

Fattigmandskost – forbedring af kassava's ernæringsmæssige værdi

Rubini Kannangara, Kirsten Pernille Sølvhøj Søgaard, Natascha Kristine Krahl Hansen, Kirsten Jørgensen og Birger Lindberg Møller. "Pro-Active Plants" - a VKR Centre of Excellence, Plant Biochemistry Laboratory, Department of Plant Biology and Biotechnology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen. blm@life.ku.dk

Kassava er tropernes kartoffel. Molekylær forædling af kassavaplanten kan forbedre ernæringsituationen for millioner af mennesker i udviklingslandene.

Kassava som stabil kulhydratkilde

Der er mange grunde til at kassava's betydning som basal fødevarerkilde i de afrikanske lande syd for Sahara er stigende. Kassava giver et højt udbytte selv på næringsfattige og eroderede jorde og kan dyrkes med lavt ressourceinput (figur 1). Kassava er tørketolerant og de stivelsesholdige rodknolde kan tåle at blive liggende i jorden et par år. Dyrkning af kassava udgør derfor en sikker kilde til kulhydrat, der kan forhindre eller begrænse sultkatastrofer i perioder med dårlige dyrkningsbetingelser som f. eks. mangel på regn og giver mulighed for at der også kan høstes en afgrøde på eroderede og ellers forladte jorder. Kassava formeres nemt vegetativt ved at afskære stængelstykker sættes ned i jorden (figur 2). Det betyder, at der i perioder med fødevaremangel ikke er behov for samtidig at skulle gemme en del af det spiselige høstudbytte for at kunne tilplantet den næste mark for også næste år at have noget at høste.

Forarbejdning af kassava

Rent ernæringsmæssigt har kassava flere ulemper. Rodknoldene har et lavt indhold af proteiner og vitaminer. Desuden indeholder alle dele af planten en gruppe af bio-aktive naturstoffer, der benævnes cyanogene glukosider. Kassava indeholder de to cyanogene glukosider linamarin og lotaustralin. Når plantevæv, der indeholder cyanogene glukosider knuses og den cellulære struktur derved ødelægges, nedbrydes de to cyanogene glukosider til giftige cyanohydriner, hydrogencyanid og ketoner (acetone og 2-butanon). Målt per indbygger er forbruget af kassava størst i den Demokratiske Republik Congo hvor forbruget i følge FAO i gennemsnit er 333 kg om året eller knap et kilo per person per dag. Her dækkes 60% af hele befolkningens kalorieforbrug af kassava. I områder, hvor kassava er hovedernæringskilden eller det eneste, der er at spise, er det vigtigt, at de cyanogene glukosider og deres giftige nedbrydningsprodukter fjernes ved omhyggelig forarbejdning inden kassava-produkterne spises. Forarbejdningsprocesserne kræver brug af meget vand og er samtidig tidsrøvende og kræver hårdt arbejde. Forarbejdningen kan bestå i rivning, udpresning af den cyanidholdige celsaft, soltørring, kogning i vand, udskæring til chips der steges eller

formaling til mel (figur 3A-H, figur 4I-K). Der kan også indgå et fermenteringstrin. Forarbejdningen udføres typisk af kvinder, der i stedet kunne bruge tiden bedre på at undervise deres børn. Ordentlig forarbejdning er vanskelig at gennemføre, når der er hungersnød og derfor akut brug for mad, når der er tørke og mangel på vand, krig og ustabile samfundsforhold og vanskeliggøres yderligere af, at knoldene er letfordærlige og derfor skal forarbejdes, så snart de er gravet op (Figur 5). Grundig forarbejdning fjerner ikke alene de giftige nedbrydningsprodukter men fører desværre også til at en stor del af de proteiner, mineraler og vitaminer, der var i knoldene går tabt. Det betyder, at der opnås et endeligt produkt, der i al væsentlighed består af stivelse. Tomme kalorier, ville vi sige i vores del af verden. På globalt plan fører forarbejdning af kassava på årsbasis



Figur 1: Kassavabonde fra Tanzania, der har lige har trukket en kassavaplante med dens rodknolde op af jorden.



