

Contents of anti-nutritional factors in grains of new sorghum cultivars harvested at two vegetative stages and in two seasons of the year

Contenido de factores antinutricionales de granos de nuevos cultivares de sorgos cosechados en dos estados vegetativos y en dos épocas del año

Janhad L. Rodríguez¹, R., Lima¹, L. I., Marrero^{1,2*}, A., Castro^{1,2}, Sandra Hoedtke³ and J. Bindelle⁴

¹Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Carretera a Camajuaní, km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba

²UCLV. Centro de Investigaciones Agropecuarias, Santa Clara, Cuba

³University of Rostock, Chair of Animal Physiology and Animal Nutrition, Justus-von-Liebig-Weg 8, 18059 Rostock, Germany

⁴Department of Animal Husbandry, Gembloux Agricultural University, 2 Passage des De' porte' s, Gembloux 5030, Belgium

Email : raciello@uclv.edu.cu

Randomly selected grain samples from new sorghum cultivars (CIAP MC-04-12 and CIAP 132-05) harvested in different seasons of the year and at different vegetative stages in 2011 and 2012, were used for determining the contents of phenolic compounds (condensed tannins, total phenols, non-tannin phenols and tannin phenols), β -glucans, phytic acids and cyanogenic glucoside. Results demonstrated that the sorghum cultivar, the vegetative stage and the harvesting season of the grain influenced on the studied concentrations of anti-nutritional factors (ANFs). Tannin phenols in the grains were from 2.6 (CIAP MC-04-12) to 2.8 (CIAP 132R-05) times higher in the dry season regarding the rainy period. Condensed tannin concentrations represented 87 % of the tannin phenols, while the concentrations of β -glucans were from 2.7 to 4.8 times higher ($P < 0.001$) in the treatments based on CIAP 132R-05 than on those of CIAP MC-04-12. It is concluded that the two cultivars studied are low in all ANFs. This suggests a low effect of these ANFs on nutrient digestibility, energetic content and productive performance of monogastric animals receiving diets in which the grains of these cultivars are the main energy source.

Key words: *sorghum*, *anti-nutritional factors*, *grain vegetative stage*

A partir de muestras aleatoriamente seleccionadas de granos de nuevos cultivares de sorgo (CIAP MC-04-12 y CIAP 132R-05), cosechados en diferentes épocas del año y a diferentes estados vegetativos, en 2011 y 2012, se determinaron los contenidos de compuestos fenólicos (taninos condensados, fenoles totales, fenoles no taninos y fenoles taninos), β -glucanos, ácido fítico y glucósido cianogénico. Los resultados demostraron que el cultivar de sorgo, el estado vegetativo y la época de cosecha del grano influyeron en las concentraciones de los factores antinutricionales (FANs) estudiados. Los fenoles taninos contenidos en los granos fueron de 2.6 (CIAP MC-04-12) a 2.8 (CIAP 132R-05) veces superiores en la época poco lluviosa con respecto al período lluvioso. Las concentraciones de los taninos condensados representaron 87 % de los fenoles taninos, mientras que las concentraciones de β -glucanos fueron de 2.7 a 4.8 veces superiores ($P < 0.001$) en los tratamientos de CIAP 132R-05 que en los de CIAP MC-04-12. Se concluye que los dos cultivares estudiados son bajos en todos los FANs. Esto sugiere que sea bajo el efecto de estos FANs en la digestibilidad de nutrientes, el contenido energético y el comportamiento productivo de animales monogástricos que reciban dietas en las que el grano de estos cultivares sea la fuente principal de energía.

Palabras clave: *sorgo*, *factores antinutricionales*, *estado vegetativo del grano*

Introduction

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is one of the cereals showing higher adaptability in areas where the climate is not favorable. Therefore, it represents a good energy source for pigs (Mushandu *et al.* 2005). The ICRISAT reports that the sorghum guinea breed has a great tolerance to rainfall shortage or abundance, with high grain yields, resistance to bird attack, as well as adaptation characteristics (flexible panicles and glumes) and acceptable nutritive value making these properties a viable alternative for producing grains in tropical systems. The sorghum cultivar CIAP MC-04-12 is a new cultivar of the guinea breed obtained by selection at the Agricultural Research Center (CIAP, Santa Clara,

Introducción

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es uno de los cereales que muestra mayor adaptabilidad en áreas donde el clima no es favorable, por lo que representa una buena fuente de energía para los cerdos (Mushandu *et al.* 2005). El ICRISAT informa que la raza de sorgo guinea posee gran tolerancia a la escasez o abundancia de lluvias, con altos rendimientos del grano, resistencia al ataque de pájaros así como características en su adaptación (panículas flexibles y glumas) y aceptable valor nutritivo, propiedades que lo hacen una alternativa viable para producir granos en sistemas tropicales. El cultivar de sorgo CIAP MC-04-12 es un nuevo cultivar de la raza guinea, obtenido por selección en el Centro

Cuba). However, it is known that cereals and its by-products have in its composition a group of substances that affects the bioproductive performance and animal health (Castro *et al.* 2002). Consequently, the content of the main anti-nutritional factors present in grains of new sorghum cultivars harvested at two vegetative stages and in two seasons of the year in the central region of Cuba was established.

