

Biological effect of tannins from four tropical tree species on *in vitro* ruminal fermentation indicators

Efecto biológico de taninos de cuatro especies arbóreas tropicales en indicadores de la fermentación ruminal *in vitro*

R. Rodríguez, Niurca González, J. Alonso, Yasmila Hernández and Yolaine Medina

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: rrodriguez@ica.co.cu

In order to estimate the *in vitro* biological effect of tannins within moringa (*Moringa oleifera* cv. Super Genius), mulberry (*Morus alba* Linn cv. Cubana), trichanthera (*Trichanthera gigantea*) and leucaena (*Leucaena leucocephala* cv. Perú) foliage meals on ruminal fermentation indicators, the *in vitro* gas production was measured and the kinetics parameters were estimated according to Gompertz model, the *in vitro* degradability of the neutral detergent fiber (NDF) and the nitrogen. The biological effect was estimated as the quotient between the value of each indicator when the tannins are inactive and active, expressed as increase percent. A random block design was applied, with four incubations as replicates and the biological effect of tannins as treatment. At the beginning of fermentation (4h), the trichanthera tannins had little effect on gas production ($P < 0.05$). At 12h, the mulberry and moringa tannins showed the lowest biological effects, while those of leucaena and trichanthera the highest ($P < 0.01$). After 24 h of incubation, the moringa and leucaena tannins had similar effects and lower to the trichanthera tannins ($P < 0.001$). From 48 h, the performance of the biological effect of tannins was trichanthera > leucaena > moringa > mulberry ($P < 0.001$). There was only moderate biological effect on the kinetic parameters for leucaena and trichanthera tannins ($P < 0.001$). Only the trichanthera tannins showed effect on the organic matter degradability (12%) and NDF (17.3%, $P < 0.01$). The leucaena tannins had moderate biological effect in the NH_3 concentration (11.3 %). The highest effects were observed for trichanthera tannins (29.4%, $P < 0.001$). It is concluded that trichanthera tannins showed higher biological effect on the analyzed ruminal fermentation indicators, while in leucaena tannins were more moderate; those of moringa and mulberry did not influence on the nutritional value of them.

Key words: *Moringa oleifera*, *Trichanthera gigantea*, *Morus alba*, *Leucaena leucocephala*, tannins

Introduction

Shrubs are every time more frequent in the feeding systems of ruminants in the tropical and subtropical region (Melesse 2012). The tree species are important due to their high protein content, their contribution with easy fermentation carbohydrates and fiber of better degradability, as well as their positive effect on the use of nitrogen (N) within the rumen, elements which allow to increase the productivity of animals fed with grasses (Rubanza *et al.* 2007). However, these plants also contain secondary metabolites that may decrease their nutritional value and even affect the animal which intake them. Among the secondary compounds that are more frequently in the shrubs plants are tannins, which can be beneficial or harmful depending on their concentration, nature and reactivity (Alexander *et al.* 2008).

Para estimar el efecto biológico *in vitro* de los taninos de harinas de follaje de moringa (*Moringa oleifera* cv. Super Genius), morera (*Morus alba* Linn cv. Cubana), trichanthera (*Trichanthera gigantea*) y leucaena (*Leucaena leucocephala* cv. Perú) en indicadores de la fermentación ruminal, se midió la producción de gas *in vitro* y se estimaron los parámetros cinéticos según modelo de Gompertz, la degradabilidad *in vitro* de la fibra neutro detergente (FND) y del nitrógeno. El efecto biológico se estimó como el cociente entre el valor de cada indicador cuando los taninos están inactivos y activos, expresado como por ciento de incremento. Se aplicó diseño de bloques al azar, con las cuatro incubaciones realizadas como réplicas y el efecto biológico de los taninos como tratamiento. Al inicio de la fermentación (4 h), los taninos de trichanthera tuvieron poco efecto en la producción de gas ($P < 0.05$). A las 12 h, los taninos de morera y moringa mostraron los menores efectos biológicos, mientras que los de leucaena y trichanthera los mayores ($P < 0.01$). Luego de 24 h de incubación, los taninos de moringa y leucaena tuvieron efectos similares e inferiores a los taninos de trichanthera ($P < 0.001$). A partir de las 48 h, el comportamiento del efecto biológico de los taninos fue trichanthera > leucaena > moringa > morera ($P < 0.001$). Solo hubo efecto biológico moderado en los parámetros cinéticos para los taninos de leucaena y trichanthera ($P < 0.001$). Solo los taninos de trichanthera mostraron efecto en la degradabilidad de la materia orgánica (12 %) y la FND (17.3 %, $P < 0.01$). Los taninos de leucaena tuvieron efecto biológico moderado en la concentración de NH_3 (11.3 %). Los mayores efectos se observaron para los taninos de trichanthera (29.4 %, $P < 0.001$). Se concluye que los taninos de trichanthera mostraron mayor efecto biológico en los indicadores de la fermentación ruminal analizados, mientras que en los taninos de leucaena fueron más moderados; los de moringa y morera no influyeron en el valor nutritivo de ellas.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, *Trichanthera gigantea*, *Morus alba*, *Leucaena leucocephala*, taninos

Introducción

Las arbustivas son cada vez más frecuentes en los sistemas de alimentación de los rumiantes en la región tropical y subtropical (Melesse 2012). Las especies arbóreas se destacan por su alto contenido de proteína, su aporte en carbohidratos de fácil fermentación y fibra de mejor degradabilidad, así como por su efecto positivo en la utilización del nitrógeno (N) en el rumen, elementos que permiten incrementar la productividad de los animales que se alimentan de pastos (Rubanza *et al.* 2007). Sin embargo, estas plantas también contienen metabolitos secundarios que pueden disminuir su valor nutritivo y afectar, incluso, al animal que las consume. Entre los compuestos secundarios que más frecuentemente están presentes en las plantas arbustivas se encuentran los taninos, que pueden beneficiosos o perjudiciales según su concentración, naturaleza y

The *in vitro* gas production technique allows quantifying the effect of these secondary compounds on the ruminal microbial fermentation, by incubating the substrates to evaluate, alone or in the presence of polyethyleneglycol (PEG), chemical compound of high affinity by tannins. The ability of PEG to join and inactivate the activity of these secondary compounds, without affecting the ruminal microbial activity (Makkar *et al.* 1995), is a simple and reproducible tool to quantify the effect of these compounds, not only on gas production, but in other fermentation indicators and nutritional value of substrates (Rodríguez *et al.* 2014a).

