

**WZBOGACANIE ŻYWNOŚCI KWASEM FOLIOWYM -  
NATURALNYM METABOLITEM PRZEMYSŁOWYCH SZCZEPÓW  
DROŹDŹY *SACCHAROMYCES CEREVISIE* ORAZ BAKTERII  
FERMENTACJI MLEKOWEJ**

**Anna Goncerzewicz, Anna Misiewicz**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego,

Zakład Mikrobiologii,

Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych,

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

e-mail: [anna.goncerzewicz@ibprs.pl](mailto:anna.goncerzewicz@ibprs.pl)

**Streszczenie**

Kwas foliowy jest witaminą mającą duże znaczenie w żywieniu człowieka, a jej niedobór skutkuje uszkodzeniami cewy nerwowej i innymi schorzeniami neurologicznymi u rozwijającego się płodu. U osób dorosłych wpływa na spowolnienie syntezy DNA, podział komórek i wchłanianie substancji odżywczych z przewodu pokarmowego. Od czasu odkrycia skutków niedoboru, lekarze zalecają kobietom w ciąży uzupełnianie diety oraz spożywanie produktów spożywczych bogatych w kwas foliowy. W wielu krajach skutkowało to także rozpoczęciem wzbogacania mąki w ten związek w syntetycznej postaci. Liczne badania naukowe zwracają uwagę na fakt, iż przemysłowe szczepy *Saccharomyces cerevisiae* (piwowarskie i piekarnicze) oraz bakterie fermentacji mlekowej syntetyzują podwyższone ilości kwasu foliowego i mogą być wykorzystane w żywności jako naturalne źródło tego metabolitu. Odpowiednio modyfikowane i optymalizowane procesy technologiczne takie jak fermentacja alkoholowa, mlekowa oraz słodowanie podnoszą zawartości kwasu foliowego w chlebie, przetworach warzywnych, produktach mleczarskich i napojach fermentowanych nawet 2-krotnie.

**Słowa kluczowe:** wzbogacanie żywności, kwas foliowy, foliany, *Saccharomyces cerevisiae*, bakterie fermentacji mlekowej

## FOOD FORTIFICATION OF FOLIC ACID – NATURAL METABOLITE OF INDUSTRIAL STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND LACTIC ACID BACTERIA

### Summary

Folic acid is a very important vitamin in human nutrition and its deficiency in pregnant women's diets results in neural tube defects and other neurological damage to the fetus. Additionally in adults DNA synthesis, cell division and intestinal absorption is inhibited. Since this discovery governments and health organizations worldwide have made recommendations concerning folic acid supplementation of food for women intending to become pregnant. This has led to the introduction in many countries of fortification, where synthetic folic acid is added to flour. It is known that *Saccharomyces cerevisiae* (brewers' or bakers' yeast) and lactic acid bacteria are one of the main producers of folic acid and they can be used as natural source of folic acid. Appropriately modified technological process can be combined and further optimized to potentially enhance the folate content in bread, fermented vegetables, dairy products and beer by 2 fold.

**Key words:** food fortification, folic acid, folate, *Saccharomyces cerevisiae*, lactic acid bacteria

### WPROWADZENIE

Drożdże oraz bakterie fermentacji mlekowej, obok roślin zielonych są głównymi mikroorganizmami syntetyzującymi kwas foliowy. Organizm ludzki nie jest zdolny do syntezy tego związku i musi go dostarczać do ustroju z pożywieniem. Niedobór prowadzi do wielu poważnych zaburzeń i chorób. Jednym z najszerzej dyskutowanych schorzeń są wady cewy nerwowej, które powstają podczas rozwoju płodowego. Dodatkowo, niedobory kwasu foliowego wpływają negatywnie na syntezę DNA i podział komórek oraz znacznie obniżają wydajność trawienia i wchłaniania składników odżywczych z przewodu pokarmowego. Zbyt mała podaż tej witaminy prowadzi również do obniżenia koncentracji, przemęczenia, a nawet depresji i stanów niepokoju. W niniejszej publikacji przedstawiona zostanie krótka charakterystyka drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w odniesieniu do ich zdolności biosyntezy podwyższonych ilości kwasu foliowego, budowa chemiczna i właściwości biologiczne kwasu foliowego oraz skutki jego niedoboru w organizmie. Przedstawione zostanie występowanie

kwasu foliowego w produktach spożywczych oraz aktualny stan wiedzy na temat wzbogacania żywności tą witaminą.

Przyjmuje się, że zapotrzebowanie organizmu na kwas foliowy, zwłaszcza u kobiet w ciąży, rośnie prawie dwukrotnie, dlatego konieczna jest dodatkowa suplementacja diety [McLone 2003]. Foliiany dostarczane wraz z produktami mięsnymi i warzywami mają postać poliglutaminianowych koniugatów, które przed przyswojeniem muszą być rozłożone w jelicie cienkim przez dekoniuazy do monoglutaminianów, a następnie zredukowane do tetrahydrofolianu i dihydrofolianu. Foliiany produkowane przez drożdże i bakterie mlekowe występują w postaci łatwo przyswajalnych związków monoglutaminianowych i sprawia to, że ich biodostępność przez organizm ludzki jest o wiele większa niż syntetyczne odpowiedniki kwasu foliowego dostępne na rynku. [Gregory i in. 1990, Pfeiffer i in. 1997]. Dlatego aby zapobiegać niedoborom, bez konieczności przyjmowania suplementów diety, należy dostarczać go wraz żywnością.

Wytwarzanie produktów spożywczych wzbogaconych w kwas foliowy jest, z punktu widzenia kosztów produkcji, bardziej ekonomiczne, niż produkcja samych suplementów diety. Szczepy drożdży i bakterii charakteryzujące się wysoką zdolnością do syntezy folianów, są stosowane w procesach biotechnologicznych i ich użycie do fortyfikacji żywności nie wymaga dodatkowego wkładu finansowego. Skuteczność biosuplementacji jest wyższa, a profilaktyka przeciwnowotworowa [Kim 2004] i zapobieganie tak poważnym chorobom jak anemia makrocytowa [Hellmann i in. 2000], miażdżyca [Lucock 2000], choroby układu sercowo naczyniowego [Look 2003] jest prowadzona regularnie.

