



Doctoral Thesis

## Improving iron nutrition from tef (*Eragrostis tef*) based diets in Ethiopia

**Author(s):**

Fischer, Melanie Maren

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010294007> →

**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. 22091

# **Improving iron nutrition from tef (*Eragrostis tef*) based diets in Ethiopia**

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**MAREN Melanie FISCHER**

M. Sc. in Life Science, University of Konstanz

born February 15, 1982

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. med. Michael B. Zimmermann, examiner

Prof. Dr. Richard F. Hurrell, co-examiner

Prof. Dr. Leo Meile, co-examiner

Dr. Ines M. Egli, co-examiner

**2014**

# Summary

## Background

Anaemia is a major public health concern in sub-Saharan Africa. Nutritional iron deficiency (ID) is an important underlying cause, due to monotonous diets based on cereal- and legumes-derived foods. In these plant-based diets, intakes of highly bioavailable haem iron from animal source foods are especially low. In contrast, intakes of phytic acid (PA) and polyphenols (PP), potent inhibitors of non-haem iron absorption, are high.

In Ethiopia, depending on the region, 33 – 75 % of children less than 5 years of age and 9 – 44 % of women of reproductive age are affected by anaemia. The staple food preferably consumed in Ethiopia is injera, a sourdough pancake, prepared from fermented tef (*Eragrostis tef*) flour. Tef is a grass species indigenous to Ethiopia. The fermentation process involved in injera preparation might be beneficial for iron absorption, due to potential degradation of PA and PP. Further evidence is required to elucidate the impact of tef fermentation on iron nutrition. However, the tiny grains of tef are often processed without complete removal of soil contamination. This soil contamination contains iron, and this increases iron content of tef flour and creates the misperception that consuming tef-based diets can prevent ID. But this soil iron, in form of poorly soluble oxides and hydroxides, is very poorly absorbed, if at all, and this helps to explain the persisting prevalence of anaemia in Ethiopia.

Additional knowledge on tef fermentation and the composition of tef based foods could further help to design strategies to combat ID and anaemia in Ethiopia. Approaches, such as mass fortification and targeted supplementation, may not be suitable to control ID in Ethiopia, due to a general lack in infrastructure, low abundance of health care facilities and traditional home food processing practices.

### **Aim**

The overall aim of this thesis was to investigate iron nutrition in relation to Ethiopian tef injera and to develop strategies to improve iron bioavailability from tef injera, which are applicable in the Ethiopian context. The specific objectives were to: 1) estimate iron availability from Ethiopian tef injera; 2) examine PA degradation strategies during tef fermentation; and 3) evaluate the impact on iron bioavailability from tef injera of two promising strategies: PA degradation and iron fortification with sodium iron ethylene-*di*-amine-*tetra*-acetate (NaFeEDTA) an iron fortificant which is reported to overcome PA inhibition of iron absorption.

### **Design**

Tef fermentation and individual habits for injera fermentation were monitored in 30 households in central Ethiopia. Samples of fermenting batter and corresponding flours were collected. Batter samples were analysed for pH, PA, PP, iron, zinc and lactic acid bacteria (LAB). Phytase activity was analysed in respective flour samples and LAB.

In 20-mL model fermentations the potential of different phytases to degrade PA in tef during 48 hours at 25 °C were examined. These approaches included 1) the application of the Ethiopian LAB isolates, capable of degrading PA, as starter cultures; 2) blending tef flour with other whole grain flours, such as from wheat and barley, which are higher in native phytase activity than tef ; 3) the addition of purified *Aspergillus (A.) niger* phytase that can be added as powder to tef flour. The most promising approaches in terms of PA degradation were subsequently tested for their applicability in injera preparation.

Two iron absorption studies based on erythrocyte incorporation of stable iron isotopes were carried out in Switzerland in groups of 17 young women following a single meal cross-over design. In study A, 3 tef injera meals, fortified with 4 mg iron either as 100 % as FeSO<sub>4</sub>; 50 % iron as FeSO<sub>4</sub> and 50 % iron as NaFeEDTA; or 25 % iron as FeSO<sub>4</sub> and 75 % iron as NaFeEDTA, were compared. In study B, tef

injera meals fortified with 4 mg Fe as FeSO<sub>4</sub> with different PA contents were compared, with the PA content decreasing in the following order: injera prepared from 100 % tef flour, injera prepared from 90 % tef and 10 % wheat flour, and injera prepared from 100 % tef flour with the addition of *A. niger* phytase.

