

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Departament de Ciència Animal i dels Aliments**

**Tesis Doctoral**

**Efectos de los Extractos de Plantas sobre las Características  
de Fermentación Microbiana Ruminal en Sistemas In Vitro e In  
Vivo**

***Paul William Cardozo Salazar***

***Febrero 2005***

**EFFECTOS DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LAS  
CARACTERÍSTICAS DE FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL EN  
SISTEMAS IN VITRO E IN VIVO**

Tesis doctoral por:  
Paul William Cardozo Salazar

Bajo la dirección de:  
Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

Para optar al grado de Doctor en el Programa de Producción Animal de la

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Bellaterra, Febrero de 2005

**Sergio Calsamiglia Blancafort**, Profesor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA: Que la memoria intitulada “**Efectos de los Extractos de Plantas sobre las Características de Fermentación Microbiana Ruminal en Sistemas In Vitro e In Vivo**” presentada por el Ing. Agr. **Paul William Cardozo Salazar** se realizó bajo su dirección y, considerando que cumple con las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en el Programa de Producción Animal que otorga la Universitat Autònoma de Barcelona, autoriza su disertación pública para que sea juzgada por la comisión correspondiente

Y, para que así conste, firma la presente en Bellaterra, a los 22 días del mes de Febrero de 2005.

**Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort**

El autor de la presente tesis doctoral ha disfrutado de una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y una beca Suport a la Reserca de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

La realización de la presente memoria ha sido posible gracias al apoyo de las siguientes instituciones:

**Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**, por darme la oportunidad de realizar los estudios de Tercer Ciclo.

**Pancosma SA**, por el aporte financiero para la ejecución de los proyectos.

A mi mamuchi **B. Eugenia**, razón de ser y deseos de superación...

A mi padre, mis hermanos y mis sobrinos...

A mi esposa Nieves y mi hija Lucia Andrea y al que viene...

Como siempre, a Jesucristo por la fuerza espiritual que siempre me da...

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido directa o indirectamente para que este proyecto llegue a su término:

A mi director de tesis, Sergio Calsamiglia, quien más que mi tutor ha sido un gran amigo, permitiéndome formar parte de su equipo, por todo su apoyo, confianza y principalmente por su paciencia. Muchas gracias Sergi...

Quisiera agradecer de forma sincera a Alfred Ferret, por su apoyo, su trabajo organizado y sus consejos.

A Chris Kamel por la confianza, el soporte económico, los extractos naturales, no me olvido de esos chocolates que endulzaron las etapas de trabajo y las de ocio...

Al Departament de Ciència Animal i dels Aliments por la confianza y amistad que me brindaron durante mi etapa de formación. Al personal de laboratorio: Rosa y Blas, y al personal de la granja por su colaboración desinteresada alimentando los terneros, no olvidare la ternera que daba patadas al estilo Bruce Lee.

Al equipo de fermentadores: Silvia, Lorena, Marta B, María Rodríguez, María Devant (las que estaban), Montse, Marta Blanch, Mari carmen, MartaLi, y Nacho (los que llegaron), las horas que pasamos dentro y fuera de nuestro oloroso laboratorio, muchísimas gracias por su amistad.

A mis amigos y compañeros de siempre: Ana, las Begoñas, Aina, Elier, Luciano, Cristóbal, Ahmed, Moez, Amine, Toni-rebecos, Elizabeth, Daniel, Vikki, Mario Mungoi, Marta H, Vanesa, Irene, Coni, Juan, Zenón, Adriana, Glauber, Vincent, Ernesto, y si hay alguno que me olvidé, por favor discúlpenme..., soy malo con los nombres.

También quiero agradecer la colaboración y la amistad de todas las personas de la Unitat de Nutrició.

Finalmente a toda mi familia en Bolivia y en España, gracias por su paciencia, apoyo y motivación para continuar por este sendero...

Gracias a todos.

**RESUMEN**

En dos estudios in vitro y dos in vivo se evaluaron los efectos de extractos de plantas sobre las características de la fermentación microbiana ruminal. Se midieron las concentraciones de ácidos grasos volátiles (**AGV**), péptidos largos (**PepL**), péptidos cortos y AA (**PepC+AA**), N amoniacal, L-lactato, número de protozoos, la ingestión de materia seca (**IMS**) y el consumo de agua. Las diferencias fueron declaradas a  $P < 0.05$ . En el primer experimento, se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo en 4 períodos de 10 días (8 días de adaptación y 3 de muestreo) para determinar los efectos de 15 mg/Kg (en base a MS) de una mezcla de todos los extractos (**MIX**), y 7.5 mg/Kg (en base a MS) de extractos de ajo (**GAR**), canela (**CIN**), yuca (**YUC**), anís (**ANI**), orégano (**ORE**) o pimentón (**CAP**) sobre la fermentación microbiana ruminal. En el período de adaptación, las concentraciones de AGV totales y N amoniacal no fueron afectadas por los tratamientos. La proporción de acetato fue mayor del día 2 al 6 por efecto de CIN, GAR, ANI y ORE, y la proporción del propionato fue menor del día 2 al 4 en CIN y GAR, y del día 2 al 5 en ANI y ORE, comparados con el control (**CTR**). Sin embargo, estas diferencias desaparecieron después de 6 días de experimentación. El CIN y YUC incrementaron un 26% las concentraciones de PepL; GAR y ANI incrementaron la concentración de N PepC+AA un 17 y 15%, respectivamente; el ANI incrementó un 31% y el GAR redujo un 25.5% la concentración de N amoniacal, comparado con CTR. En el segundo experimento, los mismos extractos de plantas y tres compuestos secundarios puros (anetol, **ATL**; cinnamaldehído, **CDH** y eugenol, **EUG**) se evaluaron a cinco dosis (0, 0.3, 3, 30, y 300 mg/L) a dos niveles de pH (5.5 y 7.0) en cultivos in vitro con líquido ruminal de terneros alimentados con dietas altas en concentrado. Las dosis altas de todos los extractos de plantas redujeron la concentración de AGV totales confirmando su capacidad antimicrobiana. Cuando el pH fue 7.0, los efectos de los extractos de las plantas sobre el perfil de fermentación no resultaron favorables para los objetivos de los sistemas de engorde. En cambio, cuando el pH fue 5.5, ATL, ANI, ORE, y CIN no afectaron y EUG, GAR, CAP, CDH y YUC incrementaron la concentración de AGV totales. La relación acetato:propionato fue menor en ORE, GAR, CAP, CDH, y YUC, respecto al CTR. En el tercer experimento, 30 g/d de extracto de la alfalfa

(**AEX**; conteniendo 10% de malato y 1.5% de saponinas), una mezcla de 180 mg/d de CDH y 90 mg/d de EUG (**CIE**), y una combinación de ambos tratamientos (**MIX**) se evaluaron en terneros Holstein de  $360 \pm 22$  Kg de peso vivo y provistos de un trocar en el rumen. Comparados con el CTR, el CIE y AEX redujeron la IMS, el consumo de agua, el número de *Entodinium* spp., pero no afectaron a la concentración de AGV totales, las proporciones molares de propionato y butirato, la concentración de PepL, ni al pH ruminal. El AEX incrementó la relación acetato:propionato y redujo el número de protozoos (*Entodinium* spp e *Isotrichus* spp.). En la prueba in vitro con líquido ruminal de CIE, AEX y MIX, el CIE y MIX redujeron la degradación de la proteína bruta (**DPB**) de soja y maíz, y el MIX redujo también la DPB del heno de alfalfa a las 4 h de incubación. Sin embargo, todas estas diferencias desaparecieron a las 24 h de incubación. En el cuarto experimento, 2 g/d de aceite esencial de anís (**ANI**; conteniendo 10% anetol), 1 g/d de extracto de capsicum (**CAP**; conteniendo 15% de capsaicina), y una mezcla de 0.6 g/d de CDH y 0.3 g/d de EUG (**CIE**) fueron evaluados en terneros Holstein de  $450 \pm 28$  Kg de peso vivo y provistos de un trocar en el rumen. Comparados con el CTR, ningún tratamiento afectó al pH ruminal, a la concentración de AGV totales ni a la proporción de butirato. El CAP incrementó la IMS, el consumo de agua, la concentración de PepC+AA, y redujo la proporción de acetato y las concentraciones AVG de cadena ramificada (**AGVCR**) y PepL. El CIE redujo el consumo de agua, la proporción de acetato, la concentración de AVGCR, L-lactato, y N amoniacal, y el número de protozoos (*Entodinium* spp e *Isotrichus* spp.), y aumentó la proporción de propionato y la concentración de PepC+AA. El ANI disminuyó la relación acetato:propionato, la concentración de AVGCR, y N amoniacal, y el número protozoos (*Entodinium* spp e *Isotrichus* spp.). En la prueba in vitro con líquido ruminal de ANI, CAP y CIE, dichos extractos redujeron la DPB de la soja 4 h después de la incubación, y sólo el ANI redujo la DPB de la soja 24 h después de la incubación. Los resultados indican que los extractos de plantas que fueron seleccionados para ser potencialmente incorporados en dietas para terneros de cebo intensivo pueden variar sus efectos en función de la dieta y del ambiente ruminal, y que el CIE, ANI y CAP pueden ser útiles como modificadores de la fermentación ruminal en los sistemas de cebo intensivo de terneros.



**ABSTRACT**

Two in vitro and two in vivo studies were conducted to evaluate the effects of natural plant extracts on rumen microbial fermentation. The concentrations of volatile fatty acids (**VFA**), large peptides (**LPep**), small peptide plus AA (**SPep+AA**), ammonia, L-lactate, protozoa counts, and dry matter (**DM**) and water intake were measured in these experiments. Differences were declared at  $P < 0.05$ . In the first experiment, 8 dual-flow continuous culture fermenters were used in four periods of 10 d (8 d adaptation and 3 d sampling) to determine the effects of 15 mg/kg DM of a mixture of equal proportions of all extracts (**MIX**), and 7.5 mg/kg DM of extracts of garlic (**GAR**), cinnamon (**CIN**), yucca (**YUC**), anise (**ANI**), oregano (**ORE**) or pepper (**PEP**) on rumen microbial fermentation. During the adaptation period, total VFA and ammonia N concentrations were not affected by treatments. The acetate proportion was higher from d 2 to 6 in **CIN**, **GAR**, **ANI** and **ORE**, and the propionate proportion was lower from d 2 to 4 in **CIN** and **GAR**, and from d 2 to 5 in **ANI** and **ORE**. However, these differences disappeared after d 6. The concentrations of **LPep** N was 26% higher in **CIN** and **YUC**, the **SPep+AA** N was 17 and 15 % higher in **GAR** and **ANI**, and the ammonia N was 31% higher in **ANI** and 25.5% lower in **GAR**, compared with control (**CTR**). In the second experiment, these plant extracts and three secondary plant metabolites (anethole, **ATL**; cinnamaldehyde, **CDH** and eugenol, **EUG**) were screened at five doses (0, 0.3, 3, 30, and 300 mg/L) and two level of pH (5.5 and 7.0) in beef cattle using an in vitro batch fermentation system. High doses of all plant extracts reduced total VFA concentration, which confirms their antimicrobial activity. When pH was 7.0, the effect of plant extracts on fermentation profile was not favorable for the improvement of beef production or efficiency. In contrast, when pH was 5.5, no changes (**ATL**, **ANI**, **ORE**, and **CIN**) or increases (**EUG**, **GAR**, **CAP**, **CDH** and **YUC**) in total VFA was followed by lower acetate to propionate ratio (**ORE**, **GAR**, **CAP**, **CDH**, and **YUC**). In the third experiment, 30 g/d of alfalfa extract (**AEX**; containing 10% malate, and 1.5% saponins), a mixture of 180 mg/d of **CDH** and 90 mg/d of **EUG** (**CIE**), and the combination of the two treatments (**MIX**) were evaluated in Holstein heifers of  $360 \pm 22$  kg BW. Relative to **CTR**,

CIE and AEX reduced DM and water intake, and *Entodinium* spp. counts, but did not affect total VFA concentration, propionate and butyrate proportions, LPep concentration, and ruminal pH. The AEX increased the acetate to propionate ratio and reduced the number of protozoa counts (*Entodinium* spp. and *Isotrichus* spp.). In vitro incubation of rumen fluid from heifers fed CIE, AEX or MIX, CIE and MIX reduced CP degradation of soybean meal and corn grain, and MIX also reduced CP degradation of alfalfa hay at 4 h after incubation, but all differences disappeared after 24 h of incubation. In the fourth experiment, 2 g/d of anise oil (**ANI**; containing 10% anethole), 1 g/d of capsicum extract (**CAP**; containing 15% capsaicin), and a mixture of 0.6 g/d of CDH and 0.3 g/d of EUG (**CIE**) were evaluated in fattening Holstein heifers of  $450 \pm 28$  kg BW fitted with ruminal trocars. Relative to CTR, treatments had no effect on ruminal pH, total VFA concentration and butyrate proportion. The CAP increased DM intake and water intake, and SPep+AA N concentration, and reduced acetate proportion, and branch-chained VFA (**BCVFA**) concentration, and LPep N concentration. The CIE reduced water intake, acetate proportion, BCVFA, L-lactate and ammonia N concentrations, and the number of protozoa counts (*Entodinium* spp. and *Isotrichus* spp.), and increased propionate proportion and SPep+AA N concentration. The ANI reduced the acetate to propionate ratio, BCVFA and ammonia N concentrations, and the number of total protozoa counts. In vitro incubations of rumen fluid from heifers fed with ANI, CAP or CIE resulted in reduced CP degradation of soybean meal at 4 h after incubation, and only ANI reduced CP degradation of soybean meal at 24 h after incubation. Results suggest that plant extracts selected to be used in beef cattle diet may differ depending on the basal diet and the rumen environment, and that CIE, ANI and CAP may be useful as modifiers of rumen fermentation in beef production systems.

# ÍNDICE

	Pag.
<b>CAPÍTULO 1. Revisión Bibliográfica</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENERALIDADES DE LA NUTRICION EN RUMIANTES</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. FERMENTACION RUMINAL</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. LOS CARBOHIDRATOS</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen.....	<b>5</b>
<b>2.3. LAS PROTEINAS</b> .....	<b>7</b>
2.3.1. Degradación del nitrógeno en el rumen.....	<b>8</b>
<b>2.4. SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA</b> .....	<b>12</b>
2.4.1. Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM).....	<b>12</b>
<b>2.5. MANIPULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL</b> .....	<b>13</b>
2.5.1. Manipulación de la dieta.....	<b>14</b>
2.5.2. Manipulación del medio líquido ruminal.....	<b>14</b>
2.5.3. Manipulación de los microorganismos ruminales.....	<b>15</b>
<b>2.6. LOS ADITIVOS EN FERMENTACIÓN RUMINAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7. PRODUCTOS NATURALES COMO MODIFICADORES DE LA FERMENTACION RUMINAL</b> .....	<b>19</b>
2.7.1. Origen de los compuestos secundarios.....	<b>20</b>
2.7.2. Antecedentes de la utilización de compuestos secundarios	<b>21</b>
2.7.3. Principios activos y propiedades .....	<b>22</b>
2.7.3.1 Fenoles y polifenoles.....	<b>24</b>
2.7.3.1.1. <i>El anetol</i> .....	<b>24</b>
2.7.3.1.2. <i>Cinnamaldehido</i> .....	<b>26</b>
2.7.3.1.3. <i>El eugenol</i> .....	<b>29</b>
2.7.3.2. Los terpenos y aceites esenciales.....	<b>31</b>
2.7.3.2.1 <i>Monoterpenos</i> .....	<b>33</b>
2.7.3.2.1.1. Carvacrol y timol.....	<b>33</b>
2.7.3.2.2. <i>Triterpenos</i> .....	<b>36</b>
2.7.3.2.2.1. Saponinas y sarsaponinas.....	<b>37</b>
2.7.3.2.3. <i>Tetraterpenos</i> .....	<b>40</b>
2.7.3.2.3.1. Capsaicina.....	<b>40</b>

2.7.3.3. Aminoácidos aromáticos.....	41
2.7.3.3.1. Alliína y Allicina.....	41
<b>2.8. CONCLUSIONES PRELIMINARES.....</b>	<b>44</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>45</b>

## **CAPÍTULO 2. Experimento 1:**

Efecto de los extractos naturales de plantas sobre la degradación de la proteína y el perfil de fermentación en cultivos continuos.

**Effect of natural plant extract on protein degradation and fermentation profile in continuous culture.**

Abstract.....	47
Introduction.....	48
Material and methods.....	49
Results.....	52
Discussion.....	57
Implication.....	60

## **CAPÍTULO 3. Experimento 2:**

Screening in vitro de extractos naturales de plantas a dos niveles de pH sobre la fermentación microbiana ruminal de dietas altas en concentrado.

**Screening for the effect of natural plant extract and two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet.**

Abstract.....	63
Introduction.....	64
Material and methods.....	65

Results.....	67
Discussion.....	74
Implications.....	80

#### **CAPÍTULO 4. Experimento 3:**

Efecto del extracto de alfalfa y una mezcla de cinnamaldehido y eugenol sobre el perfil de fermentación ruminal y la degradación de la proteína en terneros alimentados con dieta alta en concentrado.

##### **Effects of alfalfa extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen fermentation profiles and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet.**

Abstract.....	81
Introduction.....	82
Material and methods.....	82
Results and discussion.....	86
Implication.....	97

#### **CAPÍTULO 5. Experimento 4:**

Uso de anís, capsicum y la mezcla de cinnamaldehido y eugenol como modificadores de la fermentación ruminal en terneros alimentados con dieta alta en concentrado.

##### **Anis, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol as modifiers of rumen fermentation profiles in beef heifers fed a high-concentrate diet.**

Abstract.....	99
Introduction.....	100
Material and methods.....	100
Results .....	104

Discussion.....	109
Implication.....	114
<b>CAPÍTULO 6. Discusión general.....</b>	<b>115</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### CAPÍTULO 1. Revisión Bibliográfica

#### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características físicas y químicas del medio ruminal (Clarke y Bauchop, 1977).....	<b>3</b>
<b>Tabla 2.</b> Categoría de los grupos de aditivos para el uso en alimentación animal autorizados en la Unión Europea (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2000).....	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Utilidades de los extractos de plantas (Kamel, 2001).....	<b>21</b>
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de los terpenos (Pine et al., 1990).....	<b>32</b>

#### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema del metabolismo de los carbohidratos en el rumen (modificado de France y Siddons, 1993).....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Degradación de la proteína en el rumen (modificado de Wallace, 1996).....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema del metabolismo del nitrógeno en el rumen (modificado de Nolan, 1993).....	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Formación de los compuestos secundarios (Piñol et al., 2000).....	<b>23</b>
<b>Figura 5.</b> Estructura química del anetol (Piñol et al., 2000).....	<b>25</b>

<b>Figura 6.</b> Estructura química del cinnamaldehido (Davidson y Naidu, 2000).....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de transformación del cinnamaldehido a benzaldehído (Friedman et al., 2000).....	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b> Unidad de isopreno de los terpenos (Vollhardt, 1990).....	<b>32</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura química del carvacrol y del timol (Harborne et al., 1999).....	<b>34</b>
<b>Figura 10.</b> Actividad hipotética del carvacrol (Ultee et al., 2002).....	<b>35</b>
<b>Figura 11.</b> Estructuras químicas de las saponinas (Wallace et al., 2002).....	<b>37</b>
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la capsaicina (Piñol et al., 2000).....	<b>41</b>
<b>Figura 13.</b> Estructura química de la aliína (Piñol et al., 2000).....	<b>42</b>

## **CAPÍTULO 2. Experimento 1**

### **Índice de tablas**

<b>Table 1.</b> Effect of natural plant extracts on total volatile fatty acids concentrations, and acetate and propionate proportions 2 h after feeding from d 1 to 8 of fermentation.....	<b>53</b>
<b>Table 2.</b> Effect of natural plant extracts on volatile fatty acids concentrations 2 h after the morning feeding after 8 days of adaptation.....	<b>55</b>
<b>Table 3.</b> Effect of natural plant extracts on hour by hour and average nitrogen fractions in a dual flow continuous culture measured after the morning feeding.....	<b>56</b>

## **CAPÍTULO 3. Experimento 2**

### **Índice de tablas**

<b>Table 1.</b> Effects of natural plant extracts at doses 0.3, 3, 30, and 300 mg/L and pH on percentage change in ammonia N concentration compared with control (0 mg/L).....	<b>68</b>
--	-----------

<b>Table 2.</b>	Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, 30, and 300 mg/L and pH on percentage change in total VFA concentration compared with control (0 mg/L).....	<b>70</b>
<b>Table 3.</b>	Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in acetate proportion compared with control (0 mg/L).....	<b>72</b>
<b>Table 4.</b>	Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in propionate proportion compared with control (0 mg/L).....	<b>73</b>
<b>Table 5.</b>	Effects of natural plant extracts at doses 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in butyrate proportion compared with control (0 mg/L).....	<b>75</b>
<b>Table 6.</b>	Effects of natural plant extracts at doses 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in branch-chained volatile fatty acid concentration compared with control (0 mg/L).....	<b>77</b>
<b>Table 7.</b>	Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in acetate to propionate ratio compared with control (0 mg/L).....	<b>79</b>

## **CAPÍTULO 4. Experimento 3**

### **Índice de tablas**

<b>Table 1.</b>	Effect of natural plant extracts on dry matter and water intake	<b>87</b>
<b>Table 2.</b>	Effect of natural plant extracts on hour by hour and average rumen pH, volatile fatty acids and L-lactate concentrations after the morning feeding.....	<b>88</b>
<b>Table 3.</b>	Effect of natural plant extracts on hour by hour and average nitrogen fractions measured after the morning feeding.....	<b>90</b>
<b>Table 4.</b>	Effect of natural plant extracts on protozoa population by hours.....	<b>94</b>
<b>Table 5.</b>	Effect of natural plant extracts on in vitro dry matter and crude protein degradation.....	<b>96</b>



## **CAPÍTULO 5. Experimento 4**

### **Índice de tablas**

<b>Table 1.</b> Effect of Natural plant extracts on dry matter and water intake	<b>105</b>
<b>Table 2.</b> Effect of natural plant extracts on hour by hour and average rumen pH, volatile fatty acids and L-lactate concentrations after the morning feeding.....	<b>105</b>
<b>Table 3.</b> Effect of natural plant extracts on hour by hour and average nitrogen fractions measured after the morning feeding.....	<b>107</b>
<b>Table 4.</b> Effect of natural plant extracts on protozoa populations by hours.....	<b>108</b>
<b>Table 5.</b> Effect of Natural Plant Extracts on in vitro dry matter and crude protein degradation.....	<b>113</b>

## **CAPÍTULO 6. Discusión general**

### **Índice de Figuras**

<b>Figura 1.</b> Efectos de los extractos naturales de plantas sobre la proporción molar de acetato durante el periodo de adaptación.....	<b>116</b>
<b>Figura 2.</b> Efectos de los extractos naturales de plantas sobre la s fracciones nitrogenadas (Las flechas oscuras indican que los extractos tuvieron un efecto estimulador, las flechas sin relleno indican inhibición).....	<b>117</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **Revisión Bibliográfica**

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo, se han utilizado aditivos antibióticos en dietas para rumiantes como una estrategia más para manipular el ecosistema microbiano ruminal a fin de optimizar la digestión y la utilización de los nutrientes (Chalupa, 1988; Van Nevel y Demeyer, 1988; Linn, 1990). Dichas sustancias no tienen valor nutritivo como tales, pero benefician a la industria ganadera por controlar enfermedades y mejorar la utilización e incrementar la eficiencia del metabolismo energético y proteico en el rumen, entre otras (Bergen y Bates, 1984; Goodrich et al., 1984; De Blass et al. 1987; Chalupa, 1988; Maggregor, 1988; Russell y Strobel, 1988; Hino et al. 1992; Beckett et al. 1998).

Sin embargo, la utilización de dichos productos se vio cuestionada por las asociaciones de consumidores, las protectoras de animales y las autoridades de salud humana, porque muchos ganaderos utilizaron de forma inadecuada y muchas veces indiscriminada estos productos en los piensos de sus animales que han generado un aumento en la resistencia de los agentes patógenos a éstos antibióticos, provocando así una disminución de la eficacia de estos productos para combatir enfermedades (Gustafson y Bowen, 1997).

En consecuencia, la Unión Europea ha ejercido una presión constante por limitar o prohibir el uso de los antibióticos, incluidos los promotores de crecimiento, en piensos para animales. Por ello, el 1 de julio de 1999 entró en vigor la prohibición de cuatro (bacitracina de zinc, espiramicina, virginamicina y tisolina) de los ocho antibióticos utilizados en Europa como promotores de crecimiento. Finalmente, el 22 de septiembre de 2003, el consejo de la Unión Europea mediante la Directiva 1831/2003/CEE prohibió la utilización de aditivos antibióticos (avilamicina, flavofosfolipidol, monensina y salinimicina) para alimentación animal a partir del 1 de enero de 2006. La prohibición de estos aditivos ha provocado la búsqueda de aditivos alternativos cuya inclusión en el pienso sea considerada “segura para el consumo humano” (Kamel, 2001) y, a su vez, aporten soluciones al vacío que generará la retirada de los promotores de crecimiento.

Una de las alternativas que ha generado mucho interés es el uso de extractos de plantas naturales, reconocidos como sustancias seguras para el consumo humano (GRAS, generally recognized as safe, FDA, 2004). Aunque existen algunos estudios antiguos que observaron cambios en la fermentación ruminal por efecto de aceites esenciales (Miller et al., 1958; Oh et al., 1968) o de saponinas (Goodall et al., 1982; Grobner et al., 1982), existe muy poca información de los efectos de otros extractos de plantas sobre las poblaciones microbianas ruminales, así como de sus mecanismos de acción y las dosis óptimas que permitan manipular la fermentación ruminal.

## **2. GENERALIDADES DE LA NUTRICION EN RUMIANTES**

El rumiante establece una relación simbiótica estrecha con los microorganismos que habitan en el rumen. El rumen es el hábitat ideal para el crecimiento de los microorganismos ruminales. El rumiante funcional proporciona alimento masticado y un medio líquido anaeróbico altamente reductor (Yokoyama y Johnson, 1988), con temperatura y pH adecuado para los microorganismos (Harrison et al. 1976; Russell y Hespell, 1981; Russell, 1984; Van Soest, 1982). A cambio, los microorganismos digieren los nutrientes aportando ácidos grasos volátiles (**AGV**), y proteína microbiana de alta calidad (Yokoyama y Johnson, 1988).

La optimización de la producción del rumiante requiere el mantenimiento de las condiciones adecuadas del medio ruminal que garanticen el equilibrio y buen funcionamiento del ecosistema.

### **2.1. FERMENTACION RUMINAL**

Existe abundante información sobre las características del medio ruminal (Tabla 1; Van Soest, 1982; Hungate, 1988; Tsuda et al., 1991) y las funciones de las bacterias ruminales (Russell y Dombroski, 1980; Hoover, 1986; Russell y Wilson, 1996), de los protozoos (Yokoyama y Johnson, 1988; Dehority, 1993) y de los procesos fermentativos ruminales (Stern y Hoover, 1979; Strobel y Russell, 1986; Weimer, 1996; Weimer, 1998).

Al constituir un sistema abierto y continuo, el rumen aporta el volumen y el tiempo de retención necesario para que el alimento ingerido por el animal sea degradado y fermentado por los microorganismos ruminales. Este ambiente acuoso proporciona las condiciones precisas para que las interacciones entre las actividades microbianas ruminales, las enzimas producidas por los mismos microorganismos y los nutrientes, sean óptimas (Yokoyama y Johnson, 1988). Los microorganismos ruminales se encargan de degradar los carbohidratos y las proteínas de forma total o parcial a monómeros para su fermentación o absorción (Wallace y Cotta, 1988; Hoover y Stokes, 1991; Erasmus et al., 1994) con el objetivo principal de obtener energía y proteína microbiana (Stern y Hoover, 1979; Hespell y Bryant, 1979; Sniffen et al., 1983; Russell y Wallace, 1988; Russell et al., 1992; Dewhurst et al., 2000). La proteína microbiana constituye el aporte principal de proteína al rumiante, y se digiere y absorbe por la vaca para su utilización metabólica (Rooke y Armstrong, 1989; Coomer et al., 1993).

**Tabla 1.** Características físicas y químicas del medio ruminal (Clarke y Bauchop, 1977)

Parámetros físico-químicos	Valor de referencia
pH ruminal	5.7 – 7.3
Potencial oxido-reducción	- 350 mV
Temperatura	38 – 41 °C
Osmolalidad	< 400 m Osmol/kg
Tensión superficial	45 – 49 dinas/cm

## 2.2. LOS CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas que desde el punto de vista de la nutrición de los rumiantes se clasifican en carbohidratos fibrosos (celulosa, hemicelulosa, lignina) y no fibrosos (almidones y azúcares simples). Existen también las pectinas que son constituyentes de la

pared celular, aunque no se consideran parte de los carbohidratos fibrosos porque son solubles en una solución neutro detergente y su comportamiento digestivo (muy degradables en el rumen) los asemeja a los almidones, por lo que se clasifican como carbohidratos estructurales no fibrosos (Van Soest, 1982).

Los carbohidratos estructurales tienen una composición química de polisacáridos complejos (hemicelulosa, celulosa, pectina y ligninas), y desde el punto de vista nutritivo constituyen la fibra vegetal. La fibra, como nutriente, contribuye al funcionamiento normal del rumen. Las principales funciones de la fibra son estimular la rumia, la secreción de saliva, las contracciones de la pared ruminal y la producción de elementos amortiguadores de la acidez para mantener el pH superior a 6.2 que favorece a las bacterias fibrolíticas (Orskov, 1988; Nocek, 1994). Hay que considerar que la fibra tiene una degradabilidad inferior a otros nutrientes, y a medida que aumenta el contenido en fibra de la ración disminuye la ingestión de materia seca, la concentración energética y la producción de leche (Nocek, 1994).

Los carbohidratos no estructurales están formados por almidones y azúcares simples, y proporcionan la mayor parte de la energía disponible tanto para los microorganismos ruminales como para el animal (Nocek y Tamminga, 1991). Aunque no todos los carbohidratos no estructurales son almidón, éste constituye hasta el 90% de la mayoría de los cereales (Sniffen et al., 1992), encontrándose en el endospermo de la semilla en forma de gránulos de amilopectinas (80 – 85%) y amilosas (15 – 20%).

El tipo de carbohidrato aportado en la dieta condiciona de forma importante la actividad fermentativa microbiana (Sniffen et al., 1983). Una dieta rica en forrajes aporta un mayor contenido de carbohidratos estructurales, proliferando las bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas (Owens y Goetsch, 1988). Por el contrario, una dieta rica en cereales aporta grandes cantidades de carbohidratos no estructurales (almidón y azúcares simples) favoreciendo el desarrollo y la actividad de las bacterias amilolíticas (Owens y Goetsch, 1988).

### 2.2.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen

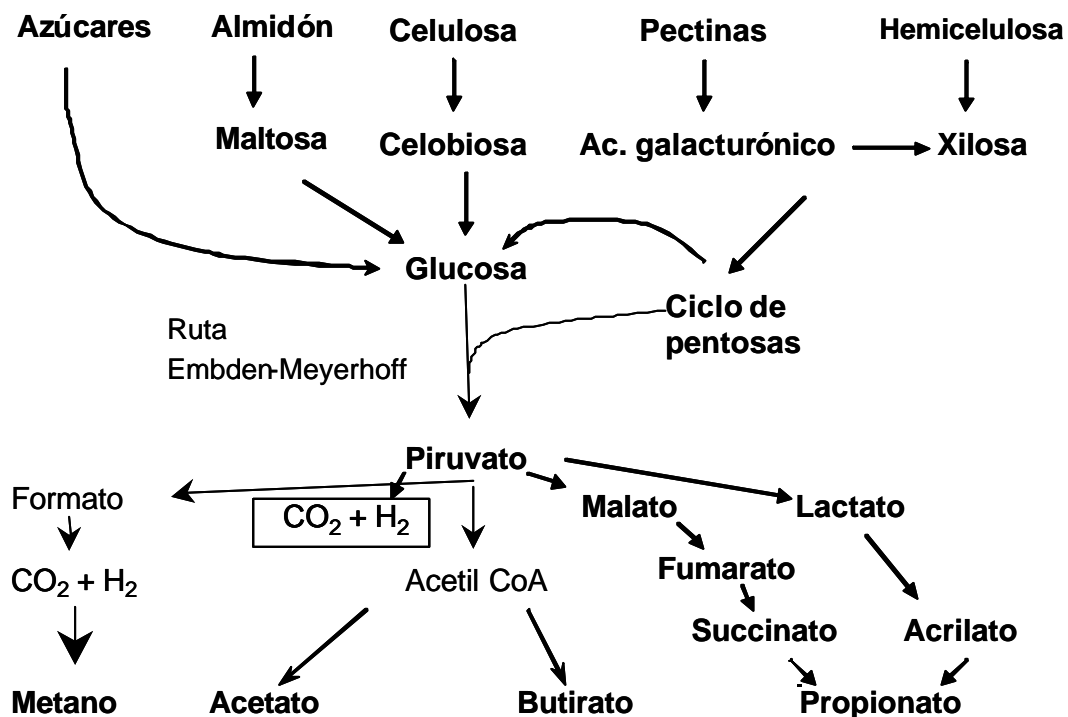
Los carbohidratos se encuentran en forma de grandes moléculas insolubles que han de degradarse hasta compuestos más simples, para poder atravesar la membrana mucosa del tracto digestivo y llegar a la sangre (McDonald et al., 1995). Sin embargo, los carbohidratos fibrosos no pueden ser degradados por las enzimas digestivas de los mamíferos, aunque los rumiantes han desarrollado un sistema digestivo especial que permite la simbiosis con los microorganismos que son los responsables de la fermentación ruminal de estos carbohidratos fibrosos (Owens y Goetsch, 1988).

Este proceso de fermentación ruminal de los carbohidratos (estructurales y no estructurales) se inicia con la adhesión y colonización microbiana de las partículas vegetales ingeridas por el animal (Russell y Hespell, 1981). Existen dos etapas de degradación de los carbohidratos: la primera, consiste en la degradación de los carbohidratos complejos mediante enzimas celulasas y hemicelulasas capaces de hidrolizar enlaces  $\beta$ -glucosídicos hasta hexosas y pentosas. El almidón y los azúcares simples son hidrolizados por las amilasas, maltasas, maltosa fosforilasa y 1,6-glucosidasas hasta hexosas. La segunda etapa consiste en una fermentación intracelular de las pentosas y hexosas a través de la ruta de Embden-Meyerhof hasta convertirse en piruvato (France y Siddons, 1993).

El piruvato es el componente intermedio a través del cual deben pasar todos los carbohidratos hasta la formación de los AGV, principalmente acetato, propionato y butirato. Las bacterias celulolíticas utilizan mayoritariamente la vía metabólica piruvato-formatoliasa para producir acetato. Esta vía metabólica produce la decarboxilación del piruvato y da origen a la formación de Acetil-CoA y formato como productos intermediarios. El formato es transformado en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  que son precursores para la formación de metano, que a su vez se pierde a través del eructo. Este proceso resulta energéticamente menos eficaz, ya que se pierde un carbono e hidrógenos en forma de metano, pero la producción de acetato es muy importante por el aporte de precursores para la síntesis de grasa en la leche (Bondi, 1989; France y Siddons, 1993).

Por otra parte, los almidones y azúcares se degradan y fermentan hasta producir propionato sin que existan pérdidas de carbonos, lo que hace que el proceso sea energéticamente más eficaz que la fermentación acética (Van Soest, 1982).

Los AGV son también conocidos como ácidos grasos de cadena corta (Bergman, 1990) y constituyen los principales productos de la fermentación ruminal. Los AGV contienen de 1 a 7 átomos de carbono y se presentan en forma lineal (acético, propiónico, butírico, valérico) o como cadenas ramificadas (isobutírico, isovalérico, 2-metil butírico; Fahey y Berger, 1993). La concentración de AGV totales en el rumen refleja el balance entre la producción y la absorción. Dicho balance oscila normalmente entre 70 a 130 mM (30 mM como mínimo y 200 mM como máximo). La proporción de cada producto final depende del tipo de carbohidrato fermentado, de las especies bacterianas que intervienen y de las condiciones del medio en el rumen (Nocek y Tamminga, 1991; Fahey y Berger, 1993).



**Figura 1.** Esquema del metabolismo de los carbohidratos en el rumen (modificado de France y Siddons, 1993)



Según Bergman (1990), el 88% de los AGV producidos en el rumen se absorben de forma pasiva a través de la pared ruminal, y el 12% pasa al omaso y abomaso. Los AGV representan entre el 50 y el 70% de la energía digestible ingerida (France y Siddons, 1993).

### 2.3. LAS PROTEINAS

Las proteínas alimentarias están constituidas por amino ácidos (**AA**) unidos mediante enlaces peptídicos entre el grupo carboxílico de un AA y el grupo amino de otro AA. Según Van Soest et al. (1981) la proteína bruta se divide en tres fracciones: nitrógeno no proteico (**NNP**), proteína verdadera y nitrógeno indegradable, y según Nolan (1996) existe tres vías de suministro de proteína al rumen: proteína de la dieta, proteína proveniente de la descamación de células epiteliales y el NNP endógeno provenientes de la saliva o a través de la pared ruminal.

Desde el punto de vista nutricional, la proteína de la dieta se divide en proteína degradable (**PDR**) y no degradable en el rumen (**PNDR**; INRA, 1988; NRC, 2001). La PDR la forman el NNP (urea, amidas, aminos, amino ácidos y nitratos; Leng and Nolan, 1984) y una fracción de proteína verdadera que se degrada en el rumen a oligopéptidos y amino ácidos aumentando el aporte de N para los microorganismos. La PNDR pasa directamente al duodeno y aporta proteína absorbible al animal (Nolan, 1996). La proteína absorbible en el intestino está constituida por la fracción digestible de la proteína microbiana y de la PNDR (Russell et al., 1983). Sin embargo, hay que considerar que la PNDR tiene en general una menor digestibilidad que la proteína microbiana (Owens y Zinn, 1988; NRC 2001). Según Owens y Zinn (1988), la digestibilidad aparente del pool de proteína que llega al duodeno en dietas normales está entre el 65 y el 75%. Sin embargo, algunos sistemas de formulación asumen un valor de digestibilidad constante del 80% (NRC 1989; 1996). El NRC (2001) señala que este valor puede variar entre 50 hasta 95 en función del tratamiento que haya sufrido previamente el alimento.

### 2.3.1. Degradación del nitrógeno en el rumen

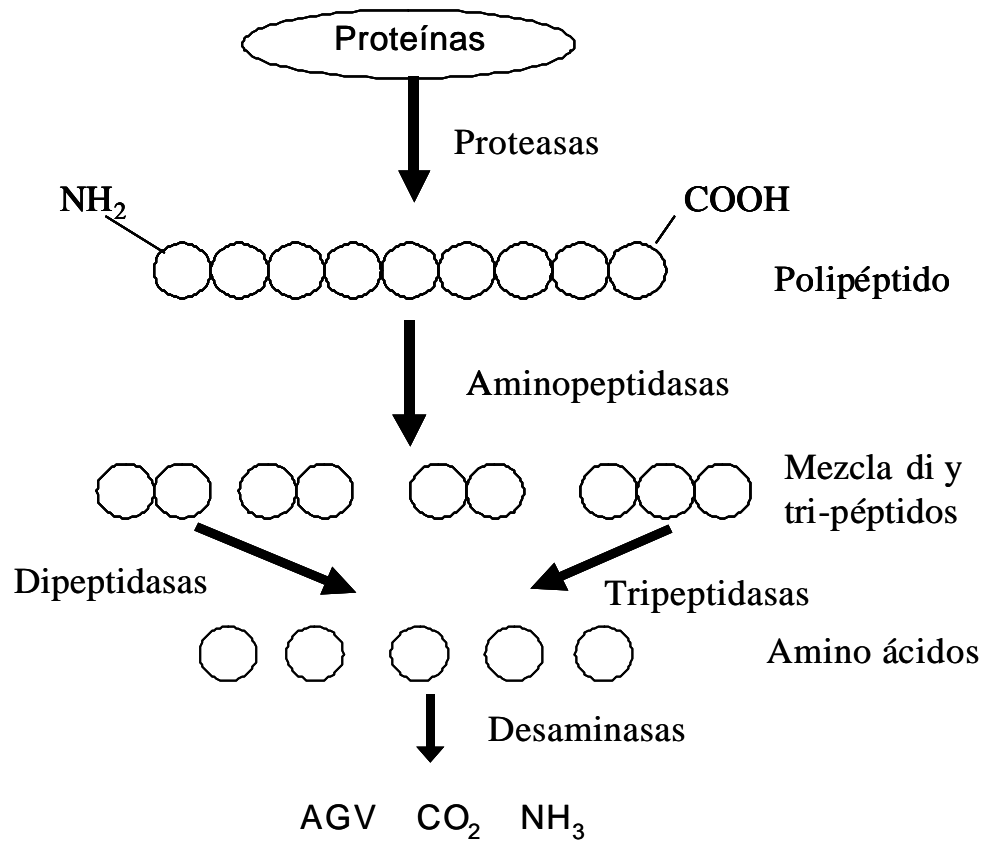
Las bacterias ruminales son las encargadas principales de degradar las proteínas, aunque los protozoos y hongos intervienen de forma activa en la proteólisis (Wallace y Cotta, 1988; Broderick et al., 1991). Entre el 30 y 50% de los microorganismos ruminales que se adhieren a las partículas alimentarias tienen actividad proteolítica extracelular (Prins et al., 1983). Dentro de los géneros proteolíticos están *Ruminobacter* spp., *Selonomonas* spp., *Eubacterias* spp. y *Streptococcus* spp., entre otras (Cotta y Hespell, 1986). Aunque estos géneros sean considerados proteolíticos, no todos utilizan los productos finales para su crecimiento. Por ejemplo, se ha observado que *Ruminobacter amylophylus* degrada la matriz proteica que envuelve los gránulos de almidón del endosperma del maíz (Roomy y Pfunfelder, 1986) pero no utiliza los péptidos ni los amino ácidos resultantes de la degradación (Jenkinson et al., 1979).