Figur 2: Kassava formeres let vegetativt ved at stikke afskårne stængelstykker i jorden. Efter en uges tid dannes så nye skud ved de stivelsesholdige vækstpunkter ved bladhjørnerne, der ses som udposninger på stængelen.

til frigivelse af 30.000-100.000 tons hydrogencyanid til vandløb, søer og atmosfæren. Mangelfuld forarbejdning kan give anledning til kronisk cyanidforgiftning og sygdommen tropisk ataksisk neuropati (manglende evne til at koordinere bevægelsen af arme og ben). Alvorlige tilfælde af cyanidforgiftning kombineret med en almen dårlig ernæringsstilstand er korreleret med udbrud af sygdommen konzo, der fører til permanent lammelse. Kroppens metabolisme af cyanid

I befolkninger hvor kassava kun indgår som en lille del af kalorieindtaget er forarbejdningen ikke så vigtig. Så vil en rå kassavaknold med rimelig lavt indhold af cyanogene glucosider godt kunne nydes som en snack. Den person, der spiser kassavaen vil sandsynligvis have en god helbredstilstand og få en varieret kost og derfor nemt kunne omsætte den cyanid, der indtages. Dødelig dosis (LD_{50}) af cyanid afhænger meget af ernæringsstatus, men ligger i området 1- 4 mg per kilo legemsvægt. Vores krop kan godt afgifte mindre mængder af cyanid. For eksempel indeholder god råmarcipan omkring 7 mg hydrogencyanid per kilo stammende fra de mandel- eller abrikoskerner, der blev brugt til fremstillingen. En ryger indtager omkring 0,3 mg hydrogencyanid ved hver cigaret der ryges! Cyanid opfattes normalt som meget giftigt, og det skyldes i vidt omfang at forgiftning med cyankalium (kaliumsaltet af hydrogencyanid) i mange kriminalromaner af berømte forfattere er blevet beskrevet som en gængs fremgangsmåde til at tage livet af folk (figur 6). I dag findes der langt mere effektive og sværere sporbare stoffer, der kan bruges til det formål.

Afgiftningen sker ved omdannelse af hydrogencyanid til thiocyanat og katalyseres af enzymet rhodanese. Ved den proces forbruges imidlertid den svovlholdige aminosyre cystein. I fattige befolkningsgrupper, hvor kassava bidrager med en stor del af det samlede kalorieindtag, er svovlaminosyrerne cystein og methionin typisk nogle af de begrænsende aminosyrer for dannelse af protein. Ernæringsstilstanden forringes derfor yderligere.

Molekylær forædling af kassava

På Plantebiokemisk Laboratorium ved Institut for Plantebiologi og Bioteknologi på Københavns Universitet har vi opklaret biosyntesevejen for cyanogene glucosider. Den omfatter to membranbundne cytokrom P450 enzymer og en UDP-glukosyltransferase og kræver medvirken af en membranbunden NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktase. Vi har udviklet en Agrobakterium-baseret transformationsmetode for kassava som virker med mange forskellige genotyper (figur 7). Det betyder at vi også kan arbejde med de højtydende elitetyper af kassava, der er udviklet på The International Institute of Tropical Agriculture (IITA), et CGIAR institut der er placeret i Ibadan, Nigeria. Fra IITA har vi også modtaget kassavasorter, hvis rodknolde er gule fordi de indeholder vitamin A forstadier. Ved hjælp af RNA interferens teknologi har vi nu været i stand til at blokere dannelsen af cyanogene glucosider i disse udvalgte sorter således at indholdet af cyanogene glucosider er fjernet i bladene og reduceret med mere end 90% i rodknoldene.

Arkæologiske udgravninger i Mellem- og Sydamerika viser at kassavaplanten allerede anvendtes som kulturplante for mere end 8.000 år siden. Forarbejdning og forædling af kassava er således forløbet parallelt gennem årtusinder. Da det protein, der var i knoldene, blev tabt under forarbejdningen, er der i gennem tusinder af år nok ubevidst og indirekte foretaget en forædling hen imod et lavere indhold af protein. Et højt indhold af protein må nemlig forventes at korrelere med et lavere indhold af stivelse, dvs. med et lavere udbytte efter forarbejdning. Det er i hvert fald de erfaringer vi har fra forædling af majs hvor et højt proteinindhold har betydet et tilsvarende lavere indhold af stivelse. Så der er ikke noget der tyder på at det ikke ved molekylær forædling skulle være muligt at forøge indholdet af protein i kassavaplantens rodknolde.

