

## تاثیر مکمل یاری با آنزیم فیتاز بر وضعیت روی، آهن و کلسیم موش صحرایی تغذیه شده با رژیم غذایی دارای نان ایرانی پرفیتات (سنگک)

سوده شکروی<sup>۱</sup>، مینو محمد شیرازی<sup>۱</sup>، علیرضا ابدی<sup>۲</sup>، مهدی سیدین اردبیلی<sup>۳</sup>، رزیتا کمیلی فنود<sup>۴</sup>، مسعود  
کیمیگر<sup>۱</sup>

۱) گروه تغذیه‌ی بالینی و رژیم درمانی، دانشکده‌ی علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۲) گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۳) انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، بلوار فرحزادی، خیابان ارغوان غربی، پلاک ۴۶، دانشکده‌ی علوم تغذیه و صنایع غذایی، گروه تغذیه‌ی بالینی و رژیم درمانی، سوده شکروی؛ e-mail: soodehshockravi@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** بیش از ۵۰ سال است که زیست دسترسی پایین املاح در نان ایرانی به دلیل وجود اسید فیتیک بالا مشخص شده است. هنوز هم بیش از یک سوم انرژی غذایی در کل کشور از نان تامین می‌شود. بنابراین بهبود زیست دسترسی املاح نان می‌تواند نقش بسزایی در کاهش شیوع فقر بسیاری از املاح داشته باشد. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر مکمل یاری با آنزیم فیتاز بر وضعیت روی در خون، کبد، استخوان و آهن در خون و کبد، و در نهایت کلسیم استخوان در موش‌های صحرایی نر و بیستار تغذیه شده با رژیم دارای نان پرفیتات سنگک بود. مواد و روش‌ها: ۳۰ موش صحرایی تازه از شیر گرفته شده در پژوهشی ۶ هفته‌ای به دو گروه فیتاز (آسپرژیلوس نایگر) و کنترل تقسیم شدند. طراحی غذای مورد استفاده بر پایه‌ی الگوی رژیم غذایی ایرانی‌ها و ۳۴/۲٪ انرژی از نان سنگک تامین شد. یافته‌ها: غذای خورده شده، افزایش وزن، وزن کبد و استخوان فمور بین دو گروه تفاوت معنی‌داری را در انتهای پژوهش نشان نداد. روی خون در گروه فیتاز بالاتر بود ( $P=0/03$ ). به این ترتیب اثرات مفید مکمل یاری فیتاز بر عنصر روی خون مستقل از وضعیت رشد می‌باشد. متغیرهای دیگر تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه نشان ندادند. نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد اضافه کردن آنزیم فیتاز به رژیم دارای نان پرفیتات ایرانی می‌تواند وضعیت عنصر روی خون را در موش‌های صحرایی بهبود بخشد.

### واژگان کلیدی: اسیدفیتیک، فیتاز، روی، نان

دریافت مقاله: ۹۰/۴/۱ - دریافت اصلاحیه: ۹۰/۵/۸ - پذیرش مقاله: ۹۰/۵/۱۸

### مقدمه

چندان دور در مصر نیز مشاهده شده بود، مربوط به کمبود روی است.<sup>۲</sup> پژوهش‌های تکمیلی نشان داد زیست دسترسی پایین عنصر روی در رژیم غذایی ایرانی‌ها و مصری‌ها که بیشتر بر پایه‌ی نان تخمیر نشده می‌باشد، دلیل اصلی کاهش رشد پسرهای جوان این مناطق است.<sup>۳</sup> پژوهش‌های دقیق‌تر در سال‌های بعد نیز نشان داد که سبب‌شناسی این سندرم

برای اولین بار پراساد و همکاران در سال ۱۹۶۱ میلادی سندرمی با علائم آنمی، هیپوگوناדיسم، کوتولگی و ژئوفاژی را در ۱۱ مورد از ایران گزارش کردند.<sup>۱</sup> پژوهش‌های بیشتر نشان داد این سندرم که مشابه آن در فاصله‌ی زمانی نه

کلسیم از نظر مقدار دریافت به طور تقریبی هم وزن با لبنیات است (۳۰/۶٪ در مقابل ۳۲/۵٪)<sup>۱۱</sup> به این ترتیب دور از ذهن نخواهد بود که یکی از اقدامات اساسی که می‌تواند موجب کاهش فقر املاح یاد شده در ایرانی‌ها شود، بهبود زیست دسترسی املاح نان یعنی رفع کمبود ثانویه‌ی آن‌ها است که با گذشت نزدیک به نیم قرن از شناخت آن همچنان حل نشده باقی مانده است.

راه حلی که به تازگی مورد توجه قرار گرفته، اما همچنان در مرحله‌ی نوپایی قرار دارد، استفاده از آنزیم فیتاز اگزورژن به صورت افزودنی در اشکال متفاوت می‌باشد. فیتازها فسفوهیدرولیز کننده‌هایی هستند که فسفر را از اسید فیتیک جدا می‌کنند<sup>۱۲</sup> و توانایی بالایی برای بهبود زیست دسترسی هم‌زمان املاح مختلف دو ظرفیتی را در انسان دارند. به این ترتیب پژوهش حاضر، با هدف بررسی تاثیر مکمل یاری با آنزیم فیتاز بر وضعیت روی، آهن و کلسیم موش صحرایی تغذیه شده با رژیم غذایی دارای نان ایرانی با فیتات بالا (سنگک) صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، تعداد ۳۰ موش صحرایی ویستار نر پس از دوران از شیرگیری (۲۱±۵ روزه)، انتخاب و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت چرخه‌ی نور و تاریکی، دمای ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵۰-۴۵ رطوبت) در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند و دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. این آزمون تجربی توسط کمیته‌ی اخلاق در پژوهش انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور بررسی و تایید گردید (شماره تاییدیه: ۰۳۷۳۷۱).

موش‌های صحرایی برای یک هفته با محیط و الگوی رژیم غذایی ایرانی طراحی شده هم‌خوانی پیدا کردند. پس از سپری شدن دوره‌ی هم‌خوانی، ابتدا توزین و سپس بر اساس وزن مرتب و در نهایت به صورت یک در میان در دو گروه توزیع شده (شروع با عددی تصادفی) تا از نظر تحمل و تمایل به مصرف غذا مشابه سازی بین دو گروه صورت گیرد. در ادامه به رژیم یکی از گروه‌ها آنزیم فیتاز بر اساس مقدار اسید فیتیک نان اضافه شد.