### **Wykorzystanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i bakterii fermentacji mlekowej w biotechnologii**

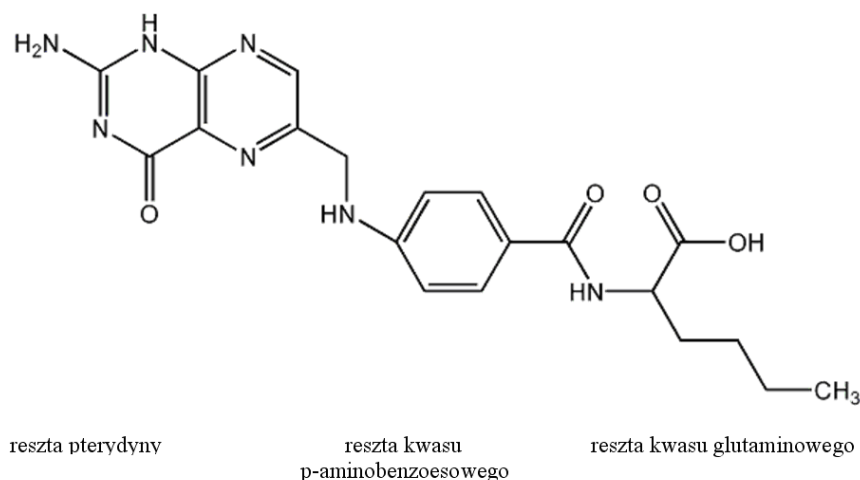
Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* dzięki swoim właściwościom fizjologicznym są szeroko wykorzystywane w procesach biotechnologicznych. Najpowszechniejszymi gałęziami produkcji spożywczej w której znajdują one zastosowanie to przede wszystkim przemysł fermentacyjny, m.in. winiarski, piwowarski, gorzelniczy i piekarski. Drożdże wykorzystywane są również szeroko w masowej produkcji ksylitolu [Govinden i in. 2001],  $\beta$ -glukanu [Klis i in. 2006], probiotyków [Czerucka i in. 2007], suplementów diety [Gmünder i in. 1990], preparatów wysokobiałkowych SCP [Oliva-Teles, Gonçalves 2001] oraz w procesie bioremediacji [Oswal i in. 2002]. Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) znajdują zastosowanie, podobnie jak drożdże, w przemyśle spożywczym [Rhee i in. 2011]. Ich główne wykorzystanie, wynikające z przeprowadzania procesów fermentacyjnych, dotyczy produkcji

napojów mlecznych, serów, w przemyśle warzywnym (do ukwaszania ogórków, kapusty), mięsny i piekarski, gdzie wchodzi w skład zakwasów chlebowych używanych do produkcji pieczywa żytniego [Leroy, De Vuyst 2004].

Wysoko wydajne szczepy mikroorganizmów wykorzystywane w biotechnologii pozyskuje się metodami klasycznymi (selekcja, mutacja, fuzja protoplastów) i nowoczesnymi, bazującymi na inżynierii genetycznej. Wprowadzanie do komórek drożdży i bakterii mlekowych określonych genów umożliwia nadprodukcję metabolitów oraz syntezę związków całkowicie nowych dla wyjściowych szczepów. Szczepy takie charakteryzują się krótkim czasem generacji, wysoką wydajnością w produkcji metabolitów, stabilnością genetyczną i fenotypową oraz małą wrażliwością na zmienne warunki środowiska [Giraffa 2006].

### **Kwas foliowy – budowa chemiczna i właściwości biologiczne**

Kwas foliowy – witamina z grupy B jest określana również terminami: folacyna, witamina B<sub>9</sub>, witamina M, witamina B<sub>11</sub>, a jego nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *folium* – liść. Kwas foliowy został wyizolowany po raz pierwszy w 1941 roku z liści szpinaku przez Mitchell, Shunell i Wiliam [Pfiffner i in. 1943]. Cząsteczka kwasu foliowego zwanego kwasem pteroilglutaminowym składa się z trzech części: zasady pterydynowej (6-metylopteryny), kwasu p-aminobenzoowego (PABA) oraz kwasu glutaminowego (rysunek 1). Foliiany różnią się między sobą stopniem utlenienia pierścienia pterydyny, a także liczbą reszt kwasu glutaminowego. Reszt biosyntetyzowanych przez *Eucaryota* może zawierać od dwóch do ośmiu, a u *Procaryota* ich liczba dochodzi do dwunastu [Berg i in 1995].



**Rysunek 1.** Wzór strukturalny kwasu foliowego (PubChem Compound)  
*Folic acid structural formula (PubMed Compound)*

Kwas foliowy i jego pochodne przekształcane są w organizmie człowieka w biologicznie aktywną formę tetrahydrofolianu. Pełni on funkcję koenzymu w przenoszeniu jednowęglowych grup formylowych i hydroksymetylowych oraz w syntezie zasad purynowych i pirymidynowych, które są podstawowym składnikiem kwasów nukleinowych. Jest on zatem niezbędny do prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek organizmu, a szczególnie tych, które ulegają częstym podziałom. Kwas foliowy odgrywa także znaczącą rolę w przemianach aminokwasów, dzięki niemu możliwa jest remetylacja homocysteiny do metioniny niezbędnej w reakcjach metylacji. Metionina jest aminokwasem, dostarczanym wraz z żywnością. W procesie demetylacji odłączana jest od niej grupa metylowa, która służy do metylacji takich związków jak białka, mielina<sup>1</sup>, fosfolipidy, kwasy nukleinowe, katecholaminy<sup>2</sup>, polisacharydy oraz karnityna<sup>3</sup>. Metionina pozbawiona grupy metylowej tworzy homocysteinę i aby możliwa była jej ponowna remetylacja niezbędna jest obecność kwasu foliowego [Stover 2004].

