

Trienzyme과 *Lactobacillus casei*를 이용한 국내 수산 자원의 엽산 분석 및 유효성 검증

정보미¹ · 남기호² · 김연계² · 천지연^{1,*}

¹순천대학교 식품공학과, ²국립수산물과학원 식품위생가공과

Validation of a trienzyme-*Lactobacillus casei* method for folate analysis in fishery resources consumed in the Korean diet

Bomi Jeong¹, Ki-Ho Nam², Yeon-Kye Kim², and Jiyeon Chun^{1,*}

¹Department of Food Science and Technology, Suncheon National University

²Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science

Abstract Fishery resources have been widely consumed as protein- and vitamin-rich food sources in the Korean diet. However, information regarding their vitamin levels is extremely limited. In this study, trienzyme-*Lactobacillus casei* method was validated and used to determine the folate contents in fishery foods. The trienzyme-*L. casei* method for folate analysis showed excellent accuracy (85.2 to 95.3% recovery) and precision (repeatability 1.4% RSD and reproducibility 2.4% RSD). Folate contents of 20 fish foods (4 fish, 3 crustaceans, 3 sea algae, 3 cephalopods, 4 shellfish, and 3 others) ranged from 1.75 to 97.98 µg/100 g. Furthermore, we found that the folate content in seaweed fusiforme was the highest, followed by gulfweed (69.73 µg/100 g). Folate analysis using the trienzyme-*L. casei* method was determined excellent based on the z-score of -0.3 in the Food Analysis Performance Assessment Scheme test. Analytical and method validation data generated in this study could be used to update the national food composition table on vitamin B₉ in Korean fishery resources.

Key words: fishery resources, folate, validation, database, vitamin

서 론

최근 건강에 관한 관심이 높아지면서 탄수화물, 지방, 단백질과 같은 다량영양소(macro-nutrient)의 균형있는 식단뿐만 아니라 비타민과 같은 미량영양소(micro-nutrient)를 고루 섭취할 수 있는 식단에 대한 요구가 증가하고 있다. 수산 자원은 물속에서 자라는 어패류 및 해조류 등을 총칭하며, DHA (docosahexaenoic acid)와 EPA (eicosapentaenoic acid)와 같은 고도의 불포화지방산, 필수아미노산, 비타민 등 다양한 영양소뿐만 아니라 키틴, 타우린 등 다양한 기능성 성분을 함유하고 있어 우수 건강 자원으로 평가되고 있다(Kris-Etherton 등, 2002). 한국은 삼면이 바다로 둘러싸여 있는 지리적 특성으로 인하여 영양적으로 우수한 수산 자원이 풍부하여 식단에서 널리 이용되고 있으나 국내 수산 자원의 영양성분에 관한 연구는 일부 특정 지역과 품종에 국한하여 단편적으로 수행되어 있다. 또한, 수산 자원의 비타민 함량에 대한 국가 데이터베이스의 경우 B₁, B₂, B₃, C 및 A 등의 항목에만 국한하여 구축되어 있으며 그 외의 성분들은 국외 데이터를 인용하거나 분석법 검증이 누락된 노후 데이터를 사용하고 있는

실정으로 국내 수산 자원의 비타민에 대한 신뢰성 있는 데이터 베이스 구축이 시급한 실정이다.

수용성 비타민 중 엽산(folate)은 비타민 B₉으로 불리며 프테리딘(pteridine), 파라아미노벤조산(para-aminobenzoic acid) 및 글루탐산(glutamate)이 결합한 프테로일글루탐산(pteroylglutamic acid)의 기본 구조를 가지고 있다. 식품 중에 존재하는 엽산은 주로 환원형(tetrahydrofolate)으로서, 체내에서 다양한 형태의 단일 탄소단위를 운반하여 성장 발달 및 핵산 합성의 조효소 역할을 담당한다(Bailey, 2010). 성인 기준의 엽산 일일요구량은 400 µg/DFE 100 g 수준으로(The Korean Nutrition Society, 2015) 결핍 시 세포분열이 활발하게 일어나는 골수, 점막 또는 생식기관 등의 세포에 영향을 주어 거대적아구증, 치매, 위장장애가 나타나며 혈장 호모시스테인 농도를 증가시켜 심혈관계 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Ruggeri 등, 1999; Youn, 2005). 또한, 임신 중 여성의 경우 엽산 섭취(일일요구량 800 µg/DFE 100 g) 부족 시 신경관손상(neural tube defect)에 의한 기형아 출산율이 높아지는 것으로 보고되어 있다(Ahn 등, 2000). 이러한 엽산 결핍을 막기 위하여 미국의 경우 주식으로 이용되는 밀가루의 엽산 강화를 의무화하여 기형아 출산율을 낮추는 영양보건정책을 유지하고 있으며, 유럽의 경우 엽산 강화를 권장(recommendation)하는 영양정책을 운영하고 있다(Park 등, 2017). 반면, 우리나라의 경우 엽산이 풍부한 다양한 자원을 고루 식단에 이용하고 있어 자율적인 식단 선택을 통해 엽산의 섭취 수준을 유지해오고 있으나, 최근 서구식 식단과 HMR (home meal replacement) 등과 같은 간편식 이용이 증가함에 따라 한국 식단의 엽산 섭취 수준 모니터링

*Corresponding author: Jiyeon Chun, Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

Tel: +82-61-750-3258

E-mail: cjyfall@sunchon.ac.kr

Received September 21, 2020; revised October 7, 2020;

accepted October 9, 2020

링과 올바른 국민건강보전 정책 수립을 위해서는 국내 다빈도 소비 자원에 대한 정확한 엽산 함량분석 및 분석법 검증을 통한 데이터의 신뢰도 확보가 주요한 선행 요건이라 하겠다.

