

דו"ח מדעי שנתי מספר 1

תיעול פסולת חקלאית של רימונים לשיפור הבריאות בבקר – השפעת טיפולי שימור

שונים על התכונות נוגדות החמצון של קליפות רימונים

מאי 2008

מגיש: ד"ר אריאל שבתאי

### מבוא

10000 דונם של מטעי רימון קיימים היום בארץ, ומתוכם כ- 6500 דונם כבר נושאים פרי. התנובה של שטחים אלה צפויה להגיע בעוד שנתיים ל- 25000 טון פרי בשנה. כ- 1600 טון של פרי מיועד כיום ליצוא, כשמתוכם כ- 600 טון הם פרי פרוט (גרגרים). רב הרימונים נמכרים היום בשווקים כפרי טרי, ופחות מ- 10% הם רימונים שנפרטים לתעשיות המיץ והיין. אולם, הכמות השנתית של פרי פרוט עשויה לגדול בשנים הקרובות בגלל שלושה תהליכים: **א.** הביקוש הגדל והולך לפרי הרימון בארץ ובחו"ל, עקב המחקרים המתרבים, המדווחים על סגולותיו הרפואיות, מעודד חקלאים לטעת רימונים בשטחים נוספים. **ב.** ההבנה בקרב יצרנים של הקושי (הפסיכולוגי) אצל הצרכן בהכנת הפרי הטרי למאכל. **ג.** הכוונה של יצרני פירות מקולפים לייבא מהודו רימונים, שלא בעונת הגידול בארץ. **ד.** פיתוח של יכולת מיכנית לקלף רימונים בכמויות גדולות בזמן קצר ובאיכות גבוהה.

בשל העובדות שהוזכרו לעיל, כמות קליפות הרימון עשויה לגדול מ 400 טון לשנה (הערכה עכשווית של מקלפי הפירות).

לקליפות הרימון אין, לעת עתה, ייעוד חקלאי. ממצאים ראשוניים מדווחים כי גם בקליפות הרימון קיימים, לפחות באופן חלקי, חומרי טבע בעלי פעילות ביולוגית רצויה, כמו טאנינים פריקים (hydrolyzable) ומעובים (condensed), חומצה אלגית וחומרים נוגדי חמצון אחרים (Gil et al., 2000; Tzulker et al., 2007).

בשל יכולתם לקשור חלבונים, לטאנינים מעובים (condensed), בריכוזים לא גבוהים (2-4% חומר יבש), ידועה השפעה חיובית על מטבוליזם החלבון של מעלי גירה. פעילותם זו מאטה את פרוק החלבון הנעכל בכרס לאמוניה, ע"י חיידקים, ומגדילה את יציאת החלבון השלם מהכרס, ואת זמינותן של חומצות אמינו לספיגה במעי הדק (Min et al., 2002). כתוצאה מכך, הוגברה התחלובה והוגדלה תוספת המשקל, ללא שינוי בצריכת המזון (Aerts et al., 1999).

בנוסף לכך, לטאנינים נודעת תרומה לבריאות מעלי גירה באמצעות דחייה ועיכוב של פעילות חיידקית, פטרייתית וטפילית (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000).

חומרים נוגדי חמצון ידועים בהשפעתם המיטיבה על מניעה והקטנה של התפתחות מחלות בבקר בפרט וביונקים בכלל. כך למשל, הוספת ויטמין E למנה של עגלי פיטום הורידה את מקרי התחלואה של עגלים בדלקות ריאות ביותר מ-20%, תוך שיפור ביצועי הגדילה שלהם (Chirase et al., 2004), ושימוש בפלבנואידים עכב חמצון של LDL (Vaya et al., 2003). מגדלי צאן ובקר שהזינו את עדריהם בקליפות רימונים לא דווחו על אפקטים שליליים; יתרה מזאת, הדיווחים מצביעים על בחירת הקליפות מתוך המנה. כאמור, קיימת כיום הולכת וגדלה של קליפות רימונים אשר מהוות פסולת חקלאית שאפשר לתעל אותה להזנת בעלי חיים, ובכך להשיג מספר מטרות: א. שיפור מצב הבריאות בחיות המשק (הקטנת/מניעת מחלות). ב. הגדלת חשיבות סגולותיו הרפואיות של פרי הרימון כמכלול. ג. פתרון אקולוגי לחומרי הלוואי של פרי הרימון.