## Results

Mean degradation of PA during Ethiopian tef fermentation was 33 % of the initial content and mean PA remaining in the fermented batter was  $0.58 \pm 0.16$  g/100 g dry matter (dm). There was no correlation between PA degradation and pH changes or phytase activity of the tef flours. Mean zinc concentration was  $3.0 \pm 0.4$  mg/100 g dm, while iron ranged from 14.5 - 62.4 mg/ 100 g dm in tef batter samples. Compared to native iron content of tef which was estimated to be 4.8 mg/100 g dm in a pre-study, the determined iron concentrations indicate high levels of soil iron contamination in tef. PA:Fe molar ratios were therefore corrected for the poorly bioavailable soil iron. The correction increased the final mean PA:Fe molar ratios after fermentation from  $1.6 \pm 0.9$  to  $10.3 \pm 2.9$ .

The mean PP content in white and mixed tef flours was identical at  $0.13 \pm 0.01$  g/ 100 g dm, and mean PP content in red tef flours was only marginally higher with  $0.16 \pm 0.01$  g/100 g dm. Measured PP contents stayed unchanged during fermentation.

From 13 different tef fermentations 76 presumptive LAB isolates were analyzed for phytase activity and 13 different isolates of 7 different *Lactobacillus* (*L.*) and *Pediococcus* (*P.*) species were detected to be positive in a phytase screening assay. In model tef fermentations, the use of isolated *L. buchneri* strain MF58 and *P. pentosaceus* strain MF35 resulted in lowest PA content in the fermented tef of 41 % and 42 %, respectively of its initial content, compared to 59 % when spontaneously fermented.

In another series of model tef fermentations imitating traditional fermentation, replacing tef flour with 25 % or 50 % barley flour increased PA degradation marginally compared to the internal control of traditional fermented tef. Wheat flour phytases were much more active: replacing 25 % of tef by wheat flour resulted in only 30 % of the original PA content remaining, while replacing 50 % and 75 % of tef by wheat flour degraded PA almost completely.

Tef injera production from non-inoculated traditional fermentation resulted in a decrease of 30 – 55 % of the initial PA content in tef flour (1 g/ 100 g dm). Using *L. buchneri* MF58 as culture additive decreased PA in cooked injera by 68 %. The initial PA level was degraded by 88 % when replacing 10 % of tef by whole wheat flour and 97 % when replacing of 25 % of tef by whole wheat flour or by the addition of *A. niger* phytase.

In the first bioavailability study (A), mean fractional iron absorption (95 % confidence intervals) from FeSO<sub>4</sub> fortified traditional tef injera was 2.4 % (1.5; 5.7) and did not increase significantly ( $p>0.05$ ) when iron as FeSO<sub>4</sub> was replaced by 50 % or 75 % of the iron as NaFeEDTA. In study B, PA levels in the test meals of traditional tef injera, injera from a tef:wheat whole flour blend of 9:1 and with addition of *A. niger* phytase were 0.62, 0.20 and 0.02 g, respectively. Mean fractional iron absorption was 1.4 % (1.2, 2.5) from the traditional tef injera and increased to 3.6 % (3.2, 6.4;  $p<0.05$ ) with the 9:1 tef:wheat blend and 3.1 % (2.5, 5.9;  $p<0.05$ ) with added phytase.

### Conclusions

PA:Fe molar ratios we observed in Ethiopian fermented tef samples, after correction for iron contamination, predict poor iron bioavailability from traditional tef injera meals. In order to improve iron nutrition from tef injera, strategies to further degrade PA during the traditional tef injera fermentation or other ways to increase the level of bioavailable iron should be considered.

With *L. buchneri* MF58, we could show the usefulness of selected autochthonous LAB as starter cultures for tef fermentation and for injera production with reduced PA content. However, considering the PA in the final product, inclusion of whole-wheat flour or *A. niger* phytase into tef fermentation for injera preparation were even more effective approaches.

Low fractional iron absorption from tef injera meals can be increased by reducing the PA:Fe molar ratio but not by partly substituting FeSO<sub>4</sub> by NaFeEDTA. Blending tef flour with whole wheat flour in a 9:1 ratio can be recommended as a promising strategy to improve iron absorption from injera in Ethiopia, since flour mixtures are sometimes used for preparation of injera. Because overall iron absorption from all tested iron fortified tef injera meals was low (<5 %), further strategies to improve iron nutrition from tef are needed and should be the focus of future research. Special attention should be given to approaches that support diversification of the Ethiopian diet.

