

Effect of cinnamaldehyde on *in vitro* ruminal degradability and volatile fatty acids production

Efecto del cinamaldehído en la degradabilidad ruminal *in vitro* y la producción de ácidos grasos volátiles

P. Catalá-Gregori¹, V. García, F. Hernández, J. Madrid, M. D. Megías and J. Orengo

Department of Animal Production, University of Murcia, Murcia 30071, Spain

¹*Email: direccion@cecaav.es*

The aim of this research was to study the effect of cinnamaldehyde on nutrients ruminal degradation and total production and molar proportion of volatile fatty acids in a ruminal *in vitro* system (DaisyII Ankom Technology, USA). The diet was composed of a mixture of barley seed: alfalfa hay (70:30) which was incubated with 4 treatments: without additive or negative control (NC), with monensin at 7.5 ppm or positive control (CP) and with cinnamaldehyde at 250 (C250) and 500 ppm (C500). The inhibitory effect of cinnamaldehyde on disappearance of DM, NDF and ADF (from 48 to 72 h incubation time, $P < 0.01$) was similar to CP treatment. All supplemented treatments tended to decrease the potential degradability of DM, CP, NDF, ADF, as the effective degradability of DM, NDF and ADF. However, contrary to monensin, cinnamaldehyde increased total VFA production and did not affect molar proportion of VFA. The two doses of cinnamaldehyde evaluated showed the same effect. Results indicate that cinnamaldehyde modified *in vitro* ruminal fermentation.

Keywords: *goat; cinnamon; monensin; ruminal fermentation; artificial incubator.*

Ruminant animals are unable to produce fiber-degrading enzymes. They have developed a symbiotic relationship with ruminal microorganisms (bacteria, fungi and protozoa) that provide them protein, vitamins and volatile fatty acids in exchange of a suitable habitat for growth. Contrary to wild ruminants, domestic ruminants are often fed an abundance of grain and little fiber. When ruminants are fed fiber-deficient rations, physiological mechanisms of homeostasis are disrupted, ruminal pH declines, microbial ecology is altered, and the animal becomes more susceptible to metabolic disorders and, in some cases, infectious diseases. Some disorders can be counteracted by feed additives as ionophores (Russell and Rychlik 2001).

One of the additives commonly used in domestic ruminants is monensin, because of its positive effect on improvement of energy and nitrogen metabolism, and its preventing effect against digestive disorders resulting from abnormal rumen fermentation (Castillo *et al.* 2004). However, the use of antibiotics as growth promoters in livestock has been limited in the European Union because of their probable implication in the development of microbial antibiotic resistance. In order to face this prohibition, alternatives must be proposed to keep animal health, productivity and microbial food

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del cinamaldehído en la degradabilidad ruminal de los nutrientes y la producción total y la proporción molar de ácidos grasos volátiles en un sistema ruminal *in vitro* (DaisyII Ankom Technology, USA). La dieta estaba compuesta por una mezcla de semilla de cebada: heno de alfalfa (70:30) que se incubó con 4 tratamientos: sin control aditivo o negativo (CN), con monensina a 7.5 ppm o control positivo (CP) y con cinamaldehído a 250 (C250) y 500 ppm (C500). El efecto inhibitorio de cinnamaldehyde en la desaparición de MS, FDN y FDA (de 48 a 72 h de tiempo de incubación, $P < 0.01$) fue similar al tratamiento con CP. Todos los tratamientos suplementados tendieron a disminuir la degradabilidad potencial de MS, PB, FDN, FDA, como la degradabilidad efectiva de la MS, FDN y FDA. Sin embargo, a diferencia de la monensina, el cinamaldehído aumentó la producción total de AGV y no afectó la proporción molar de AGV. Las dos dosis evaluadas de cinamaldehído mostraron el mismo efecto. Los resultados indicaron que cinnamaldehyde modificó la fermentación ruminal *in vitro*.

Palabras clave: *cabra, canela, monensina, fermentación ruminal, incubadora artificial*

Los animales rumiantes son incapaces de producir enzimas degradadoras de la fibra. Han desarrollado una relación simbiótica con microorganismos ruminales (bacterias, hongos y protozoos) que les proporcionan proteínas, vitaminas y ácidos grasos volátiles a cambio de un hábitat adecuado para el crecimiento. Al contrario de los rumiantes salvajes, los rumiantes domésticos a menudo se alimentan de gran cantidad de grano y poca fibra. Cuando los rumiantes se alimentan con raciones deficientes en fibra, se interrumpen los mecanismos fisiológicos de la homeostasis, disminuye el pH ruminal, se altera la ecología microbiana y el animal se vuelve más susceptible a los trastornos metabólicos y, en algunos casos, a las enfermedades infecciosas. Algunos trastornos pueden ser contrarrestados por los aditivos alimenticios como ionóforos (Russell y Rychlik, 2001).

Uno de los aditivos comúnmente utilizados en los rumiantes domésticos es la monensina, debido a su efecto positivo en la mejora del metabolismo de la energía y el nitrógeno, y su efecto preventivo contra los trastornos digestivos derivados de la fermentación anormal del rumen (Castillo *et al.* 2004). Sin embargo, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en el ganado ha sido limitado en la Unión Europea debido a su probable implicación en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos microbianos. Para enfrentar

safety.

Plants produce several secondary compounds with antimicrobial activity (Cowan 1999). Cinnamaldehyde is the main compound of cinnamon's essential oil and its *in vitro* antimicrobial effect has been widely demonstrated (Hili *et al.* 1997, Helander *et al.* 1998 and Valero and Salmerón 2003). It has been reported that cinnamaldehyde could be considered as potential alternative to monensin to modify rumen fermentation in beef cattle (Khorrami *et al.* 2015). Cinnamaldehyde had a limited potential to improve feed efficiency and growth in lambs fed concentrate-based diets (Chaves *et al.* 2011). A diet-effect was reported in sheep when using cinnamaldehyde to modify rumen fermentation (Mateos *et al.* 2013). No data of cinnamaldehyde used as additive are available for Murciano-Granadina goats. Additionally, essential oils have been shown to be promising feed additives in mitigating methane and ammonia emissions (Cobellis *et al.* 2016). However, the mode of action and activities of essential oils on rumen microbiome remain poorly understood (Cobellis *et al.* 2016).

The effect of cinnamaldehyde on goat rumen *in vitro* fermentation was evaluated. To achieve this, degradability of dry matter, protein and fiber were measured in an artificial incubator. Volatile fatty acids (acetic, propionic and butyric acids) and cinnamaldehyde concentrations in ruminal fluid were also determined.

Materials and Methods

Materials and chemicals. The substrate used for incubation was a mixture (dry matter basis) of 700 g barley grain (*Hordeum vulgare*) and 300 g alfalfa hay (*Medicago sativa*) Barley grain and alfalfa hay were milled through 1 mm screen (Hammer mill, Culatti, Italy). Cinnamaldehyde, monensin (95 %) and propionic acid were supplied by Fluka Chemika (Switzerland). Acetic acid was purchased from Riedel-de Haen (Germany) and butyric and 4-methylvaleric acid from Sigma Aldrich (USA).