אולם, הרימון הוא גידול עונתי, ואם רוצים להשתמש בקליפותיו כתוסף תזונתי לצורכי בריאות במשך כל השנה, צריך לשמר אותו. שיטות שימור שונות יכולות להילקח בחשבון כשמדובר בקליפות רימונים, ביניהן החמצה או ייבוש.

**מטרות המחקר: 1.** לבחון את הפוטנציאל הבריאותי של קליפות הרימון הטריות.

**2.** לבדוק כיצד שיטות שימור מקובלות משפיעות על נוגדי החמצון השונים בקליפות.

## שיטות וחומרים

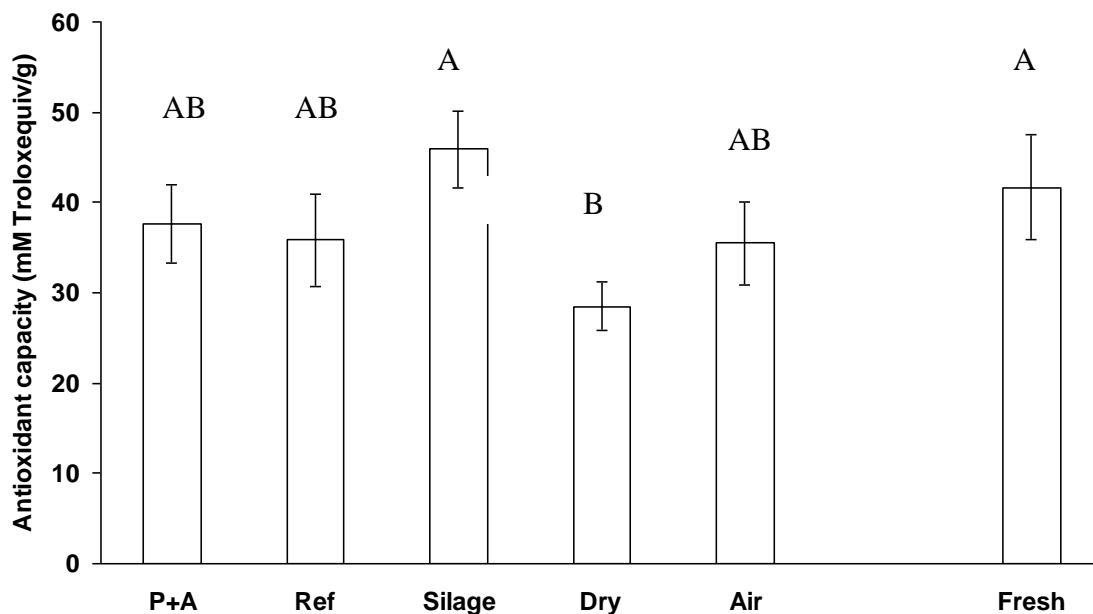
קליפות טריות של רימונים מזן Wonderful, ממפעל לקילוף פירות, שימשו אותנו במחקר הנוכחי. הקליפות הטריות שהכילו כ-10% גרגרים (טיפול P+A) שימשו לבחינת ההשפעה של טיפולי השימור והאחסון הבאים על רמת נוגדי החמצון השונים בקליפות: א. אחסון של שבוע בחדר קור (טיפול ref). ב. אחסון של שבוע אחד באוויר הפתוח (טיפול air). ג. ייבוש בתנור 60°C במשך 48 שעות (טיפול dry). ד. החמצה (טיפול silage). ה. קליפות ללא גרגרים (טיפול fresh) שימשו לבחינת התרומה של הגרגרים לתכונות נוגדות החמצון של הקליפות. בסוף כל טיפול, ולפני האנליזות הכימיות, הקליפות יובשו בהקפאה. חזרות ביולוגיות (3 עד 5) מתלכיד אקראי של 20 רימונים שימשו בכל טיפול. הקליפות מהטיפולים השונים אוחסנו בארון חשוך עד לטחינתם ולאנליזה שלהם.

פעילות נוגדת חמצון נקבעה ע"פ (Kerem et al., 2006b). קביעה כללית של פולי פנולים בוצעה ע"פ (Singleton et al., 1999). ריכוז פלבנואידים נקבע ע"פ (Jia et al., 1994). רמות הטנינים נמדדו ע"פ Broadhurst and Jones (1978) ו- Inoue and Hagerman (1988). אנליזה של פוניקליגין בוצעה כפי שתואר ע"י Tzulker וחבריה (2007). ריכוז ויטמין E (טוקופרול אלפא וגמה) נקבע ע"פ Tadmor וחבריו (2005).

