

Effekt einer Zulage an Citronensäure auf die Bioverfügbarkeit von Zink aus Maiskeimen*)

J. Pallauf, K. Krämer, A. Markwitan und D. Ebel

Institut für Tierernährung der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung: In einem 2faktoriellen Versuch mit 64 wachsenden Ratten (8 Tiere pro Gruppe, 42 g Anfangsmasse) wurde nach einer 7tägigen Depletionsphase (2,4 µg Zn/g Diät) über 21 Tage eine Diät auf der Basis von Eiklarprotein und Maiskeimen als Phytatträger (0,5 % Phytat i. d. Diät) gefüttert. Die Zn-Versorgung erfolgte in 4 Stufen (Phytat/Zn-Quotienten) zu je 2 Gruppen, wobei durch entsprechende Zn-Supplementierungen das molare Phytat/Zn-Verhältnis auf 31, 20, 14 bzw. 0 (Kontrolle ohne Maiskeime, 11 µg Zn/g Diät) eingestellt wurde. In jeder Zn-Stufe wurde an jeweils eine Gruppe eine Zulage von 1 % Citronensäure (CTS) verabreicht. Ein Phytat/Zn-Verhältnis von 31:1 führte zur Entstehung von typischen Zn-Mangelsymptomen, wie Anorexie und Alopezie sowie einer signifikanten Wachstumsdepression, deren Ausprägungen durch Zulage an CTS erheblich reduziert wurden. Deutlich in Abhängigkeit vom molaren Phytat/Zn-Quotienten reagierten die Zn-Konzentrationen in Serum und Organen, für die Leber allerdings nur das Gesamtleberzink, wobei primär Phytat/Zn-Effekte, aber auch CTS-Effekte sowie Phytat/Zn-CTS-Interaktionen auftraten. Die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatasen (AP) in Serum und Geweben wurden jeweils durch den Phytat/Zn-Quotienten signifikant beeinflusst. Die CTS-Zulage hatte im Femur einen positiven und in der Leber einen eher negativen Einfluß auf die AP. Die Metallothioneinkonzentrationen in Leber, Duodenum sowie Jejunum und Ileum waren signifikant durch den Phytat/Zn-Quotienten beeinflußt.

Summary: The purpose of this 2 factorial designed study was to investigate the influence of citric acid on the availability of zinc from diets containing 140 g corn germs as a native phytate source (0.5 % phytate in diet).

Growing male rats with an average initial weight of 42 g were divided into 8 groups of 8 animals each. After a 7 d depletion period (2.4 µg Zn/g diet) the animals were fed ad libitum for 21 d a diet on the basis of egg white solid and corn germs. The diets were supplemented with zinc in order to obtain phytate:zinc molar ratios of 31, 20, 14, and 0 (control without corn germs, 11 µg Zn/g diet). Each diet was fed with and without a supplementation of 1 % citric acid.

A phytate:Zn molar ratio of 31:1 resulted in typical symptoms of zinc-deficiency like anorexia, alopecia and a significant depression of growth. These effects were apparently reduced by citric acid. The zinc concentration in serum and organs followed the graded levels of phytate:zinc molar ratios. Primary significant effects of the phytate:Zn molar ratio but also effects of citric acid and interactions between the 2 factors phytate:Zn and citric acid could be detected. Only total liver zinc but not liver zinc based on fresh matter was affected by the phytate:Zn molar ratio. In serum and tissues the activity of alkaline phosphatase showed a significant

*) Herrn Prof. Dr. agr. Dr. agr. h.c. Dr. med. vet. h.c. M. Kirchgeßner zum 60. Geburtstag gewidmet

response to the phytate:zinc molar ratio. Furthermore the supplementation with citric acid increased the femur alkaline phosphatase and slightly reduced it in the liver. The concentrations of metallothionein in liver duodenum, jejunum and ileum were significantly affected by the phytate:Zn molar ratio.

Schlüsselwörter: Zink, Phytat, Citronensäure, Alkalische Phosphatase, Metallothionein

Key words: zinc, phytate, citric acid, alkaline phosphatase, metallothionein

Einleitung

Von besonderer Bedeutung für die Bioverfügbarkeit von Zink sind dessen native Bindungsformen und intraluminale Austausch- und Konkurrenzprozesse. Für die geringe Zn-Bioverfügbarkeit aus Zerealien und Leguminosen wird deren Phosphatspeicher Phytinsäure (myo-Inositolhexakisdihydrogenphosphat) durch Bildung unlöslicher Zn-Phytat-Komplexe verantwortlich gemacht. Umfangreiche Studien an Laborratten (1, 2, 3) und am Menschen (4, 5) ermittelten einen direkten Zusammenhang zwischen dem molaren Phytat/Zn-Quotienten und der Zn-Verfügbarkeit. Molare Phytat/Zn-Verhältnisse < 12–15 führen zu einer ausreichenden Zn-Versorgung.

