

EFFECTO DEL ACEITE DE SOYA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS VACCENICO Y RUMÉNICO EN LECHE DE VACAS EN PASTOREO

EFFECT OF SOYBEAN OIL ON THE CONCENTRATION OF VACCENIC AND RUMENIC FATTY ACIDS IN GRAZING COW MILK

Rodolfo Vieyra-Alberto¹, Carlos M. Arriaga-Jordán², Ignacio A. Domínguez-Vara³,
José L. Bórquez-Gastelum³, Ernesto Morales-Almaráz^{3*}

¹Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; ³Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (emoralesa@uaemex.mx); ²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales. Universidad Autónoma del Estado de México. 50000. Instituto Literario 100, Toluca, Estado de México, México.

RESUMEN

El aceite de soya, rico en ácido linoleico, además del aporte de ácido linolénico mayoritario en el forraje, puede mejorar la producción de los ácidos grasos (AG) insaturados en la leche de vacas en pastoreo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de aceite de soya (0, 3 y 6 % BS), en dietas completas mezcladas parcial (pTMR) para seis vacas Holstein multíparas en pastoreo, sobre el desempeño productivo, producción, composición y perfil de AG, con énfasis en el contenido de AG vaccénico (AV) y ruménico (AR) en leche. El diseño experimental fue un cuadro latino repetido 3×3 con tres periodos experimentales de 21 d cada uno, y los tratamientos (T) fueron: T1=pTMR-0, T2=pTMR-3 y, T3=pTMR-6. Los datos se analizaron con el procedimiento MIXTO y polinomios ortogonales para los efectos lineal y cuadrático ($p \leq 0.05$). El consumo de TMR disminuyó linealmente ($p \leq 0.05$) al aumentar el contenido de aceite de soya en la dieta. La leche de las vacas con pTMR-6 y pTMR-3 tuvieron 20.8 y 7.6 % menor contenido de AG saturados comparada con pTMR-0 ($p \leq 0.05$), principalmente una disminución de los AG C12, C14 y C16. El AV aumentó 50.3 y 128.7 % en la leche de las vacas con pTMR-3 y pTMR-6, comparado con pTMR-0; el AR fue mayor ($p \leq 0.05$) en pTMR-3. En conclusión, la adición de 6 % de aceite de soya en la TMR de vacas Holstein en pastoreo, aumentó la eficiencia productiva, modificó la composición de la leche y aumentó el contenido de AV y AR.

Palabras clave: Aceite de soya, ácidos grasos, pastoreo, bovinos, leche, ácido linoleico conjugado.

ABSTRACT

Soybean oil is rich in linoleic acid, and—in addition to the contribution of major linolenic acid in fodder—can improve the production of unsaturated fatty acids (AG) in the milk of grazing cows. The objective of this study was to evaluate the effect of adding soybean oil (0, 3 and 6 % BS) in partial total mixed rations (pTMR) of six multiparous Holstein grazing cows on the AG performance, production, composition, and profile, with emphasis on the content of vaccenic (VA) and rumenic AG (RA) AG in milk. The experimental design was a 3×3 replicated Latin square with three 21 d experimental periods each one, with the following treatments (T): T1=pTMR-0, T2=pTMR-3, and T3=pTMR-6. The data were analyzed with the MIXED procedure and orthogonal polynomials to find out the linear and quadratic effects ($p \leq 0.05$). The TMR intake decreased linearly ($p \leq 0.05$) as the soybean oil content of the diet increased. Milk from cows with pTMR-6 and pTMR-3 had 20.8 and 7.6 % lower contents of saturated AG compared to pTMR-0 ($p \leq 0.05$): mainly a decrease in the C12, C14, and C16 AGs. VA increased 50.3 and 128.7 % in cow milk with pTMR-3 and pTMR-6, compared to pTMR-0; RA was higher ($p \leq 0.05$) in pTMR-3. In conclusion, adding 6 % soybean oil in the grazing Holstein cows' TMR increased the production efficiency, modified milk composition, and increased VA and RA contents.

Key words: Soybean oil, fatty acids, grazing, bovines, milk, conjugated linoleic acid.

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid (CLA) is the generic name for a series of positional isomers (7.9; 8.10; 9.11; 10.12; and 11.13) and geometric (*cis* or *trans*) isomers of linoleic acid (LA; C18: 2

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2016. Aprobado: noviembre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 299-313. 2017.

INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (CLA) es el nombre genérico para una serie de isómeros posicionales (7,9; 8,10; 9,11; 10,12 y 11,13) y geométricos (*cis* o *trans*) del ácido linoleico (AL; C18:2 c9c12) con dobles enlaces conjugados (Bauman *et al.*, 1999). El isómero mayoritario del CLA es el ácido ruménico (AR; C18:2 c9t11) que representa de 75 a 90 % del total de isómeros del CLA en la leche (Bauman *et al.*, 2006). El AR es un intermediario de la biohidrogenación ruminal del AL, de donde también deriva el ácido vaccénico (AV; C18:1 t11), el cual se usa como sustrato en la síntesis de *novo* en la glándula mamaria por acción de la enzima delta⁹ desaturasa para la producción de AR (Bauman *et al.*, 1999; Sun y Gibbs, 2012). El AR se asocia con la reducción de cáncer inducido y con la supresión de la aterosclerosis en animales de laboratorio (Ip *et al.*, 1999).

Un desafío de la investigación es incrementar esos ácidos grasos (AG) en la leche porque es el alimento más consumido en el mundo (FAO, 2015). Además, los productos lácteos son la principal fuente de CLA en la dieta humana y su concentración en esos productos está en función de la concentración de CLA en la grasa de la leche (Parodi, 1999).

Hay una relación positiva entre el consumo de forraje y el contenido de AG insaturados (AGI) en la leche, principalmente de AR y AV (Bargo *et al.*, 2006; Morales-Almaráz *et al.*, 2010; Castro-Hernández *et al.*, 2014). Además de cubrir parte de los requerimientos energéticos de las vacas, la inclusión de lípidos de origen vegetal en la dieta de las vacas incrementa la producción de CLA y su secreción en leche (Loor y Herbein, 2003). Chilliard *et al.* (2000) y Bauman *et al.* (1999) indican que la concentración de AR y AV en la grasa de la leche puede aumentar al suministrar aceite insaturado con alto contenido de LA. La naturaleza química de los lípidos insaturados suministrados también podría afectar el proceso de biohidrogenación (Loor y Herbein, 2003). La acumulación *in vitro* de AV y AR fue más baja cuando el AL enlazado al triglicérido fue el sustrato, comparado con el AG libre (Noble *et al.*, 1974). Según Huang *et al.* (2008), el suministro de aceite de soya al 5 % sobre base seca (BS) en la dieta de vacas en lactancia es más efectivo para aumentar el contenido de CLA en leche que un suplemento de CLA en la misma dieta. La adición de 5 % BS de aceite de soya a vacas

c9c12) with conjugated double bonds (Bauman *et al.*, 1999). CLA's major isomer is rumenic acid (RA; C18:2 c9t11) which represents 75-90 % of total CLA isomers in milk (Bauman *et al.*, 2006). The RA is an intermediary of LA ruminal biohydrogenation. Vaccenic acid (VA; C18:1 t11) is also derived from this process and is used as substrate for de *novo* synthesis in the mammary gland by means of the Delta⁹ desaturase to produce the RA (Bauman *et al.*, 1999; Sun and Gibbs, 2012). RA is associated with the reduction of induced cancer and the suppression of atherosclerosis in laboratory animals (Ip *et al.*, 1999).

A research challenge is to increase these fatty acids (AG) in milk, the most consumed food in the world (FAO, 2015). In addition, dairy products are the main source of CLA in the human diet and its concentration in these products is based on CLA concentration in milk fat (Parodi, 1999).

There is a positive relation between pasture intake and unsaturated AG (AGI) content in milk, mainly of RA and VA (Bargo *et al.*, 2006; Morales-Almaráz *et al.*, 2010; Castro-Hernández *et al.*, 2014). Including plant-derived lipids in the cows' diet does not only partially covers the energetic requirements of cows, but it also increases the production of CLA and its secretion in milk (Loor and Herbein, 2003). Chilliard *et al.* (2000) and Bauman *et al.* (1999) indicate that the concentration of RA and VA in milk fat can be increased by supplying unsaturated oil with high LA content. The chemical nature of the unsaturated lipids supplied could also affect the biohydrogenation process (Loor and Herbein, 2003). The VA and RA *in vitro* accumulation was lower when the LA bounded to the triglyceride was the substrate, compared to free AG (Noble *et al.*, 1974). According to Huang *et al.* (2008), in order to increase CLA content in milk, supplying 5 % soybean oil on a dry basis (BS) in the diet of lactating cows is more effective than supplementing the said diet with CLA. Adding 5 % soybean oil BS to Holstein cows in barns did neither affect the concentration of volatile AG in rumen, feed intake, and milk yield, nor of protein and lactose content in milk, but it did decrease the milk fat content (Huang *et al.*, 2008).