식품 내 엽산은 대부분 그 형태가 매우 다양하여 정확한 정량 분석이 어려운 것으로 알려져 있어 enzyme protein binding assay (EPBA), high performance liquid chromatography (HPLC) 및 microbiological assay 등 다양한 분석법이 이용되었다(Tamura, 1990). EPBA는 엽산에 민감하고 분석 시간이 짧은 장점이 있으나 분석 키트의 유통기한이 짧고 di-와 poly-glutamates 형으로 존재하는 엽산 분석에 적합하지 않으며, 실험자에 따라 결과값이 상당한 차이를 보이는 것으로 보고되어 있다(Arcot 등, 2005). 한편, HPLC법은 엽산 이성질체에 대한 높은 특이성을 가지고 있으나 식품의 복잡한 matrix로 인하여 미생물학적 분석법에 비해 약 30-40% 정도 낮은 분석 결과를 나타내는 것으로 보고되어 있다(Kariluoto 등, 2001). 반면, 엽산의 농도에 반응하여 성장하는 미생물을 이용한 정량법의 경우 기기분석법에 비하여 분석 시간이 길고 분석자의 숙련도가 요구됨에도 불구하고 매우 낮은 수준의 엽산 농도에도 미생물이 민감하게 반응하여 mono-부터 polyglutamate까지 측정할 수 있어 가장 효과적인 분석 방법으로 알려져 있다(Arcot 등, 2005). 현재 식품 중 엽산이 당 구조체 및 단백질과 결합되어 있어 protease와 amylase를 이용한 추출과 polyglutamate 형태를 mono-glutamic acid로 전환하는 folate conjugase를 사용하는 trienzyme 추출법에 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469)를 정량법에 적용하는 방법이 정확성과 정밀성이 높은 효율적인 방법으로 보고되어 있다(Tamura, 1990). 국내에서 이용되는 수산 자원은 종에 따라 다양한 matrix의 차이를 나타내고 있어 성분 분석을 위해서는 분석법 적용을 위한 유효성 검증에 관한 병행 연구가 필요하다.

본 연구에서는 trienzyme을 이용한 엽산 추출 및 *L. casei*를 이용한 엽산 정량법의 유효성을 검증하고 국내에서 이용되는 다양한 수산 자원의 엽산 함량 분석에 적용하였다. 분석수행지표(직선성, 민감성, 정밀성, 정확성) 평가를 통해 분석법의 유효성을 검증하였으며 수산자원별 매트릭스에 따른 분석 유효성을 비교하여 국내 수산식품 데이터베이스 마련을 위한 신뢰도를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

엽산(folic acid) 분석에 사용된 표준품은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 엽산 균주는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469)를 구입하여 사용하였다. 엽산 분석 시 사용된 효소인 protease, α -amylase는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였으며, folate conjugase는 Pel-Freeze Biologicals (Rogers, AR, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 사용된 시약 및 용매는 GR 등급 및 HPLC 등급 이상을 구매하여 사용하였다. 분석법의 정확성 검증을 위해 NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)에서 인증표준물질(certified reference materials, CRM) 1849a (infant/adult nutritional formula) 및 3290 (dry cat food)을 구입하여 사용하였다. 정밀성 검증을 위한 분석품질관리(quality control, QC) 시료는 엽산 강화 밀가루(Rogers, commercial folate fortified flour, premium hard wheat flour, Armstrong, Canada)를 사용하였다.

시료 준비

국내 수산자원을 표준수산물 성분표 분류군에 따라 총 6군(어류, 갑각류, 두족류, 해조류, 패류 및 기타 수산물)으로 분류하여 대표 시료를 선정하였다. 선정된 어류 4종(떡대, 청어, 눈볼래 및 참다랑어), 갑각류 3종(대롱수염새우, 갯가재 및 꽃게), 해조류 3종(모자반, 톳 및 쇠미역), 두족류 3종(갈고리현오징어, 살오징어 및 문어), 패류 4종(피조개, 홍합, 참소라 및 진주담치) 및 기타 수산물 3종(명게, 미더덕 및 해삼)은 국립수산물과학원(National Fisheries Research and Development Institute, NIFS) 식품위생과 공과에서 비가식부를 제외하고 균질화한 다음 소포장 후 ice pack을 동봉하여 분석실로 배송되어 분석 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

분석법 검증

단일실험실(single laboratory)을 위한 AOAC 분석법 검증 가이드라인(2002)에 준하여 분석법 검증은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 농도에 따라 반응하는 분석 정량법의 상관성은 표준물질을 단계회석하여 미생물학적 분석법으로 분석하였으며 검출된 흡광도와 농도를 변수로 계산하여 도출된 검량선의 상관계수(R^2) 값을 이용하여 확인하였다. 엽산의 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 공시험액을 단계적으로 회석하여 계산이 가능한 최소 농도의 평균 O.D.값에 표준편차 값의 3배와 10배를 각각 더하여 산출하였다(AOAC, 2002). 정확성 검증을 위해 NIST에서 구입한 인증표준물질의 참값과 분석값을 비교하여 회수율(%)로 나타내었으며, 정밀성 검증은 각 QC 시료를 5일 동안 3반복으로 1회씩 분석하여 재현성(reproducibility)을 평가하였으며, 하루에 3반복으로 5회 분석하여 반복성(repeatability)을 평가하였다.