כל המבחנים הסטטיסטיים one-way ANOVA following by Bonferroni post-hoc test, מבחן t מזווג, מבחן פירסון בוצעו באמצעות תוכנת SPSS 15.0.

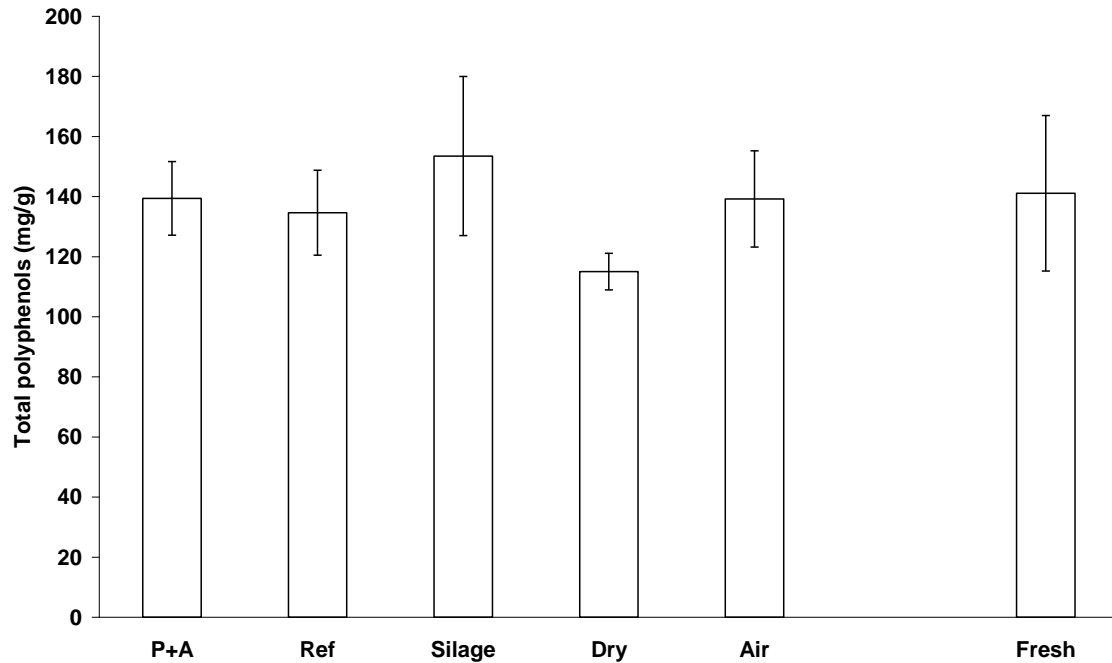
## תוצאות + דיון

השפעת שיטות שימור שונות על פוטנציאל נוגד חמצון בקליפות רימונים. השתמשנו במבחן נטרול רדיקלים חופשיים (ABTS) כדי להעריך את הפוטנציאל נוגד החמצון של הקליפות. כפי שעולה ממבחן one-way ANOVA, וכפי שנראה באיור 1, ייבוש בתנור (dry) משפיע לרעה על הפוטנציאל נוגד החמצון של הקליפות ( $F_{5,17} = 5.119, P < 0.005$ ). לקליפות ללא גרעינים ולתחמיץ קליפות יש פוטנציאל גבוה יותר מאשר ליתר הטיפולים.



איור 1: השפעת שיטות שימור שונות על הקיבולת נוגדת החמצון של קליפות רימונים. התוצאות מוצגות כממוצעים  $\pm$  סטיות תקן. האותיות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