<sup>1</sup> mielina - substancja wytwarzana przez komórki otaczające aksony komórek nerwowych.

<sup>2</sup> katecholaminy – organiczne związki chemiczne pochodne aminokwasu – tyrozyny. Krążą we krwi i są związane z białkami osocza. Przykłady: adrenalina, dopamina.

<sup>3</sup> karnityna – organiczny związek chemiczny syntetyzowany w wątrobie, nerkach i mózgu z aminokwasów lizyny i metioniny pełniący rolę w transporcie kwasów tłuszczowych z cytozolu do mitochondriów.

### **Występowanie kwasu foliowego w żywności**

Foliany występują w produktach żywnościowych, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. Zdecydowanie więcej folianów jest jednak w roślinach, gdzie występują w postaci poliglutaminianowych koniugatów, zawierających najczęściej 7 reszt glutaminowych. W produktach zwierzęcych kwas foliowy występuje w niewielkich ilościach, ponieważ zwierzęta nie mogą syntetyzować kwasu p-aminobenzoesowego oraz nie mają zdolności do tworzenia połączeń reszty pteroilowej z glutaminianem [Stover 2004]. Bogatym źródłem folianów w diecie są: szpinak, brokuły, szparagi, bób, a także cykoria i kalafior. Podwyższoną ilość kwasu foliowego zawierają również jaja, sery, wątróbka i pełne ziarna zbóż. Do najuboższych w ten związek zaliczyć można ryby (m.in. tuńczyk, morszczuk, śledź) i owoce [Ziemiański, Wartanowicz 2001, Brouwer i in. 1999, Czeczot 2008, Witthoft i in. 1999]. Szczegółowe informacje dotyczące zawartości folianów w produktach żywnościowych przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Według informacji podanych w publikacjach [Gregory i in. 1990, De Bree i in. 1997] zawartość folianów w całodziennych dawkach pokarmowych w różnych krajach waha się w szerokich granicach od 95 µg do 562 µg zależnie od sposobu żywienia. W Polsce, w dawkach pokarmowych, ilości te mieszczą się w granicach 162 µg - 680 µg, a głównym źródłem folianów są produkty zbożowe. Dostarczają one prawie 40% tej witaminy, w stosunku do całkowitego, dziennego jej spożycia. Około 25% folianów pochodzi z warzyw (13% z ziemniaków) i 6-7% z owoców, mleka, przetworów mlecznych i jaj [Wartanowicz 1997]. Według De Bree i in. [1997] w Europie średnie spożycie folianów przez osoby dorosłe obu płci wynosiło ogółem 291 µg/dzień (197 µg – 326 µg), a przez dorosłe kobiety – 247 µg/dzień (168 µg – 320 µg). W Stanach Zjednoczonych średnie spożycie folianów z diety w latach 1988-1994 przez dzieci w wieku od 6 do 8 lat wynosiło 258 µg/dzień, przez dorosłe kobiety w wieku 31-50 lat – 255 µg/dzień, a przez dorosłych mężczyzn – 317 µg/dzień. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi na terenie Polski dzienne spożycie kwasu foliowego jest zróżnicowane pod względem wieku i płci badanych. W opracowaniu przeprowadzonym przez Bieżanowska-Kopeć i in [2007] wykazano niedostateczną ilość folianów w diecie kobiet w przedziale wiekowym 20-25, czyli w grupie prokreacyjnej. Wykazano, że wśród ankietowanych w okresie jesienno-zimowym dostarczono 209,5 µg/dzień, co pokrywało normę tylko w 72,3% a w okresie wiosenno-letnim spożyto 219,8 µg/dzień (75,4% normy). Oszacowana średnia zawartość kwasu foliowego w dietach młodych kobiet, potencjalnie

mogących zajść w ciążę, była niewystarczająca w porównaniu z zaleceniami. Badania zespołu Rogalskiej-Niedźwiedz [2000]. traktujące o spożyciu folianów przez kobiety w wieku prokreacyjnym wykazały, że średnie, dzienne spożycie kwasu foliowego, pochodzącego z żywności, wynosiło 315 µg/osobę (wahało się w granicach od 111 do 548 µg), co było zbliżone do wyznaczonej normy. Inne wyniki uzyskały Hamułka i Wawrzyniak [2003] badając kobiety w ciąży. Wynika z nich, że wraz z dietą młode matki spożywały małą ilość kwasu foliowego, pokrywając tylko w 43,2–58,5% normę ich dziennego zapotrzebowania.

Określa się, że dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na kwas foliowy to 300 µg/dzień. Kobiety w ciąży powinny przyjmować 450µg/dzień, a kobiety karmiące – 530 µg/dzień. Ogólne w organizmie znajdują się od 13-28 mg kwasu foliowego, z czego połowa tej puli zdeponowana jest w wątrobie w postaci związków wieloglutaminowych. Wzajemny stosunek tych pochodnych w tkankach różni się w zależności od szybkości podziału komórek [Molloy 2002, Wartanowicz., Ziemiański 2001].

**Tabela 1.** Zawartość folianów w produktach żywnościowych [Kunachowicz i in.2005].  
*Folate content of food [Kunachowicz i in. 2005]*

<b>Produkty spożywcze zwierzęce</b>	<b>Zawartość folianów ogółem w µg na 100g produktu</b>
<b>Mleko i przetwory mleczne</b>	
Mleko spożywcze	5,0
Mleko pełne, w proszku	40,0
Mleko UHT	1,0
Śmietana	4,0
Jogurt naturalny, 2% tłuszczu	10,0
Ser, Bree pełnotłusty	60,0
Sery żółte, ogólnie	20,0
Ser twarogowy	27,0
Jaja kurze całe	65,0
<b>Mięso i przetwory mięsne</b>	
Cielęcina	5,0
Wieprzowina	3,0
Wołowina	6,0 - 10,0
Podroby, w tym:	0,0 - 330,0
• nerki wieprzowe	45,0
• wątroba wieprzowa	110,0
• wątroba cielęca	240,0
• wątroba wołowa	330,0
• wątróbka kurczaka	590,0
Mięso indycze	3,0 - 26,0
Mięso z kurczaka	4,0 - 12,0
Wędliny	1,3 - 9,0
<b>Ryby i przetwory rybne</b>	
Ryby świeże	5,0-26,0
Ryby wędzone	5,0-26,0
<b>Tłuszcze</b>	
Oleje różne, margaryny	0,0
Masło ekstra, śmietankowe	3,0