This technique allows estimating the magnitude of the effect of these secondary metabolites on the ruminal fermentation of plants which contain them, without having to characterize the chemical nature of them nor determine their concentration (Rodríguez *et al.* 2014a). The objective of this study was to estimate the *in vitro* biological effect (BE) of tannins within moringa (*Moringa oleifera* cv. Super Genius), mulberry (*Morus alba* Linn cv. Cubana), trichanthera (*Trichanthera gigantea*) and leucaena (*Leucaena leucocephala* cv. Peru) foliage meal on ruminal fermentation indicators.

Materials and Methods

Plant material. The foliage meals of tropical tree species were evaluated: moringa (*M. oleifera* L, cv. Super Genius), mulberry (*M. alba* Linn cv. Cubana), trichanthera (*T. gigantea* Humboldt et Bonpland, Ness) and leucaena (*L. leucocephala* cv. Perú). The four species were collected during October, 2012, in experimental areas from the Instituto de Ciencia Animal (ICA), located in San José de las Lajas, Cuba. Mainly young leaves and stems were collected from random plants. Every plant used in sampling had several years of establishment in a typical red ferrallitic soil (Hernández *et al.* 1999), without irrigation and fertilization, except those of *M. oleifera* that had only ten months of establishment.

The plant material was collected, at a rate of around 200 g of fresh matter per each tree until obtaining, around, 2 kg from each species. All the collected material was dried for 72 h, inside a forced air oven, with a regulated temperature (60 °C). Later, it was grounded in a hammer mill, until reaching a particle size of 1 mm. Later, it was properly stored in sealed nylon bags.

Experimental procedure. The *in vitro* technique of gas production in glass bottles, described by Theodorou *et al.* (1994), was applied. An amount of 1.0 g of dry matter (DM) of each shrub was incubated in bottles of 100 mL, in a culture medium (Menke and Steingass 2015) and an inoculum of ruminal microorganisms, in a proportion of 0.20 regarding the total volume of incubation (80 mL). The evaluated substrates were incubated alone or with 0.5 g of PEG to inactivate

reactividad (Alexander *et al.* 2008).

La técnica *in vitro* de producción de gas permite cuantificar el efecto de estos compuestos secundarios en la fermentación microbiana ruminal, al incubar los sustratos a evaluar, solos o en presencia de polietilenglicol (PEG), compuesto químico de alta afinidad por los taninos. La capacidad del PEG para unirse e inactivar la actividad de estos compuestos secundarios, sin que su presencia afecte la actividad microbiana ruminal (Makkar *et al.* 1995), es una herramienta simple y reproducible para cuantificar el efecto de estos compuestos, no solo en la producción de gas, sino en otros indicadores de la fermentación y el valor nutritivo de los sustratos (Rodríguez *et al.* 2014a).

Esta técnica permite estimar la magnitud del efecto de estos metabolitos secundarios en la fermentación ruminal de las plantas que los contienen, sin necesidad de caracterizar la naturaleza química de los mismos ni determinar su concentración (Rodríguez *et al.* 2014a). Este trabajo tuvo como objetivo estimar el efecto biológico (EB) *in vitro* de los taninos de harinas de follaje de moringa (*Moringa oleifera* cv. Super Genius), morera (*Morus alba* Linn cv. Cubana), trichanthera (*Trichanthera gigantea*) y leucaena (*Leucaena leucocephala* cv. Perú) en indicadores de la fermentación ruminal.

Materiales y Métodos

Material vegetal. Se evaluaron las harinas de follaje de las especies arbóreas tropicales: moringa (*M. oleifera* L, cv. Super Genius), morera (*M. alba* Linn cv. Cubana), trichanthera (*T. gigantea* Humboldt et Bonpland, Ness) y leucaena (*L. leucocephala* cv. Perú). Las cuatro especies se recolectaron durante octubre de 2012 en las áreas experimentales del Instituto de Ciencia Animal (ICA), ubicado en San José de las Lajas, Cuba. Se recolectaron, fundamentalmente, hojas y tallos jóvenes de plantas tomadas al azar. Todos los ejemplares muestreados tenían varios años de establecimiento en suelo ferralítico rojo típico (Hernández *et al.* 2015), sin riego ni fertilización, excepto los de *M. oleifera*, que tenían solo diez meses de establecimiento.

El material vegetal se recolectó, a razón de unos 200 g de materia fresca por ejemplar hasta obtener, aproximadamente, 2 kg de cada especie. Todo el material recolectado se secó durante 72 h, en estufa de aire forzado, con temperatura regulada (60 °C). Luego, se molió en molino de martillo, hasta alcanzar tamaño de partícula de 1 mm. Posteriormente, se conservó de manera adecuada en bolsas de nailon selladas.

Procedimiento experimental. Se aplicó la técnica *in vitro* de producción de gas en botellas de vidrio, descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se incubó 1.0 g de materia seca (MS) de cada arbustiva en botellas de 100 mL, en medio de cultivo (Menke y Steingass 1988) y un inóculo de microorganismos ruminales, en proporción de 0.20 con respecto al volumen total de incubación (80 mL). Los sustratos evaluados se incubaron solos o con 0.5 g de

tannins. In each case, four bottles (repetitions) were incubated. Four control bottles were also incubated without substrate to determine the gas contribution of the microbial inoculum.