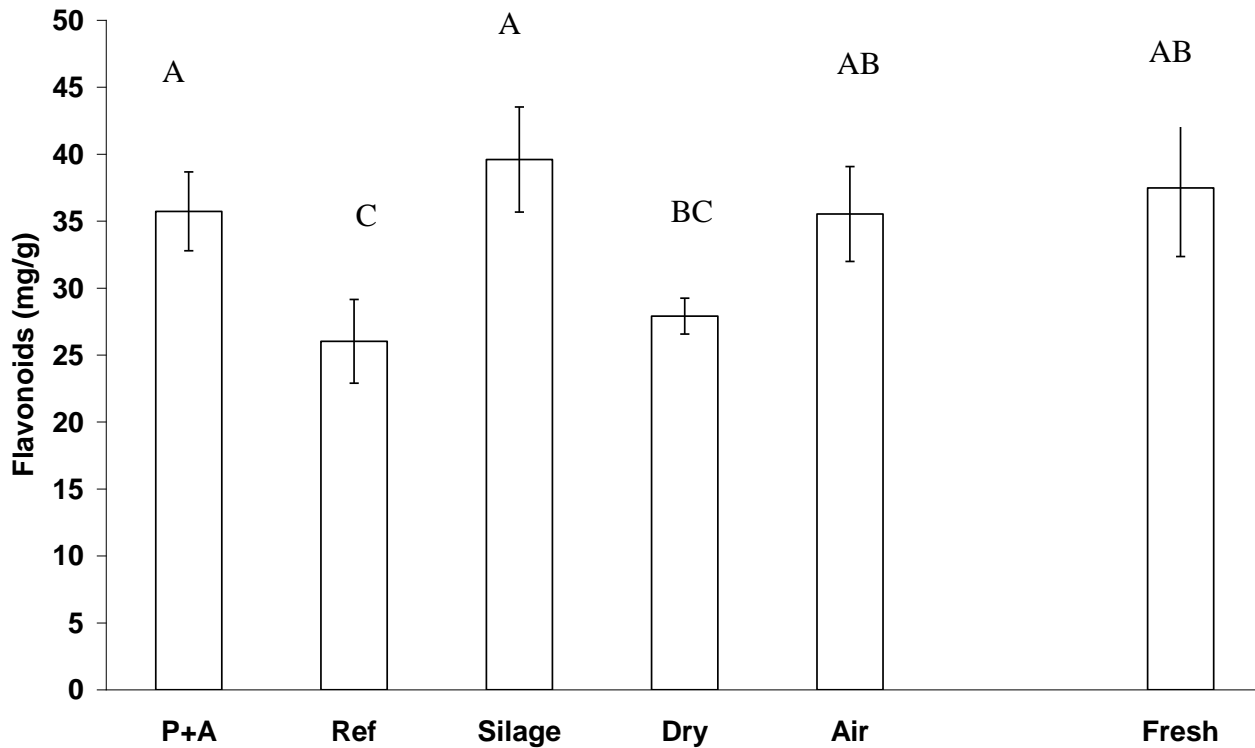
נהוג בד"כ כי הקיבולת נוגדת החמצון של פירות מיוחסת לתכולת הפוליפנולים שלהם. תכולת הפוליפנולים בקליפות הרימון במחקר שלנו נמצאה במתאם חיובי עם הקיבולת נוגדת החמצון שלהם ( $r=0.9$ ,  $p<0.0005$ ). בעוד שרוב הטיפולים לא השפיעו על תכולת הפוליפנולים (איור 2), הייבוש בתנור (dry) גרם לירידה ברמתם ( $F_{5,18} = 1.417$ ,  $p = 0.27$ ). ניתן לראות באופן בולט כי גרגרי הרימון (P+A) לא הוסיפו לריכוז הפוליפנולים שבקליפות (איור 2).



איור 2: השפעת שיטות שימור שונות על תכולת הפוליפנולים בקליפות רימונים. התוצאות מוצגות כממוצעים

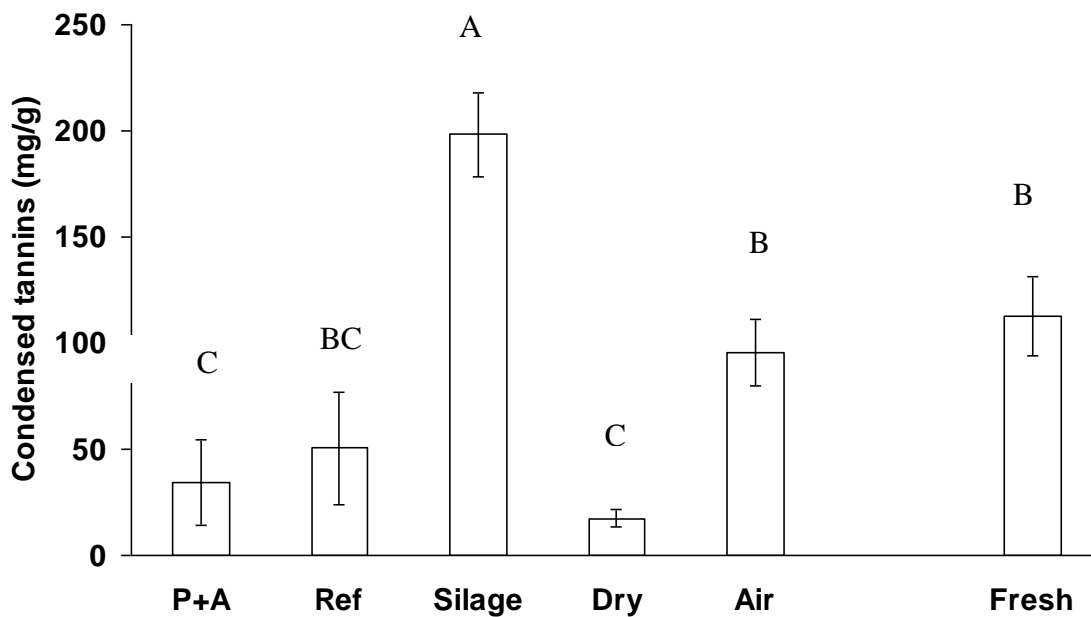
± סטיות תקן.