Materials and Methods

From randomly selected grain samples of the sorghum cultivars CIAP MC-04-12 and CIAP 132R-05, harvested in two seasons of the year and at different vegetative stages in 2011 and 2012, the anti-nutritional factors (ANFs) were determined by standardized methods at the universities of Hohenheim, in Germany and Lieja, in Belgium. The protocols described by Makkar *et al.* (2007) were used for the phenolic compounds (condensed tannins, total phenols, non-tannin phenols and tannin phenols), phytic acid and cyanogenic glucoside.

Phenols and tannins. The method used assumes the determination of four fractions: condensed tannins, total phenols, non-phenol tannins and phenol tannins. These essays are based on the oxidation-reduction principle and the utilization of the Folin-Ciocalteu reagent. Tannins are distinguished from non-tannins by the use of a solid matrix, polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). Total phenols are measured in a plant extract using the Folin-Ciocalteu methods, before and after the PVPP treatment. For condensed tannins the methods of butanol-HCl-Fe was used that shows anthocyanidines of pink color when the oxidative breaking off of the condensed tannins interflavones links occurs in the presence of acid minerals in alcoholic solutions at 95° C.

Phytic acid. Phytates were extracted with trichloroacetic acid and precipitated with ferric salt. The iron contents of the precipitate was spectrophotometrically determined and the phosphorus phytate content from this value. A constant in the molecular relationship of 4 Fe/6 P was assumed in the precipitate.

Cyanogenic glucoside. The method was based on the reaction of the hydrocyanic acid with potassium hydroxide for forming potassium cyanide reacting with the sodium picrate developing a red color compound. Color intensity is measured at 520 nm.

In addition, β -glucans were analyzed according the recommendations of Megazyme (2011). Samples are suspended and hydrated in a buffer of pH 6.5, and then incubated with the purified lichenase enzyme and filtered. An aliquot of the filtrate is next hydrolyzed with β -glucosidase. The D-glucose produced is measured with the glucose oxydase/peroxydase reagent.

Results from the chemical analyses were statistically processed in the general linear model (GLM) of SPSS

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 49, Number 4, 2015 de Investigaciones Agropecuarias (CIAP, Santa Clara, Cuba). Sin embargo se conoce que los cereales y sus subproductos tienen en su composición un grupo de sustancias que actúan en detrimento del comportamiento bioproductivo y la salud animal (Castro *et al.* 2002). Por ello, se determinó el contenido de los principales factores antinutricionales presentes en granos de nuevos cultivares de sorgos, cosechados en dos estados vegetativos y en dos épocas del año en la región de central de Cuba.

Materiales y Métodos

A partir de muestras aleatoriamente seleccionadas de granos de los cultivares de sorgo CIAP MC-04-12 y CIAP 132R-05, cosechados en diferentes épocas del año y a diferentes estados vegetativos, en 2011 y 2012, se determinaron los contenidos de los factores antinutricionales (FANs) por métodos estandarizados en las universidades de Hohenheim, en Alemania, y de Lieja, en Bélgica. Para los compuestos fenólicos (taninos condensados, fenoles totales, fenoles no taninos y fenoles taninos), el ácido fítico y glucósido cianogénico se emplearon los protocolos descritos por Makkar *et al.* (2007).

Fenoles y taninos. El método empleado asume la determinación de cuatro fracciones: taninos condensados, fenoles totales, taninos no fenoles y taninos fenoles. Estos ensayos se basan en el principio de oxidación-reducción y la utilización del reactivo de Folin-Ciocalteu. Los taninos se distinguen de no taninos mediante el uso de una matriz sólida, polivinil polipirrolidona (PVPP). Los fenoles totales se miden en un extracto de la planta, usando el método de Folin-Ciocalteu, antes y después del tratamiento con PVPP. Para los taninos condensados se emplea el método de butanol-HCl-Fe, que muestra antocianidinas de color rosa cuando ocurre la ruptura oxidativa de los enlaces interflavonas de los taninos condensados en presencia de minerales ácidos en soluciones alcohólicas a 95 °C.