در پژوهش حاضر سعی شد رژیم غذایی موش‌ها تا حد ممکن از نظر دریافت نان، فیبر، درشت مغذی‌ها و ریزمغذی‌های مهم و کلیدی شبیه به میانگین دریافت افراد ایرانی باشد. به این ترتیب همسو با داده‌های طرح جامع

مربوط به تولید ترکیبات پیچیده غیر محلول اسید فیتیک با کاتیون‌های دو ظرفیتی شامل کلسیم، روی، مس، منیزیم و آهن است،<sup>۴۵</sup> که منجر به کاهش زیست دسترسی آنها می‌شود.

اسید فیتیک یا میواینوزیتول هگزافسفات در فراورده‌های گیاهی وجود دارد، و در واقع ترکیب ذخیره‌ای اصلی فسفر در غلات، حبوبات و دانه‌ها می‌باشد. این ترکیب با املاح کلسیم، آهن، روی و منیزیم، نمک‌های غیرمحلول ساخته و به این ترتیب به عنوان مهارکننده‌ی جذب این املاح در روده‌ی کوچک شناخته شده است.<sup>۶-۹</sup> هنگامی که غذایی مانند نان تخمیر می‌شود، ارگانسیم‌های مسئول تخمیر، با تولید آنزیم فیتاز موجب شکسته شدن اسید فیتیک و آزاد شدن املاح متصل به آن می‌شوند که در نهایت منجر به افزایش جذب این املاح می‌شود. امروزه با وجود استفاده از خمیر ترش و مخمر در بسیاری از نانوائی‌ها، تخمیر به اندازه‌ی طولانی نیست که اسیدفیتیک را به طور کامل تجزیه کند. گاهی اوقات برای تسریع روند تولید نان به جای تخمیر از بی‌کربنات سدیم (جوش شیرین) استفاده می‌شود. به این ترتیب مشکل اسید فیتیک بالای نان، به ویژه در نان‌های پرسبوس مانند سنگک همچنان باقی است. نسبت مولی فیتات به عنصر روی بیشتر از ۱۵ با کاهش زیست دسترسی روی همراه است. این نسبت در رژیم‌هایی که بیش از ۵۰٪ انرژی آنها از منابع گیاهی دارای فیتات تامین می‌شود و دریافت پروتئین حیوانی پایین است، دیده می‌شود.<sup>۱۰</sup> که به نظر می‌رسد این مسئله در مورد رژیم غذایی ایرانی‌ها درست باشد. داده‌های طرح جامع الگوی مصرف مواد غذایی خانوار و وضعیت تغذیه‌ای کشور نشان داده در ایران، حدود ۵۲٪ انرژی از گروه نان و غلات تامین می‌شود و تنها حدود ۵٪ انرژی از گروه گوشت و حدود ۱۱٪ انرژی از منابع پروتئینی با ارزش بیولوژی بالا (گوشت‌ها، تخم پرندگان و لبنیات) تامین می‌شود.<sup>۱۱</sup>

در مورد آهن نیز پژوهش‌های مختلف انجام شده، شیوع بالایی از فقر آهن را در قشرهای مختلف آسیب پذیر نشان داده که به طور عمده مربوط به جذب پایین است و نه کمبود دریافت.<sup>۱۲-۱۵</sup> داده‌های طرح جامع الگوی مصرف مواد غذایی خانوار و وضعیت تغذیه‌ای کشور نیز نشان داده تنها ۱۰/۴٪ آهن دریافتی ایرانی‌ها از منابع حیوانی (گوشت‌ها، لبنیات و تخم‌مرغ) تامین می‌شود و بقیه از منابع غیر حیوانی بوده و سهم نان در تامین آهن در بالاترین مقدار یعنی ۴۵٪ است. در مورد کلسیم نیز این پژوهش نشان داده سهم نان در تامین

پژوهش‌های الگوی مصرف مواد غذایی خانوار و وضعیت تغذیه‌ای کشور<sup>۱۱</sup> ۳۴/۲٪ انرژی رژیم از نان ایرانی دارای فیتات بالا یعنی نان سنگک تامین شد. برای تامین باقیمانده‌ی انرژی، نمونه‌ای از این نان برای اندازه‌گیری کربوهیدرات، پروتئین، فیبر، آهن، روی، کلسیم و اسید فیتیک به آزمایشگاه فرستاده و پس از کسر کربوهیدرات تامین شده توسط نان در ۱ کیلوگرم غذای طراحی شده، باقیمانده‌ی کربوهیدرات تا سقف دریافت ایرانی‌ها یعنی ۶۴٪ کل انرژی از نشاسته ذرت، سوکروز و دیروز (مشابه نسبت AIN-93G)<sup>۱</sup> تامین شد. پروتئین نیز پس از کسر پروتئین نان مورد نظر تا سقف دریافت ایرانی‌ها یعنی ۱۱٪ کل انرژی از کازئین تامین گردید. در مورد کلسیم، آهن، روی و فیبر نیز به همین ترتیب عمل شد. نیاز دیگر املاح و ویتامین‌ها مشابه توصیه‌های AIN-93G تامین گردید. از آنجا که ویتامین C بر جذب آهن تاثیر می‌گذارد، مقدار آن نیز مشابه دریافت ایرانی‌ها به رژیم اضافه شد. بر اساس دریافت ایرانی‌ها برای تامین ۲۵٪ انرژی از چربی‌ها، روغن سویا به رژیم اضافه گردید. فیبر نیز مشابه رژیم ایرانی‌ها (۱۱/۹ گرم در روز) تامین گردید. لازم به یادآوری است برای پیشگیری از مشکلات پیش‌بینی نشده به ویژه تحمل رژیم توسط موش‌های صحرایی، تعداد ۵ سر موش صحرایی به مدت ۱ ماه به صورت پایلوت با این رژیم تغذیه شدند.