Una vez que el alimento es ingerido, el “pool” de proteína potencialmente degradable es colonizado por las bacterias, protozoos y hongos ruminales (Nolan, 1993). Las proteasas bacterianas extracelulares periplasmáticas forman un complejo enzima-sustrato para potencializar su actividad (Wallace, 1985). Los protozoos tienen actividad proteolítica diez veces menor que las bacterias (Forsberg et al., 1984), pero son más eficaces degradando proteína insoluble que soluble (Jouany, 1996).

Las cadenas de polipéptidos resultantes de la proteólisis son degradadas a péptidos más pequeños por acción de peptidasas (Cotta y Hespell, 1986). Las bacterias ruminales producen mayoritariamente aminopeptidasas (Figura 2; Wallace et al., 1996). Estas enzimas, clasificadas como dipeptidil-peptidasas (Web et al., 1992), se encargan de hidrolizar los polipéptidos a unidades más simples para facilitar la acción de otras enzimas como las di- y las tripeptidasas (Wallace, 1996).

También se ha observado una actividad dipeptidasa extracelular producida por protozoos ruminales, particularmente del genero *Entodinium* (Wallace y Cotta, 1988). Sin embargo, el efecto de la ausencia de protozoos

por defaunación es mínimo, debido a que otras bacterias ocupan el nicho ecológico que dejan los protozoos (Wallace y Cotta, 1988).



**Figura 2.** Degradación de la proteína en el rumen (modificado de Wallace, 1996)

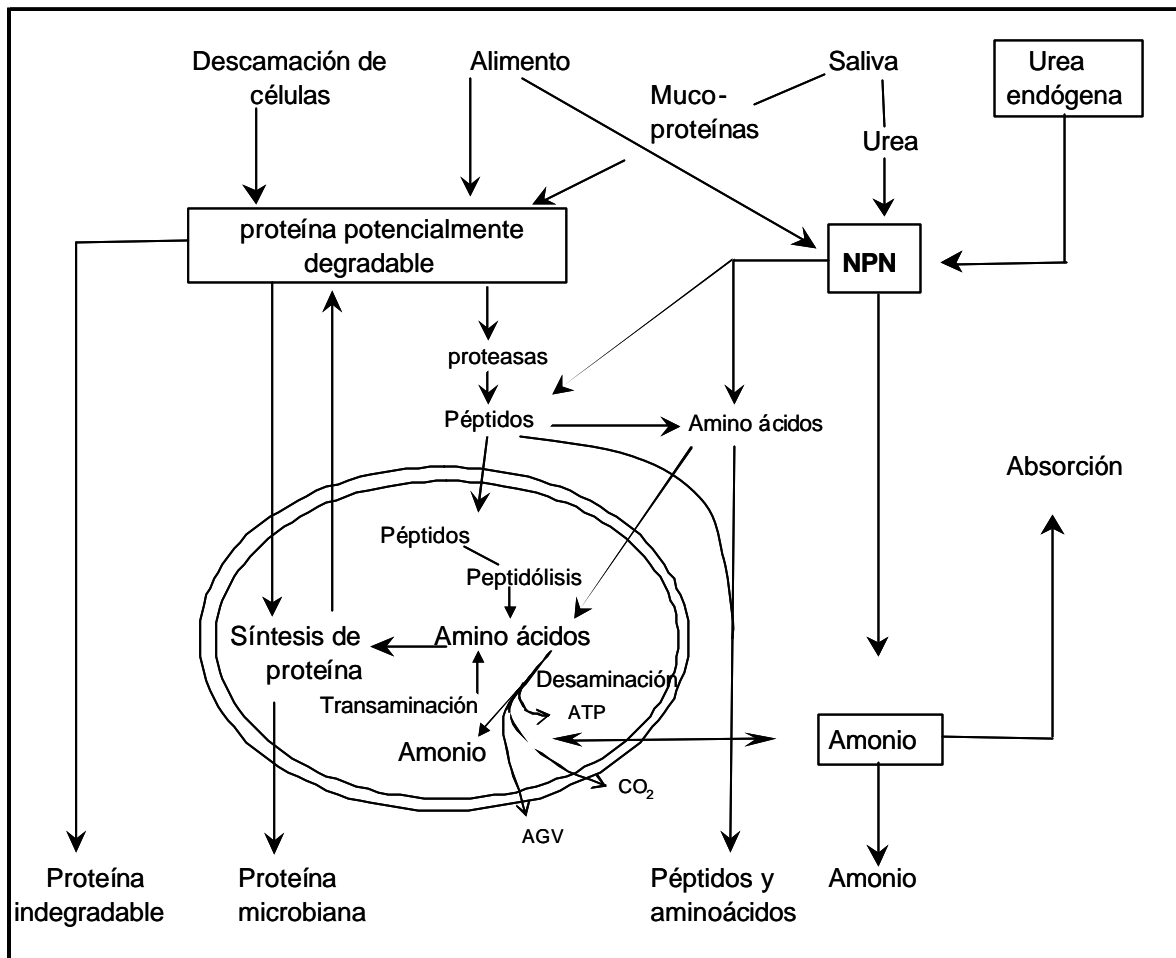
La actividad dipeptidasa extracelular libera péptidos cortos (2 a 3 AA) directamente al medio ruminal, aportando AA para las bacterias carentes de actividad proteolítica (Cotta y Hespell, 1986). La acumulación de péptidos en el rumen depende, por un lado, de la actividad proteolítica y, por otro, del ritmo de degradación extracelular y la absorción de péptidos por las poblaciones microbianas (Nolan, 1993). Algunos estudios observaron que los microorganismos ruminales absorben rápidamente los péptidos cortos y los incorporan al contenido celular con mayor eficiencia que los AA individuales (Prins et al., 1983), probablemente debido a la mayor eficiencia energética que supone el transporte de péptidos al interior de la célula que de los AA individuales (Payne, 1983).

La concentración de AA libres en el rumen es normalmente baja (Nolan 1993), probablemente porque los péptidos y AA individuales presentes en el rumen son incorporados rápidamente a la célula bacteriana y son utilizados para la síntesis de proteína o son degradados intracelularmente por enzimas desaminasas hasta amoníaco, AGV y dióxido de carbono (Maeng y Baldwin, 1976; Tamminga, 1979). Según Nolan (1975), entre el 20 y 50% del N bacteriano proviene de la utilización de péptidos y AA libres en el rumen.

Los AA son utilizados para la síntesis de proteína microbiana o, en otros casos, son degradados por descarboxilación o desaminación no oxidativa (Tamminaga, 1979; Baldwin y Allison, 1983). La ruta de descarboxilación, con la consiguiente formación de aminas, se incrementa cuando el pH ruminal es bajo, mientras que la desaminación es la ruta mayoritaria utilizada por las bacterias para producir amoníaco (Prins et al., 1983) y AGV (Chalupa, 1976; Wallace y Cotta, 1988). Los AA en el rumen se destinan mayoritariamente a la formación de amoníaco que será asimilado directamente en la proteína microbiana (Figura 3).

El amoníaco formado por la metabolización intracelular de los AA puede utilizarse para a síntesis propia de AA (por transaminación), o se excreta al medio ruminal para ser utilizado por otras especies bacterianas, en especial por bacterias celulolíticas (Russell et al., 1991) para la síntesis de proteína microbiana. La finalidad de este proceso catabólico parece ser la obtención de energía por parte de los microorganismos (Erfle et al., 1977), aunque este papel no está muy claro, habiéndose observado un menor crecimiento de las bacterias cuando los AA constituían la única fuente de alimento en cultivos mixtos (Russell et al., 1983) y en cultivos puros (Russell, 1983; Wallace, 1986).

En el caso de los protozoos, los AA resultantes de la peptidólisis intracelular son excretados al medio ruminal, incorporados a la síntesis de su propia proteína, o desaminados (Wallace y Cotta, 1988) con una mayor actividad desaminasa que las bacterias, lo que explica la menor concentración de amoníaco en el rumen de los animales defaunados (Allison, 1970). Esta elevada actividad desaminasa es responsabilidad principal de los entodiniomorfos, mientras que los isotrichus son incapaces de catabolizar AA de origen exógeno (Williams y Coleman, 1988).



**Figura 3.** Esquema del metabolismo del nitrógeno en el rumen (modificado de Nolan, 1993)

Si la ración es deficiente en proteína o la proteína es resistente a la degradación microbiana, la concentración de amoníaco en el rumen puede llegar a ser excesivamente baja, y comprometer el crecimiento de las bacterias y la degradación de los nutrientes de la ración. Se ha indicado que la concentración mínima de N amoniacal para optimizar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana es de 5 mg/100 mL (Satter y Slyter, 1974). Por el contrario, si la degradación de la proteína es más rápida que la síntesis de proteína microbiana, se acumula amoníaco en el líquido ruminal, superándose la concentración óptima. En esta situación, el amoníaco pasa al torrente sanguíneo, llega al hígado y se transforma en urea. Parte de esta urea puede regresar al rumen a través de la saliva o, directamente, a través de la pared ruminal, pero la mayor parte se excreta por la orina y, por tanto, se pierde (Owens y Zinn, 1988).

Las proteínas alimentarias también pueden ser una fuente importante de AGV, principalmente cuando se utilizan dietas con proteínas muy degradables. Un aspecto importante de la degradación de la proteína y la fermentación de AA radica en la formación de AGV de cadena ramificada como el isobutirato, isovalérato y 2-metilbutirato a partir de la desaminación de la valina, leucina e isoleucina, respectivamente. Estos AGV de cadena ramificada son factores esenciales para el crecimiento de algunas bacterias ruminales, principalmente las celulolíticas, por lo que su presencia estimula el crecimiento de estas bacterias (Cotta y Hespell, 1986).

## **2.4. SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA**

Un aspecto clave de los procesos digestivo en los rumiantes es la síntesis de proteína microbiana. Ésta se puede definir como la cantidad de proteína de origen microbiano producida en el rumen y se expresa en gramos de N o de proteína ( $N \times 6.25$ ) microbiana por día (Van Soest, 1982). La síntesis de proteína microbiana implica el crecimiento y multiplicación de los microorganismos, y depende fundamentalmente de la disponibilidad de energía y de nitrógeno. La fermentación de la materia orgánica genera el ATP necesario para aportar energía para dicha síntesis (Nolan, 1993).

Las bacterias fibrolíticas utilizan con preferencia nitrógeno amoniacal, mientras que las bacterias amilolíticas utilizan principalmente proteína verdadera. Sin embargo, el crecimiento microbiano es más eficaz con el uso de proteína verdadera que con nitrógeno amoniacal (Russell et al., 1991). El aporte microbiano al flujo total de proteína al intestino oscila entre el 33 al 89% (Rooke y Armstrong, 1989; Coomer et al., 1993), por lo que el aporte proteico microbiano en relación a las necesidades proteicas del animal a lo largo de su ciclo productivo es elevado.

### **2.4.1. Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM)**

En condiciones normales, la energía es el principal factor que limita el crecimiento de las bacterias ruminales (Stern y Hoover, 1979; Nolan, 1993). La fermentación ruminal tiene un rendimiento energético bajo, ya que la oxidación

del sustrato es incompleta, produciéndose de 4 a 5 moles de ATP por cada mol de glucosa fermentada (Beever, 1993), frente a los 38 moles de ATP que se liberarían si la reacción se realizase en aerobiosis (Murray et al., 1993). La síntesis de proteína microbiana requiere, además, de un adecuado suministro de nitrógeno para alcanzar la máxima eficiencia. Si el nivel de nitrógeno es bajo, el proceso de utilización de energía se desacopla produciéndose la fermentación con producción de calor pero sin síntesis de ATP. Por el contrario, si el nivel de N es excesivo, el amoníaco se absorbe y la energía se convierte en el factor limitante para una utilización eficiente del N (Owens y Zinn, 1988).

La ESPM es la cantidad de proteína microbiana sintetizada por unidad de energía disponible en el rumen y se expresa como gramos de N microbiano sintetizado por kilogramo de materia orgánica verdaderamente fermentada (**MOVF**) en el rumen (g N bacteriano/Kg MOVF). Stern y Hoover (1979) indicaron que se producen entre 11 y 49 g N bacteriano por cada Kg de MOVF. Esta variabilidad se atribuye al pH ruminal, el ritmo de paso (Shriver et al., 1986; Russell, 1998), el tipo de dieta, el nivel de ingestión, el tamaño de partícula, la calidad del forraje, la relación de forraje:concentrado, y a la metodología analítica utilizada, entre otras (Hoover y Stokes, 1991).

## **2.5. MANIPULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL**

Durante muchos años se ha investigado en las posibilidades de modificar la fermentación ruminal con el objetivo de mejorar la productividad animal (Van Nevel y Demeyer, 1988). La producción óptima del animal sólo puede lograrse cuando la fermentación microbiana ruminal y la síntesis de proteína microbiana en el rumen son óptimas. Una ración equilibrada para los microorganismos resultará en una eficacia máxima, pero si falta algún nutriente, el crecimiento microbiano no será óptimo y disminuirá la cantidad de proteína que llegue al intestino delgado (Stern y Hoover, 1979; Hoover y Stokes, 1991).

Existen numerosos estudios que describen los factores que pueden afectar a la fermentación ruminal y la síntesis de proteína microbiana (Stern y Hoover, 1979; Hespell y Bryant, 1979; Dewhurst et al., 2000). Estos factores

suponen oportunidades para la manipulación de la fermentación ruminal. A efectos prácticos, dichos factores se pueden agrupar en tres áreas importantes:

1. Manipulación de la dieta.
2. Manipulación del medio ruminal.
3. Manipulación de los microorganismos ruminales.

### **2.5.1. Manipulación de la dieta**

La disponibilidad de energía y proteína para las bacterias son los factores más limitantes para la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Stern y Hoover, 1979; Hoover y Stokes, 1991). Los microorganismos ruminales requieren de manera simultánea energía (ATP) y nitrógeno (en forma de amoníaco, péptidos y AA) para su crecimiento, por lo que un aporte sincronizado de energía fermentable y proteína se traduce en una mejor utilización de los nutrientes en el rumen y un mayor flujo de proteína microbiana al duodeno (Russell y Strobel, 1988; NRC, 2001). Es importante considerar que la ESPM aumenta un 50% cuando la cantidad de carbohidratos no fibrosos en la ración aumenta de 25 a 37% (Hoover y Stokes, 1991). Existe mucha información de diversos tratamientos físicos y químicos que han permitido modificar la fermentabilidad de los nutrientes de la dieta con el fin de aumentar o disminuir la disponibilidad de nutrientes en el rumen y/o en el intestino delgado (Owens y Zinn, 1988; Nocek y Tamminga, 1991). Entre los métodos físicos aplicados a los alimentos están el triturado, aplastado, extrusionado, partido, molido, peletizado, entre otros (Nocek y Tamminga, 1991). El uso de calor y la hidratación estarían dentro de los procesos físico-químicos (Hale, 1973; Theurer, 1986). Asimismo, se han utilizado sustancias químicas como el formaldehído, taninos y amonio entre otros (Fluharty y Loerch, 1989; Owens y Zinn, 1988; Nocek y Tamminga, 1991).

### **2.5.2. Manipulación el medio líquido ruminal**

La modificación de los parámetros físico-químicos del rumen permite manipular la fermentación ruminal. Por ejemplo, la digestibilidad de la fibra se



ve reducida cuando el pH ruminal es igual o menor a 6.0 (Stewart, 1977; Erfle et al., 1982; Mould y Ørskov, 1983; Cardozo et al., 2000 y 2002; Calsamiglia et al., 2002). Las bacteria celulolíticas (*Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, y *Butyrivibrio fibrosolvens*) son muy sensibles a la reducción del pH ruminal (Russell y Dombroski, 1980; Strobel y Russell, 1986; Russell y Wilson, 1996; Russell, 1998). Sin embargo, las bacterias amilolíticas (*Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*, *Bacteroides ruminicola*) son mucho más resistentes a dicha reducción de pH (Yokoyama y Johnson, 1988; Russell, 1991; Russell y Wilson, 1996). Además, la reducción del pH ruminal afecta al metabolismo del rumen (Slyter, 1976; Sauvant et al., 1999), a la velocidad de crecimiento microbiano (Hoover et al., 1984; Hoover, 1986), a la producción y proporción de AGV (Mould y Ørskov, 1983 y 1984; Russell, 1998; Cardozo et al., 2000 y 2002; Calsamiglia et al., 2002) y a la degradación de la fibra y la proteína (Erfle et al., 1982).

### 2.5.3. Manipulación de los microorganismos ruminales

Una de las estrategias para manipular la fermentación ruminal consiste en modificar la población microbiana para suprimir procesos no deseados, como la pérdida de energía en forma de metano o CO<sub>2</sub> (Czerkawski, 1976), y de proteína en forma de amonio (Nolan, 1975). Durante muchos años se han estudiado los efectos de los protozoos ruminales sobre el sistema ruminal (Williams y Coleman, 1988; Dehority, 1993). El impacto de la presencia o ausencia de protozoos en el rumen esta en función del tipo de dieta y de los protozoos predominantes (Nagaraja et al., 1992). Algunos estudios de defaunación de protozoos ruminales resultaron en un descenso en la degradación de la proteína y la concentración de péptidos y AA en el rumen (Van Nevel y Demeyer, 1988; Ivan et al., 1991; Ivan et al., 2000). Asimismo, los protozoos fagocitan bacterias como fuente principal de nitrógeno y la ausencia de éstos incrementa el número de bacterias y la producción de AGV totales en el rumen (Van Nevel and Demeyer, 1988; Williams and Coleman, 1988), e incrementa el flujo de proteína bacteriana y la ESPM (Koenig et al., 2000).

Otro avance reciente ha sido el empleo de probióticos (cultivos simples o mezclados de microorganismos vivos; Fuller, 1989). Su uso puede ejercer un efecto estimulador del crecimiento algunos grupos bacterianos. Algunos estudios señalan que los probióticos pueden eliminar oxígeno del medio ruminal, equilibrando el pH y estimulando el crecimiento bacteriano ruminal (Erasmus et al., 1992; Callaway, 1997; Kung et al., 1997).

El uso de algunos ácidos orgánicos en dietas para rumiantes también puede ejercer efectos positivos sobre la actividad de los microorganismos ruminales (Scott, 1998; Carro et al., 1999). Nisbet y Martín (1991) observaron que la adición de fumarato y malato estimularon el crecimiento de *Selonomonas ruminantium* en condiciones in vitro. Dichas bacterias pueden utilizar ácido láctico como fuente de energía (Stewart y Bryant, 1988) y producir mayoritariamente propionato por la vía del succinato (Wolin y Miller, 1988). El uso de fumarato y malato en las raciones de los animales podría disminuir las concentraciones de ácido láctico en el rumen y así evitar los descensos acusados de pH (Martin y Streeter, 1995; Callaway y Martin, 1996; Martín et al., 1999; Montaña et al., 1999; López et al., 1999).

La utilización de monensina (antibiótico ionóforo carboxílico) ha permitido manipular la fermentación ruminal. Su capacidad de introducirse entre la bicapa lipídica de los microorganismos le permite actuar como transportador transmembrana, intercambiando cationes monovalentes del líquido citoplasmático con el medio extracelular provocando la disminución del pH citoplasmático y la pérdida del gradiente electroquímico de la membrana (Bergen y Bates, 1984). Los efectos más sobresalientes de la monensina a nivel ruminal son:

- La disminución de la degradación de la proteína en el rumen (Bergen y Bates, 1989).
- La inhibición de las bacterias desaminadoras gram-positivas (Yang y Russell, 1993) y por consiguiente la disminución de la concentración de amoníaco (Dinus et al, 1976).
- La disminución de la producción de AGV ramificados en el rumen (Hino y Russell, 1985).

- La disminución de pérdidas energéticas en forma de metano (Slyter, 1979).
- La reducción de la actividad fibrolítica (Russell y Strobel, 1988).
- La disminución de lactato y el mantenimiento del pH ruminal (Nagaraja et al., 1982).
- El aumento de propionato (Schelling, 1984).

## 2.6. LOS ADITIVOS EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Los aditivos (Tabla 2) se utilizan rutinariamente en la alimentación animal para mejorar la apetecibilidad de las materias primas y piensos, prevenir ciertas enfermedades, modificar y optimizar la utilización de los nutrientes en el rumen, o estimular la síntesis de proteína microbiana. Bajo el término aditivo se incluyen sustancias tan diversas como las vitaminas, provitaminas, minerales, antioxidantes, emulsionantes, saborizantes, coccidiostáticos y agentes promotores del crecimiento como los antibióticos, prebióticos y enzimas, entre otros (Chalupa; 1988; Van Nevel y Demeyer, 1988).

**Tabla 2.** Categoría de los grupos de aditivos para el uso en alimentación animal autorizados en la Unión Europea (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2000)

Grupo aditivo
Antibióticos
Sustancias antioxidantes
Sustancias aromáticas y saborizantes
Coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas
Emulsionantes, estabilizantes, espesantes y gelificantes
Colorantes incluidos los pigmentos
Conservantes
Vitaminas, provitaminas y otras sustancias de efecto análogo químicamente bien definidas
Oligoelementos
Agentes ligantes, antiaglomerantes y coagulantes
Reguladores de la acidez
Enzimas
Microorganismos
Ligantes de radionucleidos

Dentro del grupo de los aditivos antibióticos están aquellos que se utilizan como promotores del crecimiento (**APC**), y que también son denominados "modificadores de la fermentación ruminal" (Van Nevel y Demeyer, 1988). Los APC se clasifican en antibióticos de tipo ionóforos (monensina sodica, lasalocida, salinomycin, etc.), los de tipo no ionóforos (tilosina, virginiamicina, espiramicina, flavofosfolipol, y bacitracina de zinc), inhibidores de la producción de metano, estimuladores de la producción de propionato (monensina, avoparcina), estabilizadores del pH, inhibidores de proteasas/desaminasas, y agentes defaunadores, entre otros (Chalupa, 1988; Van Nevel y Demeyer, 1988).

Los APC contribuyen de modo importante en la productividad de las explotaciones y, por ello, son los más utilizados en alimentación animal. Los efectos prácticos más sobresalientes en rumiantes tras la suplementación de APC (Chalupa et al 1980; Bergen y Bates, 1984; Yang y Russell, 1993; Phipps et al., 2000; Ruiz et al., 2001) fueron:

- Mejora de la digestibilidad de los alimentos.
- Reducción de la movilización de grasa corporal.
- Reducción del contenido graso de la leche.
- Aumento de producción de propionato.
- Reducción de producción de proteína microbiana ruminal.
- Aumento de retención de nitrógeno.
- Aumento del contenido en proteína de la leche.
- Aumento de producción de leche y del contenido en lactosa.
- Reducción in vivo e in vitro de la producción de metano.

El uso inadecuado y a veces indiscriminado de antibióticos en los piensos ha generado un aumento de la resistencia de las bacterias y otros organismos patógenos a éstos antibióticos, provocando así una reducción en la eficacia de estos productos para combatir enfermedades (Kamel, 2001).

La Directiva 70/524/CEE del Consejo del 23 de noviembre de 1970, estableció un Comité para legalizar el uso de las materias primas en piensos de animales, poniendo de manifiesto la necesidad de revisar todas las normas

sobre los aditivos para proteger mejor la sanidad de los animales, la salud humana y el medio ambiente. Así, el 1 de julio de 1999 entró en vigor la prohibición de cuatro antibióticos utilizados en Europa como promotores de crecimiento (bacitricina-zinc, espiramicina, fosfato de tilosina y virginamicina), y en agosto y septiembre del mismo año, se prohibió el uso de algunos coccidiostáticos (ipronidazol, dinitolmida y aprinocina) y otros productos (quinoxalinas, N-dióxido, carbadox y olaquinox). Como resultado de estas prohibiciones por parte de la Unión Europea, sólo quedan 4 antibióticos que pueden ser utilizados en piensos: Avilamicina, flavofosfolipidol, monensina y salinomicina.

Finalmente, la Directiva 1831/2003/CEE del Consejo de la Unión Europea del 22 de septiembre de 2003 sobre aditivos en la alimentación animal, señala que la comercialización y la utilización como aditivos para alimentación animal de dichos antibióticos sólo podrá efectuarse hasta el 31 de diciembre de 2005; a partir del 1 de enero de 2006, estas sustancias se eliminarán del registro.

El éxito de la producción ganadera sin poner en peligro el bienestar animal y salvaguardando la seguridad sanitaria del consumidor dependerá, en un futuro inmediato, de la inclusión en el pienso de componentes que mejoren la productividad y que sean considerados “seguros para el consumo humano” (Kamel, 2001). Una alternativa es investigar sustancias extraídas de especies vegetales que no sólo proporcionen una simple respuesta a la reducción de la eficacia productiva como consecuencia de la prohibición de aditivos antibióticos, sino que aporten soluciones sin riesgo de toxicidad, ni de residuos en el producto final, ni de resistencias microbianas a los antibióticos (Auclair, 2000; Losa, 2000).

## **2.7. PRODUCTOS NATURALES COMO MODIFICADORES DE LA FERMENTACION RUMINAL**

Existe un creciente interés en explorar los productos naturales como aditivos para incorporar en las raciones de los animales con el fin de modificar

la eficiencia de utilización de los nutrientes y mejorar la producción. Muchas especies vegetales producen metabolitos secundarios que les sirven como sistemas de defensa frente a enfermedades, parásitos e insectos (Harborne et al., 1999). Muchos metabolitos secundarios son utilizados en medicina humana y por la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos (Shapiro et al., 1994). Sin embargo existe información limitada sobre los efectos de estos compuestos naturales en la fermentación ruminal.

### **2.7.1. Origen de los compuestos secundarios**

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos que conducen a la formación de compuestos tales como azúcares, AA, ácidos grasos, proteínas, y lípidos que son parte del proceso vital de la planta (Piñol et al., 2000). Estos procesos se denominan “metabolismo primario” y los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios. Asimismo, algunos grupos taxonómicos han desarrollado compuestos peculiares denominados metabolitos secundarios y la ruta por la que se forman se denomina “metabolismo secundario” (Piñol et al., 2000). Sin embargo, debido a que los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de ciertos compuestos primarios y que, en cada caso, el precursor es utilizado también para la biosíntesis de otros metabolitos primarios, los dos tipos de metabolismo están interconectados entre sí, haciendo difícil el establecimiento de una clara división entre ambos (Piñol et al., 2000).

Tradicionalmente, los metabolitos secundarios se han considerado como sustancias de desecho carentes de una función específica (Curtin et al., 1991). Sin embargo, algunos de estos compuestos tienen funciones aleloquímicas (benéficas para otras especies) ó alelopáticas (interacción química negativa) (Van Soest, 1982; Salisbury y Ross, 1992; Piñol et al., 2000). Algunas de estas sustancias sirven a la planta como mecanismo de defensa frente a microorganismos, insectos y/o herbívoros. En otros casos, proporcionan el olor característico a la planta o son responsables de la pigmentación (quinonas y taninos) (Schmid, 1982), el sabor (aceites esenciales), o de actividades

antifúngicas, antibacterianas (ácidos fenólicos y fenoles simples) y antivíricas (Van Soest, 1982; Wild, 1994; Brantner et al., 1996).

### 2.7.2. Antecedentes de la utilización de compuestos secundarios

Los compuestos secundarios de las plantas han sido utilizados desde el principio de nuestros tiempos (Cowan, 1999). Las civilizaciones de todos los continentes han utilizado durante años cataplasmas y han bebido infusiones derivadas de plantas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Utilidades de los extractos de plantas (Adaptado a partir de Kamel, 2001, y Wallace et al., 2004)

<b>Vegetal</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Propiedades</b>
<b>Especies aromáticas</b>		
Canela	Cinnamaldehído	Estimulante digestión, antimicrobiano
Clavo	Eugenol	Antimicrobiano, antioxidante
Orégano	Timol y carvacrol	Estimulante del apetito, antimicrobiano
Comino	Cuminaldehído	Estimulante de la digestión
Anís	Anetol	Digestivo, carminativo, galactógeno
<b>Especies picantes</b>		
Pimentón	Capsaicina	Antiinflamatorio, estimulante del apetito
Pimienta	Piperina	Estimulante de la digestión
Mostaza	Allilisotiocinato	Estimulante de la digestión
Jengibre	Zingerol	Estimulante gástrico
<b>Hierbas y especies aromáticas</b>		
Ajo	Allicina	Estimulante digestión, antiséptico
Romero	Cíñelo	Estimulante digestión, antiséptico, antioxidante
Menta	Mentol	Estimulante digestión, antiséptico
Yuca	Sarsaponinas	Antiprotozoario, captador de NH <sub>3</sub> ruminal

Existe evidencia de que los Neandertales que vivieron hace 60.000 años, utilizaron especies vegetales para tratamientos etnomédicos. Hipócrates (100 años A.D.) mencionó entre 300 y 400 plantas medicinales. Dioscorides

(Siglo I D.C.) escribió un catálogo de plantas medicinales que constituyó el prototipo para la farmacopea moderna. La Biblia describe aproximadamente 30 especies vegetales utilizadas en medicina humana (Cowan, 1999).

En la actualidad existen unas 18.000 especies vegetales registradas y utilizadas por las culturas indígenas americanas en su alimentación y/o como fuente tradicional de antibióticos (Moerman, 1996).

Las técnicas ancestrales para obtener un concentrado de estos compuestos secundarios (destilación, deshidratación, pulverización,...) dependen de la especie vegetal (coníferas, rutáceas, umbelíferas, mirtáceas, crucíferas, rosáceas, liliáceas y labiadas) y de la naturaleza del compuesto (terpenos, aceite, fenoles, AA, alcoholes, aldehidos y cetonas). Los campos de aplicación de los extractos naturales de plantas son diversos: alimentación, farmacia, perfumería, cosmética, colorantes, aromatizantes y saborizantes de alimentos y bebidas, etc. (Font Quer, 1988; Muñoz y Cases, 1992; Cowan, 1999).

No hay duda que las plantas han contribuido de modo importante a satisfacer las necesidades físicas, espirituales y religiosas de la humanidad. En la actualidad, laboratorios en todo el mundo han acumulado cantidades importantes de información sobre estas sustancias y sus actividades fitoquímicas (Cowan, 1999; Kamel, 2001). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los efectos que estos extractos naturales ejercen sobre la fisiología ruminal y, en especial, sobre las poblaciones microbianas ruminales.

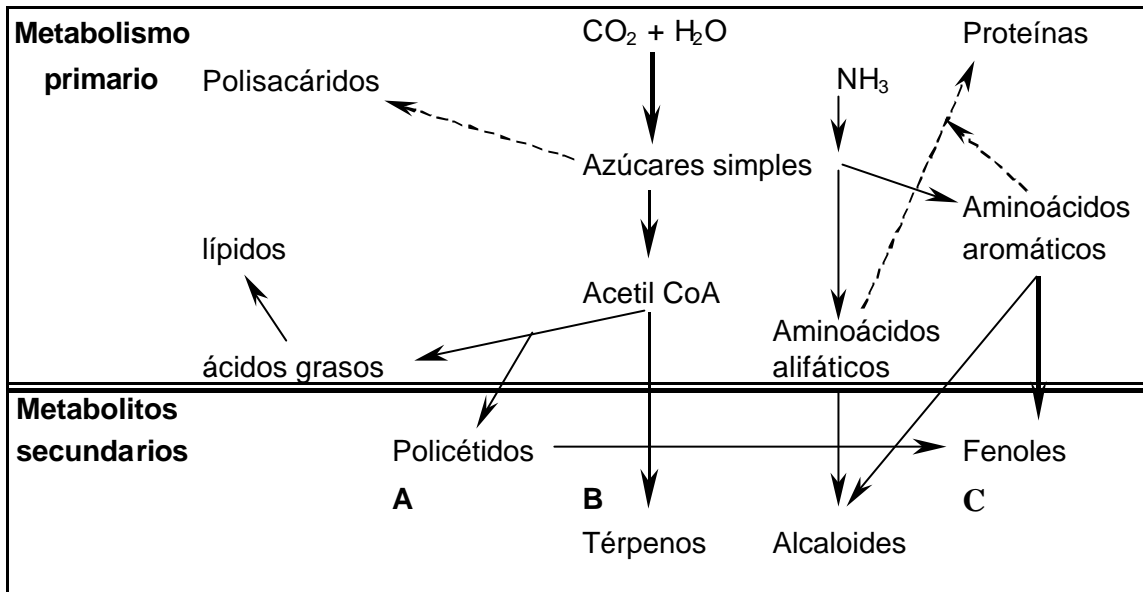
### **2.7.3. Principios activos y propiedades**

Los extractos naturales de plantas contienen una gran cantidad de sustancias químicas que actúan de diversas maneras sobre la fisiología y el metabolismo del hombre y de los animales (Tabla 3). Éstos representan una posible alternativa al vacío originado por las normativas que prohíben el uso de antibióticos en Europa (Comunidad Europea, 2003). Asimismo, Costa Batllori et al. (1999) afirmaron que a las dosis recomendadas carecen de efectos secundarios y de contraindicaciones. Los diversos compuestos secundarios que son producidos por las plantas como mecanismos de defensa influyen



sobre la degradación y utilización de elementos nutritivos por el animal (Fahey y Berger, 1993). Entre ellos se encuentran ligninas, fenoles, alcaloides, taninos, aceites esenciales, saponinas y esteroides (Van Soest, 1982; Cowan, 1999).

El metabolismo primario (Figura 4) proporciona pequeñas moléculas (ácido siquímico, acetato, AA) que constituyen el punto de partida de las rutas del metabolismo secundario.



**A**, ruta del acetato-malonato.

**B**, ruta del acetato-mevalonato.

**C**, ruta del ácido siquímico.

**Figura 4.** Formación de los compuestos secundarios (Piñol et al., 2000)

Por ejemplo, la ruta del ácido siquímico da origen a muchos compuestos aromáticos (AA aromáticos, ácidos cinámicos y ciertos polifenoles). El acetato es precursor de los ácidos grasos y de los policétidos a través de la ruta del acetato-malonato, y de los terpenos o isoprenoides a través de la ruta del acetato-mevalonato. Los AA son precursores de los alcaloides y de antibióticos peptídicos que incluyen las penicilinas y las cefalosporinas (Piñol et al., 2000).

Los extractos naturales que pueden tener efectos sobre la fermentación ruminal pueden contener grupos fenólicos, terpenos o AA aromáticos de

manera individual. Sin embargo pueden estar asociados con otros compuestos secundarios como alcaloides, taninos o cumarinas, entre otros (Cowan, 1999).

### **2.7.3.1. Fenoles y polifenoles**

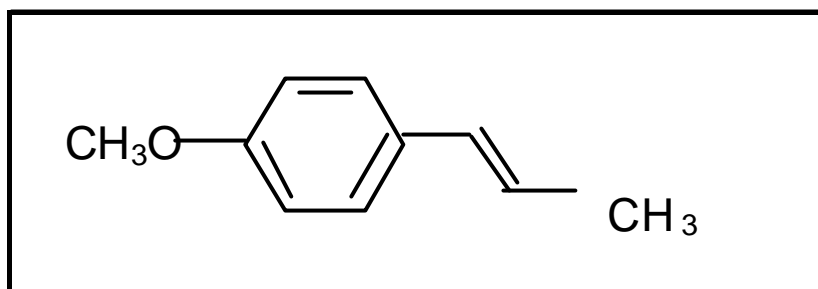
Los fenoles y polifenoles son los metabolitos más simples, compuestos de un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes como hidroxilos, carboxilos y metoxilos (Cowan, 1999). Los fenoles se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono que poseen. Existen fenoles simples ( $C_6$ ) y derivados con cadenas laterales de uno, dos o tres carbonos. Los fenoles son importantes económicamente porque contribuyen al sabor, aroma y color (Piñol et al., 2000).

La gran cantidad de grupos hidroxilo hace que los fenoles sean muy reactivos, proporcionándoles numerosos puntos de anclaje para formar puentes de hidrógeno, formando así asociaciones reversibles con otras moléculas. Los fenoles tienen mayor afinidad por las proteínas debido a la fuerte tendencia a formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los fenoles y el oxígeno del grupo carbonilo de los péptidos (Van Soest, 1982). Además, se atribuye a la mayoría de compuestos fenólicos propiedades antimicrobianas, antioxidantes y terapéuticas (Van Soest, 1982; Helander et al., 1998; Davidson and Naidu, 2000), actuando como desacopladores de la membrana celular externa y provocando así un gasto de ATP intracelular hasta el punto de provocar la muerte celular (Davidson y Naidu, 2000).

#### **2.7.3.1.1. El anetol**

El anetol (Figura 5) es un compuesto polifenólico o fenilpropanoide ( $C_{10}H_{12}O$ ) utilizado en medicina humana como estimulante de la digestión (Kamel, 2001). Este compuesto se encuentra en el aceite esencial del anís (*Pinpinella anisum*), planta anual que pertenece a la familia Umbelífera (Curtin et al., 1991) originaria de Oriente y cultivada para aprovechar el fruto y la semilla.

El aceite esencial de anís contiene entre un 80 y 90% de anetol (Nombekela et al., 1994; Kamel, 2001). Asimismo, contiene pequeñas cantidades de almidón, azúcares y hasta un 19% de materias proteicas (Font Quer, 1988). Está demostrado que el anetol es el principal responsable de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís (Davidson and Naidu, 2000).



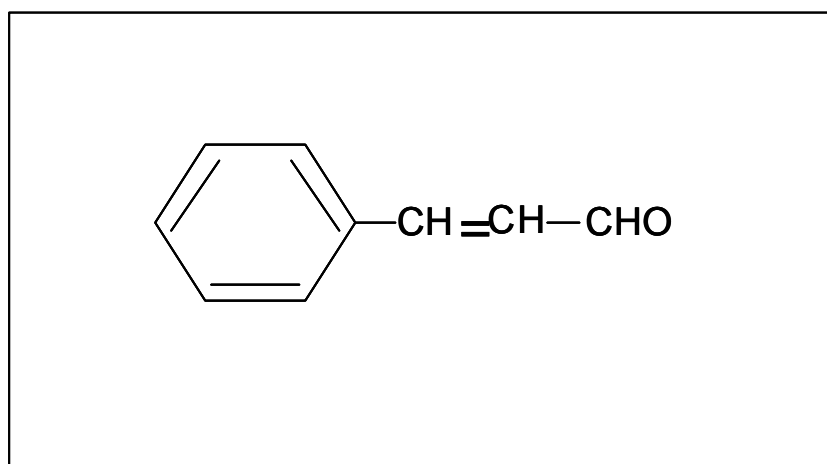
**Figura 5.** Estructura química del anetol (Piñol et al., 2000)

Miller et al. (1958) utilizaron el anís como estimulante en la palatabilidad de piensos de inicio para terneras. Basados en ese trabajo, Nombekela et al. (1994) utilizaron 0.15 Kg de aceite esencial de anís/100 Kg de alimento (M.S.) como saborizante en dietas para vacas de leche y observaron que no influyó en la ingestión de alimento. En un estudio de dosis crecientes (0, 3, 30, 300, y 3000 mg/L) de varios extractos naturales de plantas y algunos metabolitos secundarios en estado puro sobre las características de fermentación de líquido ruminal de vacas lecheras en un prueba in vitro de 24 horas de incubación (Busquet et al., 2005), se observó que el extracto de anís (86% de anetol) y el anetol en estado puro tuvieron un comportamiento similar sobre los parámetros fermentativos. Ambos disminuyeron la concentración de AGV totales, y las proporciones molares de acetato y propionato, respectivamente, incrementaron la proporción molar de butirato y la concentración de AGV ramificados, pero no modificaron la concentración de N amoniacal. Busquet et al. (2005) concluyeron que aunque el anetol mostró una alta capacidad para modificar la fermentación ruminal, este componente redujo al mismo tiempo la concentración de acetato y propionato, los cuales son precursores principales

de la síntesis de grasa en la glándula mamaria para el caso del acetato, y de la síntesis de glucosa en el hígado para el caso del propionato. A parte de estos trabajos, no existe más información acerca de los efectos del anetol sobre la fermentación ruminal.

