

EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE FLORES DE LÚPULO EN LA DIETA DE CORDEROS EN CEBO SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VIVO* E *IN VITRO*

TEJIDO M.L.¹; BLANCO, C.¹; BODAS, R.²; ANDRÉS, S.¹; CASADO, D.¹; CAYETANO, J.A.³ Y GIRÁLDEZ, F.J.¹

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). Finca Marzanas. 24346 Grulleros, León. España. ²Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Burgos, km. 119. 47071, Valladolid. España. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, México.

RESUMEN

Cuarenta corderos (PVI 14.6 kg) se distribuyeron en 4 grupos, cada uno recibiendo a voluntad un pienso compuesto completo con diferente contenido de flores de lúpulo: 0 % (Control), 0,15 % (LUP15), 0,30 % (LUP30), 0,60 % (LUP60). Tras el sacrificio (27 kg PV) se tomaron muestras de líquido ruminal para determinar pH y concentración de ácidos grasos volátiles y amoniaco. Se realizó una prueba de fermentación ruminal *in vitro* utilizando como inóculo líquido ruminal de animales del grupo Control y, como sustrato, los piensos mencionados. El líquido ruminal de los animales de los grupos LUP30 y LUP60 presentó una menor concentración de ácido propiónico ($P < 0,01$), mayor de ácido acético ($P < 0,10$) y una relación acético/propiónico superior al grupo Control ($P < 0,05$). Sin embargo, la adición de lúpulo a la ración no tuvo un efecto claro sobre la fermentación ruminal *in vitro* al emplear como inóculo líquido ruminal de animales no adaptados a este aditivo, lo que sugiere que es necesario un periodo de adaptación (>24 h) para que se manifiesten los efectos.

Palabras clave: rumen, lúpulo, ácidos grasos volátiles, amoniaco

INTRODUCCIÓN

El 98 % de la superficie dedicada a la producción de lúpulo en España se concentra en la provincia de León, dando lugar a una producción media de unas 1000 Tm anuales (MAGRAMA, 2012). La flor del lúpulo es rica en compuestos fenólicos, cuya aplicación, como fuente de antioxidantes podría ser interesante en el campo de la nutrición animal. Además, el lúpulo podría modificar la microbiota ruminal, favoreciendo la formación de ácido propiónico y reduciendo la producción de metano y amoníaco (Flythe, 2009; Flythe y Aiken, 2010), aunque los resultados observados hasta el momento son inconsistentes y varían en función de la variedad y dosis de lúpulo empleada, el tipo de extracto utilizado y el tiempo de almacenamiento y el tipo de dieta que consuman los animales (Canbas et al., 2001; Narváez et al., 2011; Wang et al., 2010; Schmidt y Nelson, 2006). Asimismo, son escasos los estudios que describan los efectos de lúpulo sobre la fermentación ruminal *in vivo*.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto de la inclusión de diferentes proporciones (0,15; 0,30 y 0,60 %) de flores de lúpulo en una ración completa para corderos de cebo sobre la fermentación ruminal. El segundo objetivo, puramente metodológico, fue comprobar si los cambios observados *in vivo* son detectables cuando se realiza una prueba de producción de gas *in vitro* a 24 h con las mismas raciones, utilizando líquido ruminal de animales no habituados al consumo de flores de lúpulo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 corderos de raza Merina (peso vivo, PV, 14.6 ± 1.21 kg) distribuidos en 4 grupos equilibrados en función del PV. Los animales de cada grupo recibieron, a voluntad, un pienso compuesto completo (43 % cebada, 15 % maíz, 24 % torta de soja, 15 % paja de cereales, 3 % corrector) con diferente contenido de flores de lúpulo (pellet Nugget cosecha 2012, S.A. Española de Fomento del Lúpulo, Villanueva de Carrizo, León): 0 % (grupo Control), 0,15 % (grupo LUP15), 0,30 % (grupo LUP30), 0,60 % (grupo LUP60). Inmediatamente después del sacrificio (27 kg PV) se recogió el rumen y se filtró todo su contenido a través de dos capas de gasa. A continuación se midió el pH del líquido ruminal, utilizando un pHmetro (WTW 330i, Alemania) y se recogieron muestras para determinar el contenido de ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco (50 ml de líquido ruminal con 1 ml de ácido sulfúrico al 20 %), que se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis (Ottenstein y Bartely, 1971; Weatherburn, 1967).

Para la prueba de fermentación ruminal *in vitro* (cultivos no renovados de microorganismos ruminales) se utilizó como inóculo la mezcla del líquido ruminal procedente de los corderos del grupo Control sacrifi-

cados cada día y se utilizaron como sustratos cada una de las dietas anteriormente mencionadas (Control, LUP15, LUP30, LUP60). Las incubaciones se realizaron empleando viales de 120 ml a los que se añadió 400 mg del sustrato correspondiente y 40 ml de una mezcla (1:4 v/v) de líquido ruminal y del medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970). Las incubaciones se repitieron 4 días (mezclándose en cada día el inóculo de al menos 2 corderos), incubándose dos viales para cada tratamiento, incluyendo también viales sin sustrato (blancos). Tras 24 horas de incubación en condiciones de anaerobiosis a 39 °C se midió el volumen de gas producido. Después los viales se abrieron y se tomaron muestras para la determinación de AGV y amoníaco, que fueron conservadas y analizadas como ya se ha descrito.