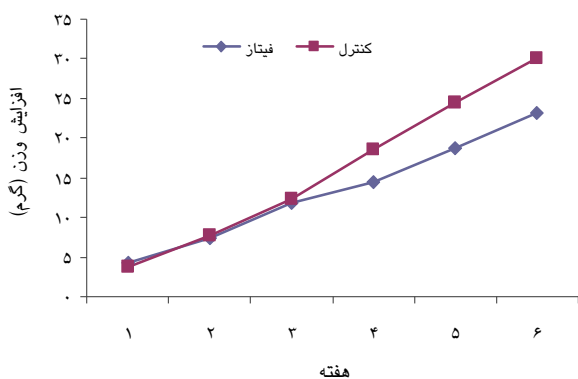
با توجه به اهداف این پژوهش، آردی با بیشینه خاکستر مورد استفاده در کشور انتخاب گردید. به این ترتیب یک کیسه آرد ۳۹/۱۹ کیلویی با ۹۳٪ درجه استخراج و ۱/۴۴٪ خاکستر، ۰/۳۱٪ خاکستر نامحلول، ۱۱/۸۵٪ رطوبت و ۲۸/۰۸٪ گلوتن تهیه و به صورت یک جا پخت شد. به طور خلاصه، این مقدار آرد با حدود ۶۰ لیتر آب ولرم و ۳۵۰ گرم نمک برای ۱۲ دقیقه مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه ۱۵۰ گرم خمیر مایه‌ی فوری (ساکارومایسز سرویزیه، شرکت دزمایه) و ۱۷/۳۵ کیلوگرم خمیر ترش (۱۲ ساعت پیش تهیه شده) به مخلوط اضافه، و برای ۲۰ دقیقه دیگر مخلوط شد. خمیر تخمیر شده سپس برای ۵۰ دقیقه در دمای اتاق استراحت داده شد. این خمیر سپس به صورت دستی به اندازه‌های ۹۵۰-۹۰۰ گرمی تقسیم، پهن و در کوره (حدود ۲۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) هر کدام به مدت حدود ۶ دقیقه پخت شدند. نان‌های پخت شده پس از خنک شدن و تکه شدن در

پلاستیک گذاشته و در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و به مرور برای تهیه‌ی پودر نان خشک مورد استفاده قرار گرفتند. برای خشک کردن، نان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در آون مورد خلا (برای جلوگیری از رشد هر گونه میکروارگانیسم و ایجاد آلودگی) خشک شدند. نان‌های خشک شده سپس توسط آسیاب به شکل پودر نرم درآمده و دوباره به مدت ۶ ساعت در آون مورد خلا با همان دما قرار داده شدند تا رطوبت باقیمانده‌ی احتمالی نیز از بین برود. پودر نان به این ترتیب به وزن ثابت رسیده و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در ظرف‌های ویژه بدون هوا نگهداری شدند.

نمونه‌های هموژنیزه از پودر نان خشک شده برای تجزیه و تحلیل به آزمایشگاه فرستاده شد. پروتئین نان با روش کج‌دال اندازه‌گیری شد. روش‌های AOAC برای اندازه‌گیری کربوهیدرات (شماره‌ی ۳۲۰۳۰۵۱)، چربی (۳۲/۲/۰۴)، کلسیم (۳۲/۱/۰۹)، آهن [۳۲/۱/۰۹ (۹۴۴/۰۲B)]، روی (۹/۱/۰۹) و فیبر (۴/۶/۰۱) نان مورد استفاده قرار گرفت.<sup>۱۷</sup>

۰/۵ گرم از نمونه‌های نان خشک با ۲۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۵ مولار در شرایط هم زدن مداوم در ۳ ساعت استخراج گردید. عصاره‌ی به دست آمده، سانتریفوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ دقیقه)، مایع رویی جدا و در طول شب در فریزر نگهداری شد، پس از سانتریفوژ مجدد برای اندازه‌گیری اسید فیتیک به روش Carlsson و همکاران<sup>۱۸</sup> مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه، کروماتوگراف شامل یک پمپ زیست سازگار (Waters مدل ۶۲۶) و مجهز به یک ستون محافظ PA-100 (Dionex Corp, Sunnyvale CA) و یک ستون تجزیه HPIC CarboPac PA-100 (Dionex Corp) تشکیل شده بود. اینوزیتول هگزافسفات با محلول ایزوکراتیک دارای ۸۰٪ اسید کلریدریک یک مولار و ۲۰٪ آب شستشو داده شد. خروجی به دست آمده از شستشو (eluent) با سرعت ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه با ۰/۱٪ محلول Fe(NO<sub>3</sub>).9H<sub>2</sub>O در یک محلول ۲٪ HClO<sub>4</sub>، در یک پس ستون مخلوط گردید. پمپ ریاکتور مورد استفاده پمپ HPIC مدل K 500 (Knauer, Berlin, Germany) بود. اینوزیتول هگزافسفات با استفاده از دتکتور UV (Waters 486, tunable) absorbance detector یا جذبی قابل مانیتور) پس از واکنش پس ستون شناسایی شد. کل مدت زمان انجام آزمون ۶ دقیقه بود و اندازه‌گیری جذب در ۲۹۰ نانومتر صورت پذیرفت. داده‌های مرتبط با اینوزیتول هگزافسفات با استفاده

نیز به روش تیتراسیون خاکستر استخوان محلول در اسید با اضافه کردن EDTA ۰/۱ مولار در حضور معرف نفتیل بلو تا تبدیل رنگ بنفش به آبی به دست آمد. تمام ظروف استفاده شده قبل از استفاده با محلول اسید نیتریک ۵٪ برای ۲۴ ساعت خیسانده و ۳ بار با آب دوبار دیونیزه آب کثی شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ابتدا تمام داده‌ها با استفاده از نمودار جعبه‌ای (Box plot) از نظر وجود مقادیر پرت (Outlier) به تفکیک در دو گروه بررسی شدند. مقادیر پرت به دست آمده با استفاده از جدول توزیع فراوانی به بیشترین عدد غیر پرت (در محدوده‌ی IQR) در گروه مربوطه تعدیل گردیدند.



سهام گروه‌ها در تعداد اعداد پرت به طور کامل مساوی بود (۵ مورد در هر گروه). با توجه به مرگ یک موش صحرایی از هر گروه حین پژوهش، موش‌های صحرایی برای مقایسه‌ی نهایی با مشابه‌ترین موش در گروه مقابل از نظر وزن اولیه جور شدند.

بررسی توزیع نرمال با استفاده از آزمون کولموگورنوف - اسمیرنوف به تفکیک در دو گروه انجام گرفت. آزمون تی زوجی برای مقایسه‌ی میانگین داده‌های با توزیع نرمال و معادل ناپارامتری آن یعنی آزمون ویلکاکسون برای دو گروه مرتبط به منظور مقایسه‌ی داده‌های با توزیع غیر نرمال مورد استفاده قرار گرفت.

با استفاده از تحلیل رگرسیون لجستیک اندازه‌ی همبستگی میان متغیرها در دو گروه بررسی شد. در تمام موارد  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

از نرم‌افزار Empower (Waters Associated, Mileford. MA) ذخیره سازی و غلظت اینوزیتول هگزافسفات در نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید.