Rumen fluid. Ruminal fluid was collected from two fistulated Murciano-Granadina goats fed alfalfa hay *ad libitum*. Rumen fluids were pooled and transported to the laboratory in a sealed thermos. Then, it was immediately strained through four layers of cheesecloth and maintained with CO₂ flow to keep anaerobic conditions.

***In vitro* incubations and treatments.** *In vitro* incubations were performed with the DaisyII (Ankom Technology, USA) incubator (Mandebvu *et al.* 2001). Incubator is composed of four digestion jars (2 L capacity) maintained at 39.5 °C in constant rotation and under a CO₂ saturated atmosphere. Each digestion jar was filled with prewarmed (39.5 °C) buffer solution (containing 1317 mL solution A: KH₂PO₄, 10 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g/L; NaCl, 0.5 g/L; CaCl₂·2H₂O,

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 53, Number 4, 2019.

esta prohibición, se deben proponer alternativas para mantener la salud animal, la productividad y la seguridad microbiana de los alimentos.

Las plantas producen varios compuestos secundarios con actividad antimicrobiana (Cowan 1999). El cinamaldehído es el principal compuesto del aceite esencial de canela y su efecto antimicrobiano *in vitro* ha sido ampliamente demostrado (Hili *et al.* 1997, Helander *et al.* 1998 y Valero y Salmerón 2003). Se ha reportado que el cinamaldehído podría considerarse una alternativa potencial a la monensina para modificar la fermentación del rumen en el ganado de carne (Khorrami *et al.* 2015). El cinamaldehído tenía un potencial limitado para mejorar la eficiencia alimentaria y el crecimiento en corderos alimentados con dietas basadas en concentrados (Chaves *et al.* 2011). Se informó un efecto de la dieta en ovejas cuando se usó cinamaldehído para modificar la fermentación del rumen (Mateos *et al.* 2013). No se dispone de datos del cinamaldehído utilizado como aditivo para las cabras Murciano-Granadina. Además, se ha demostrado que los aceites esenciales son aditivos alimentarios prometedores para mitigar las emisiones de metano y amoníaco (Cobellis *et al.* 2016). Sin embargo, el modo de acción y los aditivos de los aceites esenciales en el microbioma del rumen siguen siendo poco conocidos (Cobellis *et al.* 2016).

Se evaluó el efecto del cinamaldehído en la fermentación *in vitro* del rumen de cabra. Para lograr esto, se midió la degradabilidad de la materia seca, las proteínas y la fibra en una incubadora artificial. También se determinaron las concentraciones de ácidos grasos volátiles (ácidos acético, propiónico y butírico) y cinamaldehído en el fluido ruminal.

Materiales y Métodos

Materiales y productos químicos. El sustrato utilizado para la incubación fue la mezcla de (base de materia seca) 700 g de grano de cebada (*Hordeum vulgare*) y 300 g de heno de alfalfa (*Medicago sativa*). El grano de cebada y el heno de alfalfa se molieron a través de un tamiz de 1 mm (Molino de martillo, Culatti, Italia). El cinamaldehído, la monensina (95 %) y el ácido propiónico se suministraron por Fluka Chemika (Switzerland). El ácido acético se adquirió en Riedel-de Haen (Alemania) y el ácido butírico y 4-metilvalérico en Sigma Aldrich (USA).

Líquido ruminal. El líquido ruminal se extrajo de dos cabras Murciano-Granadina fistuladas, alimentadas con heno de alfalfa *ad libitum*. Los fluidos del rumen se agruparon y se transportaron al laboratorio en un termo sellado. Luego, se filtró inmediatamente a través de cuatro capas de estopilla y se purgó con CO₂ para mantener las condiciones anaeróbicas.

Incubaciones y tratamientos *in vitro*. Las incubaciones *in vitro* se realizaron en la incubadora DaisyII (Ankom Technology, USA.) (Mandebvu *et al.* 2001). La incubadora está compuesta por cuatro frascos de digestión (2 L de capacidad) mantenidos a 39.5 °C en rotación constante y bajo atmósfera saturada de CO₂. Cada frasco de digestión

0.1 g/L and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0.5 g/L and 267 mL solution B: Na_2CO_3 , 15 g/L and $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L, fitted pH to 6.8); 400 mL of rumen fluid and 16 mL of additive solution.

Four treatments were tested, one per each *in vitro* jar: Negative control (NC), positive control (CP) with monensin 7.5 ppm and cinnamaldehyde at 250 ppm (C250) and 500 ppm (C500). Additives (monensin and cinnamaldehyde) were initially dissolved in 16 mL of ethanol. So as to preclude all confusion due to main effects of ethanol, this product was also added (16 mL) to negative control treatment (NC). The selected concentrations of monensin and cinnamaldehyde were based on published data, that they had showed *in vitro* antimicrobial properties, for monensin Dennis *et al.* (1981), Domescik and Martin (1999) and Wang *et al.* (2004) and for cinnamaldehyde Hili *et al.* (1997); Chang *et al.* (2001) and Valero and Salmerón (2003).

Twenty-eight sample were weighed (0.5 g) per jar into ANKOM F57 filter bags (ANKOM Technology, USA). The bags (size 5.5 cm x 5 cm) had a pore size of 25 μm and were heat sealed. Four bags per treatment were removed at 0, 4, 8, 12, 24, 48 and 72h incubations times. The bags were immediately washed under running tap water until the water was clear, oven-dried at 60 °C for 48 h and weighed. The content of bags was frozen until posterior analysis.

Chemical analyses. Dry matter was determined by drying the samples at 60 °C during 48h; crude protein (CP) by Kjeldahl method (AOAC, 1990); neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) by Van Soest and Roberston (1991).

Samples preparations for GC analysis. At 48 h of incubation two samples of 50 mL of rumen fluid from each jar were collected. The samples were centrifuged at 5,000 g for 20 min and the supernatant was acidified with 1 mL of 50 % sulphuric acid. The supernatant was stored at -20 °C. For GC analysis 5 mL of acidified ruminal samples, 5 mL of deionized water and 0.5 mL of an internal standard solution (4 methyl-n-valeric acid 30 mM) were mixed and centrifuged (7 min at 7,500 g).

GC analysis conditions. The determination of the volatile fatty acids and cinnamaldehyde in rumen fluid was performed by using a Thermo Finnigan Trace gas chromatograph (Thermo, Italy), equipped with a flame ionization detector and 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm TR-FFAP fused silica capillary column (Teknokroma, Spain). The oven temperature was held at 90 °C for 1 min and increased from 90 to 125 °C at the rate of 2.6 °C/min and from 125 to 180 °C at 10 °C/min. The temperatures of the injector and detector were 220 and 260 °C, respectively. The flow rate of carrier gas was 2.0 mL/min and injection volume was 1 μL . FID air flow was 350 mL/min, while the H_2 flow was 35 mL/min (Madrid *et al.* 1999). Data processing was performed by with Chrom-

se llenó con solución tampón precalentada (39.5 °C) (que contenía 1317 mL de solución A: KH_2PO_4 , 10 g/L; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; NaCl, 0.5 g/L, CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L y $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0.5 g/L y 267 mL de solución B: Na_2CO_3 , 15 g/L y $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L, pH ajustado a 6.8); 400 mL de líquido ruminal y 16 mL de solución aditiva.