분석품질관리

분석품질관리는 내부 및 외부 수준으로 이루어졌으며 내부 분석품질관리는 AOAC 가이드라인(2002)에 준하여 분석품질 관리도표(QC chart)를 작성하여 관리하였다. QC 시료는 최소 10회 이상 반복 분석하였으며, 그중 상대표준편차가 5% 이내에 들어가는 분석값 10개를 선정한 뒤 평균값을 산출하였다. 평균값을 기준으로 관리 상하한선(upper and lower control line, UCL and LCL) 및 조치 상하한선(upper and lower action line, UAL and LAL)을 설정하여 QC chart를 작성한 뒤 시료 분석기간 동안의 분석품질관리를 위한 지표로 사용하였다. 관리 및 조치를 위한 계산식은 다음과 같다.

$$UCL \text{ and } LCL = \text{mean of analyte content} \pm 2 \times \text{standard deviation}$$

$$UAL \text{ and } LAL = \text{mean of analyte content} \pm 3 \times \text{standard deviation}$$

분석숙련도 평가

분석숙련도 평가는 영국 환경식품농림부(Department for Environment, Food and Rural Affairs, DEFRA)에서 주관하는 국제정도관리 분석능력시험인 Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) PT 21118에 참여하여 평가하였으며 총 20개 국제적인 실험실의 분석 결과와 z-score를 비교하여 분석숙련도를 비교 평가하였다.

엽산 추출 및 분석

엽산 추출은 Chun 등(2006)의 방법에 따라 protease, α -amylase, folate conjugase를 각각 처리하는 trienzyme 추출법을 사용하였다.

시료 0.5-1.0 g을 100 mL 삼각플라스크에 칭량하였으며, 5% 이상의 지방을 함유한 시료의 경우 hexane을 가하여 지방을 제거한 다음 사용하였다. 시료를 칭량한 삼각플라스크에 phosphate buffer (pH 7.8) 20 mL와 증류수 30 mL를 가한 후 100°C 항온수조(WB-20M, Jeio Tech, Daejeon, Korea)에서 15분간 열탕 처리한 후 실온으로 냉각시켰다. 냉각시킨 삼각플라스크에 phosphate buffer (pH 7.8) 10 mL와 protease 용액(2 mg/mL) 1 mL를 가한 후 37°C shaking incubator (HB-201SF, Han-Baek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 3시간 반응시킨 후 100°C의 항온수조에서 10분간 열처리하여 protease 반응을 정지시켰다. 삼각플라스크를 실온으로 냉각시킨 다음 toluene 0.5 mL과 α -amylase (20 mg/mL) 1 mL를 가한 후 37°C shaking incubator에서 2시간 동안 반응시켰다. Conjugase (5 mg/mL in pH 7.8 assay buffer)를 4 mL 첨가한 다음 최대 16시간 동안 37°C shaking incubator에서 반응시켰다. 100°C 항온수조에서 5분간 열탕 처리한 후 실온으로 냉각시켰으며, 냉각한 시료 추출액은 pH를 4.5로 조정 후 100 mL로 정용하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.1, GE Healthcare, Amersham, UK)로 여과하여 정량 분석에 사용하였다.

엽산 함량 분석은 엽산 농도에 따라 반응하는 *L. casei*가 생육하는 정도를 측정하는 미생물학적 방법을 이용하였으며, microplate reader (Eon, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 측정하였다. *L. casei*는 microplate assay 측정 당일에 depletion media (Lactobacilli broth:folic acid casei medium=1:1)에 접종하여 약 6시간 동안 37°C incubator에서 배양했다. 시료 추출액, L-ascorbic acid와 엽산 표준용액은 0.45 μ m membrane filter (Advantec, Tokyo, Japan)로 여과 후 사용하였다. Microplate에 멸균 증류수를 이용하여 시료 추출액(150 μ L)을 6단계로 희석한 후 folic acid casei 배지 15 mL, L-ascorbic acid 150 μ L과 depletion media 75 μ L를 혼합한 배지를 각 well에 150 μ L씩 가하여 37°C incubator에서 18-20시간 배양하였다. 배양된 microplate의 각 well을 균일하게 혼합한 다음 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 측정 후 분석 소프트웨어(Gen5, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 엽산 표준용액 농도에 따른 *L. casei* 성장 곡선을 나타냈으며, 엽산 함량은 μ g/100 g으로 나타내었다.

