

Jern og zink i cerealer

Daniel P. Persson, Thomas H. Hansen, Rikke P. Thomsen, Kristian H. Laursen, Søren Husted og Jan K. Schjørring, Faggruppen for Plante- og Jordvidenskab, Institut for Jordbrug og Økologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, DK-1871 Frederiksberg C. E-mail: jks@life.ku.dk

Mangel på mikronæringsstoffer, især jern og zink, er et udbredt og voksende problem for mennesker i mange udviklingslande. Det skyldes, at cerealer som ris og hvede udgør den dominerende fødekilde. Konsekvensen er en række negative indvirkninger på menneskers sundhed, udvikling, arbejdsevne og generelle livskvalitet. For at bekæmpe fejlnæringen og de deraf afledte følgesygdomme er det en central udfordring at øge indholdet og biotilgængeligheden af mikronæringsstoffer i cerealer.

Der er tre hovedårsager til, at mangelproblemerne opstår. For det første er koncentrationen af jern og zink i kornkerner generelt lav i forhold til andre plante produkter. For det andet er koncentrationen lavest i den del af kernen, som de fleste mennesker foretrækker at spise, nemlig den stivelseholdige frøhvite (endospermen). Omvendt er koncentrationen højest i kornets skaldele, og disse dele bliver ofte poleret væk af forskellige årsager. Endelig menes hovedparten af både jern og zink at være bundet til fytinsyre; et molekyle som drastisk hæmmer optagelsen af mikronæringsstoffer i tarmsystemet ved at danne tungtopløselige komplekser. I dag er dogmet, at både jern og zink primært er bundet til fytinsyre, hvorved deres optagelse drastisk reduceres, når føden passerer gennem tyndtarmen (Lopez m.fl. 2002, Lönnerdal 2002, Mitsuhashi m.fl. 2005, Ockenden m.fl. 2004, Raboy 2003). Der er dog meget begrænset viden om de faktiske bindingsformer, og en fuldstændig kemisk identifikation af komplekser indeholdende jern, zink og fytinsyre mangler stadig. Derfor er fytinsyrens rolle i forbindelse med biotilgængeligheden af jern og zink stadig uopklaret og kontroversiel.

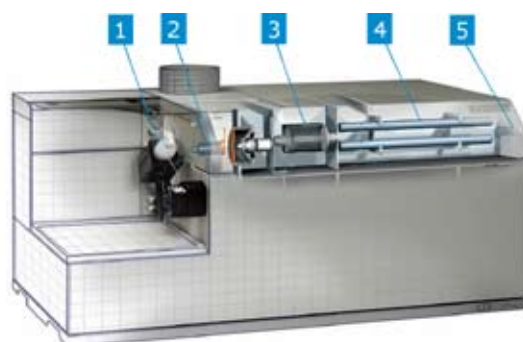
Med nye målemetoder har vi kvantificeret, hvordan mikronæringsstofferne fordeler sig i byg- og riskerner og hvor stor en andel af mikronæringsstofferne, der mistes ved polering. Vi har også analyseret hvilke bindingsformer af jern og zink, som dominerer i de forskellige dele af en kornkerne. Det viser sig, at bindingsformerne af zink og jern er forskellige og at zink ser ud til at være

bundet til proteiner i kernen frem for til den formodede fytinsyre.