**Tabela 2.** Zawartość folianów w produktach żywnościowych [Kunachowicz i in.2005].  
*Folate content of food [Kunachowicz i in. 2005].*

<b>Produkty spożywcze roślinne i inne</b>	<b>Zawartość folianów ogółem w µg na 100g produktu</b>
<b>Przetwory zbożowe</b>	
Mąka pszenna	109,0
Mąka żytnia	23,0-82,0
Ziarna pszenicy	145,0
Ziarno żyta	113,0
Kasze	19,0-32,0
Ryż biały	29,0
Makarony	31,1-64,0
Pieczywo żytnie	9,0-44,8
Pieczywo pszenne	25,0-52,3
Musli	100,0
Otręby pszenne	260,0
Płatki pszenne	40,0
<b>Warzywa</b>	
Bób	145,0
Brokuły	119,0
Brukselka	130,0
Cebula	17,0
Fasola biała	187,0
Groch	151,0
Kalafior	55,0
Kapusta włoska	80,0
Kukurydza	52,0
Papryka czerwona	55,0
Pietruszka	180,0
Soja, nasiona	280,0
Soja, kiełki	160,0
Szparagi	150,0
Szpinak	193,0
<b>Owoce</b>	
Awokado	62,0
Banan	22,0
Brzoskwinia	4,0
Cytryna	12,0
Maliny	30,0
<b>Inne</b>	
Orzechy	26,0-110,0
Drożdże prasowane	1407,0

### **Niedobór kwasu foliowego**

Głównymi przyczynami niedoboru kwasu foliowego i jego pochodnych są przede wszystkim: niedostateczna jego ilość w pożywieniu, zwiększone zapotrzebowanie (np. ciąża, laktacja), upośledzone wchłanianie jelitowe, zaburzenia przemian biochemicznych kwasu foliowego, czy jako skutek interakcji z niektórymi lekami: przeciwpadaczkowymi [Berg i in. 1995], przeciwbólowymi [Baggott i in. 1992], [Lewis i In. 1992], zobojętniającymi sok żołądkowy [Krogh i in. 1996], a także hormonalnymi, doustnymi środkami antykoncepcyjnymi [Lewis i in. 1992].

Do najważniejszych procesów chorobowych związanych z niedoborem folianów w organizmie należą: powstawanie wad cewy nerwowej oraz zaburzenia w rozwoju układu nerwowego płodu, niedokrwistość makrocytowa i miażdżyca oraz związane z nią choroby układu naczyniowo-sercowego.

Niewielkie ilości kwasu foliowego, zmagazynowanego w organizmie kobiety, podczas pierwszych tygodni ciąży zostają bardzo szybko wyczerpane na rozwój układu nerwowego płodu [Molloy 2002]. Szczególnie ważny jest moment kształtowania się cewy nerwowej, z której w następnej kolejności rozwija się mózg i rdzeń kręgowy dziecka. Niezamknięcie się cewy nerwowej prowadzi do powstawania wad rozwojowych takich jak bezmózgowie czy przepuklina mózgowo-rdzeniowa. Są one skutkiem defektu w procesie tworzenia się ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Konsekwencją tych wad jest śmierć lub trwałe inwalidztwo [Tamura, Picciano 2006]. W latach 80-tych wykazano, że podawanie profilaktycznie w okresie przedporodowym i w pierwszym okresie ciąży kwasu foliowego zmniejsza ryzyko powstawania wad OUN. Badania te zapoczątkowały na całym świecie tworzenie programów profilaktycznych, celem których jest upowszechnienie spożycia kwasu foliowego przez wszystkie kobiety w wieku przedrodzicznym [McNulty i in. 2000, Czeizel i in 2004] W Polsce Program Pierwotnej Praktyki Wad Cewy Nerwowej został wprowadzony w 1997 roku. Opracowane na lata 2004-2013 i 2007-2015 Narodowe Programy Zdrowia również uwzględniają konieczność zapobiegania tym wadom [Brzeziński 1998, Brzeziński, Mazurczak 1994].

Oprócz wad OUN, niedobór kwasu foliowego może prowadzić, u przyszłych matek, do odklejania się łożyska lub poronień, niskiej masy urodzeniowej noworodków, czy występowania anemii makrocytowej (megaloblastycznej). Główną przyczyną tego schorzenia są zaburzenia w syntezie kwasów nukleinowych. W wyniku niedoboru kwasu foliowego zmniejsza się zdolność komórek układu krwiotwórczego do biosyntezy prekursorów potrzebnych do syntezy DNA. Choroba ta może pojawić się nie tylko u ciężarnej, ale także

u noworodków w okresie między 2 a 17 miesiącem życia. Dziecko rodzi się wtedy z dużym stężeniem folianów w surowicy, otrzymanym od matki, a następnie dochodzi u nich do gwałtownego zmniejszenia zawartości i zaburzeń w procesie krwiotwórczym [Dary 2009].

Niedobór folianów w diecie wpływa również na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego – głównie miażdżycy. Jest to choroba, w której główną rolę odgrywa homocysteina, której wzrost stężenia w surowicy powoduje powstawanie blaszek miażdżycowych w układzie naczyniowym. Jej duże stężenie stanowi czynnik ryzyka choroby wieńcowej, zawału serca i udaru mózgu. Homocysteina powstaje z demetylacji metioniny – aminokwasu siarkowego pochodzącego z pożywienia. Znajdująca się we krwi może być remetylowana do metioniny lub katalizowana na drodze transsulfuryzacji do cysteiny przy udziale witaminy B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> oraz kwasu foliowego. Badania wykazały występowanie podwyższonej zawartości homocysteiny we krwi na skutek niedoborów folianów w pożywieniu oraz uszkadzającego jej działania na ścianę naczyń krwionośnych [Pintó i in. 2005, Ndrepepa i in. 2008].

