

ELŻBIETA GUJSKA, MARTA CZARNOWSKA, JOANNA MICHALAK

## ZAWARTOŚĆ FOLIANÓW W KEFIRACH I JOGURTACH ŚWIEŻYCH ORAZ CHŁODNICZO PRZECHOWYWANYCH

### Streszczenie

Celem pracy była ocena zawartości folianów w mleku towarowym, kefirach i jogurtach świeżych i przechowywanych do 34 dni w temperaturze chłodniczej. Kefir i jogurt wyprodukowano metodą termostatową. W badanych próbkach zidentyfikowano tylko formę metylową folianów, tj.  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ . W zbiorczym świeżym mleku zawartość  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  wynosiła ok.  $4,0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ . Proces pasteryzacji nie wpłynął na istotne ( $p = 0,05$ ) zmniejszenie zawartości tej formy folianów. W próbkach kefiru nie stwierdzono zmian zawartości  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w porównaniu z mlekiem wyjściowym, natomiast w jogurcie miała miejsce istotna ( $p = 0,05$ ) jego redukcja. Czas przechowywania wpłynął na zawartość  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w kefirach w sposób zróżnicowany. W jednej serii kefirów nie nastąpiło istotne zmniejszenie zawartości  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ , natomiast w drugiej serii stwierdzono istotne zwiększenie zawartości folianów po 19 dniach przechowywania, a następnie istotne zmniejszenie po 21 dniach. W obydwu seriach jogurtów stwierdzono zmniejszenie zawartości folianów w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych.

**Słowa kluczowe:** foliany, kefir, jogurt, HPLC, przechowywanie

### Wprowadzenie

Foliany naturalnie występujące w żywności (zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego), to zredukowane pochodne kwasu foliowego, tzw. poliglutaminiany. Związki te należą do rodziny rozpuszczalnych w wodzie witamin z grupy B i są niezbędnymi składnikami diety człowieka. Nazwa kwas foliowy odnosi się jedynie do syntetycznej formy witaminy [24, 25].

Foliany są niezbędne do przebiegu reakcji grup jednowęglowych, szczególnie reakcji syntezy komponentów DNA, RNA i białek. Stanowią źródło grup metylowych, wykorzystywanych w procesie remetylacji homocysteiny do metioniny [24]. Pomimo

---

*Prof. dr hab. E. Gujska, dr inż. M. Czarnowska, dr inż. J. Michalak, Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. J. Heweliusza 6, 10-724 Olsztyn. Kontakt: elka@uwm.edu.pl*

tak ważnej roli, na całym świecie stwierdza się hipowitaminozę na tle niedoboru w diecie folianów [21]. Zbyt małe, przedłużające się w czasie spożywanie folianów [19] sprzyja m.in. procesom miażdżycowym, wpływa na zwiększenie ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych (np. choroby niedokrwiennej serca, udaru mózgu, choroby zakrzepowo-zatorowej), chorób neurodegeneracyjnych (np. choroby Alzheimera, Parkinsona), zwiększa podatność komórek na zmiany nowotworowe (raka jelita grubego, piersi, szyjki macicy, płuc, trzustki), a nawet zwiększa ryzyko zaburzeń psychicznych o charakterze depresyjnym i występowania niedokrwistości makrocytarnej [20, 29]. Grupą szczególnie narażoną na niedobory tej witaminy są młode kobiety w wieku rozrodczym. Wyniki badań epidemiologicznych, prowadzonych na całym świecie wskazują, że przy niedostatecznym wysyceniu folianami organizmu przyszłych matek, zwiększa się prawdopodobieństwo wystąpienia wrodzonych wad serca, nieprawidłowości dróg moczowych, rozszczepów podniebienia, defektów kończyn, a ponadto wad cewy nerwowej (WCN) u noworodków [2, 28].