Los datos relativos al líquido ruminal fueron sometidos a un ANOVA con el tipo de dieta como fuente de variación. Las réplicas para cada sustrato y día de incubación fueron promediadas y los datos sometidos a un ANOVA con el sustrato como fuente de variación y el día como efecto bloque, utilizando el procedimiento GLM del SAS (SAS Inst. Inc., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los valores medios de pH, de concentración de amoníaco y AGV en el líquido ruminal y las proporciones de ácido acético y propiónico en el total de AGV totales. La inclusión de flores de lúpulo en la dieta no influyó significativamente ($P>0,10$) en el pH y ni en la concentración de AGV. Sin embargo, los animales de los grupos LUP30 y LUP60 presentaron menores concentraciones de ácido propiónico ($P<0,01$), tendieron a mostrar una mayor concentración de ácido acético ($P<0,10$) y una relación acético/propiónico superior al grupo Control ($P<0,05$).

Tabla 1. Valores medios de pH, amoníaco y concentración de ácidos grasos volátiles, AGV) del líquido ruminal (de los corderos de cada dieta experimental en el momento del sacrificio (efectos *in vivo*)

	Control	LUP15	LUP30	LUP60	DER	P
pH	5,41	5,57	5,65	5,61	0,547	NS
Amoníaco (mg/l)	222	237	291	312	111,7	NS
AGV totales (mmol/l)	143	141	139	144	48,3	NS
Acético/Propiónico (mmol/mmol)	1,02 ^c	1,05 ^{bc}	1,29 ^a	1,23 ^{ab}	0,209	*
Acético (mol/100 mol AGV)	44,2	44,0	47,8	46,1	3,53	T
Propiónico (mol/ 100 mol AGV)	43,8 ^a	42,7 ^a	37,7 ^b	38,4 ^b	3,86	**

DER=Desviación estándar residual. P=nivel de probabilidad (NS: $P>0.10$; T: $P<0.10$; *: $P<0.05$; ** $P<0.01$).

^{a,b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$).

En contraste con estos resultados, Wang et al. (2010) observaron un incremento en la producción de AGV, especialmente de propionato, al incluir hasta 476 mg de lúpulo por kg de MS cuando utilizaron como sustrato de fermentación una ración para el crecimiento de terneros. Sin embargo, con una ración de cebo (mayor concentración energética, aprox. 86 % de cebada), estos autores obtuvieron resultados similares a los observados en nuestra prueba *in vivo*, lo que sugiere que el efecto de las flores de lúpulo varía con el tipo de dieta basal.

Flythe (2009) y Flythe y Aiken (2010), utilizando cultivos puros *in vitro*, demostraron que la actividad antimicrobiana del lúpulo era debida a sus metabolitos secundarios (lupulona y beta ácidos, entre otros) y que éstos inhibían el crecimiento de las bacterias productoras de amoníaco, disminuyendo la concentración de amoníaco en el rumen. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la concentración de amoníaco en el líquido ruminal de los animales que consumieron las diferentes dietas experimentales, si bien se observan diferencias numéricas que sugieren un efecto opuesto al señalado por los anteriores autores. En este sentido, Narvaez et al. (2011), al incubar una ración con un 86% de cebada, señalaron un aumento en la producción de amoníaco tras 24 h de incubación al añadir 800µg de lúpulo/ml de medio de incubación.

Si bien el consumo de lúpulo durante el periodo de cebo dio lugar a cambios en perfil de ácidos grasos volátiles en muestras de líquido ruminal obtenidas tras el sacrificio, el uso de este aditivo de forma puntual no tuvo un efecto claro sobre la fermentación ruminal *in vitro*, salvo en la proporción de ácido butírico que tendió a ser mayor para la dieta LUP60 (Tabla 2). En concordancia con los resultados de nuestro estudio *in vitro*, Staerfl et al. (2010) tampoco observaron efecto alguno del lúpulo sobre la fermentación *in vitro* tras 48 h de incubación. Sin embargo, Narváez et al. (2011, 2012 y 2013) señalaron aumentos de la producción de propionato y una reducción en la relación acético/propiónico, si bien estos efectos fueron evidentes a tiempos de incubación de 48 horas y con sistemas de fermentadores semicontinuos después de 15 días de tratamiento.