Adding lipids to the diet of dairy cows in barns was studied but there are few experiments (Rego *et al.*, 2005) about providing supplements rich in AGI as a strategy to improve the AG profile of grazing cows. Rego *et al.* (2005) report an AGI increase in

Holstein estabuladas no afectó la concentración de AG volátiles en rumen, el consumo de alimento, el rendimiento de leche, ni el contenido de proteína y de lactosa en leche, pero sí disminuyó el contenido de grasa en la leche (Huang *et al.*, 2008).

La adición de lípidos en la dieta con vacas lecheras estabuladas se ha estudiado, pero hay pocos experimentos (Rego *et al.*, 2005) acerca de proporcionar suplementos ricos de AGI como estrategia para mejorar el perfil de AG con vacas en pastoreo. Rego *et al.* (2005) reportan un incremento de AGI en la grasa de la leche y con un suplemento de 0.5 kg d⁻¹ de aceites vegetales aumenta 61 % el contenido de CLA en la leche de vacas en pastoreo sin reducir el rendimiento de leche. Según Schroeder *et al.* (2004), la inclusión de AGI en la dieta de vacas lecheras en pastoreo causa un efecto significativo sobre el contenido de grasa en leche. Por lo tanto, el objetivo de nuestro estudio fue adicionar niveles altos de aceite de soya, rico en AL, a vacas Holstein en pastoreo, con un aporte alto de ácido linoléico (ALN; C18:3 c9c12c15) en el forraje consumido, para evaluar la producción y secreción de AR y AV en leche de vacas Holstein.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el verano, junio-agosto de 2014, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, localizada en Cerrillo Piedras Blancas a 19° 24' 48" N y 99° 40' 45" O y a una altitud de 2632 m. La temperatura promedio de la época fue 15.7 °C, con una precipitación pluvial anual de 884.7 mm (SMN, 2014).

Animales, dieta y tratamientos

En este estudio se utilizaron seis vacas Holstein multiparas, con un peso vivo promedio de 602±45 kg, una producción diaria promedio de 23.0±2.9 kg de leche y 220±54 d en lactancia. Las vacas se distribuyeron aleatoriamente en un cuadro latino repetido 3×3 con tres periodos experimentales de 21 d cada uno, 16 d de adaptación y 5 d de medición. Las vacas se manejaron de acuerdo con el reglamento interno de bioética y bienestar de la Universidad con fundamento en las normativas oficiales (NOM-062-ZOO-1999; NOM-051-ZOO-1995). La alimentación de las vacas consistió en pastoreo (12 h) y el suministro, en el establo, de una TMR parcial (pTMR; Cuadro 1) formulada para cubrir los requerimientos de las vacas en lactancia (NRC, 2001).

milk fat, and that —with a 0.5 kg d⁻¹ vegetable oils supplement— the CLA content in the milk of grazing cows can be increased 61 % without reducing milk yield. According to Schroeder *et al.* (2004), including AGI in the diet of grazing dairy cows has a significant effect on milk fat content. Therefore, the objective of our study was to add high levels of soybean oil, high in AL content, to diet of grazing Holstein cows with a high content of linolenic acid (LAN; C18:3 c9c12c15) from pasture, in order to evaluate the production and secretion of RA and VA in milk of Holstein cows.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the summer of 2014 (June-August) at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Autónoma del Estado de México, located in Cerrillo Piedras Blancas, at 19° 24' 48" N and 99° 40' 45" W, and 2632 m altitude. The average summer temperature was 15.7 °C, with 884.7 mm average annual precipitation (SMN, 2014).

Animals, diet and treatments

Six multiparous Holstein cows were used in this study, with 602±45 kg average live weight, 23.0±2.9 kg of average daily milk production, and 220±54 lactation days. Cows were distributed randomly in a 3×3 repeated Latin square with three experimental periods of 21 d each: 16 d for adaptation, and 5 d for measurements. The cows were managed according to the University's internal bioethics and welfare regulations, which are based on official standards (NOM-062-ZOO-1999; NOM-051-ZOO-1995). The cow feeding consisted of grazing (12 h) and —in the barn— a partial TMR (pTMR; Table 1) formulated to meet the lactating cows' needs (NRC, 2001).

At the end of adaptation period, the following treatments were randomly assigned to the cows: 1) total mixed rations without soybean oil (pTMR-0); 2) total mixed rations with 3 % soybean oil (pTMR-3); and, 3) total mixed rations with 6 % soybean oil (pTMR-6).

Grazing was rotational in prairies, composed mainly of fescue (*Festuca arundinacea*), cocksfoot (*Dactylis glomerata*), perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*), and white clover (*Trifolium repens*), fertilized with 50 kg ha⁻¹ of urea every month.

In the barn, cows were kept in 3.50×4.50 m individual pens, equipped with food and water dispensers, with *ad libitum*

Cuadro 1. Ingredientes de las dietas TMR parcial.
Table 1. Partial TMR ingredients.

Ingredientes	Tratamientos [†] (g kg ⁻¹ MS)		
	pTMR-0	pTMR-3	pTMR-6
Ensilado de maíz	279.8	327.4	327.4
Heno de avena	315.5	267.9	267.9
Maíz molido	183.5	130.6	89.6
Harina de soya	159.1	133.9	133.9
Salvado de trigo	40.5	40.5	40.5
Canola	10.4	59.0	69.8
Aceite de soya	00.0	30.4	60.7
Carbonato de calcio	8.4	8.4	8.2
Premezcla de vitaminas y minerales [‡]	2.8	2.0	2.0

[†]pTMR-0: dieta completa mezclada sin aceite de soya; pTMR-3: dieta completa mezclada con 3 % de aceite de soya; pTMR-6: dieta completa mezclada con 6 % de aceite de soya. [‡]Multitec, lechero bovino[®]: vitamina A: 231 UI; vitamina D3: 58.5 UI; vitamina E: 566 mg; Cu 400 mg; Fe: 2,560 mg; Mn: 1,860 mg; Co: 5.85 mg; I 19.84 mg; Zn: 16 mg; Se: 12 mg; P: 38,220 mg; Mg: 39,959.92 mg; carbonato de Ca: 194 g; sal: 236.621 g; bicarbonato de Na: 150 g; Na: 1,851.60 mg; K: 2,439 mg. [§]pTMR-0: total mixed rations without soybean oil; pTMR-3: total mixed rations with 3 % soybean oil; pTMR-6: total mixed rations with 6 % soybean oil. [¶]Multitec, bovine dairy[®]: vitamin A: 231 IU; vitamin D3: 58.5 IU; vitamin E: 566 mg; Cu 400 mg; Fe: 2,560 mg; Mn: 1,860 mg; Co: 5.85 mg; I 19.84 mg; Zn: 16 mg; Se: 12 mg; P: 38,220 mg; Mg: 39,959.92 mg; calcium carbonate: 194 g; salt: 236.621g; sodium bicarbonate: 150 g; Na: 1,851.60 mg; K: 2,439 mg.

Al término del periodo de adaptación, los siguientes tratamientos se asignaron aleatoriamente a las vacas: 1) dieta completa mezclada sin aceite de soya (pTMR-0), 2) dieta completa mezclada con 3 % de aceite de soya (pTMR-3) y, 3) dieta completa mezclada con 6 % de aceite de soya (pTMR-6).

El pastoreo fue rotacional en praderas polifitas, compuestas principalmente por festuca (*Festuca arundinacea*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), ballico (*Lolium perenne*), pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), fertilizadas con 50 kg ha⁻¹ de urea cada mes.

En el establo, las vacas se alojaron en corrales (3.50×4.50 m) individuales provistos de comederos y bebederos, con disponibilidad *ad libitum* de agua. El ordeño fue automatizado a las 06:00 y 15:00 h.

Desarrollo del experimento

Las vacas permanecieron 12 h en la pradera (07:00-15:00 y 16:00-20:00 h), respetando el tiempo de ordeño. El resto del tiempo permanecieron en el establo, donde se suministró la pTMR a libre acceso según el tratamiento asignado.