The inoculum used was the ruminal content of two cows with cannula in the rumen, fed *ad libitum* with grasses forage and free access to water and mineral salts. The ruminal content of each animal was collected before offering the morning food. Later, it was kept in closed thermos until getting to the lab, where it was filtered with several layers of gauze and the two inocula were mixed in equal proportions. During the process, the temperature of the inoculum was 39 ± 1 °C. The anaerobiosis conditions were kept through continuous flow of CO₂. The bottles were sealed and incubated in a bath at a controlled temperature (39 °C). That moment was considered as the starting time of incubation.

Gas production was measured at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 and 96 h using a manometer HD8804, connected to a pressure calibrator TP804 (DELTA OHM, Italy). After each measuring, the gas was released until the external pressures were equal to the internal pressure of the bottles. The volume of gas was estimated using the pressure data of a previously established equation of linear regression (Rodríguez *et al.* 2013).

The volume of gas was expressed by grams of incubated organic matter (incOM). In order to estimate the kinetics of gas production, the single-phased model of Gompertz was used (parameter A; asymptote when $t = \infty$; mL g⁻¹ incOM):

$$Y = A * \text{Exp}(-B * \text{Exp}(-C * t))$$

Besides, the maximum speed of gas production was estimated (Vmax; mL g⁻¹ incOM h⁻¹), when substituting Tvmax (value of the inflexion point of the sigmoidal model) in the first derivative of the model.

At the end of incubation (hour 96), the bottles were opened and its content was filtered through nylon bags. A sample of the filtrate was preserved to subsequently determine the NH₃ concentration. The bags with the fermentation residues were dried for 72 h in a forced air oven, with a regulated temperature (60 °C). The IVDNDF was determined using the gravimeter method as the difference between the neutral detergent fiber (NDF) within the incubated substrate and the solid residue of fermentation (96 h), divided by the NDF incubated in each bottle, respectively (Blümmel *et al.* 1997).

Metabolizable energy (ME) and the digestibility of organic matter (DOM) of the evaluated substrates, at 24 h, were estimated through the equations proposed by Menke *et al.* (1979):

$$\text{ME (MJ kg}^{-1} \text{ DM)} = 2.20 + 0.136 \text{ GP24h} + 0.057 \text{ CP}$$

$$\text{DOM (\%)} = 14.88 + 0.889 \text{ PG24h} + 0.45 \text{ CP}$$

Where,

GP24h is the volume of gas produced at 24 h (mL • 200 g⁻¹ incubated DM)

CP is the crude protein expressed in percent

Chemical analysis. The DM, organic matter (OM)

PEG para inactivar los taninos presentes. En cada caso, se incubaron cuatro botellas (repeticiones). También se incubaron cuatro botellas blancas, sin sustrato, para conocer el aporte de gas del inóculo microbiano.

Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de dos vacas canuladas en rumen, alimentadas *ad libitum* con forraje de gramíneas y libre acceso al agua y a sales minerales. El contenido ruminal de cada animal se recolectó antes de ofrecer el alimento en la mañana. Luego, se conservó en termos cerrados hasta llegar al laboratorio, donde se filtró mediante varias capas de gasa y se mezclaron los dos inóculos en proporciones iguales. Durante el proceso, se mantuvo la temperatura de los inóculos en 39 ± 1 °C. Las condiciones de anaerobiosis se conservaron mediante flujo continuo de CO₂. Las botellas se sellaron y se incubaron en baño a temperatura controlada (39 °C). Se tomó ese momento como la hora cero de la incubación.

La producción de gas se midió a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 y 96 h por medio de un manómetro HD8804, acoplado a un calibrador de presión TP804 (DELTA OHM, Italy). Después de cada medición, se liberó el gas hasta igualar las presiones externa e interna de las botellas. Se estimó el volumen de gas a partir de los datos de presión mediante una ecuación de regresión lineal pre-establecida (Rodríguez *et al.* 2013).

El volumen de gas se expresó por gramo de materia orgánica incubada (MOinc). Se utilizó el modelo monofásico de Gompertz para estimar el potencial de producción de gas (parámetro A; asíntota cuando $t = \infty$; mL g⁻¹ MOinc):

$$Y = A * \text{Exp}(-B * \text{Exp}(-C * t))$$

Además, se estimó la velocidad máxima de producción de gas (Vmáx; mL g⁻¹ MOinc h⁻¹), al sustituir Tv máx (valor del punto de inflexión del modelo sigmoidal) en la primera derivada del modelo.

Al finalizar la incubación (hora 96), se abrieron las botellas y su contenido se filtró mediante bolsas de nailon. Se preservó una muestra del filtrado para posteriormente determinar la concentración de NH₃. Las bolsas con los residuos de la fermentación se secaron durante 72 h en una estufa de aire forzado con temperatura regulada (60 °C). Se determinó por gravimetría la DIVFND, como la diferencia entre la fibra neutro detergente (FND) en el sustrato incubado y en el residuo sólido de la fermentación (96 h), dividido por la FND incubada en cada botella, respectivamente (Blümmel *et al.* 1997).

La energía metabolizable (EM) y la digestibilidad de la MO (DMO) de los sustratos evaluados, a las 24 h, se estimaron a partir de las ecuaciones propuestas por Menke *et al.* (1979):

$$\text{EM (MJ kg}^{-1} \text{ MS)} = 2.20 + 0.136 \text{ PG24h} + 0.057 \text{ PB}$$

$$\text{DMO (\%)} = 14.88 + 0.889 \text{ PG24h} + 0.45 \text{ PB}$$

Donde,

PG24h es el volumen de gas producido a las 24 h (mL • 200 g⁻¹ MS incubada)

PB es la proteína bruta expresada en por ciento

and CP were determined according to AOAC (1995). The NDF was obtained by the procedure described by van Soest *et al.* (1991). In addition the content of DM and NDF was determined in the solid residues of fermentation. The analyses of ammonia were carried out according to Conway (1957).