فیتاز مورد استفاده توسط نژاد اسپرژیلوس نایگر اصلاح شده از نظر ژنتیکی تولید و از شرکت کیان دانه پارس (تهران-ایران) تهیه شد. برای اطمینان از به دست آمدن مخلوط هموزنیزه در هنگام تهیه غذای موش‌ها، آنزیم فیتاز گرانولی شکل (Natuphos; 10,000 G, BASF, AG.) (Ludwigshafen, آلمان) به شکل پودر نرم درآورده شد. یک واحد فیتاز (FTU) یعنی مقداری از آنزیم برای تجزیه یک نانومول فسفر غیرآلی از فیتات سدیم در زمان یک دقیقه و در شرایط pH=5 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. فعالیت فیتاز ۱۰۰۰۰ واحد در گرم بود و این فعالیت پس از ایجاد پودر نرم دوباره اندازه‌گیری و تایید شد.<sup>۱۹</sup>

مقدار اسید فیتیک ۲۲۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نان خشک تعیین گردید. به این ترتیب با توجه به این‌که هر کیلوگرم غذای طراحی شده حاوی ۳۶۷/۸ گرم نان بود، مقدار فیتاز مورد نیاز برای تجزیه اسیدفیتیک ۰/۱۲۵ گرم برای ۱ کیلوگرم غذا تعیین شد، و برای اطمینان ۰/۵ گرم فیتاز به هر کیلوگرم غذای حاوی فیتاز اضافه گردید.

تمام موش‌های صحرایی از ابتدای پژوهش به صورت هفتگی توزین و غذای خورده شده توسط حیوان نیز یک روز در میان توزین شد. قد خوابیده (از نوک بینی تا قاعده دم) و وزن اولیه ثبت گردید. پس از پایان پژوهش، حیوانات با گاز دی اکسید کربن بیهوش و وزن و قد خوابیده آن‌ها دوباره اندازه‌گیری گردید. سپس از چشم حیوان (سینوس اربیتال) خون گرفته شد. هم‌چنین کبد و هر دو استخوان فمور حیوان از محل اتصال لگن جدا و به همراه خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند. خون و کبد تا هنگام آزمون‌های بیوشیمیایی در فریزر ۳۳- درجه برای سانتی‌گراد و استخوان‌های فمور در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

خون، استخوان و کبد همگی در کوره ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به شکل خاکستر در آمدند. خاکستر به دست آمده در اسید نیتریک ۱٪ حجم به حجم با آب محلول و از صافی گذرانده شد. محلول صاف شده به حجم معینی با همان اسید رسیده و املاح آهن و روی با دستگاه Flame Atomic Absorption (WFX-210 AA Spectrophotometer) و اسپکتروفتومتر (Rayleigh) اندازه‌گیری شد. کلسیم استخوان

## یافته‌ها

جدول ۱ مقایسه‌ی رژیم غذایی طراحی شده با رژیم غذایی استاندارد برای موش‌های در حال رشد ۲۱ تا ۷۰ روزه (AIN-93G) را نشان می‌دهد. در مجموع این رژیم غذایی از نظر کربوهیدرات به طور تقریبی برابر، از نظر پروتئین به طور تقریبی ۴۳٪ کمتر ولی پرچرب‌تر (۵۵/۵٪ بیشتر) بود. با وجود چربی بیشتر، چگالی انرژی این رژیم کمتر می‌باشد. این رژیم همان‌طور که در جدول نشان داده شده، از نظر املاح مورد پژوهشی (کلسیم، آهن، روی) نسبت به استاندارد بسیار فقیر است.

درجه‌ی استخراج آرد مورد استفاده حدود ۹۳٪ بود. تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی نان سنگک مورد استفاده در این پژوهش نشان داد این نان دارای ۱۰۰ گرم / ۱/۶۶ میلی‌گرم روی، ۱۰۰ گرم / ۱/۲ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰ گرم / ۸۰/۰۵ میلی‌گرم کلسیم و ۱۰۰ گرم / ۲۲۴ میلی‌گرم اسیدفیتیک (اینوزیتول هگزا فسفات) در ماده خشک می‌باشد. نسبت مولی فیتات به روی و آهن به ترتیب ۱۳/۴ و ۱۵/۸ خواهد بود که در هر دو مورد زیست دسترسی پایین نان را نشان می‌دهد.

جدول ۱- مقایسه‌ی مواد غذایی رژیم طراحی شده با رژیم غذایی استاندارد AIN-93G

مقدار توصیه شده در یک کیلوگرم غذای استاندارد AIN-93G	مقدار تامین شده در یک کیلوگرم غذای طراحی شده	درصد تامین شده توسط رژیم طراحی شده نسبت به استاندارد AIN-93G	
۳۶۵۶/۱۵	۲۹۲۰/۵۲	۷۹/۸۶	کالری (کیلوکالری)
۶۲۹/۴۸۶	۶۶۰/۶۵	۱۰۴/۹۵	کربوهیدرات کل (گرم)
۳۹۷/۴۸۶	۲۵۰/۵۲	۶۳/۰۳	نشاسته زرت (گرم)
۱۰۰	۶۳/۰۸	۶۳/۰۸	سوکروز (گرم)
۱۳۲	۸۳/۱۸	۶۳/۰۲	دیروز (گرم)
-	۲۶۳/۸۶	-	کربوهیدرات نان (گرم)
۳۹۷/۴۸۶	۵۱۴/۳۹	۱۲۹/۴۱	کربوهیدرات کمپلکس (گرم)
۲۳۲	۱۴۶/۲۶	۶۳/۰۴	کربوهیدرات ساده (گرم)
۲۰۰	۱۱۴/۶۲	۵۷/۳۱	پروتئین کل (گرم)
۲۰۰	۶۹/۳۸	۳۴/۶۹	کازئین (گرم)
-	۴۵/۲۴	-	پروتئین نان (گرم)
۳	۳	۱۰۰	L-سیستئین (گرم)
۷۰	۱۰۸/۸۵	۱۵۵/۵	چربی کل (گرم)
۷۰	۹۷/۲۶	۱۳۸/۹۴	روغن سویا (گرم)
-	۱۱/۵۹	-	روغن نان (گرم)
۵۰	۱۷/۶۸	۳۵/۳۶	فیبر کل (گرم)
۵۰	۱۱/۶	۲۲/۲	سلولز (گرم)
-	۶/۰۸	-	فیبر نان (گرم)
۵۰۰۰	۸۸۲/۳۳	۱۷/۶۷	کلسیم (میلی‌گرم)
۳۵	۲۲/۳	۶۳/۷۱	آهن (میلی‌گرم)
۳۰	۱۵/۳	۵۱	روی (میلی‌گرم)
۳۵	۳۵	۱۰۰	مخلوط املاح دیگر (گرم)
۱۰	۱۰	۱۰۰	مخلوط ویتامین‌ها (گرم)
-	۹۲/۱۲	-	ویتامین C (میلی‌گرم)

۷ زمان یکسان است ( $P=0/164$ ). همچنین اگرچه مقدار افزایش وزن هفتگی به نفع گروه کنترل بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. قد موش‌های صحرایی دو گروه هم در ابتدا و هم در انتهای پژوهش تفاوت معنی‌داری نداشت، و تفاوت معنی‌داری بین وزن مطلق و نسبی کبد بین دو گروه مشاهده نگردید، در مورد استخوان فمور نیز تفاوت معنی‌داری بین وزن مطلق و نسبی دو گروه دیده نشد (جدول ۳).