Con un cerco eléctrico se asignaron 22 kg MS d⁻¹ por vaca en la pradera, dos terceras partes se ofrecieron entre ordeños y el resto después del ordeño de la tarde. La producción de forraje en la pradera se determinó cada día mediante el corte a ras de suelo

water available. The milking was automatized at 06:00 and 15:00 h.

Development of the experiment

The cows remained 12 h in prairies (07:00-15:00 and 16:00-20:00 h) respecting the milking time. The rest of the time the cows remained in the barn, where the pTMR was provided freely, according to the treatment assigned.

In the prairie enclosed with an electric fence, 22 kg MS d⁻¹ were assigned to each cow: two thirds were offered between milkings, and the rest, after the evening milking. Forage production in the prairie was determined every day by cutting 2 m² at ground level, randomly distributed at eight points. A 0.25 m² quadrant was used. Then, the sample was dried in a microwave oven, in order to determine MS (Teuber *et al.*, 2007).

Soybean oil was added every third day to the concentrate portion (cereals and oilseeds) used to prepare pTMR; this also helped to avoid rancidity. Corn silage was included in the concentrate one hour before the cows entered the barn.

Each cow's daily pTMR intake was measured by the offer-refuse difference. Pasture intake was estimated by the difference between the cow's net energy requirements (EN) for lactation (ENL, Mcal d⁻¹) minus the ENL consumed with the pTMR,

de 2 m² distribuidos aleatoriamente en ocho puntos y se usó un cuadrante de 0.25 m². Después se determinó la MS por secado de la muestra en horno de microondas (Teuber *et al.*, 2007).

El aceite de soya se agregó con la porción del concentrado (cereales y oleaginosas) para preparar la pTMR cada tercer día y evitar la rancidez. El ensilado de maíz se incluyó al concentrado una hora antes de que las vacas entraran al establo.

El consumo diario de pTMR se midió en cada vaca por diferencia de la oferta y el rechazo. El consumo de forraje se estimó por diferencia entre los requerimientos de energía neta (EN) para lactancia (ENL, Mcal d⁻¹) de la vaca menos la ENL consumida con la pTMR, según el método descrito por Macoon *et al.* (2003). La EN de lactancia de las pTMR se calculó con las ecuaciones descritas por Menke y Steingass (1988) a partir del contenido de fibra ácido detergente. Las necesidades de ENL se estimaron con las ecuaciones de predicción del NRC (2001) incluyendo los requerimientos de EN para lactancia, mantenimiento, cambio de peso corporal, actividad en el pastoreo y desplazamiento hacia o desde la pradera al establo. Al inicio y al final de la etapa de medición las vacas se pesaron después de la ordeña de la mañana.

En la etapa de medición de cada periodo, se muestreó en tres días consecutivos la pTMR de cada tratamiento al momento de ofrecerla, y el forraje de la pradera, según la técnica de pastoreo simulado descrita por Wayne (1964). Las muestras se conservaron en congelación (-4 °C) hasta su análisis.

Cada día se registró la producción de leche individual en ambos ordeños. La leche se muestreó en cada ordeño y se obtuvo una alícuota (100 mL) por vaca para análisis en el laboratorio.

Análisis de laboratorio

Las muestras de los alimentos (pTMR y forraje) se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C por 24 h, se molieron con malla de 2 mm y se determinó el contenido de materia seca y cenizas por pérdida de peso tras desecación de la muestra a 100±1 °C en estufa de aire forzado durante 24 h, seguida de la incineración en la mufla a 600 °C por 4 h. El contenido de proteína bruta se determinó por el método Kjeldahl y el contenido extracto etéreo (EE) se determinó según la AOAC (2012). El análisis de fibra detergente ácido (FDA), fibra detergente neutro (FDN) y lignina detergente ácido (LDA) se realizó con el método descrito por Van Soest *et al.* (1991).

El contenido de AG de los alimentos se determinó previa liofilización de las muestras (LABCONCO, Free Zone 2.5), mediante la técnica de Sukhija y Palmquist (1988), con modificaciones de Palmquist y Jenkins (2003), utilizando ácido clorhídrico metanólico al 10 % para la esterificación y hexano como solvente orgánico.

according to the method described by Macoon *et al.* (2003). The pTMR's lactation EN was calculated using the equations described by Menke and Steingass (1988), based on the acid detergent fiber content. ENL requirements were estimated using the NRC prediction equations (2001), including the EN requirements for lactation, maintenance, body weight change, grazing activity, and movement to or from the prairie to the barn. At the beginning and end of the measurement phase, the cows were weighed after the morning milking.

Three consecutive days during each period's measurement phase, the pTMR of each treatment (as well as the prairie forage) was sampled at the moment it was offered, following the simulated grazing technique described by Wayne (1964). The samples were frozen (at -4 °C) until they were analyzed.

Every day, individual milk production was recorded in both milkings. Milk was sampled at each milking and an aliquot (100 mL) per cow was obtained for analysis in the laboratory.

Laboratory analysis

Food samples (pTMR and fodder) were dried in a forced air oven at 60 °C during 24 h, and were subsequently ground using a 2 mm mesh. The content of dry matter and ashes was determined by weight loss after the sample was dried at 100±1 °C in a forced air oven during 24 h, followed by incineration in a muffle furnace at 600 °C during 4 h. The crude protein content was determined using the Kjeldahl method. The ether extract (EE) content was determined according to the AOAC (2012). The analysis of acid detergent fiber (FDA), neutral detergent fiber (FDN), and acid detergent lignin (LDA) was carried out using the method described by Van Soest *et al.* (1991).

The food's AG content was determined after the samples were freeze dried (LABCONCO, Free Zone 2.5) by means of the Sukhija and Palmquist technique (1988), as modified by Palmquist and Jenkins (2003), using methanolic hydrochloric acid at 10 % for esterification and hexane as organic solvent.

The fat, protein, and lactose content of the milk was determined with a Lactoscan analyzer (Milkotronic, LTD). For the analysis of AG in milk, fat was extracted by ultracentrifugation (Feng *et al.*, 2004); methylation was performed according to the methodology described by Christie (1982), with the modifications made by Chouinard *et al.* (1999).

The AG methyl esters of the food and milk were separated and quantified by gas chromatography (Perkin Elmer Clarus 500), with a 100 m×0.25 mm×0.2 μm capillary column (SUPELCO TM-2560); nitrogen was used as carrier gas. Both the detector and the injector were kept at 260 °C; the initial oven temperature was 140 °C during 5 min, and it was increased 4 °C per minute until it reached 240 °C. Each peak

El contenido de grasa, proteína y lactosa de la leche se determinó con un analizador Lactoscan (Milkotronic, LTD). Para el análisis de AG en leche se extrajo la grasa por ultracentrifugación (Feng *et al.*, 2004); la metilación se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Christie (1982), con modificaciones de Chouinard *et al.* (1999).

Los metil ésteres de los AG de alimentos y leche se separaron y cuantificaron por cromatografía de gases (Perkin Elmer Clarus 500), con una columna capilar de 100 m×0.25 mm×0.2 μm (SUPELCO TM-2560), utilizando nitrógeno como gas acarreador. Tanto el detector como el inyector se mantuvieron a 260 °C, la temperatura inicial del horno fue 140 °C por 5 min, aumentando 4 °C por minuto hasta llegar a 240 °C. Cada pico se identificó de acuerdo con los tiempos de retención de estándares de ésteres metílicos (Supelco 37 Component FAME Mix, trans-vaccenic acid y linoleic acid conjugated de SIGMA-ALDRICH). Los AG se registran en g 100 g⁻¹ del total de AG.

Análisis estadístico

La composición química de las pTMR fue analizada con el procedimiento GLM de SAS (1999). Los resultados de consumo de MS, producción, composición y perfil de AG en la leche se analizaron con el procedimiento MIXTO (SAS, 1999), promediados por vaca y periodo, de acuerdo con el modelo de cuadrado latino repetido 3×3:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + P_{(ij)} + A_{(i)k} + Tx_l + E_{ijkl}$$

donde Y_{ijkl} : es la respuesta de las variables; μ : la media general; C_i : el efecto aleatorio del i -ésimo cuadro (1, 2); $P_{(ij)}$: el efecto fijo del periodo (1, 2, 3); $A_{(i)k}$: el efecto aleatorio del animal (1, 2, 3); Tx_l : el efecto fijo del tratamiento (1, 2, 3); E_{ijkl} : el error residual.