Se probaron cuatro tratamientos, uno por cada frasco *in vitro*: control negativo (CN), control positivo (CP) con monensina 7,5 ppm y cinnamaldehído a 250 ppm (C250) y 500 ppm (C500). Los aditivos (monensina y cinamaldehído) se disolvieron inicialmente en 16 mL de etanol. Con el fin de evitar toda confusión debido a los efectos principales del etanol, este producto también se añadió (16 mL) al tratamiento de control negativo (CN). Las concentraciones seleccionadas de monensina y cinamaldehído se basaron en datos publicados, que habían mostrado propiedades antimicrobianas *in vitro*, para la monensina Dennis *et al.* (1981), Domescik y Martin (1999); Wang *et al.* (2004) y para cinnamaldehyde Hili *et al.* (1997) y Chang *et al.* (2001) y Valero y Salmerón (2003).

Se pesaron veintiocho muestras (0,5 g) por frascos en bolsas de filtro ANKOM F57 (ANKOM Technology, USA). Las bolsas (tamaño 5,5 cm x 5 cm) tenían un tamaño de poro de 25 μm y se sellaron térmicamente. Se retiraron cuatro bolsas por tratamiento a 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación. Las bolsas se lavaron inmediatamente con agua corriente hasta que el agua estuvo clara, se secaron en estufa a 60 °C durante 48 h y se pesaron. El contenido de las bolsas se congeló hasta su posterior análisis.

Análisis químico. La materia seca se determinó secando las muestras a 60 °C durante 48 h; la proteína cruda (PC) por el método Kjeldahl (AOAC, 1990); la fibra detergente neutra (FDN) y la fibra detergente ácida (FDA) por el método Van Soest y Roberston (1991).

Preparación de muestras para análisis de CG. A las 48 h de la incubación, se recogieron dos muestras de 50 mL de líquido ruminal de cada frasco. Las muestras se centrifugaron a 5,000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se acidificó con 1 mL de ácido sulfúrico al 50 %. El sobrenadante se almacenó a -20°C. Para el análisis de CG, se mezclaron 5 mL de muestras ruminales acidificadas, 5 mL de agua desionizada y 0,5 mL de una solución estándar interna (4 ácido metil-n-valérico 30 mM) y se centrifugaron (7 minutos a 7,500 g).

Condiciones de análisis de la CG. La determinación de los ácidos grasos volátiles y el cinamaldehído en el líquido ruminal se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace (Thermo, Italia), equipado con un detector de ionización de llama y columna capilar de sílice fundida TR-FFAP de 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm (Teknokroma, España). La temperatura de la estufa se mantuvo a 90 °C durante 1 minuto y aumentó de 90 a 125 °C a una velocidad de 2.6 °C/ min y de 125 a 180°C a 10 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220 y 260°C, respectivamente. El flujo del gas portador fue de 2.0 mL/min y el volumen de inyección fue de 1 μL . El flujo de aire del FID fue de

Card Data System (Finnigan, Italy). All the products were determined in compared to the peak area of the internal standard (4 methyl-n-valeric acid).

Calculations and statistical analysis. The disappearance values of DM, CP, NDF and ADF from the filter bags at each incubation time were fitted to the exponential equation described by Ørskov and McDonald (1979) $y = a + b(1 - e^{-ct})$, where y is the loss of the analysed feed component from the filter bag at time t , a is the soluble fraction, b is the insoluble potentially degradable fraction, and c is the fractional rate of b degradation. When a value is negative or b value is more than 100, we made use of the equation described by McDonald (1981) $y = b(1 - e^{-c(t-L)})$ where L indicates the time that remains to begin the degradation of b fraction. Potential degradability (PD) is the sum of a and b fraction. Effective degradability (ED) was calculated for the equation described by Ørskov and McDonald (1979) $ED = a + ((bc)/(c + r))$ or for the equation described by McDonald (1981) $ED = ((bc)/(c + r))^{-(c+r)L}$ assuming a constant value of the fractional rate of passage (r) of 0.06 h^{-1} (Sauvant *et al.* 2004).

Data of fermentation in DAISYII incubator were analysed by ANOVA. For nutrient degradation the model used was $Y = \mu + A + B + AB + \varepsilon$, where μ is the mean, A and B are the effects of additive type and incubation time, respectively, AB is the interaction additive type x incubation time and ε_{ijk} is the error. Data of VFA were analyzed by one-way ANOVA. Differences between treatment means were established with a Least Significant Difference (LSD) test. Statistical significance was stated when $P < 0.05$. All calculations were done using SPSS (1997).

Results and Discussion

The chemical composition of incubated diet is presented in table 1. The diet was 12.87% CP, 28.54 % NDF and 12.84 % ADF.

Dry matter degradability. Dry matter disappearance according to treatment type and incubation time, as kinetic of DM degradability are shown in table 2. There was a significative interaction between

350 mL/min, mientras que el flujo de H_2 fue de 35 mL/min (Madrid *et al.* 1999). El procesamiento de datos se realizó a través del Chrom-Card Data System (Finnigan, Italia). Todos los productos se determinaron en comparación con el área del pico del estándar interno (ácido 4 metil-n-valérico).

Cálculos y análisis estadístico. Los valores de desaparición de MS, PB, FDN y FDA de las bolsas de filtro en cada tiempo de incubación se ajustaron a la ecuación exponencial descrita por Ørskov y McDonald (1979) $y = a + b(1 - e^{-ct})$, donde y es el la pérdida del componente de alimentación analizado de la bolsa de filtro en el tiempo t , a es la fracción soluble, b es la fracción insoluble potencialmente degradable y c es la tasa fraccional de degradación b . Cuando el valor de a es negativo o el valor de b es mayor que 100, se empleó la ecuación descrita por McDonald (1981) $y = b(1 - e^{-c(t-L)})$ donde L indica el tiempo que falta para comenzar la degradación de la fracción b . La degradabilidad potencial (DP) es la suma de las fracciones a y b . La degradabilidad efectiva (DE) se calculó por la ecuación descrita por Ørskov y McDonald (1979) $DE = a + ((bc)/(c + r))$ o por la ecuación descrita por McDonald (1981) $DE = ((bc)/(c + r))^{-(c+r)L}$ asumiendo un valor constante de la tasa fraccional de paso (r) de 0.06 h^{-1} (Sauvant *et al.* 2004).

Los datos de fermentación en la incubadora DAISYII se analizaron por ANOVA. Para la degradación de nutrientes, el modelo utilizado fue $Y = \mu + A + B + AB + \varepsilon$, donde μ es la media, A y B son los efectos del tipo de aditivo y el tiempo de incubación, respectivamente, AB es la interacción tipo de aditivo x tiempo de incubación y ε_{ijk} es el error. Los datos de los AGV se analizaron por ANOVA. Las diferencias entre las medias de tratamiento se determinaron mediante la prueba Least Significant Difference (LSD). La significancia estadística se estableció cuando $P < 0.05$. Todos los cálculos se realizaron utilizando SPSS (1997).

Resultados y Discusión

La composición química de la dieta incubada se presenta en la tabla 1. La dieta fue 12.87 % PB, 28.54 % FDN y 12.84 % FDA.