#### 2.7.3.1.2. Cinnamaldehido

El cinnamaldehido (Figura 6) es el principal componente antimicrobiano de la canela. Es un compuesto polifenólico (3-fenil-2-propenal fenol) cuya concentración está alrededor del 75% en el aceite esencial de la canela (Davidson y Naidu, 2000).



**Figura 6.** Estructura química del cinnamaldehido (Davidson y Naidu, 2000)

La canela de china (*Cinnamomum cassia*) es un árbol originario del suroeste tropical de Asia, Sri Lanka (antiguo Ceilán), Malasia e Indonesia, perteneciente a la familia Lauracea, que incluye más de un millar de especies leñosas propias de los países cálidos. El árbol alcanza unos 15 m de altura aproximadamente y está recubierto de una corteza amarillenta y aromática, de sabor picante y dulce, la cual, por descortezamiento, se separa en tiras que se enrollan sobre sí mismas. El fruto verde también es utilizado como condimento, y de las ramas y hojas se obtiene un aceite esencial utilizado en perfumería (Strasburger et al. 1985; Font Quer, 1988). La canela se usa como estimulante, aromático, aperitivo, astringente, carminativo, digestivo, para ayudar a la

secreción del jugo gástrico, en el tratamiento de náuseas, vómito, reumatismo, gripe e hipertensión (Kamel, 2001). El aceite esencial ha demostrado tener una gran capacidad inhibitoria sobre musgos y algunas bacterias patógenas (Helander et al., 1998).

El mecanismo de acción del cinnamaldehído aun no está muy claro. Sin embargo, Helander et al. (1998) observaron que el cinnamaldehído tenía una gran capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de enterobacterias mediante un mecanismo distinto a los demás agentes antimicrobianos, que actúan como desacopladores de la membrana celular externa, provocando un mayor gasto de ATP intracelular (Davidson y Naidu, 2000). Helander et al. (1998) formularon la hipótesis que el cinnamaldehído podía acceder al periplasma y al interior de la célula a través de la ruta de absorción de las proteínas (porin proteico) y provocar su efecto inhibitorio desde el interior de la célula.

Aunque existen algunos estudios sobre los efectos de los grupos cinámicos y sus propiedades, la información es limitada. Un trabajo realizado en pequeños vertebrados sugiere que estas sustancias tienen efectos sobre las pautas de ingestión de materia seca. Gurney et al. (1996) señalaron que la cinnamamida (componente muy similar al cinnamaldehído) redujo un 32 y 17 % la ingestión de materia seca en ratones domésticos y de monte, respectivamente. Ninguna de las dos especies de ratones encontraron aversión al alimento en un principio, pero su consumo se redujo considerablemente a partir del primer día. En el caso de los ratones domésticos, el consumo de alimento permaneció siempre bajo durante el tiempo que duro el experimento, posiblemente porque existió alguna dolencia post ingestión que provocó que los animales cesaran de comer. Asimismo, observaron que a dichos ratones la cinnamida les provocó una reacción de irritación en la boca y en las patas. Sin embargo, en los ratones de monte la aversión al alimento tratado desapareció al segundo día del experimento, retornando a los niveles de consumo de materia seca del grupo control. Gurney et al. (1996) señalaron que la respuesta repulsiva al alimento tratado con cinnamamida podía estar relacionada con los hábitos alimenticios de las especies estudiadas. El ratón de monte generalmente se alimenta de semillas dicotiledóneas y trozos de hojas, las cuales contienen componentes tóxicos que le sirven de defensa, y como consecuencia su sistema digestivo encuentra estrategias para reducir dicha

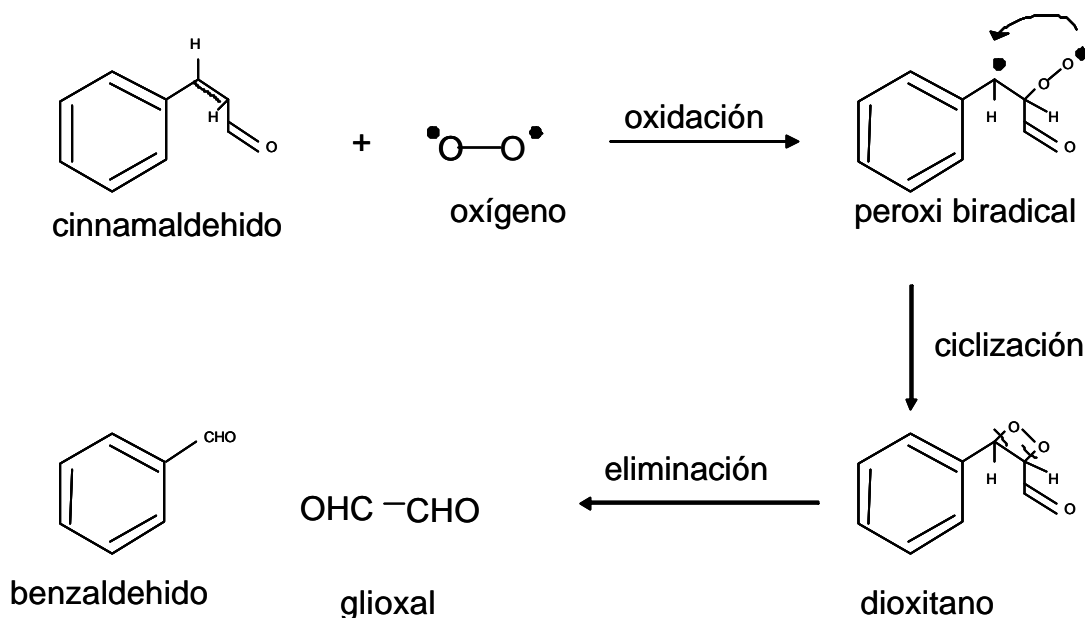
toxicidad. Es posible que esta capacidad de adaptación permitiera también la adaptación a la cinnamamida. En cambio, el ratón doméstico tiene menos oportunidades de encontrar esa gama de compuestos secundarios en sus hábitos alimenticios, por lo que su sistema digestivo no está preparado para reducir los efectos tóxicos de dichos compuestos secundarios.

Estas observaciones coinciden con un estudio realizado por Busquet et al. (2003) en vacas de alta producción que al consumir 600 mg de cinnamaldehído por Kg de concentrado, disminuyeron la ingestión de MS del concentrado respecto al control.

Por otro lado, un estudio en cultivos continuos de doble flujo y simulando las condiciones ruminales de vacas de alta producción, manteniendo el pH a 6.4 y con una dieta 50:50 relación forraje concentrado (Busquet et al., 2005a), se observó que 2.3 mg/L de cinnamaldehído tendió ( $P < 0.10$ ) únicamente a reducir la proporción molar de acetato. Asimismo, se observó un incremento numérico, pero no significativo, de la proporción de butirato, y no se vio ningún efecto sobre la proporción molar de propionato. Posteriormente, Busquet et al. (2005b) probaron una serie de extractos naturales de plantas (incluido el cinnamaldehído) a dosis entre 3 y 3000 mg/L en una prueba in vitro con líquido ruminal de vacas de alta producción y manteniendo las mismas condiciones de fermentación que el estudio anterior, y observaron que la dosis alta de cinnamaldehído redujo negativamente la concentración total de AGV y aumentó la proporción molar de propionato, lo que demuestra su actividad antimicrobiana. A la dosis 300 mg/L el cinnamaldehído tendió a reducir la concentración total de AGV, y aumentó la proporción molar de butirato, pero no afectó a la proporción molar de acetato y propionato. Finalmente, una dosis entre 3 y 30 mg/L de cinnamaldehído no afectó a ningún parámetro de fermentación ruminal, concluyendo que las respuestas variables del primer estudio comparado con éste podrían deberse a las diferentes dosis utilizadas, al sistema de fermentación utilizado, o al tiempo de fermentación al que fueron expuestas las poblaciones microbianas ruminales.

Sin embargo, Friedman et al. (2000) investigaron por cromatografía de gases las concentraciones de cinnamaldehído y su poder antimicrobiano después de que algunos alimentos para consumo humano pasaran por un

proceso de altas temperaturas con el fin de mejorar su conservación, y observaron que el cinnamaldehído en presencia de oxígeno e inducido por el incremento progresivo de la temperatura se transformaba en benzaldehído, perdiendo su capacidad antimicrobiana (Figura 7).



**Figura 7.** Mecanismo de transformación del cinnamaldehído a benzaldehído (Friedman et al., 2000)

Desde el punto de vista de los procesos físicos del tratamiento de los alimentos para alimentación animal, que incluyen el partido, picado, molido, peletizado y copos, entre otros (Nocek y Tamminga, 1991), o en la henificación con ventilación forzada (De Blas et al., 1987), mucho de estos procesos generan temperaturas que pueden ocasionar alteraciones en las propiedades antimicrobianas del cinnamaldehído en dietas de los animales (Friedman et al., 2000).

### 2.7.3.1.3. El eugenol

El eugenol (4 alil - 2 metoxi fenol) es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo (*Eugenia caryophyllus* o *Syzygium*

*aromaticum*), y es el segundo componente secundario de la canela (Davidson y Naidu, 2000). La concentración de eugenol en el clavo está alrededor del 81% y en la canela está alrededor del 8% y tiene una fuerte actividad antimicrobiana (Davidson y Naidu, 2000).

El clavo (*Eugenia caryophyllus* o *Syzygium aromaticum*) es un árbol de la familia de las mirtáceas que tarda unos veinte años en desarrollarse, con una altura entre doce y quince metros, y que puede seguir produciendo fruto durante cincuenta años. Sus hojas se parecen bastante a las del laurel. Su ambiente ideal es el clima marítimo y tropical. Su nombre procede del latín *clavus*, ya que el capullo seco sin abrir recuerda esta forma. El clavo posee un aroma picante ácido, fuerte y amargo, que deja una última sensación de frío en la boca (González, 2002).

Jayashree y Subramanyam (1999) señalaron que el eugenol podía reducir la producción de aflatoxinas inhibiendo la peroxidación lipídica de *Aspergillus parasiticus*. Por otro lado, también se ha determinado que el eugenol posee una fuerte capacidad antibacteriana (Davidson y Naidu, 2000).

Busquet et al. (2005a) estudiaron el efecto de 2.3 mg/L de aceite de clavo (81% de eugenol) en cultivos continuos de flujo doble utilizando líquido ruminal de vacas de producción, y observaron que el clavo disminuyó las proporciones molares de acetato y la concentración de AGV de cadena ramificada, y aumentó la proporción molar propionato. Asimismo, aumentó en un 80% la concentración media de N peptídico y disminuyó numéricamente la concentración media de N aminoacídico respecto al control.

Posteriormente, Busquet et al. (2005b) realizaron otro estudio de fermentación ruminal in vitro de 24 horas simulando las condiciones de vacas de producción, y observaron que el aceite de clavo (81% de eugenol) y el eugenol (99% de pureza) tuvieron efectos similares sobre la fermentación ruminal; ambos compuestos a dosis altas (3000 mg/L) disminuyeron la concentraciones de N amoniacal y AGV totales, y aumentaron el pH final, y el eugenol aumentó la proporción molar de propionato y disminuyó la proporción molar de butirato. A dosis 300 mg/L, ambos compuestos aumentaron la



proporción molar de butirato, y el aceite de clavo a dosis 300 mg/L disminuyó la proporción de acetato.

La acumulación de N peptídico en el primer trabajo de Busquet et al. (2005a) y la reducción de la concentración de N amoniacal en el segundo nos permite sugerir que el eugenol afecta la degradación de la proteína, inhibiendo la peptidólisis y la desaminación. Además, las propiedades antioxidantes que posee el eugenol (Davidson y Naidu, 2000) pueden ayudar a la hora de ser mezclado con otros compuestos secundarios susceptibles a cambio por temperatura u oxidación. Por ejemplo, Friedman et al. (2000) observaron que el cinnamaldehído perdía su capacidad antimicrobiana en presencia de oxígeno e inducido por el incremento de la temperatura (Figura 7). Sin embargo, cuando combinaron el cinnamaldehído con eugenol y los sometieron a las mismas temperaturas, observaron que el eugenol actuó como protector del cinnamaldehído y redujo la transformación del cinnamaldehído a benzaldehído. Los autores concluyeron que el eugenol protegía al cinnamaldehído frente a los mecanismos oxidativos ocasionados por los procesos térmicos de conservación.

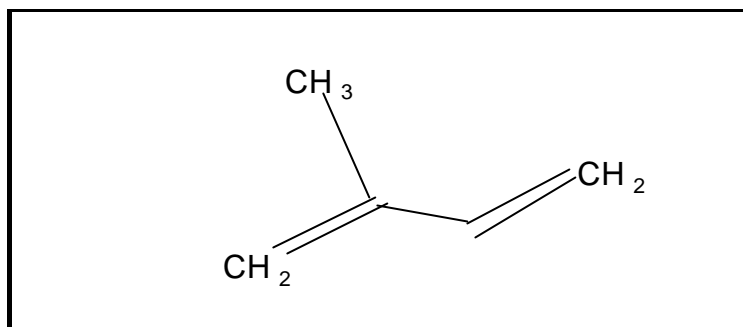
En este sentido, el papel del eugenol puede ser trascendental desde el punto de vista de los procesos físicos de tratamiento de los alimentos, o en los procesos fermentativos de los ensilajes, entre otros.

### **2.7.3.2. Los terpenos y aceites esenciales**

Las mezclas de sustancias que componen las fragancias de las plantas se llaman aceites esenciales. Estos componentes volátiles pertenecen a una clase de sustancias químicas llamadas terpenos (Figura 8; Pine et al., 1990).

El nombre “terpeno” deriva de la trementina, un líquido volátil obtenido de los pinos. Estos hidrocarburos insolubles en agua, denominados a menudo aceites esenciales (Pine et al., 1990; Vollhardt, 1990; Cowan, 1999) no sólo contienen compuestos terpénicos, sino que también pueden estar mezclados con otros compuestos secundarios como fenoles, alcaloides y/o AA aromáticos, entre otros (Cowan, 1999). Los terpenos son sintetizados en las plantas por la unión de al menos dos unidades moleculares de cinco átomos de carbono

similares al isopreno (2-metil-1,3 butadieno), por lo que se denominan “unidades de isoprenos” (Figura 8; Volhardt, 1990).



**Figura 8.** Unidad de isopreno de los terpenos (Vollhardt, 1990)

La clasificación de los terpenos está determinada por el número de carbonos que poseen y las unidades de isoprenos que las forman (Tabla 4). Oh et al. (1968) estudiaron los efectos de los aceites esenciales sobre bacterias ruminales, y demostraron que los componentes individuales de los aceites esenciales tienen efectos diferentes cuando están aislados que cuando están en la mezcla. Asimismo, los aceites esenciales tienen la capacidad de modificar la fermentación ruminal, disminuyendo la degradación de la proteína (McIntosh et al., 2000; Newbold et al., 2004; Molero et al., 2004) inhibiendo la desaminación de los AA y provocando una reducción en la concentración de N amoniacal en el rumen (McIntosh et al., 2000; Newbold et al., 2004).

**Tabla 4.** Clasificación de los terpenos (Pine et al., 1990)

Clase	Número de átomos de Carbono	Número de unidades de isoprenos
Monoterpeno	10	2
Sesquiterpeno	15	3
Diterpeno	20	4
Triterpeno	30	6
Tetraterpeno	40	8

En contraste, Castillejos et al. (2003) estudiaron el efecto de 16 mg/d de una mezcla de aceites esenciales (limonene, guayacol y timol) en cultivos continuos de flujo doble utilizando líquido ruminal de vacas lecheras, y observaron que dicha mezcla de aceites esenciales aumentó la concentración de AGV totales, modificó la proporción molar de AGV individuales y disminuyó la degradación de la proteína sin afectar a la peptidólisis ni a la desaminación.

Cowan (1999) señaló también que pueden existir combinaciones entre aceites esenciales y otros compuestos secundarios como los fenoles o alcaloides, entre otros, y que las propiedades antimicrobianas varían de una combinación a otra. Además, el contenido de aceites esenciales en las plantas no es constante, ya que influyen factores como la variedad, el área geográfica, el clima, la época de recolección y los sistemas de cultivo (Costa-Batllore et al., 1999).

Por esas razones, es necesario clarificar las utilidades de los aceites esenciales como tales y ser conscientes de la gran variabilidad que se puede generar al utilizarlos por separado o en mezclas.

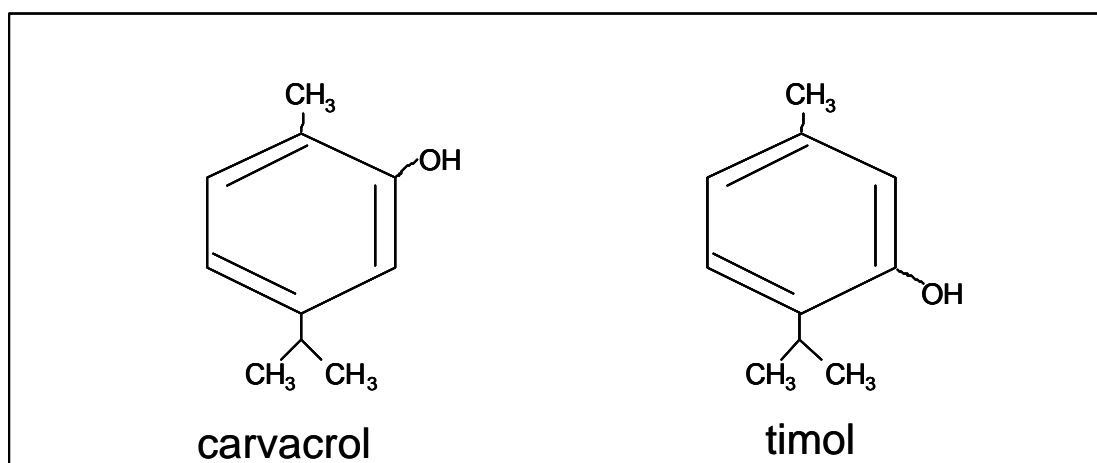
### **2.7.3.2.1. Monoterpenos**

#### **2.7.3.2.1.1. Carvacrol y timol**

El carvacrol ( $C_{10}H_{14}O$ ) y el timol ( $C_{10}H_{14}O$ ) son monoterpenos (Figura 9) considerados los componentes activos principales en el aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*), planta labiada del género de las Origanum (Strasburger et al. 1985), y del tomillo (*Thymus vulgaris*), planta labiada del género *Thymus* (Sivropoulou et al., 1996). Algunos autores señalan que el orégano contiene más de 30 componentes secundarios (Font Quer, 1988) con propiedades antibacterianas. Sin embargo, otros autores señalan que de estas 30 sustancias, sólo 3 o 4 tienen efectos negativos sobre las bacterias (Kamel, 2001).

El orégano, debido a la cantidad de carvacrol y timol que contiene, puede ser un buen antiséptico (20 veces más potente que el fenol) y antifúngico (Harborne et al., 1999). Se han observado efectos inhibitorios del aceite esencial de orégano frente a algunas bacterias patógenas en

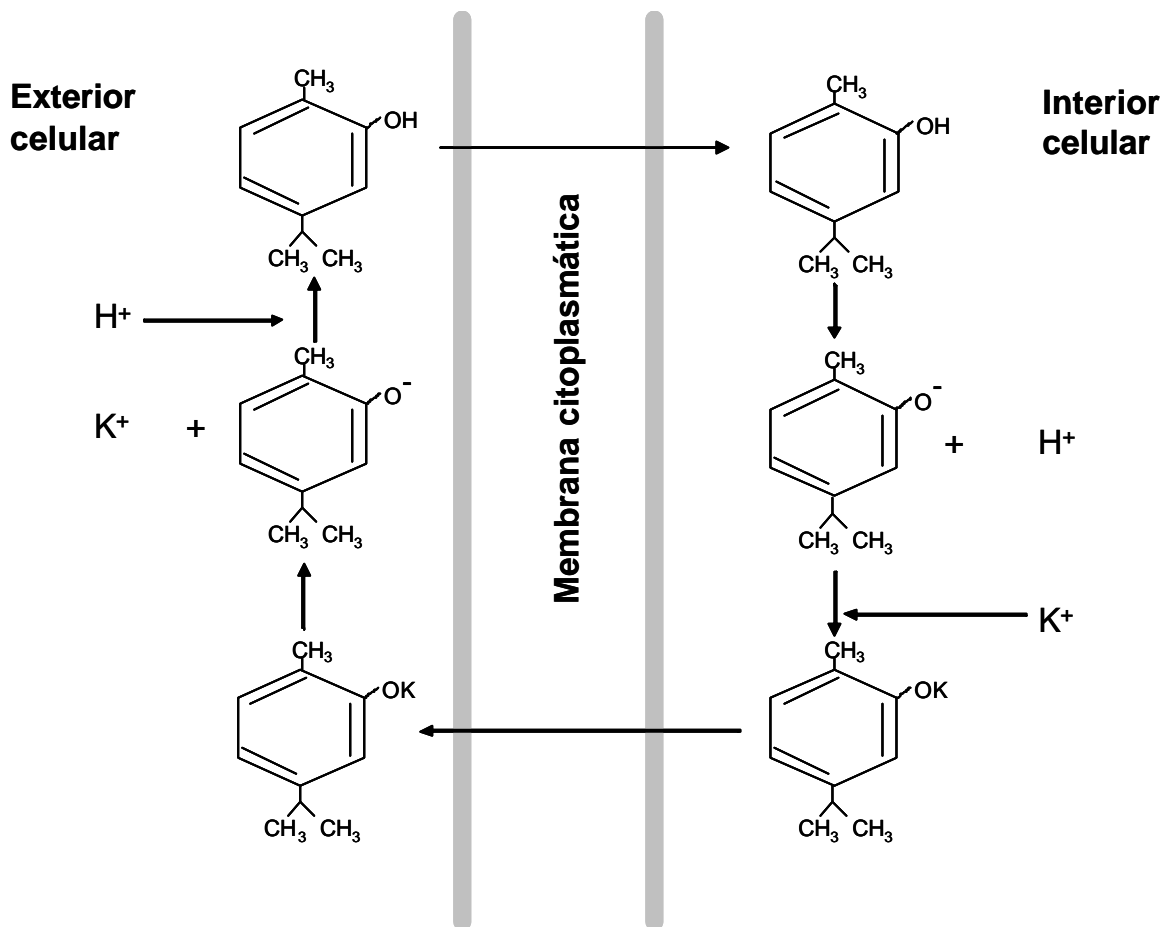
condiciones aeróbicas (Paster et al., 1990). Asimismo, la acción antibacteriana del timol es aún mayor bajo condiciones anaeróbicas. Estas diferencias pueden justificarse por la oxidación del timol y carvacrol en presencia de oxígeno, que pierden parcialmente sus actividades antibacterianas. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas, la falta de tensión de oxígeno puede provocar una baja producción de energía del metabolismo bacteriano y, consecuentemente, incrementa la sensibilidad de los microorganismos a la toxicidad de estos metabolitos (Juven et al., 1994).



**Figura 9.** Estructura química del carvacrol y del timol (Harborne et al., 1999)

Helander et al. (1998) observaron que el timol y el carvacrol poseen una gran capacidad antimicrobiana sobre bacterias gram-positivas y, en particular, sobre las gram-negativas al actuar como desintegradores de la pared celular externa e inhibir su crecimiento. Juven et al. (1994) indicaron también que estos metabolitos, después de penetrar en el citoplasma bacteriano, interactúan con enzimas del periplasma provocando cambios en las proteínas de la membrana celular afectando la fuerza motriz de los protones a través de la membrana. Ultee et al. (2002) indicaron que el grupo oxidrilo que poseen ambos compuestos parece ser el responsable de su capacidad antimicrobiana. Estos autores propusieron que el carvacrol y/o el timol podrían actuar como portadores de cationes monovalentes a través de la membrana celular (Figura 10).

Estos compuestos podrían atravesar la membrana celular hacia el citoplasma y disociarse, y el grupo oxidrilo intercambiaría su protón por otro ion (por ejemplo potasio) para volver a salir a través de la membrana citoplásmica al medio externo, arrastrando un ion de potasio (u otro catión). Una vez en el espacio extracelular, liberaría el potasio al medio y volvería a tomar otro protón para volver a atravesar la membrana citoplasmática y realizar otro ciclo, causando la pérdida de la fuerza motriz de los protones y, por lo tanto, reduciendo la síntesis del ATP hasta provocar la muerte celular.



**Figura 10.** Actividad hipotética del carvacrol (Ultee et al., 2002)

Juven et al. (1994) estudiaron los efectos del timol y carvacrol sobre dos bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimirium*) en un medio de cultivo de agar, y observaron que el efecto antibacteriano de timol era

mayor a pH 5.5 que a 6.5, y sugirieron que estas diferencias se debieron a las interacciones entre las características estructurales de los fenoles, la membrana citoplasmática de la bacteria y el medio de cultivo. A valores de pH bajos, las moléculas del timol están indisociadas, es decir, más hidrofóbicas, lo que les permiten unirse mejor con partes hidrofóbicas de las proteínas de la membrana celular, disolviéndose mejor en la fase lipídica de la membrana celular.

En estudios in vitro con microorganismos ruminales, Evans y Martin (2000) observaron que el uso de timol (Figura 9) a dosis de 90 a 400 mg/L tenía una potente actividad inhibidora de la fermentación de la glucosa por parte de las bacterias ruminales gram-negativas *Selenomonas ruminantium* y *Streptococcus bovis*, reduciendo la concentración de acetato, lactato, metano y la relación acetato:propionato, e incrementando el pH.

Busquet et al. (2005b) en otro estudio in vitro de 24 h de fermentación con líquido ruminal de vaca en producción, indicaron que a dosis de 3000 mg/L de aceite esencial de orégano (64% de carvacrol) y de carvacrol (99% de pureza) aumentaron la proporción molar de propionato, y que el carvacrol redujo la concentración de N amoniacal y de AGV de cadena ramificada. A dosis 300 mg/L ambos compuestos aumentaron la proporción molar del butirato y disminuyeron las proporciones molares de propionato y acetato. Finalmente, a dosis 3 y 30 mg/L, ningún compuesto afectó a los parámetros fermentativos ruminales.

Todos los efectos observados sugieren que el carvacrol y el timol podrían inhibir tanto a las bacterias gram-positivas (la mayoría productoras de acetato y butirato) y a las gram-negativas (productoras principalmente de propionato) dependiendo de la dosis suministrada, pudiendo modificar la fermentación microbiana ruminal de forma considerable.

#### **2.7.3.2.2. Triterpenos**

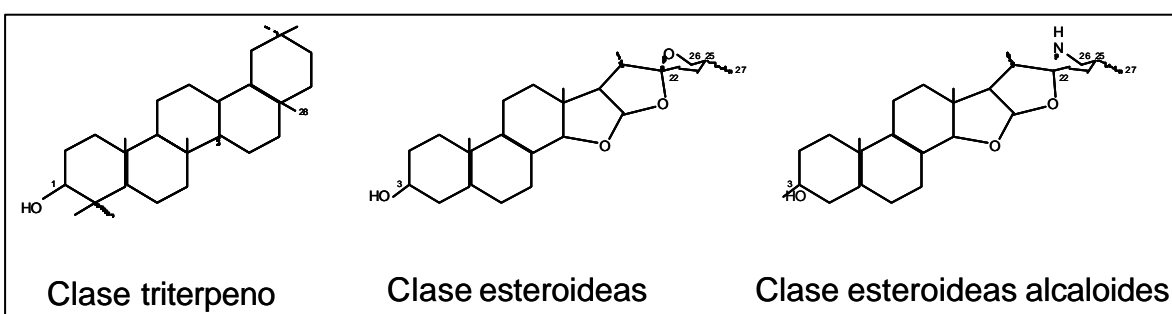
Los esteroides (alcoholes esteroideos) son triterpenoides formados a partir de seis unidades de isoprenos. A este grupo pertenecen las saponinas triterpénicas, que desempeñan funciones importantes en la planta. Dichas

saponinas se han empleado como detergentes naturales, ya que son sustancias que rebajan la tensión superficial y producen espuma al contacto con el agua. Tienen, además, la capacidad de unirse al colesterol impidiendo su absorción (Salisbury y Ross, 1992).

### 2.7.3.2.2.1. Saponinas y sarsaponinas

La mayoría de las plantas que contienen saponinas no tienen un sólo compuesto sino una mezcla compleja, con diferencias en agliconas (radicales alcohólicos) o en la longitud y composición de la cadena glicídica, lo que influye en sus propiedades. Las diferentes clases de saponinas están agrupadas en tres principales grupos: triterpénicas, esteroideas y en alcaloides esteroideos (Figura 11; Wallace et al., 2002).

El extracto de la yuca (*Yucca schidegkii*), planta liliácea de América perteneciente al género *Yucca* (Oser, 1966) contiene dos compuestos: una glicofracción denominada sarsaponina (esteroide glicosídico perteneciente a los triterpenos), con capacidad de fijar nitrógeno amoniacal; y otra fracción, la saponina, que tiene efectos antiprotozoarios y antibacterianos (Wallace et al., 1994).



**Figura 11.** Estructuras químicas de las saponinas (Wallace et al., 2002)

La alfalfa también es rica en saponinas triterpenoideas (5.6 a 8.0 % de saponinas en MS; Fenwick y Oakenfull, 1983), y aunque se ha sospechado por mucho tiempo algún tipo de relación entre las saponinas de la alfalfa y el timpanismo, Klita et al. (1996) no observaron ningún incidente de timpanismo

en ovejas alimentadas con dietas altas en forraje y 520 mg/d de saponinas de raíz de alfalfa.

Estudios con extracto de yuca (Goodall y Matsushima, 1980) observaron que 40 mg/kg de extracto de yuca mejoró la digestibilidad de nutrientes (6%), aunque la ingestión de alimentos se redujo un 7% en novillas de un año. Posteriormente, Goodall et al. (1982) observaron que 60 mg/kg de sarsaponina en dietas para terneros no afectaron al consumo de materia seca de los animales. Sin embargo, la ganancia de peso incrementó en 0.04 kg/d (2.38%) respecto al grupo control. Otros estudios confirmaron la idea de que las saponinas no afectan al consumo de materia seca en terneros (Hussain y Cheeke, 1995; Hristov et al., 1999) ni en vacas lecheras (Wu et al., 1994; Wilson et al., 1997). En cambio, al extracto de yuca se le atribuyen efectos sobre la fermentación ruminal (Goetsch y Owens, 1985).

Algunos estudios indican que las saponinas no tienen ningún efecto sobre la concentración total de AGV en terneros (Hussain y Cheeke, 1995; Hristov et al., 1999, nivel de inclusión de 3.0 y 2.6 g/d de saponina pura del extracto de yuca, respectivamente), en ovejas (Klita et al., 1996, nivel de inclusión 520 mg/d de saponinas puras de extracto de alfalfa), o en vacas lecheras (Wu et al., 1994; Wang et al., 1998, nivel de inclusión 1.2 g/d y 22 mg/L de saponinas puras de extracto de yuca, respectivamente), ni en las proporciones molares de AGV individuales en vacas lecheras (Valdez et al., 1986; Wu et al., 1994, nivel de inclusión 1.5 y 1.2 g/d de saponinas puras de extracto de yuca, respectivamente) y en ovejas (Klita et al., 1996). Sin embargo otros estudios en cultivos in vitro (Grobner et al., 1982; Ryan et al., 1997) e in vivo (Hristov et al., 1999) observaron que el extracto de yuca puede incrementar la proporción molar de propionato y, en algunos casos, reducir la proporción molar de acetato.

Muchos autores demostraron la capacidad de la sarsaponina de atrapar amoníaco cuando las concentraciones en el rumen son altas, y liberar  $\text{NH}_3$  cuando las concentraciones son relativamente bajas (Wu et al., 1994). Wu et al. (1994) calcularon que el extracto de yuca a dosis entre 6 y 8 g/d podían atrapar únicamente 34 % de  $\text{N-NH}_3/\text{g}$  extracto al 90% de saturación. Grobner et al. (1982), utilizando dosis de 60 mg/kg de extracto de yuca en cultivos continuos,



observaron una tendencia a reducir ( $P < 0.08$ ) en un 15% la concentración de N amoniacal después de 7 días de fermentación. Wallace et al. (1994) también observaron una reducción del 6% en la concentración de N amoniacal en incubaciones in vitro con líquido ruminal filtrado que contenía 10 mg/L de extracto de yuca. Ryan et al. (1997) observaron que la adición de 6.250 mg/kg de extracto de yuca disminuyó la concentración de N amoniacal de 17.0 a 15.6 mmol/L después de 48 h de incubación in vitro. En contraste, otros estudios en terneros (Wu et al., 1994, nivel de inclusión de 400 mg/kg de extracto de yuca; Hristov et al., 1999, nivel de inclusión de 5.825 mg/kg de extracto de yuca), en ovejas (Klita et al., 1996, nivel de inclusión 520 mg/d de saponinas puras de extracto de alfalfa), en vacas lecheras (Goetsch y Owens, 1985, nivel de inclusión de 60 mg/kg de extracto de yuca; Wilson et al., 1997, nivel de inclusión de 450 mg/kg de extracto de yuca; Wang et al., 1998; nivel de inclusión 0.5 mg/L de saponina pura de extracto de yuca), en terneros de engorde (Hussain y Cheeke, 1995, nivel de inclusión 250 mg/kg de extracto de yuca con el 30% de concentración de sarsaponinas) y en algunas pruebas in vitro (Wang et al., 1998; nivel de inclusión 44.000 mg/kg de extracto de yuca) no observaron efectos sobre la concentración de N amoniacal.

Las saponinas de diversas especies de plantas han demostrado tener un efecto tóxico sobre los protozoos ruminales (Francis et al., 2002). Tanto estudios in vitro (Wallace et al., 1994; nivel de inclusión 10 mg/L de extracto de yuca; Makkar et al., 1997, nivel de inclusión de 1200 mg/L de fracciones de saponinas; Wang et al., 1998; nivel de inclusión 44.000 mg/kg de extracto de yuca) como in vivo (Valdez et al., 1986, nivel de inclusión de 1500 mg/d de saponina pura de alfalfa; Klita et al., 1996; nivel de inclusión 520 mg/d o 64 mg/L de saponinas puras de extracto de alfalfa; Hristov et al., 1999, nivel de inclusión de 5.825 mg/kg de extracto de yuca) han observado una reducción del número de protozoos ruminales como consecuencias de la presencia de saponinas en el medio.

Dicho efecto de las saponinas se puede explicar por la presencia de colesterol en las membranas de la célula de los protozoos (Williams y Coleman, 1988; Wallace et al., 2002; Hristov et al., 1999). Las saponinas tienen la

capacidad de unirse al colesterol a través de su grupo OH y causar la ruptura de las membranas de la célula de los protozoos (Francis et al., 2002).

En estudios realizados con animales defaunados, demostraron que la ausencia de protozoos no afectó a los animales de forma adversa, pero disminuyó la concentración de amoníaco en el rumen y aumentó el flujo de N bacteriano al duodeno (Ivan et al., 1991; Koenig et al., 2000). Sin embargo, se cree que los protozoos ejercen un efecto estabilizador en el rumen, al ingerir partículas alimentarias y almacenar polisacáridos de reserva y, en consecuencia, mantener una fermentación más uniforme durante los intervalos entre tomas de alimento (Yokohama y Johnson, 1988).

Sin embargo, el efecto global de las saponinas parece mejorar el rendimiento de los animales bajo determinadas condiciones de alimentación (dietas ricas en concentrado y/o elevados contenidos de NNP).

### **2.7.3.2.3. Tetraterpenos**

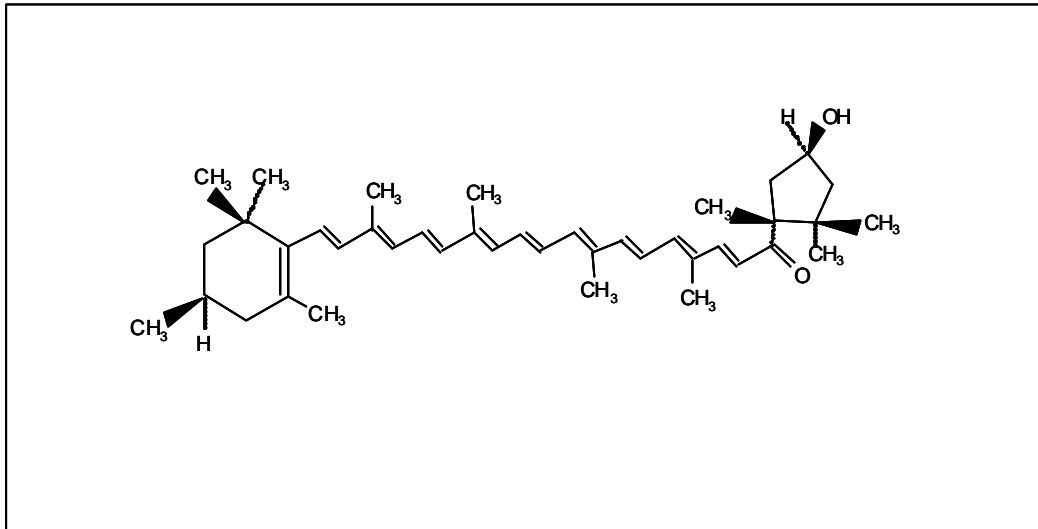
#### **2.7.3.2.3.1. Capsaicina**

La capsaicina ( $C_{40}H_{56}O_3$ ), presente en el pimentón (*Capsicum Annuum*), es un carotenoide perteneciente a los tetraterpenos ( $C_{40}$ ), pigmento liposoluble que posee propiedades antimicrobianas (Cichewicz y Thorpe, 1996).

El pimiento es una planta anual perteneciente a la familia de las Solanaceas, originaria de América Central (Strasburger et al., 1985). Su explotación está centralizada en el fruto, del que se cultivan más de 50 variedades y se dividen en dos grandes grupos: los dulces y los picantes (Curtin et al., 1991). El principio activo del pimiento es la capsaicina (Figura 12) que se halla localizada en el tabique del pericarpio donde se insertan las semillas (Font Quer, 1988; Ferris y Zheng, 1999; Kamel, 2001).

La capsaicina actúa como rubefaciente y activa la circulación de la sangre. Además, se utiliza como antidiarreico, antiinflamatorio, estimulante del apetito y tónico (Font Quer, 1988; Kamel 2001). Cichewicz y Thorpe (1996) señalaron que las culturas mayas utilizaron diversas variedades de pimentones por sus propiedades antimicrobianas, así como por sus efectos fisiológicos

como las alteraciones de la temperatura, transpiración (lo cual crea una sensación de frescura) y salivación.



**Figura 12.** Estructura química de la capsaicina (Piñol et al., 2000)

Existe información limitada sobre el uso del extracto de pimentón en alimentación de rumiantes. Sin embargo, un estudio *in vitro* de 24 h de fermentación con líquido ruminal de vaca en producción (Busquet et al., 2005b) observaron que dosis entre 3 a 3000 mg/L de aceite esencial de pimentón, conteniendo 12% de capsaicina, no afectaron a la concentración de AGV totales, N amoniacal, ni a las proporciones de AGV individuales. Esta falta de efectos del aceite esencial del pimentón comparado con otros aceites esenciales podría estar relacionada a su bajo contenido en hidrocarburos oxigenados. Algunos estudios han demostrado que los hidrocarburos de monoterpenos son menos activos que los monoterpenos oxigenados (Griffin et al., 1999; Dorman y Deans, 2000).