La significancia fue $p \leq 0.05$. Además, se realizaron análisis de polinomios ortogonales para evaluar los efectos lineal y cuadrático para tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química y contenido de ácidos grasos de la dieta

El Cuadro 2 muestra la composición química y el contenido de AG de las pTMR y del forraje que consumieron las vacas. El contenido de EE fue 2.0 y 4.4 % mayor en las dietas pTMR-3 y pTMR-6 comparado con la pTMR-0, por la adición del aceite de

was identified according to the methyl ester standards retention times (Supelco 37 Component FAME Mix, trans-vaccenic acid and linoleic acid conjugated by SIGMA-LADRICH). AGs are recorded in g 100 g⁻¹ of the AG total.

Statistical analysis

The pTMR chemical composition was analyzed with SAS' GLM procedure (1999). The results of fed intake, and production, composition and AG profile in the milk were analyzed using the MIXED procedure (SAS, 1999), averaged per cow and period, according to the 3×3 replicated Latin square model:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + P_{(ij)} + A_{(i)k} + Tx_l + E_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} : is the response of the variables; μ : the overall mean; C_i : the random effect of i -th square (1, 2); $P_{(ij)}$: the fixed effect of the period (1, 2, 3); $A_{(i)k}$: the random effect of the animal (1, 2, 3); Tx_l : the fixed effect of the treatment (1, 2, 3); E_{ijkl} : the residual error.

The significance was $p \leq 0.05$. In addition, orthogonal polynomial analyses were carried out in order to evaluate the linear and quadratic effects of the treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition and fatty acids content of the diet

Table 2 shows the chemical composition and AG content of the pTMR and fodder consumed by the cows. The EE content was 2.0 and 4.4 % greater in pTMR-3 and pTMR-6 diets, compared to pTMR-0 (as a result of adding soybean oil). The LA and LAN acids represented 79 % of the total AG; LAN represented 53 % of the total AG of fresh fodder consumed by the cattle.

Feed intake, production, and chemical composition of milk

There was no difference ($p > 0.05$) in pasture intake (2.11 kg MS cow⁻¹ d⁻¹) (Table 3). Morales-Almaráz *et al.* (2010) report —on dairy cattle with 12 h access to pasture and a 39.7 kg MS d⁻¹ forage availability per cow— a pasture intake of 8.56 kg MS cow⁻¹ d⁻¹ when a corn silage-based TMR was

Cuadro 2. Composición química y contenido de ácidos grasos de las dietas experimentales y del forraje.
Table 2. Chemical composition and fatty acid content of experimental diets and fodder.

Componente	Forraje	Tratamientos [†]			EEM	Valor P
		pTMR-0	pTMR-3	pTMR-6		
Materia seca (MS), g kg ⁻¹	231.2	551.3 ^a	521.8 ^{ab}	497.6 ^b	9.778	0.023
Materia orgánica, g kg ⁻¹ MS	883.4	934.0	932.0	940.2	0.935	0.162
Proteína cruda, g kg ⁻¹ MS	173.6	139.0	150.1	149.1	2.984	0.072
Extracto etéreo, g kg ⁻¹ MS	30.1	39.5 ^c	60.0 ^b	83.9 ^a	4.563	0.001
Fibra neutro detergente, g kg ⁻¹ MS	481.3	378.3	358.2	365.6	17.13	0.715
Fibra ácido detergente, g kg ⁻¹ MS	254.1	219.4	207.4	210.2	12.04	0.769
Lignina ácido detergente, g kg ⁻¹ MS	25.1	28.2	30.3	31.0	3.127	0.817
Energía neta de lactancia (ENL), Mcal kg ⁻¹ MS [‡]	1.58	1.65	1.68	1.68	0.028	0.800
Ácidos grasos (g 100 g ⁻¹ AG)						
Laurico (C12)	0.72	0.40	0.36	0.12		
Tridecanoico (C13)	2.04	0.44	0.24	0.12		
Mirístico (C14)	0.55	0.50	1.17	0.27		
Palmítico (C16)	15.51	19.40	16.60	14.02		
Palmitoleico (C16:1 c9)	1.29	0.14	0.11	0.04		
Estearico (C18)	1.75	2.97	4.50	3.97		
Oleico (C18:1 c9)	3.05	28.11	25.90	24.33		
Linoleico (C18:2 c9c12)	10.67	40.15	42.60	48.58		
Linolenico (C18:3 c9c12c15)	53.01	4.07	6.02	6.53		
Otros	11.41	3.81	2.53	2.01		

[†]pTMR-0: dieta completa mezclada sin aceite de soya; pTMR-3: dieta completa mezclada con 3 % de aceite de soya; pTMR-6: dieta completa mezclada con 6 % de aceite de soya. [‡]Valor estimado por la ecuación propuesta por Menke y Steingass (1988). ENL=(9.07-0.0097*FAD (g kg⁻¹ MS). El resultado fue dividido entre 4.184 para obtener Mcal. [§]pTMR-0: total mixed rations without soybean oil; PTMR-3: total mixed rations with 3 % soybean oil; PTMR-6: total mixed rations with 6 % soybean oil. [¶]Value estimated using the equation proposed by Menke and Steingass (1988). ENL=(9.07-0.0097*FDA (g kg⁻¹ MS) The result was divided by 4.184 in order to obtain Mcal.

soya. Los ácidos AL y ALN representaron 79 % del total de AG; el ALN representó 53 % del total de los AG del forraje fresco consumido por el ganado.

Consumo de alimento, producción y composición química de la leche

No hubo diferencia ($p > 0.05$) en el consumo de forraje (2.11 kg MS vaca⁻¹ d⁻¹) (Cuadro 3). Morales-Almaráz *et al.* (2010) reportan en ganado lechero con 12 h de acceso a la pradera y una disponibilidad de forraje por vaca de 39.7 kg MS d⁻¹ un consumo de forraje de 8.56 kg MS vaca⁻¹ d⁻¹ ofreciendo *ad libitum* una TMR a base de ensilado de maíz en la estabulación. Castro-Hernández *et al.* (2014) reportan consumos de forraje de 3.36 y 4.63 kg MS vaca⁻¹ d⁻¹, al suministrar 4.5 y 2.7 kg MS de concentrado a base de cereales más ensilado de maíz *ad libitum* en estabulación cuando las vacas permane-

offerred *ad libitum* in the barn. Castro-Hernández *et al.* (2014) report 3.36 and 4.63 kg MS cow⁻¹ d⁻¹ pasture intake, when 4.5 and 2.7 kg MS of cereal-based concentrate plus corn silage were supplied *ad libitum* in the barn, and when the cows remained in the prairie 12 h with a forage allowance of 25 kg MS d⁻¹. In our research, the TMR supply to cows in the barn was not limited, and this decreased pasture intake in the prairie —even though they remained 12 h in the prairie with an allowance of 22 kg MS cow⁻¹ d⁻¹. Grazing dairy cows eat more forage in the prairie when the feed offered in the barn is restricted (Palladino *et al.*, 2014).

The pTMR and total MS intake decreased linearly ($p \leq 0.05$) when the soybean oil content in the diet increased. In our study, TMR intake had an inverse relation to the EE content in the diets. According to Chamberlain and Wilkinson (1996), including more than 6 % of unsaturated lipids in the diet may reduce

Cuadro 3. Consumo diario de alimento, producción y composición de la leche de vacas Holstein en pastoreo más un suplemento con pTMR con diferentes contenidos de aceite de soya.**Table 3. Daily feed intake, and milk production and composition of grazing Holstein cows plus a supplement of pTMR with different contents of soybean oil.**

	Tratamientos [†]			EEM [‡]	Efectos [§]	
	pTMR-0	pTMR-3	pTMR-6		L	Q
CMS ^b pTMR, kg d ⁻¹	15.44 ^a	15.11 ^{ab}	13.21 ^b	0.4668	0.0147	0.2206
CMS forraje, kg d ⁻¹ [‡]	1.94	2.01	2.39	0.6265	0.6272	0.8563
CMS total, kg d ⁻¹	17.38 ^a	17.12 ^a	15.60 ^b	0.3134	0.0069	0.1487
CMS, % peso vivo	2.87 ^a	2.79 ^a	2.58 ^b	0.0476	0.0049	0.3024
Eficiencia alimenticia	1.28 ^b	1.32 ^{ab}	1.38 ^a	0.0172	0.0050	0.7341
Producción de leche, kg d ⁻¹	22.22 ^{ab}	22.64 ^a	21.60 ^b	0.2559	0.0907	0.0219
Composición de la leche, g kg ⁻¹						
Grasa	38.51 ^a	36.89 ^a	30.10 ^b	0.5077	0.0001	0.0001
Proteína	29.14 ^a	29.06 ^a	28.81 ^b	0.0748	0.0021	0.3381
Lactosa	43.41	43.32	43.09	0.1093	0.0378	0.5854