I fravær af cyanogene glucosider er der ikke behov for intensiv forarbejdning af kassava for at gøre den spiselig. Det betyder at indholdet af proteiner, mineraler og vitaminer ikke nødvendigvis tabes ved forarbejdning. Det gør det relevant at påbegynde forædling med henblik på at forøge indholdet af proteiner i kassavaplantens knolde.

Til det formål er vi nu i gang med at fremstille transgene kassavalinier uden cyanogene glucosider som samtidig har et større indhold af protein i rodknoldene. Det gør vi ved specifikt at udtrykke kartoffelns lagerprotein patatin i kassavaknoldene. For at sikre at dette protein



Figur 3: Forarbejdning af kassava i Uganda. I Afrika er det næsten altid kvinderne der udfører dette hårde og tidskrævende arbejde. Kassavaknoldene køres fra marken ind i landsbyen hvor kvinderne så kan sidde i skygge under et halvtag og begynde forarbejdningen (panel A). Forarbejdningen startes med at rodknoldenes yderste brune lag, der indeholder de højeste mængder af cyanogene glukosider, fjernes enten ved at kassavaknoldene skrælles (panel B) eller ved at de udblødes to-tre dage i vand, således at de bliver bløde og det yderste lag kan pilles af med fingrene (panel C). Knoldene rives på et stykke blik som der er omdannet til et rivejern ved at der er banket søm igennem det (panel D). De revne kassavaknolde kommer i en sæk som der placeres tunge sten ovenpå for på den måde at presse den giftige celledsaft ud (panel E). Når kassavaen skal bruges til fremstilling af "gari", er et af tilberedelsestrinnet ristning over åben ild (panel F). Forarbejdning af kassava er en vigtig del af afrikanske kvinders hverdag og giver social sammenhæng. Men tiden kunne også bruges på at få undervist børnene bedre (panel G). Den forarbejdede kassavastivelse tørres på jorden og den afrikanske mand kan stå og glæde sig over det endelige resultat (panel H).

ikke tabes ved forarbejdning har vi i det udtrykte gen indført en ekstra sekvens, der koder for et stivelsesbindende domæne og en sekvens, der dirigerer patatinen ind i rodknoldenes amyloplaster, hvor det så bindes til stivelseskornene. Idéen med dette er, at patatin ikke tabes selv hvis knoldene forarbejdes på traditionel vis for at nå frem til et ønsket produkt.

En gensplejset giftfri kassava

Hvordan vil en kassavaplante uden indhold af cyanogene glukosider klare sig i naturen? Det kan vi ikke give noget entydigt svar på. Det kræver åbne markforsøg i lande med subtropisk eller tropisk klima og i områder hvor kassava normalt dyrkes. Kun da vil det kunne afgøres om planterne uden cyanogene glukosider klarer sig godt eller dårligt under et relevant gældende sygdomstryk og

i tilstedeværelse af de normalt forekommende skadedyr. Da de planter vi arbejder med imidlertid er gensplejsede (vi har jo sat det første gen af biosyntesevejen ud af funktion!) kræver det en langvarende og økonomisk meget kostbar godkendelsesprocedure. I de fleste afrikanske lande er regelsættet for en sådan afprøvning slet ikke på plads. Som forsker er der heller ikke megen mening i at forcere en afprøvning et sted i Afrika, før vi i Europa selv er nået frem til en klar stillingtagen til dyrkning af gensplejsede afgrøder. En afprøvning under omstændigheder, hvor der ikke på hjemmefronten er etableret en lovmæssig klar holdning til og erfaring med håndtering af gensplejsede afgrøder, vil meget nemt og hurtigt udvikle sig til en skueplads, hvor GreenPeace vil kunne nyde at have temmelig frit spil til at udfolde



Figur 4: Maskinel forarbejdning af kassava begynder at vinde indpas i Afrika. Så er det straks mændene der står i spidsen for arbejdet! De maskinelt skrællede kassavaknolde køres hen til den motordrevne blender (panel A). Knoldene køres gennem blenderen og bliver skåret til lange små chips (panel B). Kassavachipsene tørres på net (panel C).