결과 및 고찰

분석법 검증

수산 자원의 엽산 분석에 적용할 trienzyme-*L. casei* 분석법의 유효성 검증은 AOAC 분석법 검증 가이드라인에 따라 직선성, LOD, LOQ, 정확성 및 정밀성 지표를 분석하여 평가하였다. 먼저, 엽산 분석법의 엽산 농도에 대한 *L. casei*의 성장 반응의 상관성을 분석(소프트웨어 Gen5, BioTek Instruments)한 결과 다항회귀(polynomial regression)식 $y=4-1.132/((1+X/0.0502)^{1.02})+1.26$ 을 얻었으며 상관계수(R^2) 값은 1.0000으로 농도에 대한 반응도가 매우 높음을 확인할 수 있었다(Table 1). 한편 식품 중 엽산과 같은

Table 1. Regression model and limits of detection and quantification for folate analyses

Parameters	Results
Range (ng/mL)	0.0006-0.2000
Regression equation ¹⁾	$y=4-1.132/((1+X/0.0502)^{1.02})+1.26$
Correlation coefficient, R^2	1.0000
LOD ²⁾ (μ g/100 g)	0.562
LOQ ³⁾ (μ g/100 g)	1.057

¹⁾y and X of the regression equation for folate indicate UV absorbance value at 595 nm and the concentration of folate (μ g/mL), respectively.

²⁾Limit of detection.

³⁾Limit of quantification.

수용성 비타민은 일반적으로 낮은 농도 수준으로 존재하기 때문에 적용하는 분석법이 어느 농도 수준까지 재현성 있는 분석이 가능한지 LOD와 LOQ 분석을 통해 평가하였다. 엽산 표준용액의 농도를 측정 가능한 범위까지 단계 희석하여 농도에 따라 *L. casei*의 생육도를 측정된 결과 LOD와 LOQ는 각각 0.562 μ g/100 g와 1.057 μ g/100 g으로 나타났다(Table 1). HPLC를 이용하여 영양강화밀가루의 엽산을 분석한 Alaburda 등(2008)은 분석법의 LOD와 LOQ를 각각 6.000 μ g/100 g와 19.000 μ g/100 g로 보고하였다. 이에 비하여 본 연구에서 *L. casei*를 이용한 분석법은 엽산의 검출 및 정량 수준이 낮아 엽산이 미량으로 존재하는 식품의 정량분석에도 용이하게 적용할 수 있을 것으로 보여진다. 한편, *L. casei*를 이용한 엽산 분석법의 정확성 검증을 위해 인증표준물질 SRM 1849a(infant formula)와 3290(dry cat food)을 분석하여 NIST에서 제시한 인증값(229.3 \pm 23, 600.0 \pm 100.0 g/100 g)과 비교하여 회수율을 산출한 결과 각각 85.1%와 95.3%로 나타났다(Table 2). HPLC 분석법을 이용하여 folic acid가 포함된 multivitamin tablet을 분석한 Kucukkolbasi 등(2013)은 88.3%의 회수율을 나타내었다. 이러한 회수율 수준은 AOAC 가이드라인(2002)에서 제시하는 수용범위(1 μ g/100 g일 때 70-125%) 내에 포함되는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구에서 분석한 인증표준물질은 NIST에서 제시하고 있는 인증값의 범위 내에 포함되는 것으로 수용 가능한 정확성을 나타낸다 하겠다. 본 연구는 *L. casei*를 이용한 엽산 분석법의 정밀성 검증은 AOAC 가이드라인(2002)에서 제시하는 반복성과 재현성의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD) 범위에 준하여 평가하였다. Chen과 Eitenmiller (2007)는 5가지의 CRM을 시료로 하여 trienzyme-*L. casei* 분석법으로 분석한 결과 intra-와 inter-day의 RSD (%)는 각각 3.6-10.2%와 4.7-13.8%의 범위를 나타내었다. 가이드라인은 정밀성 수용범위를 분석성분의 농도 수준이 1 μ g/g일 때 반복성과 재현성이 각각 8%와 16% 이하로 적용할 수 있다고 제시하고 있는데, 본 연구에서 사용된 *L. casei* 엽산 분석법의 반복성과 재현성 측정 결과는 각각 1.4%와 2.4%로 나타나 분석법의 정밀성이 우수함을 확인할 수 있었다(Table 2).

Table 2. Accuracy of folate analyses

Sample ¹⁾	Folate contents (μ g/100 g)		Recovery (%)
	Reference value ²⁾	Analytical value ³⁾	
SRM 1849a	229.3 \pm 23.0	218.4 \pm 1.6	95.3 \pm 0.7
SRM 3290	600.0 \pm 100.0	510.9 \pm 4.4	85.2 \pm 0.7

¹⁾SRM: standard reference material, SRM 1849a: infant/adult nutritional formula, SRM 3290: dry cat food.

²⁾The true value for the contents of corresponding analytes in SRM provided by NIST.

³⁾The analytical value produced in this study.