Ácido fítico. Los fitatos se extrajeron con ácido tricloroacético y precipitados como sal férrica. El contenido de hierro del precipitado se determinó espectrofotométricamente y el contenido del fitato de fósforo, a partir de este valor. Se supuso en el precipitado una constante en la relación molecular de 4 Fe/6 P.

Glucósido cianogénico. El método se basó en la reacción del ácido cianhídrico con hidróxido de potasio para formar cianuro de potasio, que reacciona con el picrato de sodio, formando un compuesto de color rojo. La intensidad del color se mide a 520 nm.

En adición, los β -glucanos se analizaron según las recomendaciones del Megazyme (2011). Las muestras se suspenden e hidratan en un tampón de pH 6.5, entonces se incuban con la enzima lichenasa purificada y se filtran. Una alícuota del filtrado entonces se hidroliza con β -glucosidasa. La D-glucosa producida se mide con el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa.

Los resultados de los análisis químicos se procesaron estadísticamente en el modelo general lineal (GLM) del

21.0 for assessing the effects of the sorghum cultivar, the vegetative stage of the grain and the harvesting season of the grain on the variables studied following the model:

$$Y_{ijk} = \mu + SC_{i=1-2} + HS_{j=1-2} + GVS_{k=1-2} + SC \times HS + SC \times GVS + HS \times GVS + SC \times HS \times GVS + \varepsilon_{ijk}$$

with $SC_{i=1-2}$,

The sorghum cultivar (CIAP MC-04-12 vs. CIAP 132R-05)

$HS_{j=1-2}$

The harvesting season (rainy vs. dry)

$GVS_{k=1-2}$

The vegetative stage of grain at harvesting time (soft paste vs hard paste) $SC \times HS + SC \times GVS + HS \times GVS + SC \times HS \times GVS$

The interaction between the different factors and ε_{ijk} , the experimental error.

Results and Discussion

The contents of phenolic compounds shows great variation, depending on the harvesting time (table 1), in which stress situations as the dry period (Makkar *et al.* 2007) make the concentrations of these compounds (e.g. tannin phenols increase 2.66 (CIAP MC-04-12) or 2.87 (CIAP 132R-05) times more in the dry period than in the rainy period). Tannin contents evidenced that the two cultivars studied can be classified as low in tannins (Osuntogun *et al.* 1989) and show similar or lower levels than other Cuban sorghum cultivars (Castro *et al.* 2002). These results suggest

SPSS 21.0 para evaluar los efectos del cultivar de sorgo, el estado vegetativo del grano y la época de cosecha del grano en las variables estudiadas siguiendo el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + SC_{i=1-2} + HS_{j=1-2} + GVS_{k=1-2} + SC \times HS + SC \times GVS + HS \times GVS + SC \times HS \times GVS + \varepsilon_{ijk}$$

con, $SC_{i=1-2}$,

El cultivar de sorgo (CIAP MC-04-12 vs. CIAP 132R-05)

$HS_{j=1-2}$

La época de cosecha (lluvioso vs. poco lluvioso)

$GVS_{k=1-2}$

El estado vegetativo del grano al momento de la cosecha (pasta blanda vs. pasta dura) $SC \times HS + SC \times GVS + HS \times GVS + SC \times HS \times GVS$

La interacción entre los diferentes factores y ε_{ijk} , el error experimental

Resultados y Discusión

El contenido de compuestos fenólicos muestra gran variación, en dependencia del momento de cosecha (tabla 1), en el que situaciones de stress, como el período poco lluvioso (Makkar *et al.* 2007) hacen que las concentraciones de estos compuestos se incrementen (ej. fenoles taninos 2.66 (CIAP MC-04-12) o 2.87 (CIAP 132R-05) veces más en el período poco lluvioso que en el lluvioso). Los contenidos de taninos evidencian que los dos cultivares estudiados se pueden clasificar como bajos en taninos (Osuntogun *et al.* 1989) y muestran niveles similares o inferiores a otros cultivares cubanos de sorgo

Table 1. Effect of the sorghum cultivar, grain vegetative stage and harvesting season on the contents of phenolic compounds of grains of two sorghum cultivars