sig med fejlinformation til de lokale myndigheder og landbefolkningen og hvor de implicerede forskere kommer på mellemhånd. Vi importerer gladeligt store mængder gensplejset foder i Danmark, men tillader ikke selv dyrkning af gensplejsede planter! Det giver en utrolig skævvridning af konkurrencemulighederne for de europæiske landmænd. Og det hæmmer indirekte udviklingen af landbrugsproduktionen i udviklingslandene. Samtidig forplumrer det debatten og gør ikke de danske forbrugere klart hvor udbredte gensplejsede produkter er i verdenen omkring os. Idag er 60 procent af alle de sojabønner der dyrkes i verdenen gensplejsede og 28 procent af al bomuld. Der er ikke mange forbrugere, som går rundt i bomuldstøj, der ikke kommer fra gensplejsede planter.

Hvilken gavn har planter af at danne cyanogene glukosider?

Så indtil videre kan vi kun spekulere på hvordan kassavaplant uden cyanogene glukosider vil klare sig i naturen. I den sammenhæng er det vigtigt at tænke på at alle planter, også kassava, producerer en lang række forskellige bio-aktive naturstoffer for at forsvare sig mod sygdomsangreb og insekter og for at kunne tilpasse sig ændringer i det omgivende miljø. I en evolutionsmæssig sammenhæng er cyanogene glukosider meget gamle forsvarsstoffer. De findes i mere end 3.000 forskellige plantearter strækkende sig lige fra bregner over énkimbladede planter til de tokimbladede planter. Cyanogene

glukosider har således været til stede i primitive planter i omkring 420 millioner år. I geologiske termer svarer det til at de begyndte at forekomme i Devon-tiden og at de var almindeligt udbredte på de to gamle superkontinenter Gondwana-land på Jordens sydlige halvkugle og Laurrasien på den nordlige halvkule og således også da disse to kontinenter for ca. 260 millioner år siden smeltede sammen til det endnu større superkontinent Pangæa. I disse hundrede af millioner af år har der været et tæt samspil og co-evolution mellem de planter der indeholdt cyanogene glukosider og de mikroorganismer og insekter der fandtes i det omgivende miljø. Vores seneste analyser tyder endda på at visse insekter var i stand til at danne cyanogene glukosider, før de overhovedet begyndte at forekomme i primitive planter.

Vi ved nu at nogle insekter, såsom den seksplettede køllesværmer, er blevet helt "afhængige" af cyanogene glukosider (figur 9). Køllesværmerlarven optager de cyanogene glucosider fra fødeplanten og oplager dem i hulrum i sin kutikula. Når larven bliver angrebet, udskiller den de cyanogene glukosider i dråber på sin overflade for at afskrække angriberen. Kan larven ikke få nok cyanogene glukosider fra sin fødeplante er den i stand til selv at danne dem. Det kræver imidlertid meget energi. En køllesværmerlarve, der vokser op på en plante med lavt indhold af cyanogene glucosider, udvikler sig derfor meget langsomt. De cyanogene glucosider har også vigtige funktioner i parringsprocessen. Så nogle

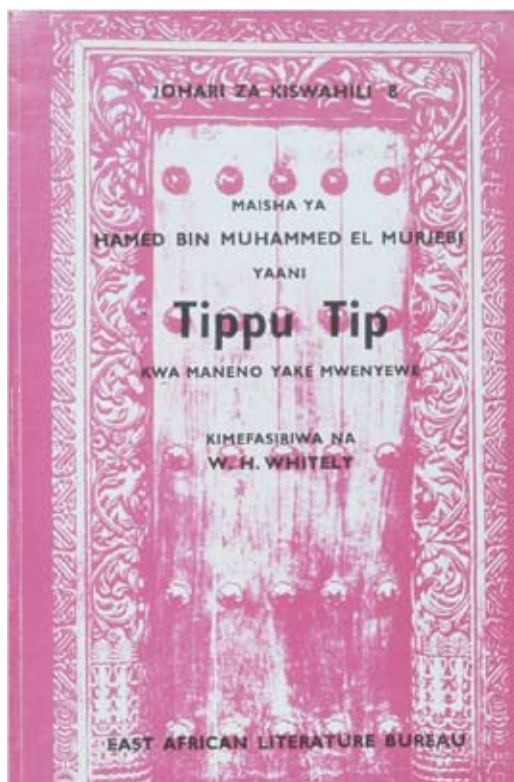
insekter, der tidligere har medført skader på kassava, vil måske fravælge en kassava uden cyanogene glukosider, mens andre insekter, der er generalister, og som hidtil ikke har udgjort et problem i kassava, nu imidlertid måske kan blive det.