Degradabilidad de la materia seca. La desaparición de la materia seca según el tipo de tratamiento y el tiempo de

Table 1. Chemical composition of incubated mixed diet (as DM basis)^a

Composition (g/kg DM)	Mixed diet (700 g barley grain + 300 g alfalfa hay)
OM	941.6
Ash	58.1
CP	128.7
NDF	285.4
ADF	128.4
ADL	19.6

^aOM = organic matter; CP = crude protein; NDF = neutral-detergent fibre; ADF = acid-detergent fibre; ADL = acid-detergent lignin.

incubation time and treatment ($P = 0.007$). Additives ($P < 0.05$) influenced DM disappearance. At 48h and 72h incubation times, PC, C250 and C500 treatments reduced ($P < 0.001$) DM disappearance in comparison with NC treatment. On the other hand, DM disappearance ($P < 0.001$) increased when incubation time advanced. All additives reduced DM potential degradability (table 2) in comparison to NC treatment (79.4, 78.5, 78.6 vs 83.6 %). The decrease of PD corresponded with a reduction of potentially degradable fraction b. *In vitro* studies (Jalc *et al.* 1992 and Wang *et al.* 2004) have demonstrated a reduction of DM disappearance when monensin was added at 2.5 and 15 ppm. The same effect for monensin has been reported *in vivo* (Rogers *et al.* 1997 and Wang *et al.* 2004) studies. For an essential oils blend (thymol (5-methyl-2-(1-methylethyl) phenol), guaiacol (2-methoxyphenol), limonene (1-methyl-4-(1-methylethenyl) cyclohexene)) has been reported a reduction of *in situ* DM disappearance for concentrate feedstuff as peas (*Pisum sativum*) (Molero *et al.* 2004) or soybean meal (*Glycine max*) (Newbold *et al.* 2004). These essential oils blend inhibited the growth of the most pure cultures of ruminal bacteria at concentrations of less than 100 ppm (McIntosh *et al.* 2003).

incubación, como la cinética de la degradabilidad de la MS se muestran en la tabla 2. Hubo interacción significativa entre el tiempo de incubación y el tratamiento ($P = 0.007$). Los aditivos ($P < 0.05$) influyeron en la desaparición de la MS. En los tiempos de incubación de 48 y 72 horas, los tratamientos con CP, C250 y C500 redujeron ($P < 0.001$) la desaparición de la MS en comparación con el tratamiento con CN. Por otro lado, la desaparición de la MS ($P < 0.001$) aumentó cuando el tiempo de incubación avanzó. Todos los aditivos redujeron la degradabilidad potencial de la MS (tabla 2) en comparación con el tratamiento con CN (79.4, 78.5, 78.6 vs 83.6 %). La disminución de la DP se correspondió con una reducción de la fracción degradable b. Los estudios *in vitro* (Jalc *et al.* 1992 y Wang *et al.* 2004) demostraron una reducción de la desaparición de la MS cuando se agregó monensina a 2,5 y 15 ppm. El mismo efecto para la monensina se informó en estudios *in vivo* (Rogers *et al.* 1997 y Wang *et al.* 2004). Para una mezcla de aceites esenciales (timol (5-metil-2- (1-metiletil) fenol), guayacol (2-metoxifenol), limoneno (1-metil-4-(1-metiletenil) ciclohexeno) se reportó una reducción de la desaparición de MS *in situ* para alimentos concentrados como guisantes (*Pisum sativum*) (Molero *et al.* 2004) o harina de soja (*Glycine max*) (Newbold *et al.* 2004). La mezcla de estos aceites esenciales inhibió el crecimiento de los cultivos más puros de bacterias ruminales en

Table 2. Effect of treatments on dry matter degradability. Disappearance kinetic's according to Ørskov and McDonald (1979) model

Treatment ^a	Incubation time (h)							SEM	P-value
	0	4	8	12	24	48	72		
Negative control	44.5	50.8 ^{bc}	62.6	64.7	72.6	82.3 ^c	83.0 ^c	0.5	0.001
Monensin 7.5ppm	46.3	54.8 ^c	60.5	63.2	72.4	76.8 ^b	80.0 ^b	0.5	0.001
Cinnamaldehyde 250ppm	45.5	47.9 ^b	60.2	66.3	73.1	75.9 ^b	79.2 ^b	0.4	0.001
Cinnamaldehyde 500ppm	44.2	48.1 ^b	59.8	65.9	73.7	76.1 ^b	79.7 ^b	0.6	0.001
SEM	1.1	0.7	0.8	0.5	0.3	0.4	0.3		
P-value	0.895	0.015	0.635	0.110	0.314	0.001	0.005		
Exponential equation: $y = a + b(1 - e^{-ct})$									
	a (%)	b (%)	c (h ⁻¹)	PD (%) ^d	ED (%) ^e	R ²	RSD ^f		
Negative control	44.4	39.2	0.061	83.6	64.2	95.6	3.0		
Monensin 7.5ppm	46.9	32.5	0.062	79.4	63.4	95.6	2.4		
Cinnamaldehyde 250ppm	43.4	35.1	0.075	78.5	62.9	94.5	3.0		
Cinnamaldehyde 500ppm	42.8	35.8	0.077	78.6	62.9	93.6	3.3		

^aIncubation time x treatment interaction, $P = 0.007$.

^{b,c}Means with different superscript within a column are significantly different ($P < 0.05$).

^dPD = $a + b$.

^eED = $a + [(bc)/(c+r)]$, assuming a constant value of r of 0.06 h⁻¹.

^fRSD = Residual standard deviation.

Crude protein degradability. Crude protein disappearance according to treatment type and incubation time, as kinetic of CP degradability are shown in table 3. There was a significant interaction between incubation time and treatment ($P = 0.030$). The effects of the tested additives on CP degradation

concentraciones de menos de 100 ppm (McIntosh *et al.* 2003).

Degradabilidad de la proteína bruta. La desaparición de la proteína bruta según el tipo de tratamiento y el tiempo de incubación, como la cinética de la degradabilidad de la PB se muestran en la tabla 3. Hubo interacción significativa

were not so noticeable, as a very high CP soluble fraction (a) was found. Monensin and cinnamaldehyde did not affect CP disappearance ($P > 0.05$), though a significant ($P < 0.05$) interaction between treatment type and incubation time was noticed (table 3). Moreover, at 48 h of incubation, CP disappearance was smaller ($P < 0.001$) in supplemented treatments than in treatment NC (94.9, 94.9 and 93.3 % vs 98.1 % for PC, C250, C500 and NC treatments respectively). The potentially degradable fraction (b) decreases lightly when additives were included, a similar trend in the PD was observed. It is known that monensin decreases ruminal CP degradation (Van Soest and Demeyer 1977 and Hillaire *et al.* 1989). Ghorbani *et al.* (2010) showed that monensin could decrease the amount of ammonia in rumen liquid. This effect could be due to the fact that monensin negatively affects the gram-positive bacteria population that have high activity of ammonia production (Duffield *et al.* 2002). However, the ruminal microbial synthesis does not seem to be affected by monensin inclusion (Ghorbani *et al.* 2010). On the other hand, some works did not find any effect of monensin on CP degradation (Vanhaecke *et al.* 1985) while others showed an increase of CP degradation (Benchaar *et al.* 2006), probably due to several factors, as monensin concentration or the type of diet used. *In situ* CP degradation can also be reduced by antimicrobial plants products. A blend of thymol (5-methyl-2-(1-methylethyl)phenol), guaiacol (2-methoxyphenol) and limonene (1-methyl-4-(1-methylethenyl)cyclohexene) reduced the soybean meal CP degradation in sheeps (Newbold *et al.*, 2004) and lupin seeds (*Lupinus angustifolius*), green peas (*Pisum sativum*) and sunflower meal (*Helianthus annuus*) CP degradation in growing heifers fed with a high concentrate diet (Molero *et al.* 2004). Tager and Krause (2010) showed that crude protein digestibility was depressed with cinnamaldehyde and eugenol (500mg/L/d).