# Zusammenfassung

## Hintergrund

Anämie beeinträchtigt einen Großteil der Bevölkerung in den afrikanischen Staaten südlich der Sahara. Eine der häufigsten zugrundeliegenden Ursachen ist nahrungsbedingter Eisenmangel. Dieser resultiert aus der einseitigen, auf Getreiden und Hülsenfrüchten basierenden Ernährung in dieser Gegend. Bioverfügbares Häm-Eisen, das in tierischen Nahrungsbestandteilen vorkommt, wird sehr selten konsumiert. Phytinsäure und Polyphenole hingegen, die die Eisenaufnahme aus den pflanzlichen Nahrungskomponenten vermindern, werden in großen Mengen mit der Nahrung aufgenommen.

In Äthiopien sind, je nach Region, 33 – 75 % der Kinder unter 5 Jahren und 9 – 44 % der Frauen im gebärfähigen Alter anämisch. Das bevorzugte äthiopische Grundnahrungsmittel ist eine Art Sauerteigfladen, der aus Tefmehl hergestellt wird und Injera genannt wird. Tef (*Eragrostis tef*) ist eine Grasart, die in Äthiopien beheimatet ist. Während der Fermentation des Injera-Teiges kann es zu einem Abbau von Phytinsäure und Polyphenolen kommen, was sich vorteilhaft auf die Eisenaufnahme auswirken könnte. Um jedoch den Einfluss der Tef-Fermentation auf die Eisenaufnahme zu bestimmen, bedarf es weiterer wissenschaftlicher Erkenntnisse. Aufgrund der geringen Korngröße der Tefsamens verbleiben bei deren Weiterverarbeitung meist Erdverunreinigungen im Mahlgut. Dadurch kommt es häufig zu einem hohen Eintrag an Eisenmineralien aus der Erde, wodurch der Glaube genährt wird, eine auf Tef basierende Ernährung würde Eisenmangel vorbeugen. Die meisten Eisenmineralien die im Erdboden vorkommen sind jedoch kaum löslich und das Eisen ist für den Körper dadurch nicht verfügbar. Diese Erkenntnisse stimmen mit dem bestehenden Anämievorkommen in Äthiopien überein.

Zusätzliches Wissen über die Vergärung von Tef und die Zusammensetzung von Tef basierten Nahrungsmitteln könnte beim Entwurf von Strategien weiterhelfen, um Eisenmangel und Anämie in



Äthiopien zu bekämpfen. Gängige Strategien im Kampf gegen Eisenmangel, wie die Anreicherung von häufig konsumierten Lebensmitteln mit Eisen und die gezielte Verabreichung von Eisenpräparaten, sind in Äthiopien schwer umsetzbar. Grund dafür sind der generelle Infrastrukturmangel, der geringe Standard der Gesundheitsfürsorge und die weite Verbreitung traditioneller Nahrungsmittelzubereitung.

### **Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Eisenaufnahme aus äthiopischen Tef-Injera genauer zu untersuchen und Strategien zur Verbesserung der Eisenbioverfügbarkeit zu entwickeln, die in Äthiopien umsetzbar wären. Im Detail beinhaltete dies: 1) die Abschätzung der Eisenverfügbarkeit von äthiopischen Tef-Injera; 2) die Analyse verschiedener Möglichkeiten Phytinsäure während der Fermentation von Tef abzubauen; und 3) die Auswirkung des Phytinsäureabbaus und alternativ die Verwendung von Natrium-Eisen- Ethylendiamintetraacetat (NaFeEDTA) als Eisenzusatz auf die Eisenaufnahme aus Tef-Injera zu bestimmen.

### **Studienaufbau**

In 30 zentraläthiopischen Haushalten wurde die traditionelle Herstellung von Tef-Injera beobachtet. Dabei wurden Teig- und Tefmehlproben gesammelt. In den Teigproben wurde der pH-Wert, Phytinsäure, Polyphenol-, Eisen- und Zinkgehalt bestimmt. In den Tefmehlproben wurde die Phytaseaktivität gemessen. Zusätzlich wurden Milchsäurebakterien aus den Teigproben isoliert, sowie auf ihre Fähigkeit Phytinsäure abzubauen untersucht und identifiziert.