Tabla 2. Valores medios de pH, producción de gas y ácidos grasos volátiles (AGV) tras incubar durante 24 h las diferentes dietas utilizando como inóculo líquido ruminal de los animales que recibieron la dieta Control (efectos *in vitro*)

	Control	LUP15	LUP30	LUP60	DER	P
Producción de gas (ml/g MS)	238	235	238	230	9,3	NS
pH	6,37	6,37	6,36	6,37	0,031	NS
Amoniaco (mg/l)	228	224	227	226	4,7	NS
Producción AGV (mmol/g MS)						
Acético	4,91	4,91	4,90	4,93	0,168	NS
Propiónico	1,72	1,70	1,68	1,68	0,037	NS
Butírico	1,48	1,42	1,47	1,53	0,083	NS
Total	8,67	8,57	8,58	8,66	0,250	NS
Acético/propiónico	3,00	3,00	3,02	3,04	0,108	NS
Proporción AGV (mol/100 mol)						
Acético	55,7	56,2	56,2	55,8	0,80	NS
Propiónico	20,7	20,5	20,2	20,3	0,50	NS
Butírico	16,6	16,2	16,6	17,1	0,55	T

DER=Desviación estándar residual. P=nivel de probabilidad (NS: $P > 0,10$; T: $P < 0,10$).

Los diferentes resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* sugieren que los cambios en el patrón de fermentación como consecuencia del consumo de flores de lúpulo no son inmediatos y tal vez requieran de un periodo de adaptación de la microbiota para que se manifiesten, como se ha observado con la utilización de otros aditivos (Opsi et al., 2012). Por otra parte, estos resultados ponen de manifiesto las limitaciones de la técnica de producción de gas *in vitro* para detectar hipotéticos cambios en la fermentación ruminal debidos a la presencia de determinadas sustancias o ingredientes.

CONCLUSIONES

La inclusión de flores de lúpulo en la dieta de corderos en cebo, en una proporción igual o superior al 0,3 %, modificó la fermentación ruminal, incrementando la proporción de ácido acético y disminuyendo la de ácido propiónico. Este efecto, no se observó en pruebas de fermentación *in vitro* de corta duración (24 h), empleando inóculo de animales no adaptados al consumo de lúpulo, por lo que se deduce que es necesario un periodo de adaptación superior a las 24 h para que pueda manifestarse el efecto del consumo de flores de lúpulo sobre la fermentación en el rumen.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto CYCIT (AGL2010-19094) e Intramural CSIC (201240E105). C. Blanco es beneficiaria de un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo, M.L. Tejido de un contrato JAE-doc financiado por el CSIC bajo el programa 'Junta de Ampliación de Estudios' (CSIC- Fondo Social Europeo) y J.A. Cayetano de una beca CONACYT financiada por el Gobierno Federal de México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Canbas A, Erten H, Özşahin F. 2001. The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochem* 36, 1053-1058 • Flythe MD. 2009. The antimicrobial effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia-producing bacteria. *Lett Appl Microbiol* 48, 712-717 • Flythe MD, Aiken GE. 2010. Effects of hops (*Humulus lupulus* L.) extract on volatile fatty acid production by rumen bacteria. *J Appl Microbiol* 109, 1169-1176 • Goering MK, Van Soest PJ. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In 'Agricultural handbook, No. 379'. (Agricultural Research Services, USDA: Washington, DC) • MAGRAMA, 2012. Lúpulo. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/lupulo/\[15/04/2014](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/lupulo/[15/04/2014) • Narvaez N, Wang Y, Xu Z, McAllister T. 2011. Effects of hops on *in vitro* ruminal fermentation of diets varying in forage content. *Livest Sci* 138, 193-201 • Narvaez N, Wang Y, Xu Z, Alexander T, Garden S, McAllister T. 2012. Effects of hop varieties on ruminal fermentation and bacterial community in an artificial rumen (rusitec). *J Sci Food Agr* 93, 45-52 • Narvaez N, Wang Y, Mcallister T. 2013. Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations *in vitro*. *J Sci Food Agr* 93, 2517-2522 • Opsi F, Fortina R, Tassone S, Bodas R, López S. 2012. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different forage:concentrate ratio. *J Agr Sci* 150, 271-283 • Ottenstein DM, Bartley DA. 1971. Improved gas chromatography separation of free fatty acid C2-C5 in dilute solution. *Anal Chem* 43, 952-955 • Schmidt MA, Nelson ML, 2006. Effects of hop acids. I. *In vitro* ruminal fermentation. *J Anim Sci* 84 (Suppl. 1), 240 • Staerfl SM, Kreuzer M, Soliva, CR. 2010. *In vitro* screening of unconventional feeds and various natural supplements for their ruminal methane mitigation potential when included in a maize-silage based diet. *J Anim Feed Sci* 19, 651-664 • Wang Y, Chaves AV, Rigby FL, He ML, McAllister TA. 2010. Effects of hops on the shedding of *Escherichia coli*, rumen fermentation, growth and carcass traits of feedlot cattle. *Livest Sci* 129, 135-140 • Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39, 971-974.