡, 수수떡, 수수팥떡), 포 2종(복어, 대구), 음료 2종(식혜, 수정과), 한과 5종(매작과, 산자, 송화다식, 약과, 유과)의 한국 의례 음식의 후식 식단의 엽산 함량을 분석한 결과 식재료의 종류에 따라 3.33~49.55 µg/100 g으로 다양하게 나타났다(Table 9). 가장 높은 엽산 함량은 49.55 µg/100 g으로 송화가루를 꿀과 혼합한 후 다식 틀에 넣어 단단하게 뭉쳐서 만드는 송화다식으로 나타났으며, 다음으로 녹두시루떡 43.39 µg/100 g, 수수팥떡 27.29 µg/100 g의 순으로 높게 나타났다. 한편 가장 낮은 엽산 함량을 보인 것은 식혜였으며(3.33 µg/100 g), 음료로 이용되는 수정과의 경우는 7.80 µg/100 g으로 식혜에 비하여 약 두 배 이상 높은 엽산 함량을 보여주었다. 경단 및 송편과 같은 떡류의 경우 속에 들어가거나 겉에 입히는 부재료인 참깨, 콩, 팥, 녹두 등의 종류에 따라 엽산 함량에 차이를 나타내어 깨경단과 깨송편이 콩경단과 콩송편에 비해 비슷하거나 조금 더 높은 엽산 함량을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 후식류 섭취를 통한 엽산 섭취 수준은 한국 일일 권장 섭취량을 기준으로 할 때 떡 3.4~10.8%, 포 2.2~4.4%, 음료 0.8~1.9%, 한과 1.3~12.4%의 수준을 섭취할 수 있을 것으로 보인다.

### 분석 품질관리

검증된 분석법을 이용하여 시료를 분석하는 경우 분석법

이 정확하다 하더라도 시료를 분석하는 기간이 증장기간 동안 지속되는 경우 분석 조건의 변화(환경요인, 기기, 실험 중 사용물질)에 따라 분석수행이 신뢰도 있게 진행되었는지를 검토하는 것은 분석으로 생산되는 성분 데이터의 신뢰성 확보를 위해 중요하다. 장기간 동안 지속되는 분석기간 중 분석 품질을 관리하기 위해 대표적으로 이용되는 것이 품질 관리도표(quality control chart, QC chart)이다. 분석 품질 관리도표의 작성을 위해 시판되는 영양 강화 밀가루를 본 연구가 수행되는 약 10개월 동안 시료 분석과 함께 분석하여 작성한 QC chart는 Fig. 1과 같다. QC 시료를 반복 분석하여 CV가 5% 이하인 분석값 13개의 평균값은 169.12±8.59 µg/100 g이었으며 이를 품질관리를 위한 기준값으로 설정하였다. 이것을 기준으로 관리 범위(LCL~UCL)를 152.21~186.03 µg/100 g으로, 그리고 조치범위(LAL~UAL)로 135.30~202.95 µg/100 g을 설정한 후 시료분석과 같이 진행된 QC 시료의 분석값을 모니터링한 결과 모두 관리 범위 안에 포함되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 분석이 진행된 약 10개월의 기간 동안 시료를 분석하는 과정이 신뢰도 높게 수행되었음을 보여주는 자료로 동일 기간에 분석된 시료의 엽산 함량 분석이 재현성 있고 정확하게 진행되었음을 보여준다 할 수 있다. 이는 본 연구에서 분석된 국내 식품 중의 엽산 함량이 국가 데이터베이스로 활용될 수 있는 신뢰도 높은 자료임을 뒷받침한다 할 수 있다.