Måling af mikronæringsstoffer

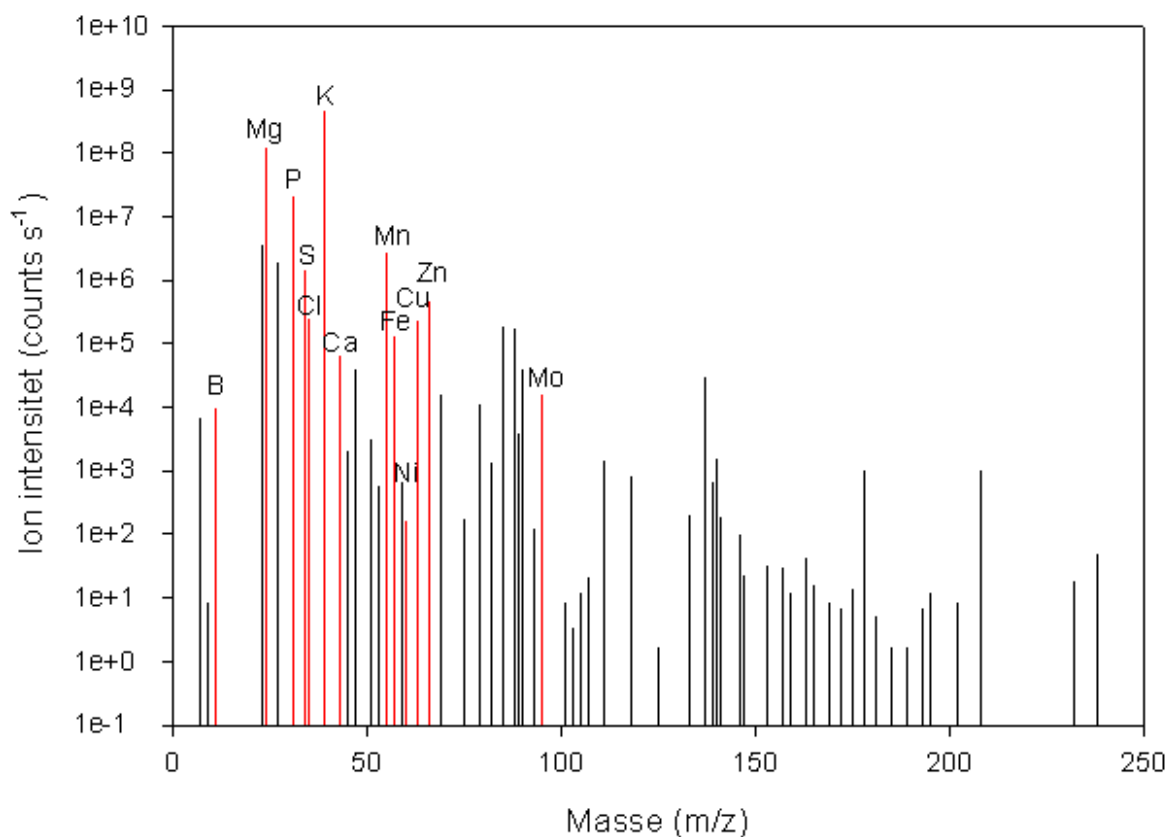
Allerede i 1800-tallet var det kendt, at planter har et uerstatteligt behov for adskillige grundstoffer, som tilsammen kaldes ”essentielle planteneringsstoffer”. Mangler en plante blot et af de essentielle næringsstoffer, reduceres plantevæksten. Grundstofanalyser af planter er derfor vigtige.

I den sidste halvdel af 1900-tallet blev adskillige metoder udviklet til grundstofanalyse såsom flammeionisering og atom absorptions spektrometri (AAS), men et af de største gennembrud for den moderne planteanalyse var udviklingen af ICP (Inductively Coupled Plasma) spektrometri. Denne teknik har muliggjort en hurtig og simultan analyse af de fleste (>70 %) grundstoffer i det periodiske system, selv i meget lave koncentrationer (pikogram grundstof pr. gram tørt plantemateriale, 10^{-12}). Grundlaget for ICP er plasmaet, som dannes ved at føre argongas ind i et elektromagnetisk felt, hvor gassen antændes og danner et plasma med en temperatur på ca. 10000 °C. Den opløste planteprøve injiceres i dette plasma, hvor væsken fordamper, og planteprøven brænder op indtil kun atomerne er tilbage (Fig.1). Atomerne ioniseres og udsender samtidig en foton (lys). De første ICP'er detekterede dette lys ved OES (Optical Emission Spectrometry), men udviklingen af moderne massespektrometre (MS) har muliggjort detekteringen



1. **Nebulizer/spraykammer:** Prøven forstøves
2. **Plasma:** Prøven ioniseres i det 10.000 grader varme plasma
3. **Octopol:** Her fjernes interferens ved hjælp af hydrogen eller helium (nøjagtigheden øges)
4. **Masse spektrometer:** Ioner separeres baseret på deres masse/ladning ratio
5. **Detektor:** Ionerne detekteres

Figur 1. Billedet viser en ICP-MS af typen der findes hos Faggruppen for Plante- og Jordvidenskab, KU (Agilent, 2009).