Niedoborem tym można skutecznie zapobiegać poprzez dostarczenie do organizmu odpowiedniej dawki kwasu foliowego, na poziomie 400 µg/dobę. Pokrycie zapotrzebowania na taką ilość tej witaminy ze źródeł naturalnych jest bardzo trudne, dlatego zaleca się stosowanie suplementów diety lub produktów wzbogaconych [30]. Suplementacja diety kwasem foliowym, podobnie jak wzbogacanie nim produktów spożywczych, np. soków, płatków śniadaniowych, pieczywa, mąki wywołuje wiele kontrowersji. Coraz częściej podkreśla się problem zbyt wysokiej koncentracji w diecie danego składnika odżywczego, co w przypadku kwasu foliowego może prowadzić do niekorzystnego efektu maskowania anemii na tle niedoborów witaminy B<sub>12</sub>, przyspieszenia rozwoju chorób nowotworowych w przypadku wczesnych ich stadiów, a także może przyczyniać się do wzrostu częstości wystąpienia ciąży bliźniaczych. Ze względu na niejednoznaczne doniesienia, dotyczące skutków zdrowotnych związanych ze zwiększonym pobraniem omawianej witaminy, zaleca się szczególną ostrożność przy podejmowaniu decyzji o wprowadzeniu obowiązkowego wzbogacania żywności [4, 7].

W okresie zwiększonego zainteresowania tzw. zdrową żywnością zaleca się zwiększenie spożycia produktów naturalnie bogatych w foliany, których nawet nadmierna konsumpcja nie wiąże się z ryzykiem przekroczenia górnego tolerowanego poziomu spożycia, wynoszącego 1 mg/dobę. Przykładem produktów popularnych wśród konsumentów, będących naturalnym źródłem substancji bioaktywnych, w tym folianów, jest mleko i jego przetwory. Choć zawartość naturalnych folianów w mleku jest mała (5 ÷ 10 µg/100 g), to, ze względu na duże spożycie produktów mlecznych, mogą one stanowić znaczące źródło tej witaminy w codziennej diecie [8, 26]. Wiele produktów jest także wytwarzanych z zastosowaniem różnych bakterii fermentacji mlekowej, mających zdolność do syntetyzowania folianów. Mleko i fermentowane napoje mlec-

ne pokrywają ok. 10 ÷ 15 % dziennego zapotrzebowania na foliany, szczególnie wśród młodej populacji [8] oraz w krajach o dużej konsumpcji tych produktów, tj. w Holandii [15] i Szwecji [1]. Właściwy udział mleka i jego przetworów w diecie przyczynia się do zwiększenia przyswajalności folianów w porównaniu z dietą ubogą w te produkty [23, 27]. Jednak naturalne foliany są związkami bardzo niestabilnymi, a ich zawartość w fermentowanych produktach mlecznych zależy od takich czynników, jak: jakość mleka, sposób jego przetwarzania, gatunek i rodzaj bakterii starterowych, czas inkubacji oraz warunki przechowywania.

Celem pracy była ocena zawartości folianów w mleku towarowym oraz w jogurtach i kefirach z niego wyprodukowanych metodą tradycyjną i przechowywanych w temperaturze chłodniczej.

### **Materiał i metody badań**

Materiałem doświadczalnym były: kefir i jogurt, wyprodukowane zgodnie z tradycyjną technologią z mleka krowiego, metodą termostatową. Użyto mleka zbiorczego, które przed zaszczepieniem poddawano procesom: normalizacji (zawartość tłuszczu 2,0 %), homogenizacji (I stopień 18 MPa, II stopień 5 MPa) i pasteryzacji (temp. 90 °C/5 min). Mleko do produkcji jogurtu normalizowano do 15 % suchej masy (dodatek mleka w proszku, blender, temp. 55 °C, 1 h). Do produkcji jogurtu używano szczepionki firmy DaniscoBiolacta sp. z o.o. o nazwie – Jogurtowa YC11 (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus*). Mleko do produkcji kefiru inkubowano ziarnem kefirowym w formie liofilizowanej – Kefir C3 LYO 200DCC. Warunki dojrzewania jogurtu były następujące: temp. 43,5 °C/4,5 h, pH = 6,5, a kefiru: temp. 21 °C przez ok. 12 h, pH = 4,65. Produkty wychładzano i magazynowano w temp. 5 - 6 °C. Zawartość folianów oznaczano w mleku surowym, w mleku po pasteryzacji i normalizacji, bezpośrednio po okresie dojrzewania jogurtu i kefiru oraz po kilku i kilkunastu dniach przechowywania w temperaturze chłodniczej (dane w tab. 1 i 2).