Estimation of BE of tannins. It is known as the tannins BE the extent in which these compounds can affect a ruminal fermentation indicator of substrates (Rodríguez *et al.* 2014a). The BE is estimated as the quotient between the value of the indicator, when tannins are inactive (incubated substrates in the presence of PEG) and when are active (substrates incubated alone) (Makkar *et al.* 1995).

In this research, the tannins BE of shrubs was estimated for each of the indicators that were selected and expressed as the increase (%) of these, when inactivating tannins with PEG, regarding to the values obtained for the plant with all its active tannins (Makkar *et al.* 1993), according to the equation:

$$BE (\%) = \left(\frac{\text{Measured indicator (In presence of PEG)}}{\text{Measured indicator (In absence of PEG)}} \times 100 \right) - 100$$

The BE in the indicators gas production, gas production potential, maximum speed of *in vitro* gas production, the NDF and the OM degradability, ME and ammonia concentration was evaluated.

Statistical analysis. A random blocks experimental design was used, in which the four incubations performed in the time (replications) were considered as blocks and the tannins biological effect of the evaluated tree species in each fermentation indicator as treatment. The results were analyzed by ANOVA by means of the InfoStat statistical package (Di Rienzo *et al.* 2010). When differences ($P < 0.05$) were found, treatment means were compared using the multiple range test of Duncan (1955).

Results and Discussion

The results of chemical composition, gas production, kinetic parameters, chemical and gravimetric indicators of fermentation of the four shrubs were previously reported (Rodríguez *et al.* 2014b). In this study only the biological effects of tannins of these plants are informed on the previously reported indicators.

Table 1 shows the results of tannins BE of shrubs evaluated in the gas production and two kinetic indicators of the *in vitro* fermentation. At the start of the fermentation (hour 4), the highest effects on gas production were observed in leucaena and moringa ($P < 0.05$), although the moringa effect not differ from the mulberry. The trichanthera tannins had lower effect, and also did not differ from those of mulberry. However, at 8 h of incubation all tannins showed similar biological effect ($P > 0.05$). At 12 h of incubation, the

Análisis químico. Se determinó MS, materia orgánica (MO) y PB, según AOAC (1995). La FND se obtuvo mediante el procedimiento descrito por van Soest *et al.* (1991). También se determinó el contenido de MS y FND en los residuos sólidos de la fermentación. Los análisis de amoníaco se realizaron según Conway (1957).

Estimación del EB de los taninos. Se conoce como EB de los taninos la magnitud en que estos compuestos pueden afectar un indicador de la fermentación ruminal de los sustratos (Rodríguez *et al.* 2014a). El EB se estima como el cociente entre el valor de dicho indicador, cuando los taninos están inactivos (sustratos incubados en presencia de PEG) y cuando están activos (sustratos incubados solos) (Makkar *et al.* 1995).

En este trabajo, el EB de los taninos de las arbustivas se estimó para cada uno de los indicadores que se seleccionaron y se expresó como el incremento (%) de estos, al inactivar los taninos con PEG, respecto a los valores que se obtuvieron para la planta con todos sus taninos activos (Makkar *et al.* 1993), según la ecuación:

$$EB (\%) = \left(\frac{\text{Indicador medido (En presencia de PEG)}}{\text{Indicador medido (En ausencia de PEG)}} \times 100 \right) - 100$$

Se evaluó el EB en los indicadores: producción de gas, potencial de producción de gas, velocidad máxima de producción de gas *in vitro*, degradabilidad de la FND y la MO, EM y concentración de amoníaco.

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, en el que se consideraron como bloques las cuatro incubaciones realizadas en el tiempo (réplicas) y como tratamiento, el efecto biológico de los taninos de las especies arbóreas evaluadas en cada indicador de la fermentación. Los resultados se analizaron por ANOVA mediante el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2010). Cuando se encontraron diferencias ($P < 0.05$), las medias de los tratamientos se compararon por la dócima de rangos múltiple de Duncan (1955).

Resultados y Discusión

Los resultados de composición química, producción de gas, parámetros cinéticos, indicadores químicos y gravimétricos de la fermentación de las cuatro arbustivas se informaron anteriormente (Rodríguez *et al.* 2014b). En este estudio solo se informan los efectos biológicos de los taninos de estas plantas en los indicadores informados previamente.

En la tabla 1 se muestran los resultados de EB de los taninos de las arbustivas evaluadas en la producción de gas y dos indicadores cinéticos de la fermentación *in vitro*. Al inicio de la fermentación (hora 4), los mayores efectos en la producción de gas se observaron en leucaena y moringa ($P < 0.05$), aunque el efecto de moringa no difirió del de morera. Los taninos de trichanthera tuvieron efecto menor, y tampoco difirieron de los de morera. Sin embargo, a las 8 h de incubación todos los taninos mostraron similares efectos

Table 1. Biological effect (%) of tannins of the four tropical shrubs evaluated on gas production, gas production potential and the maximum speed of *in vitro* gas production

Species	Biological effect (%)								
	Gas production							Kinetic parameters	
	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Potential	Vmax
Moringa	29.9 ^{bc}	16.4	11.2 ^a	10.7 ^b	9.1 ^b	8.5 ^b	7.9 ^b	7.2 ^b	12.6 ^b
Mulberry	14.2 ^{ab}	12.2	6.4 ^a	0.1 ^a	0.4 ^a	0.2 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a	0.01 ^a
Trichanthera	2.9 ^a	15.6	23.3 ^b	27.9 ^c	39.8 ^d	39.1 ^d	37.2 ^d	18.2 ^c	38.1 ^d
Leucaena	36.8 ^c	30.9	24.9 ^b	16.4 ^b	18.4 ^c	15.5 ^c	14.3 ^c	14.8 ^c	24.4 ^c
SE	6.3	5.0	3.2	2.4	2.2	1.0	1.3	1.4	1.8
Signif.	0.0168	0.1011	0.007	0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

^{abcd}Different letters indicate differences between treatments in a same column at $P < 0.05$ (Duncan 1955)

mulberry and moringa tannins showed the lower BE, while those of leucaena and trichanthera produced the highest ($P < 0.01$).

