

ARIANNA BUCCIONI*, MAURO ANTONGIOVANNI*, SARA MINIERI*,
STEFANO RAPACCINI*, ANTONIO PEZZATI*

Studio in vitro dell'effetto di alcuni tannini sulla bioidrogenazione ruminale degli acidi grassi insaturi

INTRODUZIONE

I tannini estratti dal castagno (*Castanea sativa* Miller), specie largamente diffusa in Italia, appartengono alla classe degli idrolizzabili (HT) e differiscono molto da quelli condensati (CT) per il loro ruolo nutrizionale. Prove *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che i CT, se introdotti nelle diete per piccoli ruminanti, possono migliorare le performance produttive, agire da antiparassitari intestinali e migliorare il bilancio energia-proteina della dieta riducendo l'escrezione azotata conseguente da un eccesso proteico della dieta, ridurre la produzione di metano ruminale attraverso la selezione dei microrganismi (Getachew et al., 2008). A questo, poi, si aggiungono gli effetti sulle bioidrogenazioni ruminali degli acidi grassi polinsaturi (Vasta et al., 2010). Al contrario, pochi sono gli studi riguardanti gli effetti degli HT e dei loro metaboliti. Negli ultimi anni sono stati fatti molti sforzi nel mettere a punto delle strategie finalizzate all'arricchimento di latte e carne proveniente dall'allevamento dei ruminanti in molecole bioattive quali l'acido Rumenico (RA), Vaccenico (VA) e Linolenico (LNA) e le strategie legate all'alimentazione animale rimangono quelle più efficaci e immediate. L'impiego dei tannini di castagno come integratore in diete destinate ai ruminanti potrebbe rappresentare una buona opportunità per modulare i processi di bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi al fine di favorire il by pass ruminale di RA, LNA e VA e, conseguentemente, l'incremento di questi nel latte e nella carne.

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie sez Scienze Animali, Università di Firenze

MATERIALE E METODI

Diete e fermentazione in vitro

Campioni di una dieta controllo (C, composta da paglia di grano, farina di estrazione di soia, farina di orzo, farina di mais, glutine e integratore minerale-vitaminico nei seguenti rapporti 30/13.2/9.6/15.2/30/2 sulla sostanza secca, SS) e di due diete ottenute addizionando a C due differenti concentrazioni di estratto di tannino di castagno (SaviotaN[®] Gruppo Mauro Saviola srl, titolo: 750g di equivalenti tannici/kg SS) TC1 (49 g/kg SS) e TC2 (82 g/kg SS) sono stati incubati con liquido ruminale ovino seguendo la metodica di Buccioni et al. (2006). I tempi scelti per il campionamento sono stati i seguenti: 6, 12, 18 h; al momento di ogni prelievo è stato misurato il pH.

Analisi sui campioni di alimento

I campioni delle diete sono stati essiccati a 60°C per 24 h in stufa ventilata e analizzati per il profilo bromatologico classico, le frazioni fibrose e proteiche secondo le metodiche AOAC (1990), Van Soest et al. (1991), Licitra (1996). La composizione chimica della dieta controllo era: SS, 897.7 g/kg; CP, 139.8 g/kg; NPN, 7.8 g/kg; SP, 26.6 g/kg; EE, 15.3 g/kg; NDF, 406.3 g/kg; ADF, 195.4 g/kg; ADL, 28.3 g/kg; ADIP, 11.2 g/kg; NDIP, 21.1 g/kg; ceneri, 63.8 g/kg; NFC, 395.9 g/kg; amido, 252.6 g/kg (dati espressi rispetto alla SS).

Frazionamento del contenuto microbico ruminale

Il frazionamento del contenuto ruminale è stato effettuato seguendo la metodica di Martin et al. (1994). La frazione microbica considerata è stata quella dei batteri associati alla fase solida (SAB) poiché costituita prevalentemente da cellulolitici, attivi nelle bioidrogenazioni; al termine del frazionamento i microrganismi sono stati liofilizzati per poi essere metilati e analizzati per la determinazione del profilo in acidi grassi mediante gascromatografia (Buccioni et al., 2006).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati seguendo la procedura GLM del SAS (1999) usan-

AG	C _{6h}	C _{12h}	C _{18h}	TC1 _{6h}	TC1 _{12h}	TC1 _{18h}	TC2 _{6h}	TC2 _{12h}	TC2 _{18h}	e.s.m.
C15 I	0.26 ^α	0.19 ^{αβ}	0.20 ^{αβ}	0.24 ^α	0.33 ^{ββ}	0.33 ^{ββ}	0.27 ^α	0.37 ^{ββ}	0.37 ^{ββ}	0.02
C15 A	0.34 ^α	0.44 ^{αβ}	0.37 ^{αα}	0.31 ^α	0.50 ^{αβ}	0.55 ^{ββ}	0.40 ^α	0.85 ^{ββ}	0.66 ^{αγ}	0.03
C17 I	0.76 ^{αα}	0.88 ^{αβ}	0.88 ^{αβ}	0.85 ^{βαα}	0.98 ^{ββ}	0.94 ^{ββ}	0.40 ^{αα}	0.58 ^{αβ}	0.59 ^{αβ}	0.03
C17A	0.11 ^a	0.13 ^a	0.12 ^a	0.00 ^{βαα}	0.51 ^{ββ}	0.51 ^{ββ}	0.16 ^{αα}	0.22 ^{αβ}	0.16 ^{αα}	0.01

