

TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la producción bovina
lechera en la IX y X Región (Chile).
Desarrollo estratégico de la producción
láctea con alto contenido en ácido linoleico
conjugado (CLA)**



Juan Pablo Avilez Ruiz

Diciembre de 2012

TITULO: *Caracterización de la producción bovina lechera en la IX y X Región (Chile). Desarrollo estratégico de la producción láctea con alto contenido en ácido linoleico conjugado (CLA)*

AUTOR: *Juan Pablo Avilez Ruiz*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



Universidad de Sevilla

Departamento de Ciencias Agroforestales



Universidad de Córdoba

Departamento de Producción Animal

**“Caracterización de la producción bovina lechera en la
IX y X Región (Chile). Desarrollo estratégico de la
producción láctea con alto contenido en ácido linoleico
conjugado (CLA)”**

TESIS DOCTORAL

Juan Pablo Avilez Ruiz

Universidad Católica de Temuco (Chile)

Directores:

Dr. Manuel Delgado Pertíñez (Universidad de Sevilla)

Dr. Antón García Martínez (Universidad de Córdoba)

Diciembre de 2012



Universidad de Sevilla

Departamento de Ciencias Agroforestales



Universidad de Córdoba

Departamento de Producción Animal

Caracterización de la producción bovina lechera en la IX y X Región (Chile). Desarrollo estratégico de la producción láctea con alto contenido en ácido linoleico conjugado (CLA)

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, presentada por el Licenciado en Medicina Veterinaria D. Juan Pablo Avilez Ruiz

El Doctorando

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a large, loopy oval shape.

Fdo.: Juan Pablo Avilez Ruiz



Universidad de Sevilla

Departamento de Ciencias Agroforestales



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Universidad de Córdoba

Departamento de Producción Animal

Manuel Delgado Pertíñez, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Sevilla y **Antón García Martínez**, Profesor Titular del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN:

Que la Tesis titulada “**Caracterización de la producción bovina lechera en la IX y X Región (Chile). Desarrollo estratégico de la producción láctea con alto contenido en ácido linoléico conjugado (CLA)**”, que se recoge en la siguiente memoria y de la que es autor D. JUAN PABLO AVILEZ RUIZ, ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los años 2008, 2009, 2010 y 2011; y cumple las condiciones académicas exigidas por la Legislación vigente para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente informe en Sevilla 22 de octubre de 2012.

Fdo.: Prof. Dr. Manuel Delgado Pertíñez

Fdo.: Prof. Dr. Antón García Martínez



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización de la producción bovina lechera en la IX y X Región (Chile). Desarrollo estratégico de la producción láctea con alto contenido en ácido linoléico conjugado (CLA).

DOCTORANDO/A: JUAN PABLO AVILEZ RUIZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante su formación como estudiante de doctorado (años 2008, 2009, 2010 y 2011), se ha familiarizado con diversas técnicas de análisis laboratorial (composición química alimentos, composición de ácidos grasos (AG) mediante cromatografía de gases, etc.), paquetes de análisis estadístico (como SPSS) y realizar búsquedas bibliográficas en bases de datos internacionales. Todo de ello unido a su capacidad de aprendizaje demostrados durante estos años, hacen que sea, desde nuestro punto de vista, un candidato idóneo para la defensa de la presente Tesis Doctoral, cuyo resultados y conclusiones resumidos son: Los mayores niveles de CLA se obtuvieron en leche cruda procedente de Osorno con sistemas de alimentación a base de pastoreo con valores medios de 1,72 g/100 g total AG y niveles bajos de CLA de 0.42 g/100 g total AG se observó en Los Ángeles. Los productos lácteos como queso y mantequilla presentaron niveles de CLA de 0.88 g/100 g y 1.50 g/100 g de total de AG, respectivamente. Por otro lado en la Región de los Lagos, a la dieta base pradera se adiciono suplementación con soja y raps canola, no encontrándose aumentos de los niveles de CLA.

La presente Tesis ha dado lugar a los siguientes trabajos y publicaciones:

Juan Pablo Avilez, Paul Escobar, Gabrielle von Fabeck, Karen Villagran, Fernando García, Roberto Matamoros y Antón García Martínez, 2010. Caracterización productiva de explotaciones lecheras empleando metodología de análisis multivariado. Revista Científica, FCV-LUZ (2010), Vol. XX, Nº 1, 74-80.

Juan Pablo Aviléz, Paul Escobar, Cristian Diaz, Gabrielle von Fabeck, Roberto Matamoros, Fernando García, Marcelo Alonzo, Manuel Delgado-Pertíñez, 2012. Effect of extruded whole soybean dietary concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Jersey cows under pasture conditions. Spanish Journal of Agricultural Research 2012 10(2), 409-418.

Juan Pablo Avilez, Bárbara Uribe, Gabrielle von Fabeck, Fernando Garcia, Marcelo Alonzo. Manuel Delgado-Pertíñez. Effect of rape seed (Brassica napus) dietary concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Frison Negra Chilena cows under pasture conditions. Spanish Journal of Agricultural Research. Trabajo enviado para su publicación.

Juan Pablo Aviléz, Paul Escobar, Cristian Diaz, Gabrielle von Fabeck, Roberto Matamoros, Fernando García, Marcelo Alonzo, Manuel Delgado-Pertíñez. Conjugated linoleic acid content of commercial dairy products in Chile and effect of processing methods. Food chemistry. Trabajo enviado para su publicación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 22 de octubre de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: MANUEL DELGADO PERTÍÑEZ

Fdo.: ANTÓN R. GARCÍA MARTÍNEZ

Los trabajos experimentales que conforman la presente Tesis Doctoral han sido financiados por la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (CONICYT) y la empresa NESTLE S.A-Chile, a través del Proyecto FONDEF N° D02I1135 titulado “Desarrollo de productos con alto contenido de principios activos funcionales a partir de leche bovina y sus derivados”.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a Dios por darme siempre la fuerza interna, agradecer a mi familia por su constante apoyo, gracias Pame, Pablito, Monse y Amananda, esto es dedicado a Uds; mis más grandes amores.

Agradezco a mi Universidad en su conjunto; autoridades superiores, de Facultad y de Escuela, a colegas y amigos por su paciencia y constante apoyo.

Agradezco a Antón Garcia y José Perea que fueron los que me recibieron en un comienzo en Córdoba, ciudad hermosa y rica en historia.

Gracias especiales a ti, querido Manuel Delgado por tu paciencia, dedicación y gran amistad, que Dios bendiga y mantenga en ti la gran persona que eres.

Este trabajo doctoral fue obra de un proyecto FONDEF del gobierno de Chile "FONDEF D02I-1135, "Desarrollo de productos con alto contenido de principios activos funcionales a partir de leche bovina y sus derivados"; donde doy gracias a los colegas que trabajaron junto a mí en el proyecto y también un especial reconocimiento a mis estudiantes tesisistas de pregrado que nos apoyaron siempre.

ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
SUMMARY	10
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. OBJETIVOS	15
CAPITULO I. I.1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	17
CAPITULO I. I.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	20
I.2.1. Ácido linóleico conjugado	20
I.2.2. Factores que afectan la concentración de CLA en leche	21
I.2.3. La alimentación como factor determinante de la cantidad de CLA	23
I.2.4. Acido linoleico conjugado en productos lácteos	25
I.2.5. Sistemas productivos lecheros en Chile	27
I.2.6. Referencias	28
CAPITULO I. I.3. OBJETIVOS	34
CAPÍTULO II. Caracterización de la producción bovina lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile	35
II.1. INTRODUCCIÓN	37
II.2.MATERIAL Y MÉTODO	38
II.2.1.Selección de la muestra y diseño del instrumento de recolección de datos	38
II.2.2. Análisis estadísticos	39
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
II.3.1. Características de los sistemas lecheros	40
II.3.2. Análisis Multivariado	40
II.3.2.1. Análisis de correspondencia entre producción total de leche y educación del propietario	40

	<u>Página</u>
II.3.2.2. Análisis de correspondencia entre educación del ordeñador y producción total de leche	41
II.3.2.3. Análisis de correspondencia entre N° de ordeños diarios y producción total de leche	42
II.3.2.4. Análisis de correspondencia entre terapia de secado y producción total de leche	43
II.3.2.5. Análisis de correspondencia entre producción total de leche y sistema de enfriamiento	44
II.3.2.6. Análisis de correspondencia entre registros reproductivos y producción total de leche	45
II.3.2.7. Análisis de correspondencia entre mastitis y tiempo como lechero	46
II.4. REFERENCIAS	48
CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de ácido linoleico conjugado en alimentos lácteos en Chile. efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos	53
III.1. INTRODUCCIÓN	55
III.2.MATERIAL Y MÉTODO	58
III. 2.1. Muestras experimentales	58
III. 2.2. Contenido de CLA y sus isómeros	59
III.2.3. Análisis estadísticos	59
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
III.3.1. Contenido de CLA en los productos lácteos	60
III.3.2. Transferencia en el contenido de CLA en productos lácteos	65
III.4. REFERENCIAS	70