با توجه به یافته‌های جدول ۴ مقدار روی خون گروه فیتاز در انتهای پژوهش به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. به این ترتیب با دریافت فیتاز انتظار می‌رود غلظت عنصر روی خون ۱/۲ برابر نسبت به گروه کنترل بیشتر شود. در بقیه‌ی موارد، برآورد نسبت بخت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت.

بین کل مقدار غذای خورده شده و غذای خورده شده در هر هفته در دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (میانگین مقدار کل غذای خورده شده توسط هر موش در گروه فیتاز و کنترل به ترتیب  $97/1 \pm 38/6$  و  $100/9 \pm 38/4$  گرم در روز بود، داده‌های هفتگی نشان داده نشده‌اند).

جدول ۲ تفاوت آماری معنی‌داری بین وزن موش‌های جور شده دو گروه در ابتدای پژوهش را نشان می‌دهد. تفاوت مورد نظر به دلیل مرگ یک موش از هر گروه در اواسط پژوهش ایجاد شده که این تفاوت از نظر بیولوژی با اهمیت به نظر نمی‌رسد (۱ گرم). از هفته‌ی ۶ تفاوت معنی‌دار قابل توجهی بین وزن دو گروه مورد پژوهش به وجود آمد و در نهایت، در پایان پژوهش وزن گروه کنترل به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه فیتاز بود. با این وجود تحلیل واریانس اندازه‌های تکراری نشان داد، اختلاف وزن بین این

جدول ۲- وزن موش‌های صحرایی در دو گروه مداخله و کنترل به تفکیک هفته \*

وزن به تفکیک هفته	گروه فیتاز <sup>†</sup>	گروه کنترل <sup>†</sup>	تفاضل‌های زوجی <sup>‡</sup>		اختلاف میانگین وزن در ۷ زمان و دو گروه <sup>§</sup>
			مقدار P	مقدار P	
ابتدای پژوهش	$41/39 \pm 6/1$	$42/35 \pm 6/74$	$-0/96 \pm 1/35$	0/02	مقدار P زمان
انتهای هفته ۱	$45/66 \pm 7/37$	$46/17 \pm 8/43$	$-0/51 \pm 3/08$	0/549	$<0/001$
انتهای هفته ۲	$48/71 \pm 8/91$	$50/11 \pm 9/81$	$-1/39 \pm 4/42$	0/26	
انتهای هفته ۳	$53/23 \pm 10/87$	$54/7 \pm 11/37$	$-1/47 \pm 6/26$	0/39	مقدار P زمان و گروه
انتهای هفته ۴	$55/85 \pm 15/48$	$60/9 \pm 14/1$	$-5/05 \pm 9/92$	0/079	$=0/164$
انتهای هفته ۵	$60/16 \pm 16/67$	$66/77 \pm 16/37$	$-6/61 \pm 10/54$	0/036	
انتهای هفته ۶ (انتهای پژوهش)	$64/64 \pm 19/4$	$72/75 \pm 19/79$	$-7/15 \pm 13/24$	0/045	

\* تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۴ سر می‌باشد، آ‌اعداد به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده است. † در تعیین تفاضل زوجی، گروه کنترل از گروه فیتاز کم شده است، § تحلیل واریانس اندازه‌های تکراری با برقرار نشدن فرض sphericity و براساس تصحیح Greenhouse-Geisser صورت گرفته است.

جدول ۳- قد در ابتدا و انتهای مطالعه، وزن مطلق و نسبی کبد و استخوان فمور موش‌های صحرایی گروه مداخله و کنترل در انتهای پژوهش \*

متغیر	گروه فیتاز <sup>†</sup>	گروه کنترل <sup>†</sup>	تفاضل‌های زوجی <sup>‡</sup>	مقدار P <sup>§</sup>
قد ابتدای پژوهش (سانتی‌متر)	$9/5 \pm 0/52$	$9/86 \pm 0/63$	$-0/36 \pm 0/6$	0/07
قد انتهای پژوهش (سانتی‌متر)	$12/23 \pm 1/85$	$12/91 \pm 1/54$	$-0/69 \pm 1/37$	0/06
وزن کبد (گرم)	$3/49 \pm 1/12$	$3/86 \pm 1/27$	$-0/36 \pm 0/89$	0/15
نسبت وزن کبد به وزن بدن	$0/054 \pm 0/01$	$0/053 \pm 0/01$	$0/00091 \pm 0/0083$	0/69
وزن استخوان فمور (گرم)	$0/16 \pm 0/05$	$0/2 \pm 0/02$	$-0/04 \pm 0/21$	0/42
نسبت وزن استخوان فمور به وزن بدن	$0/0025 \pm 0/0007$	$0/003 \pm 0/0035$	$-0/00047 \pm 0/0034$	0/61

\* تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۴ سر می‌باشد، آ‌اعداد به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند، † در تعیین تفاضل زوجی، گروه کنترل از گروه فیتاز کم شده است، § مقدار  $P < 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است، ¶ تحلیل با استفاده از آزمون ناپارامتریک Wilcoxon صورت گرفته است.

