

SUBPRODUCTOS DE LA GRANADA EN LA DIETA DE RUMIANTES: CUANDO LOS PROPIOS TANINOS PROTEGEN A LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA BIOHIDROGENACIÓN EN EL RUMEN

Natalello, A.^{1,2}, Hervás, G.¹, Toral, P.G.¹, Luciano, G.², Valenti, B.², Mendoza, A.G.¹, Pauselli, M.³, Priolo, A.² y Frutos, P.^{1*}

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Univ. de León), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España. ²Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (Di3A), Universidad de Catania, Via Valdisavoia 5, 95123, Catania, Italia. ³Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (DSA3), Universidad de Perugia, Borgo XX Giugno 74, 06123, Perugia, Italia; * p.frutos@csic.es

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de granadas (*Punica granatum* L.) en numerosos países, y especialmente de su zumo, está llevando a un llamativo aumento de sus subproductos, lo cuales son ricos en compuestos bioactivos.

En concreto, las semillas de este fruto contienen una alta concentración de ácido linoléico conjugado (CLnA, principalmente ácido punícico, c9t11c13 18:3), un ácido graso con propiedades beneficiosas para los consumidores muy infrecuente en alimentos vegetales (Lansky y Newman, 2007).

El resto (pulpa y pieles, incluida la corteza) tiene una considerable cantidad de taninos, la mayoría elagitaninos (Kýralan et al., 2009). Estos compuestos fenólicos podrían proteger a los ácidos grasos insaturados más saludables de su hidrogenación en el rumen (Vasta y Luciano, 2011; Carreño et al., 2015).

Por lo tanto, la inclusión de unos u otros subproductos en la dieta puede dar lugar a variaciones significativas en los procesos ruminales y en los metabolitos que pasen después al intestino y a los productos finales.

En este trabajo se analizó el efecto de la inclusión en la dieta de ovejas de 3 subproductos de la granada (las semillas, la pulpa más pieles, y el subproducto completo tras la extracción del zumo) sobre la biohidrogenación ruminal *in vitro* de los ácidos grasos (BH), con el objetivo final de incrementar el contenido de ácidos grasos (AG) potencialmente saludables que aparezcan finalmente en la carne o la leche de rumiantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo mediante cultivos no renovados de microorganismos ruminales, por lo cual se contó con tres ovejas merinas canuladas en el rumen (PV = 65 ± 3,2 kg) como donantes del inóculo. Estos animales se alimentaron con una ración completa mezclada (TMR) basada en heno de alfalfa y concentrado (ratio F:C 50:50).

Como sustrato para los cultivos se utilizaron 4 dietas: la TMR que consumían las ovejas (control, **C**) y, sobre MS, un 80% de dicha TMR más un 20% del subproducto completo de la granada, una vez extraído el zumo (**G**), de semillas (**SG**) o de pulpa y pieles (**PPG**).

En cada botella se pesaron 500 mg de sustrato (10 mg/mL de líquido ruminal tamponado). El fluido tamponado se preparó con una relación 1:4 entre fluido ruminal, extraído de las ovejas antes de la comida de la mañana y filtrado a través de una membrana de nailon de 400 µm, y saliva artificial (Goering y Van Soest, 1970).

Las incubaciones se realizaron a 39,5 °C, duraron 24 horas y se repitieron 3 días diferentes (=réplicas). Una vez detenida la fermentación, las muestras de digesta se congelaron inmediatamente a -80°C y después se liofilizaron (Carreño et al., 2015).

La composición de AG se determinó por cromatografía de gases siguiendo la metodología descrita por Shingfield et al. (2003) y Toral et al. (2017), pero con una temperatura menor (40°C) en la metilación ácida para evitar problemas relacionados con la isomerización de los CLnAs.

El contenido de taninos se analizó siguiendo el método del Folin-Ciocalteu en combinación con polivinil-pipirrolidona, con ácido tánico como estándar de referencia (Makkar, 2003).

Los resultados se analizaron mediante ANOVA utilizando el procedimiento MIXED del SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., EE. UU.). El modelo incluyó el efecto fijo de la dieta y el aleatorio de la tanda de incubación. Las medias se ajustaron para comparaciones múltiples usando el método de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, el contenido más elevado de CLnAs se detectó en las semillas de granada, donde representaban más del 60% del total de ácidos grasos antes de la incubación. A estos isómeros conjugados se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud de los consumidores. Por ejemplo, Tsuzuki et al. (2004) señalaron un efecto antitumoral más potente que el del ácido linoleico conjugado (CLA).

La mayor proporción de $\Delta 11,13$ CLA y de ácido vaccénico (VA, $t11$ 18:1) en el tratamiento SG, con un valor intermedio en G, sugiere que estos metabolitos derivan de la saturación de los CLnAs presentes en las semillas. Por otro lado, la concentración de ácido ruménico (RA, $c9t11$ CLA) no difirió entre el control y los tratamientos SG y G, pero fue significativamente superior en PPG, lo que podría indicar que la BH se vio más limitada en este tratamiento. Esto coincidiría con el efecto inhibidor de los taninos sobre la biohidrogenación ruminal, como se ha mostrado en trabajos previos (Vasta y Luciano, 2011; Carreño et al., 2015). El contenido de estos compuestos fenólicos en PPG (44,7 g/kg MS, en equivalentes de ácido tánico, en comparación con los 2,4 g en el control), podría haber afectado negativamente a la actividad de los microorganismos del rumen implicados en la BH de los AG insaturados de la dieta. Esta hipótesis estaría apoyada por la alta proporción de ácidos linoleico ($c9c12$ 18:2) y linoléico (18:3n-3) encontrados en este mismo tratamiento (PPG).