	<u>Página</u>
CAPÍTULO IV. Estrategias de mejora del contenido en ácido linoléico conjugado en leche en sistemas bovinos a base de pastoreo mediante el empleo de semillas oleaginosas (soja y canola)	77
IV.1. INTRODUCCIÓN	79
IV.2.MATERIAL Y MÉTODO	81
IV. 2.1. Animales y dietas con soja	81
IV. 2.2. Animales y dietas con raps canola	82
IV. 2.3. Análisis de los alimentos	88
IV. 2.4. Producción y composición química de la leche	88
IV. 2.5. Análisis de isómeros de CLA en la leche	89
IV. 2.6. Perfil metabólico	90
IV. 2.7. Análisis estadístico	90
IV.3. RESULTADOS	92
IV. 3.1. Resultados del ensayo con soja	92
IV. 3.1.1. Producción y calidad básica de la leche	92
IV. 3.1.2. Contenido y composición de CLA en la leche	92
IV. 3.1.3. Perfil metabólico	93
IV. 3.2. Resultados con los ensayos con Raps Canola	97
IV.3.2.1.Producción y calidad de leche	97
IV.3.2.2. Contenido y composición de CLA en la leche	97
IV.3.2.3. Perfil metabólico	98
IV. 4. DISCUSIÓN	102
IV.4.1. Producción y calidad de leche	102
IV.4.2. Contenido y composición de CLA en la leche	104
IV.4.3. Perfil metabólico	106
IV.5. REFERENCIAS	107
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	113
ANEXO- PUBLICACIONES	119

INDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla III. 1. Contenido de ácido linoleico conjugado (CLA, g/100 g de ácidos grasos en leche cruda y en productos lácteos	62
Tabla III.2. Contenidos de ácido linoléico conjugado (CLA) en productos lácteos fabricados a partir de leche líquida de vaca durante el período experimental de 2006	67
Tabla III.3. Contenidos de ácido linoléico conjugado (CLA, g/100 g ácidos grasos) en productos lácteos fabricados a partir de leche líquida de vaca durante los meses de muestreo en el período experimental de 2006	68
Tabla IV.1. Ingredientes y composición química de los concentrados en las dietas con soja	82
Tabla IV.2. Ingredientes y composición química de los concentrados suplementados y del forraje en el experimento 1 con Raps canola	85
Tabla IV.3. Ingredientes y composición química de los concentrados suplementados y del forraje en el experimento 2 con Raps canola	86
Tabla IV.4. Ingredientes y composición química de los concentrados suplementados y del forraje en el experimento 3 con Raps canola	87
Tabla IV.5. Composición nutricional del pasto en el ensayo con soja	89
Tabla IV.6. Producción y composición química (media ± S.E.) de la leche de vacas Jersey suplementadas con soja	94
Tabla IV.7. Perfiles metabólicos de las vacas al inicio y al final del ensayo con soja	95
Tabla IV.8. Efecto de la suplementación con canola (<i>Brassica napus</i>) sobre la producción y composición química de la leche en cada uno de los experimentos	99
Tabla IV.9. Perfiles metabólicos de las vacas Frison Negro Chileno al inicio y al final del ensayo con raps canola	100

INDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura II.1. Análisis de correspondencia de producción total de leche y nivel de educación del productor	41
Figura II.2. Gráfico de contingencia de educación del ordeñador y producción total de leche	42
Figura II.3. Análisis de correspondencia de número de ordeños diarios y producción total de leche	43
Figura II.4. Gráfico de contingencia de terapia de secado y producción total de leche	44
Figura II.5. Análisis de correspondencia de producción total de leche y sistema de enfriamiento	45
Figura II.6. Análisis de correspondencia de registros reproductivos y producción total de leche	46
Figura II.7. Análisis de correspondencias de mastitis y tiempo como lechero	47
Figure III.1. Contenidos de ácido linoléico conjugado total (CLA, g/100 g AG) en productos lácteos fabricados a partir de leche líquida de vaca durante los meses de muestreo en el período experimental de 2006	69
Figura IV.1. Representación en el tiempo del contenido de isómeros del ácido linoléico conjugado (CLA) (g/100g ácidos grasos totales) en leche de vacas Jersey suplementadas con concentrados con diferentes cantidades de soja	96
Figura IV.2. Representación en el tiempo del contenido de ácido linoléico conjugado total (CLA) (g/100g ácidos grasos totales) en leche de vacas Frison Negro Chileno suplementadas con concentrados con diferentes cantidades de canola	101

RESUMEN

RESUMEN

ANTECEDENTES. La leche de vaca se produce bajo diferentes sistemas de producción en Chile. Por un lado en la zona norte los sistemas son del tipo intensivo, en la zona centro sur las lecherías se ubican en el valle regado y en la zona sur, donde se concentra el mayor porcentaje de lecherías del país, los sistemas productivos están basados en el pastoreo. La producción de leche es considerada un rubro económico importante para estas regiones, el cual proporciona mano de obra estacional y permanente y es un polo de desarrollo para las mismas. Por otro lado, con la importancia que tiene la alimentación a base de praderas, sobre todo en la producción de ácidos grasos de gran impacto en salud pública como es el caso de CLA, es por lo que entre los años 2005–2008 se desarrolló el proyecto de investigación y desarrollo titulado “Desarrollo de productos con alto contenido en principios activos funcionales a partir de leche bovina y sus derivados” (Código FONDEF DO2I1135).

OBJETIVOS. El objetivo general de la presente Tesis ha sido la caracterización de la producción bovina lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile y el desarrollo estratégico de la producción láctea con alto contenido en CLA. Los objetivos específicos han sido los siguientes:

- A. Caracterizar las explotaciones o predios de la IX Región de Chile, de acuerdo a su sistema de alimentación, como región con un sistema de producción intermediario entre la VIII y la X Región.
- B. Estudiar el contenido de CLA total y de sus isómeros en leche fresca y en productos lácteos (leche en polvo, leche condensada, queso y mantequilla). Con respecto a la leche recepcionada en planta, el estudio se hace en dos regiones con sistemas de producción bovinos lecheros importantes en Chile y diferenciados principalmente por el tipo de alimentación de los animales: sistemas basados en el pastoreo (X Región de los Lagos) y sistemas con mayor estabulación y basados en raciones TMR (VIII Región del Bio-Bio).
- C. Determinar el efecto sobre el contenido en CLA del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos (leche en polvo y leche condensada).
- D. Evaluar el efecto de dietas con soya (0.5 and 1.0 kg d⁻¹) en vacas con alimentación base a de pastos, en la producción y calidad nutricional de la leche, especialmente sobre la cantidad de CLA total y sus isómeros.

RESUMEN

- E. Evaluar el efecto de dietas con grano entero, molido y grano entero agregado en el concentrado de raps canola en vacas con alimentación base a de pastos, en la producción y calidad nutricional de la leche, especialmente sobre la cantidad de CLA total y sus isómeros.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES OBJETIVO A. Se encuestaron 24 fincas lecheras: 11 consideradas pequeñas, 7 medianas y 6 grandes productores lecheros. Los resultados generales muestran que los productores grandes tienen mayor superficie de hectáreas dedicadas a la lechería, mayor número de días de lactancias de sus vacas y una producción promedio de 14 L vaca día⁻¹, en comparación con 9 L vaca día⁻¹ de los medianos y pequeños productores. Por otro lado, el análisis multivariado de correspondencia simple muestra asociación entre el nivel educacional de los productores y la cantidad de leche producida. Es así que los productores grandes poseen un título profesional de nivel superior técnico o de ingeniero. Así mismo, el nivel de escolaridad de los ordeñadores es básico completo para los productores grandes y básico completo e incompleto para los pequeños y medianos productores. Los productores que realizan dos ordeños/día tienen mayor producción total de leche, y la terapia de secado se lleva a cabo más en productores grandes y medianos que en los pequeños. El uso de estanque de frío es de uso permanente en los productores con mayor volumen productivo. Finalmente, los grandes productores usan registros reproductivos asociándose esto a sus altas producciones. En el aspecto sanitario se observa que los productores con mayor antigüedad en el rubro lechero tienen menos problemas de mastitis en su rebaño.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES OBJETIVOS B Y C. Se han tomado muestras de leche cruda durante el año 2004 (verano, n=18; otoño, n=18; primavera, n=18) de la planta NESTLÉ de dos regiones de Chile, con sistemas de producción bovinos lecheros diferenciados principalmente por el tipo de alimentación de los animales: sistemas basados en el pastoreo (zona de Osorno; X Región) y sistemas con mayor estabulación y basados en ración mezcla total (RMT) (zona de los Ángeles; VIII Región). Durante los años 2003, 2004 y 2005, se tomaron muestras de leche condensada en la zona de Osorno (n=48) y de leche en polvo en la zona de Los Ángeles (n=48). De supermercados se tomaron muestras de mantequillas (n=14) y quesos Gouda