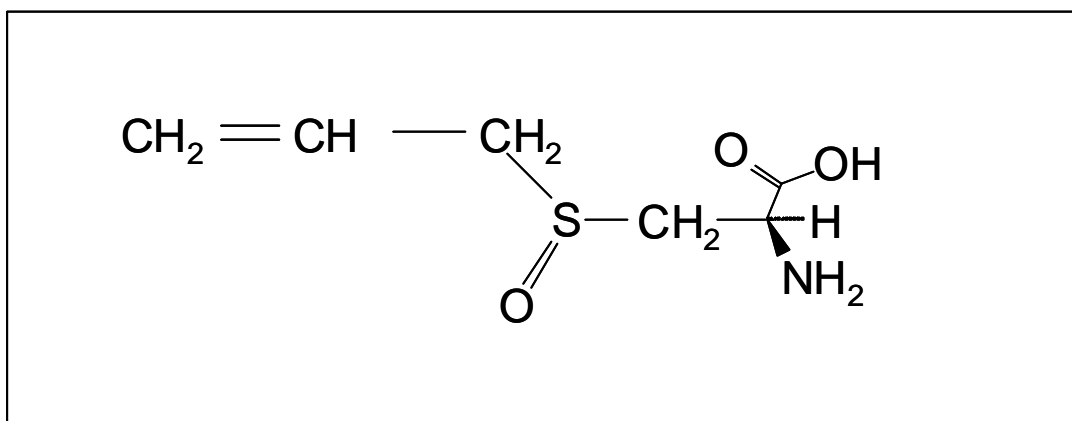
### 2.7.3.3. Aminoácidos aromáticos

#### 2.7.3.3.1. Allíina y Allicina

La fenilalanina, la tirosina y el triptófano son AA aromáticos que se forman en la ruta metabólica de los compuestos fenólicos (Salisbury y Ross, 1992). Además, existen otros AA aromáticos no proteicos, entre los que la

alliína es de interés particular (Figura 13). La alliína es una sustancia sulfurada inodora presente en el ajo (*Allium sativum*) que probablemente se forma siguiendo la misma ruta metabólica de los AA proteicos. La alliína tiene efectos antimicrobianos (Naganawa et al., 1996) y antisépticos (Kamel, 2001; Harborne et al., 1999).

El ajo es una planta perenne perteneciente al orden de las Liliales (Curtin et al., 1991), con hojas largas aplanadas y que pueden alcanzar alrededor de un metro de altura. Es originario de Asia Central (podría ser del desierto del Kirghisi), y se cultiva desde tiempos antiquísimos, (los egipcios ya lo utilizaban hace más de 5000 años). El principio activo está localizado en los bulbos o dientes (Stranburguer et al., 1985). En la actualidad, el potencial terapéutico del ajo está captando interés científico por sus efectos antitumorales (Milner, 1996; Kyo et al., 1998) y anticancerígeno (Pertechellet et al., 1990; Schaffer et al., 1997), entre otros.



**Figura 13.** Estructura química de la alliína (Piñol et al., 2000)

Los principales compuestos activos del ajo son los compuestos órgano-sulfurados. El 82% del azufre contenido en los bulbos del ajo están contenido en los sulfósidos de la aliína ( $C_6H_{11}N_3S$ ) y en la  $\gamma$ -glutamilcisteina. Los tiosulfonatos (allicina) son productos de la degradación natural del sulfósido de la aliína. La allicina ( $C_6H_{10}OS_2$ ), como se denomina el producto químico final, es la sustancia que da al ajo su aroma y su sabor característicos. Hace muchos años que los científicos que estudian la allicina saben que es tan tóxica como

cáustica. Se ha demostrado que mata no solamente las células cancerosas, sino también los microorganismos causantes de enfermedades e incluso células sanas (Feldberg et al., 1988).

La allicina no está presente en los dientes completos e intactos de ajo, sino que es el producto de una reacción bioquímica entre dos sustancias almacenadas por separado en pequeños compartimientos adyacentes dentro de cada diente. Esas dos sustancias son una enzima, la allinasa, y la alliina (sustancia química normalmente inerte). Cuando el diente se daña, ya sea por los parásitos del suelo que pretenden comer los tejidos tiernos, o al partirse o romperse el diente, las membranas que separan los compartimientos se rompen y se produce inmediatamente la allicina (Pertechellet et al., 1990; Schaffer et al., 1997).

Existe poca información que describa los efectos de la allicina sobre la fermentación ruminal. Busquet et al. (2003) estudiaron los efectos de 1.6 g/d de extracto de ajo sobre la producción, composición y residuos en la leche de vacas de alta producción, y observaron que el ajo no afectó al consumo de MS, ni a la producción ni composición de la leche. Sin embargo, disminuyó en un 3.8% la concentración de N ureico en la leche.

Posteriormente, Busquet et al. (2005b) realizaron otro estudio de fermentación ruminal in vitro de 24 h evaluando los efectos de dosis crecientes (3, 30, 300, y 3000 mg/L) de diferentes extractos naturales, incluido el aceite esencial de ajo conteniendo un 0.7% de alliina, sobre una mezcla de microorganismos ruminales provenientes de vacas de alta producción, y observaron que las dosis entre 30 y 3000 mg/L de aceite de ajo redujeron la proporción molar de acetato, y aumentaron la proporción molar de propionato. Sin embargo, ninguna de las dosis de extracto de ajo afectaron la concentración de N amoniacal.

## 2.8. CONCLUSIONES PRELIMINARES

En base a la revisión bibliográfica de las posibles aplicaciones de los extractos de plantas en nutrición de rumiantes, es necesario resaltar los siguientes puntos:

1. La fermentación ruminal puede optimizarse mediante la manipulación de la fermentación ruminal, centrados principalmente en términos de energía y proteína.
2. Los antibióticos promotores de crecimiento has demostrado ser efectivos para manipular la fermentación ruminal, mejorando la utilización de los alimentos, e incrementando la proporción molar de propionato y el flujo de proteína microbiana al duodeno, pero la legislación de la Comunidad Europea prohíbe su uso a partir del 1 de enero de 2006.
3. Algunos compuestos secundarios extraídos de las plantas tienen actividad antimicrobiana y pueden aportar soluciones a las prohibiciones de los antibióticos promotores de crecimiento sin riesgos de toxicidad ni de residuos en el producto final.
4. Es necesario identificar los principios activos útiles y determinar las dosis óptimas para manipular la fermentación ruminal.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

El presente trabajo se ha centrado en evaluar los efectos de algunos extractos de plantas y de sus metabolitos secundarios sobre el perfil de fermentación ruminal y la degradación de la proteína.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- a. Determinar el efecto de los extractos de plantas y sus metabolitos secundarios sobre la concentración y proporción de ácidos grasos volátiles totales e individuales a nivel ruminal.
- b. Determinar el efecto de los extractos de plantas y sus metabolitos secundarios sobre la degradación de las fracciones nitrogenadas (proteína, péptidos y aminoácidos) en el rumen.
- c. Identificar los principios activos de los extractos de plantas y sus metabolitos secundarios determinando las dosis óptimas para manipular la fermentación ruminal.

## **CAPÍTULO 2**

Efectos de los extractos de plantas sobre la degradación de la proteína y el perfil de fermentación ruminal en un sistema de fermentación de flujo continuo

**Effects of natural plant extract on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture**



## Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture

### ABSTRACT

Eight dual-flow continuous culture fermenters were used in four consecutive periods of 10 d to study the effects of six natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles. Fermenters were fed a diet with a 52:48 forage:concentrate ratio (DM basis). Treatments were: no extract (CTR), 15 mg/kg DM of a mixture of equal proportions of all extracts (MIX), and 7.5 mg/kg DM of extracts of garlic (GAR), cinnamon (CIN), yucca (YUC), anise (ANI), oregano (ORE) or pepper (PEP). During the adaptation period (d 1 through 8), samples for ammonia N and VFA concentrations were taken 2 h after feeding. On d 9 and 10, samples for VFA (2 h after feeding), and peptide, AA and ammonia N concentrations (0, 2, 4, 6, and 8 h after feeding) were also taken. Differences were declared at  $P < 0.05$ . During the adaptation period, total VFA and ammonia N concentrations were not affected by treatments. The acetate proportion was higher from d 2 to 6 in CIN, GAR, ANI and ORE, and the propionate proportion was lower from d 2 to 4 in CIN and GAR, and from d 2 to 5 in ANI and ORE, compared to CTR. However, the proportion of individual VFA (mol/100 mol) was similar in all treatments after d 6 except for valerate in d 9 and 10, that was lower in PEP ( $2.8 \pm 0.27$ ) compared with CTR ( $3.5 \pm 0.27$ ). The average peptide N concentration was 31% higher in MIX, and 26% higher in CIN and YUC compared with CTR ( $6.5 \pm 1.07$  mg/100 mL). The average AA N concentration was 17 and 15 % higher in GAR and ANI, respectively, compared with CTR ( $7.2 \pm 0.77$  mg/100 mL). The average ammonia N concentration was 31% higher in ANI, and 25.5% lower in GAR compared with CTR ( $5.5 \pm 0.51$  mg/100 mL). The accumulation of AA and ammonia N in ANI suggested that peptidolysis and deamination were stimulated. The accumulation of AA N and the reduction in ammonia N in GAR suggests that deamination was inhibited. The accumulation of peptide N and the numerical reduction in AA N in CIN suggests that peptidolysis was inhibited.

Results indicate that plant extracts modified rumen fermentation, but microbes were adapted to some extracts after 6 d of fermentation. Therefore, data from short-term in vitro fermentation studies may lead to erroneous conclusions, and should be interpreted with caution. Careful selection of these additives may allow the manipulation of protein degradation in the rumen.

## Introduction

Rumen microbial activity is essential for the use of structural carbohydrates and the synthesis of high quality protein in ruminants. However, microbial fermentation may result in considerable energy and protein losses as methane and ammonia N (NRC, 2001). Many feed additives have been developed to improve the efficiency of nutrient use by decreasing the total amount of methane or ammonia N produced, among which ionophore antibiotics have been very successful (Hutjens, 1992). However, the risk of the presence of antibiotic residues in milk and meat and its effects on human health have led to its prohibition for use in animal feeds in the European Union in 2006 (Official Journal of the European Union, 2003). Industry is seeking alternative additives that would improve the efficiency of nutrient use in the rumen. Many plants produce secondary metabolites such as phenolic compounds, essential oils, and sarsaponins (Chesson et al., 1982; Wallace et al., 1994; Kamel, 2001) that affect microbial activity. Sarsaponins are secondary compounds of yucca (*Yucca schidigera*) that have been reported to decrease ammonia N concentration and to alter the acetate and propionate proportions (Grobner et al., 1982; Ryan et al., 1997) in rumen fluid. However, other authors found no effect of yucca extract on ammonia N concentration (Wang et al., 1997; Hristov et al., 1999). Thymol, a secondary compound present in oregano (*Origanum vulgare*), decreased the acetate and propionate concentrations, and increased the acetate:propionate ratio in in vitro mixed ruminal fluid incubations (Evans and Martin, 2000). Although many other plant extracts have been shown to affect microbial activity (Cowan, 1999) few have been tested for their effects on rumen microbial fermentation.

The objective of this study was to evaluate the effects of several natural plant extracts on VFA concentrations and protein degradation in a dual-flow continuous culture system.

## Materials and Methods

### *Apparatus and Experimental Design*

Eight 1,320-mL dual flow continuous culture fermenters (Hoover et al., 1976) were used in four consecutive 10-d periods. On the first day of each period, all fermenters were inoculated with ruminal fluid obtained from two ruminal fistulated dairy cows fed a total mixed diet (35.7% alfalfa hay, 7.6% ryegrass hay, 15.5% ground corn, 11.6% barley grain, 11.9% corn gluten feed, 8.1% cottonseed, 4.6% molasses, 1.6% soybean meal, 1.3% calcium soaps of fatty acids, and 2.1% mineral and vitamin mixture, DM basis). During the 10 d of each period, all fermenters were fed 95 g of DM/d of the diet (18.9% CP; 36.6% NDF; 17.6% ADF; DM basis) in three feedings per day (0800, 1600, and 2400). The diet was ground to pass a 1.5 mm screen (Hammer mill, P. Prat SA, Sabadell, Spain), and consisted (DM basis) of alfalfa hay (27%), dehydrated whole corn plant (20%), barley straw (5%), soybean meal (16%), ground corn grain (15%), ground barley grain (15%), and a vitamin and mineral mixture (2%; 1 kg DM of vitamin and mineral mixture contained 1,000,000 IU of vitamin A; 200,000 IU of vitamin D; 1,333 mg of vitamin E; 300 g of magnesium oxide; 67 g of sodium chloride; 33 g of sulfur; 2.7 mg of manganese sulfate; 7 mg of cobalt sulfate; 167 mg of copper sulfate; 2.7 g of zinc methionate; 2 g of zinc sulfate; 33 mg of iodine; 27 mg of selenium; and 267 g of urea). The diet was designed to meet or exceed nutrient recommendations for a Holstein cow (600 kg) producing 25 kg of milk (NRC, 2001). Temperature (38.5°C), pH (6.4 ± 0.05) and liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates were kept constant in the fermenters. Fermentation parameters were monitored and controlled by a computer and a programmable linear controller (National Instruments, Austin, TX), and fermentation conditions were programmed with LabView Software

(National Instruments). Anaerobic conditions were maintained by infusion of N<sub>2</sub> at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) containing 0.4 g/L of urea to simulate recycled N was continuously infused into flasks at rate of 2.2 mL/min. Treatments were assigned to fermenters at random within periods, and were 1) no extract (**CTR**), 2) a mixture of equal proportions (vol/vol) of all extracts (**MIX**), and 3) extracts of garlic (*Allium sativa*, **GAR**; 0.7% of allicin), cinnamon (*Cinnamomum cassia*, **CIN**; 59% of cinnamaldehyde), yucca (*Yucca schidigera*, **YUC**; 8% of sarsaponin), anise (*Pimpinella anisum*, **ANI**; 86% of anethole), oregano (*Origanum vulgare*, **ORE**; 64% of carvacrol and 16% of thymol) and pepper (*Capsicum annum*, **PEP**; 12% of capsaicin). Raw materials were provided by AXISS France SAS (AXISS France SAS, Archamps, France). The levels of inclusion were 15 mg/kg DM for the MIX and 7.5 mg/kg DM for each of the individual extracts. Under the experimental conditions defined in this work, 7.5 mg/kg was equivalent to 0.71 mg of extract/d or 0.22 mg/L of ruminal fluid. The lipid-soluble extracts (all except yucca) were dissolved in sunflower oil at a 1:250 dilution. Yucca was dissolved in water at the same proportion. All extracts were stored at 5°C in 200-mL smoked glass bottles. One-third of the daily dose of extracts was dosed into the fermenters 1 min before each feeding. The CTR and YUC treatments were also dosed with the equivalent amount of sunflower oil.

Each experimental period consisted of 10 d (8 d for adaptation and 2 d for sample collection). On the adaptation days, 8 mL of fermenter fluid was taken 2 h after the morning feeding to determine the effects of natural plant extracts on ruminal ammonia N and VFA concentrations. During the last 2 d of the experiment, 4 mL of fermenter fluid were taken 2 h after the morning feeding to determine VFA concentrations. Samples (36 mL in each sampling time) were also taken at 0, 2, 4, 6 and 8 h after the morning feeding to determine tungstic acid soluble N (**TA N**), trichloroacetic acid soluble N (**TCA N**), and ammonia N. Results were used to calculate peptide, AA, and ammonia N concentrations in fermenters.

### *Chemical Analyses*

Samples for VFA were prepared as described by Jouany (1982): One milliliter of a solution comprising a 0.2% (wt/wt) solution of mercuric chloride, 0.2% (wt/wt) of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% (vol/vol) orthophosphoric acid was added to 4 mL of ruminal fluid and frozen. Samples were centrifuged at 3,000 × g for 30 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Kiln Farm Milton Keynes, UK) at 275°C in the injector and a 29.9 mL/min gas flow rate.

For ammonia N determination, a 4mL sample of fermenter fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at 25,000 × g for 20 min, and the supernatant was analyzed by spectrophotometry (UV-120-01, Shimadzu, Kyoto, Japan) for ammonia N (Chaney and Marbach, 1962).

Peptide and AA N were determined as described by Winter et al. (1964). A 16-mL sample of fermenter fluid was added to 4 mL of 10% (wt/vol) sodium tungstate and 4 mL of 1.07 N sulfuric acid. After allowing the tubes to stand at 5°C for 4 h, they were centrifuged at 9,000 × g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for TA N by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990). To determine TCA N, 4 mL of 50% (wt/vol) TCA was added to 16 mL of fermenter fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9,000 × g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for TCA N. Results were used to calculate in mg/100 mL: 1) Peptide N = (TCA N) – (TA N); and 2) AA N = (TA N) – (ammonia N).

### *Statistical Analyses*

All statistical analyses were conducted using SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, version 8.1). Results were analyzed using PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998). The model accounted for the effects of treatments and days (for VFA and ammonia N concentration in d 1 to 10), or

treatment and hours of sampling (for the protein fractions in d 9 and 10), and the interaction of treatment with day or treatment with hours. The period was considered a random effect. The statistical analyses of results of VFA and ammonia N concentrations day by day, and protein fractions hour by hour, was performed using the compound symmetric covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion. Orthogonal contrasts were used to compare: 1) treatment means vs. CTR, 2) each day vs. previous day for VFA and ammonia N concentration during the adaptation days, and 3) hour after feeding vs. 0 h (for the protein fractions in d 9 and 10). Differences were declared at  $P < 0.05$ .

## Results

The treatment × day (during d 1 to 8) or treatment × hour (during d 9 and 10) interactions were not significant for any of the measurements. Therefore, main effects are discussed.

### *Effect during the Adaptation Period*

Total VFA concentrations decreased ( $P < 0.05$ ) in all treatments from d 1 to d 2 (Table 1), and in all treatments except GAR and ORE in d 3, remaining constant thereafter (Table 1). There were no treatment effects on total VFA concentrations. Changes in total VFA concentration with time in continuous culture system in experiments conducted in our laboratory (unpublished observations) indicated that this reduction is normal, probably due to the adaptation of ruminal microorganisms to in vitro fermentation conditions. Results suggest that 3 d were sufficient for the adaptation of the ruminal flora to the fermentation conditions in vitro. The molar proportion (mol/100 mol) of acetate (Table 1) was higher ( $P < 0.05$ ) in CIN, GAR, ANI, and ORE on d 2 to 6 compared with CTR. These differences disappeared after 6 d of fermentation.

**Table 1. Effect of natural plant extracts on total volatile fatty acids concentrations, and acetate and propionate proportions 2 h after feeding from d 1 to 8 of fermentation<sup>a</sup>**

Item	Treatments <sup>b</sup>								SEM <sup>c</sup>	
	CTR	MIX	CIN	GAR	YUC	ANI	ORE	PEP		
Total VFA, mM										
d 1	155.4	155.4	155.4	155.4	155.4	155.4	155.4	155.4	155.4	0.02
d 2	134.9 <sup>y</sup>	139.6 <sup>y</sup>	130.6 <sup>y</sup>	132.1 <sup>y</sup>	139.6 <sup>y</sup>	138.2 <sup>y</sup>	138.2 <sup>y</sup>	145.2 <sup>y</sup>	145.2 <sup>y</sup>	8.67
d 3	119.4 <sup>y</sup>	117.5 <sup>y</sup>	122.8 <sup>y</sup>	129.6	126.7 <sup>y</sup>	117.8 <sup>y</sup>	127.1	121.9 <sup>y</sup>	121.9 <sup>y</sup>	4.81
d 4	121.3	121.6	118.9	125.2	119.6	122.4	121.6	115.0	115.0	3.36
d 5	124.1	117.5	124.4	119.7	112.9	126.2	119.3	121.1	121.1	5.62
d 6	118.7	114.7	113.6	110.0	111.1	115.5	110.4	115.1	115.1	4.55
d 7	119.9	112.8	109.0	117.4	114.8	115.5	114.3	111.3	111.3	5.56
d 8	114.0	116.9	106.2	113.0	112.5	110.7	113.4	107.0	107.0	8.70
SEM	6.34	7.01	4.62	7.18	5.85	5.07	5.83	5.82	5.82	
Acetate, mol/100 mol										
d 1	63.9	63.9	63.9	63.9	63.9	63.9	63.9	63.9	63.9	0.01
d 2	53.1 <sup>y</sup>	52.0 <sup>y</sup>	60.1 <sup>yz</sup>	59.3 <sup>yz</sup>	53.6 <sup>y</sup>	58.9 <sup>yz</sup>	58.6 <sup>yz</sup>	55.7 <sup>y</sup>	55.7 <sup>y</sup>	2.92
d 3	50.7	51.1	59.7 <sup>z</sup>	58.7 <sup>z</sup>	55.6	60.9 <sup>z</sup>	59.5 <sup>z</sup>	55.1	55.1	2.91
d 4	51.1	49.1	57.6 <sup>z</sup>	57.9 <sup>z</sup>	53.4	59.3 <sup>z</sup>	56.6 <sup>z</sup>	54.8	54.8	2.37
d 5	52.2	50.8	58.6 <sup>z</sup>	58.2 <sup>z</sup>	53.5	59.9 <sup>z</sup>	57.6 <sup>z</sup>	54.8	54.8	3.07
d 6	52.3	50.8	57.4 <sup>z</sup>	57.3 <sup>z</sup>	57.0	59.5 <sup>z</sup>	57.3 <sup>z</sup>	55.8	55.8	2.81
d 7	54.1	54.4	55.5	54.1	56.9	58.1	58.4	55.0	55.0	1.90
d 8	55.5	52.6	56.2	56.1	57.3	56.2	58.7	55.8	55.8	2.13
SEM	2.33	2.77	1.62	1.91	1.94	1.33	1.96	1.76	1.76	
Propionate, mol/100 mol										
d 1	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7	0.01
d 2	31.4 <sup>y</sup>	33.0 <sup>y</sup>	24.1 <sup>yz</sup>	25.8 <sup>yz</sup>	31.8 <sup>y</sup>	26.5 <sup>yz</sup>	27.0 <sup>yz</sup>	30.4 <sup>y</sup>	30.4 <sup>y</sup>	2.53
d 3	33.3	33.9	25.7 <sup>z</sup>	27.0 <sup>z</sup>	30.2	24.4 <sup>z</sup>	26.5 <sup>z</sup>	31.2	31.2	2.52
d 4	31.5	34.3	26.7 <sup>z</sup>	26.1 <sup>z</sup>	25.9 <sup>y</sup>	26.3 <sup>z</sup>	26.8 <sup>z</sup>	29.6	29.6	2.25
d 5	29.1	32.1	25.3	27.2	23.2	24.3 <sup>z</sup>	24.2 <sup>z</sup>	29.0	29.0	3.29
d 6	27.4	30.6	24.8	26.5	23.1	22.9	22.2	26.3	26.3	3.20
d 7	24.5	26.2	23.4	26.8	22.5	22.9	21.6	24.5	24.5	2.13
d 8	23.5	27.4	22.9	22.9	21.9	22.9	21.2	24.8	24.8	2.77
SEM	2.34	3.89	1.94	1.96	2.03	1.57	1.76	1.86	1.86	

<sup>a</sup> There were no treatment × day interactions for total VFA concentration ( $P < 0.98$ ), acetate ( $P < 0.63$ ), and propionate ( $P < 0.85$ ) proportions.

<sup>b</sup> CTR = Control, MIX = mixture of equal proportions of all extracts, CIN = cinnamon, GAR = garlic, YUC = yucca, ANI = anise, ORE = oregano, and PEP = pepper.

<sup>c</sup> Standard error of the mean ( $n = 32$ ).

<sup>y</sup> Orthogonal contrast: Within a column, means with the superscript differ from the previous day,  $P < 0.05$ .

<sup>z</sup> Orthogonal contrast: Within a row, means with the superscript differ from Control,  $P < 0.05$ .

The molar proportion (mol/100 mol) of propionate (Table 1) was lower ( $P < 0.05$ ) in CIN and GAR from d 2 to 4, and in ANI and ORE from d 2 to 5 compared with CTR; however, all of these differences disappeared after 6 d of fermentation. The molar proportion (mol/100 mol) of butyrate (data not shown) was lower ( $P < 0.05$ ) in CIN, GAR, ANI, and ORE (average of  $11.4 \pm 0.93$ ,  $10.6 \pm 0.86$ ,  $11.3 \pm 0.75$ , and  $10.5 \pm 0.88$ , respectively) from d 2 to 4 compared with CTR (average of  $14.8 \pm 0.75$ ), but these differences also disappeared after 4 d of fermentation.

The acetate:propionate ratio (data not shown) was higher ( $P < 0.05$ ) in CIN (average of  $2.4 \pm 0.13$ ), GAR (average of  $2.2 \pm 0.17$ ), ANI (average of  $2.4 \pm 0.12$ ), and ORE (average of  $2.1 \pm 0.11$ ) from d 2 to 4 compared with CTR (average of  $1.6 \pm 0.17$ ). After d 5, the acetate:propionate ratio was similar among treatments. Treatments had no effect on the proportions of isobutyrate, isovalerate, and valerate during the 8 d of adaptation.

Total ammonia N concentrations (mg/100 mL) for all treatments decreased ( $P < 0.05$ ) in the first 2 d of fermentation from an average of  $14.5 \pm 3.14$  in d 1 to  $7.5 \pm 2.09$  in d 2, and remained constant thereafter (average of  $7.4 \pm 2.11$ ; data not shown). The decrease in ammonia N concentration in the first days of fermentation is a normal observation in the dual-flow continuous culture system (unpublished observations) and is attributed to the adaptation of ruminal flora to the fermentation conditions in vitro. During the adaptation period, treatments had no effect on ammonia N concentration compared with CTR (data not shown). However, the ammonia N concentration (mg/100 mL) tended to be lower ( $P = 0.06$ ) in YUC (average of  $5.5 \pm 0.86$ ) from d 4 to 8, and tended to be higher ( $P = 0.07$ ) in ANI (average of  $10.4 \pm 0.93$ ) from d 3 to 7 compared with CTR (average of  $7.3 \pm 0.66$ ).

### *Effects after the Adaptation Period*

Total VFA concentration was similar in all treatments (average of  $109.4 \pm 4.8$  mM; Table 2). The proportion of each individual VFA was not affected by treatments except for the valerate proportion, which was lower ( $P < 0.05$ ) in PEP compared with CTR.



**Table 2. Effect of natural plant extracts on volatile fatty acids concentrations 2 h after the morning feeding after 8 days of adaptation**

Item	Treatments <sup>a</sup>								SEM <sup>b</sup>
	CTR	MIX	CIN	GAR	YUC	ANI	ORE	PEP	
Total VFA, mM	105.2	110.7	102.3	114.5	109.9	111.7	108.7	112.7	4.77
Individual, mol/100 mol									
Acetate	56.9	55.7	58.1	58.3	59.6	57.2	58.7	55.9	2.16
Propionate	23.8	25.5	22.3	21.6	21.3	23.5	20.3	25.7	2.19
Butyrate	12.1	12.7	12.7	12.4	12.3	12.0	13.8	12.5	1.03
sobutyrate	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.06
Isovalerate	3.0	3.0	2.4	3.9	2.9	3.0	3.4	2.5	0.59
Valerate	3.5	3.1	3.9	3.1	3.1	3.5	3.1	2.8 <sup>y</sup>	0.27
BCVFA <sup>c</sup>	4.0	3.7	3.2	5.2	3.9	4.2	4.5	3.6	2.63
C2:C3 <sup>d</sup>	2.5	2.5	2.8	2.9	2.9	2.5	3.0	2.2	0.32

<sup>a</sup> CTR = Control, MIX = mixture of equal proportions of all extracts, CIN = cinnamon, GAR = garlic, YUC = yucca, ANI = anise, ORE = oregano, and PEP = pepper.

<sup>b</sup> Standard error of the mean, n = 64.

<sup>c</sup> Branched-chain VFA, includes isobutyrate and isovalerate.

<sup>d</sup> Acetate:propionate ratio.

<sup>y</sup> Orthogonal contrast: Means within a row with the superscript differ from Control,  $P < 0.05$ .

The peptide N concentration of CTR decreased ( $P < 0.05$ ) in the first 2 and 4 h after feeding and returned to prefeeding levels thereafter (Table 3). Peptide N concentration in MIX and GAR followed a similar pattern. At time of feeding (0 h), the peptide N concentrations in ORE and PEP were lower ( $P < 0.05$ ) compared with CTR. The peptide N concentrations 2 h after feeding in MIX, CIN, GAR, YUC, and ANI were higher ( $P < 0.05$ ) compared with CTR. These differences disappeared 4 h after feeding. The average peptide N concentration throughout the 8-h feeding interval was higher ( $P < 0.05$ ) in MIX, CIN, and YUC, and tended to be higher ( $P = 0.07$ ) in GAR compared with CTR (Table 3).

The AA N concentration in CTR increased ( $P < 0.05$ ) from 0 to 2 h after feeding, and returned to prefeeding levels thereafter (Table 3). Similar pattern was observed for all other treatments except for PEP. At 4 h after feeding, the AA N concentration was higher ( $P < 0.05$ ) only in GAR compared with CTR. The

average AA N concentration between feedings was higher ( $P < 0.05$ ) in ANI and GAR, and tended to be lower ( $P = 0.06$ ) in CIN compared with CTR (Table 3).

**Table 3. Effect of natural plant extracts on hour by hour and average nitrogen fractions in a dual flow continuous culture measured after the morning feeding <sup>a</sup>**

Hours	Treatments <sup>b</sup>								SEM <sup>c</sup>
	CTR	MIX	CIN	GAR	YUC	ANI	ORE	PEP	
Peptide N, mg/100 mL									
0	9.8	10.1	9.2	10.8	9.2	8.0	5.9 <sup>z</sup>	6.1 <sup>z</sup>	1.53
2	3.9 <sup>y</sup>	8.6 <sup>z</sup>	7.9 <sup>z</sup>	7.9 <sup>yz</sup>	8.9 <sup>z</sup>	6.9 <sup>z</sup>	6.0	6.7	1.41
4	6.1 <sup>y</sup>	3.4 <sup>y</sup>	7.6	4.9 <sup>y</sup>	7.6	8.5	5.8	5.6	1.29
6	7.8	8.3	7.6	8.5 <sup>y</sup>	7.6	8.1	8.5	7.2	1.73
8	7.2	8.2	8.9	7.9 <sup>y</sup>	7.1	7.6	6.8	6.0	1.14
SEM	1.31	1.40	1.24	1.12	1.22	1.46	1.53	1.37	
Average	6.5	8.5 <sup>z</sup>	8.2 <sup>z</sup>	8.0 <sup>x</sup>	8.2 <sup>z</sup>	7.8	6.6	6.3	1.07
Amino acid N, mg/100 mL									
0	5.7	4.3	4.5	6.7	5.8	6.3	7.1	7.1	2.03
2	10.4 <sup>y</sup>	9.6 <sup>y</sup>	9.8 <sup>y</sup>	10.3 <sup>y</sup>	9.9 <sup>y</sup>	11.5 <sup>y</sup>	10.1 <sup>y</sup>	8.7	1.46
4	7.9	8.3	6.5	10.5 <sup>yz</sup>	6.5	8.9	7.8	8.2	1.19
6	6.6	5.8	6.1	7.4	5.2	7.1	5.2	6.3	1.07
8	6.3	5.5	4.9	7.2	5.5	6.3	6.2	7.5	1.45
SEM	1.68	1.23	1.14	1.14	1.07	1.29	1.40	1.36	
Average	7.2	6.7	6.3 <sup>x</sup>	8.4 <sup>z</sup>	6.4	8.3 <sup>z</sup>	7.3	7.6	0.77
Ammonia N, mg/100 mL									
0	7.1	7.9	6.4	5.4 <sup>z</sup>	6.6	9.1 <sup>z</sup>	8.1	6.8	1.05
2	6.7	5.6	5.5	5.2	4.9 <sup>yz</sup>	8.4 <sup>z</sup>	7.2	6.3	0.84
4	3.6 <sup>y</sup>	3.3 <sup>y</sup>	4.6	2.3 <sup>y</sup>	4.0 <sup>y</sup>	5.4 <sup>yz</sup>	5.5 <sup>yz</sup>	3.8 <sup>y</sup>	0.76
6	3.7	3.5 <sup>y</sup>	3.8	3.0	3.8 <sup>y</sup>	6.2 <sup>yz</sup>	5.0 <sup>y</sup>	3.5 <sup>y</sup>	0.88
8	6.2	5.7 <sup>y</sup>	5.8	4.8	6.1	7.1 <sup>y</sup>	6.3	5.5 <sup>y</sup>	1.00
SEM	0.63	0.68	0.69	0.85	0.65	0.80	1.12	0.66	
Average	5.5	5.2	5.2	4.1 <sup>z</sup>	5.1	7.2 <sup>z</sup>	6.4	5.2	0.51

<sup>a</sup> There were no treatment × hour interactions for peptide ( $P < 0.21$ ), AA ( $P < 0.97$ ) and ammonia ( $P < 0.94$ ) nitrogen.

<sup>b</sup> CTR = Control, MIX = mixture of equal proportions of all extracts, CIN = cinnamon, GAR = garlic, YUC = yucca, ANI = anise, ORE = oregano, and PEP = pepper.

<sup>c</sup> Standard error of the mean (n = 96 for treatment; n = 60 for hours; n = 480 for average).

<sup>x</sup> Orthogonal contrast: Within a row, means with the superscript tended to differ from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>y</sup> Orthogonal contrast: Within a column, means with the superscript differ from 0 h,  $P < 0.05$ .

<sup>z</sup> Orthogonal contrast: Within a row, means with the superscript differ from Control,  $P < 0.05$ .

The ammonia N concentration in CTR was lower ( $P < 0.05$ ) at 4 and 6 h after feeding, and returned to prefeeding levels thereafter (Table 3). Similar pattern was observed in all treatments. At time of feeding (0 h), the ammonia N concentration in ANI was higher ( $P < 0.05$ ), and in GAR was lower ( $P < 0.05$ ) compared with CTR. The ammonia N concentration was higher ( $P < 0.05$ ) at 2, 4 and 6 h after feeding in ANI, and at 4 h after feeding in ORE, and lower ( $P < 0.05$ ) at 2 h after feeding in YUC, compared with CTR. The average ammonia N concentration throughout the 8-h feeding interval was higher ( $P < 0.05$ ) in ANI, and lower ( $P < 0.05$ ) in GAR compared with CTR (Table 3).

## Discussion

Natural plant extracts have antimicrobial properties that may provide an alternative to ruminal modifiers for their ability to improve energy or protein use in the rumen (Kamel, 2001). However, there is very limited information on the effects of plant extracts on ruminal microbial fermentation. Total VFA concentration was not affected by treatments compared with CTR, suggesting that these additives at the doses used did not modify diet fermentability. It is likely that the use of high doses of plant extracts with antimicrobial activity would decrease microbial activity and diet fermentability. In fact, Evans and Martin (2000) observed that the use of 400 mg/L of thymol (a main component of oregano) decreased total VFA concentration in vitro, but the dose was 1,800 times higher than the dose used in the present experiment (0.22 mg/L). The lack of effect of plant extracts on total VFA indicates that the doses used were not toxic to ruminal microbes. The addition of YUC did not affect total VFA concentration, which agrees with other in vivo (Wu et al., 1994; Hussain and Cheeke, 1995; Hristov et al., 1999) and in vitro studies (Wang et al., 1997). There is no information available on the effect of the other natural plant extracts on total VFA production in the rumen.

The proportions of individual VFA were not affected by treatments compared with CTR, except for valerate proportion in PEP. The effects of YUC on individual VFA proportions are contradictory. Although the lack of effects

observed in the present trial agrees with some *in vivo* (Wu et al., 1994) and *in vitro* (Wang et al., 1997) reports, others (Grobner et al., 1982 and Ryan et al., 1997, *in vitro*; Hristov et al., 1999 *in vivo*) found that YUC modified the acetate and(or) propionate proportions. However, it is noteworthy that during the adaptation period, CIN, GAR, ANI, and ORE affected the molar proportions of acetate, propionate and butyrate between d 2 to 6 of fermentation, although all these difference disappeared after d 6. These results suggest that, although these additives had a short-term effect on ruminal microbial fermentation, ruminal microbes were adapted after 6 d. Evans and Martin (2000) reported that thymol (400 mg/L), a secondary compound of ORE, modified the acetate and propionate molar proportions in mixed ruminal microorganisms in *in vitro* 24-h incubations. In the present trial, the addition of ORE also affected the molar proportions of acetate and propionate after 24 h of fermentation, but differences disappeared after 6 and 5 d of fermentation, respectively. These results indicate that, at the doses used, a ruminal microbe build up a tolerance to these additives, and suggest that results from short-term fermentation studies should be interpreted with caution. Although similar changes were observed for CIN, GAR and ANI, there are no other reports available on the effect of these additives on individual proportion of VFA in the rumen. In the dual-flow continuous culture, an adaptation period of 6 d seemed to be sufficient to test the long-term effects of this type of products on ruminal microbial fermentation.

The concentrations of the different N fractions in the CTR after feeding provides evidence of the dynamics of N use by ruminal microbes. The decrease in peptide N concentration after feeding agrees with *in vivo* results (Hristov et al., 1999), but others *in vivo* studies (Chen et al., 1987; Broderick and Wallace, 1988) indicated that peptide N concentration increases after feeding as a result of protein degradation. The inconsistencies among reports may be attributed to differences in the rate of protein degradation, the rate of peptide use by ruminal microbes, which is dependant on energy availability, and the rate of peptide N passage to the lower tract. The increase in the AA N concentrations during the 2 h after feeding may be attributed to a high rate of peptide degradation or a low rate of AA N use by ruminal microbes. The ammonia N concentration in CTR in the current study decreased in the 4 h after feeding, and returned to prefeeding

levels after 8 h. In vivo, ruminal ammonia N concentration after feeding may increase (Hristov et al., 1999) or decrease (Devant et al., 2000) depending on the amount of degradable protein, and on the amount and type of dietary carbohydrates available for microbial use (Russell et al., 1983).

There is limited information on the effect of natural plant extracts on peptide metabolism in the rumen. The addition of 7.5 mg/kg DM of YUC extract (containing 8% of sarsaponin) in the present trial increased the average peptide N concentration by 26.2% throughout the 8-h feeding interval. This result suggests that proteolysis was stimulated or peptidolysis was inhibited. In contrast, Hristov et al. (1999) supplemented heifers with 1,961 and 5,825 mg/kg of YUC (containing 4.4 % of sarsaponin) and found no effect on peptide N concentration during the 6 h after feeding. The lack of agreement may be attributed to the approach used (in vivo vs. in vitro), the doses used, or the level of forage in the diet. In the present trial, YUC did not affect the AA N concentration and only decreased the ammonia N concentration 2 h after feeding without affecting the overall average between feeding. Previous studies have found inconsistent effects of YUC on ammonia N concentrations over a wide range of levels of inclusion in the diet. Ryan et al. (1997) reported that the addition of 6,250 mg/kg of YUC decreased the ammonia N concentration from 17.0 to 15.6 mmol/L after 48 h in in vitro incubation. Grobner et al. (1982) found a 15% decrease ( $P < 0.08$ ) in ammonia N after 7 d of continuous culture fermentation trial when 60 mg/kg of pure sarsaponin (secondary compound of YUC) were added to the fermenters. Wallace et al. (1994) also found a 6% reduction ( $P < 0.05$ ) in ammonia N in an in vitro incubation with strained ruminal fluid containing 10 mg/L of YUC. In contrast, other in vivo (Wu et al., 1994, level of inclusion 400 mg/kg of YUC; Hristov et al., 1999, level of inclusion 5,825 mg/kg of YUC) and in vitro (Wang et al., 1997, level of inclusion 44,000 mg/kg of YUC) studies found no effects of YUC extract on ammonia N concentration. Our results suggest that YUC extract may affect protein or peptide degradation more than deamination. However, it is relevant that the level of inclusion of YUC used in the present trial (7.5 mg/kg DM of YUC containing 8% of sarsaponin) was lower than the levels of inclusion tested in previous reports, which may explain the lack of effect of YUC on ammonia N concentration in ruminal fluid.

The addition of 7.5 mg/kg DM of CIN (containing 59% of cinnamaldehyde) increased peptide N concentration by 102.5% 2 h after feeding, increased the average peptide N concentration by 26.2%, and numerically decreased the average of AA N concentration by 12.5% throughout the 8-h feeding interval. These results suggest that CIN extract stimulated proteolysis or inhibited peptidolysis. The addition of 7.5 mg/kg DM of GAR (containing 0.7% of allicin) increased the peptide N concentration by 102.5% 2 h after feeding, and increased numerically the average peptide N concentration by 23%, suggesting that GAR extract stimulated proteolysis or inhibited peptidolysis. In addition, the 33% increase in the AA N concentration 4 h after feeding, the 17% increase in the average AA N, and the 25.5% decrease in the average ammonia N concentration throughout the 8-h feeding interval, suggests that GAR extract inhibited deamination. The addition of 7.5 mg/kg DM of ANI (containing 86% of anethole) increased the peptide N concentration by 79% 2 h after feeding, but did not affect the average peptide N concentration throughout the 8 h feeding interval. The higher average concentration of AA N, the higher ammonia N concentration at 0, 2, 4, and 6 h after feeding, and the higher average ammonia N concentration throughout the 8-h feeding intervals, suggests that ANI extract stimulated peptidolysis and deamination. To our knowledge, this is the first report on the effects of CIN, GAR and ANI extracts on peptide, AA, or ammonia N degradation in ruminal microbial fermentation. The accumulation of peptides and AA in ruminal fluid may stimulate microbial protein synthesis or improve the flow of AA to the small intestine (Griswold et al., 1996). The effects of ORE, PEP or MIX on N metabolism were small and inconsistent.