### **Wzbogacanie żywności kwasem foliowym**

W związku ze zdrowotnymi zagrożeniami wynikającymi z braku kwasu foliowego w diecie naukowcy i lekarze coraz częściej polecają suplementację żywności tą witaminą. Od 1996 roku Federalny Urząd ds. Żywności i Leków (FDA – Food and Drug Administration) wprowadził obowiązek wzbogacania mąki kwasem foliowym. W ten sposób spodziewano się uzyskać właściwą podaż kwasu foliowego w diecie, co w rezultacie, miało wpłynąć na stan zdrowia społeczeństwa. Działania te przyniosły skutek w postaci zmniejszenia liczby dzieci urodzonych z wrodzonymi wadami cewy nerwowej (o ok. 47%) jak i obniżenie poziomu homocysteiny w surowicy krwi ludności USA średnio o 11%. Obowiązkowa suplementacja spowodowała olbrzymi sukces w zapobieganiu chorobom kardiologicznym [Look 2003] jak i ogólnej poprawie stanu zdrowia społeczeństwa. Wzbogacanie mąki kwasem foliowym jest w pełni uzasadnione, gdyż jest ona powszechnym i tanim źródłem energii pokarmowej, a pieczywo jest chętnie spożywanym produktem. Obecnie w USA, kwasem foliowym suplementuje się także ryż, makarony, płatki kukurydziane i zbożowe [Malinow i in. 1998, Oakley i in. 2006, French i in. 2003]. Jak pokazują doświadczenia innych krajów, obowiązkowe wzbogacanie pieczywa kwasem foliowym wprowadzona m.in. od 2000 roku w Chile w dawce ok. 400µg/dzień spowodowała znaczny jego wzrost w surowicy. Po przeprowadzeniu badań na reprezentatywnej grupie

kobiet przez wykazano podwyższenie zawartości kwasu foliowego w surowicy z  $290 \pm 102$  nmol/L na  $707 \pm 179$  nmol/Lm [Hertrampf i in. 2003].

Aktualnie w Polsce trwa publiczna debata nad wprowadzeniem obligatoryjnego uzupełniania żywności kwasem foliowym oraz skutków oceny tego zabiegu na populację. Jak dotąd żaden kraj europejski nie zdecydował się na obligatoryjne wzbogacanie żywności kwasem foliowym, choć coraz bardziej dostępne są produkty uzupełniane w foliany [Dziekan 2005]. Unia Europejska skłania się raczej ku wprowadzaniu na rynek żywności funkcjonalnej, niż produktów suplementowanych kwasem foliowym.

Trudnością, którą należy brać pod uwagę rozważając możliwości wzbogacania żywności folianami jest ich nietrwałość w procesach technologicznych. Liczne badania dowodzą, że pod względem chemicznym, kwas foliowy jest związkiem ulegającym degradacji. Podczas ogrzewania w środowisku kwaśnym lub alkaicznym następuje hydrolityczne odszczepienie reszty p- aminobenzoilglutaminianowej, natomiast w środowisku obojętnym rozkład jest nieznaczny [McKillop i in. 2002]. Kwas foliowy jest także wrażliwy na światło, czynniki utleniające oraz redukujące. W aspekcie suplementacji mąki czy pieczywa, najważniejsze okazuje się przewyciężenie strat produktów spożywczych zawierających foliany w procesie obróbki cieplnej. Straty te mogą dochodzić nawet do 60%. Aby zachować możliwie największą zawartość folianów, zaleca się skracanie czasu przechowywania mąki i obróbki cieplnej produktu spożywczego. Podczas termicznej i chemicznej obróbki żywności dochodzi do utleniania kwasu foliowego. Wyeliminowanie tej reakcji jest bardzo trudne. Wigertz i inni [1996] podają, że w związku z tym owoce i warzywa tracą od 70 do 80% akumulowanych folianów, a proces pasteryzacji obniża w mleku ilość tego związku do 20%. Podobnie dzieje się podczas gotowania na parze, suszenia rozpyłowego, czy produkcji płatków zbożowych, owsianych i herbatników [Hakansson i in. 1987]. Można jednak złagodzić ten proces poprzez stosowanie antyoksydantów takich jak kwas askorbinowy, czy tiol, a także stosowanie odpowiednich proporcji kwasu foliowego i jonów w roztworze. Redukcja  $\text{CH}_3$ -dihydrofolianu do 5- $\text{CH}_3$ -tetrahydrofolianu może być sukcesywnie hamowana przez endogenne źródła kwasu askorbinowego. W surowcach zawierających podwyższone ilości kwasu foliowego znajdują się również podwyższone ilości antyoksydantów [Malin 1977, Witthoft i in 1999]. Wysoka temperatura stosowana podczas procesów technologicznych powoduje zmianę konformacji związków chemicznych oraz niszczenie endogennych enzymów w przetwarzanej żywności [Ristow i in. 1982].

W krajach Unii Europejskiej fortyfikacja mąki nie jest w pełni akceptowana również z innego powodu. Jak twierdzą eksperci, może nie przynosić korzyści w niektórych grupach

populacyjnych. Według doniesień naukowych, wysokie dawki kwasu foliowego, zwłaszcza u osób starszych, mogą maskować objawy niedokrwistości wynikające z niedoboru witaminy B<sub>12</sub> odgrywającą podobną rolę w organizmie co kwas foliowy i w efekcie prowadzić do uszkodzenia układu nerwowego. Nie ma jednak takiego ryzyka, jeżeli foliany spożywane są naturalnie np. w postaci biomasy drożdżowej i jej produktów (chleb, piwo, wino) [Hjortmo i in. 2008] lub w fermentowanych produktach mlecznych [LeBlanc i in 2011]. Również z badań fundacji Folate FuncHealth, działającej w strukturach Unii Europejskiej wynika, że najlepszym, alternatywnym sposobem na zwiększanie folianów w żywności jest zastosowanie ich właśnie w takiej postaci [Jagerstad i in. 2005].