Eine Reihe von Untersuchungen hatte zum Ziel, die Zn-Verfügbarkeit aus phytathaltigem Futter zu verbessern. Dazu wurden der Diät entweder naturidentische und synthetische Chelatbildner bzw. Liganden zugelegt (6, 7, 8, 9, 10) oder der Phytat/Zn-Quotient durch eine Aktivierung der getreideeigenen Phytase (11) bzw. durch Zn-Supplementierung (12) reduziert. Der natürliche Komplexbildner Citronensäure (CTS) zeigt in der Ferkelaufzucht neben positiven Wirkungen auf Wachstum, Futterverwertung und Nährstoffverdaulichkeit auch positive Effekte auf Tiergesundheit und den Intermediärstoffwechsel, wobei möglicherweise Interaktionen zwischen dem Diättyp, d. h. dem Anteil an Cerealien und CTS bestehen (13, 14). In der vorliegenden Studie sollte deshalb an wachsenden Ratten überprüft werden, ob Citronensäure eventuell auch in Form einer Ligandenkonkurrenz mit Phytat positiv auf die Bioverfügbarkeit von Zink wirken kann.

Material und Methoden

Nach dem Absetzen im Alter von 3 Wochen wurden 64 konventionell gehaltene, männliche Albinoratten (durchschnittliche Anfangsmasse 42 g) des institutseigenen Inzuchtstammes HK 51 auf 8 Gruppen verteilt. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen (4 Tiere pro Käfig) auf Edelstahlrostern, bei 25 °C, einer rel. Luftfeuchte von ca. 55 % und einem 12stündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Unpelletiertes Versuchsfutter und destilliertes Wasser standen zur freien Verfügung. Futterverzehr und Lebendmasseentwicklung wurden wöchentlich erfaßt. Nach einer 7tägigen Depletionsphase (halbsynthetische Diät, 2,4 µg Zn/g) wurden über 3 Wochen Diäten abgestufter Phytat/Zn-Quotienten auf der Basis von Eiklarprotein (Sanova, Zeven) und Maiskeimen (Meelfabrik Weert, Niederlande) gefüttert. Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der phytatfreien Kontrolldiät. In den weiteren Versuchsgruppen wurden 140 g Maisstärke gegen Maiskeime ausgetauscht. Dies führte zu einem Phytat/Zn-Verhältnis von 31:1. Dieser Quotient wurde in den weiteren Zn-Stufen

Tab. 1. Zusammensetzung der Basisdiät.

Komponenten	g/kg Diät
Eiklarprotein	200
Maisstärke	527
Saccharose	100
Kokosfett	50
Sonnenblumenöl	20
Cellulose	20
Mineralstoff- und Spurenelementvormischung*)	50
Vitaminvormischung**)	20
Zn-Vormischung***)	10
Lysin-HCl	3
	1000

*) Mineralstoffe und Spurenelemente je kg Diät: $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. 26,73 g; K_2HPO_4 p.a. 6,68 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. 5,07 g; CaCO_3 p.a. 4,43 g; NaCl p.a. 2,47 g; Na_2CO_3 p.a. 1,22 g; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. 298,68 mg; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ p.a. 184,59 mg; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ p.a. 27,50 mg; $(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{Cr}$ p.a. 4,41 mg; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. 2,38 mg; NaF p.a. 2,21 mg; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ p.a. 0,83 mg; KJ p.a. 0,65 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. 0,25 mg

**) Vitaminzusatz je kg Diät: Retinol 1,8 mg RE; Cholecalciferol 0,025 mg; D,L- α -Tocopherylacetat 100 mg D- α -TE; Menadion 5 mg; Ascorbinsäure 30 mg; Thiamin-mononitrat 8 mg; Riboflavin 10 mg; Pyridoxin 10 mg; Niacin 40 mg; Ca-D-Pantothenat 30 mg; Folsäure 3 mg; p-Aminobenzoësäure 10 mg; Biotin 0,2 mg; Cobalamin 0,05 mg; myo-Inositol 100 mg; Cholinchlorid 1150 mg