## Implications

The cinnamon, garlic, oregano, and anise extracts modified the proportion of acetate, propionate and butyrate between days 2 to 6 of fermentation in a dual-flow continuous-culture fermenter system, but all these effects disappeared after day 6, probably because of the adaptation of the bacteria to these additives. Results suggest that data from short-term in vitro

studies may lead to erroneous conclusions. The accumulation of peptide nitrogen in yucca suggests that proteolysis was stimulated or peptidolysis was inhibited. The accumulation of amino acid and ammonia nitrogen in anise suggests that peptidolysis and deamination were stimulated. The accumulation of amino acid nitrogen and the reduction of ammonia nitrogen in garlic suggest that deamination was inhibited. The accumulation of peptide nitrogen and the numerical reduction of amino acid nitrogen in cinnamon suggest that peptidolysis was inhibited. Careful selection and combination of these additives may allow for the manipulation of protein degradation in the rumen.

### **CAPÍTULO 3**

Screening in vitro de los efectos de los extractos de plantas sobre la fermentación microbiana ruminal a dos niveles de pH y alimentados con dieta alta en concentrado

**Screening for the effects of natural plant extracts at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet**



## Screening for the effects of natural plant extracts at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet

### ABSTRACT:

Six natural plant extracts and three secondary plant metabolites were tested at five doses (0, 0.3, 3, 30, and 300 mg/L) and two levels of pH (7.0 and 5.5) in a duplicate  $9 \times 5 \times 2$  factorial arrangement of treatments to determine their effects on in vitro microbial fermentation using rumen fluid from heifers fed a high concentrate finishing diet. Treatments were: extracts of garlic (**GAR**), cinnamon (**CIN**), yucca (**YUC**), anise (**ANI**), oregano (**ORE**), and capsicum (**CAP**), and pure cinnamaldehyde (**CDH**), anethole (**ATL**), and eugenol (**EUG**). Each treatment was tested in triplicate and in two periods. A 50-mL of a 1:1 rumen fluid to buffer solution was introduced into polypropylene tubes supplied with 0.5 g of DM of a 10 to 90 forage to concentrate diet (15.4% CP, 16.0% NDF), and incubated for 24 h at 39°C. Samples were collected for ammonia N and volatile fatty acid (**VFA**) concentrations. Differences were declared at  $P < 0.05$ . The reduction of pH from 7.0 to 5.5 resulted in lower total VFA, ammonia N, branch-chained VFA concentration, acetate proportion, and acetate to propionate ratio, and in higher propionate proportion. The interaction between pH and doses of extracts was significant in all measurements except for ATL and CDH in butyrate, ATL and EUG in the acetate to propionate ratio, and ORE in ammonia N concentration. The high doses of all plant extracts decreased total VFA concentrations. When pH was 7.0, ATL, GAR, CAP and CDH reduced total VFA concentration, and ANI, ORE, CIN, CAP and CDH increased the acetate to propionate ratio. The CIN, GAR, CAP, CDH, ORE, and YUC reduced, and EUG, ANI and ATL increased ammonia N concentration. The effects of plant extracts on the fermentation profile when pH was 7.0 were not favorable for improving the efficiency of rumen microbial fermentation. In contrast, when pH was 5.5, no changes (ATL, ANI, ORE, and CIN) or increases (EUG, GAR, CAP, CDH and YUC) in total VFA were followed by lower acetate to propionate ratio (ORE, GAR, CAP, CDH, and YUC) which would be favorable for beef production. Ammonia N (ATL, ANI, CIN, GAR, CAP, and CDH) and branch-chained VFA (ATL, EUG, ANI, ORE, CAP, and CDH) concentrations were also reduced, suggesting that deamination was inhibited.

Results indicate that the effects of plant extracts on rumen fermentation in beef cattle diets may differ depending on rumen pH. When pH was 5.5 GAR, CAP, YUC and CDH can alter rumen microbial fermentation in favor of propionate, more efficient in terms of energy.

## Introduction

Intensive beef production systems rely on feeding large amounts of cereal grains. However, highly fermentable diets may result in ruminal acidosis, bloat and digestive and metabolic upsets (Nocek, 1997). Ionophores have been used successfully to improve the efficiency of beef production and to prevent or reduce the incidence of digestive upsets (Chalupa et al 1980; Bergen and Bates, 1984). However, the use of ionophores in animal feeds will be restricted in the European Union in 2006 (Official Journal of the European Union, 2003). It has been estimated that the elimination of antibiotics from ruminant feeds will result in an increase in production costs of 3.5 to 5.0 % (Carro et al., 2000). Therefore, it is necessary to identify potential feeding strategies and(or) additives that will allow to maintain the current level of production without increasing the cost or the incidence of digestive upsets.

Natural plant extracts contain secondary metabolites that have shown antimicrobial activity (Cowan, 1999). Some of them have already been tested for their effects on rumen microbial fermentation, including sarsaponins (Ryan et al., 1997), phenolic compounds (Evans and Martin, 2000), and essential oils (Cardozo et al., 2004; Busquet et al., 2005a). However, most studies have been conducted using rumen fluid from dairy cows fed high forage diets. Microbial population and rumen fermentation conditions in cattle fed high concentrate diets may be very different due to the type of substrate being fermented or the resulting pH. Therefore, the search for additives that will help to replace ionophores in beef diets needs to be tested in high concentrate, low pH environment.

The objective of this trial was to test the effect of the dose of six natural plant extracts and three purified secondary metabolites on rumen microbial fermentation profile in high concentrate diets and at two level of pH (7.0 and 5.5) on an in vitro batch culture fermentation system.

## Materials and Methods

### *Apparatus and Experimental Design*

Thirty 100-mL polypropylene tubes with gas-release rubber stoppers described by Tilley and Terry (1963) were used for each additive. Ruminal fluid was obtained from two rumen fistulated heifers (200 kg BW) fed a 10 to 90 forage to concentrate ratio diet. Rumen fluid was strained through 4 layers of cheesecloth and transported to the laboratory in prewarmed thermos. The rumen fluid was mixed in a 1 to 1 ratio with a buffer solution (Tilley and Terry, 1963). The mixed ruminal fluid was separated in two equal portions. The first was adjusted to pH 7.0 and the second was adjusted to pH 5.5 with 5 N NaOH or 3 N HCl, respectively. Both fluids were maintained at 39°C and flushed with CO<sub>2</sub>-saturated gas for 15 min to maintain anaerobic conditions. A 50 mL of fluid were introduced into each polypropylene tube, and quickly sealed with a gas-release rubber stopper. Each tube contained 0.5 g of the same 10 to 90 forage to concentrate diet fed to donor heifers, except that it was previously ground through a 1.5 mm screen (Hammer mill type O, P. Prat SA, Sabadell, Spain). The diet contained (DM basis) straw (10%), corn grain (30%), barley grain (25%), soybean meal (19%), tapioca (14%), sodium bicarbonate (0.5%), white salt (0.4%), calcium carbonate (0.4%), dicalcium phosphate (0.4%), and a vitamin and mineral mixture (0.3%; each 1 kg DM of vitamin and mineral mixture contained 1,000,000 IU vitamin A; 200,000 IU vitamin D; 1,333 mg vitamin E; 300 g magnesium oxide; 67 g sodium chloride; 33 g sulfur; 2 g zinc sulphate; 33 mg iodine; 27 mg selenium; 7 mg cobalt sulphate; 167 mg copper sulphate; 267 g urea; 2.7 g manganese sulphate; and 2.7 g zinc methionate). The diet (15.4% CP, 16.0% NDF, and 8.2% ADF, DM basis) was formulated to meet or exceed NRC (1996) requirements for heifers of 180 kg body weight and growing at 1.2 kg/d. Treatments were: no extract (**CTR**), and extracts of garlic (*Allium sativa*; **GAR**; 0.7% of allicin), cinnamon (*Cinnamomum cassia*; **CIN**; 59% of cinnamaldehyde), yucca (*Yucca schidigera*; **YUC**; 8% of sarsaponin), anise (*Pimpinella anisum*; **ANI**; 86% of anethole), oregano (*Origanum vulgare*; **ORE**; 64% of carvacrol and 16% of thymol), capsicum (*Capsicum annuum*; **CAP**; 12% of capsaicin), cinnamaldehyde (**CDH**; > 99% of cinnamaldehyde), anethole (**ATL**; > 99% of anethole), and eugenol (**EUG**; > 99% of eugenol). Plant extracts

and main active components were provided by Pancosma SA (Pancosma SA, 01200-Bellegarde-sur-Valserine Cedex, France). Each treatment was tested at 0.3, 3, 30, and 300 mg/L, in triplicate and in two replicated periods. All treatments and doses were dissolved in ethanol, and the CTR was also dosed with the equivalent amount of ethanol. Treatments were dosed into the polypropylene tubes and incubated into a constant-temperature (39°C) horizontal shaking water bath for 24 h.

### *Chemical Analyses*

The final pH of the batch after 24 h of fermentation was measured with a pH-meter (model 507, Crison Instruments, Alella, Barcelona, Spain), and samples were collected for VFA and ammonia N concentrations.

Total and individual VFA were analyzed as described by Jouany (1982): 1 mL of a solution made up of a 0.2% (wt/wt) solution of mercuric chloride, 0.2% (wt/wt) of 4-methylvaleric acid as an internal standard and 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, was added to 4 mL of rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 3,000 x g for 30 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) at 275°C in the injector and 29.9 mL/min gas flow rate.

Ammonia N concentration was analyzed as described by Chaney and Marbach (1962): a 4 mL sample of rumen fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at 25,000 x g for 20 min, and the supernatant was analyzed by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Technology, Cambridge, UK).

### *Calculations and Statistical Analyses*

To help interpreting results, data of each measurement in CTR at pH 7.0 was standardized at 100%, and all doses were reported as a percentage compared with CTR. Data were analyzed using the PROC MIXED procedure of

SAS (version 8.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC) for a randomized block design. Terms in the model contained effects of treatment, the level of inclusion of extracts, two levels of pH and their interactions. The day of the run was considered random effect. Significant differences between means were declared at  $P < 0.05$  using a multiple comparison test (Tukey, 1953).

## Results

The average total and branch-chained VFA concentration (mM) in CTR at pH 7.0 was  $189.2 \pm 3.38$  and  $7.3 \pm 0.59$ , respectively. The average proportions of individual VFA (mol/100 mol) were  $53.4 \pm 0.52$  for acetate,  $31.2 \pm 0.87$  for propionate, and  $8.2 \pm 0.23$  for butyrate, and the average acetate to propionate ratio was  $1.8 \pm 0.08$ . Average ammonia N concentration was  $26.6 \pm 0.35$  mg/100 mL.

The reduction of pH from 7.0 to 5.5 resulted in a lower ( $P < 0.05$ ) ammonia N (Table 1) and total VFA concentrations (Table 2), acetate proportion (Table 3), butyrate proportion (Table 5), branch-chained VFA concentration (Table 6), and acetate to propionate ratio (Table 7), and in a higher ( $P < 0.05$ ) propionate proportion (Table 4). The final pH of mixed ruminal fluid was not affected by increasing the doses of treatments (average of  $6.89 \pm 0.27$  for high pH, and average of  $5.48 \pm 0.34$  for low pH).

**Table 1. Effects of natural plant extracts at doses 0.3, 3, 30, and 300 mg/L and pH on percentage change in ammonia N concentration compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0					pH 5.5					SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	300	0	0.3	3	30	300		pH	Doses	pH x doses
ATL	100 <sup>y</sup>	110 <sup>z</sup>	117 <sup>z</sup>	113 <sup>z</sup>	46 <sup>x</sup>	70 <sup>u</sup>	63 <sup>ut</sup>	54 <sup>ts</sup>	53 <sup>s</sup>	57 <sup>ts</sup>	2.1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
EUG	100 <sup>y</sup>	111 <sup>z</sup>	112 <sup>z</sup>	107 <sup>y</sup>	34 <sup>x</sup>	70 <sup>t</sup>	92 <sup>u</sup>	94 <sup>u</sup>	88 <sup>u</sup>	60 <sup>s</sup>	2.2	< 0.01	< 0.01	< 0.01
ANI	100 <sup>x</sup>	122 <sup>y</sup>	144 <sup>z</sup>	144 <sup>z</sup>	46 <sup>w</sup>	70 <sup>u</sup>	55 <sup>ts</sup>	50 <sup>s</sup>	60 <sup>t</sup>	67 <sup>ut</sup>	3.8	< 0.01	< 0.01	< 0.01
ORE	100 <sup>z</sup>	89 <sup>zy</sup>	85 <sup>zy</sup>	73 <sup>y</sup>	35 <sup>x</sup>	70 <sup>u</sup>	75 <sup>u</sup>	68 <sup>u</sup>	63 <sup>u</sup>	29 <sup>t</sup>	6.3	< 0.01	< 0.01	0.39
CIN	100 <sup>z</sup>	86 <sup>y</sup>	82 <sup>y</sup>	68 <sup>x</sup>	38 <sup>w</sup>	69 <sup>u</sup>	65 <sup>u</sup>	56 <sup>t</sup>	51 <sup>t</sup>	36 <sup>s</sup>	1.8	< 0.01	< 0.01	0.01
GAR	100 <sup>z</sup>	85 <sup>y</sup>	80 <sup>y</sup>	67 <sup>x</sup>	45 <sup>w</sup>	69 <sup>u</sup>	53 <sup>ts</sup>	49 <sup>s</sup>	56 <sup>t</sup>	65 <sup>u</sup>	1.8	< 0.01	< 0.01	< 0.01
CAP	100 <sup>z</sup>	89 <sup>y</sup>	82 <sup>y</sup>	76 <sup>y</sup>	66 <sup>x</sup>	64 <sup>u</sup>	52 <sup>t</sup>	43 <sup>s</sup>	44 <sup>s</sup>	60 <sup>u</sup>	1.8	< 0.01	< 0.01	< 0.01
CDH	100 <sup>z</sup>	92 <sup>y</sup>	78 <sup>x</sup>	40 <sup>w</sup>	33 <sup>v</sup>	64 <sup>u</sup>	53 <sup>t</sup>	53 <sup>t</sup>	48 <sup>t</sup>	35 <sup>s</sup>	3.6	< 0.01	< 0.01	0.05
YUC	100 <sup>z</sup>	96 <sup>z</sup>	74 <sup>y</sup>	60 <sup>x</sup>	57 <sup>x</sup>	62 <sup>ts</sup>	62 <sup>ts</sup>	73 <sup>u</sup>	61 <sup>ts</sup>	58 <sup>s</sup>	3.4	< 0.01	< 0.01	< 0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>v, w, x, y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

<sup>s, t, u</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

The interaction between pH and extracts was significant ( $P < 0.05$ ) in all treatments for the concentration of ammonia N, total VFA, and branch-chained VFA (Table 1, 2 and 6), for the proportion of acetate, propionate and butyrate (Table 3 to 5), and for the acetate to propionate ratio (Table 7), except for ORE on ammonia N concentration (Table 1), ATL and CDH on butyrate proportion (Table 5), and ATL and EUG on acetate to propionate ratio (Table 7). These results indicate that the effects of plant extracts on rumen microbial fermentation were pH dependent, and will be presented and discussed separately by pH.

#### *Effects of Natural Plant Extract on Ammonia Nitrogen, Total and Individual Volatile Fatty Acid Concentrations at pH 7.0*

When the pH of the incubation media was 7.0, high doses (300 mg/L) of all treatments reduced ( $P < 0.05$ ) ammonia N concentration between 33% in CAP to 66 % in CDH compared with CTR (Table 1). Lower doses of CIN, GAR, CAP, and CDH (0.3, 3 and 30 mg/L), YUC (3 and 30 mg/L), and ORE (30 mg/L) also reduced ( $P < 0.05$ ) ammonia N concentration compared with CTR. In contrast, low doses of ATL and ANI (0.3, 3 and 30 mg/L), and EUG (0.3 and 3 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ) ammonia N concentration compared with CTR.

The supplementation of high doses (300 mg/L) of all extracts resulted in a strong inhibition ( $P < 0.05$ ) of total VFA production ranging from 14% in CDH to 56% in ORE (Table 2). Because this effect was negative for rumen microbial fermentation, data of individual VFA proportions of all extracts at 300 mg/L were removed from Tables 3 through 7 with the purpose of improving readability and interpretation of results. Lower doses of ATL (30 mg/L), GAR and CDH (3, 3 and 30 mg/L), and CAP (0.3, 3 and 30 mg/L) reduced ( $P < 0.05$ ) total VFA concentration compared with CTR. In contrast, total VFA concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in CIN (0.3 and 3 mg/L), and was not affected by EUG, ANI, ORE, and YUC extracts compared with CTR (Table 2).

**Table 2. Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, 30, and 300 mg/L and pH on percentage change in total VFA concentration compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0					pH 5.5					SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	300	0	0.3	3	30	300		pH	Doses	pH x doses
ATL	100 <sup>z</sup>	93 <sup>zy</sup>	88 <sup>zy</sup>	84 <sup>y</sup>	75 <sup>x</sup>	73 <sup>tu</sup>	84 <sup>t</sup>	83 <sup>t</sup>	65 <sup>uv</sup>	53 <sup>v</sup>	3.4	<0.01	<0.01	0.01
EUG	100 <sup>z</sup>	96 <sup>z</sup>	93 <sup>z</sup>	87 <sup>z</sup>	54 <sup>y</sup>	73 <sup>u</sup>	90 <sup>t</sup>	89 <sup>t</sup>	88 <sup>t</sup>	62 <sup>v</sup>	3.2	<0.01	<0.01	<0.01
ANI	100 <sup>z</sup>	102 <sup>z</sup>	101 <sup>z</sup>	102 <sup>z</sup>	78 <sup>y</sup>	82 <sup>t</sup>	72 <sup>t</sup>	74 <sup>t</sup>	71 <sup>t</sup>	68 <sup>u</sup>	2.0	<0.01	<0.01	<0.01
ORE	100 <sup>z</sup>	101 <sup>z</sup>	101 <sup>z</sup>	93 <sup>z</sup>	44 <sup>y</sup>	82 <sup>t</sup>	74 <sup>t</sup>	73 <sup>t</sup>	73 <sup>t</sup>	48 <sup>u</sup>	1.9	<0.01	<0.01	<0.01
CIN	100 <sup>y</sup>	124 <sup>z</sup>	118 <sup>z</sup>	106 <sup>zy</sup>	75 <sup>x</sup>	73 <sup>t</sup>	73 <sup>t</sup>	75 <sup>t</sup>	77 <sup>t</sup>	52 <sup>u</sup>	2.8	0.01	<0.01	<0.01
GAR	100 <sup>z</sup>	92 <sup>zy</sup>	85 <sup>y</sup>	81 <sup>yx</sup>	77 <sup>x</sup>	73 <sup>u</sup>	76 <sup>u</sup>	87 <sup>t</sup>	93 <sup>t</sup>	43 <sup>v</sup>	2.5	0.01	<0.01	<0.01
CAP	100 <sup>z</sup>	91 <sup>y</sup>	90 <sup>y</sup>	89 <sup>y</sup>	54 <sup>x</sup>	72 <sup>u</sup>	86 <sup>t</sup>	87 <sup>t</sup>	87 <sup>t</sup>	68 <sup>v</sup>	1.7	0.01	0.01	<0.01
CDH	100 <sup>z</sup>	95 <sup>zy</sup>	93 <sup>y</sup>	92 <sup>y</sup>	86 <sup>x</sup>	72 <sup>u</sup>	98 <sup>t</sup>	99 <sup>t</sup>	101 <sup>t</sup>	61 <sup>v</sup>	1.4	<0.01	<0.01	0.02
YUC	100 <sup>zy</sup>	104 <sup>z</sup>	95 <sup>y</sup>	91 <sup>y</sup>	77 <sup>x</sup>	75 <sup>u</sup>	99 <sup>t</sup>	95 <sup>t</sup>	68 <sup>u</sup>	56 <sup>v</sup>	2.1	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>x, y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>t, u, v</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).



The GAR (30 mg/L) reduced ( $P < 0.05$ ), and ANI, ORE, and CAP (0.3, 3 and 30 mg/L), and CIN (0.3 and 3 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ) the acetate proportion compared with CTR (Table 3). Propionate proportion was lower ( $P < 0.05$ ) in ANI, ORE, CIN, and CAP (0.3, 3 and 30 mg/L), and CDH (3 and 30 mg/L) compared with CTR (Table 4). The resulting acetate to propionate ratio was higher ( $P < 0.05$ ) in ANI, CIN, and CAP (0.3, 3 and 30 mg/L), ORE (0.3 and 3 mg/L), and CDH (3 and 30 mg/L) compared with CTR (Table 7). The proportion of butyrate was higher ( $P < 0.05$ ) in CAP and CDH (0.3, 3 and 30 mg/L), and ORE (30 mg/L), and lower in EUG, and CIN (0.3, 3 and 30 mg/L), compared with CTR (Table 5). The ANI, CIN, CAP, and CDH (0.3, 3 and 30 mg/L), ORE (0.3 and 3 mg/L), GAR (0.3 mg/L), and YUC (3 and 30 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ) branch-chained VFA concentrations compared with CTR (Table 6).

#### *Effects of Natural Plant Extract on Ammonia Nitrogen, Total and Individual Volatile Fatty Acids Concentrations at pH 5.5*

When pH of the incubation media was 5.5, the supplementation of high doses (300 mg/L) of all treatments resulted in a reduction of ammonia N concentration compared with CTR at pH 5.5, ranging from 3 to 41 percentage units in ANI and ORE, respectively (Table 1). Moderate doses of ANI, GAR, CAP, and CDH (0.3, 3 and 30 mg/L), and ATL and CIN (3 and 30 mg/L) also resulted in moderate reductions ( $P < 0.05$ ) in ammonia N concentration compared with CTR at pH 5.5. In contrast, EUG (0.3, 3 and 30 mg/L), and YUC (3 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ) ammonia N concentration compared with CTR.

The supplementation of high doses (300 mg/L) of all treatments resulted in a inhibition ( $P < 0.05$ ) of total VFA production compared with CTR, ranging from 4 to 34 percentage units in CAP and ORE, respectively (Table 2). Because this inhibition was negative for rumen microbial fermentation, data of individual VFA proportions of all extracts at 300 mg/L were removed from Tables 3 through 7 with the purpose of improving readability and interpretation of results.

**Table 3. Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in acetate proportion compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0				pH 5.5				SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	0	0.3	3	30		pH	Doses	pH x doses
ATL	100	103	104	103	92	94	93	90	1.2	<0.01	<0.01	0.02
EUG	100	101	100	106	92	95	95	95	1.5	<0.01	<0.01	0.04
ANI	100 <sup>y</sup>	107 <sup>z</sup>	108 <sup>z</sup>	107 <sup>z</sup>	89 <sup>t</sup>	84 <sup>t</sup>	78 <sup>u</sup>	77 <sup>u</sup>	1.4	<0.01	<0.01	<0.01
ORE	100 <sup>y</sup>	107 <sup>z</sup>	108 <sup>z</sup>	109 <sup>z</sup>	89 <sup>t</sup>	84 <sup>tu</sup>	82 <sup>u</sup>	78 <sup>u</sup>	1.5	<0.01	<0.01	<0.01
CIN	100 <sup>y</sup>	105 <sup>z</sup>	104 <sup>z</sup>	102 <sup>zy</sup>	94	95	96	95	1.0	<0.01	<0.01	<0.01
GAR	100 <sup>z</sup>	100 <sup>z</sup>	99 <sup>z</sup>	94 <sup>y</sup>	94 <sup>t</sup>	92 <sup>t</sup>	91 <sup>tu</sup>	87 <sup>u</sup>	1.0	<0.01	<0.01	<0.01
CAP	100 <sup>x</sup>	103 <sup>y</sup>	104 <sup>y</sup>	108 <sup>z</sup>	94 <sup>t</sup>	88 <sup>u</sup>	75 <sup>v</sup>	72 <sup>v</sup>	1.5	<0.01	<0.01	<0.01
CDH	100	100	104	102	94 <sup>t</sup>	85 <sup>u</sup>	81 <sup>v</sup>	76 <sup>v</sup>	1.1	<0.01	<0.01	<0.01
YUC	100	92	99	94	88 <sup>t</sup>	68 <sup>u</sup>	66 <sup>u</sup>	64 <sup>u</sup>	1.9	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>x, y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

<sup>t, u, v</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

**Table 4. Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in propionate proportion compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0				pH 5.5				SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	0	0.3	3	30		pH	Doses	pH x doses
ATL	100	90	98	100	131 <sup>t</sup>	105 <sup>u</sup>	106 <sup>u</sup>	115 <sup>u</sup>	4.5	<0.01	<0.01	0.01
EUG	100	88	89	83	131 <sup>t</sup>	105 <sup>u</sup>	106 <sup>u</sup>	105 <sup>u</sup>	4.1	<0.01	<0.01	0.03
ANI	100 <sup>z</sup>	83 <sup>y</sup>	81 <sup>y</sup>	81 <sup>y</sup>	137 <sup>u</sup>	138 <sup>u</sup>	151 <sup>t</sup>	154 <sup>t</sup>	2.6	<0.01	<0.01	<0.01
ORE	100 <sup>z</sup>	81 <sup>y</sup>	79 <sup>y</sup>	90 <sup>y</sup>	137 <sup>u</sup>	135 <sup>u</sup>	148 <sup>t</sup>	151 <sup>t</sup>	2.5	<0.01	<0.01	<0.01
CIN	100 <sup>z</sup>	87 <sup>y</sup>	89 <sup>y</sup>	91 <sup>y</sup>	106	99	99	98	2.6	<0.01	<0.01	<0.01
GAR	100	94	95	101	106 <sup>u</sup>	114 <sup>tu</sup>	115 <sup>tu</sup>	119 <sup>t</sup>	1.7	<0.01	<0.01	<0.01
CAP	100 <sup>z</sup>	84 <sup>y</sup>	83 <sup>y</sup>	73 <sup>x</sup>	107 <sup>u</sup>	108 <sup>u</sup>	131 <sup>t</sup>	136 <sup>t</sup>	1.2	<0.01	<0.01	<0.01
CDH	100 <sup>z</sup>	93 <sup>zy</sup>	81 <sup>y</sup>	85 <sup>y</sup>	107 <sup>u</sup>	117 <sup>tu</sup>	123 <sup>t</sup>	131 <sup>t</sup>	2.4	<0.01	<0.01	<0.01
YUC	100 <sup>zy</sup>	106 <sup>z</sup>	89 <sup>y</sup>	102 <sup>zy</sup>	111 <sup>u</sup>	145 <sup>t</sup>	147 <sup>t</sup>	143 <sup>t</sup>	3.6	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>x, y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

<sup>t, u, v</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

Supplementation of ATL, ORE, ANI and CIN had no effect, and EUG, CAP, and CDH (0.3, 3 and 30 mg/L), GAR (3 and 30 mg/L), and YUC (0.3 and 3 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ) total VFA concentration compared with CTR.

The CAP, CDH, and YUC (0.3, 3 and 30 mg/L), ANI, and ORE (3 and 30 mg/L), and GAR (30 mg/L) reduced ( $P < 0.05$ ) the acetate proportion (Table 3). The ANI, ORE, CAP, and CDH (3 and 30 mg/L), GAR (30 mg/L), and YUC (0.3, 3 and 30 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ), and ATL and EUG (0.3, 3 and 30 mg/L) reduced ( $P < 0.05$ ) the propionate proportion (Table 4). The resulting acetate to propionate ratio was lower ( $P < 0.05$ ) in CAP and CDH (3 and 30 mg/L), YUC (0.3, 3 and 30 mg/L), ORE (30 mg/L), and GAR (30 mg/L) compared with CTR (Table 7). The EUG, ANI, ORE, and CAP (0.3, 3 and 30 mg/L), GAR (30 mg/L), and YUC (30 mg/L) increased ( $P < 0.05$ ) butyrate proportion compared with CTR (Table 5). The ATL (30 mg/L), and EUG, ANI, ORE, CAP, and CDH (0.3, 3 and 30 mg/L) reduced ( $P < 0.05$ ) branch-chained VFA concentrations (Table 6).

## Discussion

### *Effects of pH*

The increase in propionate proportion and the decrease in total VFA and branch-chained VFA concentrations, acetate and butyrate proportions, the acetate to propionate ratio and ammonia N concentration when pH was reduced from 7.0 to 5.5 were expected and agree with previous studies (Shriver et al., 1986; Lana et al., 1998; Calsamiglia et al., 2002). Most fibrolytic rumen bacteria, which are generally acetate and butyrate producers, are sensitive to low ruminal pH (Russell and Dombrowki, 1980; Hoover, 1986). In contrast, the amylolytic bacteria are acid tolerant and are responsible for most of the production of propionate in the rumen (Wolin and Miller, 1988; Brockman, 1993).

**Table 5. Effects of natural plant extracts at doses 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in butyrate proportion compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0				pH 5.5				SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	0	0.3	3	30		pH	Doses	pH x doses
ATL	100	81	89	93	77	94	95	87	7.9	0.54	0.81	0.23
EUG	100 <sup>z</sup>	81 <sup>y</sup>	82 <sup>y</sup>	78 <sup>y</sup>	77 <sup>v</sup>	92 <sup>u</sup>	92 <sup>u</sup>	91 <sup>u</sup>	3.3	0.69	0.03	<0.01
ANI	100	107	107	108	91 <sup>v</sup>	120 <sup>u</sup>	120 <sup>u</sup>	122 <sup>u</sup>	2.9	>0.05	<0.01	<0.01
ORE	100 <sup>y</sup>	106 <sup>zy</sup>	106 <sup>zy</sup>	111 <sup>z</sup>	91 <sup>v</sup>	122 <sup>u</sup>	126 <sup>u</sup>	121 <sup>u</sup>	2.8	>0.05	<0.01	<0.01
CIN	100 <sup>z</sup>	93 <sup>y</sup>	91 <sup>y</sup>	89 <sup>y</sup>	93	95	96	97	1.2	0.79	0.06	<0.01
GAR	100	103	104	104	93 <sup>v</sup>	94 <sup>v</sup>	95 <sup>uv</sup>	101 <sup>u</sup>	1.4	<0.83	<0.01	0.01
CAP	100 <sup>y</sup>	110 <sup>z</sup>	110 <sup>z</sup>	110 <sup>z</sup>	93 <sup>v</sup>	122 <sup>u</sup>	123 <sup>u</sup>	123 <sup>u</sup>	2.3	<0.01	<0.01	<0.01
CDH	100 <sup>y</sup>	109 <sup>z</sup>	110 <sup>z</sup>	110 <sup>z</sup>	93	96	95	98	2.0	<0.01	<0.01	0.32
YUC	100	99	99	99	99 <sup>v</sup>	110 <sup>uv</sup>	101 <sup>v</sup>	111 <sup>u</sup>	2.4	0.04	0.02	<0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

<sup>u, v</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

*Effects of Natural Plant Extracts*

Natural plant extracts represent one of the alternatives to the use of antibiotic growth promoters in animal feeds (Kamel, 2001). Until recently, there has been very limited research on the effect of these extracts on rumen microbial fermentation, and most has been conducted in dairy cattle-type environment (high forage diets at pH > 6.2; Wu et al., 1994; Wilson et al., 1997; Cardozo et al., 2004). The intent of the present screening was to identify natural plant extracts that would improve rumen microbial fermentation in beef cattle diets. The average ammonia N concentration of CTR at pH 7.0 ( $26.6 \pm 3.38$  mg/100mL) was above the minimum concentration required for adequate rumen microbial activity (Satter and Slyter, 1974). Compared with CTR at pH 7.0, CIN, GAR, CAP, CDH, ORE, and YUC resulted in lower ammonia N concentration, and agree with results reported of Busquet et al. (2005b) with similar doses of ORE and CDH, Grobner et al. (1982) with 1.45 mg/L of YUC, and Ryan et al. (1997) with 100 mg/L of YUC. In contrast, EUG, ANI and ATL increased ammonia N concentration, which is also consistent with previous reports (Cardozo et al., 2004; Busquet et al., 2005b).

Total VFA production is the result of diet fermentation, and a lower acetate to propionate ratio reflects a shift in rumen fermentation that is more efficient for beef production systems (Wolin and Miller, 1988; Brockman, 1993). The main criteria for selecting the extracts were the increase or no change in total VFA concentration, and the reduction in the acetate to propionate ratio. High doses of all extracts resulted in lower VFA concentration, which confirms their antimicrobial effect (Cowan, 1999). Similar results were obtained by Busquet et al. (2005b) when supplementing high doses (3000 mg/L) of plant extracts to an in vitro fermentation system fed a 50 to 50 forage to concentrate ratio diet and pH 7.0. Evans and Martin (2000) also reported that high doses of thymol (400 mg/L, main active component of ORE) inhibited VFA production in mixed rumen microbial fermentation. Furthermore, low and moderate doses of ATL, GAR, CAP, and CDH at pH 7.0 also reduced total VFA concentration, which would preclude its potential use in beef cattle diets. However, low and moderate doses of EUG, ANI, ORE, and YUC at pH 7.0 had no negative effects on total VFA concentrations, suggesting that these doses were not toxic to rumen microbes.

**Table 6. Effects of natural plant extracts at doses 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in branch-chained volatile fatty acid concentration compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0				pH 5.5				SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	0	0.3	3	30		pH	Doses	pH x doses
ATL	100 <sup>zy</sup>	117 <sup>z</sup>	85 <sup>y</sup>	77 <sup>y</sup>	79 <sup>u</sup>	61 <sup>u</sup>	61 <sup>u</sup>	34 <sup>v</sup>	8.0	<0.01	<0.01	0.02
EUG	100	118	118	98	79 <sup>u</sup>	63 <sup>v</sup>	63 <sup>v</sup>	62 <sup>v</sup>	9.0	<0.01	<0.01	<0.01
ANI	100 <sup>y</sup>	118 <sup>z</sup>	125 <sup>z</sup>	120 <sup>z</sup>	78 <sup>u</sup>	46 <sup>v</sup>	45 <sup>v</sup>	42 <sup>v</sup>	3.8	<0.01	0.14	<0.01
ORE	100 <sup>y</sup>	120 <sup>z</sup>	127 <sup>z</sup>	94 <sup>y</sup>	78 <sup>u</sup>	44 <sup>v</sup>	34 <sup>v</sup>	42 <sup>v</sup>	3.3	<0.01	<0.01	<0.01
CIN	100 <sup>y</sup>	129 <sup>z</sup>	123 <sup>z</sup>	118 <sup>z</sup>	74	68	69	71	3.5	<0.01	<0.01	<0.01
GAR	100 <sup>y</sup>	130 <sup>z</sup>	114 <sup>zy</sup>	101 <sup>y</sup>	74	70	80	76	5.6	<0.01	<0.01	<0.01
CAP	100 <sup>y</sup>	172 <sup>z</sup>	178 <sup>z</sup>	178 <sup>z</sup>	73 <sup>u</sup>	55 <sup>v</sup>	56 <sup>v</sup>	55 <sup>v</sup>	2.1	<0.01	<0.01	<0.01
CDH	100 <sup>x</sup>	132 <sup>y</sup>	179 <sup>z</sup>	171 <sup>z</sup>	73 <sup>u</sup>	43 <sup>v</sup>	44 <sup>v</sup>	34 <sup>v</sup>	6.2	<0.01	<0.01	<0.01
YUC	100 <sup>x</sup>	132 <sup>yx</sup>	200 <sup>z</sup>	163 <sup>zy</sup>	80	87	85	93	12.8	<0.01	0.03	0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>x, y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

<sup>u, v</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ (*P* < 0.05).

Busquet et al. (2005b) observed similar responses with EUG, ANI, ORE, and YUC (doses from 3 to 30 mg/L) in dairy cow-type environment. However, the supplementation with ANI, ORE, CIN, CAP, and CDH resulted in a higher acetate to propionate ratio, which is energetically less efficient due to the loss of a carbon as methane (Wolin and Miller, 1988). Therefore, it appears to be no potential benefit in using plant extracts for improving rumen fermentation profile in beef production systems when ruminal pH is high.

The effects of plant extracts on rumen microbial fermentation at pH 5.5 were completely different. Most research on the effect of plant extracts on rumen microbial fermentation has been conducted in fermentation condition where pH was above to 6.0 (Wu et al., 1994; Cardozo et al., 2004; Busquet et al., 2005a) and data available on their effects at low pH is limited. The average ammonia N concentration in CTR at pH 5.5 was  $17.9 \pm 0.20$  mg/100 mL. The reduction of ammonia N concentration in ATL, ANI, CIN, GAR, CAP, and CDH suggests that these additives reduced deamination activity or that bacteria used peptides and amino acid as a N source, reducing ammonia N production. In contrast, the accumulation of ammonia N concentrations in EUG and YUC suggests that these additives stimulated deamination activity, and it could be desirable when ammonia N concentration may limit microbial protein synthesis in feedlot cattle fed high levels of concentrate (Devant et al., 2000). When ruminal pH was 5.5, total VFA production was similar (ATL, ANI, ORE, and CIN) or higher (EUG, GAR, CAP, CDH and YUC) than CTR. The lower acetate, and the higher propionate proportions in ANI, ORE, GAR, CAP, CDH, and YUC, and the resulting lower acetate to propionate ratio in ORE, GAR, CAP, CDH, and YUC, suggests a shift in rumen microbial population that may result in a fermentation profile that will benefit beef production.

The mechanism of action of most essential oils is related to their ability to disrupt cell membranes (Griffin et al., 1999; Dorman and Deans, 2000; Ultee et al., 2002). The different response of natural plant extracts depending on pH may be related to the dissociated (hydrophilic) or undissociated (hydrophobic) status of the active molecules. Only the undissociated, hydrophobic form of the molecule is able to interact with the bilayer cell membrane.



**Table 7. Effects of natural plant extracts at doses of 0.3, 3, and 30 mg/L and pH on percentage change in acetate to propionate ratio compared with control (0 mg/L)**

Item <sup>a</sup>	pH 7.0				pH 5.5				SEM <sup>b</sup>	<i>P</i> <		
	0	0.3	3	30	0	0.3	3	30		pH	Doses	pH x doses
ATL	100	117	101	98	70	89	88	79	5.7	<0.01	<0.01	0.08
EUG	100	121	118	127	70	90	89	96	6.6	<0.01	<0.01	0.18
ANI	100 <sup>y</sup>	134 <sup>z</sup>	138 <sup>z</sup>	136 <sup>z</sup>	67	62	51	51	7.0	<0.01	0.12	<0.01
ORE	100 <sup>y</sup>	167 <sup>z</sup>	171 <sup>z</sup>	104 <sup>y</sup>	67 <sup>u</sup>	59 <sup>uv</sup>	62 <sup>uv</sup>	54 <sup>v</sup>	4.9	<0.01	<0.01	<0.01
CIN	100 <sup>y</sup>	120 <sup>z</sup>	115 <sup>z</sup>	112 <sup>z</sup>	87	86	86	86	2.6	<0.01	<0.01	<0.01
GAR	100 <sup>zy</sup>	106 <sup>z</sup>	105 <sup>zy</sup>	93 <sup>y</sup>	87 <sup>u</sup>	88 <sup>u</sup>	86 <sup>u</sup>	79 <sup>v</sup>	2.1	<0.01	<0.01	<0.01
CAP	100 <sup>x</sup>	123 <sup>y</sup>	123 <sup>y</sup>	148 <sup>z</sup>	87 <sup>u</sup>	82 <sup>u</sup>	57 <sup>v</sup>	51 <sup>v</sup>	2.5	<0.01	<0.01	<0.01
CDH	100 <sup>y</sup>	111 <sup>zy</sup>	128 <sup>z</sup>	120 <sup>z</sup>	87 <sup>u</sup>	73 <sup>uv</sup>	66 <sup>v</sup>	58 <sup>v</sup>	3.9	<0.01	<0.01	<0.01
YUC	100 <sup>zy</sup>	87 <sup>y</sup>	111 <sup>z</sup>	94 <sup>zy</sup>	79 <sup>u</sup>	47 <sup>v</sup>	45 <sup>v</sup>	45 <sup>v</sup>	4.8	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a</sup> Treatments: ATL = anethole, EUG = eugenol, ANI = anise, ORE = oregano, CIN = cinnamon, GAR = garlic, CAP = capsicum, CDH = cinnamaldehyde, YUC = yucca.

