



Doctoral Thesis

Dietary factors influencing non-heme iron absorption

Author(s):

Storcksdieck, Stefan

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005332658> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 16795

**DIETARY FACTORS
INFLUENCING NON-HEME IRON ABSORPTION**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

STEFAN STORCKSDIECK GENANNT BONSMANN

Dipl. oec. troph., Justus-Liebig-University Giessen, Germany
born 08.01.1974
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Richard F. Hurrell, examiner
Dr. Manju B. Reddy, co-examiner
Prof. Dr. Renato Amadò, co-examiner

2006

Summary

Background

Non-heme iron bioavailability in humans is influenced by a variety of dietary factors. Ascorbic acid and meat have been repeatedly shown to enhance iron absorption, whereas polyphenols, phytic acid, calcium as well as milk and soy proteins depress it. Organic acids such as citric, malic, and oxalic acid have produced equivocal results. How meat exerts its beneficial effect on iron absorption has so far eluded researchers. Most studies provide evidence in favor of meat proteins as the source of enhancer(s), but more recent *in vitro* data also suggest glycosaminoglycans, a minor muscle tissue component, as a potential “meat factor”. Oxalic acid is assumed to largely contribute to the poor bioavailability of spinach iron; yet experimental evidence to justify this claim is scarce.

Aim

The aim of this PhD project was to evaluate selected dietary components with regard to their influence on non-heme iron bioavailability. Firstly, experiments were undertaken to isolate and characterize iron-binding peptides from meat that may serve as enhancers of iron absorption. Secondly, purified glycosaminoglycans were assessed as to their potential “meat factor” properties. Lastly, the role of oxalic acid in human iron absorption was addressed.

Design

In study series 1, an extensive set of *in vitro* experiments was performed to obtain information on low-molecular-weight iron-binding meat peptides that could act as promoters of iron absorption. Simulated gastrointestinal digestion with pepsin and pepsin/pancreatin, ultrafiltration, gel filtration with an added radioiron tracer, amino acid analysis, Caco-2 cell culture, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) were employed to characterize iron-binding peptides from water-soluble (sarcolemmal) and salt-soluble (myofibrillar) meat protein extracts.

Study 2 comprised two human stable isotope studies comparing iron absorption from a semisynthetic meal (maltodextrin, corn oil, egg albumin, water) with or without purified glycosaminoglycans of either the unsulfated (hyaluronic acid) or sulfated

(chondroitin sulfate) type. Absorption was quantified by measuring erythrocyte incorporation of ^{57}Fe and ^{58}Fe 14 d after test meal administration.

Iron absorption from kale (low in native oxalic acid) with or without added potassium oxalate was determined in study 3 and compared to iron absorption from spinach (high in native oxalic acid).

Results

Study series 1: Low-molecular-weight peptides (< 10 kDa) set free upon digestion of myofibrillar proteins from beef, chicken, cod, lamb, and pork muscle tissue showed extensive iron-solubilizing capacity. Between 84-98% of the total iron in the assay appeared in the ultrafiltrable fraction of these proteins. Based on results from beef, chicken, and cod, pepsin digestion alone was sufficient to produce such peptides. Gel filtration of the myofibrillar peptides tagged with ^{59}Fe revealed a fraction of 2 kDa molecular weight as the major iron-binding fraction. As indicated by amino acid analysis, glutamic and aspartic acid residues were enriched in the iron-binding peptides. LC-MS of peptides separated by gel filtration and coupled with a SwissProt database search matched some of the peptide masses to fragments of the major myofibrillar protein myosin.

Study series 2: Addition of the unsulfated glycosaminoglycan sodium hyaluronate (300 mg) to a semisynthetic meal consisting of maltodextrin, corn oil, egg albumin, and water did not significantly affect its iron bioavailability (21.2% vs 19.5%, $P = 0.42$). Replacing sodium hyaluronate with equimolar amounts of the sulfated glycosaminoglycan chondroitin sulfate (360 mg) yielded very similar results (19.4% vs 20.3%, $P = 0.64$). Percentage iron absorption was not significantly different between the semisynthetic meals containing either sodium hyaluronate or chondroitin sulfate ($P = 0.50$). The study design would have allowed detecting a change in iron absorption of about 30% at 80% power.