***) Zinkzusatz je kg Diät: $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. 43,97 mg

durch Zulage von 10 bzw. 20 mg Zn als $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /kg Diät auf 20:1 bzw. 14:1 eingestellt. In jeder Zn-Stufe wurde an jeweils eine Gruppe eine Zulage von 1 % Citronensäure „food grade“ (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) verabreicht. In Tabelle 2 sind die analysierten Zink- und Phytatgehalte, die errechneten molaren Phytat/Zn- sowie CTS/Zn-Quotienten und pH-Werte der Versuchsdäten aufgeführt. Die Zn-Stufen werden mit A-D bezeichnet. Die Ziffern 0 und 1 bedeuten keine bzw. 1 % CTS-Supplementierung.

Am Versuchsende wurden die Ratten nach Chloroformbetäubung durch Dekapitation getötet und das Blut gewonnen. Zur Erfassung des Zn-Status wurden Leber, Dünndarm, Testes sowie linker und rechter Femur entnommen. Der Dünndarm wurde sofort nach der Entnahme mit eisgekühlter NaCl-Lösung (0,9 %, w/v) gespült, mittels eines Plastikstabes gewendet und in Duodenum (20 % des Dünndarmes distal des Pylorus) sowie verbleibendes Jejunum + Ileum aufgeteilt. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -22°C aufbewahrt.

Der Zinkgehalt der Organ- und Gewebeproben wurde nach Trockenveraschung (Femur) resp. Naßveraschung (Leber, Testes) und die Zn-Konzentration des Blutserums direkt nach Verdünnung mit 0,3 N HCl mittels Flammen-AAS (Philips PU 9485) bestimmt.

Die Dünndarmmucosa wurde durch Abschaben auf einer eisgekühlten Glasplatte gewonnen. Die Homogenisierung der Femora zur Analyse der Alkalischen Phosphatase (AP) erfolgte durch Mörsern unter Zugabe von flüssigem Stickstoff. Zur Extraktion von AP und Metallothionein (MT) wurden die Gewebeproben mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,2, versetzt, gepottiert, bei 18000 g zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Analytik abgenommen.

Die Analysen der Alkalischen Phosphatasen in Serum, Femur, Leber, Duodenum- sowie Jejunum- und Ileummucosa erfolgten unter Verwendung von Einzelchemikalien mit Diethanolaminpuffer (Merck 16205) und p-Nitrophenylphosphat, Dinatriumsalz Hexahydrat (Aldrich N2,200-2) nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (15).

Die Zn-Metallothioneinanalyse in Leber und Darmmucosa erfolgte radiochemisch (16). Dazu wird die Probe mit einer Lösung aus nicht radioaktivem Cd und ^{109}Cd (carrierfree, DuPont de Nemours) inkubiert, wobei Zn in Metallothionein gegen das affinere Cd ausgetauscht wird. Überschüssiges Cd wird durch 2maliges Kochen mit Hämoglobin abgetrennt und das hitzeresistente MT im Überstand durch Gamma-Counting gemessen.

Die Phytatanalyse in den Versuchsdiäten wurde mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie durchgeführt (17).

Die pH-Werte im Futter wurden nach Aufschlammung in bidestilliertem Wasser (1:5, w/v) nach Filtration im Filtrat gemessen.

Die Proteinconzentrationen in den Gewebehomogenaten wurden nach Kjeldahl ermittelt. Die Aktivität der Phytase in den Maiskeimen wurde mit Hilfe des freigesetzten anorganischen Phosphats bestimmt (18).

Die 2faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde zur Prüfung signifikanter Unterschiede, als Folge der Versuchsfaktoren Zn-Stufe und Citronensäure, eingesetzt. Mittels t-Test wurden die Lebendmassen bzw. täglichen Zunahmen auf einer Zn-Stufe (mit bzw. ohne CTS-Zulage) geprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Als Grundlage des vorliegenden Experiments diente die theoretisch mögliche Ligandenkonkurrenz zwischen Phytat und Citrat um Zink, die durch experimentelle Befunde aus der Literatur bislang nur sehr unzureichend und widersprüchlich belegt wird. In einem Versuch mit gesunden Erwachsenen (4) wurden 25 mmol Citronensäure (K-Salz) einer Säuglingsnahrung auf Sojabasis zugesetzt. Die CTS-Supplementierung blieb dabei ohne Effekt auf die ^{65}Zn -Absorption. In sämtlichen weiteren Untersuchungen am intakten Tier oder perfundierten Intestinum, die sich mit Citronensäure als physiologischem Zn-bindenden Liganden beschäftigten, wurden phytatfreie halbsynthetische Diäten oder Pufferlösungen

Tab. 2. Analysierte Zn- und Phytatgehalte sowie pH-Werte der Versuchsdiäten und molare Phytat/Zn- sowie Citronensäure/Zn-Verhältnisse.