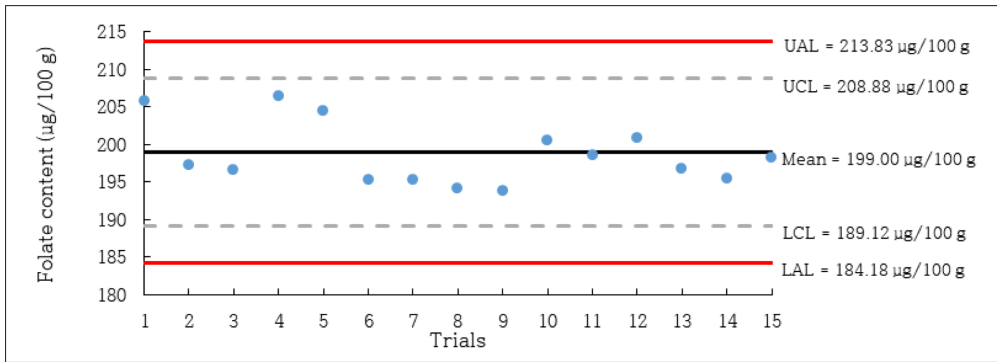


Fig. 1. A quality control charts of folate analysis. Upper and lower control lines (UCL and LCL)=mean±2×SD, upper and lower action lines (UAL and LAL)=mean±3×SD, SD: standard deviation.

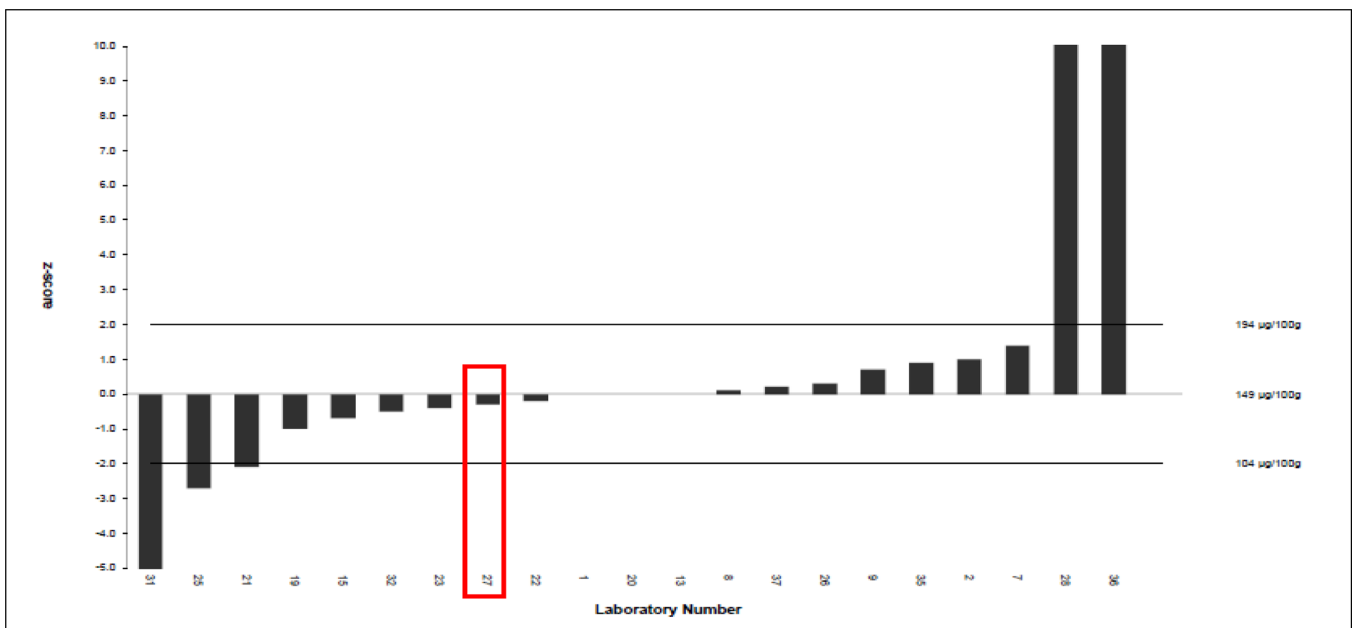


Fig. 2. z-Scores of folate analysis by twenty international laboratories participated in a FAPAS proficiency test 21118. Data with laboratory number 27 was obtained in the present study.

분석품질관리

AOAC 가이드라인(2002)에서는 데이터 신뢰도 확보를 위해 품질관리도표(quality control chart, QC chart)를 활용하는 방법을 제시하고 있다. 본 연구에서는 분석품질관리를 위해 시판되는 엽산 강화밀가루를 품질관리 시료로 선정하고, 분석 초기에 QC chart를 구축하고 연구가 수행되는 약 5개월 동안 시료를 분석할 때마다 품질관리 시료를 동시에 분석하여 구축한 QC chart에 plotting하여 분석품질을 모니터링하였다(Fig. 1). 분석 초기에 구축된 QC chart의 평균값은 199.00 µg/100 g이었으며 분석품질관리를 위한 관리상하한선 범위는 189.12-208.88 µg/100 g, 조치상하한선 범위는 184.18-213.83 µg/100 g이었다. 시료 분석 시 함께 분석된 품질관리 시료는 분석 기간 동안 모두 관리상하한선 내에 수용되는 것으로 나타나 본 연구에서 분석된 총 20종의 수산물 및 수산가공품의 엽산 분석이 모두 일정 수준의 분석품질을 유지하며 진행되었음을 확인할 수 있었다.