Foliany: 5-metylotetrahydrofolian (5CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>) i tetrahydrofolian (FH<sub>4</sub>) zakupiono w firmie Sigma Aldrich i przygotowano według metody opisanej przez Koningsa [15]. Stężenie standardów obliczano przy użyciu współczynników absorpcji molarnej, podanych przez Blakleya [3].

Proteazę (EC 3.4.24.31, Sigma-Aldrich P-5147) rozpuszczano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 7,0 w ilości 4 mg/ml, bezpośrednio przed analizą, aby uniknąć zanieczyszczenia bakteriami, które mogą syntetyzować foliany w czasie inkubacji.

Hydrolazę  $\gamma$ -glutamylową z plazmy krwi szczura zakupiono w firmie Europa Bioproducts Ltd., Cambridge i przygotowano w sposób opisany wcześniej [9].

Wszystkie próbki przygotowano w przyciemnionym pomieszczeniu. Do probówek wirowniczych OakRidge PPCO (Nalgene Co.) o pojemności 50 ml odważano

10 g próbki. Dodawano 25 ml 0,1M buforu fosforanowego (pH = 7,0) z dodatkami 2 % (m/v) kwasu askorbinowego i 0,2 % (v/v) 2-merkaptoetanolu, intensywnie wytrząsano i ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 100 °C przez 15 min, od czasu do czasu wstrząsając. Następnie próbki schładzano w łaźni lodowej do temp. 20 °C, dodawano 0,25 ml hydrolazy  $\gamma$ -glutamylowej i 1 ml proteazy. Próbki inkubowano w temp. 37 °C przez 4 h. Następnie, w celu inaktywacji enzymów, ogrzewano próbki przez 5 min w temp. 100 °C i chłodzono w łaźni lodowej. Próbki wirowano przez 20 min (12000 rpm) w 4 °C. Po odwirowaniu supernatant z nad osadu zlewano do kolbek miarowych z ciemnego szkła o pojemności 50 ml. Do pozostałego w próbkach osadu dodawano 10 ml 0,1 M buforu fosforanowego, wstrząsano i ponownie wirowano. Uzyskany supernatant zlewano do tych samych kolbek miarowych. Objętość kolbek uzupełniano 0,1-molowym buforem fosforanowym i całość sączono przez sączki karbowane do buteleczek o pojemności 25 ml.

Oczyszczanie próbek przeprowadzano w kolumnach Bakerbondspe J. T. (Baker 7091-03, czwartorzędowa amina), a rozdział folianów w kolumnie chromatograficznej PhenomenexSynergi 4a Hydro-RP80A (4  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm), według metody opisanej przez Jastrebowa i wsp. [13], przy użyciu chromatografu cieczonego Shimadzu seria LC-10A. Identyfikację i obliczanie zawartości folianów wykonywano na podstawie wzorca ze znaną zawartością folianów. Wzorec nanoszono kilkakrotnie na szczyt kolumny chromatograficznej podczas całej serii oznaczeń.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z trzech powtórzeń. Istotność różnic pomiędzy średnimi oceniono testem Duncana, na poziomie istotności  $p = 0,05$ , przy użyciu programu Statistica 2010.