Gruppe	Zn ($\mu\text{g/g}$)	Phytat (%)	Phytat:Zn	CTS:Zn	pH
A0	11	—	0	—	6,03
A1	11	—	0	283:1	5,01
B0	16	0,50	31:1	—	5,86
B1	17	0,53	31:1	183:1	5,11
C0	25	0,51	20:1	—	5,85
C1	24	0,49	20:1	130:1	4,96
D0	37	0,52	14:1	—	5,93
D1	36	0,52	14:1	86:1	5,02

eingesetzt. Diese Arbeiten können somit in der vorliegenden Studie nur sehr eingeschränkt zur Interpretation herangezogen werden. Allerdings konnte *in vitro* die Löslichkeit von Zink aus Frühstücksgerealien bei pH 7,0 durch Zugabe von CTS um 93 % gesteigert werden (19). Supplementierte Citronensäure bzw. Citronensäure aus Fruchtsäften wirkte über eine Reduktion des Phytateffektes auch positiv auf die Verfügbarkeit von Eisen (20, 21). Aus den Arbeiten über die Stabilität von Zn-Komplexen (6, 8) ist abzuleiten, daß die Stabilitätskonstante für Zn-Phytat etwa zwischen 11 und 18 liegen dürfte. Die Stabilitätskonstante für Zn-Citrat wird mit 9,4 angegeben (22). Damit entspricht Citronensäure nicht der Forderung von Kratzer und Vohra (22), wonach eine effektive Freisetzung von Zink aus Futtermitteln nur möglich ist, wenn die Stabilitätskonstante eines zugesetzten Liganden einen höheren Wert aufweist als die des Komplexbildners im Futter. Deshalb wurde mit 10 g CTS/kg Futter ein hoher molarer Überschuß an Citronensäure gegenüber Zn eingestellt, der je nach Zn-Stufe zwischen 86:1 und 283:1 lag (Tab. 2). Allerdings verweisen die Autoren (22) auch darauf, daß theoretische, unter standardisierten Bedingungen ermittelte Stabilitätskonstanten nicht unumschränkt Reaktionen unter physiologischen Verhältnissen beschreiben können.

In Abbildung 1 ist die Entwicklung der Lebendmasse während des 3wöchigen Hauptversuches dargestellt. Nach der 2. und 3. Versuchswoche zeigte sich in den Gruppen B0 und B1 eine signifikante Reduktion der Zunahme der Lebendmasse. Insbesondere die Gruppe B0, in geringerem Ausmaß auch die Gruppen B1 und C0, zeigten typische, durch Zn-Mangel induzierte Symptome wie Anorexie und Alopezie. Über den Gesamtver-

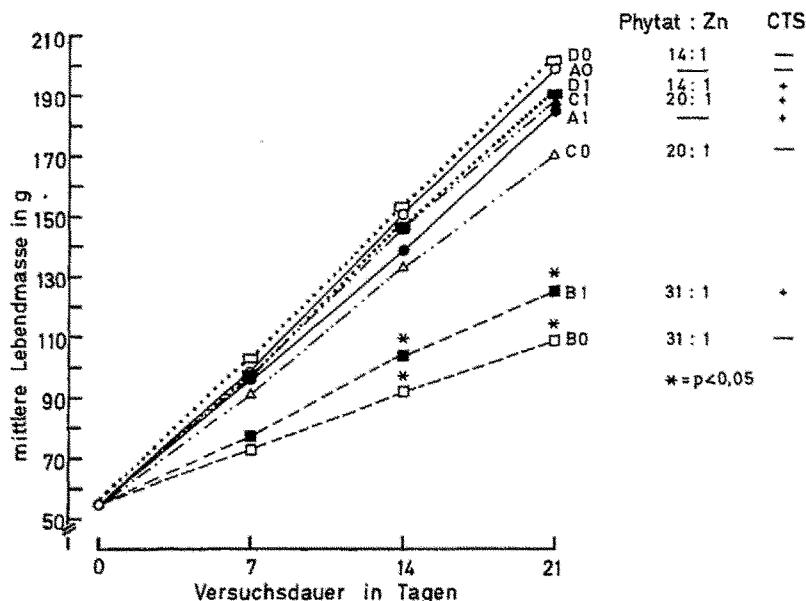


Abb. 1. Lebendmasseentwicklung wachsender Ratten in Abhängigkeit vom molaren Phytat/Zn-Verhältnis und einer Zulage von 1 % Citronensäure (CTS).