Um Phytinsäure während der Fermentation abzubauen, wurden drei verschiedenen Verfahren in Betracht gezogen: 1) die Verwendung äthiopischer Milchsäurebakterienisolate, welche Phytaseaktivität zeigten, als Starterkultur; 2) der Einsatz von Mehlmischungen, welche neben Tef noch Vollkornmehle mit einer höheren endogenen Phytaseaktivität enthalten, so wie es für Weizen

oder Gerste der Fall ist; 3) die Zugabe gereinigter, pulverförmiger *Aspergillus (A.) niger* Phytase zu Tefmehl. Zunächst wurden diese Möglichkeiten in einem 20-ml Modelansatz hinsichtlich des Phytinsäureabbaus getestet und anschließend die vielversprechendsten Ansätze auf die Integrationsmöglichkeit in die Injeraherstellung geprüft.

Zwei Eisenabsorptionsstudien wurden in der Schweiz durchgeführt. Zur Absorptionsbestimmung wurden stabile Eisenisotope zu den Testmahlzeiten hinzugefügt und deren Inkorporation in rote Blutkörperchen gemessen. Je 17 Studienteilnehmerinnen bekamen an drei aufeinander folgenden Tagen zum Frühstück auf Injera basierende Testmahlzeiten serviert. In Studie A wurden verschiedene Formen der Eisenanreicherung getestet. Dafür wurden jeweils 4 mg Eisen zugegeben, entweder in Form von reinem  $\text{FeSO}_4$  oder in Mischungen mit 50 % bzw. 75 % des Eisens in Form von NaFeEDTA. In Studie B wurden mit 4 mg Eisen als  $\text{FeSO}_4$  angereicherte Injeramahlzeiten unterschiedlichen Phytinsäuregehalts verglichen. Dafür wurden folgende, nach absteigendem Phytinsäuregehalt sortierte Injeravariationen verwendet: 100 % Tef-Injera, Injera aus einer Tef-Weizen-Mischung von 9:1 und 100 % Tef-Injera, hergestellt mit *A. niger* Phytase.

## Ergebnisse

In den äthiopischen Tef-Fermentationsproben belief sich der mittlere Phytinsäureabbau auf 33 % des ursprünglichen Gehalts. Der mittlere Phytinsäuregehalt, der im fermentierten Teig zurückblieb war  $0.58 \pm 0.16$  g/100 g Trockenmasse (Tr.). Es wurde keine Korrelation des Phytinsäureabbaus mit den pH-Wert-Änderungen oder mit der Phytaseaktivität im entsprechenden Mehl beobachtet. Die mittlere Zinkkonzentration in den Teigproben betrug  $3.0 \pm 0.4$  mg/100 g Tr., während der Eisengehalt zwischen 14.5 und 62.4 mg/100 g Tr. stark variierte. Im Vergleich zu nativem Tef-Eisen, das in einer vorrausgegangenen Studie auf 4.8 mg/100 g Tr. geschätzt wurde, deuten die gemessenen Eisenkonzentrationen auf starke Verunreinigung mit Eisen aus der Erde hin. Aus diesem Grund wurde das molar Verhältnis von Phytinsäure zu Eisen für das kaum bioverfügbare Eisen aus

der Erde korrigiert. Durch diese Korrektur stieg das mittlere molare Verhältnis, das für das Ende der Fermentation berechnet wurde von  $1.6 \pm 0.9$  auf  $10.3 \pm 2.9$ .

Der mittlere Polyphenolgehalt in Mehlen von weißen und gemischten Tefsorten war gleich und lag bei  $0.13 \pm 0.01$  g/100 g Tr., während in Mehlen der roten Sorte ein Polyphenolgehalt von  $0.16 \pm 0.01$  g/100 g Tr bestimmt wurde. Während der Fermentation wurden keine Veränderungen beobachtet.

Aus 13 verschiedenen Tef-Fermentationen wurden 76 vermutliche Milchsäurebakterien auf ihre Fähigkeit Phytinsäure abzubauen untersucht. Davon wurden 13 verschiedene Isolate positiv getestet und deren Charakterisierung ergab eine Zugehörigkeit zu 7 verschiedenen *Lactobacillus* (L.) und *Pediococcus* (P.) Spezies. Mit den Isolaten *L. buchneri* MF58 und *P. pentosaceus* MF35 als Starterkultur wurden mit 41 und 42 % die niedrigsten Phytinsäurewerte im Modelversuch erreicht - im Vergleich zu 59 % in spontaner Fermentation.