### **Zastosowanie wysoko wydajnych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i kultur LAB w zwiększaniu zawartości kwasu foliowego w produkcie spożywczym.**

Jak donoszą liczne dane naukowe, zwiększenie zawartości kwasu foliowego w produktach spożywczych może odbywać się poprzez modyfikację warunków procesu technologicznego oraz zastosowanie wyselekcjonowanych szczepów drożdży i kultur bakterii mlekowych. Procesy takie jak fermentacja nie powodują strat, a dodatkowo umożliwiają podniesienie stężenia folianów w żywności. Zauważono to na przykładzie takich produktów jak chleb, wino, piwo oraz fermentowanych produktów mlecznych jak jogurt, kefir, masło, czy ser.

Zbadano, że biomasa drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystywana w piekarstwie syntetyzuje relatywnie wysokie dawki tetrahydrofolianu w stosunku do swojej masy [Witthoft i in. 1999] i są to 24,5 µg/g suchej masy drożdży dla zespołu Seyoum [1998] lub 35,2 µg/g suchej masy drożdży dla Patring i Jestrebova [2007]. Aktualnie przeprowadza się wiele badań nad wykorzystaniem ich w produkcji pieczywa o podwyższonej zawartości kwasu foliowego dla konkretnych, docelowych grup populacyjnych, a wyniki zespołu Hjortmo [2008] dają obiecujące rezultaty. Mimo niewielkich strat związanych z procesem termicznym wypieku, testy wykazały zawartość 84-86 µg aktywnego kwasu foliowego na 100g świeżego chleba, którego biodostępność była porównywalna z tym związkiem zawartym w świeżej biomacie.

Aby zapewnić odpowiednią, dzienną dawkę kwasu foliowego w spożywanym produkcie mleczarskim powinno się spożywać np. 6-12 litrów mleka na dobę, co jest ilością nierealistyczną. Obiecujące są badania optymalizujące procesy technologiczne tak, aby zwiększyć zawartość kwasu foliowego w gotowym produkcie lub zajmujące się selekcją kultur LAB syntetyzujących podwyższone ilości kwasu foliowego w fermentowanych napojach mleczarskich. Opracowania dotyczące wybranych kultur wykazały wzrost

zawartości tego metabolitu o sześć razy w końcowym produkcie [Holasova i in. 2004]. Również badania przeprowadzone przez zespół Jagerstad [2005] dowodzą, że zastosowanie szczepów bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* podnosi zawartość kwasu foliowego dwu i trzykrotnie w produktach mlecznych. Wykazano, że można podnieść wydajność kultur LAB aby w jogurcie znajdowało się 200 µg folianów na litr. Jest to jednak cecha szczepowa, i proces możliwy jedynie poprzez zastosowanie drobnoustrojów przemysłowych, odpowiednio do tego przygotowanych, gdyż typowe nie biosyntetyzują i nie rozkładają takich ilości tego związku.

Mleko oraz fermentowane produkty mleczarskie, oprócz folianów w wolnej postaci, zawierają białka wiążące foliany (FBP – folate binding proteins), które po raz pierwszy zostały zidentyfikowane przez zespół Ghitis [1967] i Metz [1968]. Białka te wiążą foliany występujące w surowicy krwi. Powstające kompleksy wędrują do gruczołów wydzielniczych i kierowane są do mleka matki. Oprócz zaopatrywania noworodka karmionego piersią w foliany, działają ochronnie na jego naturalną mikroflorę jelitową. Obecność w mleku i fermentowanych produktach mleczarskich takich białek dodatkowo podnosi wartość odżywczą produktów.

Innym sposobem na zwiększenie zawartości kwasu foliowego w żywności, obok suplementacji żywności syntetycznym związkiem oraz prowadzenia technologii wykorzystującej naturalne szczepy, są metody polegające na zastosowaniu inżynierii genetycznej, m.in. klonowania oraz mutagenyzy ukierunkowanej. Naukowcy [Bekaert i in. 2007] przeprowadzili udane eksperymenty nad zwiększeniem zawartości kwasu foliowego w roślinach np. pomidorach i rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*) poprzez podniesienie ekspresji genu kodującego enzym GTP-cyklohydrolazę oraz genu ADCS. W badanych roślinach uzyskano poprawę wydajności biosyntezy folianów od 4 do nawet 1250 razy. Goyer z zespołem [2004] wykazali natomiast, że geny kodujące enzymy uczestniczące w biosyntezie kwasu foliowego w pomidorach wykazują dużą homologię w stosunku do genów kodujących te enzymy u *E. coli*. Wykonano klonowanie genów, a następnie poddano identyfikacji powstałe metabolity. Wyniki potwierdziły zwiększoną syntezę kwasu foliowego u powstałych mutantów.

Innego zadania podjął się zespół pod kierownictwem Shepard [1999]. Skonstruowano szczep *E.coli*, który mimo naturalnie posiadających genów kodujących aktywną formę kwasu foliowego – tetrahydrofolian (THF), posiadał plazmid kodujący enzym reduktazę tetrahydrofolianową z dodatkową ilością sześciu histydyn na C końcu w celu identyfikacji chromatograficznej. Wyizolowane białko poddano badaniom właściwości biochemicznych

i wykazano jego dużą zbieżność z enzymem naturalnie występującym u *Eucaryota*. Badania takie mają na celu otrzymanie mutantów, które będą syntetyzować białka jak najbardziej podobne do białek ludzkich, aby możliwe było zastosowanie ich np. w technologii żywności i produkcji spożywczej.