At 24h of incubation is not observed BE of mulberry tannins on the *in vitro* gas production. The moringa and leucaena tannins had similar and lower effects than those of trichanthera ($P < 0.001$). From 48 hours and until the end of the incubation, mulberry tannins either had BE on gas production. The BE of tannins was the following: trichanthera > leucaena > moringa > mulberry ($P < 0.001$).

The reduction of the biological effect in time for the moringa, leucaena and mulberry tannins could be related with the presence of hydrolysable tannins. The hydrolysable tannins could be degraded by the action of ruminal microorganisms during the first incubation hours, which would explain the BE decrease in time (Rodríguez *et al.* 2015). The increase in time of the magnitude of the BE of trichanthera tannins may indicate that the tannins in this shrub are linked to the insoluble fraction of plant material.

Respect to the BE in the evaluated kinetic parameters, mulberry tannins do not affect the potential of gas *in vitro* production of this shrub, while those of moringa had lower effect on this parameter. A moderate BE for trichanthera and leucaena tannins, which did not differ between them ($P < 0.001$) was appreciated. Similarly, mulberry tannins do not affect the gas production Vmax. The effect of moringa tannins on this parameter was moderate and the higher BE were observed for leucaena and trichanthera tannins. The latter species showed the highest effects ($P < 0.001$).

There is available information about the tannins content of the four shrubs species evaluated (Scull 2004, Garcia *et al.* 2008, Bakhshwain *et al.* 2010 and Pedraza *et al.* 2013). However, it is little known about their effects on ruminal fermentation. Getachew *et al.* (2002) studied the gas production of 39 tropical shrub species, when incubate them with and without PEG.

These authors observed a positive correlation ($r = 0.76$; $P < 0.001$) between the BE on gas production and the tannins content of the samples. However, the

biológicos ($P > 0.05$). A las 12 h de incubación, los taninos de morera y moringa mostraron los menores EB, mientras que los de leucaena y trichanthera produjeron los mayores ($P < 0.01$).

A las 24 h de incubación no se constató EB de los taninos de morera en la producción de gas *in vitro*. Los taninos de moringa y leucaena tuvieron efectos similares e inferiores al de los de trichanthera ($P < 0.001$). A partir de las 48 h y hasta el final de la incubación, los taninos de morera tampoco tuvieron EB en la producción de gas. El EB de los taninos fue el siguiente: trichanthera > leucaena > moringa > morera ($P < 0.001$).

La reducción del efecto biológico en el tiempo para los taninos de moringa, morera y leucaena pudo estar relacionada con la presencia de taninos hidrolizables. Los taninos hidrolizables se pudieron degradar por la acción de los microorganismos ruminales durante las primeras horas de incubación, lo que explicaría la disminución del EB en el tiempo (Rodríguez *et al.* 2015). El incremento en el tiempo de la magnitud del EB de los taninos de trichanthera puede indicar que los taninos presentes en esta arbustiva están ligados a la fracción insoluble del material vegetal.

Respecto al EB en los parámetros cinéticos evaluados, los taninos de morera no afectaron el potencial de producción de gas *in vitro* de esta arbustiva, mientras que los de moringa tuvieron efecto bajo en este parámetro. Se apreció un EB moderado para los taninos de leucaena y trichanthera, que no difirió entre ellos ($P < 0.001$). De igual manera, los taninos de morera no afectaron la V_{máx} de producción de gas. El efecto de los taninos de moringa en este parámetro fue moderado y los mayores EB se observaron para los taninos de leucaena y trichanthera. Esta última especie mostró los mayores efectos ($P < 0.001$).

Existe información disponible acerca del contenido de taninos de las cuatro especies arbustivas evaluadas (Scull 2004, García *et al.* 2008, Bakhshwain *et al.* 2010 y Pedraza *et al.* 2013). Sin embargo, se conoce poco de sus efectos en la fermentación ruminal. Getachew *et al.* (2002) estudiaron la producción de gas de 39 especies arbustivas tropicales, al incubarlas con PEG y sin él. Estos autores observaron una correlación positiva

tannins BE on gas production not only depend on the concentration of these compounds but also of their chemical structure and reactivity (Bueno *et al.* 2008 and Rodríguez *et al.* 2015)

The tannins BE of the evaluated shrubs on the OM and NDF degradability, as well as on the estimated ME, is show in figure 1. Only the trichanthera tannins showed effect on these indicators ($P < 0.01$), although this BE was moderate in the three indicators (11-17%). The increase in the available energy by the increase of degradability and ME, when inactivating the trichanthera tannins, can lead to increases in the final products of fermentation (short-chain fatty acid

($r = 0.76$; $P < 0.001$) entre el EB en la producción de gas y el contenido de taninos de las muestras. Sin embargo, el EB de los taninos en la producción de gas no solo depende de la concentración de estos compuestos sino también de su estructura química y reactividad (Bueno *et al.* 2008 y Rodríguez *et al.* 2015).