Treatments ^a		Condensed tannins	Total phenols	Non-tannins phenols	Tannins phenols
g/kg MS					
CIAP MC-04-12	PbLl	1.23	2.78	1.38	1.40
	PbS	3.56	8.32	4.15	4.17
	PdLl	1.54	3.52	1.75	1.77
	PdS	3.51	8.21	4.09	4.12
CIAP 132R-05	PbLl	0.99	2.19	1.09	1.11
	PbS	3.05	7.10	3.54	3.56
	PdLl	1.24	2.80	1.39	1.41
	PdS	3.02	7.07	3.51	3.53
ESM		0.218	0.518	0.259	0.259
P value ^b	SC	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	HS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	GVS	0.001	0.001	0.001	0.001
	SC×HS	0.002	0.002	0.002	0.002
	SC×GVS	0.772	0.781	0.781	0.781
	HS×GVS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	SC×HS×GVS	0.513	0.518	0.517	0.518

^aPbLl: soft paste in the rainy period; PbS: soft paste in dry period; PdLl: hard paste in the rainy period; PdS: hard paste in the dry period

^bP value: shows the significance of the main effects (SC, HS, GVS) and its interactions according to the general linear model.

that the effect of these is low (Duodu *et al.* 2003 and Mushandu *et al.* 2005) on nutrient digestibility, energetic contents and the productive performance of monogastric animals receiving diets in which the grain of these cultivars is the main energy source.

In addition, results show that condensed tannins represent 87 % of the tannin phenols. The sorghum cultivar as the grain vegetative stage affected ($P < 0.001$) the condensed tannin levels and other phenolic fractions. However, interdependence is evidenced between the harvesting season of the grain and its vegetative stage, as well as between the sorghum cultivar and the grain harvesting season in all the phenolic compounds.

The β -glucans of the sorghum cultivars studied regarding other cereals (Castro *et al.* 2002) allow its classification as of low in β -glucans (table 2). In view of the low contents of these substances, there must be no negative effect on the digestive nutrient utilization and on the productive performance of monogastric animals receiving diets in which the grain of these cultivars is the main energy source. Nonetheless, in spite of these low concentrations in both cultivars, the concentrations of β -glucans were from 2.7 to 4.8 times higher in the treatments based on CIAP 132-05 than in those of CIAP MC-04-12.

The contents of phytic acid are very variable in the sorghum and depend on the type of cultivar (Duodu *et al.* 2003). In our study the CIAP MC-04-12 cultivar showed 1.3-1.7 times less phytic acids regarding the CIAP 132R-05 cultivar. Also, there was effect ($P < 0.001$) of the grain vegetative stage and the grain harvesting season on the phytic acid contents (table 2). The concentrations of these substances in the studied cultivars classify them as cultivars low in phytic acid, though the highest part of the phosphorus contained in these grains will be more assimilable by the animals and its effect on protein digestibility and the immobilization of trace minerals will be minimum (Duodu *et al.* 2003).

The cyanogenic glucoside content is very variable in sorghum cultivars. Osuntogun *et al.* (1989) studying 15 sorghum cultivars used in human feeding found values between 8 and 38 mg/kg DM. The concentrations of cyanogenic glucoside in the studied cultivars (table 2) are within this range and present values far lower than the permissible limits in the diets (500 mg of cyanogenic glucoside/kg DM).

It is concluded that the two cultivars are low in all the ANFs studied, which allows suggesting a low effect of these ANFs on nutrient digestibility, energetic contents and the productive performance of monogastric animals receiving diets in which the grain of these cultivars is the main energy source. Nonetheless, there are differences between both cultivars regarding the ANFs concentrations and in the way in which the vegetative stage and the harvesting

(Castro *et al.* 2002). Estos resultados sugieren que sea bajo el efecto de estos (Duodu *et al.* 2003 y Mushandu *et al.* 2005) en la digestibilidad de nutrientes, el contenido energético y el comportamiento productivo de animales monogástricos que reciban dietas en las que el grano de estos cultivares sea la fuente principal de energía.

Además, los resultados muestran que los taninos condensados representan 87 % de los fenoles taninos. El cultivar de sorgo como el estado vegetativo del grano afectaron $P < 0.001$ los niveles de los taninos condensados y demás fracciones fenólicas. Aunque se evidencia una interdependencia entre la época de cosecha del grano y su estado vegetativo, así como entre el cultivar de sorgo y la época de cosecha del grano en todos los compuestos fenólicos.

Los contenidos de β -glucanos de los cultivares de sorgo estudiados con respecto al de otros cereales (Castro *et al.* 2002) permite clasificarlos como de bajo contenido en β -glucanos (tabla 2). Debido a los bajos contenidos de estas sustancias, no debe haber efecto negativo en el aprovechamiento digestivo de los nutrientes y en el comportamiento productivo de los animales monogástricos que reciban dietas en las que el grano de estos cultivares sea la fuente principal de energía. No obstante, a pesar de esas bajas concentraciones en ambos cultivares, las concentraciones de β -glucanos fueron de 2.7 a 4.8 veces superiores en los tratamientos de CIAP 132R-05 que los de CIAP MC-04-12.