Rosnący obecnie udział wykorzystania aktywnych mikroorganizmów w gospodarce żywnościowej (rolnictwo, proekologiczne metody zagospodarowania odpadów przemysłowych i rolniczych, powrót do naturalnych metod produkcji i konserwacji żywności oraz pasz) najbardziej poszukiwanymi mikroorganizmami są te o właściwościach specyficznych, ukierunkowanych na procesy powstawania żywności funkcjonalnej. Jak podaje literatura jednym z głównych producentów kwasu foliowego są drożdże. Szczególnie drożdże piwowarskie i piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzają podwyższone ilości kwasu foliowego, w stosunku do innych drożdży o znaczeniu przemysłowym. Badania własne pokazują, że Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego jest w posiadaniu szczepów o podwyższonych zdolnościach produkcji folianów. Badania nad polimorfizmem genetycznym genów *FOL2*, *FOL3* i *DFR* kodujących enzymy szlaku biosyntezy u drożdży wykazały, że istnieje grupa drożdży piwowarskich i piekarskich stabilnych genetycznie, które wykazują właściwości syntezy kwasu foliowego na podwyższonym poziomie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Baggott J.E., Morgan S.L., Vaughn H. T., Hine R.J. (1992): Inhibition of folate-dependent enzymes by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. J.*, 282, 197-202.
2. Bailey L.B. (1994): Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrical detection. University of Florida, USA., 23-42, 43-72.
3. Bekaert S., Storozhenko S., Mehrshahi P., Bennett M.J., Lambert W., Gregory III J.F., Schubert K., Hugenholtz J., van der Straeten D., Hanson A.D. (2007): Folate biofortification in food plants. *T. Plant* 13(1), 28-35.
4. Berg M.J., Stumbo P.J., Chenard C.A., Fincham R.W., Schneider P.J., Schottelius D.D. (1995): Folic acid improves phenytoin pharmacokinetics. *J. Am. Diet Assoc.*, 95(3), 352-356.
5. Biezanowska-Kopeń R., Leszczyńska T., Pisulewski P.M. (2007): Oszacowanie zawartości folianów i innych witamin z grupy B w dietach młodych kobiet (20-25 lat) z województwa małopolskiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 6(55), 352-358.

6. Brouwer I.A., van Dusseldorp M., West C.E., Meyboom S., Thomas C.M., Duran M., van het Hof K.H., Eskes T.K., Hautvast J.G., Steegers-Theunissen R.P. (1999): Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J. Nutr.*, 129(6), 1135-9.
7. Brzeziński Z.J. (1998): Kwas foliowy w zapobieganiu wadom wrodzonym cewy nerwowej. *Med. Wieku Rozw.*, 2, 453–461.
8. Brzeziński Z.J., Mazurczak T. (1994): Propozycje wprowadzenia profilaktyki pierwotnej wad rozwojowych cewy nerwowej w Polsce *Pediat. Pol.*, 69, 684–686.
9. Czeczot H. (2008): Kwas foliowy w fizjologii i patologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 62, 405-419.
10. Czeizel A.E., Dobo M., Vargha P. (2004): Hungarian cohort-controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation shows a reduction in certain congenital abnormalities. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, 70(11), 853-61.
11. Czerucka D., Pichet T., Rampal P. (2007): Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 26, 767–778.
12. Dary O. (2009): Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr. Rev.*, 67, 235-44.
13. De Bree A., van Dusseldorp M., Brouwer I.A., van het Hof K.H., Steegers-Theunissen R.P. (1997): Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51 (10), 643-660.
14. Dziekan G. (2005): Żywność fortyfikowana w Polsce. *Służba Zdrowia* 21-25,53.
15. French A.E, Grant R., Weitzman S., Ray JG., Vermeulen M.J., Sung L., Greenberg M., Koren G. (2003): Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin. Pharmacol. Ther.* 74, 288–294.
16. Ghitis J. (1967): The folate binding in milk. *Am J. Clin Nutr* 20, 1–4.
17. Gmünder F.K., Joller P.W., Joller-Jemelka H.I., Bechler B., Cogoli M., Ziegler W.H., Müller J., Aeppli R.E., Cogoli A. (1990): Effect of a herbal yeast food supplement and long-distance running on immunological parameters. *Br. J. Sports Med.*, 24, 103-112.
18. Govinden R., Pillav B., van Zyl W.H., Pillay D. (2001): Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* XYL1 genes *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 76-80.
19. Goyer A., Illarinova V., Roje S., Fischer M., Bacher A., Hanson A.D. (2004): Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologous expression and characterization of dihydroneopterin aldolases. *Plant Physiol.*, 135, 103-111.



20. Giraffa G. (2006): Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28 (2), 251 – 260.
21. Gregory J., Foster K., Tyler H. (1990): The dietary and nutritional survey of British adults. HMSO, 109-112.
22. Hakansson B., Jagerstad M., Oste R., Akesson B., Jonsson L. (1987): The effect of various thermal processes on protein quality, vitamins and selenium content in whole-grain wheat and white flour. *J. Cereal. Sci.* 6, 269-82.
23. Hamułka J., Wawrzyniak A. (2003): Ocena spożycia wybranych witamin i składników mineralnych u kobiet w ciąży. *Rocz. PZH*, 2003, 3, 245-251.
24. Hellmann A., Siekierska-Hellmann M. (2000): Niedokrwistość kobiet w okresie rozrodczym. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 103, 5–42.
25. Hertrampf E., Cortes F., Erickson J. D., Cayazzo M., Freire W., Bailey L.B., Howson C., Kauwell G. P. A., Pfeiffer C. (2003): Consumption of Folic Acid-Fortified Bread Improves Folate Status in Women of Reproductive Age in Chile. *J. Nutr.*, 133, 3166-3169.
26. Hjortmo S., Patring J., Jastrebova J., Andlid T. (2008): Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *Intern. J. Food Microbiol.* 127, 2-36.
27. Holasova M.; Fiedlerova V.; Roubal P.; Pechacova M. (2004): Biosynthesis of folates by lactic acid bacteria and propionibacteria in fermented milk. *Czech J. Food Sci.* 22(5). 175-181.
28. Jagerstad M., Piironen V., Walker C., Ros G., Carnovale E., Holasova M., Nau H. (2005): Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends Food. Sci. Technol.*, 16 (6-7), 298-306.
29. Kim Y.I. (2004): Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am. J. Clin. Nutr.*, 80(5), 1123–1128.
30. Kiis F.M., Boorsma A., De Groot P.W. (2006): Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23, 185-202.
31. Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K. (2005): Tabele składu i wartości odżywczej żywności. PZW, Warszawa.
32. Krogh Jensen M., Ekelund S., Svendsen L. (1996). Folate and homocysteine status and haemolysis in patients treated with sulphasalazine for arthritis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 56(5), 421-9.
33. LeBlanc J.G., Lainol J.E., Juarez del Valle1 M., Vannini1 V., van Sinderen D., Taranto1 M.P., Font G., de Valdez G., Savoy de Giori1 G., Sesma1 F. 2001. B-Group vitamin