Tab. 3. Zn-Konzentrationen in Serum, Femur, Testes und Leber in Abhängigkeit vom molaren Phyttat/Zn-Verhältnis und einer Zulage von 1 % Citronensäure (CTS).

Zinkgehalte µg/ml	A0		A1		B0 PA:Zn = 31:1		B1		C0 PA:Zn = 20:1		C1		D0 PA:Zn = 14:1		D1		ANOVA	
	phyttatfrei		+CTS		-CTS		+CTS		-CTS		+CTS		-CTS		+CTS			
	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS
Serum	\bar{x}	1,06	1,25	0,45	0,45	0,14	0,14	0,14	0,14	0,63	0,62	0,77	0,92	0,17	0,17	PA/Zn:	P < 0,001	
	s	0,22	0,14	0,10	0,10					0,09	0,09	0,12	0,17			CTS:	P < 0,02	
Femur	\bar{x}	126	136	78	69	71	5	5	5	81	120	120	120	8	8	PA/Zn × CTS:	n.s.	
	s	14	9	7	9	9				16	16	16	16			PA/Zn:	P < 0,001	
Testes	\bar{x}	20,4	20,6	14,7	16,4	16,4	3,9	3,9	1,6	19,6	22,4	24,1	24,4	0,7	1,8	CTS:	P < 0,02	
	s	0,8	3,1	1,7						1,6	1,1					PA/Zn × CTS:	n.s.	
Leber	\bar{x}	25,3	27,2	27,9	26,6	28,0	4,4	4,4	1,4	28,3	27,8	29,1	29,1	1,6	1,6	PA/Zn:	n.s.	
	s	3,2	3,4	2,5						1,6	1,6	2,8	2,8			CTS:	n.s.	
																PA/Zn × CTS:	n.s.	

such wurden in Gruppe C die täglichen Zunahmen durch Citronensäure signifikant erhöht und in Gruppe A (phytatreie Diät) signifikant reduziert. Eine generell erhöhte Schmackhaftigkeit des CTS-supplementierten Futters, wie sie bei Ferkeln nachgewiesen wurde (23), dürfte im vorliegenden Experiment nicht vorliegen. Die Futteraufnahme war in den Gruppen A und D bei CTS-Zulage reduziert, in den Gruppen B und C hingegen verbessert. Somit korrespondiert die Futteraufnahme in allen Gruppen mit dem erzielten Lebendmaszezuwachs. Für die Futterverwertung (Futterverbrauch pro g Lebendmaszezuwachs) ergaben sich während des dreiwöchigen Versuches der 8 Gruppen (A0-D1) folgende Werte: 2,12, 2,22, 2,84, 2,38, 2,12, 2,03, 2,01 bzw. 2,08.

Die Zn-Konzentrationen in Serum, Femur und Testes (Tab. 3) reagierten deutlich in Abhängigkeit vom molaren Phytat/Zn-Verhältnis in der Diät. Die Serum-Zn-Gehalte waren in den Gruppen B und C durch CTS nicht beeinflußt. In den Gruppen A und D führte die CTS-Zulage jedoch zur Erhöhung des Serumzinks um 18 bzw. 19 %. Signifikant positive Einflüsse der Faktoren Zn-Stufe und CTS-Zulage konnten dabei für das Serum und die Testes nachgewiesen werden. Bei den Femur-Zn-Konzentrationen traten auch Interaktionen zwischen dem Phytat/Zn-Quotienten und Citronensäure auf. Ein Einfluß des Phytat/Zn-Verhältnisses auf die Leber-Zn-Konzentration, bezogen auf die Frischmasse, wurde nicht festgestellt. Diese Beobachtung konnte auf die Abhängigkeit der Lebemasse von der Lebendmasse zurückgeführt werden, denn das Gesamtleber-Zink (Einzelwerte nicht dargestellt) war bei weitem Phytat/Zn-Verhältnis signifikant reduziert.