RESUMEN

(n=14) más consumidos en Chile. Por otro lado, durante el año 2006 se tomaron muestras de leche de la planta NESTLÉ (n= 90) en las zonas de Osorno y Los Ángeles y paralelamente se tomaron muestras de los productos procesados de la leche cruda, leche en polvo (elaborada en la planta de Osorno, n=30) y leche condensada (elaborada en la planta de Los Ángeles, n= 30). Los contenidos de los isómeros CLA (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *cis*-12) fueron determinados en muestras de leche fresca y productos lácteos. Mayores niveles de CLA se han obtenido en leche cruda procedente de sectores con sistemas de alimentación a base de pastoreo en comparación con sectores con sistemas más estabulados y basados RMT, con valores medios entre 1.72 g/100 g total FA de la leche de primavera de la zona de Osorno y 0.42 g de la leche de verano de la zona de Los Ángeles. Los productos lácteos han presentado contenidos significativamente mayores de CLA total que la leche cruda, con promedios muy variados que van desde 0.88 g/100 g of total FA en queso hasta 1.50 g en mantequilla, 1.49 g en leche condensada y 1.97 g en leche en polvo. El isómero *cis*-9, *trans*-11 representa un 53% del CLA total, y se encuentra en un rango que va de 0.26 g/100 g of total FA en el silo de leche de verano en la zona de los Ángeles y un máximo de 1.26 g en mantequilla en la zona de Osorno. Las cantidades de los isómeros *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12 han sido superiores a las señaladas en la literatura. El procesado ha afectado significativamente el traspaso de CLA de leche fresca a producto (leche condensada y leche el polvo). Tanto para el CLA total como para sus isómeros, la leche condensada presentó en la mayoría de los meses menores valores que la leche líquida original y la leche en polvo. En cambio, la leche en polvo presentó valores cercanos o superiores a los de la leche líquida. En conclusión, si bien el consumo de productos lácteos en Chile es más bajo que el de otros países más consumidores de estos productos, la alta cantidad de CLA de los productos estudiados en el presente trabajo, garantizan adecuados niveles para la salud humana. Además, es necesario más investigación para dilucidar el efecto de las condiciones de procesamiento y almacenamiento de la leche y productos lácteos sobre el contenido del CLA.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES OBJETIVO D. 21 vacas Jersey fueron divididas al azar en 3 grupos de 7 animales cada uno. Los animales fueron suplementados con un concentrado (5 kg d⁻¹) y a cada grupo se le

RESUMEN

asignó uno de los tres siguientes tratamientos: control sin soja (0-SB), con 0.5 kg d⁻¹ de soja (0.5-SB) y con 1 kg d⁻¹ de soja (1-SB). La base de la alimentación fue el pasto, compuesto mayoritariamente por *Lolium perenne* (70%) y *Trifolium repens* (25%). La duración del estudio fue de 75 días. La producción de leche ($p = 0.706$) y la producción de proteína ($p = 0.926$) no se vieron afectados. Los porcentajes de grasa ($p = 0.015$) y proteína ($p = 0.045$) y la producción de grasa ($p = 0.010$) fueron más bajos en el grupo 1-SB. Las cantidades de soja no modificaron los contenidos de CLA total ($p = 0.290$) y de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 ($p = 0.582$), *trans*-10, *cis*-12 ($p = 0.136$) y *cis*-10, *cis*-12 ($p = 0.288$), pero si fueron afectados por la calidad nutritiva del pasto, observándose menores valores al aumentar la madurez del pasto.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES OBJETIVO E. Se realizaron tres experimentos en la zona sur de Chile. En el experimento 1, 14 vacas fueron asignadas aleatoriamente en 2 grupos de 7 animales cada uno: grupo control al que se le suministró 5 kg d⁻¹ de concentrado comercial sin canola (0TC1) y grupo tratamiento al que se le suministró 3.75 kg de concentrado comercial más 1.16 kg canola en grano (1.16TC1). Los dos grupos tuvieron como base de la alimentación el pasto de una pradera natural (compuesta por *Trifolium*, *Dactylis glomerata*, *Bromus*, *Lolium*, *Taraxacum officinale* y *Plantago lanceolata*) y de una pradera natural mejorada (compuesta por *Lolium perenne* y *Trifolium repens*), más 6 kg⁻¹ de ensilado (compuesto por *Lolium perenne* y *Avena sativa*). En el experimento 2, 20 vacas fueron asignadas aleatoriamente en 2 grupos de 10 animales cada uno: grupo control al que se le suministró 8 kg d⁻¹ de concentrado comercial sin canola (0TC2) y grupo tratamiento al que se le suministró 6.2 kg de concentrado comercial más 1.2 kg de canola en grano molido (1.2TC2). Los dos grupos tuvieron como base de la alimentación el pasto de una pradera natural mejorada (compuesta por *Lolium perenne* y *Trifolium repens*). En el experimento 3, 20 vacas fueron asignadas aleatoriamente en 2 grupos de 10 animales cada uno: grupo control al que se le suministró 6 kg d⁻¹ de concentrado comercial sin canola (0TC3) y grupo tratamiento al que se le suministró 6 kg de concentrado comercial con un 20% de semilla de canola en grano entero (1.2 kg d⁻¹, 1.2TC3). Los dos grupos tuvieron como base de la alimentación el pasto de una pradera artificial (compuesta por *Avena Sativa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*), más 6 kg⁻¹

RESUMEN

de ensilado (compuesto por *Avena sativa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*) y 1.5 kg⁻¹ de col forrajera (*Brassica oleracea*). La duración de cada experimento fue de 60 días, de los cuales los primeros 15 días fueron de adaptación a cada una de las dietas experimentales. En cada uno de los experimentos, la producción de leche y su composición química no se afectó significativamente por los tratamientos. Los isómeros *trans*-10, *cis*-12 (entre 49 y 51 % del CLA total en el experimento 1; entre 31 y 32 % del CLA total en el experimento 2; entre 36 y 42 % del CLA total en el experimento 3) y *cis*-10, *cis*-12 (no detectado en el experimento 1; entre 27 y 37 % del CLA total en el experimento 2; entre 16 y 20 % del CLA total en el experimento 3) presentaron valores más altos a los encontrados normalmente en la literatura científica. Las cantidades de semilla de canola suplementadas en cada uno de los experimentos, no modificaron los contenidos de CLA total y de los isómeros *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12.

RESUMEN

SUMMARY

SUMMARY

BACKGROUND. Cow's milk is produced under different production systems in Chile. On the one hand in the northern type systems are intensive in the central southern dairies are located in the irrigated valley and in the south, where the highest concentration of dairies in the country, production systems are based on grazing. Milk production is considered an important economic item for these regions, which provides seasonal labor and permanent and is a development center for them. Furthermore, the importance of feeding of grasslands, especially in the production of fatty acids of great public health impact as in the case of CLA, so it is between the years 2005-2008 was developed research and development project entitled "Development of products with high content of functional active ingredients from bovine milk and its derivatives" (FONDEF- DO2I1135 Code).

OBJETIVES:

- A. Characterize dairy productive systems of Vilcún commune, Cautín province, the IXth Region, Chile, linking qualitative and quantitative variables using statistical multivariate analysis of simple correspondence.
- B and C. Study the contents of total and individual CLA isomers of cow dairy products in Chile, both in raw milk receptioned in commercial dairy plant and derived products for human consumption (powdered milk, sweetened condensed milk, cheese, butter)). In addition, study the effect of processing fresh milk into dairy products (powdered and sweetened condensed milk) on the CLA content was estimated.
- D Evaluate the effect of a dietary supplement with different quantities of extruded whole soybean on the production and composition of milk, and CLA concentration or their isomers in Jersey cows under pasture conditions.
- E. Evaluate the effect of a dietary supplement with canola seed (*Brassica napus*) on the production and composition of milk, and CLA concentration or their isomers in Chilean Black Friesian cows under pasture conditions.