Fiber degradability. NDF and ADF disappearance according to treatment type and incubation time, as kinetic of NDF and ADF degradability are shown in table 4 and 5. There was a significant interaction between incubation time and treatment ($P = 0.001$) for both NDF and ADF. NDF and ADF degradations were reduced ($P < 0.001$) with additive supplementation. In addition, the effect of cinnamaldehyde at 250 ppm on fiber degradation was similar to that observed with monensin. Fiber disappearance for C500 treatment did not begin until 8 h of incubation for NDF degradation and until 12 h of incubation in all treatments for ADF degradation. C500 treatment showed a time "lag" from which NDF degradation started. A time "lag" was necessary for ADF fraction in all treatments used. This result is consistent with the fact that ADF does not have soluble fraction (Van Soest, 1994). PC, C250 and C500 treatments tended to reduce PD and ED of

entre el tiempo de incubación y el tratamiento ($P = 0.030$). Los efectos de los aditivos probados en la degradación de la PB no fueron tan notables, ya que se encontró una fracción soluble (a) de PB muy alta. La monensina y el cinamaldehído no afectaron la desaparición de la PB ($P > 0.05$), aunque se observó interacción significativa ($P < 0.05$) entre el tipo de tratamiento y el tiempo de incubación (tabla 3). Además, a las 48 h de incubación, la desaparición de la PB fue menor ($P < 0.001$) en los tratamientos suplementados que en el tratamiento CN (94.9, 94.9 y 93.3 % vs 98.1 % para los tratamientos con PB, C250, C500 y CN respectivamente). La fracción potencialmente degradable (b) disminuye ligeramente cuando se incluyen los aditivos, se observó una tendencia similar en la DP. Es sabido que la monensina disminuye la degradación ruminal de la PB (Van Soest y Demeyer 1977 y Hillaire *et al.* 1989). Ghorbani *et al.* (2010) demostraron que la monensina podría disminuir la cantidad de amoníaco en el líquido ruminal. Este efecto podría deberse al hecho de que la monensina afecta negativamente a la población de bacterias grampositivas que tienen una alta actividad de producción de amoníaco (Duffield *et al.* 2002). Sin embargo, la síntesis microbiana ruminal no parece verse afectada por la inclusión de monensina (Ghorbani *et al.* 2010). Por otro lado, algunos estudios no encontraron ningún efecto de la monensina en la degradación de la PB (Vanhaecke *et al.* 1985), mientras que otros mostraron aumento de la degradación de la PB (Benchaar *et al.* 2006), probablemente debido a varios factores, como la concentración de monensina o el tipo de dieta utilizada. La degradación *in situ* de CB también puede reducirse por productos de plantas antimicrobianas. Una mezcla de timol (5-metil-2-(1-metiletil)fenol), guaiacol (2-metoxifenol) y limoneno (1-metil-4-(1-metiletenil) ciclohexeno) redujo la degradación de la PB de la harina de soya en las ovejas (Newbold *et al.* 2004) y las semillas de lupino (*Lupinus angustifolius*), guisantes verdes (*Pisum sativum*) y harina de girasol (*Helianthus annuus*) disminuyeron la degradación de la PB en las novillas en crecimiento alimentadas con una dieta altamente concentrada (Molero *et al.* 2004). Tager y Krause (2010) demostraron que la digestibilidad de la proteína bruta fue baja con cinamaldehído y eugenol (500 mg/L/d).

Degradabilidad de la fibra. En la tabla 4 y 5 se muestran las desapariciones de la FDN y la FDA según el tipo de tratamiento y el tiempo de incubación, así como la cinética de la degradabilidad de la FDN y la FAD. Hubo interacción significativa entre el tiempo de incubación y el tratamiento ($P = 0,001$) tanto para la FDN como para la FDA. Las degradaciones de FDN y FDA se redujeron ($P < 0.001$) con la suplementación de aditivos. Además, el efecto del cinamaldehído a 250 ppm en la degradación de la fibra fue similar al observado con la monensina. La desaparición de la fibra para el tratamiento con C500 no comenzó hasta las 8 h de incubación para la degradación de FDN y hasta las 12 h de incubación en todos los tratamientos para la degradación de FDA. El tratamiento con C500 mostró la fase de latencia a partir de la cual comenzó la degradación

Table 3. Effect of treatments on crude protein degradability. Disappearance kinetic's according to Ørskov and McDonald (1979) model

Treatment ^a	Incubation time (h)							SEM	P-value
	0	4	8	12	24	48	72		
Negative control	79.0	81.2 ^b	88.0	89.1	94.1	98.1 ^d	98.4	0.3	0.001
Monensin 7.5ppm	81.0	84.9 ^c	87.3	88.4	94.5	94.9 ^c	98.2	0.4	0.001
Cinnamaldehyde 250ppm	81.5	80.5 ^b	87.5	90.8	93.8	94.9 ^c	97.6	0.4	0.001
Cinnamaldehyde 500ppm	79.2	84.8 ^c	89.6	90.7	95.1	93.3 ^b	97.4	0.5	0.001
SEM	0.9	0.3	0.9	0.5	0.2	0.2	0.2		
P-value	0.714	0.013	0.798	0.293	0.303	0.001	0.401		
	Exponential equation: $y=a+b(1-e^{-ct})$.								
	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (h ⁻¹)	PD (%) ^e	ED (%) ^f	R ²	RSD ^g		
Negative control	78.4	20.5	0.063	98.9	88.9	96.3	1.4		
Monensin 7.5ppm	81.2	16.4	0.056	97.6	89.1	93.8	1.5		
Cinnamaldehyde 250ppm	79.9	17.0	0.066	96.9	88.8	88.7	2.2		
Cinnamaldehyde 500ppm	80.2	14.2	0.090	94.4	88.7	83.0	2.6		

^a Incubation time x treatment interaction, P = 0.030.

^{b,c,d} Means with different superscript within a column are significantly different (P<0.05).

^e PD = $a + b$.

^f ED = $a + [(bc)/(c+r)]$, assuming a constant value of r of 0.06 h⁻¹.

^g RSD = Residual standard deviation.

