



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

고엽산 생산능 선발 유산균을  
이용한 공동 배양과 pH-조절 발효  
조건에서의 엽산 생산

**Screening of lactic acid bacteria for strong  
folate synthesis and production of folate  
under co-culture and pH-controlled culture  
conditions**

2014년 2월

서울대학교 대학원

식품영양학과

두 경 민

고엽산 생산능 선발 유산균을  
이용한 공동 배양과 pH-조절 발효  
조건에서의 엽산 생산

**Screening of lactic acid bacteria for strong  
folate synthesis and production of folate  
under co-culture and pH-controlled culture  
conditions**

지도교수 지 근 익

이 논문을 생활과학석사학위논문으로 제출함  
2013 년 11월

서울대학교 대학원  
식품영양학과  
두 경 민

두경민의 생활과학석사학위논문을 인준함  
2014 년 1월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 국문초록

엽산은 수용성 비타민 B군으로, 생체 내에서 아미노산 및 핵산 합성의 필수 성분으로 세포 분화 및 성장에 중요한 역할을 한다.

한국인 엽산 일일 권장량은 200-400  $\mu\text{g}$ 이며, 임산부는 600  $\mu\text{g}$ 이다. 본 연구에서는 강력한 엽산 생성능력이 있는 유산균을 선발하여 엽산 생성을 증가시키는 것이 목적이다. 엽산 정량을 위해 엽산 의존성 균주인 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237을 이용한 microbiological assay법을 이용하였다. 유산균으로부터 생성된 엽산의 정성분석을 위해 LC-MS/MS(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry)을 이용하였다. 총 67 균주의 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 중 3 균주인 *Lactobacillus plantarum* Fol 708, *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608, *Lactobacillus brevis* 651에서 상대적으로 높은 엽산 생성을 확인하였다.

엽산 생성이 확인된 균주 중 가장 높은 생성을 보인 *Lactobacillus plantarum* Fol 708과 *Lactobacillus brevis* GABA 100을 1% glutamic acid가 첨가된 배지에서 공동 배양하여 *Lactobacillus plantarum* Fol 708 단독 배양한 경우와 엽산 생성을 비교하였다. *Lactobacillus plantarum* Fol 708의 엽산 생성은 단독 배양 조건보다, 공동 배양 조건에서 높은 생성을 확인하였다. 엽산 생성이 우수한 *Lactobacillus plantarum* Fol 708을 배양 초기부터 pH 조건을 각각 4.5, 5.5, 6.5 로 고정한 후, 각각의 pH에서 엽산 생성을 비교해 본 결과 pH 5.5에서 가장 높은 생성을 확인하였다. 이러한 높은 엽산 생성이 확인된 *Lactobacillus plantarum* Fol 708을 이용하면, 기존에 널리 연구된 유제품을 이용한 엽산 제품 이외에

한국의 전통 음식인 김치 등의 발효식품을 이용한 제품 개발 및 응용을 통한 엽산 공급의 효과를 기대해 볼 수 있다.

**주요어** : 엽산, 발효음식, 공동 배양, Lactobacilli, Microbiological assay, LC-MS/MS

**학 번** : 2012-21489

# 목 차

국문 초록 .....	i
목차 .....	iii
표목차 .....	v
그림목차 .....	v
I. 서 론 .....	1
II. 실험재료 및 방법 .....	4
1. 사용 균주 및 성장 조건 .....	4
2. 엽산 생성 균주 확인 .....	5
3. Microbiological assay를 이용한 엽산 생성 균주의 정량 분석 .....	6
4. <i>L. plantarum</i> Fol 708에서 생성된 엽산의 정성 분석 .....	8
5. <i>L. plantarum</i> Fol 708과 <i>L. brevis</i> GABA 100의 우유 배지 내 공동 배양을 통한 엽산 생성 .....	9
6. pH-조절 발효조건에서 <i>L. plantarum</i> Fol 708으로부터 생성된 엽산 정량분석 .....	10
III. 실험결과 및 고찰 .....	11
1. 엽산 생성 균주의 탐색 .....	11
2. 선발 균주의 엽산 정량 분석 .....	13
3. <i>L. plantarum</i> Fol 708의 엽산 정성 분석 .....	16
4. <i>L. plantarum</i> Fol 708과 <i>L. brevis</i> GABA 100의 우유배지 내 공동 배양을 통해 생성된 엽산 정량 분석 .....	17
5. pH-조절 발효조건에서 <i>L. plantarum</i> Fol 708의 엽산 생성 정량 분석 .....	20