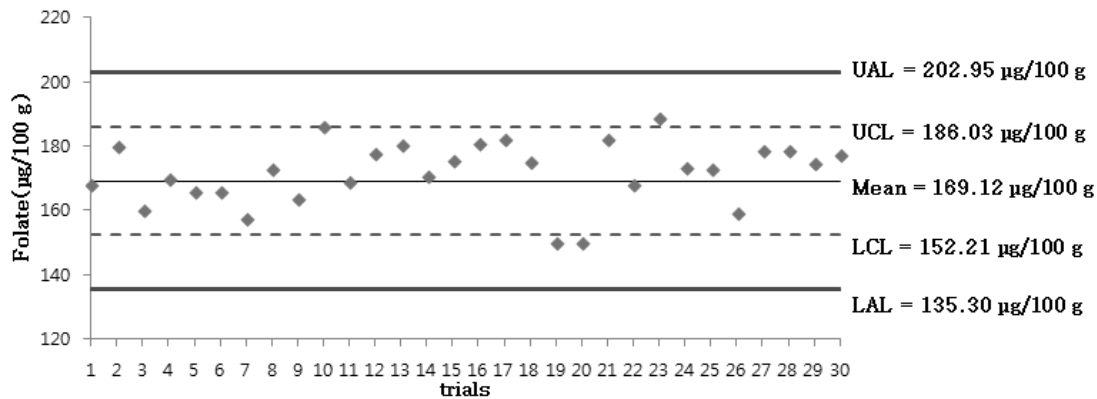
### 요 약

본 연구에서는 한국 차례 및 제사에 이용되는 식단의 엽산 함량을 분석하기 위하여 trienzyme 추출과 *Lactobacillus*

**Table 9.** Folate content of dessert prepared for the Korean ancestral rites

Dessert (n=19)	Main ingredients	Folate content (µg/100 g)	%RNI <sup>1)</sup>
<i>Songhwa-dasik</i>	Pine pollen, honey	49.55±2.39	12.4
<i>Nokdu-siruttok</i>	Rice, mung bean flour	43.39±6.29	10.8
<i>Susu-pat-ttok</i>	Millet, red bean flour	27.29±1.98	6.8
<i>Bukkumi</i>	Millet	22.80±3.12	5.7
<i>Bukeo-po</i>	Dried pollack	17.50±3.55	4.4
<i>Kke-songpyeon</i>	Sesame, rice	16.58±4.54	4.1
<i>Gipipyeon</i>	Rice, bean flour	16.44±4.68	4.1
<i>Kong-songpyeon</i>	Bean, rice	16.15±4.14	4.0
<i>Kke-gyeongdan</i>	Sesame, rice	16.01±6.31	4.0
<i>Memil-jeonbyeong</i>	Buckwheat	14.92±2.14	3.7
<i>Ssuk-ttok</i>	Mugwort, rice	13.52±2.92	3.4
<i>Kong-gyeongdan</i>	Bean, rice	11.22±1.37	2.8
<i>Maejagwa</i>	Rice, honey	10.92±1.65	2.7
<i>Daegu-po</i>	Dried codfish	8.71±2.96	2.2
<i>Yugwa</i>	Rice, honey	8.46±0.53	2.1
<i>Yakgwa</i>	Rice, honey	8.14±0.97	2.0
<i>Sujeonggwa</i>	Ginger, cinnamon	7.80±0.23	1.9
<i>Sanja</i>	Fried rice, grain syrup	5.04±3.04	1.3
<i>Sikhye</i>	Rice, malt	3.33±0.99	0.8
Mean		16.72±12.06	4.2
Range		3.33~49.55	0.8~12.4

<sup>1)</sup>%RNI=recommended nutrient intake of folate for Korean adult.



**Fig. 1.** Quality control chart of folate assay by the microplate method. Upper and lower control lines (UCL and LCL)=mean±10% of mean, upper and lower action lines (UAL and LAL)=mean±20% of mean. Each trial was the mean of duplicate determinations done once or twice a week.