ההשפעה של שיטות שימור שונות על רמות הפלבנואידים בקליפות הרימון מוצגת באיור 3. כפי שניתן לראות, קירור וייבוש בתנור גרמו לירידה בריכוז של הפלבנואידים, בעוד שהאחסון באוויר וההחמצה לא השפיעו על רמתם ( $F_{5,16} = 8.205, p < 0.001$ ). ממצאים אלו מלמדים כי הפלבנואידים המצויים בקליפות הרימונים הם בעלי רגישות משתנה לטיפול שימור שונים. כפי שכבר הוזכר לגבי הפוליפנולים, גם במקרה של הפלבנואידים, הגרגרים לא תרמו לרמה הכללית הקיימת בקליפות.



איור 3: השפעת שיטות שימור שונות על ריכוז הפלבונואידים בקליפות רימונים. התוצאות מוצגות כמוצעים  $\pm$  סטיות תקן. האותיות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

קליפות רימונים עשירות בטנינים. טנינים נחלקים לשתי קבוצות, פריקים (hydrolysable) ומעובים (condensed). בעבר הראו כי לטנינים אפקטים מועילים ומזיקים במעלי גירה (Makkar 2003). ריכוזים מתונים של טנינים מעובים במנה (2-4% על בסיס חומר יבש) שפרו את יעילות הייצור של מעלי גירה ללא העלאת צריכת המזון (Aerts et al., 1999). במחקר הנוכחי, לקירור ולייבוש בתנור היו השפעות שליליות על רמת הטנינים המעובים (איור 4), לעומת תחמיץ הקליפות שבו הוכפלה רמת הטנינים הללו ( $F_{5,13} = 34.867, p < 0.0001$ ).



איור 4: השפעת שיטות שימור שונות על ריכוז הטנינים המעובים בקליפות רימונים. התוצאות מוצגות

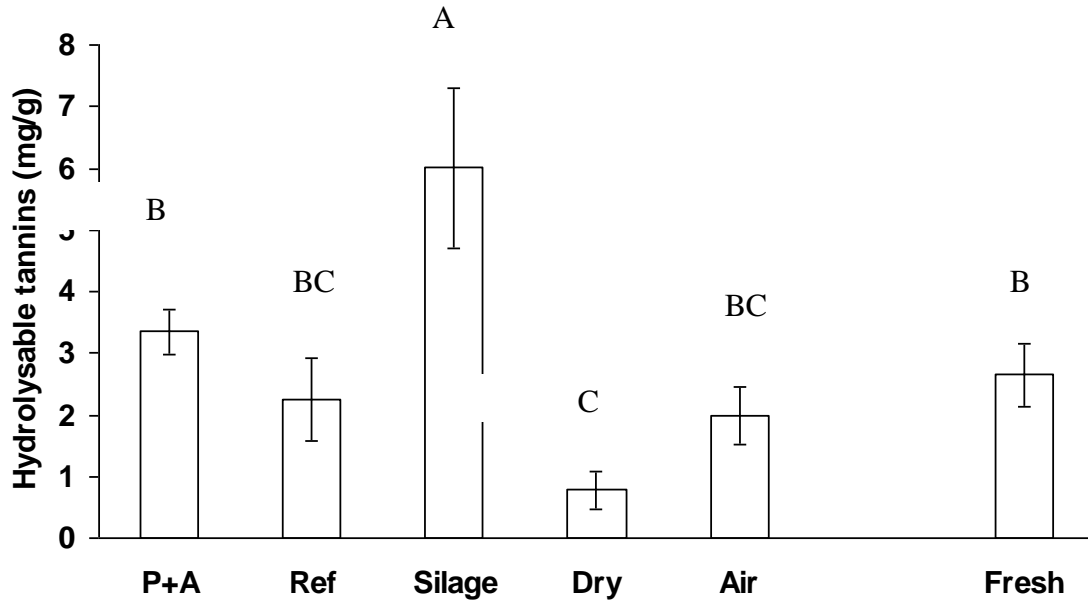
כממוצעים  $\pm$  סטיות תקן. האותיות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