<sup>b</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>x, y, z</sup> Means within a row at pH 7.0 followed by different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>u, v</sup> Means within a row at pH 5.5 followed by different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

As pH decreases, acids tend to become undissociated and more hydrophobic, therefore interacting more easily with cell membranes and exerting their antimicrobial effect. In fact, Juven et al. (1994) reported that the antimicrobial effect of the essential oil of thyme, cinnamon and clove bud increased as pH decrease from 6.5 to 5.5. Furthermore, bacteria seem to be more susceptible to the effects of essential oils at low pH (Skandamis and Nychas, 2000). Therefore, it could be hypothesized that there is a close relation between the rumen pH and the antimicrobial effect of plant extracts due to the higher proportion of undissociated, hydrophobic form of the active molecules and the higher susceptibility of specific microbial populations, resulting in changes in the rumen fermentation profile. Results indicate that it appears to be potential benefit of using some extracts to improve rumen fermentation profile in beef production system when ruminal pH is low.

### **Implications**

The effects of plant extracts on rumen microbial fermentation are pH dependent. At high pH, all extracts, except cinnamon, maintained or reduced total volatile fatty acids, and maintained or increased the acetate to propionate ratio, suggesting that none of them appear beneficial for beef production. In contrast, when pH was 5.5, total volatile fatty acid concentration was higher in eugenol, garlic, capsicum, cinnamaldehyde, and yucca, and the acetate to propionate ratio was lower in oregano, garlic, capsicum, cinnamaldehyde, and yucca. The effects of plant extracts on ammonia N concentrations were pH dependent, but at pH 5.5 most of them resulted in lower ammonia N concentrations. At the low pH expected in high concentrate diets, oregano, garlic, capsicum and yucca extracts, and cinnamaldehyde are potentially useful in beef diets. Further studies are necessary to determine the effectiveness of these extracts on in vivo rumen microbial fermentation and animal performance.

## **CAPÍTULO 4**

Efectos del extracto de alfalfa y una mezcla de cinnamaldehído y eugenol sobre el perfil de fermentación ruminal y la degradación de la proteína en terneros alimentados con dieta alta en concentrado

**Effects of alfalfa extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen fermentation profiles and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet**

## Effects of alfalfa extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen fermentation profiles and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet

### ABSTRACT:

Four Holstein heifers ( $360 \pm 22$  kg BW) fitted with ruminal trocar were used in a 4 x 4 Latin square design to evaluate the effects of alfalfa extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen microbial fermentation profile and protein degradation. Each period consisted of 15 d of adaptation and 6 d for sampling. Treatments were: no extract (CTR), 30 g/d of alfalfa extract (**AEX**; containing 10% malate, and 1.5% saponins), a mixture of 180 mg/d of cinnamaldehyde and 90 mg/d of eugenol (**CIE**), and the combination of the two treatments (**MIX**). On d 16 to 18 of each period, dry matter (**DM**) and water intake were measured. On d 19 to 21 ruminal content was sampled at 0, 3, 6, 9, and 12 h after feeding to determine ruminal pH, and the concentrations of volatile fatty acids (**VFA**), L-lactate, and N fractions (large peptides, small peptides plus AA, and ammonia N). On d 20 and 21, samples of rumen fluid were also taken at 0 and 3 h after feeding to determine protozoa counts. On d 21, rumen fluid was used to determine DM and crude protein (**CP**) degradation of alfalfa hay, ryegrass hay, barley grain, wheat grain, corn grain and soybean meal after 4 and 24 h of in vitro incubation. Relative to CTR, CIE and AEX reduced DM and water intake, and *Entodinium* spp. counts, but did not affect total VFA concentration, propionate and butyrate proportions, large peptides concentration, and ruminal pH. The CIE tended ( $P = 0.07$ ) to reduce BCVFA and ammonia N, and tended ( $P = 0.08$ ) to increase small peptides plus AA N concentrations. The AEX increased the acetate to propionate ratio and reduced the number of *Entodinium* spp. counts. The MIX tended ( $P = 0.06$ ) to reduce DM intake, water intake and ruminal pH. In vitro, CIE and MIX reduced CP degradation of soybean meal and corn grain, and MIX also reduced CP degradation of alfalfa hay at 4 h after incubation, but all differences disappeared after 24 h of incubation. Results suggest that CIE reduced *Entodinium* spp. counts and ammonia N concentration, AEX reduced *Entodinium* spp. counts and increased acetate to propionate ratio, but the effects of their combination were not additive.

## Introduction

High cereal grain diets are energetically more efficient than high fibrous diets for beef cattle, but the resulting decrease in ruminal pH may increase the risk of acidosis (Nocek, 1997). Ionophores have been used in beef diets due to their ability to improve the efficiency of nutrient utilization, and reduce the risk of rumen acidosis and bloat (Chalupa et al., 1980; Bergen and Bates, 1984). However, antibiotics are being banned from use in animal feeds in the European Union (European Union, 1998). It has been estimated that the elimination of antibiotics in ruminant feeds will result in a 3.5 to 5.0 % increase in production costs (Carro and Ranilla, 2002). Industry is searching for alternative additives to reduce or eliminate these losses. Plant extracts are potentially useful modulators of rumen fermentation. Klita et al. (1996) found that 48 g/d of alfalfa extract (containing 28% of saponins) reduced ruminal protozoa counts increasing the flow of total N to the duodenum in sheep. In addition, alfalfa is also rich in malic acid (Callaway et al., 1997) that has been shown to increase total VFA production and propionate proportion, and reduce lactic acid accumulation (Martin and Streeter, 1995). Cardozo et al. (2004, 2005) and Busquet et al. (2005a, 2005b) also suggested that eugenol and cinnamaldehyde have strong antimicrobial properties, being potentially useful in modulating rumen microbial fermentation. Moreover, the antioxidant properties of eugenol prevent the oxidation of cinnamaldehyde into the non-active metabolite benzaldehyde when cinnamaldehyde containing feeds are heat-processed (Friedman et al., 2000). Therefore, the combination of eugenol and cinnamaldehyde may allow modulating rumen microbial fermentation even after heat processing feeds. The objective of this study was to evaluate the effects of alfalfa extract and a combination of cinnamaldehyde and eugenol on rumen microbial fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet.

## Materials and Methods

### *Animal, Treatments and Housing*

Four heifers (average initial BW of  $360 \pm 22$  kg) fitted with a 1-cm i.d. plastic ruminal trocars (Divasa Farmavic SA, Vic, Spain) were used in a  $4 \times 4$  Latin square design. Heifers were individually housed in tie-stalls at the Unitat de

Granges i Camps Experimentals of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain), and were randomly assigned to one of four experimental treatments. The diet consisted (DM basis) of barley straw (10%), ground barley grain (30%), ground corn grain (21%), wheat bran (14%), soybean meal (15%), corn gluten feed (7%), sodium bicarbonate (0.5%), and a mineral and vitamin mixture (2.5%; 1 kg DM of the vitamin and mineral mixture contained 1,562 k IU vitamin A; 150 k IU vitamin D; 2,500 mg vitamin E; 3,500 mg zinc; 2,000 mg iron; 400 mg manganese; 250 mg copper; 50 mg cobalt; 38 mg iodine; 25 mg selenium). The diet (91% DM, 16% CP, 25% NDF, and 11% ADF, DM basis) was designed to meet or exceed nutrient recommendations of a 360 kg BW Holstein heifers with an ADG of 1.15 kg/d (NRC, 1996). Treatments were: no additive (control: **CTR**), 30 g/d of alfalfa extract (**AEX**; containing 10% malic acid and 1.5% saponins, DM basis), a mixture of 180 mg/d of cinnamaldehyde and 90 mg/d of eugenol (**CIE**), and the combination of the two treatments (**MIX**). Raw materials were provided by Pancosma (Pancosma SA, 01200-Bellegarde-sur-Valserine Cedex, France). Each experimental period consisted of 21 d (15 d for adaptation and 6 d for sample collection). Animals had ad libitum access to concentrate and barley straw offered once daily at 0900. Treatments were offered daily at 0900 mixed with 600 g of a mixture of soybean meal and mineral and vitamin mix of the diet to guarantee the consumption of the whole dose. The research protocol was approved by the Campus Laboratory Animal Care Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain).

### *Sample Collection and Analyses*

Dry matter and water intake were measured on d 16, 17 and 18 of each period to avoid interference with rumen sampling protocols. Feed refusals were recorded before feeding. Refused concentrate and barley straw were manually separated with a sieve (0.5 cm screen), and weighted separately. Feed and refusal samples were collected daily and analysed for DM to determine DM intake. Water intake was also monitored using individual drinking cups equipped with individual flow meters (B98.32.50, Invensys model 510 C, Tashia SL, Artesa de Segre, Spain). Dry matter was determined by oven drying feed at 105°C for 24 h and ashes by heating feed at 550°C for 4 h (AOAC, 1990) to determine OM

content. Nitrogen content was determined using the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990), and ash corrected NDF and ADF were determined sequentially using  $\alpha$ -amylase and sodium sulphite (Van Soest et al., 1991).

On d 19, 20, and 21 of each period, samples of whole ruminal contents were collected at 0, 3, 6, 9, and 12 h after the morning feeding. Rumen pH was measured immediately with a portable pH-meter (model 507, Crison Instruments SA, Barcelona, Spain). Ruminal fluid was strained through 2 layer of cheesecloth and 5 sub-samples of filtrate were taken for VFA, large peptides, small peptides plus AA, ammonia N, and lactate analyses.

Total and individual VFA were analyzed as described by Jouany (1982): 1 mL of a solution made up of a 0.2% (wt/wt) mercuric chloride, 0.2% (wt/wt) of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, was added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 15,000  $\times$  g for 15 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) at 275°C in the injector and 29.9 mL/min gas flow rate.

Ammonia N concentration was analyzed as described by Chaney and Marbach (1962): 4 mL sample of filtrate was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at 15,000  $\times$  g for 15 min, and the supernatant was analyzed by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Analytical Instruments, Cambridge, UK).

Large peptides (**LPep**) and small peptides plus AA N (**SPep+AA**) were determined as described by Winter et al. (1964): 16 mL of filtered rumen fluid were added to 4 mL of 10% (wt/vol) sodium tungstate and 4 mL of 1.07 N sulfuric acid. After allowing the tubes to stand at 5°C for 4 h, they were centrifuged at 9,000  $\times$  g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for tungstic acid soluble N (**TA N**) by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990). To determine trichloroacetic acid soluble N (**TCA N**), 4 mL of 50% (wt/vol) of TCA were added to 16 mL of filtered rumen fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9,000  $\times$  g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for TCA N. Results were used to calculate

(mg/100 mL): a) LPep N = ?TCA N? – ?TA N?; and b) SPep+AA N = ?TA N? – ?ammonia N?.

The L-lactate was analyzed according to de Veth and Kolver (2000): 8 mL of filtered rumen fluid were added to 0.1 mL of 50% (vol/vol) sulfuric acid, and frozen. Samples were centrifugate at 15,000 × g for 15 min. A 25 ?L of supernatant were added to 250 ?L of the first reactant (containing 0.5 M hydrazinium hydroxide, 12 mM EDTA, and 20 mM NAD<sup>+</sup>). Three minutes after incubation, 7 ?L of the second reactant (100 U/mL of LDH, and 3.2 M ammonium sulphate) were added, and absorbance was measured at 340 nm in an auto-analyzer (Model COBAS MIRA 89, Roche, Switzerland).

On day 20 and 21 of each period, at 0 and 3 h after the morning feeding, subsamples of filtrate were also taken for enumeration of protozoa by combining 8 mL of filtrate with 2 mL of methyl green:formaldehyde (38%; wt/wt) solution. Protozoa were counted as described by Veira et al. (1983) using a Neubauer Improved Bright-Line counting chamber (Hausser Scientific Partnership, Horsham, PA), and *Entodinium* and *Isotricha* spp. were identified (Dehority, 1993).

#### *In Vitro Dry Matter, and Crude Protein Degradation*

On d 21 of each period at 3 h after feeding, samples (1500 mL) of rumen contents of each heifer were obtained and strained through two layers of cheesecloth and transported to the laboratory in four prewarmed insulated containers. An in vitro fermentation system (Daisy II, ANKOM technology, NY) was used to determine DM and N degradation of six supplements (soybean meal, corn grain, barley grain, wheat grain, alfalfa hay, and ryegrass hay) after 4 and 24 h of incubation. Rumen fluid (1000 mL) was mixed in a 1:1 proportion with a buffer solution (Weller and Pilgrim, 1974), the pH was adjusted to 7.0 with 3 N HCl or 5 N NaOH, introduced into the Daisy II flask, and gassed with CO<sub>2</sub>. The dose of each extract was recalculated considering an average flow of rumen fluid of 72 L/d in heifers used in the present trial (rumen volume = BW<sup>0.57</sup> = 30 L; Owens and Goetsch, 1988; and a dilution rate of 10%/h), and added into the Daisy II jar (417 mg of AEX; 2.5 mg of cinnamaldehyde and 1.3 mg of eugenol, CIE; and a combination of both extracts, MIX). Each supplement was weighed in duplicate (0.5 g for 4 h, and 0.75 g for 24 h) into 5 × 5 cm polyester bags with a 52 ± 16 ?m



average pore size (ANKOM R510, ANKOM technology, NY). The bags were heat-sealed (impulse sealer 34J9, UL, TEW Co. Ltd., Taiwan), introduced in the Daisy II jars, and incubated at constant temperature (39 °C) and rotation for 4 or 24 h. After removal from the Daisy II jars, bags were washed with water (three times, 5 min each) in a commercial washing machine (JATA, Spain), and dried at 105°C oven for 24 h. Bag residues were analyzed for DM (105°C for 24 h) and N content (Kjeldahl procedure; AOAC, 1990).

### *Statistical Analyses*

All statistical analyses were conducted using SAS (Version 8.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Results of DM and water intake, ruminal pH, the concentration and proportions of VFA, L-lactate, LPep N, SPep+AA N, ammonia N, and protozoa counts were analyzed using the PROC MIXED procedure for repeated measures (Littell et al., 1998). The model accounted for the effects of treatments, and days (for DM and water intake) or day and hours (for pH, VFA, lactate, protein fractions, and protozoa). Period was considered random effect. The heifers × period were also considered subject. Each variable was subjected to three covariance structures: compound symmetric, autoregressive order one, and unstructured covariance. The covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion was considered to be the most desirable analyses. In vitro estimated DM and CP degradability of the six supplements were analyzed using the PROC MIXED procedure. The statistical model accounted for the effects of treatment, time of incubation, and the six supplements. The period was considered a random effect. Significant differences between means of each treatment and CTR were declared at  $P < 0.05$  using the Dunnett option.

## **Results and Discussion**

### *Dry Matter and Water Intake*

The CIE and AEX reduced ( $P < 0.05$ ) total DM, concentrate, and water intake, and MIX tended to decrease total DM ( $P = 0.06$ ) and water intake ( $P = 0.07$ ) compared with CTR (Table 1).

**Table 1. Effect of natural plant extracts on dry matter and water intake**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	CIE	AEX	MIX	
Total DM intake, kg/d	8.8	7.4 <sup>z</sup>	7.3 <sup>z</sup>	7.7 <sup>y</sup>	0.41
Concentrate DM intake, kg/d	7.9	6.6 <sup>z</sup>	6.5 <sup>z</sup>	6.9	0.43
Barley straw DM intake, kg/d	0.9	0.8	0.9	0.9	0.42
Water intake, L/d	44.3	38.0 <sup>z</sup>	36.8 <sup>z</sup>	39.4 <sup>y</sup>	2.06

<sup>a</sup> CTR = Control, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol, AEX = alfalfa extract, MIX = combination of the two treatments.

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

There were no effects of extracts on barley straw DM intake (average of 0.87 kg/d), although AEX tended to increase ( $P = 0.09$ ) the concentrate to barley straw ratio, compared with CTR. The reduction in water intake in CIE, AEX and MIX is likely associated to the reduction in DM intake. There are no previous reports on the effects of a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on DM intake in growing heifers. However, Busquet et al. (2003) observed a 12% reduction in concentrate DM intake in dairy cattle fed 600 mg/kg DM of cinnamaldehyde. Gurney et al. (1996) also observed that cinnamamide (a compound similar to cinnamaldehyde) reduced by 17% DM intake in house mice. They noted that mouse appeared to find the treated diet irritating to the mouth and paws. In contrast, the effect of AEX on DM intake in the present trial is contrary to previous studies with either malic acid or saponins. Feeding malic acid to dairy cows (Kung et al., 1982; level of inclusion 70 to 140 g/d of malate), dairy goats (Salama et al., 2002; level of inclusion 6.5 g/d of malate), or steers (Kung et al., 1982, level of inclusion 200 mg/Kg BW of malate; Martin et al., 1999; level of inclusion 25 to 80 g/d of malate; Montaña et al., 1999, level of inclusion 80 g/d of malate) had no effect on DM intake. Likewise, feeding saponins did not affect DM intake in steers (Hussain and Cheeke, 1995; Hristov et al., 1999) or dairy cows (Wu et al., 1994). Therefore, the reduction in DM intake in heifers fed AEX may be attributed to factors other than saponins and malic acid. With the available evidence, it can only be hypothesized that the reduction in DM intake in CIE and AEX is due to the presence of

organoleptic factors that inhibited intake. The ability of cattle to discriminate among several chemicals and flavors in feeds and their effect on DM intake has been demonstrated (Grover and Chapman, 1988). However, the reduction in DM intake should not be interpreted as a negative effect, because many growth promoters in beef (i.e., ionophores) improve feed conversion index by reducing DM intake while maintaining average daily gain (ADG; Chalupa, 1980). However, heifers used in this trial were at the end of the fattening period and measuring ADG was of limited value. Further research is necessary to determine their effects on DM intake, ADG and feed conversion.

#### *Rumen Fermentation Profile and Nitrogen Fractions*

The effects of AEX, CIE and MIX on rumen pH, total VFA concentration and profile, and N fraction concentrations were small (Tables 2 and 3).

**Table 2. Effect of natural plant extracts on hour by hour and average rumen pH, volatile fatty acids and L-lactate concentrations after the morning feeding**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	CIE	AEX	MIX	
Ruminal pH					
0	6.51	6.39	6.40	6.36	0.14
3	6.02	5.95	6.05	5.74	0.17
6	5.83	5.88	5.94	5.67	0.24
9	5.76	5.80	5.72	5.69	0.06
12	5.63	5.75	5.61	5.54	0.15
Average	5.95	5.95	5.94	5.80 <sup>y</sup>	0.06
Total AGV, mM					
0	116.9	117.8	120.5	123.2	7.71
3	128.7	127.6	125.8	146.4 <sup>z</sup>	7.71
6	138.5	131.3	130.0	141.6	7.71
9	147.8	141.0	143.3	146.1	7.71
12	157.4	144.9	151.3	155.2	7.71
Average	137.8	132.5	134.2	142.5	7.44
BCVFA, mM <sup>c</sup>					
0	3.4	3.1 <sup>y</sup>	3.2	3.6	0.22
3	3.4	3.0 <sup>y</sup>	3.1	3.3	0.22
6	3.2	2.6 <sup>y</sup>	2.6 <sup>z</sup>	2.9	0.22

9	2.8	2.6	2.7	2.9	0.22
12	2.7	2.6	2.6	2.9	0.22
Average	3.1	2.8 <sup>y</sup>	2.9	3.1	0.38
Acetate, mol/100 mol					
0	56.3	57.2	59.0 <sup>z</sup>	55.9	1.73
3	56.1	57.0	59.0 <sup>z</sup>	55.2	1.73
6	55.5	56.7	59.2 <sup>z</sup>	54.8	1.73
9	56.0	56.5	58.2	54.6	1.73
12	54.9	56.8	57.6	53.7	1.73
Average	55.8	56.8	58.6	54.8	1.01
Propionate, mol/100 mol					
0	26.1	25.9	23.3	27.6	3.13
3	26.4	26.8	23.3	29.1	3.13
6	27.3	27.6	24.6	30.2	3.13
9	28.3	28.3	26.3	30.8	3.13
12	29.5	28.2	27.5	31.8	3.13
Average	27.5	27.4	25.0	29.9	1.99
Butyrate, mol/100 mol					
0	12.7	12.6	13.4	11.9	1.38
3	12.7	12.1	13.5	11.5	1.78
6	12.5	12.1	12.5	11.2	1.23
9	11.7	11.8	12.2	11.0	1.34
12	11.6	11.6	11.7	10.9	1.66
Average	12.1	12.0	12.7	11.3	1.05
C2:C3 <sup>d</sup>					
0	2.15	2.21	2.53	2.02	0.21
3	2.13	2.12	2.53 <sup>z</sup>	1.89	0.10
6	2.03	2.05	2.41	1.81	0.33
9	1.98	1.99	2.21 <sup>z</sup>	1.77	0.11
12	1.86	2.01	2.09	1.68	0.15
Average	2.03	2.08	2.35 <sup>z</sup>	1.83	0.10
L- lactate, mM					
0	0.07	0.03	0.05	0.05	0.03
3	0.09	0.05	0.05	0.06	0.04
6	0.08	0.14 <sup>z</sup>	0.14 <sup>z</sup>	0.09	0.02
9	0.03	0.02	0.03	0.05	0.03
12	0.03	0.02	0.04	0.05	0.01
Average	0.06	0.05	0.06	0.06	0.02

<sup>a</sup> CTR = Control, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol, AEX = alfalfa extract, MIX = combination of the two treatments.

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>c</sup> BCVFAs = Branched-chain volatile fatty acid, including isobutyrate and isovalerate.

<sup>d</sup> C2:C3 = Acetate to propionate ratio.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

**Table 3. Effect of natural plant extracts on hour by hour and average nitrogen fractions measured after the morning feeding**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	CIE	AEX	MIX	
Large peptides-N, mg/100 mL					
0	10.8	8.7	9.2	8.7	1.01
3	12.7	11.6	12.7	9.9	2.14
6	10.4	10.5	8.2	10.0	1.85
9	8.1	7.1	10.1	10.6	1.72
12	8.5	7.3	10.2	11.6 <sup>z</sup>	1.06
Average	10.1	9.0	10.1	10.1	1.01
Small peptides plus amino acid-N, mg/100 mL					
0	14.0	16.9 <sup>z</sup>	14.8	13.8	2.03
3	14.7	15.1	13.0	14.0	1.98
6	10.0	17.6 <sup>z</sup>	15.0 <sup>z</sup>	12.5	1.07
9	13.8	15.4	14.5	13.7	1.69
12	16.0	15.0	15.8	16.2	1.97
Average	13.7	16.0 <sup>y</sup>	14.6	14.1	1.04
Ammonia-N, mg/100 mL					
0	19.8	14.8 <sup>z</sup>	20.9	19.1	1.60
3	20.5	18.1	19.5	17.7	1.84
6	18.3	14.9	13.1 <sup>z</sup>	14.1	1.82
9	11.9	12.5	13.4	13.3	1.80
12	13.9	14.3	13.9	13.0	1.86
Average	16.9	14.9 <sup>y</sup>	16.2	15.5	0.85

<sup>a</sup> CTR = Control, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol, AEX = alfalfa extract, MIX = combination of the two treatments.

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

Diurnal fluctuation and average ruminal pH was similar among treatments (average  $5.91 \pm 0.06$ ), except for MIX that tended to reduce ( $P = 0.07$ ) average ruminal pH compared with CTR (Table 2). There were no treatment effects on total VFA concentration (average of  $136.8 \pm 7.44$  mM, Table 2), the average proportions (mol/100 mol) of acetate ( $56.5 \pm 1.01$ ), propionate ( $27.5 \pm 1.99$ ) and butyrate ( $12.05 \pm 1.05$ ), and the concentration of lactic acid (average of  $0.06 \pm 0.02$  mM). The only changes in the average proportion of VFA were observed in the acetate to propionate ratio, that was higher ( $P < 0.05$ ) in AEX, and in the

branch-chained VFA (**BCVFA**) concentration that tended ( $P = 0.08$ ) to be lower in CIE compared with CTR.

The average concentration of LPep, SPep+AA and ammonia N were not affected by treatments, except for CIE that tended to increase ( $P = 0.08$ ) SPep+AA N and tended to decrease ( $P = 0.06$ ) ammonia N concentration. These changes suggest that CIE reduced the uptake of small peptides and AA by bacteria, or that deamination of AA was inhibited. Similar reduction of ammonia concentration was observed in *in vitro* studies with ruminal liquid from lactating dairy cows (Busquet et al., 2005a; with 2.3 mg/L of clove bud oil containing 81% of eugenol, Busquet et al. 2005b; with dose of 3000 mg/L of cinnamaldehyde and eugenol, respectively) and from fattening heifers (Cardozo et al., 2005; with 0.3 to 30 mg/L of cinnamaldehyde and dose of 300 mg/L of eugenol).

Considering a rumen volume of 30 L (rumen volume =  $BW^{0.57}$ ; Owens and Goetsch, 1988) in heifers used in the present trial and a dilution rate of 10%/h, the estimated rumen fluid flow through the rumen is around 72 L/d. If the amount of cinnamaldehyde and eugenol supplied daily was of 180 and 90 mg/d, respectively, the estimated average rumen concentration was of 2.5 and 1.3 mg/L for cinnamaldehyde and eugenol, respectively. The cinnamaldehyde dose was within the range of the doses reported to have effects on rumen microbial fermentation *in vitro* (Cardozo et al., 2005), and the concentration of eugenol was slightly below the concentration suggested to have effects (Busquet et al., 2005b). However, the role of eugenol was related to its antioxidant effect, protecting cinnamaldehyde from its transformation into the inactive component benzaldehyde (Friedman et al., 2000). Cinnamaldehyde and eugenol have shown to have antimicrobial activity against rumen microbes and to modify rumen fermentation profile and N metabolism (Busquet et al., 2005a; Cardozo et al., 2004). They were selected for this trial after Cardozo et al. (2005), who observed that cinnamaldehyde and eugenol increased total VFA concentration, and cinnamaldehyde also reduced the acetate to propionate ratio in a 24 h *in vitro* batch culture fermentation study using rumen fluid from heifers fed a 10:90 forage to concentrate diet and at pH 5.5. However, when initial pH in the batch fermentation was 7.0, the addition of cinnamaldehyde reduced total VFA concentration and increased the acetate to propionate ratio, and eugenol had no effects, which suggested that the effects

were pH dependent. Similar observations were reported by Busquet et al. (2005a) when these additives were tested in rumen fluid of a dairy cow fed a high forage diet and pH above 6.0. The lack effect of CIE on N fraction in the current experiment could be attributed to the pH of the rumen fluid of heifers that was relatively high (5.95), and the management and the use of 0.5% bicarbonate may have prevented average pH from dropping below 5.95. Devant et al. (2000 and 2001) reported that when heifers were individually housed in tie-stalls and fed with a high concentrate diets (with no competition for feed) the ruminal pH was above 6.0 and there was no indication of ruminal acidosis.

Saponins and malate are the main active components in alfalfa extract (Fenwick and Oakenfull, 1983; Callaway et al., 1997). The most important effects observed by AEX were at 6 h after feeding, where AEX increased ( $P < 0.05$ ) L-lactate concentration, and reduced ( $P < 0.05$ ) BCVFA concentration compared with CTR. The AEX also increased ( $P < 0.05$ ) the acetate proportion during the 6 h after feeding, resulting in an increase in the acetate to propionate ratio at 3 and 9 h after feeding compared with CTR. Although the AEX did not affect the average LPep, SPep+AA and ammonia N concentration during the 12 h after feeding interval, it increased ( $P < 0.05$ ) the SPep+AA N and reduced ( $P < 0.05$ ) ammonia N concentrations at 6 h after the morning feeding compared with CTR. Saponins had no effect on total VFA concentration in steers (Hussain and Cheeke, 1995; Hristov et al., 1999, level of inclusion 3.0 and 2.6 g/d of pure yucca saponins, respectively), sheep (Klita et al., 1996, level of inclusion 520 mg/d of pure alfalfa saponins), or dairy cows (Wu et al., 1994; Wang et al., 1998, level of inclusion 1.2 g/d and 22 mg/L of pure yucca saponins, respectively), and on propionate proportions in dairy cows (Valdez et al., 1986; Wu et al., 1994, level of inclusion 1.5 and 1.2 g/d of pure yucca saponins, respectively) and in sheep (Klita et al., 1996). Malate may increase or no change the total VFA concentration (Kung et al., 1982; Carro et al., 1999; Montaña et al., 1999), increase propionate proportion (Kung et al., 1982; Carro et al., 1999), and ruminal pH (Martin and Streeter, 1995; Martin et al., 1999; Montaña et al., 1999), and reduce lactate concentration (Carro et al., 1999). However, most of the reported research found inconsistent effects of saponins or malate on ammonia N concentrations depending on the dose and (or) the approach used (in vivo or in vitro). Studies in sheep (Klita et al., 1996), dairy

cows (Wu et al., 1994; Wang et al., 1998), and steers (Hussain and Cheeke, 1995) found no effect of saponins on ammonia N concentration. In contrast, other in vitro studies indicated that saponins reduce ammonia N concentration (Makkar et al., 1998, level of inclusion 1,200 mg/L of pure saponins). Hristov et al. (1999) also observed a lower ammonia N concentration 2 h after supplying 60 g/d of *Yucca schidigera* (containing 4.4% of saponins) to heifers. On the other hand, malate seems not to affect ammonia N concentration in ruminal fluid of sheep fed a 50 to 50 forage to concentrate ratio in a RUSITEC system (Carro et al., 1999, level of inclusion 750 mg/L of malate), and in dairy cows (Kung et al., 1982, level of inclusion 140 g/d of malate). In the present trial, the effects of AEX on ammonia N concentration was observed only at 6 h after feeding, without affecting the overall average between feeding, and these changes are likely due to the effect of saponins rather than malate. However, the lack of effect of AEX on propionate, rumen pH and lactate concentration could be attributed to the dose. Considering an average daily rumen flow of 72 L (rumen volume =  $BW^{0.57}$ ; Owens and Goetsch, 1988) and a dilution rate of 10%/h, and the concentration of saponins and malate in AEX, the estimated average rumen concentration was of 6.3 and 41.7 mg/L for saponins and malate, respectively. The concentration of saponins and malate were lower than other studies that found some effect on rumen microbial fermentation (Makkar et al., 1998, level of inclusion 1,200 mg/L of pure saponins; Carro et al., 1999, level of inclusion 750 mg/L of malate).

The objective of mixing AEX and CIE was to determine their possible synergism on rumen microbial fermentation. In general, the effects of MIX on rumen microbial fermentation were small, showing a trend ( $P = 0.07$ ) to reduce average ruminal pH throughout the 12 h feeding interval, and increasing ( $P < 0.05$ ) total VFA concentration at 3 h after feeding, and LPep N concentration at 12 h after feeding compared with CTR. There is no information on the effect of these four components (cinnamaldehyde, eugenol, saponins, and malate) acting together on peptide metabolism in the rumen. Although the MIX increased total VFA and LPep N concentration at 3 and 12 h after feeding, respectively, the average concentration and proportions of VFA, and N fractions were not affected by MIX. If considering that AEX and CIE fed individually modified some ruminal



fermentation parameters, but when they were mixed the effects were not observed, suggesting that their effects were not additive.

### *Protozoa Population*

The *Entodinium* spp. and *Isotricha* spp. counts were not affected ( $P > 0.05$ ) by CIE, but the *Entodinium* spp count was reduced ( $P < 0.05$ ) by AEX, and *Isotricha* spp. Counts was reduced ( $P < 0.05$ ) by MIX at time of feeding (0 h; Table 3). In contrast, AEX reduced ( $P < 0.05$ ), and CIE tended to reduce ( $P = 0.07$ ) *Entodinium* spp. counts, and CIE and MIX increased ( $P < 0.05$ ) *Isotricha* spp. counts 3 h after feeding compared with CTR. Protozoa from the genera *Entodinium* spp. were the predominant protozoa in the present trial, but *Isotricha* spp. were more sensitive to CIE than *Entodinium* spp. There is no information on the effects of cinnamaldehyde and eugenol on protozoa population. However, the antimicrobial properties of these plant secondary metabolites have been assessed (Davidson and Naidu, 2000). The CIE could gain access to the ectoplasm and to deeper parts of protozoa, causing instability of membranes and depletion of intracellular ATP, resulting in cell death.

**Table 4. Effect of natural plant extracts on protozoa population by hours**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	CIE	AEX	MIX	
Protozoo h 0, millions/mL					
<i>Entodinium</i> spp.	0.42	0.26	0.22 <sup>z</sup>	0.43	0.09
<i>Isotricha</i> spp.	0.02	0.02	0.02	0.04 <sup>z</sup>	0.08
Protozoo h 3, millions/mL					
<i>Entodinium</i> spp.	0.73	0.55 <sup>y</sup>	0.42 <sup>z</sup>	0.72	0.09
<i>Isotricha</i> spp.	0.03	0.07 <sup>z</sup>	0.03	0.06 <sup>z</sup>	0.08

<sup>a</sup> CTR = Control, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol, AEX = alfalfa extract, MIX = combination of the two treatments.

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

Such mechanism of action has been suggested for bacteria (Helander et al., 1998). As expected, AEX reduced protozoa counts (particularly *Entodinium* spp.). Saponins are known to inhibit protozoa numbers in sheep rumen liquid (Wallace et al., 1994, level of inclusion 10 mg/L of *Yucca schidigera*; Klita et al., 1996, level of inclusion 64 mg/L of pure alfalfa saponins; Makkar et al., 1998, level of inclusion 1200 mg/L of sarsaponins fractions), in steers fed high concentrate diets (Hristov et al., 1999, level of inclusion 2600 mg/d of pure yucca saponins), and in dairy cows (Valdez et al., 1986, level of inclusion 1500 mg/d of pure alfalfa saponins). The effect of saponins-containing plants on ciliate protozoa may be attributed to the cholesterol-binding capacity of saponins that may interact with the hydroxi-group of cholesterol of protozoa cell membrane, resulting in its instability and cell death (Francis et al., 2002). Considering an average rumen flow of 72 L (rumen volume =  $BW^{0.57}$ ; Owens and Goetsch, 1988; and a dilution rate of 10 %/h), and the amount of saponins supplied daily (450 mg), the average estimated concentration of saponins (6.3 mg/L) was lower than in some studies (Makkar et al., 1998; Hristov et al., 1999), but similar to other (Wallace et al., 1994) which reported strong antiprotozoal activity, and suggests that rumen protozoa were very sensitive at moderate doses of saponins.

The combination of cinnamaldehyde, eugenol, and AEX had small effects on rumen protozoa counts, affecting only to genera *Isotricha* spp. The implication of these change are not known. Likewise, it is not clear the reason for the smaller effect of the combination of CIE and AEX compared to AEX alone, but suggests that these additives act more efficiently when added separately than together.

#### *In vitro Dry Matter and Crude Protein Degradability*

Treatments had no effect on the degradation of DM of the six supplements after 4 or 24 h of incubation. In contrast, the effect on CP degradation was feed dependent. Treatments CIE and MIX reduced ( $P < 0.05$ ) CP degradation of soybean meal and corn grain 4 h after incubation, and MIX reduced ( $P < 0.05$ ) CP degradation of alfalfa hay 4 h after incubation compared with CTR. Treatments had no effect on CP degradation of the six supplements after 24 h of incubation.

These results suggest that rate, but not the extent of protein degradation of some supplements was affected by treatments. There are no reports on the effects of cinnamaldehyde, eugenol, malate, and saponins on in vitro DM and CP degradation of these six supplements.

**Table 5. Effect of natural plant extracts on in vitro dry matter and crude protein degradation <sup>a</sup>**

		Treatments <sup>b</sup>				SEM <sup>c</sup>
		CTR	CIE	AEX	MIX	
DM degradation, %						
h 4	Soybean	50.0	47.0	46.3	46.7	2.27
	Corn	55.5	54.4	50.9	53.4	2.92
	Wheat	87.9	89.4	89.2	89.4	1.29
	Barley	69.7	70.2	67.3	68.6	3.08
	Alfalfa hay	46.1	43.8	43.4	44.3	3.72
	Ryegrass	35.9	34.5	34.1	34.1	1.99
h 24	Soybean	88.7	90.9	89.4	85.9	2.44
	Corn	95.5	95.5	93.9	93.8	2.27
	Wheat	95.8	95.9	95.5	95.6	0.39
	Barley	91.1	90.8	91.2	90.4	2.13
	Alfalfa hay	73.9	73.6	73.2	72.6	2.79
	Ryegrass	63.9	65.3	63.9	62.2	2.28
CP degradation, %						
h 4	Soybean	44.6	38.3 <sup>z</sup>	40.2	36.0 <sup>z</sup>	2.28
	Corn	52.1	46.1 <sup>z</sup>	49.7	45.8 <sup>z</sup>	2.11
	Wheat	89.9	88.7	86.7	86.6	2.44
	Barley	65.1	67.7	67.2	67.9	3.41
	Alfalfa hay	54.5	49.8	49.9	45.7 <sup>z</sup>	2.39
	Ryegrass	50.2	49.2	48.8	46.2	2.03
h 24	Soybean	82.6	86.6	82.9	79.3	2.65
	Corn	89.8	90.7	86.8	86.5	3.14
	Wheat	98.0	97.9	97.9	97.7	0.28
	Barley	96.5	96.0	96.6	96.0	2.85
	Alfalfa hay	87.9	88.0	87.0	87.3	2.83
	Ryegrass	81.4	81.3	79.6	80.2	3.12

<sup>a</sup> There were no treatment by hour interactions.

<sup>b</sup> CTR = Control, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol, AEX = alfalfa extract, MIX = combination of the two treatments.

<sup>c</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

However, early studies suggested that some essential oils reduced rate, but not the extent, of CP degradation of some, but not all, feeds (Newbold et al., 2004; Molero et al., 2004). Newbold et al. (2004) tested the effect of feeding a blend of essential oils on rapeseed meal, soybean meal or hay in sheep fed a 60 to 40 forage to concentrate ration, and reported that tended to reduce the rate of degradation of CP only in soybean meal. Molero et al. (2004) also reported a selective effect of the same blend of essential oils on the rate of degradation (but not the extent) of CP of lupin seeds, green peas, and sunflower meal in heifers fed a high concentrate diets.

### **Implication**

This is the first in vivo report on the effects of alfalfa extract (containing saponins and malate) and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen fermentation in heifers fed a high-concentrate diet. The mixture of cinnamaldehyde and eugenol reduced dry matter intake, the number of *Isotricha* spp, and in vitro CP degradation of soybean meal, and corn grain. The alfalfa extract reduced dry matter intake and *Entodinium* spp. counts, and increased the acetate to propionate ratio. The effects of a mixture of the two treatments were smaller suggesting that they perform better alone than in combination.

## **CAPÍTULO 5**

Anís, capsicum, y una mezcla de cinnamaldehído y eugenol como modificadores de la fermentación ruminal en terneros alimentados con dietas altas en concentrado

**Anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol as modifiers of rumen fermentation in beef heifers fed a high-concentrate diet**

---

## **Anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol as modifiers of rumen fermentation in beef heifers fed a high-concentrate diet**

### **ABSTRACT**

Four fattening Holstein heifers ( $450 \pm 28$  kg BW) fitted with ruminal trocars were used in a 4 x 4 Latin square design to evaluate the effects of anise oil, capsicum extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen fermentation and protein degradation. Each period consisted of 15 d of adaptation and 6 d for sampling. Treatments were: no extract (**CTR**), 2 g/d of anise oil (**ANI**; containing 10% anethole), 1 g/d of capsicum extract (**CAP**; containing 15% capsaicin), and a mixture of 0.6 g/d of cinnamaldehyde and 0.3 g/d of eugenol (**CIE**). On d 16, 17 and 18 of each period, dry matter (**DM**) and water intake were measured. On d 19, 20 and 21 ruminal content was sampled at 0, 3, 6, 9, and 12 h after feeding to determine ruminal pH, and the concentration of volatile fatty acids (**VFA**), L-lactate, large peptides (**LPep**), small peptides plus AA (**SPep+AA**), and ammonia N. On d 20 and 21, samples of rumen fluid were also taken at 0 and 3 h after feeding to determine protozoa counts. On the last day, rumen fluid was used to determine DM and crude protein (**CP**) degradation of alfalfa hay, ryegrass hay, barley grain, wheat grain, corn grain and soybean meal after 4 and 24 h of in vitro incubation. Relative to CTR, treatments had no effect on ruminal pH, total VFA concentration and butyrate proportion. The CAP increased DM intake, and water intake, and SPep+AA N concentration, and reduced acetate proportion, and branch-chained VFA (**BCVFA**) concentration and LPep N concentration. The CIE reduced water intake, acetate proportion, BCVFA, L-lactate and ammonia N concentrations, and the number of total protozoa counts, and increased propionate proportion and SPep+AA N concentration. The ANI reduced acetate to propionate ratio, BCVFA and ammonia N concentrations, and the number of total protozoa counts. In vitro, ANI, CAP, and CIE reduced CP degradation of soybean meal at 4 h after incubation, and only ANI reduced CP degradation of soybean meal at 24 h after incubation. Results indicate that CIE, ANI and CAP may be useful as modifiers of rumen fermentation in beef production systems.