## Wyniki i dyskusja

W próbkach mleka i fermentowanych napojów mlecznych zidentyfikowano tylko jedną formę folianów, tj. 5-metylotetrahydrofolian ( $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ ). Wyniki uzyskane przez Wigertz i Jägerstad [26] potwierdzają, że w produktach mlecznych forma  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  jest dominująca. Badając zawartość folianów w mleku konsumpcyjnym o zawartości 0,5 % tłuszczu, wymienieni autorzy stwierdzili występowanie jedynie formy metylowej. Potwierdzają to także wcześniejsze badania przeprowadzone przez Selhub [22] oraz Karlin [14]. Wyniki oznaczeń zawartości  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w ocenianych produktach przedstawiono w tab. 1. i 2.

W zbiorczym mleku świeżym, stanowiącym surowiec do produkcji jogurtu i kefiru, zawartość  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  wynosiła około 4,0  $\mu\text{g}/100$  g. Na tak małą zawartość naturalnych folianów w mleku istotny wpływ mogły mieć warunki jego transportu i przechowywania, na co zwrócili uwagę Hawkes i Villota [10]. Straty folianów powodują takie czynniki, jak: traktowanie temperaturą wyższą od optymalnej dla danego rodzaju produktów, promieniowanie słoneczne oraz kwasowość poniżej neutralnej. Mleko narażo-

ne na działanie światła może tracić znaczne ilości folianów, co potwierdzają Krumdieck i Baugh [16].

Tabela 1. Zawartość 5-metylotetrahydrofolianu w mleku i w kefirach przechowywanych chłodniczo, w zależności od czasu przechowywania kefirów [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ].

Table 1. Content of 5-methyltetrahydrofolate in milk and in cold stored kefir depending on storage time of kefir [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ].

Seria dośw. Exp. series	Mleko surowe Raw bulk milk	Mleko po pasteryzacji Milk after pasteurization	Czas przechowywania kefiru w temp. 5 - 6 °C Time period of storing kefir at temp. of 5 - 6 °C				
			1 dzień 1 day	9 dni 9 days	19 dni 19 days	21 dni 21 days	34 dni 34 days
			$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$
I	3,61 <sup>bc</sup> ± 0,10	3,52 <sup>c</sup> ± 0,04	3,67 <sup>bc</sup> ± 0,29	3,83 <sup>b</sup> ± 0,36	4,91 <sup>a</sup> ± 0,10	3,21 <sup>d</sup> ± 0,17	-
II	3,93 <sup>a</sup> ± 0,31	3,86 <sup>a</sup> ± 0,25	3,92 <sup>a</sup> ± 0,39	3,81 <sup>a</sup> ± 0,35	3,47 <sup>a</sup> ± 0,18	-	3,54 <sup>a</sup> ± 0,04

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s / \text{SD}$  – wartość średnia ± odchylenie standardowe /mean value ± standard deviation; n = 3; wartości średnie oznaczone tą samą literą w wierszach nie różnią się statystycznie istotnie (p = 0,05) / mean values in rows and denoted by the same letter do not differ statistically significantly (p = 0.05).

Zastosowany proces pasteryzacji mleka nie spowodował istotnego ( $p \leq 0,05$ ) zmniejszenia zawartości omawianej formy folianów. Drewek i Czarnocka-Rocznikowa [6] podają natomiast, że pasteryzacja mleka powoduje straty folianów średnio o 20 %. W badaniach własnych, w próbkach kefiru nie stwierdzono zmian ilości  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w porównaniu z mlekiem wyjściowym (tab. 1), natomiast w próbkach jogurtu nastąpiło statystycznie istotne ( $p \leq 0,05$ ) zmniejszenie zawartości tej formy folianów (tab. 2). Według Patringa i wsp. [18] oraz Holasovej [12], fermentowane napoje mleczne odznaczają się większą zawartością tych związków w porównaniu z mlekiem świeżym dzięki zdolności kultur bakterii fermentacji mlekowej do syntetyzowania folianów.