IV. 요약 및 결론 .....	25
참고문헌 .....	26
Abstract .....	30

## 표 목 차

Table 1. Plate screening of folate synthesizing strains .....	12
---	----

## 그 립 목 차

Figure 1. Quantification of synthesized folate from the selected strains in FACM media by microbiological assay .....	15
Figure 2. Concentration of folate in culture of <i>L. plantarum</i> Fol 708 and <i>L. brevis</i> GABA 100 .....	19
Figure 3. Concentrations of folate and dry-weight of the cell grown in different pH-controlled media .....	23



## I. 서론

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 3-11 개 결합된 poly-glutamate 형태이고, 보충제 형태는 glutamate가 1 개 결합된 mono-glutamate 형태를 이루고 있다(7). 또한 엽산을 구성하는 pteridine ring의 5, 6, 7, 8번 자리가 식품에 존재하는 엽산의 경우에는 수소가 결합된 환원된 형태로 되어 있으며, 보충제 형태의 엽산은 수소가 제거된 산화된 형태로 되어 있다(7). 임신 중 엽산 섭취가 부족해지면 태아 발생 과정에서 신경관 형성이 제대로 이루어지지 않게 되므로, 이러한 증상을 예방하기 위해 가임기 여성의 엽산 보충제 섭취가 권장되고 있다. 최근 연구 결과에 따르면 성인 기준으로 엽산을 일일 권장량 수준으로 꾸준히 섭취할 경우, 심혈관계 질환 및 각종 암, 빈혈, 성장 지연 등을 예방할 수 있다는 연구 결과가 보고되고 있다(1). 한국인 엽산 일일 권장량은 성인의 경우 200-400  $\mu\text{g}$  이며, 임신부의 경우 600  $\mu\text{g}$  이다. 엽산의 주요 급원은 녹색 채소와 일부 유산균 발효 식품이다(6). 엽산의 형태는 folate(천연 형태)와, folic-acid(합성 형태), 그 외 pteroyl-L-glutamate으로 되어있으며(6), 보충제인 folic acid는 간에서 tetrahydrofolate, 또는 다른 형태의 folate로 전환된 후에 생리 활성을 나타내어 체내에서 이용된다(5). 가임기 여성 및 임신부에 필수적인 엽산의 공급을 위해 미국과 캐나다를 비롯한 일부 국가에서는 곡류 및 유제품에 folic-acid를 첨가하는 영양 강화 프로그램을 이용하여 엽산을 공급하고 있다(7). 하지만 이러한 엽산 영양 강화 프로그램의 인체 영향을 연구한 일부 연구결과에서 과도한 folic-acid 섭취

로 인해 혈액 내의 vitamin B<sub>12</sub>의 부족을 진단하기 어렵게 한다는 점이 보고 되었으며(6), 이러한 문제점에 대한 해결 방안으로 미생물을 이용하여 생성된 엽산을 공급하는 방안이 제시된 바 있다(2). 우유에는 기본적으로 엽산의 함량이 부족하다(7). 하지만 미생물을 통한 유제품 발효 식품에서 엽산의 함량이 상당히 증가하는 것을 확인하였다(7). 이를 통해 발효 유산균 중 엽산의 생성을 증가시킬 수 있는 균주의 선발 및 활용에 대한 연구가 진행되었으며, 실제로 *Streptococcus thermophilus*의 경우에는 상업 균주로서 엽산 생성에 이용되고 있다(5). 유제품 이외에도 밀가루 반죽을 발효시켜 엽산을 공급하는 방안도 연구되고 있다(7).

이러한 유산균을 통한 엽산 공급의 사례를 토대로, 본 실험에서는 프로바이오틱스로서의 장점을 갖는 유산균들을 대상으로 하여 엽산 생성 균주에 주목하였다. 총 67 균주의 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*를 이용하여 plate screening을 통해 엽산 생성 능력을 가지는 균주를 선발하였다. 이후 엽산 의존성 균주인 *L. rhamnosus* KCTC 3237(ATCC 7469)를 이용하여, 선발된 균주의 엽산 생성을 정량분석 하기 위해 microbiological assay를 이용하였다. 생성된 엽산의 정성 분석을 위해 LC-MS/MS(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry)를 이용하였으며, 엽산 생성 능력이 확인된 균주 중 생성 능력이 가장 우수한 *L. plantarum* Fol 708를 이용하여 우유 배지에서 *L. brevis* GABA 100과 공동 배양을 통해 엽산 생성량의 변화를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 확인된 공동 배양 조건을 이용하여 *L. plantarum* Fol 708의 pH 조건에 따른 엽산 생성량의 차이를 보았다. 이러한 결과를 토대로 *L. plantarum* Fol 708을 이용하면, 기존에 연구된 유제품 및 밀가루 반죽의 발효를 통한 엽산 공급과는 다른 방법으로 엽산을 공급할 수 있으며, 엽산을 고농도로 함유한 발효 식품 개발의 기초