분석 데이터의 신뢰도 확보를 위해서는 장기간 분석이 지속되는 경우 실험 중 시약, 분석 환경, 분석자 등의 여러 요인들로 인해 변화되는 정도를 지속적으로 모니터링하여 검증된 분석법

이 적절하게 적용되고 있는지를 평가 관리하는 것이 매우 중요하다. 특히, 본 연구와 같이 미생물을 이용한 분석법을 적용하는 경우, 미생물을 다루는 분석자의 숙련도와 분석 기간 동안의 분석에 사용되는 미생물의 생육 특성 등이 분석 결과에 영향을 미치게 되므로 일반적인 기기분석이 일정한 주기별로 분석품질을 관리하는 것과 달리 미생물을 이용하는 모든 분석일에 분석품질 시료를 함께 분석하는 것이 미생물이 정상적으로 엽산 농도에 반응하고 있는지를 확인할 수 있게 된다. 이러한 분석품질관리 데이터는 본 연구에서 분석한 국내 수산 자원의 엽산 분석데이터의 신뢰성을 보여주는 것으로써 향후 국가영양성분 데이터베이스 구축 및 개정의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

분석숙련도 평가

국제정도관리 분석능력시험 프로그램 FAPAS PT-21118(영국 환경식품농림부)에 참여하여 20개 국내외 분석기관들과 엽산 분석값을 비교하여 z-score로 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. z-Score는 표준편차를 단위로 하여 분석값이 평균을 기준으로 벗어난 정도를 평가하는 것으로 일반적으로 ±2 이내 범위를 나타내면 국제

Table 3. Precision of folate analyses

Sample	Folate contents ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		
	Parameters	Repeatability ¹⁾	Reproducibility ²⁾
Commercial folate-fortified flour	Mean \pm SD ³⁾	195.86 \pm 2.75	202.14 \pm 4.77
	CV ⁴⁾ (%)	1.4	2.4

¹⁾Repeatability refers to the results of independent 5 determination in triplicates obtained by analyzing a QC sample five times on the same day.

²⁾Reproducibility refers to the results of independent 5 determinations in triplicates obtained by analyzing a QC sample five times on different days (once a day).

³⁾Standard deviation.

⁴⁾Coefficient of variation (%)=100 \times (SD/mean).

Table 4. Folate contents of fishery resources in Korea

Classification (n=20)	Roman name	English name	Scientific name	Folate content ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Fish (n=4)	<i>Cheong-eo</i>	Pacific herring	<i>Clupea pallasii</i>	10.34 \pm 0.14
	<i>Chamdalang-eo</i>	Pacific bluefin tuna	<i>Thunnus orientalis</i>	4.85 \pm 0.05
	<i>Deogdae</i>	Korean pomfret	<i>Pampus argenteus</i>	3.11 \pm 0.04
	<i>Nunboldae</i>	Blackthroat seaperch	<i>Doederleinia berycoides</i>	1.75 \pm 0.04
Crustacean (n=3)	<i>Gaetgajae</i>	Japanese squillid mantis shrimp	<i>Oratosquilla oratoria</i>	36.24 \pm 1.05
	<i>Kkochge</i>	Gazami crab	<i>Portunus trituberculatus</i>	30.50 \pm 1.06
	<i>Daelongsuyeomsaeu</i>	Razor mud shrimp	<i>Solenocera melantho</i>	20.96 \pm 0.82
Sea algae (n=3)	<i>Tot</i>	Seaweed fusiforme	<i>Hizikia fusiforme</i>	97.98 \pm 3.27
	<i>Mojaban</i>	Gulf weed	<i>Sargassum fulvellum</i>	69.73 \pm 2.43
	<i>Soemiyeok</i>	Seersucker	<i>Costaria costata</i>	12.94 \pm 0.38
Cephalopod (n=3)	<i>Chammuneo</i>	Common octopus	<i>Octopus vulgaris</i>	3.32 \pm 0.06
	<i>Sal-ojing-eo</i>	Common squid	<i>Todarodes pacificus</i>	3.16 \pm 0.09
	<i>Galgolihuin-ojing-eo</i>	Schoolmaster gonate squid	<i>Berryteuthis magister</i>	2.23 \pm 0.03
Shellfish (n=4)	<i>Honghap</i>	Mussel	<i>Mytilus coruscus</i>	45.54 \pm 0.17
	<i>Jinjudamchi</i>	Blue mussel	<i>Mytilus edulis</i>	41.42 \pm 0.79
	<i>Pijogae</i>	Ark shell	<i>Scapharca broughtonii</i>	39.13 \pm 1.38
	<i>Chamsora</i>	Spiny top shell	<i>Turbo cornutus</i>	9.10 \pm 0.28
Others (n=3)	<i>Mideodeog</i>	Warty sea squirt	<i>Styela clava</i>	33.85 \pm 0.37
	<i>Meong-ge</i>	Common sea squirt	<i>Halocynthia roretzi</i>	25.27 \pm 0.21
	<i>Haesam</i>	Black sea cucumber	<i>Stichopus japonicus</i>	2.28 \pm 0.03

적 수준의 분석속련도를 갖고 있는 것으로 평가하며, z-score가 0에 가까울수록 평균치에 가까운 값으로 우수한 결과라 평가할 수 있다. 본 연구에서 검증한 *L. casei* 엽산 분석법을 이용하여 시험 시료 중의 엽산을 분석한 결과는 141.509 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 z-score -0.3에 해당하는 값을 얻었다. 이는 ± 2 이내 범위 이내를 충족하는 수준일 뿐 아니라 0에 가까운 값으로 본 연구에서 사용된 분석법과 분석수행도가 국제적 수준의 데이터를 생산할 수 있는 수준으로 우수함을 갖추고 있다고 평가할 수 있다.