RESULTS AND CONCLUSIONS **OBJETIVE A.** 24 dairy farms were analyzed: 11 considered small size, 7 medium ones and 6 big dairy producers. The general results show that the big producers have a larger surface of hectares dedicated to the dairy, more days of lactation and an average

SUMMARY

production of 14 L per day, in comparison with 9 L of the medium and small producers. The multivariable analysis of simple correspondence shows association between the educational level of the dairy producers and the quantity of produced milk. Thus, big producers have possess a professional title of degree senior technician or engineer. On the other hand, the level of education of the milkers was at least secondary level for the big producers and basic complete and incomplete for the small and medium producers. Likewise, the producers who carry out twice-daily milking have bigger total production of milk, and the drying therapy is carried out more in big and medium producers than in the small ones. The use of cooling tank is of permanent use in the producers with a greater productive volume. Finally, the big producers used a reproductive records which are associated with their high productions. About the sanitary aspect was observed that the producers with more seniority in the business have fewer mastitis problems in their herd.

RESULTS AND CONCLUSIONS OBJETIVES B and C. Samples of raw milk receptioned in commercial dairy plant in 2004 of two regions of Chile were taken, with dairy cattle production systems differentiated mainly by the type of animal feeding: grazing based systems (Osorno) and housing and based in total mixed ration (TMR) systems (Los Angeles). Also, supermarkets samples were taken of condensed milk, powder milk, butters and Gouda cheese. Furthermore, in 2006 raw milk and processed products (powdered milk and sweetened condensed milk) were taken. The CLA isomers (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *cis*-12) contents in milk and dairy product samples were determined. Higher levels of CLA in raw milk were obtained from sectors with livestock systems based on grazing compared to sectors with TMR systems, with average values between 1.72 g/100 g total fatty acids in spring milk of Osorno and 0.42 g in summer milk of Los Angeles. Dairy products have presented significantly higher content of total CLA than raw milk. The processing has significantly affected the transfer of fresh milk CLA to products. Sweetened condensed milk presented lower values of CLA than starting milk and powder milk. In contrast, powder milk showed values similar or above to those of fresh milk. In conclusion, although the consumption of dairy products in Chile is lower than in other countries consumers of these products, the high amount of CLA found in the Chilean dairy products studied provide adequate levels for human

SUMMARY

health. In Addition, more research is needed to elucidate the exact effect of processing and storage conditions of milk and dairy products on the CLA content.

RESULTS AND CONCLUSIONS OBJETIVES D. Twenty-one Jersey cows were randomly assigned into 3 groups of 7 animals each. The cows were supplemented with a dietary concentrate (5 kg d^{-1}), and each group received one of the three next treatments: control without soybean (0-SB), with extruded whole soybean at 0.5 kg d^{-1} (0.5-SB) or at 1 kg d^{-1} (1-SB). The basic diet was a pasture composed of *Lolium perenne* (70%), *Trifolium repens* (25%) and other species. The duration of the study was 75 d. Milk production ($p = 0.706$) and protein production ($p = 0.926$) were not affected by treatments. Fat ($p = 0.015$) and protein ($p = 0.045$) content as well as fat production ($p = 0.010$) were lower in the 1-SB group. There was no effect of the inclusion of extruded soybean on total CLA content ($p = 0.290$) or the content of *cis*-9, *trans*-11 ($p = 0.582$), *trans*-10, *cis*-12 ($p = 0.136$) and *cis*-10, *cis*-12 ($p = 0.288$) isomers. However, concentrations of all isomers were affected by the nutritional quality of the pasture, with low values observed at greater maturity stages of pasture.

RESULTS AND CONCLUSIONS OBJETIVES E. Three experiments were done on three representative sectors of southern Chile. Experiment 1. Fourteen cows were assigned randomly into 2 groups of 7 animals each: control group was fed 5 kg d^{-1} of commercial concentrate without canola (0-TC1) and treatment group that was fed 3.75 kg of commercial concentrate plus 1.16 kg of whole canola seed (1.16-TC1). The basic diet of all groups was: a natural (composed mainly of *Trifolium*, *Dactylis glomerata*, *Bromus*, *Lolium*, *Taraxacum officinale* and *Plantago lanceolata*) and improved pastures (composed of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*), and 6 kg DM d^{-1} of silage (composed of *Lolium perenne* and *Avena sativa*). Experiment 2. Twenty cows were randomly assigned into 2 groups of 10 animals each: control group was fed 8 kg d^{-1} commercial concentrate without canola (0-TC2) and treatment group that was fed 6.2 kg of commercial concentrate plus 1.2 kg of ground canola seed (1.2-TC2). The basic diet of all groups was an improved pasture composed of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*. Experiment 3. Twenty cows were randomly assigned into 2 groups of 10 animals each: control group was fed 6 kg d^{-1} commercial concentrate without canola (0-TC3) and the treatment group was

SUMMARY

fed 6 kg of commercial concentrate with 20% of whole canola seed (1.2 kg d⁻¹, 1.2-TC3). The basic diet of all groups was an artificial pasture (composed of *Avena Sativa*, *Lolium perenne* and *Trifolium repens*), 6 kg DM d⁻¹ of silage (composed of *Avena sativa*, *Lolium perenne* and *Trifolium repens*) and 1.5 kg DM d⁻¹ of fodder cabbage (*Brassica oleracea*). The duration of each experiment was 60 days and animals were adapted to the diets for the first 15 days of the experiment. No differences in milk production and quality were observed among the experimental groups in every experiment. The isomers *trans*-10, *cis*-12 (between 49 and 51 % of total CLA in the experiment 1; between 31 and 32 % of total CLA in the experiment 2; between 36 and 42 % of total CLA in the experiment 3) and *cis*-10, *cis*-12 (not detected in the experiment 1, between 27 and 37% in the experiment 2, between 16 and 20 % in the experiment 3) were higher than those normally found in the scientific literature. There was no effect of the inclusion of canola seed on total CLA content or the content of *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN-JUSTIFICACIÓN. REBVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA. OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

El sector silvoagropecuario en Chile representa el 5,4 % del PIB (producto interno bruto), sin considerar el PIB de los productos elaborados procedentes de dicho sector. La representación por subsectores es de un 20% para la agricultura (cultivos), un 40% para la fruticultura, un 20% para el silvícola y un 20% para el pecuario (ODEPA, 2011).

Dentro del sector pecuario, el censo de 2007 permitió establecer para el país una dotación de 3.789.697 cabezas de ganado bovino, las cuales se concentraban geográficamente en la zona sur, siendo la Región de Los Lagos la de mayor relevancia con una participación del 27,9% del total del censo bovino. Le siguen en importancia las regiones de La Araucanía y de Los Ríos, con unos porcentajes del 17,9% y 16,6%, respectivamente (ODEPA, 2011). Esta masa total comenzó a aumentar el 2011, debido a la retención de vientres, situación que será precisada en el censo programado para el año 2014. Con esta masa bovina Chile no alcanza a cubrir las necesidades de carne de su población, que en la actualidad alcanza a un consumo per cápita de 21 kg., con un consumo total de carne (ave, cerdo y otros) de 85,2 kg.

En cuanto a la producción de leche bovina durante el año 2011, la recepción nacional industrial de leche registró un incremento anual del 6,4 %, totalizando una cifra récord de 2.379 millones de litros, a pesar que este año se produjeron altas temperaturas (en algunos días superaron los 30° C en el mes de diciembre), lo que se tradujo en una rápida maduración de los pastos y el empobrecimiento de su calidad. Este volumen considera las 122 plantas existentes en el país, cuya información es recogida por ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agropecuarias), de ellas 22 son consideradas plantas mayores y el resto son plantas menores (INE, 2011). En cuanto al volumen recepcionado en las plantas destaca la Región de Los Lagos, con una participación del 46,7% del total y le sigue en importancia Los Ríos, con un 26,0%. Otras regiones de relevancia son Biobío (9,3%), Metropolitana (8,2%) y La Araucanía (8,2%). Con el volumen de leche producido Chile no cubre sus necesidades de consumo que alcanza a unos 138,5 litros per cápita.

De la cantidad total de leche recepcionada en planta el año 2011 (2.379 millones de litros), 369.166.121 de litros se utilizaron como leche fluida, se produjeron

92.812.449 kg de leche en polvo, 80.619.584 kg de queso, 222.063.393 kg de yogur, 34.578.871 kg de leche condensada, 21.041.340 kg de mantequilla, 9.134.872 kg de quesillo y 11.125.512 lts de leche cultivada, entre otros productos. Esto significó que durante 2011 los principales incrementos se observan en leche cultivada (14,0%), leche en polvo (12,7%) y yogur (11,7%). El queso crece 25,5%, pero en gran parte debido a la incorporación en el año 2011 de plantas menores.