Table 4. Effect of treatments on neutral detergent fiber degradability. Disappearance kinetic's according to Ørskov and McDonald (1979) or McDonald (1981) model

Treatment ^a	Incubation time (h)							SEM	P-value
	0	4	8	12	24	48	72		
Negative control	6.0 ^d	14.9 ^d	19.7 ^c	24.6 ^d	29.8 ^c	44.3 ^c	49.5 ^d	0.3	0.001
Monensin 7.5ppm	5.2 ^d	14.5 ^d	18.8 ^c	21.0 ^c	25.1 ^b	31.5 ^b	37.9 ^c	0.3	0.001
Cinnamaldehyde 250ppm	2.3 ^c	9.9 ^c	16.2 ^c	23.3 ^{cd}	26.3 ^b	27.8 ^b	34.6 ^{bc}	0.4	0.001
Cinnamaldehyde 500ppm	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	17.4 ^b	25.6 ^b	31.5 ^b	31.7 ^b	0.3	0.001
SEM	0.3	0.1	0.6	0.3	0.4	0.5	0.5		
P-value	0.008	0.001	0.001	0.005	0.050	0.001	0.001		
	Exponential equation: $y=a+b(1-e^{-ct})$ or $y= b(1-e^{-c(t-L)})$								
	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (h ⁻¹)	L (h)	PD (%) ^e	ED (%) ^f	R ²	RSD ^g	
Negative control	8.0	45.3	0.033		53.3	24.1	98.1	2.1	
Monensin 7.5ppm	7.7	29.0	0.047		36.7	20.4	94.2	2.5	
Cinnamaldehyde 250ppm	2.1	29.3	0.085		31.4	19.3	94.2	2.6	
Cinnamaldehyde 500ppm		34.2	0.048	2.38	34.6	11.8	88.6	4.9	

^a Incubation time x treatment interaction, P = 0.001.

^{b,c,d} Means with different superscript within a column are significantly different (P<0.05).

^e PD = $a + b$.

^f ED = $a + [(bc)/(c+r)]$ or $[(bc)/(c+r)]^{-(c+r)L}$, assuming a constant value of r of 0.06 h⁻¹.

^g RSD = Residual standard deviation.

the fiber fraction, in comparison with NC treatment. Monensin inhibitory effect on fiber degradation is well documented by other authors in *in vitro* and *in situ* trials (Jalc *et al.* 1992). The effect of plants extracts on fiber degradation is depending on their chemical structure. This way, tannins (Hervás *et al.* 2003) and saponins (Wina *et al.* 2005) could to reduce *in situ* NDF degradation, while Achillea millefolium extract containing flavonoids, increased NDF and ADF degradabilities (Broudiscou *et al.* 2002).

de la FDN. La fase de latencia fue necesaria para la fracción de FDA en todos los tratamientos utilizados. Este resultado es consistente con el hecho de la FDA no tiene fracción soluble (Van Soest, 1994). Los tratamientos con PB, C250 y C500 tendieron a reducir la DP y la DE de la fracción de fibra, en comparación con el tratamiento de CN. El efecto inhibitorio de la monensina en la degradación de la fibra está bien documentado por otros autores en ensayos *in vitro* e *in situ* (Jalc *et al.* 1992). El efecto de los extractos de plantas en la degradación de las fibras depende de su

Table 5. Effect of treatments on acid detergent fiber degradability. Disappearance kinetic's according to McDonald (1981) model.

Treatment ^a	Incubation time (h)				SEM	P-value	
	12	24	48	72			
Negative control	5.0 ^d	11.0 ^c	28.3 ^c	37.7 ^c	0.4	0.001	
Monensin 7.5ppm	0.0 ^b	2.2 ^b	12.6 ^b	22.1 ^b	0.2	0.001	
Cinnamaldehyde 250ppm	5.2 ^d	9.1 ^c	11.3 ^b	20.7 ^b	0.5	0.001	
Cinnamaldehyde 500ppm	2.8 ^c	9.1 ^c	15.4 ^b	18.0 ^b	0.3	0.001	
SEM	0.2	0.7	0.6	0.7			
P-value	0.003	0.040	0.001	0.002			
	Exponential equation $y = b(1 - e^{-c(t-L)})$						
	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (h ⁻¹)	<i>L</i> (h)	PD (%) ^e	ED (%) ^f	R ²	RSD ^g
Negative control	39.6	0.025	4.35	39.6	8.0	92.1	4.2
Monensin 7.5ppm	23.5	0.019	6.18	23.5	3.5	82.9	3.5
Cinnamaldehyde 250ppm	19.8	0.027	3.11	19.8	4.7	86.1	2.8
Cinnamaldehyde 500ppm	19.6	0.029	3.71	19.6	5.6	93.5	1.9

^a Incubation time x treatment interaction, P = 0.001.

^{b,c,d} Means with different superscript within a column are significantly different (P<0.05).

^e PD = $a + b$.

^f ED = $[(bc)/(c+r)]^{(c+r)L}$, assuming a constant value of r of 0.06 h⁻¹.

^g RSD = Residual standard deviation.

Volatile fatty acids. The effect of treatments on volatile fatty acids production is shown in table 6. The main effect of monensin on ruminal energy metabolism is to increase production of propionic acid and to reduce the production of acetic acid, resulting in a lower acetic: propionic ratio (Wang *et al.* 2004). In our study, this effect was also found. Cinnamaldehyde increased the total VFA production (P < 0.01) compared with NC or PC, but did not affect the molar proportion of acetate, propionate or butyrate compared with the control treatments. When cinnamaldehyde was added at 2.2 mg/mL concentration in a continuous culture system, total VFA production and propionate molar proportion were not affected, but a lower molar proportion of acetate and a numerical increase in molar proportion of butyrate were noticed (Busquet *et al.* 2005). In similar incubators, the addition of 0.22 mg/mL of an extract of cinnamon with a 59 % of cinnamaldehyde increased the molar proportion of acetate and decreased the molar proportion of propionate and butyrate during the adaptation period. However, these effects disappeared after 6 days of fermentation (Cardozo *et al.* 2004). An increase of total VFA production due to plant extracts has also been reported by other study (Wina *et al.* 2005). Thus, the addition of 2 or 4 mg/mL of a methanol extract from *Sapindus rarak* containing saponins to glass syringes incubators *in vitro*, it increased the total VFA production at 48 h of incubation. In contrast, a dose of 540 mg/L of cinnamaldehyde reduced the total VFA production in a 16h incubation of mixed rumen microorganism with medium and high concentrate content diets,

estructura química. De esta forma, los taninos (Hervás *et al.* 2003) y las saponinas (Wina *et al.* 2005) podrían reducir la degradación *in situ* de la FDN, mientras que el extracto de *Achillea millefolium* que contiene flavonoides, incrementa las degradabilidades de FDN y FDA (Broudiscou *et al.* 2002).