Study series 3: Iron absorption from meals containing 100 g wheat bread rolls and 150 g kale, a vegetable low in native oxalic acid (< 0.01 g/100 g fresh weight), was 11.0% and did not differ from kale meals with 1.26 g added potassium oxalate (11.2%). Normalization for reference spinach meal iron absorption yielded absorption percentages of 10.7% and 11.5%, respectively, the difference remaining non-

significant ($P = 0.86$). Iron absorption from the spinach meals was 8.4% in the first study and 8.0% in the second study. The 24-28% lower absorption from the spinach compared to the kale meals did not reach statistical significance ($P > 0.16$), which could be expected as the study was designed to pick up a 30% difference at 80% power.

Conclusions

1. The present findings provide further evidence that low-molecular-weight peptides set free upon digestion of myofibrillar meat proteins bind and solubilize iron. These results are in line with literature reports and extend the published data mostly on chicken muscle, to include beef, cod, lamb, and pork. Importantly, pepsin digestion was sufficient to obtain such peptides. The gel filtration experiments identified a new group of iron-binding peptides of 2 kDa molecular mass enriched in aspartic and glutamic acid which could explain the iron-binding properties. The results would support a theory of early release, in the stomach, of peptides by pepsin which bind with iron and prevent interaction with inhibitors of iron absorption such as phytic acid and polyphenols. The peptides remain soluble at the higher pH of the duodenum and transport iron to the absorptive sites. Certain iron-binding peptides within the 2 kDa group of peptides identified in this study would be expected to be part of the “meat factor”. Nevertheless, other peptides not identified in this study, and perhaps enriched in cysteine and/or histidine, could also be part of the “meat factor”.

2. Meat carbohydrates, namely glycosaminoglycans derived from the intercellular matrix, have been proposed as an alternative “meat factor” based on Caco-2 iron uptake experiments. The two human absorption studies evaluating hyaluronic acid and chondroitin sulfate – which may be regarded representative of unsulfated and sulfated glycosaminoglycans, respectively – did not support this suggestion. No differences in iron absorption from semisynthetic meals with or without added glycosaminoglycans were observed. Unsulfated and sulfated glycosaminoglycans as represented by hyaluronic acid and chondroitin sulfate do not enhance iron absorption and it would seem unlikely that minor glycosaminoglycans would influence iron absorption. However, we only tested two glycosaminoglycan structures out of a large number of possible compounds. Furthermore, glycosaminoglycan

carbohydrates are known to be susceptible to oxidation, and the effect of isolation of the purified compound on its chemical structure remains unknown.

3. Large amounts of oxalic acid, given as soluble potassium oxalate, did not influence iron absorption from a vegetable meal low in native oxalic acid. It is therefore unlikely that oxalic acid from plant foods would interfere with iron absorption. The lower iron absorption from spinach reported in the literature presumably relates to its high polyphenol and calcium content rather than the high levels of native oxalic acid. However, the different solubility properties of ferrous and ferric oxalate warrant further investigation.

Zusammenfassung

Hintergrund

Die Bioverfügbarkeit von Nicht-häm-Eisen hängt beim Menschen von mehreren Nahrungsfaktoren ab. Ascorbinsäure (Vitamin C) und Fleisch haben ihren fördernden Einfluss auf die Eisenabsorption wiederholt bewiesen, wohingegen Polyphenole, Phytinsäure, Calcium sowie Milch- und Sojaprotein bekanntermassen hemmend wirken. Für organische Säuren wie Äpfelsäure, Oxalsäure und Zitronensäure ist die Beweislage widersprüchlich. Obwohl nach wie vor unbekannt ist, wie Fleisch seine absorptionsfördernde Wirkung entfaltet, deuten die meisten Studien auf das Fleischprotein als Quelle des so genannten „meat factor“ hin. Neuere Ergebnisse sprechen darüberhinaus den Glykosaminoglykanen, einer mengenmässig eher unbedeutenden Fleischkomponente mit Strukturfunktion, eine mögliche Rolle zu. Für die vermutete negative Wirkung von Oxalsäure auf die Eisenabsorption z. B. aus Spinat fehlen ausreichende wissenschaftliche Belege.

Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die weiterführende Bewertung ausgewählter Nahrungsfaktoren bezüglich ihres Einflusses auf die Bioverfügbarkeit von Nicht-häm-Eisen. Ein wesentlicher Aspekt beinhaltete die Isolierung und Charakterisierung eisenbindender Fleischpeptide, die einen möglichen Anteil an der positiven Wirkung von Fleisch auf die Eisenabsorption beim Menschen haben. In einem zweiten Abschnitt wurde die Bedeutung definierter Glykosaminoglykane als möglicher Bestandteil des „meat factor“ evaluiert. Abschliessend wurde versucht, die Rolle von Oxalsäure als Hemmstoff der Eisenabsorption zu klären.

Design

Abschnitt 1: Eine Reihe von *In vitro*-Verfahren wurde durchgeführt, um Informationen zu niedermolekularen, eisenbindenden Fleischpeptiden als Förderer der Eisenabsorption zu erhalten. Unter Verwendung von simulierter Verdauung mit Pepsin und Pankreatin, Ultrafiltration, Gelfiltration mit ⁵⁹Fe-Markierung, Aminosäurenanalyse, Caco-2 Zellkultur und Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) wurden eisenbindende Peptide aus wasserlöslichen (sarkoplasmatischen) und salzlöslichen (myofibrillären) Fleischproteinextrakten charakterisiert.

Abschnitt 2: Zwei Humanstudien mit stabilen Isotopen dienten dem Vergleich der Glykosaminoglykane Hyaluronsäure (unsulfatiert) und Chondroitinsulfat (sulfatiert) bezüglich ihres Einflusses auf die Eisenabsorption aus einem semisynthetischen Shake (Maltodextrin, Maiskeimöl, Eialbumin, Wasser). Die Anreicherung der stabilen Eisenisotope ^{57}Fe und ^{58}Fe in den Erythrozyten 14 Tage nach Gabe der Testmahlzeiten diente als Mass für die Absorption.

Abschnitt 3: Die Eisenabsorption aus Grünkohlmahlzeiten (arm an natürlicher Oxalsäure) mit oder ohne Zusatz von Kaliumoxalat wurde in zwei Humanstudien bestimmt und mit Absorptionswerten aus einer Spinatmahlzeit (reich an natürlicher Oxalsäure) verglichen.

Ergebnisse

Abschnitt 1: Niedermolekulare Peptide (< 10 kDa), die durch simulierte Verdauung myofibrillärer Proteine von Rind, Hühnchen, Kabeljau, Lamm und Schwein entstanden, führten grosse Mengen lösliches Eisen mit sich; zwischen 84 und 98% des Gesamteisens fanden sich im Ultrafiltrat wieder. Wie die Daten zu Rind, Hühnchen und Kabeljau zeigten, war die Verdauung mit Pepsin ausreichend, solche eisenlösenden Peptide zu produzieren. Gelfiltration der myofibrillären, mit ^{59}Fe markierten Peptide wies eine Fraktion mit einem Molekulargewicht von etwa 2 kDa als Hauptträger der Eisenbindungskapazität aus. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung ergab, dass Asparaginsäure und Glutaminsäure in dieser Fraktion angereichert waren. Ein Vergleich der mittels LC-MS bestimmten Peptidmassen mit ausgewählten Datensätzen der SwissProt-Datenbank lieferte unter anderem Übereinstimmungen mit Fragmenten von Myosin, dem mengenmässig wichtigsten Protein der Myofibrillen.

Abschnitt 2: Zusatz des unsulfatierten Glykosaminoglykans Na-Hyaluronat (300 mg) zu einem semisynthetischen Shake aus Maltodextrin, Maiskeimöl, Eialbumin und Wasser hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Eisenabsorption (21.2% vs 19.5%, $P = 0.42$). Austausch des Na-Hyaluronats durch eine äquimolare Menge des sulfatierten Glykosaminoglykans Chondroitinsulfat (360 mg) erbrachte sehr ähnliche Resultate (19.4% vs 20.3%, $P = 0.64$). Die prozentuale Eisenabsorption unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den zwei Glykosaminoglykanen ($P = 0.50$). Das

Studiendesign hätte den Nachweis einer signifikanten Absorptionsänderung von 30% mit achtzigprozentiger Macht gestattet.