El EB de los taninos de las arbustivas evaluadas en la degradabilidad de la MO y la FND, así como en la EM estimada, se muestra en la figura 1. Solo los taninos de trichanthera mostraron efecto en estos indicadores ($P < 0.01$), aunque este EB fue moderado en los tres indicadores (11-17%). El aumento en la energía disponible por el aumento de la degradabilidad y la EM, al inactivar los

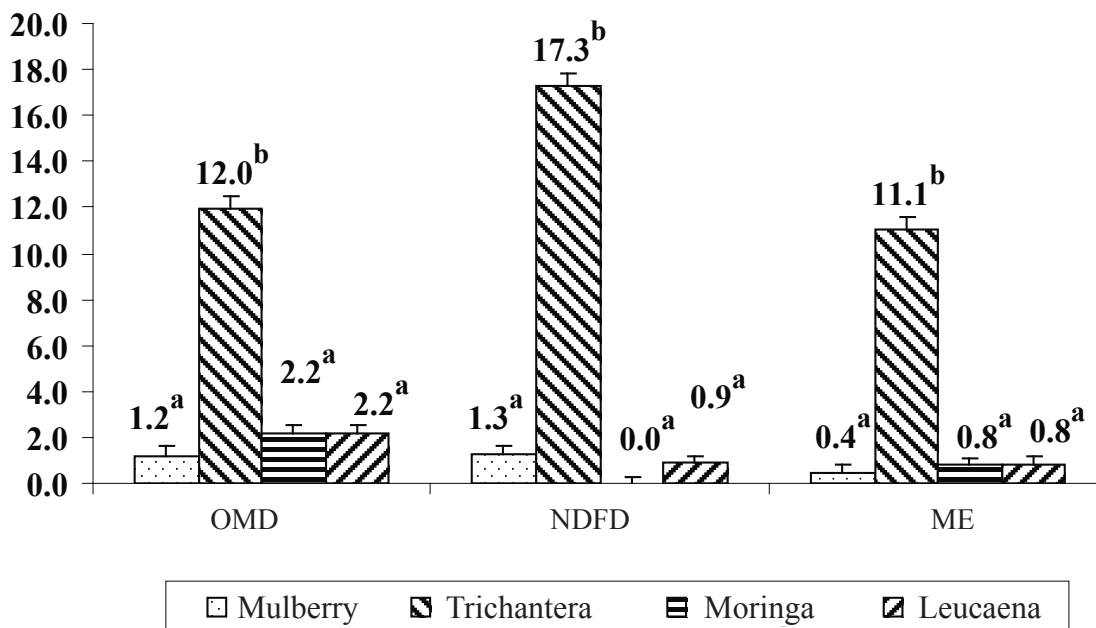


Figure 1. Biological effects (%) of tannins of four tropical shrubs on OM and NOF degradability and estimated *in vitro* ME ($P < 0.05$)

and gas) (table 1), and also in the microbial biomass synthesis. Both processes are inversely related (Blummel *et al.* 1997).

Figure 2 shows the tannins BE of species evaluated on the NH_3 concentration at 96 h of incubation, as an indicator of the effect of these secondary metabolites on the nitrogenous metabolism. The mulberry and moringa tannins do not have BE on the NH_3 concentration, while in leucaena tannins the BE was moderate. The highest effects were observed for trichanthera tannins ($P < 0.001$).

The higher affinity of tannins by the PEG causes, in presence of this compound, the availability of such proteins is increased which would otherwise remain joined to these secondary compounds as strong complex tannins: proteins and protected from the action of microbial proteases (Mtui *et al.* 2009). Therefore, the PEG inclusion favors the ruminal proteolysis (Getachew *et al.* 2000), although the BE magnitude will depend on the source of tannins which is evaluate (Rodríguez *et al.* 2014a) and the proteins protection degree that these metabolites achieve in natural conditions.

Tannins can join to proteins and carbohydrates

taninos de trichanthera, puede conducir a incrementos en los productos finales de la fermentación (i.e. ácidos grasos de cadena corta y gas) (tabla 1), y también en la síntesis de biomasa microbiana. Ambos procesos están inversamente relacionados (Blümmel *et al.* 1997).

La figura 2 muestra el EB de los taninos de las especies evaluadas en la concentración de NH_3 a las 96 h de incubación, como indicador del efecto de estos metabolitos secundarios en el metabolismo nitrogenado. Los taninos de morera y moringa no tuvieron EB en la concentración de NH_3 , mientras que en los taninos de leucaena el EB fue moderado. Los mayores efectos se observaron para los taninos de trichanthera ($P < 0.001$).

La mayor afinidad de los taninos por el PEG hace que, en presencia de este compuesto, se incremente la disponibilidad de aquellas proteínas que de otra forma permanecerían unidas a estos compuestos secundarios en forma de fuertes complejos taninos: proteínas y protegidas de la acción de las proteasas microbianas (Mtui *et al.* 2009). Por ello, la inclusión de PEG favorece la proteolisis ruminal (Getachew *et al.* 2000), aunque la magnitud del EB dependerá de la fuente de taninos que se evalúe (Rodríguez

and have a significant effect on their fermentation in the rumen, when limiting their use by ruminal microorganisms (McAllister *et al.* 1994 and Makkar *et al.* 1995), to interfere in the microbial adherence to food particles or directly affect their microbial populations or enzymatic complexes (Bakhashwain *et al.* 2010). These effects depend not only on the concentration of tannin in the plant, but also from the reactivity of these compounds, that depends on their chemical nature (Bueno *et al.* 2008 and Rodríguez *et al.* 2015). It is known that the same tannins

et al. 2014a) y el grado de protección de las proteínas que logren estos metabolitos en condiciones naturales.

Los taninos se pueden unir a proteínas y carbohidratos y ejercer un efecto importante en su fermentación en el rumen, al limitar su utilización por los microorganismos ruminales (McAllister *et al.* 1994 y Makkar *et al.* 1995), interferir en la adhesión microbiana a las partículas de alimento o afectar directamente las poblaciones microbianas o sus complejos enzimáticos (Bakhashwain *et al.* 2010). Estos efectos dependen no solo de la concentración de taninos en la planta, sino también de