I=iso, A=anteiso; AG=acido grasso; P<0.05 a, b significatività fra diete entro tempo; α, β significatività entro dieta a tempi differenti;

Tab. 1 *Profilo degli acidi grassi ramificati presenti nei SAB a differenti tempi di fermentazione (g/100 g acidi grassi totali)*

AG	C _{6h}	C _{12h}	C _{18h}	TC1 _{6h}	TC1 _{12h}	TC1 _{18h}	TC2 _{6h}	TC2 _{12h}	TC2 _{18h}	e.s.m.
C18:2 _{c9c12}	25.2 ^α	24.1 ^{αβ}	22.5 ^{αγ}	25.4 ^α	24.5 ^{αβ}	21.9 ^{βγ}	25.2 ^α	23.5 ^{bcβ}	22.0 ^{bcγ}	0.22
C18:2 _{c9c11}	0.56 ^{αα}	0.64 ^{αβ}	0.27 ^{αγ}	0.57 ^{βαα}	0.90 ^{ββ}	0.88 ^{ββ}	0.51 ^{αα}	0.73 ^{αβ}	0.70 ^{αβ}	0.01
C18:3 _{c9c12c15}	2.37 ^{αα}	1.40 ^{αβ}	1.13 ^{αγ}	2.20 ^{βαα}	1.15 ^{ββ}	1.17 ^{αβ}	2.75 ^{αα}	1.80 ^{αβ}	1.73 ^{ββ}	0.03
C18:3 _{c9c11c15}	0.55 ^{αα}	0.63 ^{αα}	0.26 ^{αβ}	0.40 ^{βαα}	0.40 ^{βαα}	0.57 ^{ββ}	0.52 ^{ααα}	0.53 ^{αα}	0.70 ^{αβ}	0.04
C18:1 _{c11}	2.02 ^{αα}	3.03 ^{αβ}	3.45 ^{αγ}	2.14 ^{βαα}	5.62 ^{ββ}	5.58 ^{ββ}	3.94 ^{αα}	4.13 ^{αβ}	4.14 ^{αβ}	0.02
C18:1 _{c9}	18.4 ^{αα}	14.1 ^{αβ}	14.2 ^{αβ}	17.6 ^{βαα}	14.6 ^{ββ}	14.9 ^{ββ}	18.9 ^{αα}	17.7 ^{αβ}	17.7 ^{αβ}	0.20
C18:0	14.9 ^{αα}	18.7 ^{αβ}	21.8 ^{αγ}	14.3 ^{βαα}	16.7 ^{ββ}	16.7 ^{ββ}	14.2 ^{βαα}	15.2 ^{αβ}	15.3 ^{αβ}	0.11

P<0.05 a, b, c significatività fra diete entro tempo; α, β, γ significatività entro dieta a tempi differenti

Tab. 2 *Contenuto in LA, LNA e dei loro intermedi di bioidrogenazione presenti nei SAB a differenti tempi di fermentazione (g/100 g acidi grassi totali)*

do il seguente modello lineare a due fattori di interazione: dieta e tempo di fermentazione.

$$y_{ij} = \mu + D_i + T_j + D_i \cdot T_j + e_{ij}$$

dove y_{ij} è l'osservazione; μ è la media; D_i la dieta ($i = 1$ to 5); T_j tempo di fermentazione ($j = 1$ to 3); $D_i \cdot T_j$ interazione fra la dieta e il tempo di fermentazione e e_{ij} l'errore residuo. Il livello di significatività è stato fissato per $P < 0.05$.

RISULTATI

Il profilo degli acidi grassi ramificati e di quelli relativi agli intermedi derivanti dalla bioidrogenazione dell'acido Linoleico (LA) e LNA nei SAB sono riportati in tabella 1 e 2.