En relación a nuestras colocaciones en el exterior, éstas registraron en 2011 una fuerte alza anual de 25,4 %, desde US\$ 159,1 millones en 2010 a US\$ 199,6 millones en 2011. Los principales destinos corresponden a México (con una participación del 27,7 %), Venezuela (13,7 %), Brasil (8,4%), Perú (7,2 %), EE.UU. (6,8 %), Colombia (6,8 %) y Corea del Sur (4,5 %). Otros países con menor importancia son China, Costa Rica, Cuba, Argelia, Ecuador, y le siguen una veintena más de países. Dentro de los productos exportados destacan la leche en polvo, el queso y la leche condensada, con producciones de 10.400, 66.679 y 11.900 toneladas, respectivamente.

En el año 2011, los precios reales pagados a los productores del país experimentaron un incremento del 5,5%, con un precio promedio de \$191 el lt, (US\$ 0,38), siendo el costo de producción muy variable entre los planteles, pudiendo ser entre \$ 70 a 190 por lt.

La leche de vaca se produce bajo diferentes sistemas de producción dependiendo de las condiciones agroecológicas que se presentan en Chile. Por un lado en la zona norte los sistemas son del tipo intensivo, en la zona centro sur las lecherías se ubican en el valle regado y en la zona sur, donde se concentra el mayor porcentaje de lecherías del país, los sistemas productivos están basados en el pastoreo, teniendo éstos una gran variabilidad en el nivel de intensificación. En el caso de los sistemas pastoriles la producción ganadera está sujeta a las fluctuaciones estacionales, ya que los pastos (o praderas como se denominan en Chile) no mantienen un ritmo constante de crecimiento a través del año. Aunque existen variaciones de una zona a otra, por lo general sobre un 60% de la producción de forraje ocurre en los meses de primavera; sin embargo, en el caso de la zona intermedia como es la IX región de la Araucanía no se conoce los sistemas de manejo que se realizan en estos sistemas productivos.

Este tipo de producción basado en pasturas hace que la leche bovina, además de ser rica en proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, sea una fuente de ácidos grasos de alta calidad saludables para el hombre, producto del tipo de alimentación a base de pastos. De estos ácidos grasos destacan por sus efectos benéficos los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, y más concretamente, en los últimos 10 años destacan los isómeros del ácido linoléico conjugado (CLA). Dentro de sus isómeros, el *cis-9 trans-11* está considerado desde el punto de vista biológico como el más importante por sus efectos anticancerígeno, protección contra la arteriosclerosis, estimulador del sistema inmune y poder antioxidante (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2003).

Además destaca el isómero *cis-9, trans-12*, el cual estaría relacionado a la disminución del tejido graso y a la reducción del peso (Belury, 2002). Se ha demostrado que el CLA se produce en mayor cantidad en sistemas productivos que basan su alimentación en praderas y también con el uso de granos de oleaginosas. Es por ello que tiene importancia en estas zonas probar nuevas estrategias de alimentación, que por un lado aumenten el nivel productivo y por otro lado aumenten los niveles de CLA, teniendo siempre como base la pradera como insumo alimenticio de bajo costo.

La producción de leche es considerada un rubro económico importante para estas regiones, el cual proporciona mano de obra estacional y permanente y es un polo de desarrollo para las mismas. Por otro lado, con la importancia que tiene la alimentación a base de praderas, sobre todo en la producción de ácidos grasos de gran impacto en salud pública como es el caso de CLA, es por lo que entre los años 2005–2008 se desarrolló el proyecto de investigación y desarrollo titulado “Desarrollo de productos con alto contenido en principios activos funcionales a partir de leche bovina y sus derivados” (Código FONDEF DO211135), por un monto de 430.000.000 de pesos (700.000 euros), entre la Universidad Católica de Temuco y la empresa NESTLE SA. En el marco de este proyecto se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral

I. 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.2.1. Ácido linoléico conjugado

La leche bovina representa una fuente valiosa de nutrientes como son las proteínas, las grasas, los carbohidratos, las vitaminas y los minerales (Maynard *et al.*, 1997). La grasa es el mayor componente energético en la leche bovina y cumple funciones metabólicas específicas en el organismo. Los triacilglicéridos constituyen casi la totalidad de los componentes lipídicos de la leche, con un 99 %; además contiene lípidos complejos tales como fosfolípidos, cerebrósidos, esteroides y ácidos grasos (AG) libres de alto peso molecular (Thomas y Rowney, 1996). De estos componentes, destacan por sus efectos dañinos para el hombre los ácidos saturados y por sus efectos benéficos los AG monoinsaturados y poliinsaturados (Valenzuela *et al.*, 2000). La gran mayoría de los AG que se encuentran naturalmente en leche poseen isomería *cis*; sin embargo, en nuestra dieta habitual consumimos una pequeña porción (de 1 a 7 g/día) de AG con isomería *trans* (Valenzuela y Morgado, 1999) dañinos para la salud humana. A la luz del conocimiento actual, la generalización del concepto sobre el efecto dañino de los AG *trans* está siendo revisada, ya que algunos de estos isómeros pueden tener efectos beneficiosos en la nutrición y salud humana (Ramaswamy *et al.*, 2001; Sanhueza *et al.*, 2002).

Es el caso del ácido linoleico conjugado (CLA) quien representa entre 20 y 28 isómeros del ácido linoleico C18: 2 (Lock y Garnsworthy, 2003; O'Quinn *et al.*, 2000; Banni *et al.*, 1998) que se ha indicado como uno de los ácidos grasos más beneficiosos para la salud humana (Pariza y Park, 2001). Del mismo modo, los productos de rumiantes como la leche y la carne constituyen la principal fuente de CLA para los seres humanos. De todos los posibles isómeros, sólo *cis-9*, *trans 11*-y *10-trans*, *cis-12* han mostrado una actividad biológica interesante (Wahle *et al.*, 2004; Belury, 2002; McGuire y McGuire, 2000). El isómero *cis-9*, *trans-11*, también conocido como ácido ruménico, se ha documentado que tiene un efecto anticancerígeno (Ha *et al.*, 1987; Visonneau *et al.*, 1997; Aro *et al.*, 2000) y un efecto antioxidante (Devery *et al.*, 2001), mientras que el

isómero *trans-10, cis-12* es capaz de disminuir la grasa corporal y aumentar la masa corporal magra.

El isómero *cis-9, trans-11* ó ácido octadecadienoico (también llamado ácido ruménico), es el producto intermedio de la biohidrogenación del ácido linoléico por acción de la bacteria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens* y es el isómero más abundante (Kim *et al.*, 2002). Este isómero también puede ser encontrado en gran cantidad en los tejidos de la glándula mamaria por la enzima $\Delta-9$ desaturasa a partir de ácido transvaccénico (TVA- *trans-11* C18:1), otro intermediario en la biohidrogenación ruminal del ácido linoléico y α - linoléico (*cis-9, cis-12, cis-15* C18:3) (Mosley *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2002; Griinari *et al.*, 1999).

La enzima $\Delta-9$ desaturasa también se encuentra en el intestino delgado y en el tejido adiposo de rumiantes (Ward *et al.*, 2003), sugiriendo que podría ocurrir síntesis endógena en estos tejidos. Otra vía metabólica para la formación de CLA podría ocurrir en el hígado de los rumiantes, y posiblemente también en los no rumiantes. Esta sería la razón por la que en los no rumiantes, incluidos los humanos, también se encuentra CLA en sus tejidos y en leche, aunque en menor proporción que en los rumiantes (Yurawecz *et al.*, 1998).

El isómero *trans-10, cis-12*, aunque es importante fisiológicamente, está presente en cantidades de sólo 3 al 5% del total de CLA (Parodi, 2003); sin embargo, su contenido en grasa láctea puede ser incrementado bajo ciertas situaciones de manejo de la dieta. Además a este isómero se le ha atribuido la capacidad de reducir la síntesis de grasa láctea (Perfield, 2007).

1.2.2. Factores que afectan la concentración de CLA en leche

Entre los factores que causan variaciones en la composición de los ácidos grasos y de CLA en leche en vacas están la raza, la variación individual, el número de partos, el período de lactancia, la estacionalidad, siendo la alimentación del animal el factor más importante (Stanton *et al.*, 1997, Pinto *et al.*, 2002). Este último factor se analizará en el siguiente apartado.

En relación a la *raza* se indica que el CLA en leche varía ampliamente entre rebaños (Kelly y Bauman, 1996; Moore *et al.*, 2005). De mayor a menor contenido, las razas que tendrían más CLA son: Holstein, Pardo Suizo, Normando y Jersey, cuya variabilidad del contenido de CLA en la grasa de la leche estaría relacionada con el índice Δ -9 desaturasa (Kelsey *et al.*, 2003, Khanal y Olson, 2004).