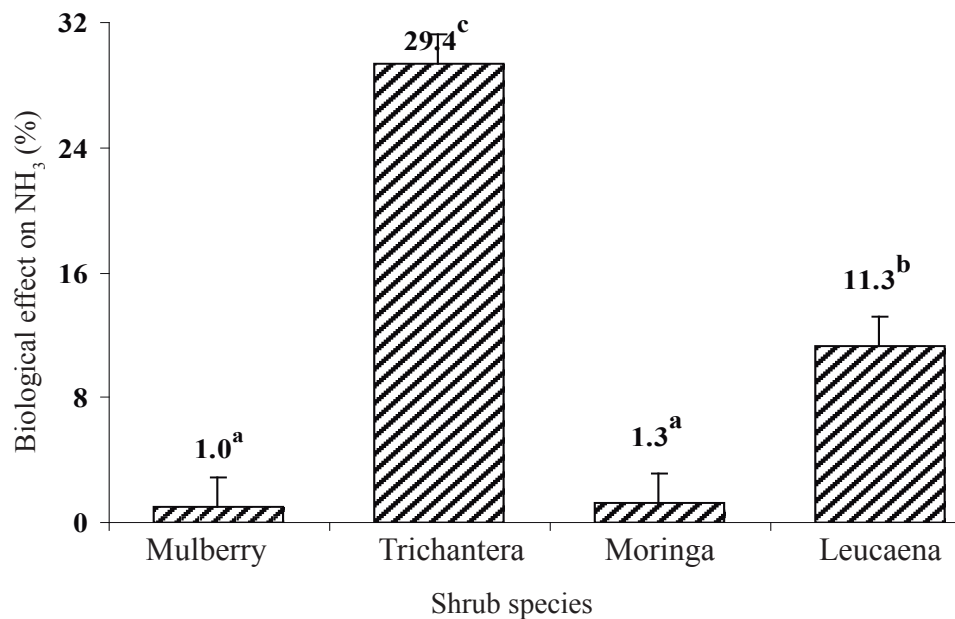


Figure 2. Biological effect (%) of tannins of the four tropical shrubs evaluated on the NH₃ concentration at 96 h of incubation (P < 0.05).

concentration from different sources can produce effects of different magnitude (Bueno *et al.* 2008).

In this study, the highest BE on the different monitored indicators corresponded to trichanthera tannins. Scull (2004) found moderate concentrations of these compounds in this species. However, the BE of trichanthera tannins does not justify the low nutritional value attributed to this species, probably because this could be the result of the combined effect of its high fiber content (Rodríguez *et al.* 2014b), lignin and BE of their tannins on the digestibility (Ammar *et al.* 2005), without taking into account the anti-nutritional effect of other secondary compounds in this shrub (Scull 2004).

Leucaena also showed moderate BE, but higher than the moringa and mulberry tannins in gas production (96 h), gas production potential, maximum speed and proteins degradation (NH₃ release to the incubation medium). The moderate BE of leucaena coincide with previous results on the nature and reactivity of the tannins which this legume species contains (Rodríguez *et al.* 2013).

The low BE of moringa and mulberry tannins coincide with the low concentration and the reported

la reactividad de estos compuestos, que depende de su naturaleza química (Bueno *et al.* 2008 y Rodríguez *et al.* 2015). Se conoce que la misma concentración de taninos de diferentes fuentes puede producir efectos de magnitud desigual (Bueno *et al.* 2008).

En este estudio, los mayores EB en los diferentes indicadores monitoreados correspondieron a los taninos de trichanthera. Scull (2004) encontró moderadas concentraciones de estos compuestos en esta especie. Sin embargo, el EB de los taninos de trichanthera no justifica el bajo valor nutritivo atribuido a esta especie, probablemente porque este sea el resultado del efecto combinado de su alto contenido de fibra (Rodríguez *et al.* 2014b), lignina y EB de sus taninos en la digestibilidad (Ammar *et al.* 2005), sin descartar el efecto antinutricional de otros compuestos secundarios presentes en esta arbustiva (Scull 2004).

También leucaena mostró EB moderados, pero superiores a los taninos de moringa y morera en la producción de gas (96 h), potencial de producción de gas, velocidad máxima y degradación de las proteínas (liberación de NH₃ al medio de incubación). Los moderados EB de leucaena coinciden con resultados previos de la naturaleza y reactividad de los taninos que contiene esta especie de leguminosa (Rodríguez *et al.* 2013).

activity for these compounds in these species (García *et al.* 2008 and Bakhshwain *et al.* 2010).

The obtained results of tannins BE on gas production, degradability of OM and NDF, ME and NH₃ concentration allow to concluded that the trichanthera tannins showed the highest BE on the ruminal fermentation indicators analyzed, while those of leucaena showed more moderate effects. The moringa and mulberry tannins did not influence on the nutritional value of these shrubs.

El poco EB de los taninos de moringa y morera coincide con la baja concentración y actividad informada para estos compuestos en dichas especies (García *et al.* 2008 y Bakhshwain *et al.* 2010).

Los resultados obtenidos de EB de los taninos en la producción de gas, degradabilidad de la MO y FND, EM y concentración de NH₃ permiten concluir que los taninos de trichanthera mostraron los mayores EB en los indicadores de la fermentación ruminal analizados, mientras que los de leucaena evidenciaron efectos más moderados. Los taninos de moringa y morera no influyeron en el valor nutritivo de estas arbustivas.