- production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* 111(6), 1297–1309.
34. Leroy F., Vuyst L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-78
  35. Lewis D.P., Van Dyke D.C., Stumbo P.J., Berg M.J. (1998). Drug and environmental factors associated with adverse pregnancy outcomes. Part I: Antiepileptic drugs, contraceptives, smoking, and folate. *Ann. Pharmacother.*, 32 (7), 802-817.
  36. Look J. (2003). News and views on folate and elderly persons. *J. Gerontol.*, 4, 354-361.
  37. Lucock M. (2000). Folic acid-vitamin and panacea or genetic time bomb? *Molecular Genetics and Metabolism*, 71, 121-138.
  38. Malin J.D. (1977). Total folate activity in Brussels sprouts: the effects of storage, processing, cooking and ascorbic acid content. *J. Food Technol.* 12, 623-32.
  39. Malinow M.R., Duell P.B., Hess D.L., Anderson P.H., Kruger W.D., Phillipson B.E., Gluckman R.A., Block P.C. (1998). Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, 338(15), 1009-15.
  40. McLone D.G. (2003). The etiology of neural tube defects: the role of folic acid. *ChNS*, 19, 537–539.
  41. McKillop D.J., Pentieva K., Daly D., McPartlin J.M., Hughes J., Strain J.J., Scott J.M., McNulty H. (2002). The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br. J. Nutr.*, 88, 681–688.
  42. McNulty H., Cuskelly G.J., Ward M. (2000). Response of red blood cell folate to intervention: implications for folate recommendations for the prevention of neural tube defects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (5 Suppl), 1308S-1311S.
  43. Metz J., Zalusky R., Herbert V. (1968). Folic acid binding by serum and milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 21, 289–297.
  44. Molloy A.M. (2002). Is Folate bioavailability and health. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 72, 46–52.
  45. Ndrepepa G., Kastrati A., Braun S., Koch W., Kölling K., Mehilli J., Schömig A. (2008). Circulating homocysteine levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Metab. Cardiovasc.*, 18(1), 66-73.
  46. Oakley G.P. J.R., Adams M.J., Dickinson C.M. (1996). More folic acid for everyone, now. *J Nutr.*, 126(3), 751S-755S.

47. Oliva-Teles A., Gonçalves P. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccaromyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202, 3-4.
48. Oswal N., Sarma P.M., Zinjarde S.S., Pant A. (2002). Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. *Bioresour. Technol.*, 85 (1), 35.
49. Patring J.D.M., Jastrebova J.A., Hjortmo S.B., Andlid T.A. Jägerstad I.M. (2005). Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 53 (7), 2406-2411.
50. Pfeiffer C.M., Rogers L.M., Bailey L.B., Gregory J.F. (1997). Absorption of folates from fortified cereal-grain products and supplemental folate consumed with or without food, determined by using a dual label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr.* 66, 1388-1397.
51. Pfiffner J.J., Binkley S.B., Bloom E.S., Brown R.A., Bird O.D., Emmett A.D., Hogan A.G., O'Dell B.L. (1943). Isolation of the antianemia factor (vitamin Bc) in crystalline form from liver. *Science* 97 (2522), 404-405.
52. Pintó X., Vilaseca M.A., Balcells S., Artuch R., Corbella E., Meco J.F., Vila R., Pujol R., GrinberG D. (2005). A folate-rich diet is as effective as folic acid from supplements in decreasing plasma homocysteine concentrations. *Int. J. Med. Sci.*, 2(2), 58-63.
53. Rhee S.J., Lee J., Lee C. (2011). Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories* 2011, 10 (Suppl 1):S5.
54. Ristow K.A., Gregory III J.F., Damron B.L. (1982). Effects of dietary fiber on the bioavailability of folic acid monoglutamate. *J. Nutr.*, 112, 750-8.
55. Rogalska- Niedźwiedź M., Chabros E., Chwojnowska Z., Wajszczyk B., Charzewska J., Ziemiański Ś. (2000). Badania wielkości spożycia folianów w grupie kobiet w wieku prokreacyjnym. *Żyw. Człow.Met.*, 27, 2, 172-183.
56. Seyoum E., Selhub J. 1998. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J. Nutr.* 128(11), 1956-1960.
57. Sheppard C.A., Trimmer E.E., Matthews R.G. (1999). Purification and properties of NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MetF) from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181(3), 718-725.
58. Stover P.J. (2004). Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr. Res.*, 6, 3-12.

59. Tamura T., Picciano M.F. (2006). Folate and human reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83(5), 993-1016.
60. Wartanowicz M. (1997). Foliiany w żywieniu (przegląd piśmiennictwa). *Żyw. Człow. Metab.* 24, 81–90.
61. Wartanowicz M., Ziemiański Ś. (2001). Witaminy rozpuszczalne w wodzie. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa, 198–280.
62. Wigertz K., Hansen S.I., Hoier-Madsen M., Holm J., Jagerstad M. (1996). 1996 Effect of milk processing on the concentration of folate-binding protein (FBP), the folate-binding capacity and the retention of 5-methyltetrahydrofolate. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 47, 315-22.
63. Witthoft C.M., Forssen K., Johannesson L., Jagerstrad M. (1999). Folates – food sources, analyses, retention and bioavailability. *Scand. J. Nutr.* 43, 138-146.
64. Ziemiański Ś., Wartanowicz M. (2001). Rola folianów w żywieniu kobiet i dzieci. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 3 (2), 119-125.