Los contenidos de ácido fítico son muy variables en el sorgo y dependen del tipo de cultivar (Duodu *et al.* 2003). En nuestro estudio, el cultivar CIAP MC-04-12 mostró 1.3-1.7 veces menos de ácido fítico con respecto al cultivar CIAP 132R-05. Además, se observó efecto ($P < 0.001$) del estado vegetativo del grano y la época de cosecha del grano en los contenidos de ácido fítico (tabla 2). Las concentraciones de estas sustancias en los cultivares estudiados lo clasifican como cultivares bajos en ácido fítico, por lo que la mayor parte del fósforo contenido en estos granos será más asimilable por los animales, y el efecto de estos en la digestibilidad de la proteína y la inmovilización de minerales traza será mínima (Duodu *et al.* 2003).

El contenido de glucósido cianogénico es muy variable en los cultivares de sorgo. Osuntogun *et al.* (1989), al estudiar 15 cultivares de sorgo utilizados en la alimentación humana, encontró valores entre 8 y 38 mg/kg MS. Las concentraciones de glucósido cianogénico en los cultivares estudiados (tabla 2) están en este rango y presentan valores muy inferiores a los límites permisibles en las dietas (500 mg de glucósido cianogénico/kg MS).

Se concluye que los dos cultivares son bajos en todos los FANs estudiados, lo que sugiere que sea bajo el efecto de estos FANs en la digestibilidad de los nutrientes, el contenido energético y el comportamiento productivo de animales monogástricos que reciban dietas en las que el grano de estos cultivares sea la fuente principal de energía. No obstante, existen diferencias entre ambos cultivares, en cuanto a las concentraciones de los FANs

Table 2. Effect of the sorghum cultivar (SC), the grain vegetative stage (GVS) and the harvesting season (HS) on the contents of β -glucans, phytic acid and cyanogenic glucoside of grains of two sorghum cultivars

Treatments ^a		β -glucans	Phytic acid	Cyanogenic glucoside
		g/kg MS		mg/kg MS
CIAP MC-04-12	PbLI	0.59	9.05	11.4
	PbS	0.12	18.6	12.1
	PdLI	0.41	8.14	9.10
	PdS	0.23	17.4	9.37
CIAP 132R-05	PbLI	1.61	15.3	12.9
	PbS	0.56	23.8	13.2
	PdLI	1.20	13.8	10.9
	PdS	0.77	22.2	11.2
ESM		0.098	1.102	0.293
P value ^b	SC	<0.001	<0.001	<0.001
	HS	<0.001	<0.001	<0.001
	GVS	<0.001	<0.001	<0.001
	SC×HS	<0.001	<0.001	0.331
	SC×GVS	<0.001	0.005	0.011
	HS×GVS	<0.001	0.265	0.188
	SC×HS×GVS	<0.001	0.597	0.229

^a PbLI: soft paste in the rainy period; PbS: soft paste in dry period; PdLI: hard paste in the rainy period; PdS: hard paste in the dry period

^b P value: shows the significance of the main effects (SC, HS, GVS) and its interactions according to the general linear model.

season act in these cultivars.

y a la forma en que el estado vegetativo y la época de cosecha actúan en estos cultivares.

References

- Castro, A., Marrero, L., Valdiviá, M., Gabel, M. & Steingass, H., 2002. Contenido de factores antinutricionales del grano de sorgo de cuatro variedades cultivadas en Cuba. *Cuban J. Agric. Sci.* 36:31
- Duodu, K.G., Taylor, J.R.N., Belton, P.S. & Hamaker, B.R., 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38:117-131
- Makkar, H.P.S. Siddhuraju, P. & Becker, K. 2007. *Methods in molecular biology "Plant secondary metabolites"*. Humana Press. Totowa, New Jersey. p. 47-49
- Megazyme, 2011. Mixed-Linkage β -glucan assay procedure (K-BGL 07/145), Megazyme International Ireland, Wicklow, Irlanda. p. 15
- Mushandu, J., Chimonyo, M., Dzama, K., Makuza, S.M. & Mhlanga, F.N. 2005. Influence of sorghum inclusion level on performance of growing local Mukota, Large White and their F¹ crossbred pigs in Zimbabwe. *Animal Feed Sci. Technol.* 122:321
- Osuntogun, B.A., Adewusi, S.A., Ogundiwin, J.O. & Nwasike, C.C., 1989. Effect of cultivar, steeping, and malting on tannin, total polyphenol, and cyanide content of Nigerian sorghum. *Cereal Chem.* 66:87

Received: July 4, 2015