자료로 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 성장 조건

엽산 생성 능력의 확인을 위해 서울대학교 식품 미생물 연구실에서 보관중인 총 67 종의 *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, Pyeong-tack, Korea)이 포함된 stock 상태로 -80℃에서 보관하였다. L-cysteine • hydrochloride(Sigma, Buchs, Switzerland)가 0.05% 수준으로 첨가된 MRS broth를 121℃에서 15 분간 멸균한 뒤, 균주를 혐기조건에서 37℃, 18 시간, 1 회 계대배양 후 사용하였다.

## 2. 엽산 생성 균주 확인

유산균의 엽산 생성 능력을 확인하기 위해, folic acid casei medium agar(folic acid casei medium 9.4 g(BD, Franklin Lake, NJ, USA), L-ascorbic acid 50 mg(Sigma, Buchs, Switzerland), agar 1.5 g) 배지를 이용하였다. 이 때 L-ascorbic acid가 첨가된 FACM agar 배지는 121℃에서 5 분간 멸균하여, 미리 배양된 엽산 후보 균주를 1 ml에 멸균생리 식염수(0.9%, w/v, NaCl)에 현탁한 후 10  $\mu$ l 접종하였다. 접종한 FACM agar 배지를 혐기 조건에서 37℃, 48 시간 배양 후, 26 종의 *Lactobacillus*와 41 종의 *Bifidobacterium* 중, colony가 확인된 엽산생성 능력이 있는 균주를 1차 선발하였다.

### 3. Microbiological assay를 이용한 엽산 생성 균주의 정량 분석

FACM 배지(FACM broth 9.4 g, L-ascorbic acid 50 mg)에서 선발된 11 균주를 혐기조건에서 37°C, 18 시간, 2 회 계대배양 후 사용하였다. 이 때 L-ascorbic acid가 첨가된 FACM배지는 121°C에서 5 분간 멸균하여 이용한다. 배양 후 수확한 세포를 13,500g × g에서 2 분 30 초간 원심분리 한 후, 상등액과 세포를 분리하였다. 원심 분리를 통해 침전시킨 세포는 1 ml의 멸균된 엽산 완충용액(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Amersco, OH, USA) 0.08 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(Amersco, OH, USA) 0.02 M, L-ascorbic acid 0.1%, 최종 pH 6.1±0.05)에 녹인 후, 4°C에서 초음파 세포 파쇄기로 2 분 30 초(1 초 켜고, 1 초 끄)간 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포와 원심분리를 통해 분리한 배양 상등액을 각각 85°C에서 30 분간 열처리하였다. 이 후 세포 파쇄액을 13,500g × g에서 2 분 30 초간 원심분리 하여 상등액을 수거하고, 다시 엽산 완충용액에 녹여 세포를 풀어준 후, 13,500g × g에서 2 분 30 초간 원심분리 하여 상등액을 다시 수거한다. 세포 파쇄를 통해 얻은 상등액과, 배양 상등액을 각각 0.2- $\mu$ m(Pall, NY, USA) 필터로 멸균한 후, 엽산의 glutamic acid를 제거해 주는 효소인 gamma-glutamyl hydrolase(Pro-spec, Ness-ziona, Israel)를 첨가하여 37°C, 200 rpm에서 (JEIO TECH, Seoul, Korea) 18 시간 동안 처리하였다(10).

Microbiological assay에 이용되는 엽산 의존성 균주인 *L. rhamnosus* KCTC 3237는 0.2- $\mu$ m 필터로 멸균된 folic acid(농도 0.2 ng/ml)가 첨가된 FACM 배지에서 2 회 계대배양 후 이용한다. Microbiological assay 전 멸균생리식염수(0.9%, w/v, NaCl)로 *L. rhamnosus* KCTC 3237를 3 회 세척하였다.