Tabla 1. Perfil parcial de la digesta ruminal (g/100 g AG) después de 24 h de incubación *in vitro* de 4 dietas: C= TMR control, G= 80% TMR + 20% del subproducto completo de la granada, SG= 80% TMR + 20% de semillas y PPG=80% TMR + 20% de pulpa y pieles.

	Dieta				eed ¹	Prob ² .
	C	G	SG	PPG		
$t11$ 18:1	4,54 ^c	5,11 ^b	6,88 ^a	4,64 ^c	0,0833	<0,001
$c9c12$ 18:2	1,70 ^c	1,92 ^b	1,11 ^d	2,33 ^a	0,0525	<0,001
$c9t11$ CLA ³	0,093 ^b	0,130 ^{ab}	0,092 ^b	0,162 ^a	0,0141	0,007
$\Sigma \Delta 11,13$ CLA	0,043 ^c	0,324 ^b	0,694 ^a	0,059 ^c	0,0267	<0,001
18:3n-3	0,382 ^b	0,382 ^b	0,214 ^c	0,440 ^a	0,0157	<0,001
$c9t11c13$ 18:3	-	0,217 ^b	0,431 ^a	-	0,0419	0,036
Otros $\Delta 9,11,13$ 18:3	-	0,757 ^b	1,852 ^a	0,141 ^c	0,1641	<0,001
Σ AGPI ⁴	2,82 ^c	4,26 ^{ab}	5,02 ^a	3,73 ^b	0,2088	<0,001

^{abc}Para cada ácido graso, diferentes superíndices indican diferencias significativas.

¹Error estándar de la diferencia. ²Probabilidad. ³Ácido linoleico conjugado. ⁴Ácidos grasos poliinsaturados.

Esto último, junto con el hecho de que la concentración de ácido vaccénico fuera similar en el control y en PPG sugiere que los taninos de la granada, al menos en las condiciones de este ensayo *in vitro*, habrían alterado principalmente los primeros pasos de la BH, algo acerca de lo que aún existe cierta controversia, que ya algunos trabajos indicaban que el efecto inhibidor de los taninos se ejercería fundamentalmente sobre el último paso de la BH (e. g., Buccioni et al., 2011).

Todos los tratamientos con granada mostraron un mayor contenido de AG poliinsaturados que el control, observándose el valor más alto en SG, lo que se atribuye a la cantidad de CLnA en las semillas incubadas.

En conclusión, los subproductos de la granada pueden ser utilizados para aumentar el contenido de ácidos grasos saludables en los productos derivados de los rumiantes (i. e., en la carne y la leche). No obstante, los efectos específicos dependerán del subproducto utilizado.

El hecho de que los taninos de la pulpa y las pieles sirvan para proteger a los PUFA de la dieta, encontrados básicamente en las semillas, frente a la biohidrogenación ruminal,

constituye un buen ejemplo de las posibles interacciones entre compuestos bioactivos y del potencial que ofrecen en la alimentación animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Buccioni, A., et al. 2011. *Animal*, 5: 1521-1530. • Carreño, D., et al. 2015. *Anim. Feed Sci. Technol.* 202: 42-51. • Goering M.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. *Agriculture handbook* 379. USDA, EE. UU. • Kýralan, M., et al. 2009. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 86: 985-990. • Lansky, E.P. & Newman, R.A. 2007. *J. Ethnopharmacol.* 109: 177-206. • Makkar, H.P.S. 2003. *Small Rumin. Res.* 49: 241-256. • Shingfield, K.J., et al. 2003. *Anim. Sci.* 77: 165-179. • Toral, P.G., et al. 2017. *J. Dairy Sci.* 100: 6187-6198. • Tsuzuki, T., et al. 2004. *Carcinogenesis* 25: 1417-1425. • Vasta, V. & Luciano, G. 2011. *Small Rumin. Res.* 101: 150-159.

Agradecimientos: Este trabajo se financió con fondos del contrato de investigación VATC-20160394. P.G. Toral disfruta de un contrato Ramón y Cajal del MINECO con apoyo del Fondo Social Europeo.

POMEGRANATE BY-PRODUCTS IN RUMINANT DIET: WHEN THE OWN TANNINS PROTECT THE FATTY ACIDS FROM RUMINAL BIOHYDROGENATION

ABSTRACT: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds contain a high concentration of conjugated linolenic acids (CLnA; especially *c9t11c13* 18:3), while residual peels and pulps include tannins. This study investigated the effect of including three pomegranate by-products in sheep diet on *in vitro* rumen biohydrogenation (BH) of fatty acids (FA). Four diets were incubated *in vitro*: a TMR (control), and, on a DM basis, 80% TMR plus 20% of either pomegranate seeds (SG), or pomegranate peels and pulps (PPG) or whole pomegranate by-product (G). The results showed that the inclusion of pomegranate by-products in sheep diets increased the content of potentially beneficial fatty acids in the ruminal digesta but specific effects depended on the by-products. The higher proportion of $\Delta^{11,13}$ CLA and vaccenic acid (*t11* 18:1) in the SG treatment suggests that they derive from saturation of the CLnAs present in the seeds (>60% of total FA). The concentration of rumenic acid (*c9t11* CLA) was only significantly greater in PPG, which suggests that BH was limited in this treatment, likely due to the presence of tannins (44.7 g tannic acid equivalents/kg DM). All treatments containing pomegranate by-products showed a higher content of total PUFA than the control. Tannins in PPG and G probably protected dietary PUFA from ruminal BH, representing a clear example of interactions between bioactive compounds.

Keywords: conjugated linolenic acid, pomegranate by-products, rumen biohydrogenation, tannins.