También hay una *variación individual* entre vacas que estaría asociada a dos factores; primero, la producción ruminal de TVA y CLA y segundo, la actividad de la enzima Δ -9 desaturasa. La variación ruminal de TVA y CLA está relacionada a la biohidrogenación de los sustratos disponibles en la dieta; tipo y número de bacterias que biohidrogenan el sustrato disponible hacia la producción de TVA y CLA y factores tales como patrones de alimentación (Clouet *et al.*, 1998). Se presume que la variación de la actividad enzimática entre individuos, podría estar regulado por la expresión genética asociada a un polimorfismo genético que afecta la estructura primaria o terciaria de esa enzima, o factores que podrían alterar la interacción entre enzima, el sustrato y la frecuencia masticatoria modificando el medio ambiente ruminal (Kelsey *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2002).

El *número de partos* representa menos del 0,3% del total de la variación de CLA en grasa láctea; sin embargo, las vacas con más de cuatro partos tienen más altos contenidos de CLA que vacas de dos a cuatro pariciones (Kelsey *et al.*, 2003).

El *estado de lactación* tendría un pequeño efecto sobre el contenido de CLA en leche y en el índice de Δ -9 desaturasa (Kelsey *et al.*, 2003). Lock y Garnsworthy (2002) encontraron que el CLA contenido en grasa láctea y el índice de Δ -9 desaturasa son independientes de la producción de leche, producción de grasa y del porcentaje de ésta en leche.

Las *variaciones estacionales* del contenido de CLA en grasa láctea tienen directa relación con el pasto (Gagliostro *et al.*, 2003). El CLA aumentó de 2 a 3 veces en grasa láctea durante la primavera, cuando las vacas están alimentadas a pastoreo y las concentraciones de *cis*- 9, *trans*-11 promediaron 12 mg/g, disminuyendo a 9 mg/g en verano e incrementándose nuevamente a 10 mg/g en otoño (Thomson y Van Der Poel, 2000).

I.2.3. La alimentación como factor determinante de la cantidad de CLA

Numerosos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de incrementar el contenido de CLA en los productos animales y mejorar con ello sus propiedades nutricionales. En general, los forrajes frescos y los alimentos ricos en aceites incrementan la concentración de CLA (White *et al.*, 2001; Stanton *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2005; Dewhurst *et al.*, 2006). Es por ello, que el pasto pasa a ser una valiosa herramienta para aumentar el CLA en leche (Jahries *et al.*, 1997, Lock and Garnsworthy, 2002). A pesar que los pastos contienen bajos niveles de ácido linoléico, éstos aumentarían el CLA por los altos niveles de otros AG poliinsaturados que no son intermediarios de la biohidrogenación ruminal, pero que si dan origen directa o indirectamente a precursores de la síntesis endógena de CLA (Harfoot y Hazlewood 1988, Griinari *et al.*, 1999).

Es por ello que contenido de CLA de la leche y carne de rumiantes puede ser aumentado con dietas a base de pastos (Gagliostro *et al.*, 2004, Khanal *et al.*, 2005, Murphy *et al.*, 2008), siendo el pastoreo uno de los factores dietarios más importantes que lo afecta. Vacas que reciben toda su dieta desde pastoreo, producen grasa láctea con mayores contenidos de CLA comparados con vacas que consumen uno o dos tercios de su dieta en forma de pastoreo (Khanal y Olson 2004), por lo que incrementando los niveles de forraje fresco (pradera o forraje fresco cortado) se incrementan los niveles de TVA, CLA, y C18:3 (Ward *et al.*, 2003). Otro factor que parece actuar en la concentración de CLA es la madurez del pasto, encontrándose cantidades 2 o 3 veces inferior de CLA en pastos maduros. Además se ha visto que la diversidad de las especies de forrajes disponibles en la pradera también incrementaría el contenido de CLA (Collomb *et al.*, 2002). Vacas en praderas con trébol rosado tuvieron una concentración de *cis*- 9, *trans*-11 de 14 mg/g, comparado con vacas alimentadas con gramíneas en la que se encontró 9 mg/g de CLA en grasa láctea (Wu *et al.*, 1998).

En general se puede señalar que la síntesis endógena en el animal es la responsable de más del 91 % de CLA *cis*-9, *trans*-11, en animales alimentados con forraje fresco y que la suplementación con el aceite de girasol por ejemplo, si bien

aumenta la proporción de ácidos grasos de cadena larga en la grasa de leche, aumenta solo en un 18% la producción de ácido vaccénico (Khanal *et al.*, 2005)

Dietas basadas en pastos incrementan la concentración de AG insaturados de cadena larga y CLA en grasa de leche, esto básicamente cuando se compara con dietas mezcla total (TMR) con un similar contenido de lípidos (Schroeder *et al.*, 2003). Mientras el primer AG de dietas TMR es el ácido linoléico, en el pasto es altamente predominante el ácido α -linolénico, el cual al ser biohidrogenado no produce *cis*- 9, *trans*-11 como intermediario, sino que produce un precursor endógeno que es el TVA. Por lo cual, elevadas concentraciones de *cis*- 9, *trans*-11 en grasa láctea de vacas a pastoreo puede ser debido a un aumento en el suplemento de TVA (Kay *et al.*, 2007). La concentración de *trans*-11 en grasa láctea aumentó desde 26,5 mg/g a 51,0 mg/g cuando las vacas que consumían dieta TMR fueron retornadas a pastoreo (Precht y Molquentin 1997, 2000).

También se señala que el efecto de suplementar a vacas en pastoreo con CLA *trans*-10,*cis*-12, ha mejorado la síntesis de proteína, la relación de proteína/grasa y el balance energético de las vacas (Kay *et al.*, 2007).

Por otro lado dietas suplementadas con aceites que contienen ácido linoleico, como el aceite de maíz, de maravilla, de soya, de canola y aceite de pescado incrementan sustancialmente el contenido de CLA en grasa de leche (Jhones *et al.*, 2000, Bauman y Griinari 2001, Cruz-Hernandez *et al.*, 2007). Por otra parte la utilización de un concentrado tal vez sean la medida más efectiva, rápida y fácil de implementar para modificar la composición de la grasa láctea y del CLA, pero para muchos sistemas las dietas a base de concentrado tienen una limitante de costo.

Dentro de las semillas oleaginosas, la soja es muy utilizada en raciones en mezcla total (TMR) a diferentes niveles, habiéndose observado que un tratamiento previo de la semilla (tostada o extrusionada) tendría un mayor efecto sobre el contenido de CLA que la semilla intacta (Chouinard *et al.*, 2001). En el caso de las semillas tostadas o extruidas al ser semillas tratadas con calor, hacen los AG más asequibles para los microorganismos ruminales cuando las semillas de oleaginosas son procesadas y el tratamiento con calor incrementa fuertemente su disponibilidad (Khanal y Olson 2004).

Sin embargo, son pocos los trabajos que se han realizado para estudiar el efecto de la suplementación de este tipo de semilla en sistemas con alimentación a base de praderas y los resultados no son concluyentes. En este sentido Bartolozzo *et al.* (2003), en ganado Friesian concluyen que el efecto del pasto sobre el perfil de ácidos grasos y el contenido en CLA en la leche fue más importante que la fuente de suplementación de soja (semilla tostada o intacta). Khanal *et al.* (2005) en vacas Holstein en pastoreo no encuentran efecto de la suplementación con 2,4 kg/día de soja extruida en la concentración de CLA en leche, mientras que Lawless *et al.* (1998) en vacas lecheras en pastoreo suplementadas con 3,1 kg/día de soja tostada y Paradis *et al.* (2008) en vacas de carne en pastoreo suplementadas con 2 kg/día de soja extruida observan un incremento en CLA.

Para el caso de la soja, se han obtenido 0,37; 0,77 y 2,10 % de CLA en grasa de leche utilizando soja cruda, soja tostada y aceite de soja, respectivamente (Dhiman *et al.*, 2000). Por otra parte, la soja extrusada y cocida elevó dos o tres veces la cantidad de CLA en comparación a la soja cruda (Chouinard *et al.*, 2001, Abu-Ghazaleh *et al.*, 2003).

En el caso del raps canola, Staton *et al.* (1997), encontraron que la suplementación con semilla de raps incrementó un 65% el contenido de CLA en grasa láctea sobre el grupo control no suplementado. Estos autores no pudieron determinar si el incremento en CLA fue producto de su bajo contenido de ácido linoléico o al efecto de su gran contenido de ácido oléico. Por otro lado, el aceite de raps canola incrementó los niveles de CLA a 3,5 mg/g de AG en leche con respecto a un grupo sin canola, pero fue el que menos aportó CLA a la leche con respecto a la inclusión en la dieta de otros aceites vegetales (Chouinard *et al.*, 2001).