## Introduction

Ionophores have been used in beef diets due to their ability to modify rumen microbial fermentation increasing propionate proportion, decreasing acetate, lactate, and methane production, and inhibiting deamination of amino acid in the rumen (Chalupa et al., 1980). These changes in rumen fermentation may improve the efficiency of nutrient utilization and reduce the risk of acidosis and bloat in ruminants (Bergen and Bates, 1984). However, the European Union legislation will ban the use of antibiotic in animal feeds from January of 2006 (Official Journal of the European Union, 2003). For this reason, industry is searching for alternative additives such as plant extracts that are generally recognised as safe for human and animal consumption. Previous in vitro studies in our laboratory (Busquet et al., 2005a, 2005b; Cardozo et al., 2004) with different plant extracts and secondary plant metabolites showed the potential of some extracts to modify rumen microbial fermentation. Cardozo et al. (2005) also reported that doses from 3 to 30 mg/L of anise oil, capsicum extract, eugenol and cinnamaldehyde may reduce energy losses (by increasing propionate proportion) and nitrogen (by decreasing the ammonia-N concentration) from the diet in an in vitro system under beef type conditions (high concentrate, and low pH).

The objective of this study was to evaluate the effects of anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in heifers fed a high-concentrate diet.

## Materials and Methods

### *Animal, Treatments and Housing*

Four fattening Holstein heifers (average initial BW of  $450 \pm 28$  kg) fitted with a 1-cm i.d. plastic ruminal trocars (Divasa Farmavic SA, Vic, Spain) were used in a  $4 \times 4$  Latin square design. Heifers were individually housed in tie-stalls at the Unitat de Granges i Camps Experimentals of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain), and were randomly assigned to one of four experimental treatments. The diet consisted (DM basis) of barley straw (10%), ground barley grain (30%), ground corn grain (21%), wheat bran (14%), soybean meal (15%), corn gluten feed (7%), sodium bicarbonate (0.5%), and a mineral and vitamin mixture (2.5%; 1

kg DM of vitamin and mineral mixture contained 1,562,500 IU vitamin A; 150,000 IU vitamin D; 2,500 mg vitamin E; 3,500 mg zinc; 2,000 mg iron; 400 mg manganese; 250 mg copper; 50 mg cobalt; 38 mg iodine; 25 mg selenium). The diet (91% DM, 16% CP, 25% NDF, and 11% ADF, DM basis) was designed to meet or exceed nutrient recommendations for 450 kg BW Holstein heifers with an ADG of 1.07 kg/d (NRC, 1996). Treatments were: no additive (control: **CTR**), 2 g/d of anise extract (**ANI**; containing 10% anethole), 1 g/d of capsicum extract (**CAP**; containing 15% capsaicin), and a mixture of 0.6 g/d of cinnamaldehyde and 0.3 g/d of eugenol (**CIE**). Raw materials were provided by Pancosma (Pancosma SA, 01200-Bellegarde-sur-Valserine Cedex, France). Each experimental period consisted of 21 d (15 d for adaptation and 6 d for sample collection). Animals had ad libitum access to concentrate and barley straw offered once daily at 0900. Treatments were offered daily at 0900 mixed with 600 g of a mixture of soybean meal and mineral and vitamin mix of the diet to guarantee the consumption of the whole dose. The research protocol was approved by Campus Laboratory Animal Care Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain).

### *Sample Collection and Analyses*

Dry matter and water intake were measured individually on d 16, 17 and 18 of each period to avoid interference with rumen sampling protocols. Feed refusal was recorded before feeding. Refused concentrate and barley straw were manually separated with a sieve (0.5 cm screen), and weighted separately. Feed and refusal samples were collected daily and analysed for DM to determine DM intake. Water intake was also registered using an individual drinking cups equipped with individual flow meters (B98.32.50, Invensys model 510 C, Tashia SL, Artesa de Segre, Spain). Dry matter was determined by oven drying feed at 105°C for 24 h and ashes by heating feed at 550°C for 4 h (AOAC, 1990) to determine OM content. Nitrogen content was determined using the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990), and ash corrected NDF and ADF were determined sequentially using  $\alpha$ -amylase and sodium sulphite (Van Soest et al., 1991).

On d 19, 20, and 21 of each period, samples of whole ruminal contents were collected at 0, 3, 6, 9, and 12 h after the morning feeding. The rumen pH was



measured immediately with a portable pH-meter (model 507, Crison Instruments SA, Barcelona, Spain). Ruminant fluid was strained through 2 layer of cheesecloth and 5 sub-samples of filtrate were taken for VFA, large peptides (**LPep**), small peptides plus AA (**SPep+AA**), ammonia N, and lactate analysis.

Total and individual VFA were analyzed as described by Jouany (1982): 1 mL of a solution made up of a 0.2% (wt/wt) mercuric chloride, 0.2% (wt/wt) of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, was added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 15,000 × g for 15 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) at 275°C in the injector and 29.9 mL/min gas flow rate.

Ammonia N concentration was analyzed as described by Chaney and Marbach (1962): 4 mL sample of filtrate was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at 15,000 × g for 15 min, and the supernatant was analyzed by spectrophotometry at 625 nm (Libra S21, Biochrom Analytical Instruments, Cambridge, UK).

Large peptides and SPep+AA N were determined as described by Winter et al. (1964): 16 mL sample of filtered rumen fluid was added to 4 mL of 10% (wt/vol) sodium tungstate and 4 mL of 1.07 N sulfuric acid. After allowing the tubes to stand at 5°C for 4 h, they were centrifuged at 9,000 × g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for tungstic acid soluble N (**TA N**) by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990). To determine trichloroacetic acid soluble N (**TCA N**), 4 mL of 50% (wt/vol) of TCA were added to 16 mL of filtered rumen fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9,000 × g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for TCA N. Results were used to calculate (mg/100 mL): a) LPep N = TCA N – TA N; and b) SPep+AA N = TA N – ammonia N.

The L-lactate was analyzed according to de Veth and Kolver (2000): 8 mL of filtered rumen fluid were added to 0.1 mL of 50% (vol/vol) sulfuric acid, and frozen. Samples were centrifuged at 15,000 × g for 15 min. A 25 µL of supernatant was added to 250 µL of the first react (containing 0.5 M of hydrazinium hydroxide, 12 mM of EDTA, and 20 mM of NAD<sup>+</sup>). Three minutes after incubation, 7 µL of

second reactant (100 U/mL of LDH, and 3.2 M of ammonium sulphate) were added, and absorbance was measured 340 nm by an auto-analyzer (Model COBAS MIRA 89, Roche, Switzerland).

On day 20 and 21 of each period, at 0 and 3 h after the morning feeding, subsamples of filtrate were also taken for enumeration of protozoa by combining 8 mL of filtrate with 2 mL of methyl green:formaldehyde (38%; wt/wt) solution. *Entodinium* and *Isotricha* spp. were identified (Dehority, 1993) counting as described by Veira et al. (1983) using a Neubauer Improved Bright-Line counting chamber (Hausser Scientific Partnership, Horsham, PA).

#### *In Vitro Dry Matter and Crude Protein Degradation*

On day 21 of each period at 3 h after feeding, samples (1500 mL) of rumen contents of each heifer were obtained and strained through two layers of cheesecloth and transported to the laboratory in four prewarmed insulated containers. An in vitro fermentation system (Daisy II, ANKOM technology, NY) was used to determine DM and N degradation of six supplements (soybean meal, corn grain, barley grain, wheat grain, alfalfa hay, and ryegrass hay) after 4 and 24 h of incubation. Rumen fluid (1000 mL) was mixed in a 1:1 proportion with a buffer solution (Weller and Pilgrim, 1974), the pH was adjusted to 7.0 with 3 N HCl or 5 N NaOH, introduced into the Daisy II flask, and gassed with CO<sub>2</sub>. The dose of each extract was recalculated considering an average flow of rumen fluid of 82 L/d in heifers used in the present trial (assuming that rumen volume =  $BW^{0.57} = 34$  L; Owens and Goetsch, 1988; and a dilution rate of 10%/h), and added into the Daisy II jar (24.4 mg/L of ANI, 7.3 mg/L of cinnamaldehyde and 3.7 mg/L of eugenol, and 12.0 mg/L of CAP). Each supplement was weighed in duplicate (0.5 g for 4 h, and 0.75 g for 24 h) into 5 × 5 cm polyester bags with a 52 ± 16 μm average pore size (ANKOM R510, ANKOM technology, NY). The bags were heat-sealed (impulse sealer 34J9, UL, TEW Co. Ltd., Taiwan), introduced in the Daisy II jars, and incubated at constant temperature (39 °C) and rotation for 4 or 24 h. After removal from the Daisy II jars, bags were washed with water (three times, 5 min each) in a commercial washing machine (JATA, Spain), and dried at 105°C oven for 24 h.

Bag residues were analyzed for DM (105°C for 24 h) and N content (Kjeldahl procedure; AOAC, 1990).

### *Statistical Analyses*

All statistical analyses were conducted using SAS (Version 8.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Results of DM and water intake, ruminal pH, the concentration and proportions of VFA, L-lactate, LPep N, SPep+AA N, ammonia N, and protozoa counts were analyzed using the PROC MIXED procedure for repeated measures (Littell et al., 1998). The model accounted for the effects of treatments, and days (for DM and water intake), or day and hours (for pH, VFA, lactate, protein fractions and protozoa). Period was considered random effect. The heifers × period was also considered subject. Each variable was subjected to three covariance structures: compound symmetric, autoregressive order one, and unstructured covariance. The covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion was considered to be the most desirable analyses. In vitro estimated DM and CP degradation of the six supplements were analyzed using the PROC MIXED procedure. The statistical model accounted for the effects of treatment, time of incubation, and the six supplements. The period was considered a random effect. Significant differences between means of each treatment and CTR were declared at  $P < 0.05$  using the Dunnett option.

### **Results**

The CAP increased ( $P < 0.05$ ) total DM intake, concentrate intake, and water intake, ANI tended ( $P < 0.10$ ) to increase total DM intake, and CIE reduced ( $P < 0.05$ ) water intake compared with CTR. However, barley straw DM intake (average of  $0.93 \pm 0.06$  kg/d) and barley straw to concentrate ratio (average  $11.8 \pm 1.11$ , Table 1) were not affected by treatments.

Plant extracts had no effect ( $P > 0.05$ ) on average ruminal pH ( $6.09 \pm 0.07$ ) and average total VFA concentrations ( $154.5 \pm 3.15$  mM, Table 2). Compared with CTR, average molar proportion of acetate was lower ( $P < 0.05$ ) in ANI, CAP, and CIE, and that of propionate was higher ( $P < 0.05$ ) in ANI and CIE, the acetate to propionate ratio was lower ( $P < 0.05$ ) in ANI, the concentration of branch-chained

VFA (**BCVFA**) was lower ( $P < 0.05$ ) in ANI, CAP, and CIE, and the concentration of L-lactate was lower ( $P < 0.05$ ) in ANI and CIE. These differences were most apparent 3 and 6 h after feeding.

**Table 1. Effect of Natural plant extracts on dry matter and water intake**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	ANI	CAP	CIE	
Total DM intake, Kg/d	7.6	8.0 <sup>y</sup>	8.3 <sup>z</sup>	7.8	0.13
Concentrate intake, kg/d	6.7	7.0	7.3 <sup>z</sup>	7.0	0.23
Barley straw intake, kg/d	0.92	0.94	0.98	0.89	0.06
Straw to concentrate ratio	12.1	11.9	11.8	11.3	1.11
Water intake, L/d	36.3	37.4	45.7 <sup>z</sup>	34.1 <sup>z</sup>	0.43

<sup>a</sup> CTR = Control (no additive), ANI= anise oil, CAP = Capsicum extract, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

**Table 2. Effect of natural plant extracts on hour by hour and average rumen pH, volatile fatty acids and L-lactate concentrations after the morning feeding**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	ANI	CAP	CIE	
Ruminal pH					
0	6.76	6.75	6.64	6.52	0.14
3	6.31	6.25	6.45	6.21	0.18
6	5.90	5.81	5.93	5.97	0.25
9	5.89	5.88	5.92	5.90	0.06
12	5.63	5.66	5.74	5.63	0.14
Average	6.10	6.07	6.14	6.05	0.07
Total VFA, mM					
0	129.6	127.0	128.7	134.1	4.06
3	144.1	152.3	143.6	147.0	5.44
6	157.8	161.7	166.5 <sup>z</sup>	154.9	3.95
9	157.9	159.7	158.7	153.7	5.03
12	186.0	176.9	174.9	174.6	6.55

Average	155.1	155.5	154.5	152.9	3.15
Acetate, mol/100 mol					
0	56.4	56.7	56.7	55.0	1.38
3	62.4	52.8 <sup>z</sup>	51.1 <sup>z</sup>	52.7 <sup>z</sup>	1.45
6	55.9	52.2 <sup>z</sup>	50.9 <sup>z</sup>	52.5 <sup>y</sup>	1.34
9	55.4	54.4	55.8	52.6 <sup>z</sup>	0.87
12	54.0	53.3	54.8	51.9	1.44
Average	56.8	53.9 <sup>z</sup>	53.9 <sup>z</sup>	52.9 <sup>z</sup>	0.61
Propionate, mol/100 mol					
0	25.6	27.2	24.8	27.6	2.41
3	20.7	32.5 <sup>z</sup>	32.9 <sup>z</sup>	30.7 <sup>z</sup>	2.53
6	28.1	33.7	34.4 <sup>y</sup>	31.1	2.45
9	28.6	30.7	27.8	30.8	1.61
12	30.3	31.9	28.9	32.0	2.40
Average	26.7	31.2 <sup>z</sup>	29.8	30.5 <sup>z</sup>	1.05
Butyrate, mol/100 mol					
0	12.3	10.8	13.1	12.3	0.99
3	11.6	10.6	12.3	12.2	1.03
6	11.1	10.7	11.2	12.1	0.98
9	11.5	10.6	12.0	12.0	0.79
12	11.4	10.8	12.1	11.8	0.97
Average	11.6	10.7	12.1	12.1	0.85
Acetate to propionate ratio					
0	2.4	2.2	2.4	2.4	0.24
3	3.0	1.6 <sup>z</sup>	1.6 <sup>z</sup>	1.9 <sup>z</sup>	0.23
6	2.2	1.6 <sup>z</sup>	1.5 <sup>z</sup>	1.9	0.24
9	2.1	1.9	2.2	1.9	0.21
12	2.0	1.8	2.1	1.8	0.23
Average	2.3	1.8 <sup>z</sup>	2.0	2.0	0.19
Branch-chained VFA, mM					
0	5.0	4.4	4.8	4.5	0.28
3	4.7	3.5 <sup>z</sup>	3.2 <sup>z</sup>	3.5 <sup>z</sup>	0.29
6	4.3	2.8 <sup>z</sup>	3.3 <sup>z</sup>	3.7	0.29
9	4.2	4.0	4.2	4.3	0.25
12	4.5	4.2	4.5	4.4	0.30
Average	4.5	3.8 <sup>z</sup>	4.0 <sup>z</sup>	4.1 <sup>z</sup>	0.16
L-lactate, mM					
0	0.07	0.07	0.03	0.02	0.08
3	0.07	0.04	0.25 <sup>z</sup>	0.12	0.06
6	0.23	0.14	0.37	0.16	0.07
9	0.58	0.38 <sup>z</sup>	0.28 <sup>z</sup>	0.36 <sup>z</sup>	0.07
12	0.71	0.71	0.54 <sup>z</sup>	0.60	0.09
Average	0.33	0.27 <sup>y</sup>	0.29	0.25 <sup>z</sup>	0.04

<sup>a</sup> CTR = Control (no additives), ANI= anise oil, CAP = Capsicum extract, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

The ANI and CAP reduced ( $P < 0.05$ ) the acetate proportion, BCVFA concentration, and the acetate to propionate ratio 3 and 6 h after feeding, and increased ( $P < 0.05$ ) the propionate proportion 3 h after feeding.

**Table 3. Effect of natural plant extracts on hour by hour and average nitrogen fractions measured after the morning feeding**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	ANI	CAP	CIE	
Large peptides-N, mg/100 mL					
0	11.9	11.3	10.3	10.9	3.20
3	19.1	17.3	15.5	15.4	1.13
6	22.2	19.4	12.8 <sup>z</sup>	15.3	2.08
9	16.2	11.7 <sup>y</sup>	9.4 <sup>z</sup>	12.1	2.06
12	14.5	15.3	16.4	14.2	2.53
Average	16.8	15.0	12.9 <sup>z</sup>	13.6	1.17
Small peptides plus amino acid-N, mg/100 mL					
0	14.8	17.2	19.0	15.8	3.26
3	20.3	21.5	25.5	21.7	1.11
6	18.1	19.5	28.6 <sup>z</sup>	23.0	1.49
9	19.3	18.2	23.5 <sup>z</sup>	26.5 <sup>z</sup>	1.61
12	16.8	12.8 <sup>z</sup>	17.4	18.0	1.12
Average	17.9	17.8	22.8 <sup>z</sup>	21.0 <sup>z</sup>	0.89
Ammonia-N, mg/100 mL					
0	19.9	18.3	18.8	18.6	1.58
3	17.0	12.2 <sup>z</sup>	15.5	13.2 <sup>y</sup>	1.56
6	14.1	10.7	14.9	11.6	2.05
9	13.8	10.1 <sup>z</sup>	13.2	11.5	1.45
12	17.8	13.6 <sup>y</sup>	14.1	14.6	1.48
Average	16.5	13.0 <sup>z</sup>	15.3	13.9 <sup>z</sup>	0.70

<sup>a</sup> CTR = Control, ANI= anise oil, CAP = Capsicum extract, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol.

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

The CIE reduced ( $P < 0.05$ ) the proportion of acetate 3 and 9 h after feeding, the acetate to propionate ratio 3 h after feeding, and the concentration of BCVFA 3 h after feeding, and increased ( $P < 0.05$ ) the proportion of propionate 3 h after feeding, compared with CTR. The L-lactate concentration in ANI was only reduced ( $P < 0.05$ ) 9 h after feeding. The CAP also increased ( $P < 0.05$ ) total VFA

concentration, and tended to increase ( $P < 0.10$ ) propionate proportion 6 h after feeding, and increased ( $P < 0.05$ ) L-lactate 3 h, but reduced ( $P < 0.05$ ) L-lactate 9 and 12 h after feeding. The CIE tended to reduce ( $P < 0.10$ ) the molar proportion of acetate 6 h and reduced ( $P < 0.05$ ) the concentration of L-lactate 9 h after feeding.

The average LPep N concentration throughout the 12 h feeding interval was lower ( $P < 0.05$ ) in CAP compared with CTR (Table 3). The LPep N concentrations in CAP were lower ( $P < 0.05$ ) at 6 and 9 h, and in ANI tended to be lower ( $P < 0.10$ ) at 9 h after feeding compared with CTR. The average SPep+AA N concentration between feedings was higher ( $P < 0.05$ ) in CAP and CIE compared with CTR (Table 3). The Spem+AA N concentrations in CAP were higher ( $P < 0.05$ ) at 6 and 9 h, in ANI at 12 h, and in CIE at 9 h after feeding compared with CTR. The average ammonia N concentration throughout the 12 h feeding interval was lower ( $P < 0.05$ ) in ANI and CIE compared with CTR (Table 3). The ammonia N concentration in ANI was lower ( $P < 0.05$ ) at 3 and 9 h, and tended to be lower ( $P < 0.10$ ) at 12 h, and in CIE tended to be lower ( $P < 0.10$ ) at 3 h after feeding compared with CTR.

Protozoa (*Entodinium* spp. and *Isotricha* spp.) counts were not affected ( $P > 0.05$ ) by treatments at time of feeding (0 h; Table 4) except in ANI that were lower compared with CTR. However, counts were lower ( $P < 0.05$ ) in ANI and CIE at 3 h after feeding compared with CTR.

**Table 4. Effect of natural plant extracts on protozoa populations by hours**

	Treatments <sup>a</sup>				SEM <sup>b</sup>
	CTR	ANI	CAP	CIE	
Protozoa h 0, millions/mL					
<i>Entodinium</i> spp.	0,44	0,16 <sup>z</sup>	0,39	0,33	0,09
<i>Isotricha</i> spp.	0,03	0,01 <sup>z</sup>	0,02	0,02	0,10
Protozoa h 3, millions/mL					
<i>Entodinium</i> spp.	0,67	0,29 <sup>z</sup>	0,49	0,47 <sup>z</sup>	0,09
<i>Isotricha</i> spp.	0,03	0,02 <sup>z</sup>	0,03	0,02 <sup>z</sup>	0,08

<sup>a</sup> CTR = Control, ANI= anise oil, CAP = Capsicum extract, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol.

<sup>b</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

Effects of ANI, CAP and CIE on in vitro DM and CP degradation were small (Table 5). The ANI reduced ( $P < 0.05$ ) in vitro DM degradation of corn grain at 4 and 24 h, and of soybean meal at 24 h after incubation. The CAP also reduced ( $P < 0.05$ ), and CIE tended to reduce ( $P < 0.10$ ) DM degradation of corn grain after 4 h of incubation compared with CTR. The in vitro CP degradation of soybean meal was lower ( $P < 0.05$ ) after 4 and 24 h of incubation in ANI, and 4 h after incubation in CAP and CIE, compared with CTR.

## Discussion

There is very limited information available on the effects of these plant extracts on rumen microbial fermentation, and most of it relates to effects on rumen fermentation of dairy cattle.

### *Dry Matter and Water Intake*

The addition of CAP to heifer diets in the present trial increased DM and water intake. There are no previous reports on the effects of CAP on DM or water intake in growing heifers. However, there is evidence that capsaicin increases DM and water intake in rats (Zafra et al., 2003), and can stimulate appetite in humans (Calixto et al., 2000). Supplementation of diets with ANI also tended to increase DM intake in heifers. In contrast, Nombekela et al. (1994) tested the effects of anise as a flavouring additive in multiparous Holstein cows, but DM intake was not affected. The CIE had no effect on DM intake, but reduced water intake. Cardozo et al. (2005b) reported that the same mixture of cinnamaldehyde and eugenol, at a dosed 3 times lower, reduced DM and water intake in heifers fed a high concentrate diet. Busquet et al. (2003) also reported that feeding CIN reduced concentrate intake in dairy cattle, although the dose used (600 mg/kg DM basis, which was equivalent to 19.6 mg/L) was much higher than the one used in the present trial. Gurney et al. (1996) indicated that doses from 0.4 to 1.2 % (wt/wt) of cinnamamide (a compound similar to cinnamaldehyde) reduce DM intake house and wood mice. They noted that house mouse appeared to find the treated diet irritating to the mouth and paws. However, the reduction in DM intake should not



be interpreted as a negative effect, because many growth promoters in beef (i.e., ionophores) are efficacious in improve feed conversion index by reducing DM intake while maintaining average daily gain (ADG; Chalupa, 1980). The heifers used in this trial were at the end of the fattening period and measuring ADG was of limited value. Further research is necessary to determine their effects on DM intake, ADG and feed conversion.

### *Rumen Fermentation Profile*

There has been very limited research on the effect of plant extracts on rumen microbial fermentation. Cardozo et al. (2004) reported no effects of anise, cinnamon (containing 59 % of cinnamaldehyde), and pepper (containing 12% of capsaicin) extracts on total and individual VFA concentrations. Busquet et al. (2005a) also reported no effects of pure anethole (main component of anise), cinnamaldehyde and clove bud (containing 81% of eugenol) on total and individual VFA concentrations or N metabolism, except in cinnamaldehyde that tended to decrease the acetate proportion, and clove bud that increased propionate proportion and reduced acetate proportion. However, all these experiments were conducted in vitro under a dairy-type environment (high forage diets at pH > 6.2). However, Cardozo et al. (2005a) demonstrated that the effects of essential oils were pH dependent, and may have different effects when used in beef cattle diets. Under these conditions (a 10:90 forage to concentrate diet and an initial fermentation pH of 5.5), cinnamaldehyde, eugenol and capsicum (doses from 0.3 to 30 mg/L) increased total VFA concentration, anise and capsicum (doses from 3 to 30 mg/L) reduced acetate and increased propionate proportions, and cinnamaldehyde (doses from 3 to 30 mg/L) reduced the acetate to propionate ratio, suggesting that fermentation profile may be beneficial for beef-type fermentation environment. In the present trial, total VFA concentration was not affected by treatments, but the molar proportion of acetate decreased in ANI, CAP and CIE, the molar proportion of propionate increased in ANI and CIE, and the acetate to propionate ration decreased in ANI, compared with CTR. Although these changes were in the same direction as those observed in vitro with a 10:90 forage to concentrate ratio diet (Cardozo et al., 2005a), effects were smaller, and may be attributed to the relatively high ruminal pH of heifers in the current

experiment (average of 6.09) for the type of diet fed. It is likely that the management of heifers (fed individually with no animal-to-animal competition for feed) and the use of 0.5% bicarbonate in the diet may have prevented average pH from dropping below 5.8. In fact, Devant et al. (2000 and 2001) reported that when heifers were fed high concentrate diets individually (with no competition for feed), ruminal pH was much higher than expected (average above 6.0). Considering that heifers used in the present trial had a rumen volume of 34 L (rumen volume =  $BW^{0.57}$ ; Owens and Goetsch, 1988) and a dilution rate of 10%/h, the estimated daily volume through the rumen is around 82 L. Therefore, the estimated average rumen concentration was of 24.4 mg/L for ANI, 12.0 mg/L of CAP, and 7.3 mg/L of cinnamaldehyde and 3.7 mg/L of eugenol. These doses were within the range of the doses reported to have effects on rumen microbial fermentation (Busquet et al., 2005a; Cardozo et al., 2005a; Cardozo et al., 2005b).

The addition of ANI, CAP and CIE had small effects on the concentration of N fractions. In the conditions used in the present trial, CAP only reduced the average concentration of LPep N, and increased SPep+AA N concentrations without affecting ammonia N concentration. There is limited information on the effect of CAP on N fractions metabolism in the rumen. Cardozo et al. (2004) indicated that 0.22 mg/L of CAP had no effect on N fractions concentrations, and Busquet et al. (2005b) also reported that CAP (doses of 3 to 300 mg/L) had no effect on ammonia N concentration in a dairy type environment. However, Cardozo et al. (2005a) in a *in vitro* batch culture fermentation using rumen fluid from heifers fed a 10:90 forage to concentrate diet and at initial fermentation pH of 7.0 and 5.5, found that doses from 0.3 to 30 mg/L of CAP reduced the ammonia N concentration in both pH. The effect of CAP in the present trial suggests that 12.0 mg/L of CAP extract stimulated LPep N degradation resulting in an accumulation of SPep+AA N in the rumen, which may enhance microbial protein flow to the intestine (Hristov et al., 1999).

A previous report of Cardozo et al. (2005b) in heifers fed a high concentrate diet reported that a mixture of cinnamaldehyde and eugenol increased SPep+AA N concentration, and reduced ammonia N concentration and BCVFA concentration. As expected, the accumulation of SPep+AA N and the lower BCVFA and ammonia N concentration in CIE in the present trial suggests that CIE

inhibited deamination activity. Similar response was observed in vitro in a beef-type environment at low pH (Cardozo et al., 2005; doses from 0.3 to 30 mg/L of cinnamaldehyde and eugenol).

The addition of ANI decreased the average ammonia N concentration throughout the 12 h feeding interval. This result is in contrast with a previous report (Cardozo et al., 2004), which indicated that ANI extract stimulated peptidolysis and deamination, resulting in an accumulation of ammonia N concentration. This inconsistency may be attributed to the approach used (in vitro vs. in vivo), the doses used, or the level of forage in the diet. Our results suggest that ANI inhibited deamination of AA or that the low concentration of ammonia N could be due to the reduction of protozoa counts.

#### *Protozoa Population*

Until recently, there has been very limited information on the effect of natural plant extracts and secondary compounds on ruminal protozoa counts. Rumen ciliate protozoa play diverse roles in ruminal metabolism of nutrients, and in their absence the numbers of bacteria, and starch degradation increase, and ammonia N concentration decreased (Van Soest and Demeyer, 1988). However, Newbold et al. (2004) recently reported that a blend of essential oils had no effect on protozoa numbers. In contrast, in the present trial, ANI and CIE reduced protozoa count 3 h after feeding. Similar response was observed by Cardozo et al. (2005b) after supplying CIE at doses 3 times lower than the present trial to heifers fed high concentrate diets. Although the mechanism of action of CIE is not well understood, its lipophilic nature may contribute in crossing the cell membrane of protozoa to develop its antimicrobial activity (Helander et al., 1998; Francis et al., 2002). There are no other reports available on the effect of ANI on ruminal protozoa counts.

#### *In Vitro Dry Matter and Crude Protein degradation*

In general, the effects of ANI, CAP and CIE on in vitro DM and CP degradation of feeds tested were small. The effect of natural plant extract on CP degradation was dependent on the supplement incubated in the nylon bags. There

is limited information on the effect of ANI, CAP and CIE on in vitro DM and CP degradation of these six feeds.

**Table 5. Effect of Natural Plant Extracts on in vitro dry matter and crude protein degradation <sup>a</sup>**

		Treatments <sup>b</sup>				SEM <sup>c</sup>
		CTR	ANI	CAP	CIE	
DM degradation, %						
h 4	Alfalfa hay	39.4	41.3	39.0	39.5	2.98
	Ryegrass	33.3	33.1	32.6	32.6	1.86
	Barley	65.4	70.8	67.1	63.0	3.07
	Wheat	85.8	87.9	88.4	85.9	1.27
	Corn	54.0	45.9 <sup>z</sup>	47.1 <sup>z</sup>	49.0 <sup>y</sup>	1.94
	Soybean	50.6	49.0	47.7	47.5	2.02
DM degradation, %						
h 24	Alfalfa hay	68.5	69.0	68.4	69.2	1.78
	Ryegrass	61.9	62.9	64.1	67.1	2.17
	Barley	90.0	90.1	91.4	89.4	1.87
	Wheat	94.8	94.9	94.9	94.7	0.39
	Corn	95.0	86.1 <sup>z</sup>	94.9	93.8	2.07
	Soybean	91.7	84.3 <sup>z</sup>	91.5	91.7	1.94
CP degradation, %						
h 4	Alfalfa hay	46.3	46.5	45.4	43.1	3.52
	Ryegrass	46.3	45.3	46.0	43.7	2.45
	Barley	62.6	71.6 <sup>z</sup>	67.6	61.6	2.40
	Wheat	82.5	84.5	86.0	82.7	1.58
	Corn	42.7	43.1	41.2	42.0	1.23
	Soybean	44.8	38.7 <sup>z</sup>	39.6 <sup>z</sup>	38.7 <sup>z</sup>	1.57
Cp degradation, %						
h 24	Alfalfa hay	89.0	86.9	86.0	86.6	2.03
	Ryegrass	80.6	80.3	78.8	79.0	2.99
	Barley	96.1	96.0	96.8	95.5	2.23
	Wheat	98.4	97.9	97.9	97.9	0.28
	Corn	87.7	81.7	85.2	81.3	3.58
	Soybean	87.6	77.3 <sup>z</sup>	87.3	87.2	3.45

<sup>a</sup> Mean data across periods.

<sup>b</sup> CTR = Control, ANI= anise oil, CAP = Capsicum extract, CIE = mixture of cinnamaldehyde and eugenol.

<sup>c</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>y</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.10$ ).

<sup>z</sup> Within a row, means are different from Control ( $P < 0.05$ ).

Although the in situ technique does not provide complete information on effect of essential oils on rumen protein degradation, Newbold et al. (2004)

reported that a blend of essential oils tended to reduce CP degradation of soybean meal in sheep fed a 60 to 40 forage to concentrate ratio. Likewise, Molero et al. (2004) also reported a selective effect of a blend of essential oils on the rate, but not the extent, of CP degradation of soybean meal and sunflower meal. In a previous study, Cardozo et al. (2005b) observed that CIE at a dose 3 times lower than the present trial, reduced CP degradation of soybean meal and corn grain, and suggested that at least part of the effects of CIE on protein degradation can be attributed to a reduction in the proteolytic activity. However, the effect of CIE on in vitro CP degradation in the present trial only affected CP degradation of soybean meal.

### **Implication**

Anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol were no toxic to rumen microbes, but affected some rumen fermentation characteristics. Although the total volatile fatty acid concentration was not affected by treatments, anise extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol increased propionate and reduced acetate proportions, total protozoa count and ammonia N concentrations, and reduced in vitro crude protein degradation of soybean meal. The capsicum extract also reduced acetate proportions, large peptides N and increased small peptides plus amino acid N concentrations. Results indicate that anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol have the potential to modify rumen microbial fermentation such as propionate proportion, protein degradation and protozoa counts, which may be beneficial for beef production systems.

## **CAPÍTULO 6**

### **Discusión General**

En la actualidad, existen muchas especies vegetales con propiedades antimicrobianas utilizadas en farmacopea humana (Moerman, 1996) cuya aplicación a la modificación de la fermentación microbiana ruminal esta recibiendo un interés creciente. Sin embargo, se dispone de muy poca información sobre los efectos de los extractos de plantas en los procesos fermentativos ruminales.

Como la mayor parte de las discusiones sobre los efectos de los extractos de plantas en la fermentación ruminal ya se han realizado en los capítulos anteriores, el presente capítulo pretende describir de una manera informal el desarrollo cronológico del proyecto, la justificación de las decisiones tomadas a lo largo de su desarrollo, las ventajas y/o inconvenientes de trabajar con convenios “empresa-Universidad”, y las perspectivas de futuro de algunos de éstos compuestos.

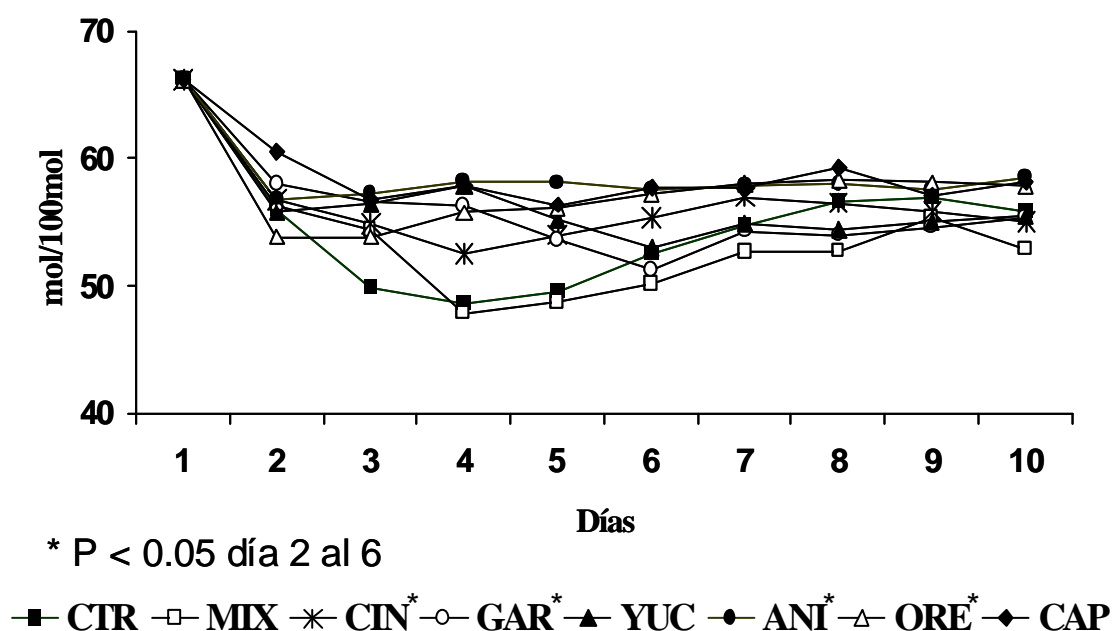
El proyecto se inició mediante un convenio entre la empresa Pancosma SA (Bellegarde-sur-Valserine Cedex, France) y la Universidad Autónoma de Barcelona (convenio UAB Nro.163359). El objetivo era evaluar los efectos de una serie de extractos de plantas sobre la fermentación ruminal. Para ello, se utilizaron tanto sistemas *in vitro* para incubaciones ruminales de corta duración (Tilley y Terry, 1963), incubaciones prolongadas (sistema de fermentación ruminal de doble flujo continuo, Hoover et al., 1976), y trabajos experimentales *in vivo*.

El sistema de fermentadores de doble flujo continuo instalados en la UAB consiste en ocho fermentadores diseñados para una fermentación continua, y permite controlar las condiciones de temperatura, pH, alimentación, infusión de saliva artificial, y flujo diferencial de las fracciones sólidas y líquidas del líquido ruminal. A diferencia de otras técnicas *in vitro* más sencillas, éste sistema permite obtener datos sobre el flujo de nutrientes, concentración de AGV, digestibilidades de los nutrientes, síntesis de proteína microbiana, etc., que en condiciones *in vivo*, por la gran variabilidad que representa el efecto animal, es difícil llegar a conclusiones claras. Además, éste sistema permite de una manera rápida y económica obtener información completa de cómo un producto puede afectar o modificar la fermentación microbiana ruminal.

El primer trabajo experimental de la tesis, que a su vez resultaba ser el primer trabajo de este tipo analizando los efectos sobre la fermentación

microbiana ruminal de muchos de los extractos, obligó a seleccionar una dosis 7,5 veces superior a la recomendada por la empresa (1 ppm en base a MS). Asimismo, por primera vez en estudios con cultivos continuos, se decidió tomar muestras del líquido del cultivo para determinar la evolución de los AGV y N amoniacal los días de adaptación, con el objetivo de estudiar los posibles procesos de adaptación de las poblaciones microbianas ruminales al sistema in vitro y a la presencia de los extractos de plantas. También se desarrolló un protocolo para determinar las fracciones nitrogenadas (N peptídico, N aminoacídico y N amoniacal) durante el intervalo de una comida a otra con el fin de identificar las áreas donde podrían actuar estos productos, ya sea alterando la proteólisis, la peptidólisis o la desaminación.

En el primer experimento descrito en el capítulo 2 se observó que, en el período de adaptación (días 1 al 8), ciertos extractos como CIN, GAR, ANI y ORE, incrementaron la proporción molar de acetato (Figura 1) y redujeron la proporción molar de propionato comparados con el control. Sin embargo, dichos efectos desaparecieron a partir del día 6.



**Figura 1.** Efectos de los extractos de plantas sobre la proporción molar de acetato durante el periodo de adaptación



En relación con las fracciones nitrogenadas se observó que MIX incrementó un 31%, y CIN y YUC aumentaron un 26% la concentración media de N peptídico, GAR y ANI aumentaron un 17 y 15%, respectivamente, la concentración de N aminoacídico, y ANI incrementó un 31% y GAR disminuyó un 26% la concentración de N amoniacal, comparados con el control (Figura 2).

	CTR	MIX	CIN	GAR	YUC	ANI	ORE	PEP
N- péptidos	6.5	8.5	8.2	8.0	8.2	7.8	6.6	6.3
N- amino acidos	7.2	6.7	6.3	8.4	6.4	8.3	7.3	7.6
N- amonio	5.5	5.2	5.2	4.1	5.1	7.2	6.4	5.2

**Figura 2.** Efectos de los extractos naturales de plantas sobre las fracciones nitrogenadas (Las flechas a rayas indican que los extractos tuvieron un efecto estimulador, las flechas sin relleno indican inhibición)

Los resultados obtenidos en éste experimento permitieron centrar la atención en los siguientes puntos:

1. Las dosis utilizadas no fueron tóxicas para las poblaciones microbianas.
2. Algunos extractos tuvieron efectos a corto plazo sobre las proporciones molares de AGV individuales, pero al cabo de unos días estos efectos desaparecieron. Estos resultados indican que, a las dosis usadas, las poblaciones microbianas ruminales adquirieron tolerancia a dichos productos, sugiriendo así que los estudios de fermentación ruminal a corto plazo deberían ser interpretados con precaución. En sistemas de

fermentación continua, un período de la adaptación de 6 días parecía ser suficiente para probar los efectos a largo plazo de este tipo de productos en la fermentación microbiana ruminal.