Czas przechowywania nie wpłynął na istotne ( $p \leq 0,05$ ) zmniejszenie zawartości  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w drugiej serii kefirów, badanych po 34 dniach przechowywania, natomiast w pierwszej serii zaobserwowano istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost zawartości folianów po 19 dniach przechowywania, a następnie istotne ( $p \leq 0,05$ ) ich zmniejszenie po 21 dniach (tab. 1). W obu seriach zastosowano te same parametry obróbki mleka i inkubacji tym samym ziarnem kefirowym, różna natomiast mogła być jakość wyjściowa mleka przetworzonego.

Tabela 2. Zawartość 5-metylotetrahydrofolianu w mleku i w jogurtach przechowywanych chłodniczo, w zależności od czasu przechowywania jogurtów [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ].Table 2. Content of 5-methyltetrahydrofolate in milk and in cold stored yoghurts depending on storage time of yoghurts [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ].

Seria dośw. Exp. series	Mleko surowe Raw bulk milk	Mleko po pasteryzacji Milk after pasteurization	Czas przechowywania jogurtu w temp. 5 - 6 °C Time period of storing yoghurts at temp. of 5 - 6 °C				
			1 dzień 1 day	8 dni 8 days	16 dni 16 days	21 dni 21 days	34 dni 34 days
			$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$	$\bar{x} \pm s / \text{SD}$
I	3,93 <sup>a2</sup> $\pm 0,31$	4,19 <sup>a</sup> $\pm 0,03$	3,48 <sup>b</sup> $\pm 0,24$	2,34 <sup>c</sup> $\pm 0,22$	1,11 <sup>d</sup> $\pm 0,07$	0,26 <sup>e</sup> $\pm 0,02$	0,46 <sup>e</sup> $\pm 0,03$
II	4,14 <sup>a</sup> $\pm 0,17$	3,98 <sup>a</sup> $\pm 0,27$	2,74 <sup>b</sup> $\pm 0,21$	2,65 <sup>b</sup> $\pm 0,18$	2,64 <sup>b</sup> $\pm 0,17$	1,34 <sup>c</sup> $\pm 0,03$	0,52 <sup>d</sup> $\pm 0,11$

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Nie stwierdzono także istotnego ( $p \leq 0,05$ ) zwiększenia zawartości folianów w stosunku do ich zawartości w mleku wyjściowym w obydwu seriach wyprodukowanych jogurtów, a miało miejsce istotne ( $p \leq 0,05$ ) zmniejszenie zawartości tej witaminy już w pierwszym dniu po okresie dojrzewania oraz dalsza istotna ( $p \leq 0,05$ ) redukcja jej ilości w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych (tab. 2).

Uzyskane różne, ale małe zawartości 5CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub> w kefirach mogą być konsekwencją zastosowania nieodpowiednio dobranej szczepionki kefirowej oraz wyjściowej jakości mleka, co w czasie przechowywania mogło doprowadzić do strat folianów bądź przemian oznaczanej formy folianów w inne formy. Zwracają na to uwagę Lin i Young [17], którzy podają, że niektóre rodzaje bakterii fermentacji mlekowej zamiast syntetyzować foliany, wręcz mogą je utylizować, co w efekcie prowadzi do zmniejszenia zawartości tych witamin w gotowym produkcie. Można wnioskować, że istotnym czynnikiem, decydującym o zawartości folianów w fermentowanych napojach mlecznych jest zastosowanie w procesie produkcyjnym odpowiednich kultur bakterii fermentacji mlekowej. Jak podają Crittendeni i wsp. [5], spośród badanych mikroorganizmów największymi zdolnościami do syntezy folianów odznaczały się bakterie z gatunku *Streptococcus thermophilus*. Bakterie te były w stanie zwiększyć 4-krotnie zawartość folianów, w porównaniu z mlekiem wyjściowym. Szereg szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wykazuje się także zdolnością syntetyzowania folianów. Prowadząc fermentację przy użyciu kombinacji *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium animalis*, uzyskano 6-krotne zwiększenie zawartości folianów w produkcie [5]. Podob-