^{ab} Valores medios en una hilera con distinta literal son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$) ($n=90$). [†]Tratamientos, pTMR-0: dieta completa mezclada sin aceite de soya; pTMR-3: dieta completa mezclada con 3 % de aceite de soya; pTMR-6: dieta completa mezclada con 6 % de aceite de soya. [‡]EEM: error estándar de la media. [§]Efectos, L: lineal; Q: cuadrático. ^bCMS: consumo de materia seca. [‡]Es-timado por diferencia entre los requerimientos de energía neta para lactancia (ENL) menos la ENL consumida con la pTMR (Macon *et al.*, 2003). [‡] ^{ab} Mean values in a row with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) ($n=90$). [†]Treatments, pTMR-0: total mixed rations without soybean oil; PTMR-3: total mixed rations with 3 % soybean oil; PTMR-6: total mixed rations with 6 % soybean oil. [‡]EEM: standard error of the mean. [§]Effects, L: linear; Q: Quadratic. ^bCMS: dry matter consumption. [‡]Estimated by difference between the net energy requirements for lactation (ENL) minus the ENL consumed with pTMR (Macon *et al.*, 2003).

cieron en la pradera 12 h con una asignación de forraje de 25 kg MS d⁻¹. En nuestra investigación no se limitó la oferta de TMR a las vacas en el establo, lo cual redujo el consumo de forraje en la pradera a pesar de permanecer 12 h allí con una asignación de 22 kg MS vaca⁻¹ d⁻¹. Las vacas lecheras en pastoreo aumentan el consumo de forraje en la pradera cuando se restringe el alimento ofertado en el establo (Palladino *et al.*, 2014).

El consumo de pTMR y la ingesta total de MS disminuyeron linealmente ($p \leq 0.05$) al aumentar el contenido de aceite de soya en la dieta. En nuestro estudio, el consumo de TMR tuvo una relación inversa con el contenido de EE en las dietas. Según Chamberlain y Wilkinson (1996), la inclusión de más de 6 % de lípidos insaturados en la dieta puede reducir la actividad microbiana en rumen y se reflejaría en un menor consumo de alimento y menor síntesis de grasa en la leche.

La eficiencia alimenticia (EA=kg leche vaca⁻¹ d⁻¹/consumo total MS d⁻¹) fue mayor para los tratamientos con aceite de soya. La producción de leche en pTMR-3 fue 1.9 y 4.8 % mayor ($p \leq 0.05$) que en pTMR-0 y pTMR-6 (Cuadro 3). Una unidad de

microbial activity in rumen and would be reflected in lower feed intake and lower fat synthesis in milk.

Feeding efficiency (FE=kg milk cow⁻¹ d⁻¹/MS total intake d⁻¹) was greater for soybean oil treatments. Milk production in pTMR-3 was 1.9 and 4.8 % higher ($p \leq 0.05$) than in pTMR-0 and pTMR-6 (Table 3). A production unit of grazing dairy cows can be more efficient when an additional source of lipids is included in their diet. Cows fed by grazing only showed an EA of 1.12 (Palladino *et al.*, 2014) and 0.95 when they received 6.3 kg of concentrate (Roca- Fernandez *et al.*, 2012), with a milk production of 22.7 and 22.6 kg d⁻¹.

The treatments had a quadratic effect ($p \leq 0.05$) on milk production and its fat and protein content; the lowest values were observed in pTMR-6. The diet's influence on fat content in milk depends on the fiber and lipid content (Bauman and Griinari, 2001). According to Veira *et al.* (2001), the content of fat (3.24 vs. 2.6 %) and protein (3.19 vs. 3.18 %) in milk decreased when 0 and 3 % soybean oil is provided. This could be explained because cellulolytic activity in rumen decreases when vegetable oil is consumed, therefore decreasing the production of acetate and the

producción de vacas lecheras en pastoreo puede ser más eficiente cuando se incluye una fuente de lípidos adicional en la dieta. Vacas alimentadas solo a base de pastoreo mostraron una EA de 1.12 (Palladino *et al.*, 2014) y de 0.95 al dar 6.3 kg de concentrado (Roca-Fernández *et al.*, 2012) con una producción de 22.7 y 22.6 kg leche d^{-1} .

Los tratamientos tuvieron un efecto cuadrático ($p \leq 0.05$) sobre la producción de leche y su contenido de grasa y proteína; los valores menores se observaron en pTMR-6. La influencia de la dieta sobre el contenido de grasa en la leche depende del contenido de fibra y de los lípidos presentes (Bauman y Griinari, 2001). Según Veira *et al.* (2001), el contenido de grasa (3.24 *vs.* 2.6%) y proteína (3.19 *vs.* 3.18%) disminuye en leche al proporcionar 0 y 3 % de aceite de soya. Esto podría explicarse porque la actividad celulolítica en rumen disminuye al consumir aceite vegetal, lo cual reduce la producción de acetato y la síntesis de AG de cadena corta en la glándula mamaria (Griinari *et al.*, 1998). Además, el consumo de aceites insaturados puede inhibir la síntesis de la grasa de la leche derivado de la producción de AG parcialmente hidrogenados, específicamente AG *trans* (Griinari *et al.*, 1998). Ambos mecanismos pudieron causar la disminución de grasa en leche.

El contenido de proteína en la leche de las vacas alimentadas con pTMR-6 fue menor, lo cual se puede deber al probable efecto negativo de los AGI sobre los microorganismos del rumen (Buccioni *et al.*, 2012). El exceso de estos ácidos en el rumen puede afectar la actividad de los microorganismos y así reducir la síntesis de proteína microbiana (Chamberlain y Wilkinson, 1996).

Perfil de ácidos grasos en leche

La inclusión de aceite de soya en la dieta de las vacas disminuyó linealmente ($p \leq 0.05$) la concentración de AG saturados (AGS) y con ello la relación AGS/AGI, debido principalmente al aumento del contenido de AG monoinsaturados (AGMI) y AG poliinsaturados (AGPI) en la leche (Cuadro 4). De acuerdo con Dewhurst *et al.* (2006), la inclusión de aceites vegetales en la dieta reduce los AG de cadena corta y media, y aumenta los AG de cadena larga, con una respuesta caracterizada por un cambio hacia C18 a expensas de C16, y una disminución en la proporción de AGS e incremento de AGMI y AGPI

synthesis of short-chain AG in the mammary gland (Griinari *et al.*, 1998). In addition, the consumption of unsaturated oils may inhibit the synthesis of milk fat, as a result of the production of partially hydrogenated AGs, specifically AG *trans* (Griinari *et al.*, 1998). Both mechanisms could have caused the reduction of milk fat.

The protein content in the milk of cows fed with pTMR-6 was lower, which may be due to the probable negative effect of AGI on rumen microorganisms (Buccioni *et al.*, 2012). The excess of these acids in the rumen can affect the activity of the microorganisms, therefore decreasing the synthesis of microbial protein (Chamberlain and Wilkinson, 1996).

Profile of milk fatty acids

Including soybean oil in the cow's diet linearly decreased ($p \leq 0.05$) the saturated AG (AGS) concentration, and therefore the AGS/AGI relation, mainly as a result of the increase of the monounsaturated AGs (AGMI) and polyunsaturated AGs (AGPI) content in milk (Table 4). According to Dewhurst *et al.* (2006), including vegetable oils in diet reduces short- and medium-chain AGs, and increases long-chain AGs, with a response set apart by a change towards C18 at the expense of C16, and a decrease in the AGS proportion and an increase of AGMI and AGPI in milk. Accordingly, cows fed with pTMR-6 and pTMR-3 produced milk with higher nutritional values, compared with pTMR-0, because they had 26.7 and 9.1 % less AGS. Ulbricht and Southgate (1991) suggest that humans should consume more AGMI and AGPI, and less AGS, in order to reduce coronary heart disease risks.