DISCUSSIONE

Le percentuali di tannino impiegate nelle diete fermentate non hanno va-

riato il pH del liquido ruminale tamponato che è rimasto intorno a valori di 6.74 ± 0.2 . Dalla letteratura si evince che vi sono meno informazioni sulle modalità di interazione tra i tannini e le cellule batteriche rispetto a quelle che riguardano la complessazione delle proteine alimentari da parte di queste molecole polifenoliche. Sicuramente il valore di pH gioca un ruolo importante nell'interazione tannino – microrganismo perché alcune attività batteriche possono subire modificazioni a seguito delle variazioni nell'ambiente ruminale legate a tale parametro (Min et al., 2003). In particolare, i complessi tannino-proteina si formano intorno a pH neutro valore che è assai vicino a quello ottimale perché avvenga correttamente la bioidrogenazione ruminale dell'LA e LNA con la massima produzione di RA. La crescita costante della concentrazione di isoacidi, con particolare riferimento all'iso C17:0 che rimane costantemente più elevato rispetto all'isomero anteiso, è indice di una buona crescita della frazione microbica cellulosolitica. Considerando che la concentrazione di questi acidi grassi nel fermentato contenente l'estratto di tannino di castagno è maggiore rispetto al controllo pone l'attenzione sul fatto che questo integratore polifenolico non implica una particolare sofferenza dei microrganismi i quali al contrario sembrano crescere a ritmi costanti. Prendendo in considerazione gli effetti sulla bioidrogenazione degli acidi LA e LNA (tab. 2) è possibile notare che la presenza dell'estratto tannico di castagno non induce un rallentamento dell'attività della linoleico e linolenico isomerasi e che pertanto dall'LA e LNA i microrganismi producono rispettivamente RA e acido linolenico coniugato (CALNA); infatti, la concentrazione di questi acidi grassi non differisce tra le diete ma si può notare solo una tendenza alla diminuzione per il contenuto di LA e LNA nel fermentato contenente i tannini di castagno. Al contrario, sia il VA che l'RA si accumulano maggiormente con le diete contenenti tannini rispetto a al fermentato relativo alla dieta C. Ciò potrebbe trovare una spiegazione prendendo in considerazione una selezione della flora microbica con particolare riferimento alla diminuzione dei batteri responsabili della riduzione da VA ad acido stearico (SA) descritti in lavori pubblicati recentemente che hanno individuato nel *Butyrivibrio proteoclasticum* il principale microrganismo sensibile alla presenza di sostanze polifenoliche nel liquido ruminale (Vasta et al., 2010). L'accumulo di VA, a sua volta, può aver indotto per feed-back negativo un incremento nella produzione di RA come conseguente diminuzione della velocità di bioidrogenazione. Il fatto che la riduzione del doppio legame in cis9 non venga bloccata dalla presenza dei tannini nella dieta ma solo rallentata è confermata anche dalla riduzione dell'acido oleico (OA, cis9 C18:1).

CONCLUSIONI

I tannini di castagno rappresentano una buona opportunità per modulare le bioidrogenazioni ruminali favorendo l'accumulo di RA e VA, senza turbare l'equilibrio microbico come accade per altre specie di tannino molto più aggressive sulla flora microbica.

RIASSUNTO

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare gli effetti del tannino estratto dal castagno sulle vie di bioidrogenazione che conducono alla formazione dell'acido linoleico coniugato e dell'acido vaccenico nonché monitorare la produzione di acidi grassi ramificati, markers delle attività microbiche ruminali. Campioni di una dieta contenenti due differenti livelli di tannino di castagno sono stati messi a confronto in una prova *in vitro*. Le vie di bioidrogenazione degli acidi C18:2 cis9, cis12 and C18:3 cis9, cis12, cis15 sono state influenzate dalla presenza del tannino di castagno favorendo l'accumulo del C18:1 trans11, durante la fermentazione.

ABSTRACT

The aim of the present trial was to study the effects of tannins extracted from chestnut on the biohydrogenation pathway of conjugated linoleic and vaccenic acids and to monitor the branched chain fatty acid profile as rumen microbial markers. Samples of two diets integrated with two different levels of chestnut tannins were compared in an *in vitro* trial. The biohydrogenation pathway of C18:2 cis9, cis12 and C18:3 cis9, cis12, cis15 was affected by the presence of chestnut tannins in the diets, favouring the accumulation of C18:1 trans11 during rumen fermentation.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1990): *Official Methods of Analysis*, 1/2 vol., 15th edition, AOAC, Arlington, VA, USA.
- BUCCIONI A., ANTONGIOVANNI M., PETACCHI F., MELE M., SERRA A., SECCHIARI P., BENVENUTI D. (2006): *Effect of dietary fat quality on C18:1 fatty acids and conjugated linoleic acid production: an in vitro rumen fermentation study*, «Anim. Feed Sci. Technol.», 127, pp. 268-282.
- GETACHEW G., PITTROFF W., PUTNAM D.H., DANDEKAR A., GOYAL S., DEPETERS E.J. (2008): *The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis*, «Anim. Feed Sci and Technol.», 140, pp. 444-416.

- LICITRA G. (1996): *Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feed*, «Anim. FeedSci.Technol.», 57, pp. 347-358.
- MARTIN C., WILLIAMS A.G., MICHALET-DOREAU B. (1994): *Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents*, «J. Anim. Sci.», 72, pp. 2962-2968.
- MIN B.R., BARRY T.N., ATTWOOD G.T., McNABB W.C. (2003): *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review*, «Anim. Feed Sci. and Technol.», 106, pp. 3-19.
- SAS USER'S GUIDE (1999): Statistics, Version 8.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B., LEWIS B.A. (1991): *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition*, «J. Dary Sci.», 74, pp. 3583-3597.
- VASTA V., YÁÑEZ-RUIZ D.R., MELE M., SERRA A., LUCIANO G., LANZA M., BIONDI L., PRIOLO A. (2010): *Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumens of sheep fed a diet containing added tannins*, «Appl. Env. Microbiol», in proof (vol. 76, No 8, doi:10.1128/AEM 02583-09).