References

- Alexander, G., Singh, B., Sahoo, A., & Bhat, T.K. 2008. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets". *Animal Feed Science and Technology*, 145 (1–4), pp. 229–244, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.05.036.
- Ammar, H., López, S. & González, J. S. 2005. "Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by *in vitro* techniques". *Animal Feed Science and Technology*, 119 (3–4), pp. 323–331, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2004.12.013.
- AOAC International. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed., vol. 1, AOAC International, ISBN: 978-0-935584-54-7, Available: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19951414840.html;jsessionid=F473A9F5FB5AA48E5B87E3FC0986D738>>, [Accessed: February 21, 2016].
- Bakhshwain, A. A., Sallam, S. M. A. & Allam, A. M. 2010. "Nutritive value assessment of some Saudi Arabian foliage by gas production technique *in vitro*". *Meteorology, Environment and Arid Land Agriculture Sciences*, 21 (1), p. 65, ISSN: 1319-1039.
- Blümmel, M., Steingäß, H. & Becker, K. 1997. "The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages". *British Journal of Nutrition*, 77 (06), pp. 911–921, ISSN: 1475-2662, DOI: 10.1079/BJN19970089.
- Bueno, I. C. S., Vitti, D. M. S. S., Louvandini, H. & Abdalla, A. L. 2008. "A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique". *Animal Feed Science and Technology*, 141 (1–2), pp. 153–170, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.011.
- Conway, E. J. 1957. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. London: Crosby Lockwood & Sons, 465 p., CABDirect2.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2010. *InfoStat*. version 2010, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11 (1), pp. 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- García, D. E., Medina, M. G., Cova, L. J., Torres, A., Soca, M., Pizzani, P., Baldizán, A. & Domínguez, C. E. 2008. "Preferencia de vacunos por el follaje de doce especies con potencial para sistemas agrosilvopastoriles en el Estado Trujillo, Venezuela". *Pastos y Forrajes*, 31 (3), pp. 1–1, ISSN: 0864-0394.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2000. "Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes". *British Journal of Nutrition*, 84 (01), pp. 73–83, ISSN: 1475-2662, DOI: 10.1017/S0007114500001252.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2002. "Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production". *The Journal of Agricultural Science*, 139 (03), pp. 341–352, ISSN: 1469-5146, DOI: 10.1017/S0021859602002393.
- Hernández, A., Pérez, J., Bosch, D. & Castro, N. 2015. *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M. & Becker, K. 1995. "Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques". *British Journal of Nutrition*, 73 (06), pp. 897–913, ISSN: 1475-2662, DOI: 10.1079/BJN19950095.
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M., Borowy, N. K. & Becker, K. 1993. "Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61 (2), pp. 161–165, ISSN: 1097-0010, DOI: 10.1002/jsfa.2740610205.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A. & Cheng, K. J. 1994. "Microbial attachment and feed digestion in the rumen". *Journal of animal science*, 72 (11), pp. 3004–3018, ISSN: 0021-8812, DOI: /1994.72113004x.
- Melesse, A. 2016. "Assessing the feeding values of leaves, seeds and seeds-removed pods of *Moringa stenopetala* using *in vitro* gas production technique". *African Journal of Biotechnology*, 11 (51), pp. 11342–11349, ISSN: 1684-5315, DOI: 10.4314/ajb.v11i51.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. 1979. "The estimation of the digestibility and

- metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*". The Journal of Agricultural Science, 93 (01), pp. 217–222, ISSN: 1469-5146, DOI: 10.1017/S0021859600086305.
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. "Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid". Animal Research and Development, 28 (1), pp. 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Mtui, D. J., Lekule, F. P., Shem, M. N., Ichinohe, T., Fujihara, T. & others. 2009. "Comparative potential nutritive value of grasses, creeping legumes and multipurpose trees commonly in sub humid region in the Eastern parts of Tanzania". Livestock Research for Rural Development, 21 (10), ISSN: 0121-3784, Available: <<http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd21/10/mtui21158.htm>>, [Accessed: March 2, 2016].
- Pedraza, O. R. M., Pérez, L. S., González, R. M., González, P. E., León, G. M. & Sifonte, E. E. 2013. "Indicadores *in vitro* del valor nutritivo de *Moringa oleifera* en época de seca para rumiantes". Revista de Producción Animal, 25 (especial), ISSN: 2224-7920, Available: <https://www.researchgate.net/profile/Redimio_Pedraza_Olivera/publication/277022522_Indicadores_in_vitrodel_valor_nutritivo_de_Moringa_oleifera_en_poca_de_seca_para_rumiantes_Redimio_M_Pedraza_Olivera_Susana_Prez_Lpez_Mileidys_Gonzlez_Rodrguez_Eliane_Gonzlez_Prez_Marlene_Len_Gonzlez_y_Enrique_Espinosa_Sifonte/links/555ff99708ae9963a118b791.pdf>, [Accessed: March 2, 2016].
- Rodríguez, R., de la Fuente, G., Gómez, S. & Fondevila, M. 2014a. "Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits *in vitro*". Animal Production Science, 54 (8), pp. 1039–1046, ISSN: 1836-0939, DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/AN13045>.
- Rodríguez, R., Frutos, P. & Fondevila, M. 2015. "A new index to estimate reactivity and biological effect of tannins, using tropical browse legumes as a model". Animal Feed Science and Technology, 205, pp. 42–48, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2015.04.007.
- Rodríguez, R., González, N., Alonso, J., Domínguez, M. & Sarduy, L. 2014b. "Nutritional value of foliage meal from four species of tropical trees for feeding ruminants". Cuban Journal of Agricultural Science, 48 (4), p. 371, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, R., Lores, J., Gutiérrez, D., Ramírez, A., Gómez, S., Elías, A., Aldana, A. I., Moreira, O., Sarduy, L. & Jay, O. 2013. "Inclusion of the microbial additive Vitafer in the <i>in vitro</i> ruminal fermentation of a goat diet". Cuban Journal of Agricultural Science, 47, p. 171, ISSN: 2079-3480.
- Rubanza, C. D. K., Shem, M. N., Bakengesa, S. S., Ichinohe, T. & Fujihara, T. 2007. "Effects of *Acacia nilotica*, *A. polyacantha* and *Leucaena leucocephala* leaf meal supplementation on performance of Small East African goats fed native pasture hay basal forages". Small Ruminant Research, 70 (2–3), pp. 165–173, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.02.008.
- Scull, I. 2004. Metodología para la determinación de taninos en forrajes de plantas tropicales con potencialidades de uso en la alimentación animal. Master Thesis, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 79 p.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. "A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds". Animal Feed Science and Technology, 48 (3–4), pp. 185–197, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". Journal of Dairy Science, 74 (10), pp. 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

Received: July 24, 2015