Ácidos grasos volátiles. El efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles se muestra en la tabla 6. El efecto principal de la monensina en el metabolismo de la energía ruminal es aumentar la producción de ácido propiónico y reducir la producción de ácido acético, lo que resulta en menor relación acético: propiónico (Wang *et al.* 2004). En este estudio, este efecto también se encontró. El cinamaldehído aumentó la producción total de AGV (P<0.01) en comparación con CN o PB, pero no afectó la proporción molar de acetato, propionato o butirato en comparación con los tratamientos de control. Cuando se agregó cinamaldehído a la concentración de 2.2 mg/mL en un sistema de cultivo continuo, la producción total de AGV y la proporción molar de propionato no se afectaron, pero se notó una proporción molar inferior de acetato y un aumento numérico en la proporción molar de butirato (Busquet *et al.* 2005). En incubadoras similares, la adición de 0.22 mg/mL de un extracto de canela con 59 % de cinamaldehído aumentó la proporción molar de acetato y disminuyó la proporción molar de propionato y butirato durante el período de adaptación. Sin embargo, estos efectos desaparecieron después de 6 días de fermentación (Cardozo *et al.* 2004). Otro estudio (Wina *et al.* 2005) también informó aumento en la producción total de AGV debido a extractos de plantas. Por lo tanto, la adición de 2 o 4 mg/mL de extracto con metanol de *Sapindus rarak* que contiene saponinas

while lower doses (180, 60 and 20 mg/L) didn't affect total VFA production in comparison to control group (Mateos *et al.* 2013). This way, Macheboeuf *et al.* (2008) found no increase of total VFA production with cinnamaldehyde supplementation at doses of 132 or 264 mg/L, but total VFA production were reduced by cinnamaldehyde doses of 396 and 661 mg/L. Blanch *et al.* (2016) describes reduction in total VFA with a dose of 172 mg/L of cinnamaldehyde.

a incubadoras *in vitro* de jeringas de vidrio, incrementó la producción total de AGV a las 48 h de incubación. A diferencia de, una dosis de 540 mg/L de cinamaldehído redujo la producción total de AGV en una incubación de 16 horas de mezcla de microorganismos de rumen mixto con dietas de contenido de concentrado medio y alto, mientras que las dosis más bajas (180, 60 y 20 mg/L) no afectaron la producción total de AGV en comparación con el grupo control (Mateos *et al.* 2013). De esta manera, Macheboeuf

Table 6. Effect of treatments on volatile fatty acids production at 48 h of *in vitro* incubation

Treatments	Total VFA (mM)	Molar proportion VFA (%)		
		Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
Rumen fluid at 0 h of incubation	7.45	78.94	9.79	11.25
Rumen fluid at 48 h of incubation				
Negative control	21.06 ^b	70.17	16.76 ^b	13.05 ^a
Monensin 7.5 ppm	16.65 ^b	66.16	23.74 ^a	10.09 ^b
Cinnamaldehyde 250 ppm	28.17 ^a	69.61	16.70 ^b	13.66 ^a
Cinnamaldehyde 500 ppm	28.91 ^a	69.85	17.92 ^b	12.18 ^{ab}
SEM	0.64	0.82	0.45	0.37
P-value	0.003	0.152	0.002	0.021

^{a-b} Means with different superscript within a column are significantly different (P<0.05)

When gas chromatography analyses were performed, a peak in ruminal samples with cinnamaldehyde treatments was found (Figure 1). This peak was identified using a standard solution of cinnamaldehyde. As consequence, the method developed could be used to determine both VFA and plant-derived compounds as cinnamaldehyde

et al. (2008) no encontraron aumento de la producción total de AGV con suplementación de cinamaldehído a dosis de 132 o 264 mg/L, pero la producción total de AGV se redujo con dosis de cinamaldehído de 396 y 661 mg/L. Blanch *et al.* (2016) describen la reducción total de AGV con una dosis de 172 mg/L de cinamaldehído.

Cuando se realizaron los análisis de cromatografía

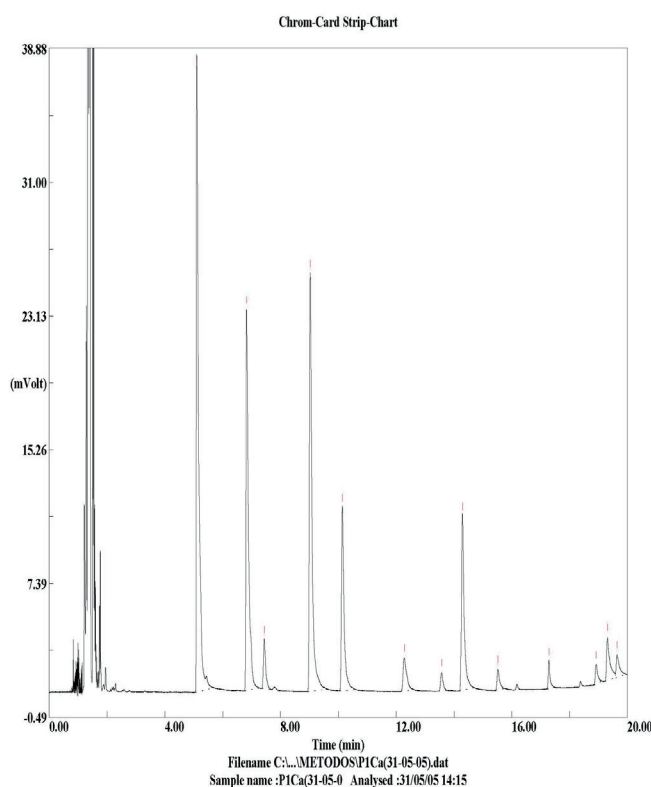


Figure 1. Chromatogram of rumen fluid with cinnamaldehyde (500 ppm) at 48h of incubation. Peaks: 1=acetic acid, 2=propionic acid, 3=butyric acid, 4=4 methyl n-valeric acid, 5=cinnamaldehyde.

in ruminal fluid, method in which an apolar solvent extraction would be not needed as well.

In conclusion, results indicated that cinnamaldehyde modified *in vitro* goat ruminal fermentation. This phenolic compound reduced DM and fiber degradation in the same fashion as monensin did. However, contrary to monensin, cinnamaldehyde increased total VFA production and did not affect molar proportion of VFA. The two doses of cinnamaldehyde used showed an identical effect and probably were too high. Further research with lower doses and *in vivo* study are required.

Acknowledgements

P. Catalá-Gregori was recipient of a research fellowship (AP2002-3340) from the Ministry of Education and Science of Spain.

de gases, se encontró un pico en las muestras de rumen con tratamientos con cinamaldehído (figura 1). Este pico se identificó utilizando una solución estándar de cinamaldehído. Como consecuencia, el método desarrollado podría usarse para determinar tanto los AGV y los compuestos derivados de plantas como el cinamaldehído en el fluido ruminal, método en el que tampoco sería necesaria una extracción con solvente apolar.

En conclusión, los resultados indicaron que el cinamaldehído modificó la fermentación ruminal *in vitro* de la cabra. Este compuesto fenólico redujo la MS y la degradación de la fibra de la misma manera que la monensina. Sin embargo, a diferencia de la monensina, el cinamaldehído aumentó la producción total de AGV y no afectó la proporción molar de AGV. Las dos dosis de cinamaldehído utilizadas mostraron efecto idéntico y probablemente fueron demasiado altas. Se requieren investigaciones futuras con dosis más bajas y estudios *in vivo*.