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

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

선발 균주인 *L. plantarum* Fol 708에서 생성된 엽산을 정성 분석하기 위해 LC-MS/MS(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, AB sciex instrument 3200 Q TRAP, MA, USA)를 이용하여 3 회 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, Jona, Switzerland)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℃로 설정하여 측정하였고, 시료 10 μl을 주입하였다(4). 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(4). 미지시료는 75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 52 mM ascorbic acid, 0.1% 2-mercaptoethnaol(pH 6.0)을 증류수에 녹인 용액으로 희석하여 분석하였다(4). 이동상은 메탄올/증류수(5:95, v/v (A))용액과 메탄올에 5 mM의 dimethylhexylamine이 첨가된(pH 8.1 (B))용액이 이용되었고, 조건으로는 0-5 분(22%A, 78%B), 5-20 분(20%A, 80%B), 20-25분(100%B)를 사용하였다(4).



## 5. *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%, w/v, NaCl) 1 ml에 각각 현탁한 후, 1% glutamic-acid(Junsei chemical, Tokyo, Japan)를 첨가한 10 ml의 우유배지에 접종하였다. 우유배지는 95℃에서 30 분간 멸균하여 이용하였다. 균주의 접종은 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 단독 배양과, 공동배양의 경우 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 접종 비율을 각각 1:1, 10:1, 1:10(v/v)으로 하였다. 시료는 12 시간 마다 채취하고, 시료 채취 후 pH 변화를 측정하였다. 엽산 함량은 microbiological assay를 이용하여 분석하였다.

## 6. pH-조절 발효조건에서 *L. plantarum* Fol 708으로부터 생성된 엽산 정량분석

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 70 시간까지 배양하였고, 배양 초기부터 pH 조건을 각각 4.5, 5.5, 6.5로 유지하였다. 시료 채취는 각각 0, 12, 24, 48, 70 시간에 이루어졌고, 배양 배지와, 균주에 존재하는 엽산을 각각 microbiological assay를 이용하여 분석하였다.

### Ⅲ. 실험 결과 및 고찰

#### 1. 엽산 생성 균주의 탐색

엽산 생성 능력이 있는 유산균의 선발을 위해, 초기 plate screening에서 26 균주의 *Lactobacillus*와 41 균주의 *Bifidobacterium*을 이용하였다. 그 결과 총 11 종의 *Lactobacillus*에서 엽산 합성이 가능함을 확인하였다 (Table. 1).

Table.1 Plate screening of folate synthesizing strains

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

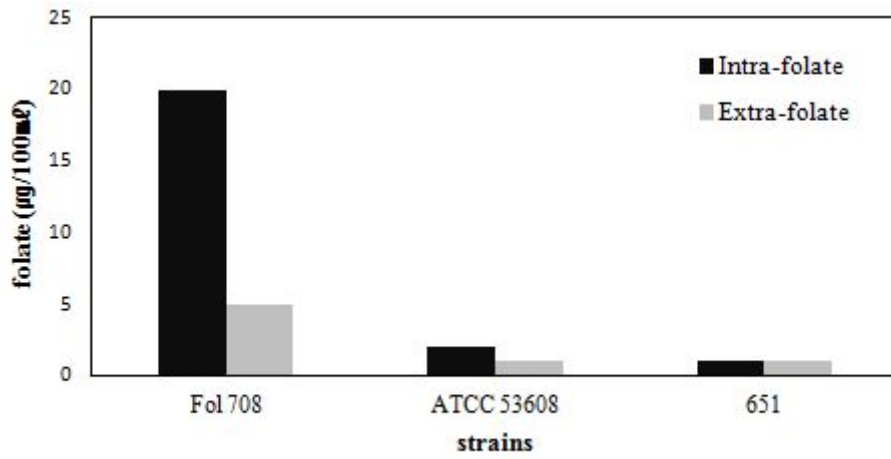
Grows very well: +++++, Grows well: +++, Grows: ++, Rarely grows: +

## 2. 선발 균주의 엽산 정량 분석

선발된 11 균주의 *Lactobacillus*를 FACM배지에서 배양한 후, 생성된 엽산을 정량 하기 위하여 microbiological assay를 하였다. 분석 결과 11 균주 중, 엽산 생성능력이 높은 총 3 균주를 선발하였다. 선발된 3 균주는 *L. plantarum* Fol 708, *L. reuteri* ATCC 53608, *L. brevis* 651이며, 총 엽산 생성은 각각 25, 3 및 2  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 이었다(Fig. 1). 선발 균주의 엽산 생성량을 살펴보면, 가장 높은 생성을 보인 *L. plantarum* Fol 708의 경우 동일한 배지 및 배양 조건에서 기존 *L. plantarum*의 생성능력으로 알려진 4.5  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 보다 약 5 배 높은 생성을 보여주었다(7). 이러한 엽산 생성능력은 동일한 배양 조건에서 상업 균주로 이용되고 있는 *S. thermophilus*(20  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )와 유사한 수준이다(7,8).