Abschnitt 3: Die Eisenabsorption aus einer Mahlzeit mit 100 g Weizenbrötchen und 150 g Grünkohl, der arm an natürlicher Oxalsäure ist, betrug 11.0% (Studie I) und änderte sich nicht nach Zugabe von 1.26 g Kaliumoxalat (11.2%, Studie II). Bezogen auf eine über die zwei Studien gemittelte Absorption von 8.2% aus der Kontrollmahlzeit, die statt Grünkohl Spinat enthielt, ergaben sich Absorptionsraten von 10.7% beziehungsweise 11.5%. Der Unterschied blieb statistisch nicht signifikant ($P = 0.86$). Aus der Spinatmahlzeit wurde das Eisen zu 8.4% (Studie I) und 8.0% (Studie II) absorbiert. Die um 24-28% niedrigere Absorption aus Spinat gegenüber Grünkohl erreichte keine statistische Signifikanz ($P > 0.16$), da die Studie auf die Erfassung eines mindestens dreissigprozentigen Unterschieds mit einer Macht von 80% ausgelegt war.

Schlussfolgerungen

1. Die vorliegenden Ergebnisse liefern zusätzliche Belege, dass niedermolekulare Peptide, die während der Verdauung myofibrillärer Proteine freigesetzt werden, Eisen binden und in Lösung halten können. Die Daten stimmen weitgehend mit publizierten Studien überein, in denen vorrangig Hühnerfleisch verwendet worden war, und erweitern das Spektrum untersuchter Fleischarten auf Rind, Kabeljau, Lamm und Schwein. Von besonderer Bedeutung ist die Beobachtung, dass Verdauung mit Pepsin allein ausreichte, um solche Peptide zu erhalten. Mittels Gelfiltration wurde eine neue Peptidfraktion mit einem Molekulargewicht von 2 kDa identifiziert, die einen erhöhten Aspartat- und Glutamatgehalt aufwies und dadurch womöglich ihre besondere Eisenbindungskapazität erlangte. Unsere Resultate erlauben eine Theorie, nach der frühzeitig im Verdauungsprozess kurzkettige Fleischpeptide entstehen, die Eisen binden und damit dessen Interaktion mit Absorptionshemmern wie Polyphenolen oder Phytinsäure verhindern. Im Duodenum bleiben diese Peptide löslich und liefern ihre Eisenfracht an den Ort der Absorption. Bestimmte eisenbindende Peptide innerhalb der hier beschriebenen 2 kDa-Fraktion tragen höchstwahrscheinlich zum „meat factor“ bei. Nichtsdestotrotz ist anzunehmen, dass auch andere Peptide, die in dieser Studie nicht berücksichtigt worden sind und

vermutlich einen erhöhten Gehalt an Cystein und/oder Histidin aufweisen, am „meat factor“ beteiligt sind.

2. Bestimmte Fleischkohlenhydrate, die Glykosaminoglykane der interzellulären Matrix, sind auf der Basis von Caco-2-Experimenten als alternative Quelle des „meat factor“ vorgeschlagen worden. Unsere Absorptionsstudien mit Na-Hyaluronat und Chondroitinsulfat, welche als repräsentativ für unsulfatierte beziehungsweise sulfatierte Glykosaminoglykane angesehen werden können, liefern dafür keine Bestätigung. Es konnte kein Unterschied in der Eisenabsorption aus einem semisynthetischen Shake mit oder ohne Zusatz dieser Verbindungen gefunden werden. Unsulfatierte und sulfatierte Glykosaminoglykane vom Hyaluronsäure- oder Chondroitinsulfat-Typ fördern die Eisenabsorption nicht, und es ist unwahrscheinlich, dass andere Glykosaminoglykane einen Einfluss haben. Jedoch ist anzumerken, dass wir nur zwei aus einer Vielzahl von möglichen Strukturen untersucht haben. Desweiteren sind Glykosaminoglykane anfällig für oxidative Veränderungen, und es ist unbekannt, welchen Einfluss die Herstellung der reinen Substanzen auf ihre chemische Struktur hat.

3. Grosse Mengen Oxalsäure, verabreicht als lösliches Kaliumoxalat, hatten keinen Einfluss auf die Eisenabsorption aus einer Gemüsemahlzeit, die arm an natürlicher Oxalsäure war. Es ist daher nicht anzunehmen, dass Oxalsäure aus pflanzlicher Nahrung die Eisenaufnahme stört. Die geringe Eisenabsorption aus Spinat, wie sie in der Literatur berichtet wird, hängt vermutlich mit dem hohen Calcium- und Polyphenolgehalt von Spinat zusammen, und nicht mit dessen hohem Oxalatgehalt. Welche Rolle jedoch die unterschiedliche Löslichkeit von Eisen(II)- und Eisen(III)-Oxalat spielt, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.