جدول ۴- متغیرهای اندازه‌گیری شده در خون، کبد و استخوان فمور موش‌های صحرایی در گروه مداخله و کنترل در انتهای پژوهش\*

Exp (B)	تفاضل‌های زوجی <sup>‡</sup>		گروه کنترل <sup>†</sup>	گروه فیتاز <sup>†</sup>	متغیر
	مقدار <sup>§</sup> P				
۱/۰۱	۰/۲	۳۲/۲ ± ۱۰۴/۱	۱۱۲/۴ ± ۶۴/۵	۱۴۴/۶ ± ۷۶/۰۴ <sup>†</sup>	آهن خون (میکروگرم در صد میلی‌لیتر)
۱/۲	۰/۰۳	۶/۹۹ ± ۱۰/۷۴	۱۹/۲۵ ± ۵/۲۱	۲۶/۲۴ ± ۷/۴	روی خون (میکروگرم در صد میلی‌لیتر)
۱/۰۲۵	۰/۰۹	۱/۵ ± ۳/۱	۱۲/۶ ± ۳/۷	۱۴/۱ ± ۲/۸	آهن کبد (میکروگرم در صد گرم)
۰/۸۶	۰/۵۴	۰/۰۶ ± ۰/۳۷ <sup>¶</sup>	۱/۷ ± ۰/۳۲	۱/۶ ± ۰/۲۸	روی کبد (میکروگرم در صد گرم)
۰/۹۸	۰/۷	-۰/۵۳ ± ۵/۱۶	۹/۲ ± ۴/۲	۸/۷ ± ۲/۲	روی استخوان (میکروگرم در صد گرم)
۰/۹۷	۰/۵۴	۱/۴۹ ± ۸/۹۲ <sup>¶</sup>	۱۵/۵ ± ۷/۴۹	۱۴/۰۱ ± ۶/۳۳	کلسیم استخوان (میکروگرم در صد گرم)

\*تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۴ سر می‌باشد، <sup>†</sup> اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند، <sup>‡</sup> در تعیین تفاضل زوجی، گروه کنترل از گروه فیتاز کم شده است، <sup>§</sup> مقدار  $P < 0.05$ ، <sup>¶</sup> تحلیل با استفاده از آزمون ناپارامتریک Wilcoxon صورت گرفته است.

## بحث

یافته‌های پژوهش حاضر، افزایش بیشتر غلظت عنصر روی خون در گروه فیتاز را نشان داد، در حالی که تفاوتی بین روی کبد و استخوان فمور بین دو گروه دیده نشد. از آنجا که روی خون ۸۰-۷۰٪ سلولی است، در این پژوهش روی در خون کامل اندازه‌گیری گردید،<sup>۲۰</sup> اگرچه در بیشتر پژوهش‌های مشابه قبلی از روی پلاسما به عنوان شاخص روی استفاده شده است. McClung و همکاران<sup>۲۱</sup> در پژوهش ۸ هفته‌ای خود روی موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم فقیر از عنصر روی بهبود وضعیت روی با فیتاز را در پلاسما و استخوان (فمور و تیبا) گزارش کردند. Scrimgeour و همکاران<sup>۲۲</sup> نیز یافته‌های مشابهی را از غلظت روی سرم و استخوان تیبا در موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم فقیر از نظر روی، به واسطه‌ی مکمل یاری غذا با فیتاز گزارش کردند. در هر دو پژوهش، موش‌های صحرایی در گروه فیتاز رشد بیشتری نیز نسبت به گروه کنترل نشان دادند. اما در پژوهش حاضر، با وجود این‌که افزایش وزن در گروه فیتاز نسبت به کنترل بیشتر نبود باز هم بهبود روی خون مشاهده گردید. با توجه به این مورد، می‌توان نتیجه گرفت تاثیر مفید فیتاز بر وضعیت روی مختص خود فیتاز است و مستقل از وضعیت رشد می‌تواند اثر نماید. در پژوهش حاضر، محتوای روی کبد در پاسخ به فیتاز تغییر نکرد که این یافته همسو با یافته‌های Rimbach و همکاران،<sup>۲۳</sup> Roth،<sup>۲۴</sup> Kirchgessner،<sup>۲۵</sup> Pallof و

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد مکمل یاری با آنزیم فیتاز وضعیت عنصر روی خون را در موش صحرایی ویستار تغذیه شده با رژیم حاوی نان پرفیتات سنگک بهبود می‌بخشد.

علت انتخاب نان سنگک بر اساس هدف‌های پژوهش حاضر صورت گرفت. به این ترتیب که برای ایجاد شرایط اغراق آمیز، پرفیتات‌ترین نان ایرانی پرمصرف در کشور یعنی سنگک انتخاب شد و این طور فرض شد که در صورت مفید بودن مکمل یاری با این رژیم، به احتمال زیاد مکمل یاری در نان‌های کم فیتات تر نیز موثر واقع خواهد شد. بنابراین، نیازی به گروه‌های متعدد موش صحرایی و استفاده از انواع نان نبوده و از نظر اخلاقی نیز رعایت استفاده از کمینه تعداد حیوان آزمایشگاهی به عمل آمد.

از آنجا که زیست دسترسی املاح یک مسئله‌ی چند عاملی بوده و از موارد متعددی مانند پروتئین، مقدار فیبر رژیم، تداخل جذب املاح با هم تاثیر می‌پذیرد، در این پژوهش سعی گردید غذای مورد استفاده حیوان به شکلی طراحی شود که بیشترین شباهت را به میانگین دریافتی ایرانی‌ها (الگوی رژیمی) داشته باشد. اگرچه این شباهت هرگز نمی‌تواند در پژوهش‌های حیوانی به شکل کامل محقق گردد.

زیست دسترسی آهن غیر هم در انسان را در پژوهشی روی موش‌های صحرایی تعیین کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد مصرف گوشت، اسید اسکوربیک، سبوس و پروتئین سویا که بر جذب آهن در انسان تاثیر می‌گذارند، در جذب آهن موش صحرایی تاثیر بسیار کمی دارند. آنها نتیجه‌گیری کردند موش صحرایی در مقایسه با انسان نسبت به بسیاری از مواد موثر بر جذب آهن غیر هم کمتر حساس بوده و برای بررسی این جنبه از تغذیه‌ی انسان از ارزش محدودی برخوردارند.

چای نوشیدنی بسیار محبوبی در ایران است. شبیه سازی پلی فنل‌های چای در رژیم غذایی به عنوان مهارکننده جذب آهن می‌توانست ارزش زیادی داشته باشد، اما مشکلات روش‌شناسی برای استفاده از آن‌ها وجود دارد. برای نمونه گروه‌های فنولیک ترکیبات ناهمگونی در مواد غذایی هستند که در گونه‌های مختلف چای با هم متفاوت هستند. همچنین توجه به این که در پژوهش‌های کشوری مقدار مصرف این مواد اندازه‌گیری نمی‌شوند، امکان استفاده از آن‌ها در پژوهش‌ها بسیار مشکل است.