선발된 균주의 엽산 생성을 균체 내부와 배양 상등액으로 나누어 비교해 본 결과, 균체 내부에서 생성된 엽산의 농도가 배양 상등액에서 생성된 농도보다 높게 나타났다(Fig. 1). 특히 *L. plantarum* Fol 708의 경우, 균체 내부의 엽산 농도가 배양 상등액보다 4 배 더 높게 나타났다. 엽산 생성 균주의 엽산 생성과 건조 중량의 상관관계는 Fig. 1에서와 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 poly-glutamate 형태로 생성된다는 것을 의미하며(8), 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 때

문에(9), 시료 전처리 과정에서 18 시간 동안 gamma-glutamyl hydrolase와 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 보인다. Tri-enzyme법(9)의 경우에는  $\alpha$ -amylase, protease, gamma-glutamyl hydrolase를 각각 엽산이 포함된 시료에 처리한 후 분석하는 방법이다. 하지만 본 실험에서는 엽산이 포함된 시료에 초음파 파쇄 과정 및 열처리 과정을 통해 tri-enzyme에서 사용한 효소 중 gamma-glutamyl hydrolase만 사용하여 시료를 전처리 후 엽산을 분석하였다. 이러한 시료의 전처리 과정은 엽산의 열 안정성 및 전처리 과정에서 손실을 최소화하여 정확한 분석을 하기 위함이다(9,10).



strain	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. brevis</i>
	Fol 708	ATCC 53608	651
Intra-folate (µg/100ml)	20	2	1
Extra-folate (µg/100ml)	5	1	1
Intra-folate/cell mass (µg/g)	340	29	6

Fig. 1 Quantification of synthesized folate from the selected strains in FACM media by microbiological assay

### 3. *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 생성된 엽산의 존재를 확인하였다(12). 표준물질과 시료는 LC-MS/MS 상에서 모두 positive ion mode로 분석하였고, 분석 결과 표준물질인 tetrahydrofolic acid는 precursor ion 값이 446.1 m/z이고, product ion 값이 299.1 m/z으로 확인되었다(4). 본 실험에 사용된 5 CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid는 precursor ion 값이 460 m/z이고, product ion 값이 313.2 m/z으로 확인되었다(4). 시료에서 표준물질로 정한 tetrahydrofolic acid와 5 CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid의 product ion 값과 precursor ion 값이 모두 확인되었다. 이러한 결과를 통해 생성된 엽산의 형태 중 tetrahydrofolic acid와 5 CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid의 화학적 motif를 확인할 수 있었다.