In Tabelle 4 sind die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase dargestellt. Unter den kontrollierten Bedingungen eines Tierversuches wird die Aktivität der Alkalischen Phosphatase i. d. R. als empfindlicher Zn-Statusparameter zitiert. Dies gilt vorwiegend für die Serum- und Knochen-AP (24). Einen positiven Einfluß übte die CTS-Zulage auf die Serum-AP in den Gruppen A, C und D aus; die Aktivität stieg gegenüber den CTS-freien Vergleichsgruppen relativ um 8, 26 bzw. 22 % an. Die spezifische Aktivität der Femur-AP wurde in allen Gruppen, außer in Gruppe C, durch die CTS-Supplementierung erhöht, wobei die stärksten Aktivitätssteigerungen in Gruppe D mit 33 % beobachtet wurden. Die Serum-AP setzt sich aus einer Reihe von Isoenzymaktivitäten zusammen, die ihrer Herkunft entsprechend als Femur-, intestinale und Leber-AP bezeichnet werden (25). Zur Aktivität der Serum-AP der Ratte leistet, im Gegensatz zum Menschen, die duodenale AP den größten Beitrag (26). Infolge verhältnismäßig hoher individueller Streuung der Duodenum-AP, ließ sich bei niedriger Zn-Versorgung ein entsprechend reduzierter Beitrag der spezifischen duodenalen AP-Aktivität zur Serum-AP nicht feststellen. Dies traf auch für die Jejunum- und Ileum-AP zu, die insgesamt um den Faktor 4 niedriger lag als im Duodenum (Einzelwerte nicht dargestellt). Für die Alkalischen Phosphatasen konnte unter Anwendung des 2faktoriellen Modells in allen analysierten Organen (Serum, Femur, Duodenum-mucosa, Jejunum- und Ileummucosa, Leber) ein Einfluß des molaren Phytat/Zn-Verhältnisses nachgewiesen werden. Im Femur hatte außerdem die CTS-Zulage einen positiven und in der Leber einen eher negativen Einfluß auf die entsprechende Isoenzymaktivität.

Tab. 4. Aktivitäten der Alkalischen Phosphatasesen in Serum, Femur und Duodenum sowie Leber in Abhängigkeit vom molaaren Phytat/Zn-Verhältnis und einer Zulage von 1 % Citromensäure (CTS).

Isoenzym-Aktivitäten	A0		A1		B0 PA:Zn = 31:1		B1 PA:Zn = 20:1		C0 PA:Zn = 20:1		C1 PA:Zn = 14:1		D0 PA:Zn = 14:1		D1 PA:Zn = 14:1		ANOVA	
	-CTS		+CTS		-CTS		+CTS		-CTS		+CTS		-CTS		+CTS			
	n	s	n	s	n	s	n	s	n	s	n	s	n	s	n	s	P A/Zn:	P A/Zn:
Serum U/l	387	79	419	110	214	40	269	58	293	53	263	43	288	30	351	86	CTS: PA/Zn × CTS: n.s.	P < 0,001
Femur mU/mg Prot.	71,2	10,1	89,8	17,7	62,0	12,8	75,1	14,4	58,5	11,4	57,9	20,1	49,4	9,7	65,5	13,0	CTS: PA/Zn × CTS: n.s.	P < 0,001
Duodenum mU/mg Prot.	369	49	519	32	699	170	614	240	407	160	369	56	460	121	625	183	CTS: PA/Zn × CTS: n.s.	P < 0,002
Leber mU/mg Prot.	4,0	0,4	3,4	0,5	4,0	0,5	3,6	0,9	3,5	0,8	3,0	0,6	2,9	0,3	3,0	0,5	CTS: PA/Zn × CTS: n.s.	P < 0,001

Tab. 5. Konzentrationen an Metallothionein (MT) in Leber, Duodenum- sowie Jejunum- und Ileummucosa in Abhängigkeit vom mola ren Phytat/Zn-Verhältnis und einer Zugabe von 1 % Citronensäure (CTS).

MT-Konzen- trationen	A0		B0 PA:Zn = 31:1		C0 PA:Zn = 20:1		D0 PA:Zn = 14:1		ANOVA	
	phytatefrei		-CTS		+CTS		-CTS			
	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS	-CTS	+CTS		
Leber										
µg/g FM	7,53	8,58	5,55	5,61	4,26	4,88	6,30	6,15	PA/Zn: P < 0,05	
s	4,32	1,64	1,19	1,43	1,13	1,28	1,59	0,88	CTS: n.s.	
Duodenum										
µg/g FM	1,81	2,11	1,37	1,13	1,71	1,70	1,84	2,06	PA/Zn: P < 0,01	
s	0,37	0,39	0,18	0,24	0,66	0,09	0,08	0,65	CTS: n.s.	
Jej. + Ileum										
µg/g FM	2,59	1,86	1,20	1,27	1,39	1,74	1,44	1,45	PA/Zn: P < 0,001	
s	0,25	0,75	0,30	0,37	0,52	0,33	0,40	0,35	CTS: n.s.	
									PA/Zn × CTS: n.s.	