case를 이용한 microplate assay법을 검증하고, 이를 적용하여 분석하는 동안 분석 품질관리를 수행하여 분석 결과의 신뢰도를 확보하였다. 인증표준물질을 이용한 정확성 검증으로 분석값이 인증값의 상대표준 오차 범위 안에 포함되는 값을 얻었으며 식품군을 대표하는 시료를 선정하여 엽산 표준용액을 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료를 함께 분석하여 엽산 회수율을 측정 시 96.0~106.2%를 얻어 정확성이 높은 분석법임을 확인하였다. Repeatability와 reproducibility로 측정한 미생물학적 분석법의 정밀성 모두 5% 미만의 값을 얻어 정밀성이 우수함을 확인하였다. 제사 음식 중의 엽산 함량은 국 및 탕류(4.62~18.84 µg/100 g)에서는 토란국이 가장 높은 함량을 나타내었으며, 나물류(6.13~48.40 µg/100 g)에서는 미나리나물, 적 및 전류(5.49~49.50 µg/100 g)는 홍합산적, 찜류(10.34~38.88 µg/100 g)에서는 도미찜, 후식류(3.33~49.55 µg/100 g)에서는 송화다식이 엽산 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 한국 의례 음식의 섭취는 1회 100 g 섭취 시 성인 일일 권장 섭취량의 0.8~12.4%의 수준까지 엽산을 섭취할 수 있으며, 한상차림으로 섭취 시 평균 약 28.1%의 엽산을 섭취할 수 있는 것으로 보인다. 본 연구가 진행된 약 10개월 동안 분석 품질관리를 수행하였으며 품질관리도표(quality control chart)의 관리를 통하여 본 연구에서 진행된 모든 분석이 관리 하에 진행되었음을 확인할 수 있었으며 이는 본 논문에서 보고하는 총 59종의 한국 차례 및 제사 음식의 엽산 함량이 신뢰도 높게 분석되어 국가 엽산 함량 데이터로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처의 연구개발비(13162미래식162)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Ji HJ, Kim S, Yon M, Hyun T. 2009. Folate content of fast foods and processed foods. *Korean J Nutr* 42: 397-405.
- Arcot J, Shrestha A. 2005. Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci Technol* 16: 253-266.
- Ruggeri S, Vahteristo LT, Aguzzi A, Finglas P, Carnovale E. 1999. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 855: 237-245.
- Min HS, Kim CK. 1996. A study of blood folate levels in adolescent girls. *Korean J Nutr* 29: 104-111.
- Ball GFM. 2012. *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*. CRC Press, London, UK. p 231.
- Chang N, Kang M, Paik HY, Kim IH, Cho YW, Park SC, Shin YW. 1993. Serum folate and iron levels of pregnant, lactating, and non-pregnant, non-lactating women. *Korean J Nutr* 26: 67-75.
- Kang M, Chang N. 1993. Effect of dietary folate intakes on serum folate levels of pregnant and lactating women. *Korean J Nutr* 26: 433-442.
- Choe JS. 2003. Study on frequently consumed dishes and menu patterns of middle-aged housewives for 1 year. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 764-778.
- Tamura T. 1990. Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, eds. John Wiley & Sons Press, New York, NY, USA. p 121-137.
- Kariluoto S, Vahteristo L, Finglas PM, van den Berg H, Carnovale E, Jagerstad M. 2001. Intercomparison of current methods for folate determination in food. Proceeding of Fourth International Food Data Conference, Bratislava, Slovakia. p 40-41.
- Smith JS. 1998. Evaluation of analytical data. In *Food Analysis*. 2nd ed. Nielsen S, ed. Aspen Publication, Gaithersburg, MD, USA. p 67.
- Chun J, Martin JA, Chen L, Lee J, Ye L, Eitenmiller RR. 2006. A differential assay of folic acid and total folate in foods containing enriched cereal-grain products to calculate µg dietary folate equivalents (µg DFE). *J Food Compos Anal* 19: 182-187.
- AOAC. 2002. *AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals*. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. p 12-13.
- FDA. 1994. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Proce-



- dures: Text and Methodology. Current step 4 version, parent guideline dated 27 October. (Complementary guideline on methodology dated 6 November, 1996 incorporated in November 2005). U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA. p 11-12.
15. Kim YM. 1979. The measurement of folacin content in Korean foods – Part 3. Folate distribution in various foods –. *Korean J Nutr* 12: 53-63.
  16. National Academy of Agricultural Science. 2006. *Food component table*. 7th revision. Rural Development Administration, Suwon, Korea. p 27-79.
  17. Kim YM. 1977. The measurement of folacin content in Korean foods – Part 1. Folate distribution in vegetables. *Korean J Nutr* 10: 84-91.
  18. The Korean Nutrition Society. 2010. *Dietary reference intakes for Koreans 2010*. Seoul, Korea. p 149-165.
  19. Min HS. 1998. Changes of folate content in spinach by cooking and storage – The comparisons of thermal destruction and loss of folate into cooking water by blanching time of spinach –. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 286-290.
  20. Williams VR, Fieger EA. 1946. Oleic acid as a growth stimulant for *Lactobacillus casei*. *J Biol Chem* 166: 335-343.
  21. Williams WL, Broquist HP, Snell EE. 1947. Oleic acid and related compounds as growth factors for lactic acid bacteria. *J Biol Chem* 170: 619-630.
  22. Chen L, Eitenmiller RR. 2007. Single laboratory method performance evaluation for the analysis of total food folate by trienzyme extraction and microplate assay. *J Food Sci* 72: C243-C247.