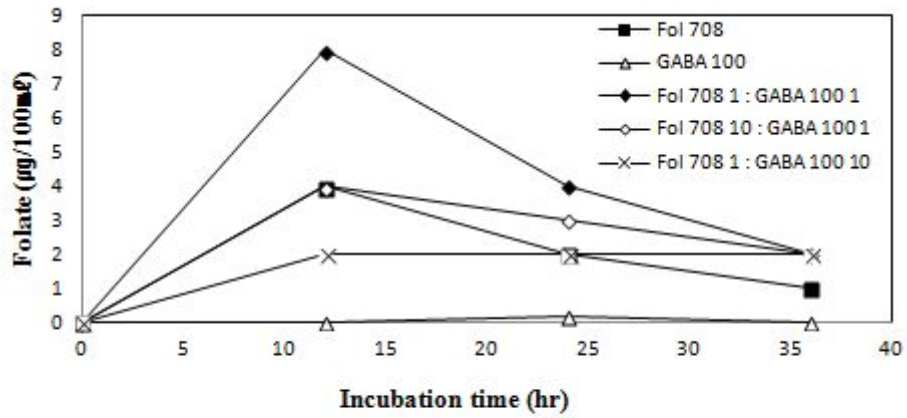


#### 4. *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 우유배지 내 공동 배양을 통해 생성된 엽산 정량 분석

엽산 생성이 확인된 균주 중, 가장 높은 생성을 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 우유배지에서 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100을 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 4  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 엽산 생성을 보여주었고, *L. brevis* GABA 100의 경우에는 엽산을 거의 생성하지 않았다(Fig. 2). pH 변화는 *L. plantarum* Fol 708의 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 8  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 엽산 생성을 보여주었고, 10:1과 1:10의 비율에서는 *L. plantarum* Fol 708 단독 배양과 같거나 더 낮은 생성을 보여주었다(Fig. 2). pH 변화에서도 1:1 접종 비율의 경우, 6.5에서 4.1로 감소하였으나, 나머지 접종 비율에서는 pH 변화폭이 1:1보다 작은 것으로 측정되었다(Fig. 2). 최대 엽산 생성 시간은 모든 조건에서 12 시간으로, 그 이후에는 생성된 엽산의 양이 감소하는 것으로 측정되었다. 이러한 결과는 저지방 우유배지에서 *S. thermophilus*의 엽산 생성능력을 연구한 Lin(6)의 경우와 같이 균주의 성장기에 엽산 생성은 균체의 증가에 따라 증가하지만, 이후에는 엽산 생성균주가 생성된 엽산을 소비하여 농도가 감소한다는 결과와 유사함을

확인할 수 있었다.

(a)



(b)

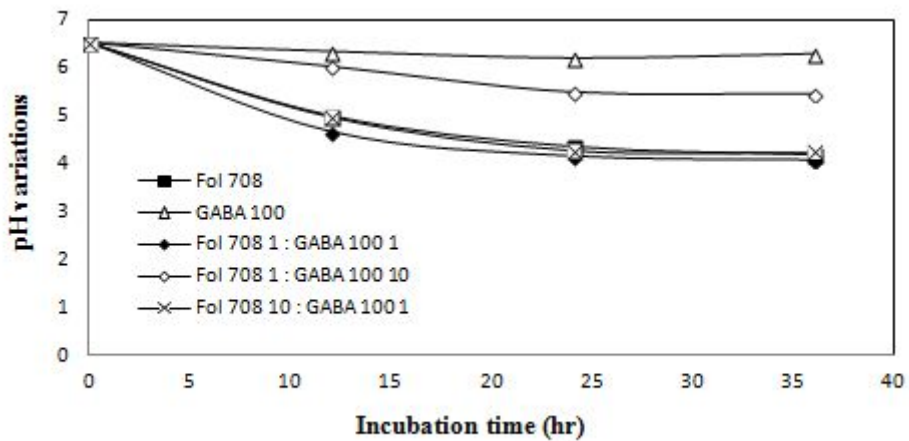


Fig. 2 (a) Concentration of folate in cultures of *L. plantarum* Fol 708 and *L. brevis* GABA 100 (b) time-dependent pH-change of culture media in different culture conditions using milk media containing 1% glutamic acid.

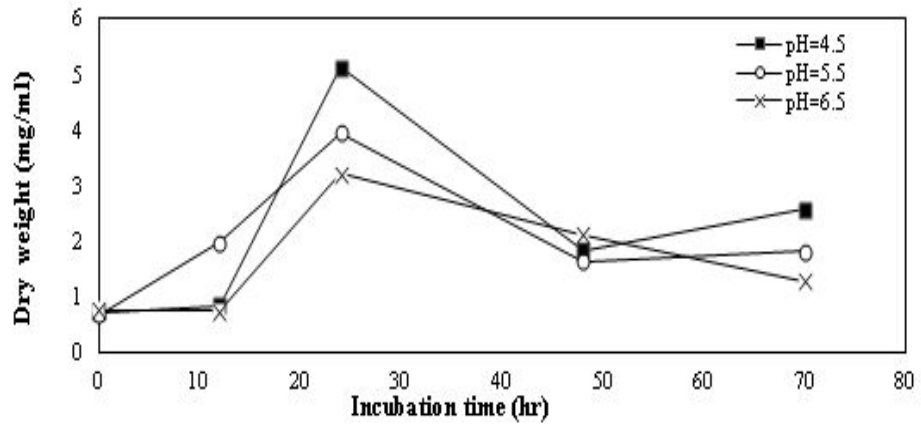
## 5. pH-조절 발효조건에서 *L. plantarum* Fol 708의 엽산 생성 정량 분석