The content of short-chain (C4, C6, C8, C10) and medium-chain AGs (C11, C12, C13, C14, C15, C16, and C17) was lower in the milk of cows that were provided a diet with 6 % soybean oil. Meanwhile, the milk content of medium-chain AGs C12, C14 and C16 was reduced by 56.7, 43.2, and 18.2 %, with regard to the control treatment. The studies quoted in the review carried out by Martínez *et al.* (2013) show that short- and medium-chain AG content decreases in milk fat when oils are added to the ruminants' diet. In our study, adding soybean oil to the diet could have affected the total production of volatile AGs in the rumen; therefore, acetic acid was

Cuadro 4. Perfil de ácidos grasos de la leche de vacas Holstein en pastoreo más un suplemento de pTMR con diferentes niveles de aceite de soya.
Table 4. Fatty acid profile of the milk extracted from grazing Holstein cows plus a supplement of pTMR with different contents of soybean oil.

Ácidos grasos	Tratamientos [†]			EEM [¶]	Efectos [§]	
	pTMR-0	pTMR-3	pTMR-6		L	Q
C4	1.51 ^{ab}	1.94 ^a	1.14 ^b	0.1812	0.1642	0.0087
C6	2.25 ^a	2.25 ^a	1.02 ^b	0.1541	0.0001	0.0024
C8	1.34 ^a	1.20 ^a	0.50 ^b	0.0789	0.0001	0.00630
C10	2.90 ^a	2.35 ^b	1.02 ^c	0.1196	0.0001	0.0102
C11	0.29 ^a	0.22 ^b	0.08 ^c	0.0182	0.0001	0.1182
C12	3.15 ^a	2.23 ^b	1.38 ^c	0.1371	0.0001	0.8170
C13	0.12 ^a	0.09 ^b	0.06 ^c	0.0065	0.0001	0.5243
C14	11.45 ^a	9.72 ^b	6.61 ^c	0.2892	0.0001	0.0605
C14:1 c9	1.07 ^a	0.81 ^b	0.71 ^c	0.0264	0.0001	0.0218
C15	1.12 ^a	0.97 ^{ab}	0.82 ^b	0.0823	0.0147	0.9922
C16	28.40 ^a	25.25 ^b	22.97 ^c	0.5653	0.0001	0.5385
C16:1 c9	1.84 ^a	1.43 ^b	1.71 ^a	0.0473	0.0594	0.0001
C17	0.59 ^a	0.38 ^b	0.37 ^b	0.0255	0.0001	0.0035
C17:1 c10	0.14 ^a	0.10 ^b	0.12 ^{ba}	0.0091	0.0722	0.0160
C18:2 c9c12	0.17 ^c	0.34 ^b	0.48 ^a	0.0226	0.0001	0.5060
C18:2 c9t11	0.79 ^b	1.49 ^a	1.40 ^a	0.0628	0.0001	0.0001
C20	0.14 ^a	0.10 ^b	0.13 ^a	0.0082	0.4232	0.0032
C20:1 c11	0.22	0.11	0.10	0.0550	0.1336	0.4489
Otros	0.75 ^a	0.61 ^a	0.39 ^b	0.0626	0.0002	0.5940
Categoría ^b						
AGS	66.27 ^a	61.23 ^b	52.48 ^c	0.6810	0.0001	0.0293
AGMI	30.26 ^c	34.46 ^b	43.05 ^a	0.6172	0.0001	0.0053
AGPI	3.46 ^b	4.41 ^a	4.47 ^a	0.1078	0.0001	0.0013
AGS/AGI	2.00 ^a	1.62 ^b	1.12 ^c	0.0584	0.0001	0.4140

^{ab} Valores medios en un renglón con distinta literal son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$) ($n=18$). [†]Tratamientos, pTMR-0: dieta completa mezclada sin aceite de soya; pTMR-3: dieta completa mezclada con 3 % de aceite de soya; pTMR-6: dieta completa mezclada con 6 % de aceite de soya. [¶]EEM: error estándar de la media. [§]L: lineal; Q: cuadrático. ^bCategoría, AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; AGI: ácidos grasos insaturados. ^{ab} Mean values in a row with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) ($n=18$). [†]Treatments, pTMR-0: total mixed rations without soybean oil; PTMR-3: total mixed rations with 3 % soybean oil; PTMR-6: total mixed rations with 6 % soybean oil. [¶]EEM: standard error of the mean. [§]L: linear; Q: Quadratic. ^bCategory, AGS: saturated fatty acids; AGMI: monounsaturated fatty acids; AGPI: polyunsaturated fatty acids; AGI: unsaturated fatty acids.

en leche. En concordancia, las vacas alimentadas con pTMR-6 y pTMR-3 produjeron una leche nutricionalmente mejor porque tuvieron 26.7 y 9.1 % menos AGS, comparado con pTMR-0. Ulbricht y Southgate (1991) sugieren que los humanos deberían consumir más AGMI y AGPI, y menos AGS, para reducir el riesgo de enfermedad coronaria del corazón.

El contenido de AG de cadena corta (C4, C6, C8, C10) y media (C11, C12, C13, C14, C15, C16 y C17) fue menor en la leche de las vacas que consumieron la dieta con 6 % de aceite de soya. Cabe destacar que los AG de cadena media C12, C14 y C16 redujeron su contenido en leche 56.7,

reduced—which is the main substrate necessary for the de novo synthesis of short- and medium-chain AGS (Chilliard and Ferlay, 2004). A lower de novo synthesis can occur as a consequence of the inhibitory effect on the activities of the acetyl- CoA carboxylase and fatty acid synthetase enzymes (Martínez *et al.*, 2013)—as a result of the higher content of long-chain AG, absorbed in the small intestine, with greater flow and availability for the mammary gland. C14:1, C16:1 and C17:1 AGs experienced a quadratic effect ($p \leq 0.05$), while the C14:1 AG content decreased drastically with the pTMR-6 diet, and the C16:1 and C17:1 AGs increased. This may be the result of the

43.2 y 18.2 %, respecto al tratamiento testigo. Los estudios citados en la revisión realizada por Martínez *et al.* (2013) muestran que el contenido de AG de cadena corta y media disminuyen en la grasa de la leche cuando se adicionan aceites en la dieta de rumiantes. En nuestro estudio, la adición de aceite de soya en la dieta pudo afectar la producción total de AG volátiles en rumen; por lo tanto, pudo reducirse el ácido acético, el cual es el principal sustrato necesario para la síntesis de novo de AGs de cadena corta y media (Chilliard y Ferlay, 2004). Una menor síntesis de novo puede ocurrir por el efecto inhibitorio, debido al mayor contenido de AG de cadena larga, absorbidos en el intestino delgado, con mayor flujo y disponibilidad para la glándula mamaria, sobre las actividades de las enzimas acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa (Martínez *et al.*, 2013). Los AG C14:1, C16:1 y C17:1 fueron afectados de forma cuadrática ($p \leq 0.05$), mientras que el contenido del AG C14:1 disminuyó drásticamente con la dieta pTMR-6, y los AG C16:1 y C17:1 aumentaron, lo cual puede deberse a la actividad de las enzimas desaturasas en el organismo observada en algunos pares de AG (C14:1/C14; C16:1/C16; C18:1/C18, AR/AV) (Bauman y Griinari, 2001). Pero su índice de actividad depende de cada animal (Soyeurt *et al.*, 2008), así como de las características del suplemento o alimento (Shi-jun *et al.*, 2007).

La Figura 1 muestra los efectos lineal y cuadrático ($p \leq 0.05$) en el contenido de los AG esteárico y oleico en leche; en las dietas pTMR-3 y pTMR-6 el AG esteárico aumentó su concentración 13.8 y 26.1 %, comparado con la dieta pTMR-0; mientras que el AG oleico aumentó 14.3 y 40.6 %. El aumento

activity of desaturase in the organism, as observed in some AG pairs (C14:1/C14; C16:1/C16; C18:1/C18, RA/VA) (Bauman and Griinari, 2001). But their activity rate depends on each animal (Soyeurt *et al.*, 2008), as well as on the supplement or diet features (Shi-jun *et al.*, 2007).

Figure 1 shows the linear and quadratic effects ($p \leq 0.05$) on the content of stearic and oleic AGs in milk. In pTMR-3 and pTMR-6 diets, the concentration of stearic AG increased 13.8 and 26.1 %, compared to the pTMR-0 diet; meanwhile, oleic AG increased 14.3 and 40.6 %. The increase of stearic AG with the addition of soybean oil may be due to the action of rumen microorganisms, which saturate the AGIs of 18 carbons (Buccioni *et al.*, 2012); meanwhile, the increase of oleic AG may be associated with the action of the delta⁹ desaturase, which uses the stearic AG as a substrate for oleic AG synthesis (Griinari *et al.*, 2000).