De fleste svampe er i stand til at afgifte hydrogencyanid ved at omdanne det til formamid, som så spaltes til carbondioxid og ammoniumioner. Det menes f. eks. at være årsagen til at bl. a. gummitræer generelt er mere følsomme for svampeangreb jo højere indhold af cyanogene glukosider de har. Det kan betyde at kassava uden cyanogene glukosider vil være mindre udsat for svampeangreb.

Blandt hvidkløver findes der planter, der producerer de samme to cyanogene glukosider som vi finder i kassava. Men der findes også hvidkløverplanter, der enten ikke kan producere eller nedbryde cyanogene glukosider. De hvidkløverplanter, der producerer cyanogene glukosider, er bedre beskyttet mod snegleangreb. Men de vokser langsommere end de planter der ikke producerer cyanogene glukosider. I perioder med voldsomme snegleangreb klarer de cyanogene planter sig derfor bedst, mens de acyanogene planter profiterer af at kunne vokse hurtigere i de perioder hvor der ikke forekommer eller kun er begrænsede angreb af snegle. Begge typer planter lever således side om side i naturen. Det viser at cyanogene glukosider ikke er essentielle for planten, men at de under visse miljømæssige forhold kan give planten en lille fordel. Ligesom hos kløver, findes der mandeltræer der bærer mandler der indeholder cyanogene glukosider og træer hvis mandler ikke gør det. Det kender vi som hhv. bitre og søde mandler. Det viser sig, at de bitre og søde mandler begge danner nogenlunde samme mængder af cyanogene glukosider. Syntesen foregår i tegumentet, den brune hinde vi fjerner når vi smutter mandler, men som under kerneudviklingen er et meget aktivt væv. I den søde mandel nedbrydes de cyanogene glukosider inden de transporteres fra tegumentet ind i mandelkernen og udnyttes til at balancere aminosyreforsyningen og dermed optimere dannelsen af protein i kernen. I den bitre mandel sker denne nedbrydning ikke. Den sker først når den bitre mandel spirer og tjener der til at optimere en balanceret tilførsel af aminosyrer til den udviklende spire. Planter er altså i stand til at gen-omdanne bio-aktive naturstoffer (tidligere kaldet sekundære metabolitter) til primære metabolitter. Hvorvidt denne mekanisme spiller nogen rolle i kassava dyrket under normale forhold ved vi ikke.