بسیاری از بررسی‌های نشان داده‌اند غلات کامل اثرات مفید متعددی در سلامت انسان بر ضد بیشتر بیماری‌های تمدن مانند بسیاری از انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی - عروقی و دیابت شیرین دارند.<sup>۳۲</sup> با توجه به این که در کشورهای با درآمد پایین، مصرف انواع گوشت به عنوان منبع روی و آهن برای بسیاری از قشرهای مردم آسان نیست، توصیه‌های تغذیه‌ای در این مورد باید بسیار با احتیاط انجام شود تا منجر به بدبینی نسبت به مصرف نان پرسبوس نشود. در مجموع به نظر می‌رسد کاهش اسید فیتیک نان با هر روش ممکن بهترین راه حل برای کاهش شیوع فقر املاح آهن و روی باشد.

از آنجا که اثر متقابل مهارکننده‌ها و بهبود دهنده‌های جذب املاح در الگوی رژیم غذایی، تعیین کننده‌ی نهایی جذب در روده می‌باشد، پاسخ به آنزیم فیتاز در شرایط متفاوت رژیمی خطی و مشابه یکدیگر نمی‌باشد. منبع فیتات مورد استفاده در این پژوهش منحصر به فرد بوده و امکان مقایسه را با یافته‌های دیگران مشکل می‌سازد. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتری در زمینه‌ی زیست دسترسی نان صورت گیرد. به ویژه انجام پژوهش‌ها روی مدل سلول‌های Caco-2 برای بررسی زیست دسترسی املاح در نان پرفیتات ایرانی در شرایط متفاوت توصیه می‌شود. در هر حال

بود که نشان می‌دهد غلظت روی کبد با بهبود تامین روی بدون تغییر می‌ماند. روی استخوان به عنوان شاخص معتبرتری از وضعیت روی در پژوهش‌های حیوانی مطرح شده است.<sup>۲۶</sup> در پژوهش حاضر بر خلاف یافته‌های Rimbach<sup>۳۳</sup> و Scrimgeour<sup>۳۲</sup> و همکاران تفاوتی بین روی استخوان بین دو گروه فیتاز و کنترل مشاهده نشد. این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت ترکیب رژیم غذایی و در واقع منبع فیتاز مورد استفاده باشد. در پژوهش Rimbach و همکاران<sup>۳۳</sup> از رژیم بر پایه‌ی سویا و ذرت، و در پژوهش Scrimgeour و همکاران<sup>۳۲</sup> از رژیم غذایی تصفیه شده با اسید فیتیک افزوده شده‌ی سنتتیک استفاده شده بود. همچنین این تفاوت می‌تواند مربوط به اثر متقابل بهبود رشد در موش‌های گروه فیتاز در مقایسه با گروه کنترل در پژوهش آنها باشد که در پژوهش کنونی مشاهده نگردید.

در آزمایشگاه حیوانات، بیشتر موش‌های صحرایی تا ۷۰ روزگی با رژیم AIN-93G به وزن حدود ۱۵۰ گرم می‌رسند. اما در این پژوهش موش‌های صحرایی مورد بررسی، رشد کمتری داشتند که می‌تواند مربوط به دلایل مختلفی از جمله چگالی پایین انرژی (رژیم کم چرب ایرانی‌ها)، کمبود پروتئین با ارزش بیولوژی بالا و کلسیم، آهن و روی پایین به همراه اسید فیتیک بالای رژیم باشد. از سوی دیگر، در پژوهش کنونی وزن خام کبد در گروه کنترل بالاتر بود، در حالی که نسبت وزن کبد به وزن بدن در گروه فیتاز بالاتر بود. اگرچه در هر دو مورد تفاوت‌ها بین دو گروه معنی‌دار نبود، اما این تغییر شیفت شایان توجه است و به احتمال زیاد می‌تواند به علت اثر محافظت کننده‌ی روی در کاهش رشد کبد در اثر سو تغذیه باشد.

افزودن فیتاز در پژوهش حاضر نتوانست وضعیت کلسیم و آهن را به شکل معنی‌داری تغییر دهد. این یافته‌ها همسو با بررسی‌های حیوانی مشابه<sup>۲۱،۲۲</sup> و مخالف بعضی پژوهش‌های انسانی بر آهن می‌باشد.<sup>۲۷-۳۰</sup> البته مقایسه‌ی مستقیم یافته‌ها با یکدیگر مشکل است. از جمله دلایل این امر، طراحی متفاوت پژوهش‌ها، مقدار املاح و کمپلکس غذایی حامل آنها می‌باشد. موش‌های صحرایی در حال رشد به مقدار بسیار بیشتری به آهن و کلسیم در مقایسه با آنچه در رژیم غذایی آنها تامین شده بود، نیاز داشتند. این تفاوت بزرگ بین نیاز املاح همراه با تفاوت سوخت و ساز املاح در موش‌های صحرایی، تعمیم یافته‌ها را به انسان مشکل می‌سازد. Cook<sup>۳۱</sup> و Reddy در سال ۱۹۹۱ میزان پیش‌بینی



شرکت خوراک دام و طیور کیان دانه پارس برای تامین آنزیم فیتاز مورد نیاز این پژوهش ابراز می‌کنیم. همچنین از آقایان دکتر فائق حاجی لاری، مهندس ودود خوش طینت و سرکار خانم فرزانه شهرزاد کمال سپاسگزاری را بابت همکاری‌های بی‌شائبه‌ی ایشان داریم. این پژوهش نتیجه‌ی پایان نامه‌ی دکتری علوم تغذیه سوده شکروی و با حمایت مالی معاونت پژوهشی انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور اجرا شده است.

پژوهش حاضر نشان داد آنزیم فیتاز می‌تواند موجب بهبود غلظت عنصر روی خون حتی در شرایط عقب ماندگی رشد در موش‌های صحرایی شود.