ne badania, mające na celu określenie, które szczepy bakterii stosowane do fermentacji produktów mleczarskich wpływają na zawartość folianów, prowadziła Holasova [12]. Największy wzrost zawartości folianów zaobserwowała w próbkach fermentowanych z zastosowaniem bakterii z gatunków *Streptococcus alivarius*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium longum*. Natomiast zwiększenie zawartości folianów w kefirze, na co wskazują Drewek i Czarnocka-Rocznikowa [6], można uzyskać również poprzez zastosowanie odpowiednich drożdży. Ziarno kefirowe jest to symbiotyczny zespół bakterii fermentacji mlekowej oraz drożdży, które nawzajem stymulują swój rozwój. Autorki wykazały, że gdy zawartość komórek drożdży w stosunku do komórek bakterii kwasu mlekowego w grzybkach kefirowych zwiększała się, wówczas ogólna zawartość folianów w kefirze zwiększała się od 4,3 µg/100 g do 6,4 µg/100 g. Bardzo istotny wpływ na zawartość folianów w kefirze mają także warunki przechowywania. Wykazano, że bezpośrednio wyprodukowany kefir zawierał średnio 4,3 µg folianów/100 g, a przechowywanie przez 24 h w temp. pokojowej spowodowało zwiększenie zawartości folianów do 6,3 µg/100 g. Kefir przechowywany w warunkach chłodniczych (4 °C) zawierał zdecydowanie więcej tej witaminy: 8,2 µg/100 g po 24 h i 9,3 µg/100 g po 48 h przechowywania. Warunki chłodnicze wpływały również bardzo korzystnie na cechy smakowe produktu [6]. Powyższe rezultaty potwierdzają także badania Patringa i wsp. [18], którzy oznaczając foliany w szczepach drożdży wyizolowanych z rosyjskich grzybków kefirowych wykazali, że forma 5CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub> była w nich dominująca. W dużo mniejszej ilości występowały formy 5CHOFH<sub>4</sub> (5-formylo-tetrahydrofolian) i FH<sub>4</sub> (tetrahydrofolian). Średnia zawartość sumy folianów w ośmiu przebadanych szczepach wynosiła 10,780 ± 550 µg/100 g suchej masy, chociaż były różnice w dystrybucji wymienionych trzech form tej witaminy pomiędzy szczepami. Autorzy potwierdzają, że poprzez odpowiedni dobór szczepów można wpływać na produkcję pożądanых form folianów w kefirze. Wykazali, że wybierając grzybki kefirowe, zawierające szczepy produkujące bardziej stabilne formy folianów, tj. 5CHOFH<sub>4</sub>, istnieje możliwość poprawienia stabilności folianów podczas fermentacji i przechowywania, co przyczynia się do zwiększenia ich zawartości w kefirach.

W badaniach własnych stwierdzono, że jedynie w przypadku produkcji kefiru, w jednej tylko serii miało miejsce niewielkie, ale istotne ( $p \leq 0,05$ ) zwiększenie zawartości 5CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub> w czasie przechowywania. Może to świadczyć o zastosowaniu nieodpowiednich gatunków bakterii fermentacji mlekowej, zarówno w szczepionce kefirowej, jak i jogurtowej. Wcześniejsze badania, dotyczące zawartości folianów w różnych szczepach *S. cerevisiae* [11] wykazały, że dobór odpowiednich kultur starterowych jest bardzo ważny w przypadku dążenia do uzyskania zwiększenia zawartości folianów w żywności produkowanej przy użyciu drożdży. W związku z tym wydaje się, że producenci fermentowanych napojów mlecznych powinni badać swoje produkty pod

względem zawartości folianów. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, jak ważne staje się prowadzenie tego typu analiz.