Die Metallothionein-Gehalte in Leber, Duodenum- sowie Jejunum- und Ileummucosa (Tab. 5) reflektieren deutlich die von Gruppe A über D nach C und B stufenweise abnehmende Zn-Bioverfügbarkeit. Anhand der ANOVA war für die MT-Konzentration ein signifikanter Einfluß der Zn-Stufen festzustellen. Ein gerichteter Einfluß der CTS-Supplementierung auf die MT-Konzentration innerhalb einer Zn-Stufe war dabei nicht festzustellen. Auch Interaktionen traten nicht auf.

Im vorliegenden Experiment konnte übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (1, 2, 3, 4, 5, 11, 12) ein direkter Zusammenhang zwischen dem molaren Phytat/Zn-Verhältnis und der Zinkverfügbarkeit nachgewiesen werden. Bei den täglichen Zunahmen und einigen biochemischen Zn-Statusparametern zeigte Citronensäure insbesondere dann einen positiven Effekt, wenn der molare Phytat/Zn-Quotient zu einer mangelnden bzw. suboptimalen Zn-Versorgung (Gruppe B und C) führte. Dies könnte auf eine höhere Verfügbarkeit von Zink durch Citronensäure zurückzuführen sein. Ob es sich dabei um eine direkte Konkurrenz der Liganden Phytat und Citrat um Zink oder um eine verbesserte Löslichkeit bzw. Aktivierung der nativen Phytase infolge pH-Absenkung der Ingesta bei CTS-Zulage handelt, kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend bewertet werden.

Zn₆-Phytat ist bis pH 4,0 zu 100 % löslich, wobei die Löslichkeit bis pH 7,1 auf 0 % zurückgeht und erst ab pH 10,5 wieder ansteigt (27).

Die Maisphytase ist im Keimling lokalisiert. Die Phytaseaktivität der in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Maiskeime (0,55 µmol PO₄³⁻ × min⁻¹ × g T⁻¹) erreicht fast die Aktivität der Phytase aus Weizen (0,68 µmol PO₄³⁻ × min⁻¹ × g T⁻¹) und dürfte damit einen nicht zu unterschätzenden Einfluß auf die Zn-Löslichkeit gehabt haben. Durch die pH-Absenkung des Futters könnte dieser Effekt noch verstärkt worden sein.

Nicht auszuschließen sind allerdings weitere Einflüsse der Citronensäure, z. B. auf andere essentielle Nahrungsbestandteile. Citronensäure zeigte im vorliegenden Experiment einen großen Einfluß auf das Wachstum der Ratten, während die Zn-Statusparameter nicht immer entsprechend reagierten. Es ist somit nicht völlig auszuschließen, daß die ermittelten Zn-Parameter nicht ausreichend sensitiv sind, um dem relativ großen Wachstumseffekt einer geringfügigen Änderung der Zn-Bioverfügbarkeit zu entsprechen, der unter den vorliegenden Bedingungen nach einer 7tägigen Depletionsphase bei nicht optimal mit Zink versorgten Ratten zu beobachten war.

Durch den Einsatz organischer Säuren als Futteradditiva kann die Tierproduktion dem Verbraucherwunsch nach qualitativ hochwertigen, rückstandsarmen und preiswerten Lebensmitteln tierischer Herkunft entgegenkommen. In der Humanernährung könnte bei gleichzeitiger Aufnahme von Vollkornprodukten und Fruchtsäften, die reich an Citronen- und Ascorbinsäure sind, ein nicht unerheblicher Beitrag zur Erhöhung der Spurenelementverfügbarkeit geleistet werden.

Danksagung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei ein herzlicher Dank für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Untersuchung ausgesprochen.