Figur 2. En grundstofprofil af en riskerne, målt ved ICP-MS. De essentielle grundstoffer er markeret med rød farve.

af ionerne i stedet og dermed muliggjort de meget lave detektionsgrænser.

Vi har i Faggruppen for Plante- og Jordvidenskab på Det Biovidenskabelige Fakultet, KU, anskaffet to ICP-MS apparater og en ICP-OES med det formål bl.a. at undersøge indhold og bindingsformer af grundstoffer i forskellige væv af kornkerner. Sammen med de to ICP-MS apparater er der installeret en række supportfaciliteter til effektiv nedbrydning og ekstraktion af alle former for biologisk materiale. Til at undersøge komplekseringen mellem grundstoffer og organiske ligander, således at grundstoffernes bindingsformer kan analyseres, anvender vi væskkromatografisk separation (HPLC -High Performance Liquid Chromatography) direkte koblet til ICP-MS.

Et eksempel på en grundstofprofil fra en riskerne er vist i figur 2. Profilen viser, at en riskerne indeholder et meget stort antal grundstoffer ud over de essentielle næringsstoffer. Mange grundstoffer er til stede i ultra-lav koncentration og er biologisk aktive, men deres præcise indflydelse på den menneskelige organisme kendes endnu ikke. Med henblik på at analysere forskellige vævstyper af kornkerner har vi udviklet en mikronedbrydnings-teknik, således at der nu kun kræves ét milligram tørt plantemateriale for at måle koncentrationen af jern og zink. I kombination med kemometrisk dataanalyse af de opnåede grundstofprofiler kan vi blandt andet adskille forskellige risgenotyper fra hinanden, således at deres

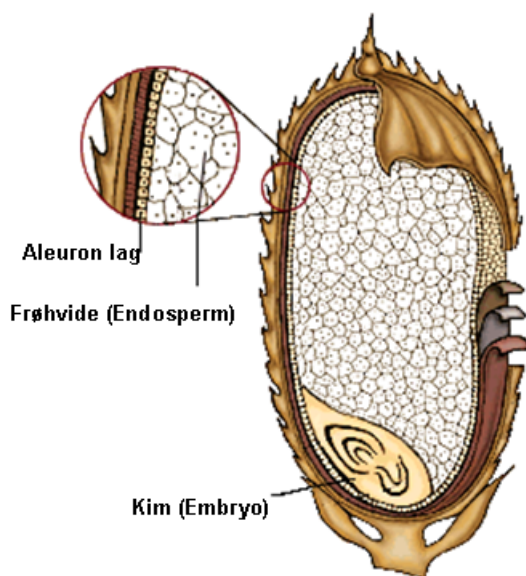
geografiske oprindelse og dyrkningsforhold kan belyses (Laursen *m. fl.* 2009).

Mikronæringsstoffernes fordeling i kornkerner

Høstede kornkerner består groft set af tre forskellige vævstyper: Kim (embryo), frøhvide (endosperm) og skaldele, som er en blanding af forskellige lag, der omgiver endospermen. Det inderste af disse lag kaldes aleuronlaget og har en meget høj koncentration af næringsstoffer. Aleuronlaget i ris består af blot et enkelt cellelag, mens der i f.eks. byg er tre cellelag (fig. 3).

Hovedparten af hvede og ris forarbejdes ved polering, så kun den hvide, meget stivelsesholdige endosperm spises. Der er flere årsager til dette. For ris er der en smagsmæssig præference for den hvide polerede ris. Desuden kræver den en kortere kogetid, hvilket er væsentligt i ulande, da det mindsker brugen af dyrt fossilt brændstof. Endvidere har den polerede ris også en længere holdbarhed. For hvede er det afgørende, at bagekvaliteten af den polerede hvede er bedre end hos fuldkornshvede.