### Wnioski

1. W próbkach kefiru i jogurtu zidentyfikowano tylko formę metylową folianów tj. 5-metylotetrahydrofolian.
2. W próbkach świeżego kefiru nie stwierdzono zmian ilości 5-metylotetrahydrofolianu w porównaniu z mlekiem wyjściowym, natomiast w trakcie wytwarzania jogurtu miała miejsce istotna ( $p \leq 0,05$ ) jego redukcja.
3. Czas chłodniczego przechowywania kefiru (19 dni) nie wpłynął na zmniejszenie zawartości  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ , w jogurcie natomiast stwierdzono istotne ( $p \leq 0,05$ ) zmniejszenie ilości tej formy folianów w jednej serii już po 8 dniach przechowywania, a w drugiej – po 21 dniach.

### Literatura

- [1] Becker W.: Dietary habits and nutrient intake in Sweden 1989. In: Swedish National Food Administration. Ed. Livsmedelsverketsförlag, Uppsala, Sweden, 1994.
- [2] Bentley T.G.K., Willett W.C., Weinstein M.C., Kuntz K.M.: Population-level changes in folate intake by age, gender, and race/ethnicity after folic acid fortification. *Am. J. Public Health*, 2006, **11** (96), 2040-2046.
- [3] Blakley R.L.: The biochemistry of folic acid and related pteridines. Ed. North-Holland, Amsterdam 1969.
- [4] Buttriss J.: Strategies designed to increase awareness about folates and health, and to increase folate intake: A review. *Trends Food. Sci. Technol.*, 2005, **16**, 246-252.
- [5] Crittenden R.G., Martinez N.R., Playne M.J.: Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **80**, 217-222.
- [6] Drewek Z., Czarnocka-Rocznikowa B.: Microbiological processes in folacin synthesis in kefir. *Acta Alimen. Pol.*, 1986, **12** (1), 39-45.
- [7] Finglas P.M., de Meer K., Molloy A., Verhoef P., Pietrzik K., Powers H.J., van der Straeten D., Jägerstad M., Varela-Moreiras G., van Vliet T., Havenaar R., Buttriss J., Wright A.J.A.: Research goals for folate and related B vitamin in Europe. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2006, **60**, 287-294.
- [8] Forssén K.M., Jägerstad M.I., Wigertz K., Withthöft C.M.: Folate and dairy products: A critical update. *J. Am. College Nutr.*, 2000, **19**, 100-110.
- [9] Gujska E., Czarnowska M.: Wpływ warunków ekstrakcji i hydrolizy na wynik oznaczania zawartości kwasu foliowego i folianów w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **2** (75), 77-88.
- [10] Hawkes J.G., Villota R.: Kinetics of folate degradation during food processing. In: Le Maguer M., Jelen P.: *Food engineering and process applications*. Ed. Elsevier Applied Science Amsterdam, Netherlands, 1986, p. 323.
- [11] Hjortmo S., Patring J., Jastrebova J., Andlid T.: Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts. *Trends Food. Sci. Technol.*, 2005, **16**, 311-316.