In einer weiteren Reihe von Modelfermentationen wurde die traditionelle Fermentation nachgeahmt. Wurden dabei 25 % oder 50 % des Tefmehls mit Gerstenmehl ersetzt, wurde der Phytinsäureabbau im Vergleich zu dem 100 % Tef Ansatz kaum gefördert. Die Phytaseaktivität von Weizen war deutlich höher und durch den Austausch von 25 % des Tefs mit Weizen konnte die Phytinsäure bis auf 30 % des ursprünglichen Werts abgebaut werden. Wenn 50 % oder 75 % des Tefs durch Weizen ersetzt wurden, wurde die Phytinsäure fast vollständig abgebaut.

Im Labor hergestelltes Injera aus 100 % Tef und ohne spezifische Starterkultur, wies einen 30 – 55 % niedrigeren Phytinsäuregehalt als das Mehl auf (1 g/100 g Tr.). Die Verwendung von *L. buchneri* MF58 in der Fermentation führte zu einer Reduktion des Phytinsäuregehalts von 68 % im gebackenen Injera. In Injera, das aus 90 % Tefmehl und 10 % Weizenmehl hergestellt wurde, wurde der ursprünglich Phytinsäuregehalt um 88 % reduziert. Wenn 25 % Weizenmehl für die Injeraherstellung verwendet wurde oder wenn *A. niger* Phytase zugegeben wurde, wurde 97 % der Phytinsäure abgebaut.

In der ersten Eisenabsorptionsstudie (A) war die mittlere fraktionelle Eisenabsorption (95 % Konfidenzintervall) aus der mit FeSO<sub>4</sub> angereicherten Tef-Injera Mahlzeit 2.4 % (1.5, 5.7). Die Absorption stieg nicht signifikant ( $p > 0.05$ ) wenn Eisen aus FeSO<sub>4</sub> zu 50 % oder 75 % durch Eisen aus NaFeEDTA ersetzt wurde. In der zweiten Studie (B) war der Phytinsäuregehalt der Mahlzeiten mit 100 % Tef-Injera 0.62 g, mit Injera aus einer 9:1 Mehlmischung aus Tef und Weizen 0.2 g und mit Injera bei dem *A. niger* Phytase zur Anwendung kam 0.02 g. Die entsprechende mittlere Eisenabsorption stieg dabei signifikant von 1.4 % (1.2, 2.5) auf 3.6 % (3.2, 6.4;  $p < 0.05$ ) und 3.1 % (2.5, 5.9;  $p < 0.05$ ) an.

### **Schlussfolgerung**

Die bereinigten molaren Verhältnisse von Phytinsäure und Eisen in äthiopischen Proben deuten auf eine schlechte Eisenbioverfügbarkeit aus traditionellen Tef-Injera hin. Um die Eisenaufnahme aus Tef-Injera zu erhöhen, werden Verfahren benötigt, die einen stärkeren Phytinsäureabbau erzielen. Daneben sollten auch andere Möglichkeiten, die zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit beitragen können, in Betracht gezogen werden.

Für *L. buchneri* MF58 konnten wir zeigen, dass autochthone Milchsäurebakterien als Starterkultur für die Tef-Fermentation und Tef-Injera Herstellung geeignet sind und zu einem verstärkten Phytinsäureabbau beitragen können. Allerdings ist dieser Effekt wesentlich geringer im Vergleich zur Einbindung von Weizenvollkornmehl oder *A. niger* Phytase in den Fermentationsprozess.

Die niedrige fraktionelle Eisenabsorption aus Tef-Injera Mahlzeiten kann erhöht werden indem das molare Verhältnis von Phytinsäure zu Eisen verringert wird, jedoch nicht durch das teilweise Ersetzen von FeSO<sub>4</sub> durch NaFeEDTA. Da in Äthiopien auch Mehlmischungen zur Zubereitung von Injera verwendet werden, kann die Mischung von Tef mit Weizenvollkornmehl in einem Verhältnis von 9:1 daher als vielversprechende Möglichkeit empfohlen werden, um die Eisenabsorption von Injera in Äthiopien zu verbessern. Die Eisenabsorption bei allen getesteten, mit Eisen

angereicherten Injera Mahlzeiten war niedrig (< 5 %). Den Mittelpunkt weiterer Forschungsbestrebungen sollten daher weitere, nötige Strategien zur Verbesserung der Eisenaufnahme aus Tef darstellen. Besondere Aufmerksamkeit sollte auf Bestrebungen gelenkt werden, die eine vielfältigere Diät in Äthiopien unterstützen.