سپاسگزاری: پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از همکاری سرکار خانم آناهیتا هوشیارراد و جناب آقای دکتر مرتضی عبداللهی برای به دست آوردن مقدار میانگین روی و فیبر مصرفی در کشور قدردانی کنند. به این‌وسیله مراتب قدردانی خود را از

## References

- Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med* 1961; 31: 532-46.
- Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schultert AR, Darby WJ. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism, and anemia. *Arch Intern Med* 1963; 111: 407-28.
- Sandstead HH, Prasad AS, Schultert AR, Farid Z, Miale A Jr, Bassilly S, et al. Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment. *Am J Clin Nutr* 1967; 20: 422-42.
- Reinhold JG. Phytate concentration of leavened and unleavened Iranian breads. *Ecology of Food and Nutrition* 1972; 1: 187-92.
- Reinhold JG. High phytate content of rural Iranian bread: a possible cause of human zinc deficiency. *Am J Clin Nutr* 1971; 24: 1204-6.
- Fredlund K, Isaksson M, Rossander-Hulthen L, Almgren A, Sandberg AS. Absorption of zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. *J Trace Elem Med Biol* 2006; 20: 49-57.
- Zhou JR, Erdman JW Jr. Phytic acid in health and disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 495-508.
- Torre M, Rodriguez AR, Saura-Calixto F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991; 30: 1-22.
- Lopez HW, Leenhardt F, Coudray C, Remesy C. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? *International Journal of Food Science and Technology* 2002; 37: 727-39.
- Hallberg L, Sandstrom B, Ralph A, Arthur J. Iron, zinc and other trace elements. In: Garrow J, James W, Ralph A, editors. *Human nutrition and dietetics*. 10 ed. London: Churchill livingstone 2000. p 177-209.
- kalantari N, Ghaffarpour M, HoushiarRad A, Abdollahi M, Kianfar H, Bondarianzadeh D. National comprehensive study on household food consumption pattern and nutritional status IR IRAN, 2001-2003. Tehran: Nutrition Research Department, National Nutrition and Food Technology Research Institute 2005.
- Javadzadeh Shahshahani H, Attar M, Taher Yavari M. A study of the prevalence of iron deficiency and its related factors in blood donors of Yazd, Iran, 2003. *Transfus Med* 2005; 15: 287-93.
- Kadivar MR, Yarmohammadi H, Mirahmadizadeh AR, Vakili M, Karimi M. Prevalence of iron deficiency anemia in 6 months to 5 years old children in Fars, Southern Iran. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR100-4.
- Sarrafi Z, Goldberg D, Shahbazi M, Arbuckle K, Salehi M. Nutritional status of schoolchildren in rural Iran. *British Journal of Nutrition* 2005; 94: 390-6.
- Keikhaei B, Zandian K, Ghasemi A, Tabibi R. Iron-deficiency anemia among children in southwest Iran. *Food Nutr Bull* 2007; 28: 406-11.
- Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1787-94.
- Cunniff P. Official methods of analysis of AOAC International 16th ed AOAC Int. Gaithersburg; 1995.
- Carlsson NG, Bergman EL, Skoglund E, Hasselblad K, Sandberg AS. Rapid analysis of inositol phosphates. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1695-701.
- Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PH, Smit EL. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int* 1994; 77: 760-4.
- Milne DB, Ralston NV, Wallwork JC. Zinc content of cellular components of blood: methods for cell separation and analysis evaluated. *Clin Chem* 1985; 31: 65-9.
- McClung JP, Stahl CH, Marchitelli LJ, Morales-Martinez N, Mackin KM, Young AJ, et al. Effects of dietary phytase on body weight gain, body composition and bone strength in growing rats fed a low-zinc diet. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 190-6.
- Scrimgeour AG, Marchitelli LJ, Whicker JS, Song Y, Ho E, Young AJ. Phytase supplementation increases bone mineral density, lean body mass and voluntary physical activity in rats fed a low-zinc diet. *J Nutr Biochem* 2010; 21: 653-8.
- Rimbach G, Walter A, Most E, Pallauf J. Effect of microbial phytase on zinc bioavailability and cadmium and lead accumulation in growing rats. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 7-12.
- Roth HP, Kirchgessner M. [De- and repletion study of zinc in the bones and liver of growing rats]. *Arch Tierernahr* 1974; 24: 283-98.
- Rimbach G, Pallauf J. Enhancement of zinc utilization from phytate-rich soy protein isolate by microbial phytase. *Z Ernahrungswiss* 1993; 32: 308-15.
- Bobilya DJ, Johanning GL, Veum TL, O'Dell BL. Chronological loss of bone zinc during dietary zinc deprivation in neonatal pigs. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 649-53.
- Troesch B, Egli I, Zeder C, Hurrell RF, de Pee S, Zimmermann MB. Optimization of a phytase-containing micronutrient powder with low amounts of highly bioavailable iron for in-home fortification of complementary foods. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 539-44.
- Zhang H, Önning G, Öste R, Gramatkovski E, Hulthen L. Improved Iron Bioavailability In An Oat-Based Beverage: The Combined Effect Of Citric Acid Addition, Dephytinization And Iron Supplementation. *European Journal Of Nutrition* 2007; 46: 95-102.

29. Sandberg AS, Hulthen LR, Turk M. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J Nutr* 1996; 126: 476-80.
30. Sandberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E, Rossander-Hulthen L. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 240-6.
31. Reddy MB, Cook JD. Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 723-8.
32. Kumar V, Sinha A, Makkar H, Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry* 2010; 120: 945-59.

Original Article

## Effect of Phytase Supplementation on Zinc, Iron and Calcium Status in Rats Fed with Diet Containing Iranian High Phytate Bread (Sangak)

Shockravi S<sup>1</sup>, Mohammad-Shirazi M<sup>1</sup>, Abadi A<sup>2</sup>, Seyedain Ardabili M<sup>3</sup>, Komeili-fonood R<sup>3</sup>,  
Kimiagar M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Nutrition and Dietetics, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, <sup>2</sup>Department of Social Medicine, Faculty of Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, <sup>3</sup>Institute of Nutrition Science and Food Tecnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Tehran, I.R. Iran

e-mail: soodehshockravi@yahoo.com

Received: 22/06/2011 Accepted: 09/08/2011

### Abstract

**Introduction:** Restricted mineral bioavailability of minerals in Iranian breads due to high levels of phytic acid has been reported for more than 50 years. Bread intakes still provide over one-third of the food energy through out the country. Hence improving bread mineral bioavailability can play an important role in decreasing the prevalence of many mineral deficiencies. The aim of this study was to assess the effect of phytase supplementation on blood, liver and bone zinc, blood and liver iron and femur bone calcium in growing Wistar male rats, fed a diet containing high phytate Iranian bread (Sangak). **Materials and Methods:** Thirty weaning Wistar rats were assigned to the phytase (*Aspergillus niger*) or the control group for 6 weeks. The diet was designed based on Iranian food patterns and 34.2 % of energy was supplied from Sangak bread with high amount of phytic acid. **Results:** Feed intakes, weight gain, liver and femur bone weight did not differ between the groups. Blood zinc was higher in the phytase group ( $p=0.03$ ), indicating the positive effect of phytase supplementation on blood zinc levels, independent of the growth process. Other variables did not show any differences between groups. **Conclusion:** We conclude that the addition of high phytate Iranian bread phytase to the diet can improve blood zinc status in growing rats.

**Keywords:** Phytic Acid, Phytase, Zinc, Bread