Den typiske fordeling af zink og jern i kornkerner kan visualiseres ved hjælp af farvning med specifikke indikatorer. I figur 4A er kaliumcyanid anvendt til at farve jern i en bygkerne. Den blå farve illustrerer, at jern primært er lokaliseret i aleuronlaget og i embryoen. Til højre i figur 4B er anvendt farvestoffet dithiazon, der udvikler

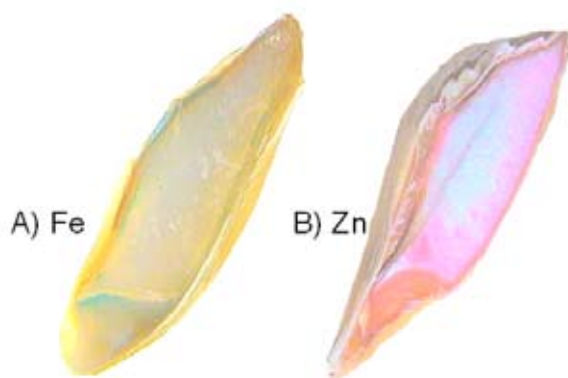


Figur 3. Anatomiske dele af en risikerne. Efter Britisk Encyklopædi (1996).

en rød farve sammen med zink. Embryoet og aleuronlaget farves intensivt rødt, men også i endospermen er der en aftagende rødfarvning ind mod centrum af kernen. Ved at sammenholde de to farvninger ses det, at koncentrationsfaldet mellem aleuronlag og endosperm er mindre for zink end for jern.

Endospermen består hovedsagligt af stivelse og udgør den største fraktion, ca. 86 % af vægten af en risikerne. Skaldele med tilhørende aleuronlag udgør ca. 12 %, mens resten (ca. 2 %) er embryo (fig. 5A). Byg og hvede har omtrent samme vægtmæssig fordeling af de forskellige kernefraktioner som i ris.

Fjernelsen af aleuronlag og embryo er ernæringsmæssigt meget uheldigt, da endospermen er den vævstype i kernen, som har den laveste zink- og jernkoncentration. Endospermen indeholder således blot godt halvdelen (57 %) af zink (fig. 5B) og ca. en tredjedel (32 %) af jern (fig. 5C) i en risikerne.



Figur 4. Længdesnit af bygkerner tilsat indikatorer for jern (blå farve, A) og zink (rød farve, B).

Tallene kan variere lidt afhængig af genotype og dyrkningsforhold, men variationerne blandt de eksisterende kommercielle sorter er ikke store. Omtrent halvdelen af alt zink og ca. to tredjedele af alt jern i en risikerne går altså tabt ved polering.

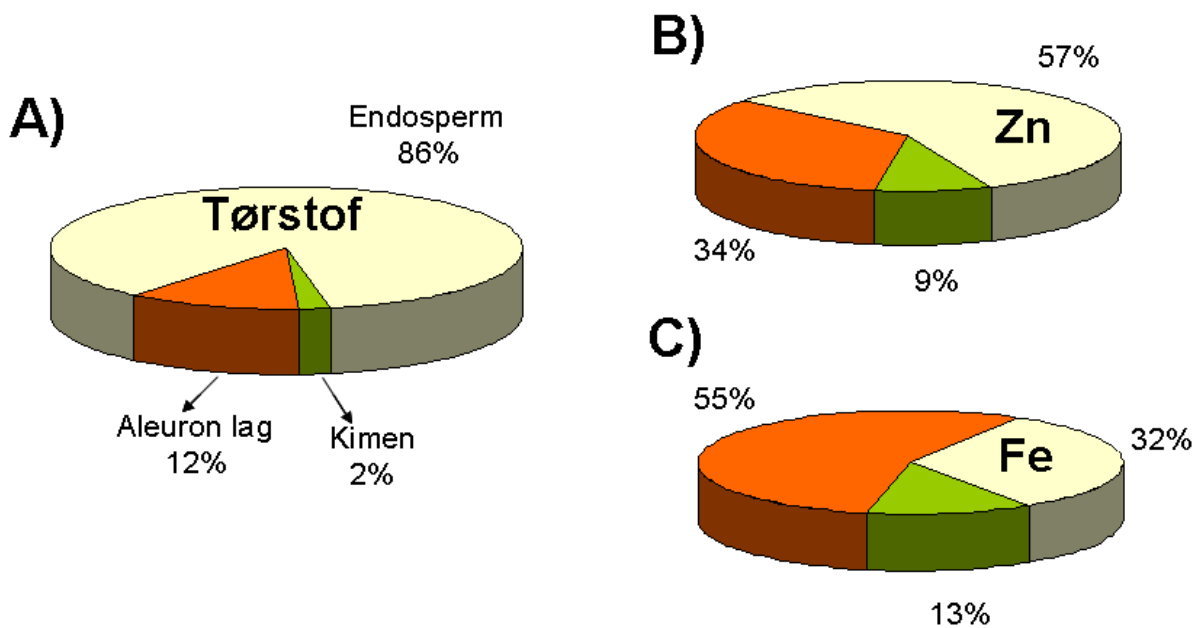
Grundstoffernes bindingsformer i kornkerner