הטנינים הפריקים נחשבים למרכיב הדומיננטי של הפעילות נוגדת החמצון של קליפות הרימונים (Gil et al.,

2000). לאחרונה, Tzulker וחבריה (2007) הראו מתאם חיובי בין טנינים פריקים לפעילות נוגדת חמצון

ולריכוז פוליפנולים. במחקר שלנו מצאנו כי לייבוש בתנור השפעה שלילית על רמת הטנינים הפריקים

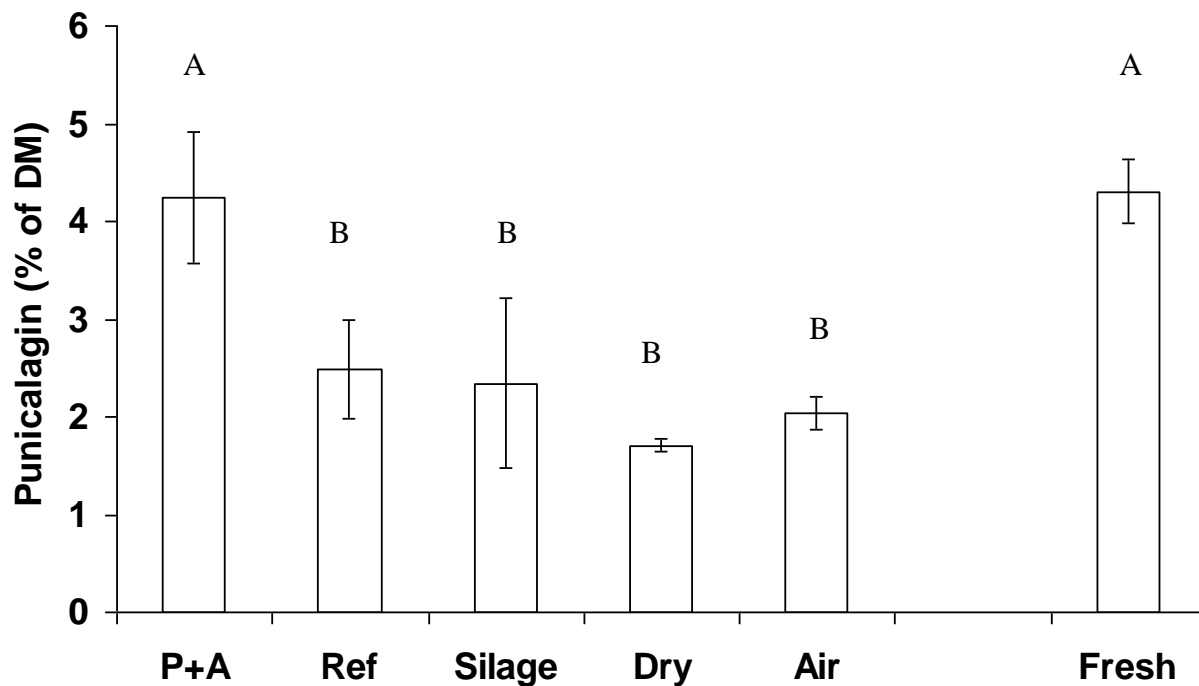
בקליפות הרימון (איור 5), בעוד שבתחמיץ הקליפות ריכוזם הוכפל ( $F_{5,16} = 22.814, p < 0.0001$ ).