I.2.4. Acido linoleico conjugado en productos lácteos

El CLA se ha encontrado en diversos alimentos como lácteos, carnes, productos vegetales y alimentos de origen marino, siendo los productos de rumiantes como la leche y la carne los principales alimentos que aportan CLA a los humanos (Chin *et al.*, 1992). En este sentido y expresado en g de CLA/100 g del total de grasa, se han

señalado cantidades de 0,11 g en carne de conejo, 1,20 g en carne de cordero, 0,09 g en carpa y entre 0,40 y 1,7 g en diversos quesos (Fritsche y Steinhart, 1998). En cambio, en aceites vegetales y en margarinas se ha observado menos de 0,01 g/100 g del total del contenido de grasa (Fritsche y Steinhart, 1998).

En el caso de Chile se ha estudiado el contenido de ácidos grasos en leche bovina recepcionada en planta y su relación con la estacionalidad anual y el sector geográfico, obteniéndose valores de CLA de 1,75 y 1,41 g/100 g del total de grasa en las regiones VIII y IX, respectivamente (Pinto *et al.*, 2002). Sin embargo, en ese estudio sólo se analiza el isómero *cis*-9, *trans*-11 pero no se conoce la cantidad de CLA de los productos lácteos producidos en Chile.

Por otra parte los productos lácteos usualmente sufren diversos cambios durante su preparación o procesamiento, el cual puede incluir tratamiento con calor intenso o moderado que pueden llevar a cambios indeseables en lípidos o proteínas (Herzallah *et al.*, 2005). Semma (2002), estableció que los lípidos de la leche pueden sufrir cambios químicos y físicos durante el procesamiento y almacenaje, tales como auto-oxidación y formación de AG *trans*.

No obstante, los resultados del efecto de las condiciones de procesamiento, almacenamiento y envasado en el contenido de CLA de diversos tipos de productos lácteos no están claros. Herzallah *et al.*, (2005) reportaron una disminución de CLA, de 21 y un 53% en los quesos cuando se calientan en un horno de microondas durante 5 y 10 min, respectivamente. Otros estudios detectaron nuevos isómeros de CLA en los quesos madurados (Werner *et al.*, 1992; Lavillonière *et al.*, 1998; Sehat *et al.*, 1998) y se planteó la hipótesis de que biohidrogenación de ácido linolénico en el queso podría dar lugar a la formación de isómeros de CLA como productos intermedios. En otro estudio (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2007), los isómeros CLA predominantes (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-10 CLA, *trans*-12) no fueron afectados significativamente por el procesamiento, pero una disminución de la CLA total de queso fresco las muestras se detectó después de 10 semanas de almacenamiento refrigerado.

I.2.5. Sistemas productivos lecheros en Chile

Los sistemas de producción de leche se caracterizan por su alta complejidad y se influyen por el medio ambiente (Navarro, 2001), el sistema de producción adoptado, el ambiente institucional (tecnología y servicios) y los valores culturales. Así, la planificación de acciones de intervención requiere distinguir los diferentes grupos o tipos que coexisten en la población estudiada, considerando los diversos aspectos en que se desarrollan los sistemas de producción (Ausin, 2001).

Para el caso chileno existen tres sistemas productivos bien definidos: Modelo europeo o intermedio, modelo americano intensivo que maximiza la productividad por vaca, con alimentación a base de dietas TMR, o alta cantidad de concentrado y un modelo Neozelandés que privilegia la producción por hectárea y que tiene como base alimenticia la pradera. En el caso del sur de Chile existe una mezcla de estos sistemas, siendo la Región del Bio-Bio (VIII Región) la más parecida al sistema americano, la Región de la Araucanía (IX Región) la más parecida a los sistemas intermedios y la Región de los Lagos y de los Ríos (Actual X Región y XIV Región, respectivamente) la zona con un sistema más parecido al Neozelandés (Anrique *et al.*, 2004). Además estos sistemas lecheros son altamente heterogéneos en cuanto a tamaño de población de animales, superficie predial, infraestructura, sistemas de alimentación, capacitación de su mano de obra, capacidad empresarial y en nivel de especialización y tecnificación (González, 2007).

En el caso de la Zona sur, por condiciones de clima predomina el uso de praderas con producciones que van de 2500 a 8000 Lt/hectárea, dependiendo del número de animales, es así que el nivel productivo de 8000 litros lo alcanzan predios con sobre 300 animales en lechería (Pulido *et al.*, 2009). Estos predios de mayor producción usan la estabulación, ya sea en forma permanente o bien en periodos estacionales de invierno principalmente (Anrique *et al.*, 2004).

La rentabilidad en los predios es altamente variable debido a los diferentes sistemas, siendo de entre un -3 a un 20%. Los sistemas más bajos en rentabilidad están asociados al uso precario de la alimentación y de la tecnología.

Esta amplia variabilidad en los sistemas lecheros hace necesario que el estudio de estos factores que lo afectan, sea realizado utilizando la estadística multivariable, la cual ha sido empleada en muchas áreas de la ciencia aplicada para clasificar y establecer relaciones de similitud entre unidades de las cuales se han medido una gran cantidad de variables (Johnson y Whichern, 1998; Hair et al. 1998).

1.2.6. Referencias

- Abu-Ghazaleh AA, DJ Schingoethe, AR Hippen, KF Kalscheur. 2003. Conjugated linoleic acid and vaccenic acid in rumen, plasma, and milk of cows fed fish oil and fats differing in saturation of 18 carbon fatty acids. *J. Dairy Sci.* 86: 3648-3660.
- Anrique, R.; Latrille, L.; Balocchi, O.; Moreira, V.; Smith, R.; Alomar, D.; Pinochet, D.; Vargas, G. 2004 La producción de leche en Chile: Caracterización técnica a nivel predial: Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 59 p.
- Ausin, J. 2001. Apropriados manejos post-parto para mantener la producción y eficiencia. *Agroanálisis*. Chile. 202: 27-29.
- Banni S, E Angioni, M Contini, G Carta, V Casu, G Lengo, P Melis, M Deiana, A Dessi, F Corongiu. 1998. Conjugated linoleic acid and oxidative stree. *J. Am Oil Chem Soc.* 75: 261-267
- Bauman, DE, JM Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest Prod. Sci.*, 70: 15-29.
- Belury, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22:505–531
- Chouinard PY, L Corneau, WR Butler, Y Chilliard, JK Drackley, DE Bauman. 2001. Effect of Dietary Lipid Source on Conjugated Linoleic Acid Concentrations in Milk Fat. *J. Dairy Sci.* 84: 680-690.
- Clouet P, L Demizieux, J Gresti, P Degrace. 1998. Mitochondrial respiration on rumenic and linoleic acids. *Biochem Soc Trans.* 29: 320-325.

- Collomb M, U Bütikofer, R Sieber, B Jeangros, JO Bosset. 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *Int. Dairy J.*, 12: 649-659.
- Cruz-Hernandez C, JK Kramer, JJ Kennelly, DR Glimm, BM Sorensen, EK Okine, LA Goonewardene and RJ Weselake. 2007. Evaluating the conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing mounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. *J. Dairy Sci.* 90: 3786-3801
- Dhiman TR, LD Satter, MW Pariza, MP Galli, K Albright, MX Tolosa. 2000. Conjugated linoleic acid. (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83: 1016-1027.
- Fritsche, H. Steinhart: Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 1998, 206, 77–82.
- Gagliostro GA. 2004. Leches con alto impacto sobre la salud humana. INTA EEA BCLAarce. Buenos Aires, Argentina. pp.1-15.
- González, J. 2007 Caracterización y Tipificación de Sistemas Productivos de Leche en la X Región de Chile: un Análisis Multivariable. Tesis Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia, Universidad Austral de Chile. 105 p
- Griinari JM, K Nurmela, AD Dwyer, DM Barbano, BE Bauman. 1999. Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage u associated with a change in ruminal biohydrogenation. *J. Animal. Sci.* 77 (Suppl. 1). Pp:117-118 (Abstr).
- Hair, J., R. Anderson, R. Tatham, and W. Black. 1998. Multivariate data analysis. 768 p. 5th ed. Prentice Hall College Div., New York, USA.
- Herzallah SM, Humeid MA, Al-Ismail KM. Effect of Heating and Processing Methods of Milk and Dairy Products on Conjugated Linoleic Acid and Trans Fatty Acid Isomer Content *Dairy Sci* 2005; 88:1301-1310
- Jahries G, J Fritsche, H Steinhart. 1997. Conjugated linoleic acid in milk fat: High variation depending on production system. *Nutr. Res.* 17:1479–1484.
- Jhones DF, PW Weiss, DL Palmquist. 2000. Short communication: Influence of Dietary Tallow and Fish Oil on Milk Fat Composition. *J. Dairy Sci.* 83: 2024-2026.