Kornkerner indeholder betydelige mængder af fytinsyre (hexa-inositolfosfat), som udgør mere end 80 % af den totale fosformængde i en kornkerne (Raboy 2003). Fytinsyre formodes at reducere biotilgængeligheden af en række mikronæringsstoffer, heriblandt zink og jern, da polyvalente kationer (næringsstofferne) bindes til de negativt ladede fosforgrupper i fytinsyre. De derved dannede salte (fyttater) hydrolyseres kun i meget ringe udstrækning i tarmen hos dyr og mennesker (Cakmak m.fl. 2002).

Dogmet i dag er, at både jern og zink primært findes i de ydre dele (aleuronlaget og embryoet) af kornkerner, hvor de to mikronæringsstoffer hovedsageligt er bundne til fytinsyre. Der er imidlertid en meget begrænset viden om de faktiske bindingsformer. Fytinsyren er det dominerende lagermolekyle for fosfor, men danner en række forskellige komplekser med andet end metaller (fig. 6). Det drejer sig primært om positivt ladede proteiner, der også binder til de stærkt negativt ladede fosforgrupper i fytinsyren. Endvidere sker der formentligt en vis binding til stivelse ved hjælp af hydrogenbindinger.

En analyse af mikronæringsstoffers naturligt forekommende bindingsformer foregår normalt i tre trin: (i) ekstraktion af findelt materiale af de forskellige væv i kernen, (ii) separation på en væskkromatografisk søjle (HPLC) og (iii) detektion. I relation til sidstnævnte trin muliggør ICP-MS analyse af en række grundstoffer samtidig. Ved at måle jern og zink sideløbende med makronæringsstofferne fosfor og svovl, der er karakteristiske for henholdsvis fytinsyre og peptider/proteiner, kan det sandsynliggøres, hvilke bindingsformer der er i spil. Identisk retentionstid (co-eluering) mellem mikronæringsstof og fosfor vil stærkt indikere binding til fytinsyre. På samme måde vil et svovlsignal stærkt indikere binding til et protein eller et peptid. Ved at kalibrere kolonnen med opholdstiden (retentionstiden) på kolonnen for nogle kendte stoffer, kan størrelsen af jern- og zinkkomplekserne estimeres. Detektion af svovl på ICP-MS er en kompliceret opgave. Vi måler svovl som svovloxid (SO^+ , 48 amu) i en nyudviklet ICP-MS metode, der bliver publiceret i løbet af foråret (Persson m.fl. 2009).

Figur 7 viser et kromatogram med signaler for jern, zink, svovl og fosfor målt på et ekstrakt af kimen fra en bygkerne. Det fremgår tydeligt, at jern og zink eluerer forskelligt, både i relation til kompleksernes størrelse, samt i relation til deres bindingsform. Jern eluerer primært sammen med fosfor i et formodet fytat-proteinstivelse kompleks med en tilsyneladende masse på 15 kDa. Derimod ser zink ud til udelukkende at være bundet i et protein/peptid-kompleks, idet Zn har den



Figur 5. Den vægtmæssige fordeling (gram tørstof pr. kerne) af anatomiske vævstyper i ris (A), samt hvor stor en andel af totalindholdet af zink (B) og jern (C), som de forskellige fraktioner bidrager med (n=4).

samme retentionstid som svovl og slet ikke co-eluerer med fosfor. Dette kompleks har en tilsyneladende masse på 7 kDa.