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 정량분석과 균주의 건조중량을 측정하였다. 분석 결과 최대 엽산 생성은 균체 내부의 경우 pH 5.5에서 8  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 측정되었고, 배양 상등액의 경우 pH 5.5에서 20  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 측정되었다. 생성 균주의 건조 중량은 pH 4.5에서 5.13 mg/ml으로 가장 높게 측정되었다(Fig. 3). 최대 엽산 생성 시간은 균체 내부의 경우 24 시간, 배양 상등액의 경우 48 시간으로 측정되었고, 건조 중량의 경우 24 시간에서 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 18 시간보다 증가하였다. 엽산의 생성을 보기 위해 FACM 배지에서 배양한 양은 8 ml이었고, pH를 고정한 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 인해 배양 중 여러 성장단계가 나타나며, 시간에 따라 증가하는 세포 파괴로 용출된 엽산이 증가하여, 배양 상등액의 엽산 농도가 증가한 것으로 판단된다. pH별 엽산 생성의 경향을 살펴보면, 균체의 농도는 5.5에서 가장 높게 나타났고, 배양 상등액의 농도는 4.5와 5.5에서 거의 유사한 수준으로 높게 나타났으며, 총 엽산 생성은 pH 4.5

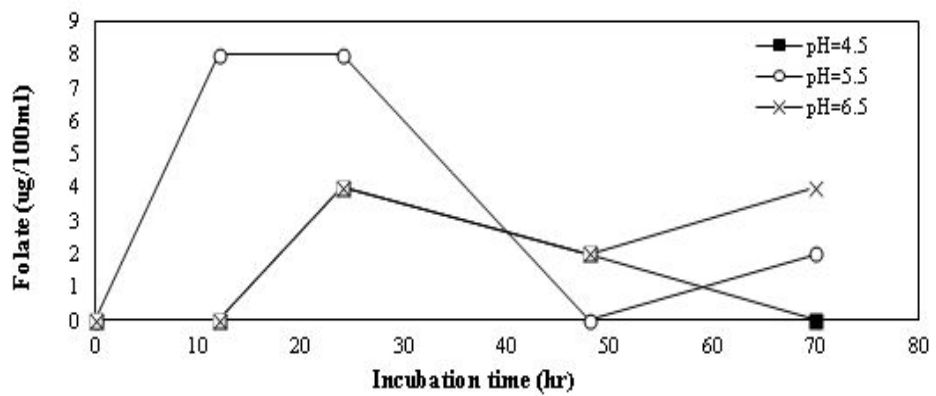
와 5.5에서 24-28  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 유사한 수준으로 관측되었고, 6.5에서는 이보다 더 낮은 14-18  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 관측되었다. 하지만 최대 엽산 생성 시간이 지난 후, 모든 조건에서 엽산의 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 경향성은 공동 배양의 엽산 생성 결과 및 저지방 우유배지에서 *S. thermophilus*의 엽산 생성능력을 연구한 Lin(6)의 경우에서와 같이, 엽산을 생성하는 균주일지라도 최대 생성시간 이후에는 생성된 엽산을 소비하여 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 배양 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, FACM배지에서 배양할 경우 상업 균주로 이용되는 *S. thermophilus*의 20  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  (7)과 유사한 25  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 생성을 보여주었고, 우유 배지에서 공동 배양한 결과에서도, 우유 배지에서 배양한 *S. thermophilus*의 엽산 생성인 1.5-14  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (7)과 유사한 수준인 8  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 생성을 보여주었다. 성장 초기부터 고정된 pH의 MRS배지에서 배양한 후 측정 한 총 엽산 생성도 24-28  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  수준으로 FACM 배지에서 배양할 때 보여준 생성과 유사한 수준으로 측정되었다. 이러한 결과를 통해 *L. plantarum* Fol 708을 이용한 엽산 생성과 배양조건의 변화를 통한 엽산 생성 증가가 가능하다는 것을 확인하였다. 차후 기존에 보고된 *L. plantarum* 보다 높은 엽산 생성을 보여준 *L. plantarum* Fol 708을 이용하여 주로 연구된 유제품을 이용한 엽산 공급 제품 이외 한국의 전통 음식인 김치 등을 포함한 다양한 엽산 공급 발효식품의 개발 및 응용에 활

용할 수 있을 것이다.

(a)



(b)



(c)