The content of AG LAN in milk fat decreased slightly ($p \leq 0.05$), when the level of soybean oil in TMRs increased (Figure 2). The LAN levels in milk are lower than those reported by other authors who allowed the same prairie time (Castro-Hernández *et al.*, 2014; Morales-Almaraz *et al.*, 2010). Fresh forage is one of the major LAN sources, avoids the ruminal BH process, reaches the mammary gland, and goes into milk. In our study, the lower fresh forage intake by cows helps to explain its slightly lower content in milk. According to Huang *et al.* (2008), LAN is lower (0.24 *vs.* 0.30 g 100 g⁻¹ AG) in the milk of Holstein cows in barns with a diet that includes 5 % soybean oil, compared to the control group.

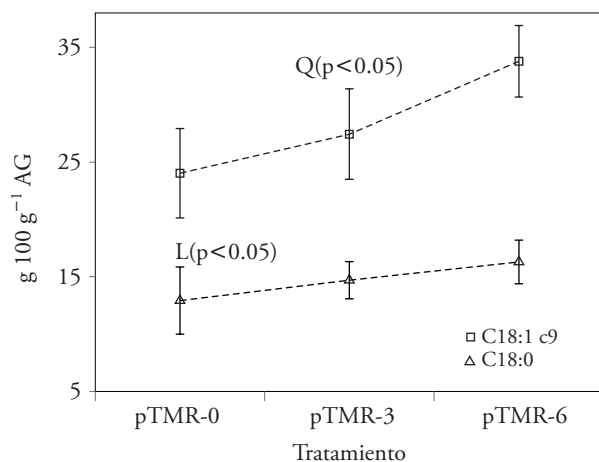


Figura 1. Efecto de la adición de aceite de soya en la dieta sobre el contenido de los ácidos grasos oleico (C18:1 c9) y esteárico (C18:0) en la grasa de la leche de vacas Holstein en pastoreo. L: Lineal, Q: cuadrático.

Figure 1. Effect of adding soybean oil to the diet on the content of oleic (C18:1 c9), and stearic (C18:0) fatty acids in the milk fat of grazing Holstein cows. L: Linear, Q: quadratic.

del AG esteárico con la adición de aceite de soya puede deberse a la acción de los microorganismos del rumen, los cuales saturan los AGI de 18 carbonos (Buccioni *et al.*, 2012); y el incremento del AG oleico puede estar asociado a la acción de la enzima delta⁹ desaturasa, la cual usa al AG esteárico como sustrato para síntesis al AG oleico (Griinari *et al.*, 2000).

El contenido de AG ALN disminuyó ($p \leq 0.05$) ligeramente en la grasa de la leche al aumentar el nivel de aceite de soya en las TMR (Figura 2). Los niveles de ALN en leche son menores a los reportados por otros autores al asignar el mismo tiempo de acceso a la pradera (Castro-Hernández *et al.*, 2014; Morales-Almaraz *et al.*, 2010). El forraje fresco es una de las mayores fuentes de ALN, evita el proceso de BH ruminal, llega a la glándula mamaria y se incorpora a la leche. En nuestro estudio, el menor consumo de forraje fresco en las vacas ayuda a explicar su ligero menor contenido en la leche. Según Huang *et al.* (2008), ALN es menor (0.24 vs. 0.30 g 100 g⁻¹ AG) en la leche de vacas Holstein estabuladas y cuya dieta incluyó 5 % de aceite de soya, en comparación con el testigo.

La inclusión de aceite de soya en la dieta aumentó ($p \leq 0.05$) AL en la grasa de la leche, lo cual puede deberse a su mayor aporte con el aceite de soya incluido en la dieta. Una respuesta similar se observó en otros estudios con la adición de aceite de soya en la dieta de vacas lecheras (Huang *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2005).

El AV es el mayor AG *trans* producido por la biohidrogenación de los AG AL y ALN (Bauman y Griinari, 2001). En nuestro estudio se mostró que un aumento del contenido de aceite de soya en la dieta, incrementó la concentración de AV en la leche

Including soybean oil in the diet increased ($p \leq 0.05$) LA in milk fat, which may be the result of its greater contribution. A similar response was observed in other studies in which soybean oil was added to the diet of dairy cows (Huang *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2005).

VA is the largest AG *trans* produced by the biohydrogenation of AG LA and LAN (Bauman and Griinari, 2001). In our research, we showed that augmenting the soybean oil content in the diet increased the VA concentration in milk ($p \leq 0.05$), which was 50.3 and 128.7 % higher in pTMR-3 and pTMR-6 compared to pTMR-0 (Figure 2). Sun and Gibbs (2012) conclude that providing cows with diets with high content of AGPI can inhibit the last phase of the biohydrogenation process in the rumen. Consequently, there would be a greater concentration of intermediate AGs and a greater flow of these to the small intestine, where they are absorbed and transported to the mammary gland, before they are excreted in the milk. An important aspect of VA content in cow's milk is that this acid is a precursor of RA synthesis in humans (Turpeinen *et al.*, 2002). Both VA and RA have been associated with the reduction of coronary heart disease and atherosclerosis risk in animal models, and probably in humans (Wang *et al.*, 2012). In our research, the RA content underwent a quadratic effect ($p \leq 0.05$) and we observed a higher content in the pTMR-3 diet (Figure 2). In contrast, the pTMR-6 treatment reduced the RA content in milk, which may be the result of a possible inhibition of delta9 desaturase activity by the AG C18:2 t10c12 —perhaps due to a lower expression of the gene responsible for this enzyme (Choi *et al.*, 2000). Likewise, the CLA's

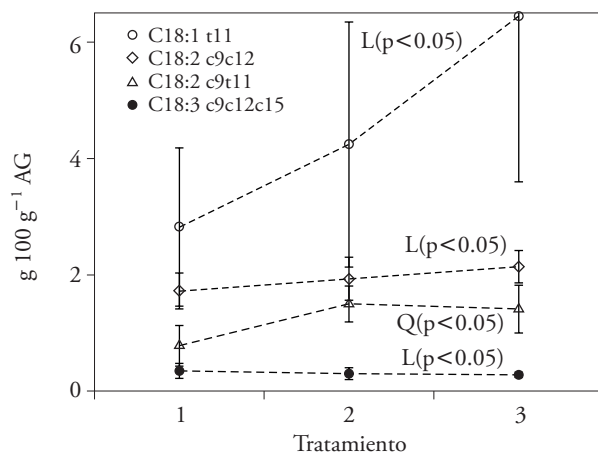


Figura 2. Efecto de la adición de aceite de soya en la dieta sobre el contenido de los ácidos grasos vaccínico (C18:1 t11), linoleico (C18:2 c9c12), ruménico (C18:2 c9t11) y linolénico (C18:3 c9c12c15) en la grasa de la leche de vacas Holstein en pastoreo. L: Lineal, Q: cuadrático.

Figure 2. Effect of adding soybean oil to the diet on the content of vaccinic (C18:1 t11), linoleic (C18:2 c9c12), rumenic (C18:2 c9t11), and linolenic (C18:3 c9c12c15) fatty acids in the milk fat of grazing Holstein cows. L: Linear, Q: quadratic.

($p \leq 0.05$) y fue 50.3 y 128.7 % mayor en pTMR-3 y pTMR-6, comparado con pTMR-0 (Figura 2). Sun y Gibbs (2012) concluyen que alimentar vacas con dietas alto contenido de AGPI puede inhibir la última fase del proceso de biohidrogenación en el rumen; en consecuencia, habría mayor concentración de AG intermediarios y un mayor flujo de estos hacia el intestino delgado donde se absorben y se transportan a la glándula mamaria para ser excretados en la leche. Un aspecto importante del contenido de AV en la leche de vacas es que este AG es un precursor de la síntesis del AR en humanos (Turpeinen *et al.*, 2002). Para AV y AR se asocian propiedades para reducir la enfermedad coronaria del corazón y el riesgo de la aterosclerosis en modelos animales, y probablemente en el humano (Wang *et al.*, 2012). En nuestro estudio el contenido de AR fue afectado de forma cuadrática ($p \leq 0.05$) y su mayor contenido se observó en la dieta pTMR-3 (Figura 2). En contraste, el tratamiento pTMR-6 redujo el contenido de AR en leche, lo cual puede deberse a una posible inhibición de la actividad de la enzima delta9 desaturasa por el AG C18:2 t10c12, tal vez debido a una menor expresión del gen responsable de esta enzima (Choi *et al.*, 2000). Asimismo, el isómero C18:2 t10c12 del CLA, proviene de la isomerización del AL, y se ha observado mayor contenido cuando la proporción de concentrado en la dieta es mayor que la de forraje (Bauman *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

El uso de 6 % de aceite de soya en una ración completa mezclada a vacas lecheras en pastoreo, con 12 h en la pradera y una asignación de forraje de 22 kg de MS, aumenta el contenido total de ácidos grasos insaturados en la leche y reduce el contenido de ácidos grasos saturados, principalmente, C12, C14 y C16, pero disminuye el contenido total de grasa y proteína de la leche. El contenido de ácido ruménico en leche es duplicado con la adición de aceite de soya en la ración y es independiente del porcentaje de aceite de soya añadido, mientras que el contenido de ácido vaccénico incrementó al agregar más aceite de soya.