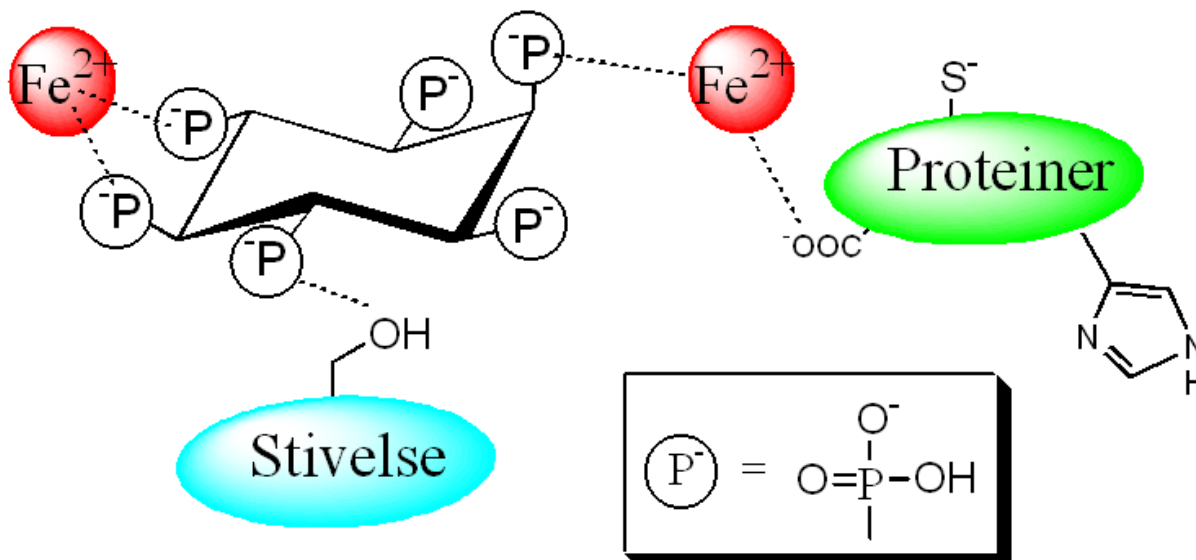
For yderligere at undersøge identiteten af fosforsignalerne i figur 7 har vi inkuberet ekstraktet med fytase, det enzym som nedbryder fytinsyre (hexainositolfosfat, InsP_6) til mindre inositolfosfater (InsP_5 - InsP_2), og injicerede dette på den kromatografiske kolonne. Resultaterne herfra viser det formodede, nemlig at det dominerende fosforsignal skyldes fytinsyre, idet intensiteten gradvist aftager med stigende inkubationstid, samtidig med, at det analytiske signal fra de mindre inositolfosfater, dvs. nedbrydningsprodukterne fra fytinsyre, stiger. Omkring 90 % af jern ekstraheret fra bygkimen var bundet til fytinsyre og ca. 10 % til mindre inositolfosfater. Ved

at inkubere kimen af bygplanter med fytase i 4 timer før ekstraktionen opnås en stigning på 250 % i den totale ekstraherbare mængde af jern. Den ekstraherbare mængde af zink øges derimod ikke ved behandling med fytase. Erstatte fytasen med et proteinnedbrydende enzym (protease XIV) ses i stedet en markant stigning i zink koncentration.

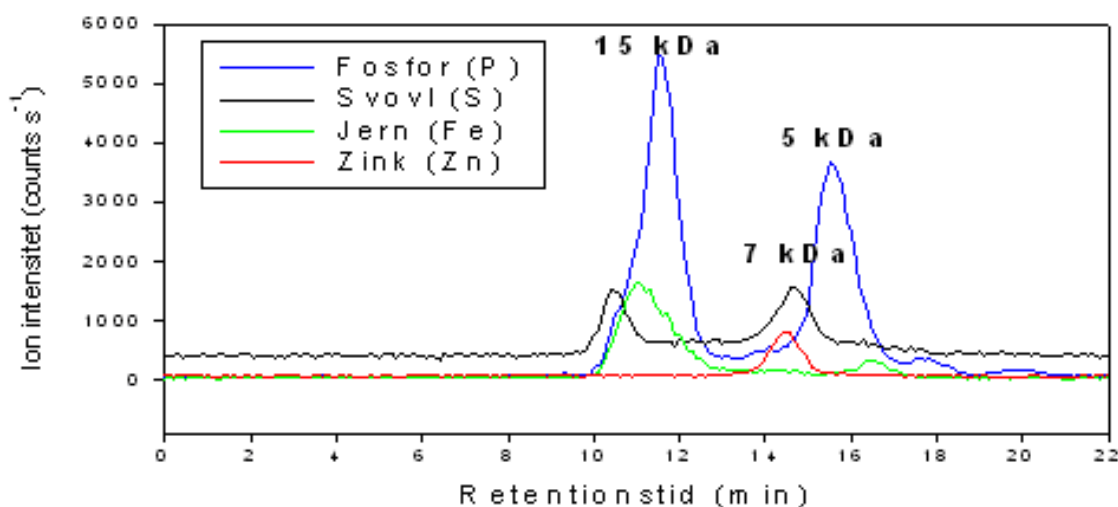
Tilsammen giver disse resultater stærk evidens for, at jern hovedsagelig er bundet til et fytinsyrekompleks, mens zink hovedsagelig er bundet til protein.