- [12] Holasova M.: Folate production by lactic acid bacteria and propionibacteria in fermented milk. First International conference of folates analysis, bioavailability and health, Warsaw, Poland 2004, February 11-14, p. 72.
- [13] Jastrebova J., Withhöft C., Granath A., Svensson U., Jägerstad M.: HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chem.*, 2003, **80**, 579-588.
- [14] Karlin R.: Sur la teneur en folates des laits de grandmélange. *J. Int. Vitaminol.*, 1969, **39**, 359-371.
- [15] Konings E.J.M.: A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J. AOAC Int.*, 1999, **1 (82)**, 119-127.
- [16] Krumdieck C.L., Baugh C.M.: The solid phase synthesis of polyglutamates of folic acid. *Biochem.*, 1969, **8**, 1568.
- [17] Lin M.Y., Young C.M.: Folate level in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 409.
- [18] Patring J.D.M., Hjortmo S.B., Jastrebova J.A., Svensson U.K., Andlid T.A., Jägerstad I.M.: Characterization and quantification of folates produced by yeast strains isolated from kefir granules. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **223 (5)**, 633-637.
- [19] Pietruszka B.: Efektywność uzupełniania diety folianami na tle czynników ryzyka niedoboru folianów u młodych kobiet. Wyd. SGGW, Warszawa 2007.
- [20] Rampersaud G.C., Kauwell G.P.A., Bailey L.B.: Folate: A key to optimizing health and reducing disease risk in the elderly. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003, **1 (22)**, 1-7.
- [21] Rébeillé F., Ravanel S., Jabrin S., Douce R., Storozhenko S., van der Straeten D.: Folate in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum*, 2006, **126**, 330-342.
- [22] Selhub J.: Combined affinity and ion pair liquid chromatographic for direct analysis of tissue folate composition. In: *Chemistry and Biology of Pteridines*. Ed. Walter de Gruyter & Co., 1989, p. 1238-1246.
- [23] Smith A.M., Picciano M.E., Deering R.H.: Folate intake and blood concentrations of term infants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985, **41**, 590-598.
- [24] Storozhenko S., Ravanel S., Zhang G., Rébeillé F., Lambert W., van der Straeten D.: Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 271-281.
- [25] Vora A., Riga A., Dollimore D., Alexander K.S.: Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta*, 2002, 209-220.
- [26] Wigertz K., Jägerstad M.: Comparison of a HPLC and radioprotein - binding assay for the determination of folates in milk and blood samples. *Food Chem.*, 1995, **54**, 429-436.
- [27] Wigertz K., Svensson U.K., Jägerstad M.: Folate and folate binding protein content in dairy products. *J. Dairy Res.*, 1997, **64**, 239-252.
- [28] Wiśniewska K., Wysocki J.: Wrodzone wady rozwojowe w Polsce w latach 2003-2004. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. Ośrodek Wyd. Nauk., Poznań 2006.
- [29] Wright A.J.A., Finglas P.M., Southon S.: Proposed mandatory fortification of the UK diet with folic acid have potential risks been underestimated? *Trends Food. Sci. Technol.*, 2001, **12**, 313-321.
- [30] Wyka J., Mikołajczuk J.: Podaż kwasu foliowego w racjach pokarmowych Wrocławianek w wieku 20 - 25 lat oraz ocena wiedzy o jego znaczeniu dla zdrowia. *Roczniki PZH*, 2007, **4 (54)**, 633-640.

## CONTENT OF FOLATES IN FRESH AND COLD STORED KEFIRS AND YOGHURTS

### S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the content of folates in commercial milk and fresh kefirs and yoghurts as well as in kefirs and yoghurts that were stored at a refrigeration temperature for max 34 days. Kefirs and yoghurts were produced using a thermostatic method. In the samples tested, only

a methyl form of folate ( $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ ) was identified. In the raw bulk milk, the content of  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  was ca.  $4.0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ . The process of milk pasteurization do not cause decreasing of the folate content. In the kefir samples, no changes were reported in the amount of  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  compared to the raw bulk milk; however, a significant decrease ( $p \leq 0.05$ ) was found in the content of folate in the yoghurts. The storage time had a different effect on the content of  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  in the kefirs. In one series of the kefirs, no significant decrease occurred in the content of  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ ; however, in the second series, a significant increase was found in the content of folates after a 19 day storage, then, it was followed by a significant decrease after a storage period of 21 days. In the two series of yoghurts, a content of folates was found to decrease during refrigeration storage.

**Key words:** folates, kefir, yoghurt, HPLC, storage ☒