Kassava og bio-ethanol

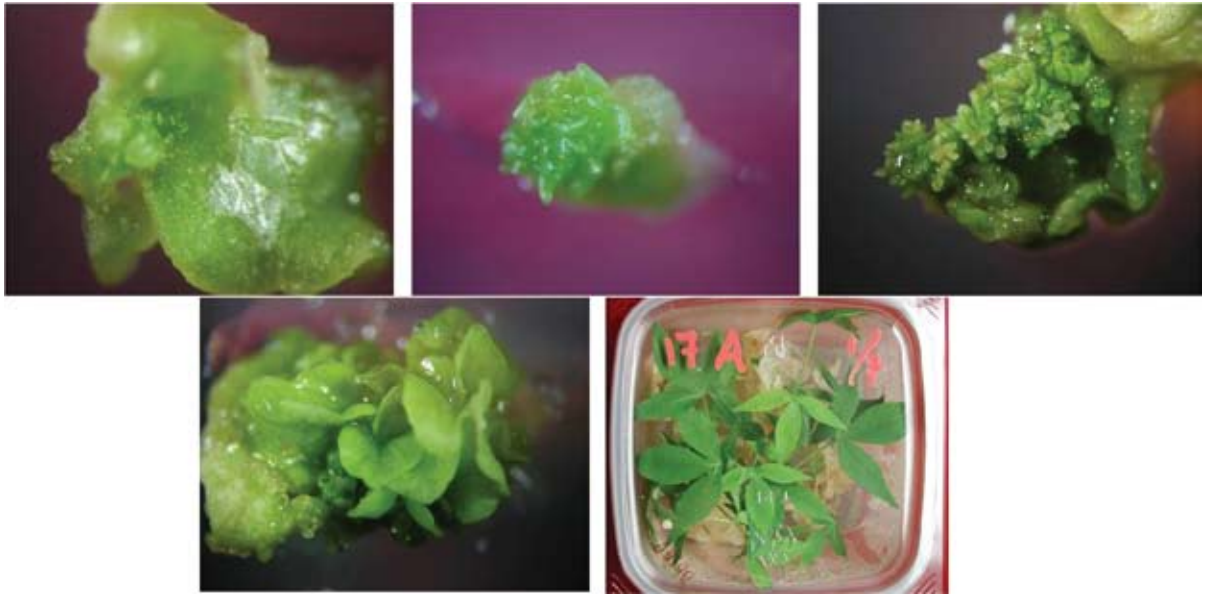
Forædlingsmæssigt har der tidligere ikke været nogen interesse fra kommercielle forædlingsfirmaer i kassava. Det skyldes, at planten meget let formeres vegetativt, og forædleren dermed ikke kan sikre sig at forædlingsarbejdet bliver økonomisk rentabelt. Så snart kassavabonden har modtaget blot én plante, kan han hurtigt opformere den vegetativt til 100 nye genetisk identiske planter! Forædling af kassava er tidligere udelukkende



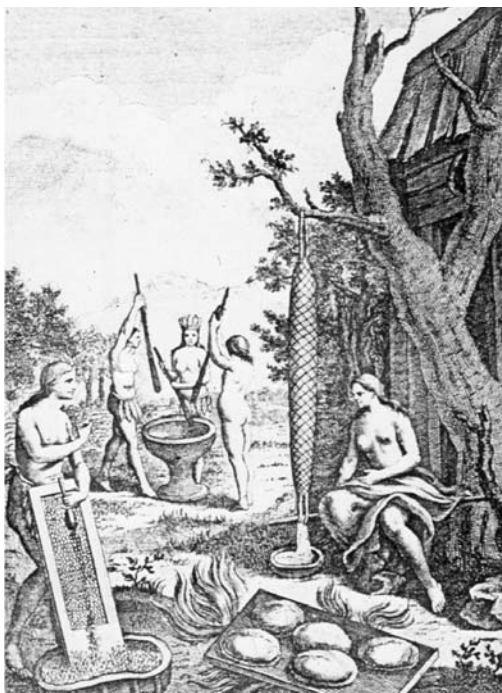
Figur 5: Forsiden af Tippu Tips dagbog. Tippu Tip døde i 1905 og beretter i sine dagbogsoptegnelser udførligt om, hvorledes akut mangel på mad og kendskab til tilberedningen af kassava resulterer i cyanidforgiftning. Tippu Tip var slavehandler i Congo og havde på disse rejser mødt både Livingstone og Stanley og stået i spidsen for en ekspedition for at finde Stanley.



Figur 6: Forsiden af Agatha Christie's kriminalroman "Sparkling Cyanide" hvor cyankalium spiller en væsentlig rolle.



Figur 7: Agrobakterium-baseret transformation af kassava. Små kimbladsstykker inokuleres med agrobakterium, som overfører de ønskede egenskaber. Ud fra disse små kimbladsstykker gendannes små planter/skud. For at kunne identificere de planter, til hvilke det er lykkedes agrobakterium at overføre de nye egenskaber, dyrkes planterne på selektionsmedium (her antibiotika), som kun tillader at de transformerede planter at vokse videre. De transformerede planter/skud forbliver grønne og udvikles til store planter, mens de ikke transformerede bliver hvide og dør.