איור 5: השפעת שיטות שימור שונות על ריכוז הטנינים הפריקים בקליפות רימונים. התוצאות מוצגות כממוצעים  $\pm$  סטיות תקן. האותיות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

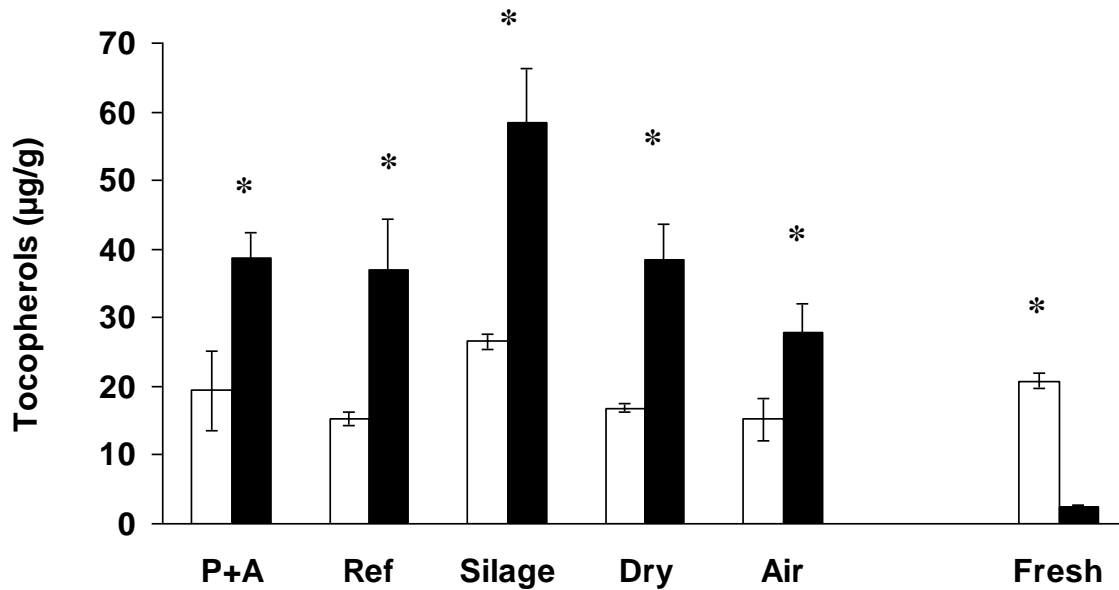
ברימונים, את קבוצת הטנינים הפריקים מרכיבות מולקולות שונות, שמתוכן punicalagin נחשבת לבעלת כ-50% מהפעילות נוגדת החמצון שבמיץ הרימון (Gil et al., 2000). מהטנינים הפריקים בקליפות הרימון punicalagin הוא בעל פעילות נוגדת חמצון ליפידים ו"לכידת" רדיקלים חופשיים המשמעותיות ביותר (Kulkarni et al., 2004), והתועלות שלו לבריאות הבקר עשויות להיות מאוד רלבנטיות (Adams et al., 2006). אנו השונו את השפעת תנאי השימור על תכולת punicalagin בקליפות. כפי שנראה באיור 6, כל תנאי השימור גרמו לידידה מובהקת בתכולת punicalagin בקליפות ( $F_{5,14} = 15.263, P < 0.0005$ ). התוצאות הנ"ל מלמדות כי שלא כמו במקרה של פוליפנולים, punicalagin רגיש יותר לשימור. ובאמת, לא נמצא כל מתאם בין punicalagin לכלל הפוליפנולים בעקבות השימור ( $r = 0.23, P = 0.329$ ). אולם, למרות הירידה המובהקת של punicalagin בקליפות, בכל שיטות השימור, עדיין קיים ריכוז לא מבוטל של punicalagin בקליפות הרימון (איור 6).





איור 6: השפעת שיטות שימור שונות על ריכוז punicalagin בקליפות רימונים. התוצאות מוצגות כממוצעים  $\pm$  סטיות תקן. האותיות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

הערכה של הפעילות נוגדת החמצון והתכולה הכללית של פוליפנולים במיץ רימונים ובמיצוי מהרימון השלם מצביעים על כך שפוליפנולים לא יכולים להסביר עלייה של פי 3 לערך של הפעילות נוגדת החמצון במיצוי מהרימון השלם (Tzulker et al., 2007). אנו הנחנו כי קיימים נוגדי חמצון שאינם פוליפנולים, שיכולים להסביר, לפחות באופן חלקי, את התופעה הזאת. באופן טבעי בדקנו נוכחות של ויטמין E בקליפות (איור 7), ומצאנו שתי צורות שלו  $\alpha$ -tocopherol ו  $\gamma$ -tocopherol. כמות ניכרת של  $\gamma$ -tocopherol מגיעה מהגרגרים, ובאמת, בקליפות ללא גרגרים (fresh) רמות ה-  $\gamma$ -tocopherol היו נמוכות באופן מובהק מאשר ביתר הטיפולים ( $F_{5,15} = 52.593, P < 0.0005$ ). שלא כמו המרכיבים הפוליפנוליים בקליפה שהיו רגישים לייבוש בתנור, רמות ה-  $\gamma$ -tocopherol היו יציבות בכל טיפולי השימור. יתרה מזאת, רמות ה-  $\gamma$ -tocopherol עלו באופן מובהק בתחמיץ הקליפות (איור 7).