수산 자원의 엽산 함량

Trienzyme 추출 및 *L. casei* 생육도를 이용하여 다양한 수산 자원의 엽산 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 총 20종의 수산 자원의 엽산 함량은 1.75-97.98 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 비교적 넓은 범위를 나타내었으며 어류(1.75-10.34 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), 갑각류(20.96-36.24 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), 해조류(12.94-97.98 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), 두족류(2.23-3.32 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), 패류(9.10-45.54 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) 그리고 기타류(2.28-33.85 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)의 수산자원의 분류군에 따라 엽산 수준에 차이가 나타남을 확인할 수 있었다. 그 중 해조류에 속하는 툯(97.98 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)이 가장 높은 엽산 함량을 보였으며 그 다음은 모자반(69.73 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)으로 나타났다. 해조류에 속하는 쇠미역은 엽산 함량이 12.94 $\mu\text{g}/$

100 μg 으로 나타나 툯과 모자반에 비해 상당히 낮은 엽산 함량을 보였다. 국가식품영양성분표(2017)에 따르면 미역(생것)의 엽산 함량은 29 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 보고되어 있는 반면, Yon과 Hyun (2005)은 미역의 엽산 함량이 153 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 약 5배 정도 높은 엽산 함량을 보고한 바가 있다. 또한 HPLC를 이용하여 5종의 해조류의 엽산 함량(61.40-161.59 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)을 분석한 De Quiros 등(2004)은 해조류 종류에 따라 최대 약 2.5배 가량의 엽산 함량이 차이가 나타난 것을 보여주었는데, 이는 미역의 종, 서식지 그리고 채취 시기 등의 요인에 의해 함량 차이가 나타나는 것으로 판단된다.

한편 어류와 두족류의 엽산 함량은 다른 수산 자원에 비하여 상대적으로 낮은 수준을 보인 반면 갑각류와 패류는 이에 비해 상대적으로 높은 엽산 함량을 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 같은 패류와 기타류 중에서도 각각 참소라와 해삼은 같은 군에 속하는 다른 수산 자원에 비하여 엽산 함량이 비교적 낮은 수준을 나타내었다. 패류와 기타류에 분류된 미더덕, 멍게, 해삼은 주로 조류, 원생동물과 식물성 플라크톤을 먹이로 생활하는 것으로 알려져 있다. Woortman 등(2020)은 호염성 미세조류 9종의 엽산 함량을 분석한 결과 539-6470 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 매우 높은 수준의 엽산이 함유되어 있다고 보고하였는데 피조개, 홍합, 진주담치의 경우 가시부에 내장이 포함되어 있는 반면 참소라와 해삼의 경우

Table 5. Recovery of folate from various fishery resources by trienzyme extraction coupled with *L. casei* assay

Representative samples for recovery				Recovery (%)
Classification	Roman name	English name	Scientific name	
Fish	<i>Cheong-eo</i>	Pacific herring	<i>Clupea pallasii</i>	86.6±3.1
Crustacean	<i>Daelongsuyeoimsaeu</i>	Razor mud shrimp	<i>Solenocera melantho</i>	105.1±3.9
Sea algae	<i>Soemiyeok</i>	Seersucker	<i>Costaria costata</i>	103.3±0.9
Cephalopod	<i>Chammuneeo</i>	Common octopus	<i>Octopus vulgaris</i>	104.7±2.3
Shellfish	<i>Chamsora</i>	Spiny top shell	<i>Turbo cornutus</i>	108.1±5.9
Other	<i>Meong-ge</i>	Common sea squirt	<i>Halocynthia roretzi</i>	94.2±2.0

내장을 포함하고 있지 않아 엽산 함량에 차이가 발생한 것으로 생각된다. 한편 본 연구에서 분석한 멧게와 해삼의 엽산 함량은 우리나라 해역과 가까운 일본에서 분석한 멧게(32 µg/100 g)와 해삼(4 µg/100 g)의 엽산 함량과 유사한 수준을 나타내는 것으로 확인되었다(Standard Tables of Food Composition in Japan, 2015).