Figur 8: Forarbejdning af kassava vist på træsnit fra 1791 i værket El Orinoco af Gumilla. Kassavaen rives i stykker på rivejern (til venstre). Den revne kassava kommes ned i en flettet aflang beholder, der kaldes en tipitie. Beholderen har en løkke i begge ender. Beholderen hænges op i et træ ved at den ene løkke sættes ind over en kraftig gren og strækkes ud ved at en af kvinderne sætter sig på en tyk gren, der er anbragt i løkken i den anden ende af beholderen. Derved trykkes den cyanid-holdige celsesaft ud gennem fletværket. Kassavaen formales (de tre kvinder i baggrunden) og derefter fremstilles kassavapandekager på et ildsted (ses i forgrunden).

foregået i offentligt regi med The International Institute of Tropical Agriculture (IITA) i Ibadan, Nigeria og Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) i Cali, Colombia, som de to hovedaktører. Kassava er imidlertid nu blevet meget interessant som en fremtidig energiafgrøde. Det store indhold af stivelse gør produktion af bio-ethanol fra kassavaknolde meget attraktiv. Samtidig rapporteres udbytter på 80 tons per hektar. US Department of Energy har derfor finansieret igangsætning af totalsekventering af kassavaplantens genom. Formålet hermed er dels at kunne foretage effektiv molekylær forædling af kassava mod højere udbytte mht. bio-ethanol produktion. Denne produktion kunne foregå i amerikanske sydstater som Texas og Louisiana. Men det åbner samtidig mulighed for at fastlægge potentialet for brug af kassavaplantens knolde som et biologisk fornybart produktionssystem til syntese af finkemikalier til erstatning for dem, som vi idag får fra olieindustrien eller for syntese af kostbare medicinske produkter. Så fra at være en central kulturplante i Afrika, Sydamerika og Sydøstasien og lidet påagtet i den industrialiserede del af verden, er kassava nu kommet på den globale dagsorden. Ikke for at løse sultproblemer i udviklingslandene, men for at frigøre den industrialiserede verden fra afhængigheden af olie fra den arabiske verden!

Udvalgt faglitteratur:

A.V. Morant, K. Jørgensen, S.M. Paquette, R. Sánchez-Pérez, B.L. Møller and S. Bak: Beta-Glucosidases as Detonators of Plant Chemical Defense. *Phytochemistry* 69: 1795-1813 (2008)

M. Zagrobelny, S. Bak and B.L. Møller: Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* 69:1457-1468 (2008)

Larve af sekspletet køllesværmer



Irriteret larve frigiver forsvarsdråber



Sekspletet køllesværmer



Close-up af forsvarsdråberne



Figur 9: Sekspletet køllesværmer og dens larve. Insektlarven lever på planter som kællingetand, der producerer de samme to cyanogene glukosider (linamarin og lotaustralin), der findes i kassava. Under hver af de sorte pletter på køllesværmerlarvens ryg findes hulrum, hvor larven oplagrer cyanogene glukosider. Når larven bliver truet, udskilles forsvarsstofferne som dråber på dens overflade.

N. Bjarnholt, M. Laegdsmand, H.C.B. Hansen, O.H. Jacobsen and B.L. Møller: Leaching of cyanogenic glucosides and cyanide from white clover green manure. *Chemosphere* 72: 897-904 (2008)

R. Sánchez-Pérez, K. Jørgensen, C. E. Olsen, F. Dicenta and B. L. Møller: Bitterness in almonds. *Plant Physiology* 146: 1040-1052 (2008)

A.V. Morant, K. Jørgensen, B. Jørgensen, W. Dam, C.E. Olsen, B. L. Møller and S. Bak: Lessons learned from metabolic engineering of cyanogenic *Metabolomics* 3: 383-398 (2007)

M. Zagrobelny, S. Bak, C.E. Olsen and B.L. Møller: Intimate roles for cyanogenic glucosides in the life cycle of *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera, Zygaenidae) *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:1189-1197 (2007)

R. Jenrich, I. Trompetter, S. Bak, C.E. Olsen, B.L. Møller and M. Piotrowski: Evolution of heteromeric nitrilase complexes in Poaceae with new functions in nitrile metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:18848-18853 (2007)

C. Kristensen, M. Morant, C.E. Olsen, C.T. Ekstrøm, D.W. Galbraith, B.L. Møller and S. Bak: Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with

marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 1779-1784 (2005)

D.B. Tattersall, S. Bak, P.R. Jones, C.E. Olsen, J.K. Nielsen, M.L. Hansen, P.B. Høj and B.L. Møller: Resistance to an Herbivore Through Engineered Cyanogenic Glucoside Synthesis. *Science* 293: 1826-1828 (2001)