איור 7: השפעת שיטות שימור שונות על ריכוז  $\alpha$ -tocopherol ו  $\gamma$ -tocopherol בקליפות רימונים. התוצאות מוצגות כממוצעים  $\pm$  סטיות תקן. הכוכביות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין שתי הצורות של ויטמין E בתוך אותו טיפול.

בהשוואה לטיפולים שהכילו גרגרים, בהם ריכוז ה- $\gamma$ -tocopherol היה גבוה באופן מובהק משל ה- $\alpha$ -tocopherol, בטיפול הביקורת fresh, שבו לא היו גרגרים, ריכוז ה- $\alpha$ -tocopherol היה גבוה באופן מובהק מזה של ה- $\gamma$ -tocopherol ( $t = 36.937, P < 0.0005$ ). לא היה רגיש לתנאי השימור השונים, אולם הבדלים מובהקים נרשמו בהשוואת ריכוזו בתחמיץ הקליפות לזה של הייבוש בתנור והקירור ( $F_{5,17} = 6.052, P < 0.002$ ).

**Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D., Heber, D., (2006).**

Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 980–985

**Aerts, R. J., Barry, T. N. and McNabb, W. C. (1999).** Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture Ecosystem & environment* **75**: 1-12.

**AOAC. 1990.** Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA.

**Broadhurst, R.B., Jones, W.T. (1978).** Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* **29**: 788–794.

**Chirase, N. K., Greene, L. W., Purdy, C. W., Loan, R. W., Auvermann, B. W., Parker, D. B., Walborg, E. F. Jr, Stevenson, D. E., Xu, Y. and Klaunig, J. E. (2004).** Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.* **65(6)**: 860-864.

**Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., (2000).** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 4581–4589.

**Gosselink, J.M.J., Dulphy, J.P., Poncet, C., Jailler, M., Tamminga, S., Cone, J.W., (2004).** Prediction of forage digestibility in ruminants using in situ and in vitro techniques. *Anim. Feed Sci. Tech.* **115**: 227-246.

**Inoue, K., Hagerman A., (1988).** Determination of gallotannin with rhodanine. *Anal. Biochem.* **169**: 363–369.

**Jia, Z.S., Tang, M.C., Wu, J.M., (1994).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food. Chem.* **64**: 559-559.

**Kahn, L. P. and Diaz-Hernandez, A. (2000).** Tannins with anthelmintic properties. In: *Tannins in Livestock and Human Nutrition*. Brooker, J.D (Ed).

[www.aciar.gov.au/publications/proceedings/92/index.htm](http://www.aciar.gov.au/publications/proceedings/92/index.htm)

**Kerem, Z., Bilkis, I., Flaishman, M.A., Sivan, L., (2006b).** Antioxidant activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by trans resveratrol, piceid, and a novel trans-stilbene from the root of Israeli Rumax bucephalophorus L. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1243-1247.

**Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., Divakar, S., (2004).** Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem.* **87**: 551–557.

**Makkar H.P.S., (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Res.* **49**: 241-256.

**Min, B. R., Attwood, G. T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J. S., Barry, T. N. and McNabb, W. C. (2002).** Lotus corniculatus condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Can. J. Microbiol.* **48(10)**: 911-921.

**NRC, 2001.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> Revised Edition. National Academy Press. Washington, DC, USA.

**Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178

**Tadmor, Y., King, S., Levi, A., Davis, A., Meir, A., Wasserman, B., Hirschberg, J., and Lewinsohn, E., (2005).** Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Res. Int.* **38**: 837–841.

**Tilley, J. M.A., Terry, R.A., (1963).** A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* **18**: 104–111.

**Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan I.,| Holland, D., Aviram, M., Amir, R., (2007).** Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 9559-9570.

**Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., (1991).** Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**: 3583– 3597.

**Vaya, J., Mahmood, S., Goldblum, A., Aviram, M., Volkova, N., Shaalan, A., Musa, R. and Tamir S. (2003).** Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry.* **62(1)**: 89-99.