Literatur

1. Davies NT, Olpin SE (1979) Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *Br J Nutr* 41:590–603
2. Morris ER, Ellis R (1980) Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rats fed semipurified diets. *J Nutr* 110:1037–1045
3. Morris ER, Ellis R (1980) Bioavailability to rats of iron and zinc in wheat bran: response to low phytate bran and effect of the phytate/zinc molar ratio. *J Nutr* 110:2000–2010
4. Lönnerdal B, Cederblad A, Davidsson L, Sandström B (1984) The effect of individual components of soy formula and cows' milk formula on zinc bioavailability. *Am J Clin Nutr* 40:1064–1070
5. Turnlund JR, King JC, Keyes WR, Gong B, Michel MC (1984) A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and α -cellulose. *Am J Clin Nutr* 40:1071–1077
6. Vohra P, Kratzer FH (1964) Influence of various chelating agents on the availability of zinc. *J Nutr* 82:249–256
7. Vohra P, Kratzer FH (1966) Influence of various phosphates and other complexing agents on the availability of zinc for turkey poult. *J Nutr* 89:106–112
8. Nielsen FH, Sunde ML, Hoekstra WG (1966) Effect of some dietary synthetic and natural chelating agents on the zinc-deficiency syndrome in the chick. *J Nutr* 89:35–42
9. Oberleas D, Muhrer ME, O'Dell BL (1966) Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. *J Nutr* 90:56–61
10. Sandström B, Cederblad A (1987) Effect of ascorbic acid on the absorption of zinc and calcium in man. *Int J Vit Nutr Res* 57:87–90
11. Harmuth-Hoene AE, Meuser F (1987) Biologische Verfügbarkeit von Zink in Getreidevolkkornprodukten mit unterschiedlichem Phytatgehalt. *Z Ernährungswiss* 26:250–267
12. Harmuth-Hoene AE, Meuser F (1988) Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit von Zink in Schrot- und Knäckebrot. *Z Ernährungswiss* 27:244–251
13. Kirchgeßner M, Roth FX (1988) Ergotrope Effekte durch organische Säuren in der Ferkelaufzucht und Schweinemast. *Übers Tierernährg* 16:93–108
14. Pallauf J, Göttert W, Krämer K (1988) Beitrag zum Einfluß von Citronensäure auf Nährstoffverdaulichkeit und N-Bilanz beim Ferkel. *Dtsch tierärztl Wschr* 95:146–150
15. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1972) Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP). *Z klin Chem u klin Biochem* 10:191
16. Eaton DL, Toal BF (1982) Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 66:134–142
17. Neusser H, Pallauf J (1988) Bestimmung von Phytinsäure in Futtermitteln und Faeces mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 60:20
18. Fretzdorff B, Weipert D (1986) Phytinsäure in Getreide und Getreideerzeugnissen. Mitteilung I: Phytinsäure und Phytase in Roggen und Roggenprodukten. *Z Lebensm Unters Forsch* 182:287–293
19. Lyon DB (1984) Studies on the solubility of Ca, Mg, Zn, and Cu in cereal products. *Am J Clin Nutr* 39:190–195
20. Ballot D, Baynes RD, Bothwell TH, Gillooly M, Macfarlane BJ, Macphail AP, Lyons G, Derman DP, Bezwoda WR, Torrance JD, Bothwell JE, Mayet F (1987) The effects of fruit juices and fruits on the absorption of iron from a rice meal. *Br J Nutr* 57:331–343
21. Derman DP, Ballot D, Bothwell TH, Macfarlane BJ, Baynes RD, Macphail AP, Gillooly M, Bothwell JE, Bezwoda WR, Mayet F (1987) Factors influencing the

- absorption of iron from soya-bean protein products. *Br J Nutr* 57:345–353
22. Kratzer FH, Vohra P (eds) (1986) Chelates in Nutrition. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 1–48
23. Henry RW, Pickard DW, Hughes PE (1985) Citric acid and fumaric acid as food additives for early-weaned piglets. *Anim Prod* 40:505–509
24. Kirchgeßner M, Roth H-P (1983) Nutritional influence of zinc on the activity of enzymes and hormones. In: Sigl H (ed), Metal Ions in Biological Systems. Vol 15, Zinc and its Role in Biology and Nutrition. Marcel Dekker, New York, pp 363–414
25. Moss DW (1982) Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 28:2007–2016
26. Koyama I, Arai K, Sakagishi Y, Ikezawa H, Komoda T (1987) Blood appearance of rat alkaline phosphatase originating from the duodenum in vitro. *J Chromatogr* 420:275–286
27. Scheuermann SE, Lantsch H-J, Menke KH (1988) In vitro und in vivo Untersuchungen zur Hydrolyse von Phytat. I. Löslichkeit von Phytat. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 60:55–63

Eingegangen 24. Juli 1989

Für die Verfasser:

Prof. Dr. J. Pallauf, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Tierernährung, Senckenbergstr. 5, 6300 Gießen (FRG)