한편, 수산 자원 6개 분류군별 matrix 특성을 확인하기 위하여 trienzyme-*L. casei*법의 엽산 회수율(recovery)을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 회수율은 각 군별로 엽산 농도 수준의 100% 수준이 되도록 엽산 표준용액을 가하여 분석하였다. 어류에 속하는 청어가 86.6%로 가장 낮은 회수율을 보였으며 다른 5개 분류군 시료의 회수율은 94.2-108.1%로 보다 높은 수준을 나타내었다 (Table 5). AOAC 분석법 검증 가이드라인(2002)은 시료 중 분석하고자 하는 성분의 함량 수준에 따라 회수율 수용범위를 다르게 제시하고 있는데, 시료 중 분석성분 1 µg/g 수준에서는 회수율 75-120%, 10 µg/kg에서는 70-125%의 범위가 신뢰도가 확보된 수용 가능한 회수율 수준으로 제시하고 있다. 본 연구에서 분석한 20종의 수산물의 엽산 함량 범위는 1.75-97.98 µg/100 g 수준이며 6개 군별 시료로부터 얻은 회수율 86.6-108.1%는 가이드라인이 제시하는 1 µg/g 수준의 회수율 75-120% 범위 내에 속하는 값으로 모두 수용 가능하므로 본 연구에서 사용한 trienzyme-*L. casei* 분석법을 수산 자원에 적용할 때 국제적 수준의 정확성을 보이는 신뢰도를 나타낸다 할 수 있겠다.

요 약

본 연구에서는 trienzyme 추출 및 *L. casei* 분석법을 국내 다양한 수산 자원의 엽산 분석에 적용하기 위해 분석수행지표(직선성, 민감성, 정확성, 정밀성)를 분석 평가하여 분석법의 유효성을 검증하였다. 분석법의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.562 µg/100 g와 1.057 µg/100 g으로 엽산 함량이 낮은 식품에 적용할 수 있는 분석법으로 나타났다. 시료 중 엽산 함량에 대한 *L. casei* 생육 관계는 다항식 모델($y=4-1.132/((1+X/0.0502)^{102})+1.26$)로 분석한 결과 $R^2=1.0000$ 을 나타내는 우수한 상관성을 얻었다. 또한, 분석법의 정확성과 정밀성이 우수한 수준임을 확인할 수 있었으며, 수산 자원 6개 군별로 따른 엽산 회수율 분석에서도 약 87-108%의 신뢰도가 확보된 회수율을 나타냄을 확인하였다. 본 연구에서 분석한 수산자원 20종의 엽산 함량분석 및 검증 데이터는 국내 수산 자원에 대한 신뢰도 있는 데이터베이스 구축 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 한국은 삼면이 바다로 인접된 지리적 특성으로 인하여 일상 식단에서 다양한 수산 자원이 자주 이용되고 있는 바 trienzyme-*L. casei* 분석법을 향후 수산 자원의 엽산 함량 분석에 확대 적용하여 국가수준의 영양성분데이터베이스 구축에 기여할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 국립수산물과학원 수산시험연구소사업(R2020053)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

Ahn HS, Kim JS, Lee GJ, Kim YT. Serum folate levels of maternal-umbilical cord blood and pregnancy outcomes. *Korean J. Food Nutr.* 33: 840-847 (2000)

Alaburda J, de Almeida AP, Shundo L, Ruvieri V, Sabino M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. *J. Food Compos. Anal.* 21: 336-342 (2008)

AOAC. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. pp. 2,12-13,22,25,26 (2002)

Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci. Tech.* 16: 253-266 (2005)

Bailey LB. Folate in health and disease. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp. 2-19 (2010)

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)

Chun, J, Martin JA, Chen L, Lee J, Ye L, Eitenmiller RR. 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 (2006)

De Quirs ARB, De Ron CC, Lopez-Hernandez J, Lage-Yusty MA. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1032: 135-139 (2004)

Kariluoto S, Vahteristo L, Finglas PM, van den Berg H, Carnovale E, Jagerstad M. Intercomparison of current methods for folate determination in food. *Proceeding of Fourth International Food Data Conference, Bratislava, Slovakia.* pp. 40-41 (2001)

Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106: 2747-2757 (2002)

Kucukkolbasi S, Bilber O, Ayyildiz HF, Kara H. Simultaneous and accurate determination of water-and fat-soluble vitamins in multi-vitamin tablets by using an RP-HPLC method. *Quim. Nova* 36: 1044-1051 (2013)

Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). Standard Tables of Food Composition in Japan. 7th ed. Tokyo, Japan. pp. 120-151 (2015)

Ministry of Health and Welfare, The Korean Nutrition Society. Dietary reference intakes for Koreans 2015. *Sejong.* pp. 489-493 (2015)

Park SJ, Park SH, Chung HJ, Lee JS, Hyun TS, Chun JY. Effects of different cooking methods on folate retention in selected mushrooms. *Korean J. Food Preserv.* 24: 1103-1112 (2017)

Ruggeri S, Vahteristo LT, Aguzzi A, Finglas P, Carnovale E. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*

- 855: 237-245 (1999)
- Rural Development Administration (RDA). National Standard Nutrient Database. 9th ed. Jeonju, Korea. pp. 370-373 (2017)
- Tamura T. 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. pp. 121-137 (1990)
- Wortman DV, Fuchs T, Striegel L, Fuchs M, Weber N, Brck TB, Rychlik M. Microalgae a superior source of folates: Quantification of folates in halophile microalgae by stable isotope dilution assay. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7: 481 (2020)
- Yon MY, Hyun TS. Additional data for the folate database for foods common in Korea. *J. Nutr. Health.* 38: 586-604 (2005)
- Youn HS. New nutritional concepts of vitamins and minerals. *Korean J. Pediatr.* 12: 1295-1309 (2005)