Agradecimientos

P. Catalá-Gregori recibió una beca de investigación (AP2002-3340) del Ministry of Education and Science of Spain.

References

- AOAC, 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Inc., Arlington, VA. USA. ISBN: 978-0935584424.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Whyte, T.D. & Chouinard, P. Y. 2006. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 4352-4364. ISSN: 0022-0301. [http://doi.org/10.3168/jds.58022-8302\(06\)72482-1](http://doi.org/10.3168/jds.58022-8302(06)72482-1)
- Blanch, M., Carro, M.D., Ranilla, M.J., Viso, A., Vázquez-Añón, M. & Bach, A. 2016. Influence of a mixture of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen fermentation, feeding behavior and performance of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219, 313-323. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.002>.
- Broudiscou, L.P., Papon, Y. & Broudiscou, A.F. 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 183-189. ISSN: 0377-8401. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(2\)00221-3](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(2)00221-3).
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2005. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:597-613. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.03.008>.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82: 3230-3236. ISSN: 0021-8812. <http://doi.org/10.2527/2004.82113230x>.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso, M., Miranda, M. & Hernández, J. 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 101-116. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.02.001>.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Sci. Total Environ.* 545–546, 556–568. ISSN: 0048-9697. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>.
- Chang, S.T., Chen, P.F. & Chang, S.C. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* 77: 123-127. ISSN: 0378-8741. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00273-2](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00273-2)
- Chaves, A.V., Dugan, M.E.R., Stanford, K., Gibson, L.L., Bystrom, J.M., McAllister, T.A., Van Herk, F. & Benchaar, C. 2015. A dose-response of cinnamaldehyde supplementation on intake, ruminal fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livest. Sci.* 141: 213-220. ISSN: 1871-1413. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.06.006>.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582. ISSN1098-6618. DOI:10.1182/CMR.12.4.564.
- Dennis, S.M., Nagaraja, T.G. & Bartley, E.E. 1981 Effect of lasalocid or monensin on lactate production from *in vitro* rumen fermentation of various carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 64, 2350-2356. ISSN: 0022-0302. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(81)82857-3.
- Domescik, E.J. & Martin, S.A., 1999. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the *in vitro* mixed ruminal

- microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 77: 2305-2312. ISSN: 0021-8812. <http://doi.org/10.2527/1999.778305x>.
- Duffield, T., Bagg, R., DesCoteaux, L., Bouchard, E., Brodeur, M., DuTremblay, D., Keefe, G., LeBlanc, S. & Dick, P. 2002. Parturition monensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 397-405. ISSN: 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(2)74087-3.
- Ghorbani, B., Ghoorchi, T., Amanlou, H. & Zerehdaran, S. 2010. Effects of using monensin and different levels of crude protein on milk production, blood metabolites and digestion of dairy cows. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 24: 65-72. ISSN: 1011-2367. <http://doi.org/10.5713/ajas.2011.40623>.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, I., Pol, T., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. & Von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3590-3595. ISSN: 1520-5118. <http://doi.org/10.1021/jf980154m>.
- Hervás, G., Frutos, P., Giraldez, F.J., Mantecón, A.R. & Álvarez Del Pino, M.C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109: 65-78. ISSN: 0377-8401. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(3\)00208-6](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(3)00208-6).
- Hili, P., Evans C.S., Veness & R.G. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 269-275. ISSN: 1472-765X. <http://doi.org/10.1016/j.1472-765X-1997.00073.X>.
- Hillaire, M.C., Jouany, J.P., Gaboyard, C. & Jeminet, G. 1989. *In vitro* study of the effect of different ionophore antibiotics and of certain derivatives on rumen fermentation and on protein nitrogen degradation. *Reprod. Nutr. Dev.* 29: 247-257.
- Jalc, D., Baran, M., Vendrak, T., Siroka & P. 1992. Effect of monensin on fermentation of hay and wheat bran investigated by rumen simulation technique (Rusitec). Basal parameters of fermentation. *Arch. Tierernähr.* 42: 147-152.
- Khorrarnia, B., Vakili, A.R., Danesh Mesgarana, M. & Klevenhusenb, F. 2015. Thyme and cinnamon essential oils: Potential alternatives for monensin as a rumen modifier in beef production systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 200: 8-16. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.009>.
- Macheboeuf, D., Morgavi, D.P., Papon, Y., Mousset, J.-L. & Arturo-Schaan M. 2008. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 335-350. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.044>.
- Madrid, J., Megías, M.D. & Hernández, F. 1999. Determination of short chain volatile fatty acids in silages from artichoke and orange by-products by capillary gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 79: 580-584. ISSN: 1097-0010. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1047-0010\(19990315\)79:4<580::AID](http://doi.org/10.1002/(SICI)1047-0010(19990315)79:4<580::AID).
- Mandebvu, P., Klingener, J.L., LaCoss, D.D., Ballard, C.S., Sniffen, C.J. & Kramer, S.R. 2001. Effects of source and level of nitrogen, and changing buffer/ruminal fluid at 48h on *in vitro* digestion of feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 93: 43-54. ISSN: 0377-8401. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00268-1](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00268-1).
- McDonald, I. 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *J. Agric. Sci., Camb.* 96: 251-252.
- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A. & Newbold, C.J. 2003. Effects of essential oils on rumen microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5011-5014. ISSN: 1098-5336. DOI: 10.1128/AEM.69.8.504-5014.2003.
- Mateos, I., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Saro, C., Kamel, C. & Carro M. D. 2013. The influence of diet type (dairy versus intensive fattening) on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Anim. Prod. Sci.* 53(4): 299-307. ISSN: 1836-0934. <http://doi.org/10.1071/AN12167>.
- Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, P. 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. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/anifeed.2003.11.011>.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R. & Wallace, R.J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 105-112. ISSN: 0377-8401. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.12.006>.
- Ørskov, E.R. & McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci., Camb.* 92: 499-503. ISSN: 1469-5146. <http://doi.org/10.1017/S0021859600063048>.
- Rogers, M., Jouany, J.P., Thivend, P., Fontenot & J.P. 1997. The effects of short-term and long-term monensin supplementation, and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65: 113-127. ISSN: 0377-8401. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01089-9](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01089-9).
- Russell, J.B. & Rychlik, J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Sci.* 292: 1119-1122. ISSN: 1095-9303. DOI: 10.1126/science.1058830.
- Sauvant, D., Pérez, J.M. & Tran, G. 2004. Tablas de composición y de valor nutritivo de las materias primas destinadas a los animales de interés ganadero. Eds. Mundi-Prensa, Madrid, Spain. ISBN: 978 8484761778.
- SPPS. 1997. Software for Windows, release 10.0. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Tager, L.R. & Krause, K.M. 2010. Effects of cinnamaldehyde, eugenol, and capsaicin on fermentation of a corn-based dairy ration in continuous culture. *Can. J. Anim. Sci.* 90: 413-420. ISSN: 1918-1825. <http://doi.org/10.4141/CJAS09080>.
- Valero, M. & Salmerón, M.C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 73-81. ISSN: 0168-1605. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00484-1](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00484-1).
- Van Nevel, C.J. & Demeyer, D.I. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 251-257. ISSN: 1098-5336.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Cornell University Press, New York. USA. ISBN: 978-0801 427725.
- Van Soest, P.J. & Roberston, J.B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in

- relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3588-3597. ISSN: 022-0302.[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(9\)78551-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(9)78551-2).
- Vanhaecke, H., van Nevel, C.J., Dendooven, R. & Demeyer, D.I. 1985. Effect of monensin on fermentation pattern and soybean protein degradation in the rumen of sheep. *Arch. Tierernahr.* 35: 279-286.
- Wang, Y., Alexander, T.W. & McAllister, T.A. 2004. *In vitro* effects of monensin and tween 80 on ruminal fermentation of barley grain:barley silage-based diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116: 197-209. ISSN: 0377-8401.<http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.06.006>.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S. & Becker K. 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121: 159-174. ISSN: 0377-8401.<http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.016>.

Received: May 5, 2019