Perspektiver

En forskellig bindingsform af jern og zink i kornkerner vil have konsekvenser for forædlingen af nye kornsorter med øget indhold af mikronæringsstoffer, som har en



Figur 6. Den fosforrige fytinsyres potentielle bindingsformer til mineralske kationer, proteiner og stivelse.



Figur 7. Et kromatogram som viser hvordan jern, zink, svovl og fosfor fordeles størrelsesmæssigt i kimen fra en bygkerne. Den dominerende jerntop (grøn) co-eluerer med den dominerende fosfortop (blå), hvilket indikerer binding til fytinsyre i et ca. 15 kDa kompleks. Zinktoppen (rød) co-eluerer med en svovltop (sort), hvilket indikerer binding til protein eller peptid i et ca. 7 kDa kompleks.

højere tilgængelighed for mennesker og dyr. En øget pulje af biotilgængeligt zink i kornkerner nås sandsynligvis ikke ved at forædle efter et lavere indhold af fytinsyre. En øgning af proteinindhold i endospermen vil formentligt have større effekt. Uanset hvad, så skal strategierne for bekæmpelse af jern- og zinkmangel differentieres og ikke, som tilfældet i høj grad er i dag, bekæmpes med de samme midler.

Litteratur

- Agilent, 2009. Online information at: www.agilent.dk
- Cakmak, I. Graham, R.D. & Welch, R.M. (2002). Agricultural and molecular genetic approaches to improving nutrition and preventing micronutrient malnutrition globally. I: Knowledge for sustainable development – an insight into the encyclopaedia of life support systems. UNESCO Publishing, vol. 2: 1075-1099.
- Laursen, K. H., D. P. Persson, T. H. Hansen, J. K. Schjørring and S. Husted (2009). Multi-elemental fingerprinting of plant tissue by semi-quantitative ICP-MS and chemometrics. *In press*.
- Lopez, H. W., F. Leenhardt, C. Coudray and C. Remesy (2002). Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem? *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37: 727-739.
- Lönnerdal, B. (2002). Phytic acid – trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37: 749-758.
- Mitsuhashi, N., M. Ohnishi, Y. Sekiguchi, Y-U. Kwon, Y-T. Chang, S-K. Chung, Y. Inoue, R. J. Reid, H. Yagisawa and T. Mimura (2005). Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of

Catharanthus roseus induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Plant Physiology*, vol. 138: 1607-1614.

Ockenden, I., J. A. Dorsch, M. M. Reid, L. Lin, L. K. Grant, V. Raboy and J. N. A. Lott (2004). Characterization of the storage of phosphorous, inositol phosphate and cations in grain tissues of four barley (*Hordeum vulgare* L.) *low phytic acid* genotypes. *Plant Science*, vol. 167: 1131-1142.

Persson D. P., T. H. Hansen, K. H. Laursen, J. K. Schjørring and Søren Husted (2009). Simultaneous zinc, iron, sulphur and phosphorus speciation analysis of the barley grain using SEC-ICP-MS and LC-ESI-MS. *In press*.

Raboy, V. (2003). *Myo*-inositol-1-2-3-4-5-6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*, vol. 64: 1033-1043.

Tak til HarvestPlus, DANIDA, Forskningsrådet for Teknologi og Produktion, EU's 6. rammeprogram (projekterne META-PHOR og PHIME) og Fødevareministeriet (ICROFS, projekt ORGTRACE) for økonomisk støtte.