LITERATURA CITADA

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC: International, USA. pp: 34-36.

C18:2 t10c12 isomer is the result of the isomerization of LA, and a higher content has been observed when the proportion of the concentrate in the diet is greater than the fodder's (Bauman *et al.*, 1999).

CONCLUSIONS

Using 6 % soybean oil in a total mixed ration for grazing dairy cows (with 12 h in the prairie and a forage allowance of 22 kg of MS) increases the total content of unsaturated fatty acids in milk and reduces the content of saturated fatty acids (mainly C12, C14 and C16), but decreases the total fat and protein content. The content of rumenic acid in milk is doubled when soybean oil is added to the ration and is independent of the percentage of soybean oil added, while the content of vaccenic acid increased as more soybean oil is included.

—End of the English version—



- Bargo F., J. E. Delahoy, G. F. Schroeder, L. H. Baumgard, and L. D. Muller. 2006. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131: 226-240.
- Bauman D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89: 1235-1243.
- Bauman D. E., and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome: Review. *Livest. Prod. Sci.* 70: 15-29.
- Bauman D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl., and J. M. Griinari. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. American Soc. Animal Sci.* pp: 1-15.
- Buccioni A, M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, and A. Cabiddu. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and bio hydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174: 1-25.
- Castro-Hernández H., F. F. González-Martínez, I. A. Domínguez-Vara, J. M. Pinos-Rodríguez, E. Morales-Almaráz, y R. Vieyra-Alberto. 2014. Efecto del nivel de concentrado sobre el perfil de ácidos grasos de la leche de vacas Holstein en pastoreo. *Agrociencia* 48: 765-775.
- Chamberlain A. T., and J. M. Wilkinson. 1996. Feeding the Dairy Cow. Chalcombe Publications, Lincoln, UK. 241 p.
- Chilliard Y, A. Ferlay, R. M. Mansbridge, and M. M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49: 181-205.
- Chilliard Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 467-492.

- Choi Y., Y. C. Kim, Y. B. Han, Y. Park, M. W. Pariza, and J. M. Ntambi. 2000. The *trans* 10, *cis* 12 isomer of conjugated linoleic acid down regulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 130: 1920-1924.
- Chouinard P. Y., C. Louise, D. M. Barbano, L. E. Metzger, and D. E. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129: 1579-1584.
- Christie W. W. 1982. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. *J. Lipid Res.* 23: 1072-1075.
- Dewhurst R. J., K. J. Shingfield, M. R. F. Lee, and N. D. Scollan. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131: 168-206.
- Feng S., A. L. Lock, and P. C. Garnsworthy. 2004. Technical note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *J. Dairy Sci.* 87: 3785-3788.
- Griinari J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta⁹-desaturase. *J. Nutr.* 130: 2285-2291.
- Griinari J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 1251-1261.
- Huang Y., J. P. Schoonmaker, B. J. Bradford, and D. C. Beitz. 2008. Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. *J. Dairy Sci.* 91: 260-270.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. J. Thompson, B. Barbano, and D. E. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butterfat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129: 2135-2142.
- Loor J. J., and J. H. Herbein. 2003. Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 103: 63-83.
- Macon B., E. Sollenberger, E. Moore, R. Staples, H. Fike, and M. Portier. 2003. Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. *J. Anim. Sci.* 81: 2357-2366.
- Martínez Marín A.L., M. Pérez Hernández, L. M. Pérez Alba, D. Carrión Pardo, G. Gómez Castro, and A. I. Garzón Sígler. 2013. Efecto de los aceites y semillas en dietas para rumiantes sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. *Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 4: 319-338.
- Menke H., and H. Steingass. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Morales-Almaráz E., A. Soldado, A. González, A. Martínez-Fernández, I. A. Domínguez-Vara, B. de la Rosa-Delgado, and F. Vicente. 2010. Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *J. Dairy Res.* 77: 225-230.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th Edn. National Academic Press, Washington, DC. USA. 292 p.
- Noble R. C., J. H. More, and C. G. Harfoot. 1974. Observations of the pattern of biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. *Br. J. Nutr.* 31: 99-108.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2015. *Leche y productos lácteos*. <http://www.fao.org> (Consulta: Marzo 2015).
- Palladino R. A., M. O'Donovan, and D. A. Kenny. 2014. Fatty acid intake and rumen fatty acid composition is affected by pre-grazing herbage mass and daily herbage allowance in Holstein dairy cows. *Spanish J. Agric. Res.* 12: 708-716.
- Palmquist D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fast and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81: 3250-3254.
- Parodi P. W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 82: 1339-1349.
- Rego O. A., H. J. D. Rosa, P. V. Portugal, T. Franco, C. M. Vouzela, A. E. S. Borba, and R. J. B. Bessa. 2005. The effects of supplementation with sunflower and soybean oils on the fatty acids profile of milk fat from grazing dairy cows. *Anim. Res.* 54: 17-24.
- Roca-Fernandez A. I., A. Gonzalez-Rodriguez, O. P. Vazquez-Yanez, and J. A. Fernandez-Casado. 2012. Effect of forage source (grazing *vs.* silage) on conjugated linoleic acid content in milk fat of Holstein-Friesian dairy cows from Galicia (NW Spain). *Spanish J. Agric. Res.* 10: 116-122.
- Schroeder G. F., G. A. Gagliostro, F. Bargo, J. E. Delahoy, and L. D. Muller. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest. Prod. Sci.* 86: 1-18.
- Shi-jun L., W. Jia-qi, B. Deng-pan, W. Hong-yang, Z. Ling-yun, and L. Qiu-jiang. 2007. The effect of dietary vegetable oilseeds supplement on fatty acid profiles in milk fat from lactating dairy cows. *Agric. Sci. China* 6: 1002-1008.
- SMN (Sistema Meteorológico Nacional). 2014. *Temperatura y precipitación*. www.smn.conagua.gob.mx (Consulta: Noviembre 2014).
- Soyeurt H., F. Dehareng, P. Mayeres, C. Bertozzi, N. Gengler. 2008. Variation of Δ^9 -desaturase activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91: 3211-3224.
- SAS Institute, Inc. 1999. *SAS/STATTM User's Guide*. Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA. 315 p.
- Sukhija P. S., and D. L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agr. Food Chem.* 36: 1202-1206.
- Sun X. Q., and Gibbs. 2012. Diurnal variation in fatty acid profiles in rumen digesta from dairy cows grazing high-quality pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 177: 152-160.
- Teuber K. N., O. Balocchi L., and J. Parga M. 2007. *Manejo del Pastoreo*. Imprenta America. Chile. 129 p.
- Turpeinen A. M., M. Mutanen, A. Aro, I. Salminen, S. Basu, D. L. Palmquist, and J. M. Griinari. 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 504-10.
- Ulbricht T. L. V. and D. A. T. Southgate. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet* 338: 985-992.
- Van Soest P. J., J. B. Roberson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3897.

- Veira D. M., L. L. Charmley, E. Charmley, and A. J. Lee. 2001. The effect of feeding soybean oil to mid lactation dairy cows on milk production and composition and on diet digestion. *Can. J. Anim. Sci.* 81: 425-428.
- Wang Y., M. M. Jacome-Sosa, and S. D. Proctor. 2012. The role of ruminant *trans* fat as a potential nutraceutical in the prevention of cardiovascular disease. *Food Res. Int.* 46: 460-468.
- Wayne C. C. 1964. Symposium on nutrition of forages and pastures: Collecting samples representative of ingested material of grazing animals for nutritional studies. *J. Anim. Sci.* 23: 265-270.