3. Respecto a las fracciones nitrogenadas (Figura 2), los efectos fueron variables dependiendo, sobre todo, de la naturaleza del extracto de planta. Por ejemplo, la acumulación del N-peptídico por efecto de YUC (conteniendo triterpenos como las sarsaponinas) sugirió que dicho extracto pudo estimular la proteólisis o inhibir la peptidólisis, o que la acumulación del N-AA y N-amoniaco por el efecto del ANI (conteniendo polifenoles como el anetol) sugirió que la peptidólisis y la desaminación fueron estimuladas. En el caso de la acumulación del N-AA y la reducción del N-amoniaco por efecto del ajo (conteniendo amino ácidos aromáticos como la alliína) sugirió que el ajo inhibió la desaminación de amino ácidos, o que la acumulación del N-peptídico y la reducción numérica del N-AA por efecto del CIN (conteniendo polifenoles como cinnamaldehído) sugirió que la peptidólisis fue inhibida.

Los resultados del primer experimento, que permitieron comprobar que algunos extractos de plantas podían modificar la fermentación ruminal y otros no, consolidaron un convenio más amplio entre la UAB y la empresa Pancosma, donde se definieron dos líneas de investigación:

- a) La primera: centrada en los efectos de los extractos de plantas naturales sobre la fermentación ruminal, utilizando inóculo ruminal, dieta y pH propios de vacuno lechero, y cuyos resultados se describen en la tesis doctoral de Marta Busquet (2005). En dicho proyecto, 18 compuestos, entre extractos naturales y metabolitos secundarios, fueron probados en diferentes estudios in vitro, y los resultados mostraron que el cinamaldehído y ajo fueron efectivos en modificar la fermentación ruminal incrementando el propionato y reduciendo el N amoniaco.
- b) La segunda: centrada en los efectos de los extractos de plantas sobre la fermentación ruminal, utilizando inóculo ruminal, dieta y pH

propios de terneros de cebo intensivo, y cuyos resultados se describen en la presente tesis doctoral.

El desarrollo de la segunda línea de investigación se estructuró en 2 etapas: la primera, un screening de los extractos de plantas naturales a diferentes dosis efectuados en un sistema in vitro de 24 horas de incubación (Tilley y Terry, 1963), y la segunda, dos trabajos con terneros de cebo intensivo llevados a cabo en la Unitat de Granges i Camps Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona.

En el experimento 2 descrito en el capítulo 3, se evaluaron los efectos de los extractos de plantas utilizados en el primer experimento (capítulo 2) más tres metabolitos secundarios purificados (anetol, cinamaldehído y eugenol) intentando responder a las siguientes preguntas: ¿Qué extractos de plantas y a qué dosis pueden afectar a la fermentación ruminal en condiciones de terneros de engorde (dieta alta en concentrado, líquido ruminal de terneros y características de fermentación mayoritariamente amilolítica)?, y ¿el pH ruminal afectaría la acción de estos extractos de plantas?

De los resultados del segundo experimento se pudo comprobar que muchos de los extractos naturales modificaron de diferente manera la actividad de las poblaciones microbianas ruminales, lo que hacía que la interpretación de los resultados resultara compleja, por lo que se decidió identificar aquellos extractos que tenían efectos similares a la monensina (estimulador de la producción de propionato, entre otros; Chalupa, 1988). Los resultados más sobresalientes fueron:

1. La reducción del pH de 7.0 a 5.5 disminuyó la concentración total de AGV y del N amoniacal, así como la proporción molar de acetato y la relación acetato:propionato, y aumentó la proporción de propionato. Dichos resultados eran esperados porque existe abundante información respecto a los efectos del pH ruminal sobre la fermentación ruminal (Mould et al., 1983/1984; Shriver et al., 1986; Lana et al., 1998; Cardozo et al., 2000 y 2002; Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia et al., 2002).
2. La interacción entre el pH y las dosis de extractos fue significativa en todas las medidas, excepto en ATL y CDH para el butirato, ATL y EUG

para la relación acetato propionato, y MIX para la concentración del N amoniacal. Esto indica que los efectos de la mayoría de los extractos estudiados en el presente trabajo sobre las características de fermentación microbiana ruminal variaron en función del pH ruminal.

3. A dosis altas (3000 mg/L) la fermentación ruminal se vio disminuida de manera negativa, confirmando el carácter antimicrobiano de los extractos estudiados.
4. Cuando el pH fue 7.0 algunos extractos (ANI, ORE, CIN, GAR y CDH) aumentaron la relación acetato:propionato, que en términos de energía es desfavorable, ya que por la vía piruvato-acetato se pierde un carbono en forma de metano o CO<sub>2</sub> que el animal no utiliza.
5. Cuando el pH fue 5.5, ORE y GAR (dosis 30 mg/L), CAP y CDH (dosis 3 a 30 mg/L) y YUC (dosis de 0.3 a 30 mg/L) disminuyeron la relación acético:propiónico, que refleja una mayor formación de propionato, que en términos de energía es más eficiente al no perder ningún carbón en comparación con la vía acética (Van Soest, 1982).

En la segunda etapa (capítulos 4 y 5), se estableció un convenio entre la UAB y la empresa Karizoo (Caldes, Barcelona) que permitió ejecutar los trabajos orientados a evaluar prototipos de interés comercial con impacto tecnológico para los sistemas productivos a través de un proyecto CDTI (04005) y PROFIT (FIT-060000-2004-2005). Para ello, la empresa Karizoo, en colaboración con Pancosma, puso a disposición un producto comercial en vacunos de leche (cinamaldehído y eugenol, **CIE**), fruto de las investigaciones de Busquet et al. (2005 ab), y otros productos a partir de extractos de plantas, para ser probados e incorporados en raciones de terneros como moduladores de la fermentación ruminal, cumpliendo así con los criterios del CDTI en innovación tecnológica para sistemas productivos.

El experimento 3 descrito en el capítulo 4, se probó el CIE junto con otro producto comercial (extracto de alfalfa, **AEX**) en terneros de 360 Kg de peso vivo. Aunque éste último producto no fue evaluado en el capítulo 3, la empresa Karizoo, dentro del marco de la aplicación tecnológica del CDTI, debía evaluar el

CIE con algún producto comercial de similares características disponible en el mercado. Los resultados más sobresalientes fueron:

1. El CIE y AEX redujeron la ingestión de materia seca, el consumo de agua, y la concentración de protozoos del género *Entodinium* spp, pero no afectaron a la concentración de AGV totales, las proporciones molares de propionato y de butirato, la concentración de péptidos largos, ni el pH ruminal.
2. El CIE tendió ( $P = 0.07$ ) a reducir la concentración de AVG de cadena ramificada y el N amoniacal, y tendió ( $P = 0.08$ ) a aumentar la concentración de péptidos cortos y AA.
3. El AEX aumentó la relación acetato:propionato y redujo el número de protozoos del género *Entodinium* spp.
4. En la prueba in vitro, a las 4 horas de fermentación, CIE y MIX redujeron la degradación de la proteína bruta de la soja y del maíz, y MIX redujo también la degradación de la proteína bruta de la alfalfa. Sin embargo a las 24 horas de fermentación, no se observaron cambios en la degradación de la proteína bruta por efecto de los tratamientos.

En el cuarto experimento in vivo descrito en el capítulo 5, se volvió a evaluar el efecto de CIE sobre las características de fermentación ruminal, pero incrementando 3 veces más la dosis utilizada, para determinar si la falta de efectos sobre la proporción molar de propionato en el anterior experimento se debía a la dosis o a otros factores. Asimismo, se seleccionaron el aceite esencial de anís (ANI) y el extracto de pimentón (CAP) para evaluar sus efectos en terneros. Se contaba con evidencias de que el aceite esencial de anís (ANI) estimulaba la actividad peptidolítica y la desaminación bajo condiciones de vacuno de leche (experimento 1), y que el CAP estimulaba la ingestión en otras especies de vertebrados (Zafra et al., 2003) y en humanos (Calixto et al., 2000). Además, en el segundo experimento en la presente tesis doctoral se observó que ANI y CAP a dosis entre 3 a 30 mg/L podían reducir las pérdidas de energía (estimulando la vía piruvato-propionato) y de nitrógeno (disminuyendo la concentración de N amoniacal) de la dieta en el rumen bajo condiciones de cebo

intensivo (niveles altos de concentrado y pH ruminal bajo). Los resultados más sobresalientes fueron:

1. El CAP incrementó la ingestión de materia seca, el consumo de agua, y la concentración de péptidos cortos y AA, y disminuyó la proporción molar de acetato y las concentraciones de AVG de cadena ramificada y de péptidos largos.
2. El CIE redujo el consumo de agua, la proporción molar de acetato y las concentraciones de AVG de cadena ramificada, la de L-lactato, de N amoniacal, y la concentración protozoos (*Entodinium* spp., *Isotrichus* spp.), e incrementó la proporción molar de propionato y la concentración de péptidos cortos y AA.
3. El ANI redujo la relación acetato:propionato, y las concentraciones de AVG de cadena ramificada, de N amoniacal y de protozoos (*Entodinium* spp., *Isotrichus* spp.).
4. En la prueba In vitro, a las 4 horas de fermentación el ANI, CAP, y CIE disminuyeron la degradación de la proteína bruta de la soja, y a las 24 h de incubación sólo el ANI disminuyó la degradación de la proteína bruta de la soja.

Dichos resultados sugieren que a las dosis utilizada el CIE (0.6 g/d de cinamaldehído y 0.3 g/d de eugenol), el ANI (2 g/d de aceite de anís conteniendo 10% de anetol) y el CAP (1 g/d de extracto de pimentón conteniendo 15% de capsaicina) pueden ser utilizados como modificadores de la fermentación ruminal en sistemas de cebo intensivo de terneros.

Los resultados de la presente tesis doctoral son esperanzadores para la continuidad de la investigación con los extractos de plantas, cuya aplicación como moduladores de la fermentación microbiana ruminal deben centrarse en algunos aspectos que surgieron durante el desarrollo de proyecto de tesis:

1. La necesidad de evaluar los efectos de los prototipos comerciales en los parámetros productivos de terneros de cebo intensivo en explotaciones comerciales.

2. La necesidad de desarrollar un sistema de encapsulamiento que permita mejorar la palatabilidad de algunos prototipos comerciales, o de proteger de los procesos físicos del tratamiento de los alimentos para alimentación animal (molienda, peletizado, etc.).
3. La necesidad de desarrollar técnicas que permitan asegurar la trazabilidad del prototipo comercial en los piensos de los animales.
4. La necesidad de evaluar la presencia de residuos en la carne a fin de garantizar el reconocimiento de productos GRAS (generally recognized as safe; FDA, 2004).

Es importante recalcar que las recomendaciones mencionadas anteriormente están actualmente marcando las directrices de otro proyecto de tesis doctoral, siguiendo la misma línea de investigación y dentro de los convenios entre la UAB y la empresa Karizoo (CDTI 04005 y FIT-060000-2004-2005) y con aplicación tanto en granjas experimentales como en explotaciones comerciales.

**CONCLUSIONES**



Los cuatro experimentos realizados sobre los efectos de extractos de plantas y compuestos secundarios sobre las características de fermentación microbiana ruminal permiten concluir que:

1. Algunos extractos de plantas y sus metabolitos secundarios pueden modular el perfil de fermentación ruminal y la degradación de la proteína.
2. Algunos extractos tuvieron efectos a corto plazo sobre la fermentación microbiana ruminal, pero estos efectos desaparecieron en un plazo máximo de 6 días, lo que sugiere la existencia de un proceso de adaptación. En consecuencia, los resultados de estudios de corta duración tienen que ser interpretados con precaución.
3. Los efectos de la mayoría de los extractos de plantas estudiados sobre las características de la fermentación microbiana ruminal variaron en función del pH ruminal.
4. El CIE (0.6 g/d de cinamaldehído y 0.3 g/d de eugenol), el ANI (2 g/d de aceite esencial de anís conteniendo 10% de anetol) y el CAP (1 g/d de extracto de pimentón conteniendo 15% de capsaicina) pueden ser utilizados como modificadores de la fermentación ruminal en sistemas de cebo intensivo de terneros.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Allison, M. J. 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 29:797-807.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. of Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Auclair, E. 2000. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. III Conference Show Feed Manufacturing in the Mediterranean region Improving Safety: From Feed to Food. 22-24 March, Reus, España. 54:45-53.
- Baldwin, R. L., and M. J. Allison. 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 57:461-477. Suppl.2.
- Beckett, S., I. Lean, R. Dyson, W. Tranter, and L. Wade. 1998. Effects of monensin on the reproduction, health, and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1563-1573.
- Beever, D. E., 1993. Rumen function in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. Forbes, J. M., and J. France (eds). CAB International. London UK.
- Bergen, W. G., and D. B. Bates. 1984. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiology Review* 2:567-589.
- Bondi, A. A. 1989. Nutrición Animal. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Brantner, A., Z. Males, S. Pepeljnjak, A. Antolic. 1996. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. *J. Ethnopharmacol.* 52:119-122.
- Brockman, R. P. 1993. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. Pages 249-265 in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. Forbes, J. M., and J. France. (eds). CAB International, London, UK.
- Broderick, G. A., and R. J. Wallace. 1988. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescamine-reactive peptides in the sheep rumen. *J. Anim. Sci.* 66:2233-2238.
- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. R. Ryskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. pp 541-592. *In: Physiology Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the Several International Symposium on Ruminant Physiology.* Tsuda, T., Y. Sasaki, and R. Kawashima. (Eds). Academic Press, NY.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2003. Efecto del extracto de ajo y/o cinnamaldehído sobre la producción, composición y residuos en vacas de alta producción. *ITEA Vol-Extra.* 24:756-758.

- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005a. Effects of different doses of plant extracts on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 83 (accepted).
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005b. Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* (accepted).
- Calixto, J. B., A. Beirith, J. Ferreira, A. R. S. Santos, V. C. Filho, and R. A. Yunes. 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants: a review. *Phytother. Res.* 14:401-418.
- Callaway, E. S. 1997. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035-2044.
- Callaway, T. R., and S. A. Martin. 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* 74:1982-1989.
- Callaway, T. R., S. A. Martin, J. L. Wampler, N. S. Hill, and G. M. Hill. 1997. Malate content of forage varieties commonly fed to cattle. *J. Dairy Sci.* 80:1651-1655.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, and M. Devant. 2002. Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Cardozo, P. W. S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2000. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation on a dual flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 83 (Suppl. 1):265
- Cardozo, P. W. S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2002. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation on a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl. 1):182
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230-3236.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts on rumen microbial fermentation in high-concentrate diet and two level of pH in vitro. *J. Anim. Sci.* (Submitted).
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005b. Effects of alfalfa extract and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on rumen fermentation profiles and protein degradation in heifers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* (Submitted).
- Carro, M. D., and M. J. Ranilla. 2002. Los antibióticos promotores de crecimiento como aditivos: efectos sobre la producción animal, situación legal y perspectivas de futuro. *Información Veterinaria (Revista del Consejo General de Colegios Veterinarios de España)* 238:35-45.

- Carro, M., S. López, C. Valdés, and F. Ovejero. 1999. Effect of DL- Malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:279-288.
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret., and R. Losa. 2003. Estudio del efecto de dosis crecientes de una mezcla de aceites esenciales sobre el metabolismo nitrogenado y el perfil de fermentación en un sistema de cultivo continuo. *ITEA*, vol. Extra. 24:726-728.
- Chalupa, W. 1976. Degradation of amino acids by mixed rumen microbial population. *J. Anim. Sci.* 43:828-834.
- Chalupa, W. 1988. Manipulation of rumen fermentation. pp 308-322. *In: Haresign, H., and D.J.A. Cole (Eds). Recent Developments in Ruminant Nutrition 2.* Butterworthd. UK.
- Chalupa, W., W. Corbett, and J. R. Brethour. 1980. Effects of monensin and amichloral on rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* 51:170-179.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Chen, G., C. J. Sniffen, and J. B. Russell. 1987. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J. Dairy Sci.* 70:983-992.
- Chesson, A., C. S. Stewart, and R. J. Wallace. 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:597-603.
- Cichewicz, R. H., and P. A. Thorpe. 1996. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum species*) and their uses in Mayan medicine. *J. Ethnopharmacol.* 52:1-70.
- Clarke, R. T. J., and T. Bauchop. 1977. *Microbial Ecology of the Gut.* Academic Press, San Francisco, USA.
- Coomer, J. C., H. E. Amos, M. A. Froetschel, K. K. Rogland, and C. C. Williams. 1993. Effect of supplemental protein source on rumina fermentation protein degradation and amino acid absorption in steers and on growth and feed efficiency in steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 71:3078-3086.
- Costa-Bartllori, P., S. Salado, P. Mendel, y J. J. Asensio. 1999. Productos Naturales de Origen Vegetal: Una Alternativa a los Aditivos antimicrobiales en Alimentación Animal. *Anaporc.* 190:51-58.
- Cotta, M. A., and R. B. Hespell. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:51-58.

- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.
- Curtin, CH. B., N. K. Mottet, G. Pontecorvo, and W. R. Sistrun. 1991. *Diccionario de Ciencias*. 996 pp. Mc Graw-Hill, Madrid, España.
- Czerkawski, J. W. 1976. Chemical composition of microbial matter in the rumen. *J. Sci. Food. Agric.* 27:621-632.
- Davidson, P. M., and A. S. Naidu. 2000. Phyto-phenols. Pages 265-293. *In: Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu, A. S. ed. CRC Press. Boca Raton. FL.
- De Blas, C., G. González, y A. Argamentaria. 1987. *Nutrición y alimentación del ganado*. Mundi prensa, Madrid, España.
- de Veth, M. J., and E. S. Kolver. 2000. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:066-2072.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification of rumen ciliate protozoa*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Devant, M., A. Ferret, J. Gasa, S. Calsamiglia, and R. Casals. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667-1676.
- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953.
- Dewhurst, R. J., J. M. Moorby, M. S. Dhanoa, R. T. Evans, and W. J. Fisher. 2000. Effects of altering energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 1. Intake, body condition and milk production. *J. Dairy Sci.* 83:1782-1794.
- Dinus, D. A., M. E. Simpson, and P. B. Marsh. 1976. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.* 42:229-234.
- Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, and A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:3056-3065.
- Erasmus, L. P., P. M Botha, C. W. Cruywagen, and H. H. Maissner. 1994. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 77:541-551.

- Erfle, J. D., F. D. Sauer, and S. Mahadevan. 1977. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 60:1064-172.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, and F. D. Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1464.
- Evans, J. D., and S. A. Martin. 2000. Effect of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. microbiol.* 41:336-340.
- Fahey, G. C., y L. L. Berger. 1993. Los Carbohidratos en la Nutrición de los rumiantes. pp 305-337. *In: El Rumiante. Fisiología Digestiva y Nutrición.* Church, D. C. (ed). Acribia, Zaragoza. España.
- Food and Drug Administration. 2004. Animal drugs, feed, and related product: substances generally recognized as safe. Title 21, vol 6, part 582.
- Feldberg R. S., C. S. Chang, A. N. Kotik, M. Nadler, Z. Neuwirth, D. C. Sundstrom, and N. H. Thompson. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 32:1763-1768.
- Fenwick, D. E., and D. Oakenfull. 1983. Saponin content of food plants and some prepared foods. *J. Sci. Food Agric.* 34:186-191.
- Ferris, H., and L. Zheng. 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies: effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *J. Nematology.* 31:214-263.
- Fluharty, F. L., and S. C. Loerch. 1989. Chemical treatment of ground corn to limit ruminal starch digestion. *Can. J. Anim. Sci.* 69:173-180.
- Font Quer, P. 1988. Plantas medicinales (11ª ed) Editorial Labor, S. A. Barcelona, España. 1035 pp.
- Forsberg, C. W., L. A. Lovelock, L. Krumholz, and J. G. Buchamon-Smith. 1984. Protease activity of rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:101-110.
- France, J., and R. C. Siddons. 1993. Volatile Fatty Acid Production. pp 107-122. *in: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism.* Forbes, J. M., and J. France (eds). CAB International. London, UK.
- Francis, G., Z. Kerem, P. Harinder, S. Makkar, and K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88:587-605.
- Friedman, M., N. Kozukue, and L. A. Harden. 2000. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 48:5702-5709.
- Fuller, R. 1989. A Review: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Goetsch, A. L., and F. N. Owens. 1985. Effects of sarsaponin on digestion and passage rates in cattle fed medium to low concentrate. *J. Dairy Sci.* 68:2377-2384.

- González, R. 2002. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol*, Mayo-ago. Vol.39, no.2, p.139-156. ISSN 0034-7507.
- Goodall, S. R., and J. K. Matsushima. 1980. The effects of sarsaponin on ruminant digestion and rate of passage. *J. Anim. Sci.* 51 (suppl. 1). 363.
- Goodall, S. R., P. Brady, D. Horton, and B. Beckner. 1982. Steam flaked versus high moisture corn rations with and without sarsaponin for finishing steers. *Proc. West. Sec. An. Sec. Anin. Sci.* 33:45-48.
- Goodrich, R. D., J. E. Garrett, D. R. Ghast, M. A. Kirich, D. A. Larson, and J. C. Meiske. 1984: Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.* 58:1484-1498.
- Griffin, S. G., S. G. Wyllie, J. L. Markham, and D. N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Frag. J.* 14:322-332.
- Griswold, K. E., W. H. Hoover, T. K. Miller, and W. V. Thayne. 1996. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 74:483-491.
- Grobner, M. A., D. E. Johnson, S. R. Goodall, and D. A. Benz. 1982. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. *J. Anim. Sci. (West. Sec. Proc.)* 33:64-66.
- Grovum, W. L., and H. W. Chapman. 1988. Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. 4. The effect of additives representing the primary tastes on sham intakes by esophageally-fistulated sheep. *Br. J. Nutr.* 59:63-72.
- Gurney, J. E., R. W. Watkins, E. L. Gill, and D. P. Cowan. 1996. Non-lethal mouse repellents: Evaluation of cinnamide as a repellent against commensal and field rodents. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 49:353-363.
- Gustafson, R., and R. Bowen. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 83:531-541.
- Hale, W. H. 1973. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. *J. Anim. Sci.* 37:1075-1080.
- Harborne, J. B., H. Baxter, and G. P. Moss. 1999. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of bioactive compounds from plants.* (2da Ed.). Taylor and Francis. pp 976. Padstow. UK.
- Harrison, D. G., D. E. Beever, D. J. Thomson, and D. F. Osbourn. 1976. Manipulation of fermentation in the rumen. *J. Sci. Food. Agric.* 27:617-620.
- Helander, I. M., H. L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, and A. von Wright. 1998. Characterization of the action of selected



- essential oil components on gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46:3590-3595.
- Hespell, R. B., and M. P. Bryant. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on  $Y_{ATP}$ . J. Anim. Sci. 49:1641-1659.
- Hino, T., and J. B. Russell. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. Appl. Environ. Microbiol. 50:1368-1374.
- Hino, T., K. Takeshi, M. Kanda, and S. Kumazawa. 1992. Effects of Aibellin, a novel peptide antibiotic, on rumen fermentation *in vitro*. J. Dairy Sci. 76:2213-2221.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factories involved in ruminal fiber digestion. J. Dairy Sci. 29:2755-1766.
- Hoover, W. H. and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. J. Dairy. Sci. 74:3630-3644.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. J. Anim. Sci. 43:528-534.
- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Varga, W. V. Thaine, and L. L. Junkin, Jr. 1984. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. pH and dilution rate. J. Anim. Sci. 58:692-699.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister, F. H. Van Herk, K. J. Cheng, C. J. Newbold, and P. R. Cheeke. 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. J. Anim. Sci. 77:2554-2563.
- Hungate, R. E., 1988. The Ruminant and the rumen. pp 1-19. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. (ed) Elsevier Applied Science. London, UK.
- Hussain, I., and P. R. Cheeke. 1995. Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. Anim. Feed Sci. Technol. 51:213-242.
- Hutjens, M. F. 1992. Selecting feed additives. Pages 309-317. *In: Large Dairy Herd Management*. H. H. Van Horn and C. J. Wilcox, ed. ADSA, Champaign, IL.
- INRA. 1988. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and feed Tables. INRA, París.
- Ivan, M., L. Neill, and T. Entz. 2000. Ruminal fermentation and duodenal flow following progressive inoculations of fauna-free wethers with major individual species of ciliate protozoa or total fauna. J. Anim. Sci. 78:750-759.
- Ivan, M., M. Hidioglou, and H. V. Petit. 1991. Duodenal flow of nitrogen following protozoal inoculation of fauna-free sheep fed a diet supplemented with casein or soybean meal. Can. J. Anim. Sci. 71:793-801.

- Jayashree, T., and C. Subramanyam. 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:179-83.
- Jenkinson, M. F., P. J. Buttery, and D. Lewis. 1979. Assimilation of ammonia by *Bacteoides amylophilus* in chemostat culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 113:305-313.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermenter contents. *Sci. Aliment.* 2:131-144.
- Jouany, J. P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr.* 126:1335s-1346s.
- Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, and H. Weisslowicz. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacter.* 76:626-631.
- Kamel, C. 2001. Tracing modes of action and roles of plant extracts in non-ruminants. Pages 151-165. *In: Recent Advances in Animal Nutrition.* P. C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham. Univ. Press. UK.
- Klita, P. T., G. W. Mathison, T. W. Fenton, and R. T. Hardin. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74:1144-1156.
- Koenig, K. M., C. J. Newbold, F. M. McIntosh, and L. M. Rode. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78:2431-2445.
- Kung Jr., L., J. T. Huber, J. D. Krummrey, L. Allison, and R. M. Cook. 1982. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile fatty acids, digestibility, and nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.* 65:1170-1174.
- Kung Jr., L., E. M. Kreck, R. S. Tung, A. O. Hession, A. C. Sheperd, M. A. Cohen, H. E. Swain, and J. A. Z. Leedle. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2045-2051.
- Kyo, E., N. Uda, A. Suzuki, M. Kakimoto, M. Ushijima, M. S. Kasuga, and Y. Itakura. 1998. Immunomodulation and antitumour activities of aged garlic extract. *Phytomedicine* 5:259-267.
- Lana, R. P., J. B. Russell, and M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76:2190-2196.
- Leng, R., and J. Nolan. 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 67:1072-1079.
- Linn, J. G. 1990. Feed Additives in Dairy Rations. Dairy Update. Minnesota Extension Service. Issue 101. 11 pp.

- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-1231.
- López, S., C. Valdés, J. C. Newbold, and R. J. Wallace. 1999. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro. *Br. J. Nutr.* 81:59-64.
- Losa, R. 2000. The Use of essential oils in animal nutrition. In III Conference Show Feed Manufacturing in the Mediterranean region. From feed to food. pp 22-24. March. Reus. España. 54:45-53.
- Maeng, W. J., and R. J. Baldwin. 1976. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: Effects of urea and amino acids over time. *J. Dairy Sci.* 59:643-647.
- Maggregor, R. C. 1988. Growth promoters and their importance in ruminants livestock production. pp 308-322. *In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 2.* Haresign, H., and D. J. A. Cole (eds). Butterworthd. UK.
- Makkar, H. P. S., S. Sen, M. Blümmel, and K. Becker. 1998. Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 46:4324-4328.
- Martin, S. A., and M. N. Streeter. 1995. Effect of malate on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73: 2141-2145.
- Martin, S. A., M. N. Streeter, D. J. Nisbet, G. M. Hill, and S. E. Williams. 1999. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77:1008-1015.
- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, and C. A. Morgan. 1995. *Animal Nutrition.* 5ª ed. Addison Wesley Longman Limited, London, UK.
- McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal metabolism and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5011-5014.
- Miller, W. J., J. L. Carmon, and H. L. Dalton. 1958. Influence of anise oils on the palatability of calf starters. *J. Dairy Sci.* 41:1262-1271.
- Milner, J. A. 1996. Garlic: Its anticarcinogenic and antitumorigenic properties. *Nutr. Rev.* 54:s82-s86.
- Moerman, D. E. 1996. An analysis of the food plants and drug plants of native North America. *J. Ethnopharmacol.* 56:1-22.
- Molero. R., M. Ibars, S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:91-104.

- Montaño, M. F., W. Chai, T. E. Zinn-Ware, and R. A. Zinn. 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J. Anim. Sci.* 77:780-784.
- Mould, F. L., and E. R. Ørskov. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- Mould, F. L., and E. R. Ørskov. 1984. Manipulation of ruminal fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- Muñoz, F., y M. A. Cases. 1992. Las plantas aromáticas en la alimentación. Dossier. Boletín informativo Nro 23. pp 23-37.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell. 1993. Harper's biochemistry. 23<sup>rd</sup> eds. USA.
- Naganawa, R., N. Iwata, K. Ishikawa, H. Fukuda, T. Fujino, and A. Suzuki. 1996. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4238-4242.
- Nagaraja, T. G., T. B. Avery, E. E. Bartley, S. K. Roof, and A. D. Dayton. 1982. Effect of lasalocid, monensin, or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 54:649-658.
- Nagaraja, T. G., G. Towne, and A. A. Beharka. 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2410-2414.
- National Research Council. 1989. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- National Research Council. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Newbold, C. J. 2003. Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumer. *In: International One-Day Seminar: Lelystad.*
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, P. Williams, R. Losa, and R. J. Wallace. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:105-112.
- Nisbet, D. J., and S. A. Martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69:4628-4633.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.

- Nocek, J. E. 1994. Manipulation of non structural and structural carbohydrates in rations for dairy cows. *Minn. Nutr. Conf.* 55:165-171.
- Nocek, J. E., and S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *J. Dairy. Sci.* 74:3598-3629.
- Nolan, J. V. 1975. Quantitative models of nitrogen metabolism in sheep. Pp 416-431. *In: Digestion and metabolism in the ruminants.* McDonald, I. W., and A C. Warner. (eds). University of New England Publishing Unit. Armidale. Australia.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen Kinetic. pp 123 –144. *In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* Forbes, J. M., and J. F. France. (eds). CAB International. London, UK.
- Nombekela, S. W., M. R. Murphy, H. W. Gonyou, and J. I. Marden. 1994. Dietary preferences in early lactation cows as affected by primary tastes and some common feed flavors. *J. Dairy Sci.* 77:2393-2399.
- Official Journal of the European Union. 1970. Regulation (EC) No 70/524 of the European Parliament and the Council of 23 November 1970 on Additives for Use in Animal Nutrition. Page L270 in OJEU of 14/12/1970.
- Official Journal of European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Page L268/36 in OJEU of 10/18/2003.
- Oh, H. K., M. B. Jones, and W. M. Longhurst. 1968. Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relative unpalatable plant species. *Appl. Microbiol.* 16:39-44.
- Ørskov, E. R. 1988. Nutrición proteica de los ruminates. Acribia, Zaragoza. 178 pags.
- Oser, B. 1966. An evaluation of *Yucca mohavensis* as a source of food grade saponin. *Food. Cosmet. Toxicol.* 4:57-61.
- Owens, F. N., and A. L. Goetsch. 1988. Ruminal fermentation. Pages 145-171. *In: Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition.* Church, D. C. ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs. NJ.
- Owens, F. N., and R. Zinn. 1988. Metabolismo de la proteína en los rumiantes. Pp 255-282. en: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* Ed: Church, D. C. Acribia, Zaragoza, España.
- Paster, N., B. J. Juven, E. Shaaya, M. Menasherov, R. Nitzan, H. Weisslowicz, and U. Ravid. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:33-37.
- Payne, J. W. 1983. Peptide transport in bacteria: methods, mutants and energy coupling. *Biochemical Society Transactions.* 11:794-798.

- Perchellet, J. P., E. M. Perchellet, and S. Belman. 1990. Inhibition of DMBA-induced mouse skin tumorigenesis by garlic and onion oils. *Nutr. Cancer* 14:183-193.
- Phipps, R. H., J. I. D. Wilkinson, L. J. Jonker, M. Tarrant, A. K. Jones, and A. Hodge. 2000. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2789-2794.
- Pine, S. H., J. B. Hendrickson, D. J. Cram, and G. S. Hammond. 1990. *Química Orgánica*. (4ta Ed.) Mc Graw-Hill. Mexico DF.
- Piñol, M. T., J. Palazón, D. J. Cram, and G. S. Hammond. 1990. *Química Orgánica*. 4ta ed. Mc Graw-Hill. México DF.
- Prins, R. A., D. L. van Rheenen, and A. T. van Klooster. 1983. Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *A. van Leeuwenhoeck* 49:585-595.
- Rooke, J. A., and D. G. Armstrong. 1989. The importance of the form of nitrogen on microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage and continuous intrarumen infusion of sucrose. *Br. J. Nutr.* 61:113-121.
- Ruiz, R., G. L. Albrecht, L. O. Tedeschi, G. Jarvis, J. B. Russell, and D. G. Fox. 2001. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. *J. Dairy Sci.* 84:1717-1727.
- Russell, J. B., and D. B. Dombroski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604-610.
- Russell, J. B., and R. B. Hespell. 1981. Microbial rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 64:1153-1169.
- Russell, J. B. 1983. Fermentation of peptides by *Bacterioides ruminicola* B<sub>14</sub>. *J. Dairy Sci.* 76:826-830.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763-775.
- Russell, J. B. 1984. Limits to the manipulation of rumen fermentation. pp 87-93. *In: Cornell Nutr. Conf.* pp 87-93.
- Russell, J. B., and R. J. Wallace. 1988. Energy-yielding and energy-consuming reactions. pp 185-215. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P. N. (ed) Elsevier Applied Science. London, UK.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1988. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: A comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *J. Anim. Sci.* 66:552-558.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:872-877.

- Russell, J. B. 1991. Intracellular pH of acid tolerant ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3383-3384.
- Russell, J. B., R. Onodera, and T. Hino. 1991. Ruminal protein fermentation: new perspectives on previous contradictions. pp 681-697. *In: Physiology Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the Several International Symposium on Ruminant Physiology.* Tsuda, T., Y. Sasaki, and R. Kawashima. R. (eds). Academic Press, Inc. NY.
- Russell, J. B., D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 75:3551-3561.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH?. *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.
- Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- Ryan, J. P., T. Quinn, and B. L. Leek. 1997. Comparison of effects of *Yucca schidigera* plant extract (De-Odorize) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture (Yea-Sacc 1026) on pH, short chain fatty acids (SCFA) and ammonium, during fermentation of hay by sheep's ruminal fluid in vitro. *J. Dairy Sci.* 81:3222-3230.
- Salama A. A. K., G. Caja, D. Garín, E. Albanell, X. Such, and R. Casals. 2002. Effects of adding a mixture of malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on milk production of Murciano-Granadina dairy goats. *Anim. Res.* 51:295-303.
- Salisbury, F. B., and C. W. Ross. 1992. *Fisiología vegetal.* Ed. Iberoamericana S.A. México.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des ratios. *INRA Prod. Anim.* 12:49-60.
- Schaffer, E. M., J. Z. Liu, and J. A. Milner. 1997. Garlic powder and allyl sulphur compounds enhance the ability of dietary selenite to inhibition 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced mammary DNA adducts. *Nutr. Cancer* 27:162-168.
- Schelling, G. T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58:1518-1527.
- Schmid, G. 1982. *Química biológica, Las bases químicas de la vida.* pp 525-529. Interamericana, Grafur S. A., Madrid, España.
- Scott, A. M. 1998. Ruminal fermentation with organic acids examined. *Feedsutffs.* 10:12-17.

- Shapiro, S., A. Meier, and B. Guggenheim. 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 9:202-208.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, and W. V. Thaine. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, and M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44:1202-1205.
- Skandamis, P. N., and G. E. Nychas. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1646-1653.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910-929.
- Slyter, L. L. 1979. Monensin and dichloroacetamide influences on methane and volatile fatty acid production by rumen bacteria in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:283-288.
- Sniffen, C. J., J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1983. The influence of carbon source, nitrogen source and growth factors on rumen microbial growth factor in rumen microbial growth. *Proc Cornell Nutr. Conf. Ithaca, NY.* Pp 26-33.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. J. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 72:3562-3577.
- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J. Anim. Sci.* 49:1590-1603.
- Stewart, C. S. 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:497-502.
- Stewart, C. S., and M. P. Bryant. 1988. The rumen bacteria. *In: The Rumen Microbial Ecosystem.* Hobson, P. N. (ed) Elsevier Science Publishers LTD, Essex, UK.
- Strasburguer, E., F. Noll, H. Schenck, and A. F. W. Schimper. 1985. *Tratado de Botánica* (7ma Ed.). Ed. Omega, SA. Barcelona, España.
- Strobel, H. J., and J. B. Russell. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69:2941-2947.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* 49:1615-1630.



- Theurer, C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 63:1649-1662.
- Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grass. Soc.* 18:104-111.
- Tsuda, T., Y. Sasaki, and R. Kawashima. 1991. *Physiology Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the Several International Symposium on Ruminant Physiology.* Academic Press, Inc. USA.
- Tukey, J. W. 1953. The problem of multiple comparison. Unpublished notes, Princeton University, Princeton, NJ.
- Ultee, A., M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561-1568.
- Valdez, F. R., L. J. Bus, A. L. Goetsch, and F. N. Owens. 1986. Effects of steroidal saponins on ruminal fermentation and on production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:1568-1575.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1988. Manipulation of rumen fermentation. pp 387-444. *In: The Rumen Microbial Ecosystem.* Hobson, P. N. ed. Elsevier Applied Science. London, UK.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the ruminant.* (2 Ed). pp. 253-280. Comstock Publishing Associates a Division of Cornell University Press. London. UK.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Veira, D. M., M. Ivan, and P. Y. Jui. 1983. Rumen ciliate protozoa: Effects on digestion in the stomach of sheep. *J. Dairy Sci.* 66:1015-1022.
- Vollhardt, K. P. 1990. *Química Orgánica.* Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.
- Wallace, R. J. 1985. Absorption of soluble proteins to rumen bacteria and the rate of absorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.* 53:399-408.
- Wallace, R. J. 1986. Catalism of amino acid by *Megasphaera elsdenii* LC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1141-1143.
- Wallace, R. J., and M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. pp 217-249. *In: The rumen microbial ecosystem.* Hobson, P.N. (ed). Elsevier Applied Science, London. UK.
- Wallace, R. J., N. McKain, and C. J. Newbold. 1990. Metabolism of small peptides in the rumen fluid. Accumulation of intermediates during hydrolysis of alanine oligomers and comparison of peptidolytic activities of bacterias and protozoa. *J. Sci. Food Agric.* 50:191-199.

- Wallace, R. J., L. Arthaud, and C. J. Newbold. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1762-1767.
- Wallace, R. J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. *J. Nutr.* 1326s-1335s.
- Wallace, R. J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural product as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 10:1458-1468.
- Wang, Y., T. A. McAllister, C. J. Newbold, L. M. Rode, P. R. Cheeke, and K. J. Cheng. 1998. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:143-153.
- Webb, K. E., J. C. Matthews, and D. B. DiRienzo. 1992. Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives. *J. Anim. Sci.* 70:3248-3257.
- Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *J. Dairy Sci.* 79:1496-1502.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76:3114-3122.
- Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from rumen of sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.
- Wild, R., 1994. The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press. Inc., Emmaus, Pa. *In: Cowan, M. M.* 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiologic Reviews.* October. pp 564-582.
- Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1988. The rumen Protozoa. pp 77-128. *In: The Rumen Microbial Ecosystem.* Hobson, P. N. (ed) Elsevier Science Publishers LTD, Essex. UK.
- Wilson, R. C., T. R. Overton, and J. H. Clark. 1997. Effects of *Yucca schidigera* extract and soluble protein on performance of cow and concentrations of urea nitrogen in plasma and milk. *J. Dairy Sci.* 81:1022-1027.
- Winter, K. A., R. R. Johnson, and B. A. Dehority. 1964. Metabolism of urea nitrogen by mixed cultures of rumen bacteria grown on cellulose. *J. Anim. Sci.* 97:793-797.
- Wolin, M. J., and T. L. Miller. 1988. Microbe-microbe interactions. Pages 343-359. *In: The Rumen Microbial Ecosystem.* Hobson, P. N. ed. Elsevier Applied Science LTD, Essex. UK.

- Wu, Z., M. Sadik, F. T. Sleiman, J. M. Simas, M. Pessarakli, and J. T. Huber. 1994. Influence of Yucca extract on ruminal metabolism in Cows. *J. Anim. Sci.* 72:1038-1042.
- Yang, C. M. J., and J. B. Russell. 1993. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3250-3254.
- Yokoyama, M. T., and K. A. Johnson. 1988. Microbiology of the Rumen and Intestine. pp 125-144. *In: The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition.* Church, D.C. (ed) Waveland Press, INC. Illinois, USA.
- Zafra, M. A., F. Molina, and A. Puerto. 2003. Effects of perivagal administration of capsaicin on post-surgical food intake. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 107:37-44.