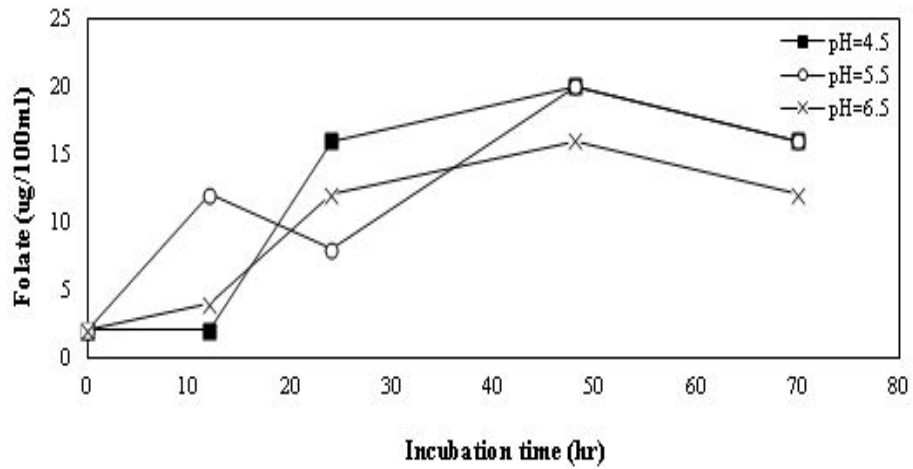


Fig.3. Concentrations of folate and dry weight of the cell grown in different pH controlled media (a) dry weight of the cell (b) concentrations of intracellular folate (c) concentrations of extracellular folate



## IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 총 67 균주의 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*으로부터 엽산 생성능력이 있는 11 균주의 *Lactobacillus*를 1차 선정하였다. 그 중 microbiological assay을 통해 엽산 생성능력이 가장 우수한 것으로 선발된 *L. plantarum* Fol 708을 이용하여, 우유 배지에서 *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 우유 배지에 균주를 각각 1%(v/v)접종하여 발효시켰으며, *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 접종비율이 1:1에서 가장 높은 엽산 생성( $8 \mu\text{g}/100\text{ml}$ )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.

## 참 고 문 헌

D'Aimmo MR, Mattarelli P, Biavati B, Carlsson N.G, Andlid T. The potential of bifidobacteria as a source of natural folate. J Appl Microbiol. 112: 975-984 (2012)

Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotics bacteria. Nutrients. 3: 118-134 (2011)

Home DW, Patterson D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. Clin Chem. 34: 2357-2359 (1988)

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 ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Sp. 19: 2390-2398 (2005)

Lin MY, Young CM. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. Int Dairy J. 10: 409-413 (2000)

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)

LeBlanc JG, Giori GS, Smid EJ, Hugenholtz J, Sesma F. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. *Common Curr Res Educ Topic Trends Appl Microbiol.* 1: 329-339 (2007)

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)

Hyun TH, Tamura T. Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Exp Biol Med.* 230: 444-454 (2005)

Arcot J, Shrestha AK, Gusanoy 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)

Laino JE, LeBlance JG, Giori GS. Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal argentinean yogurts. *Can J Microbiol.* 58: 581-588 (2012)

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: 734–742 (2011)

Vora A, Rig A, Dollimore D, Alexander KS. Thermal stability of folic acid. *Thermochim Acta.* 392: 209–220 (2002)

Gujaska 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)

Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Maddalena R. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotics property. *Appl Environ Microbiol.* 73: 179–185 (2007)

DeVries JW, Rader JI, Keagy PE, Hudson CA. Microbiological assay–trienzyme procedure for total folate in ccereals and cereal foods: collaborative study. *J AOAC Int.* 88: 5–15 (2005)

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)

Chen L, Eitenmiller R.R. 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)

Goli DM, Vanderslice JT. Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. *Food Chem.* 43: 57-64 (1991)

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)

## Abstract

### **Screening of lactic acid bacteria for strong folate synthesis and production of folate under co-culture and pH-controlled culture conditions**

Kyung-Min, Du

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Folate is a water soluble vitamin B which is required to synthesize amino acids and nucleic acids, and plays an important role in the cell division and growth in various living organisms. Recommended daily intake of folate is 400  $\mu\text{g}$  for human. The purpose of this study was to select the strong folate synthesizing bacterial strains and optimize culture conditions for the production of folate by the selected bacteria. Microbiological assay using folate dependent strain *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237(same as ATCC 7469) was used for the quantification of folate. Folate derivatives were identified by LC-MS/MS(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry). Among the experimental sixty-seven strains of

bifidobacteria and lactobacilli, *L. plantarum* Fol 708 showed the greatest ability to produce folate. The optimal pH for the folate production by *L. plantarum* Fol 708 was 5.5 in the constantly pH-controlled lab scale fermentor. Co-culture of *L. plantarum* Fol 708 with *Lactobacillus brevis* GABA 100 in milk medium enhanced the level of folate production compared to the single culture of *L. plantarum* Fol 708. The newly developed strain of *L. plantarum* Fol 708 may be useful for the development of fermented foods containing high level of folate.

**keywords : Folate, Microbiological assay, LC-MS/MS,  
Fermentated-food, *Lactobacilli*, Co-culture  
*Student Number* : 2012-21489**