- Johnson, R., and D. Wichern. 1998. Applied multivariate statistical analysis. 799 p. 4th ed. Prentice Hall, New York, USA. [
- Kay JK, TR Mackle, DE Bauman, NA Thomson, LH Baumgard. 2007. Effects of a Supplement Containing *Trans*-10, *Cis*-12 Conjugated Linoleic Acid on Bioenergetic and Milk Production Parameters in Grazing Dairy Cows Offered Ad Libitum or Restricted Pasture. *J. Dairy Sci.* 90:721-730.
- Kay JK, TR Mackle, MJ Auldist, NA Thomson, DE Bauman. 2002. "Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows". *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 62:12-15.
- Kay JK, TR Mackle, MJ Auldist, NA Thomson, DE Bauman. 2004. Endogenous Synthesis of *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J. Dairy Sci.* 87:369-378.
- Kelly ML, DE Bauman. 1996. Conjugated linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. In Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf., Rochester, NY. Cornell Univ., Ed. Ithaca, NY. Pp 68-74.
- Kelsey JA, BA Corl, RJ Collier, DE Bauman. 2003. The Effect of Breed, Parity, and Stage of Lactation on Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk Fat from Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86: 2588- 2597.
- Khanal R, KC Olson. 2004. Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content in Milk, Meat, and Egg: A Review . Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Asian Network for Scientific Information. Utah State University, Logan, UT 84322, USA. *Pakistan Journal of Nutrition.* 3 (2): 82-98.
- Khanal RC, TR Dhiman, AL Ure, CP Brennand, RL Boman, DJ McMahon. 2005. Consumer Acceptability of Conjugated Linoleic Acid-Enriched Milk and Cheddar Cheese from Cows Grazing on Pasture *J. Dairy Sci.* 88:1837-1847
- Kim YJ, RH Liu, DR Bond, JB Russell. 2002. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl Environ Microbiol.* 12: 5226-5230.

- Lock AL, PC Garnsworthy. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Anim. Sci.* 74:163–176.
- Maynard L, J Loosli, H Hintz, R Warner. 1997. *Nutrición Animal*. 7th ed. McGraw-Hill Book Co. USA.
- Moore CE, JK Kay, RJ Collier, MJ VanBaale and LH Baumgard. 2005. Effect of Supplemental Conjugated Linoleic Acids on Heat-Stressed Brown Swiss and Holstein Cows: *J. Dairy Sci.* 88:1732-1740
- Murphy J.J., Coakley M. , Stanton C. 2008. Supplementation of dairy cows with a fish oil containing supplement and sunflower oil to increase the CLA content of milk produced at pasture. *Livestock Science* 116 : 332–337.
- Navarro, H. El enfoque de sistemas en el desarrollo de predios lecheros. Seminario de Leche. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Octubre. Chile. 187 pp. 2001.
- O` Quinn PR, JL Nelssen, RD Goodband, MD Tokach. 2000. Conjugated linoleic acid. *Anim Health Res Rev.* 1: 35-46.
- Offer NW, M Marsden, J Dixon, BK Speake, FE Thacker. 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of *n*-3 poly-unsaturated fatty acids, *trans* acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Anim. Sci.* 69:613–625.
- Parodi P. 2003. Conjugated linoleic acid in food. In J. Sebedio, W.W. Christie and R. Adolf ed. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2, Pp:101-121. AOCS Press, Champaign, IL.
- Perfield JW II, AL Lock, JM Griinari, A Sæbø, P Delmonte, DA Dwyer, DE Barman. *trans*-9, *cis*-11 Conjugated Linoleic Acid Reduces Milk Fat Synthesis in Lactating Dairy Cows . *J Dairy Sci.* 90: 2211-2218.
- Peterson DG, JA Kelsey, DE Barman. 2002. Analysis of Variation in *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk Fat of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2164-2172.
- Pinto M, Rubilar, Carrasco, E. 2002. Efecto estacional y del área geográfica en la composición de ácidos grasos en la leche de bovinos. *Agro sur*. Vol. 30, No. 2, pp. 75-90.

- Precht D, J Molquentin. 1997. Effect of feeding on *trans* positional isomers of octadecenoic acid in milk fats. *Milchwissenschaft*. 52:564-568.
- Precht D, J. Molquentin. 2000. Frequency distribution of conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid contents in European bovine milk fats. *Milchwissenschaft*. 55:687-691
- Pulido RG, Escobar A, Follert S, Leiva M, Orellana P, Wittwer F *et al.*, . Efecto del nivel de suplementación con concentrado sobre la respuesta productiva en vacas lecheras a pastoreo primaveral con alta disponibilidad de pradera. *Arch. med. Vet. Arch Med Vet* 41, 197-204. 200
- Ramaswamy N, RJ Baer, DJ Schingoethe, AR Hippen, KM Kasperson, LA Whitlock.2001. Consumer evaluation of milk high in conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci*. 84: 1607-1609.
- Sanhueza CJ, S Nieto, BA Valenzuela. 2002. Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria *trans* potencialmente beneficioso. *Rev. chil. nutr.* vol.29, no.2. 98-105.
- Schroeder G, J Delahoy, I Vidarreta, F Bargo, G Gagliostro, L. Mullert. 2003. Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. *J. Dairy Sci*. 86: 3237- 3248.
- Semma, M. 2002. *Trans* fatty acids: Properties, benefits and risks. *J. Health Sci*. 48: 7-13.
- Smith, R. 1999. Caracterización de los sistemas productivos lecheros de Chile. p. 274-302. Cap. V. *In* Competitividad de la producción lechera nacional. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile.
- Stanton C, F Lawless, G Kjellmer, D Harrington, R Devery, JF Connolly, J Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk *cis*-9, *trans*-11- conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci*. 62: 1083-1086.
- Thomas L, M Rowney. 1996. Australian milk fat survey - fatty acid composition. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 51(10):112-114.
- Thomson NA, W Van Der Poel. 2000. Seasonal variation of the fatty acid composition of milk fat from Friesian cows grazing pasture. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* : 60:314-317.

- Valenzuela A, J Sanhueza, S Nieto. 2000. Ácidos grasos omega-3 de cadena larga en la nutrición humana y animal. *Rev Chil Nutr.* 27: 351-354.
- Valenzuela A, N Morgado. 1999. Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biol Res* 1999. 32: 273-287
- Ward AT, KM Wittenberg, HM Froebe, R Przybylski, L MCLAolmson. 2003. Fresh Forage and Solin Supplementation on Conjugated Linoleic Acid Levels in Plasma and Milk. *J. Dairy Sci.* 86:1742-1750.
- Wu Z, MN Lahlou, LD Satter, L Massingill, MW Pariza. 1998. Increased Conjugated Linoleic Acid (CLA) in milk fat of grazing cows is not explained by more CLA production in the rumen. US Dairy Forage Research Center, Research Summaries. Pp. 96-97
- Yurawecz MP, JA Roach, N Sehat , MM Mossoba, JK Kramer, J Fristsche, H. Steinhart, K ku. 1998. A new conjugated linoleic acid isomers, 7 trans, 9 cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids.* 33: 803-809.

I.3. OJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes planteados anteriormente y por la importancia que tiene el ácido linoléico conjugado en la nutrición del hombre y sus claros efectos en salud pública, el objetivo general de la presente Tesis ha sido la caracterización de la producción bovina lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile y el desarrollo estratégico de la producción láctea con alto contenido en CLA.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

- a. Caracterizar las explotaciones o predios de la IX Región de Chile, de acuerdo a su sistema de alimentación, como región con un sistema de producción intermediario entre la VIII y la X Región.
- b. Estudiar el contenido de CLA total y de sus isómeros en leche fresca y en productos lácteos (leche en polvo, leche condensada, queso y mantequilla). Con respecto a la leche recepcionada en planta, el estudio se hace en dos regiones con sistemas de producción bovinos lecheros importantes en Chile y diferenciados principalmente por el tipo de alimentación de los animales: sistemas basados en el pastoreo (X Región de los Lagos) y sistemas con mayor estabulación y basados en raciones TMR (VIII Región del Bio-Bio).
- c. Determinar el efecto sobre el contenido en CLA del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos (leche en polvo y leche condensada).
- d. Evaluar el efecto de dietas con soja (0.5 and 1.0 kg d^{-1}) en vacas con alimentación base a de pastos, en la producción y calidad nutricional de la leche, especialmente sobre la cantidad de CLA total y sus isómeros.
- e. Evaluar el efecto de dietas con grano entero, molido y grano entero agregado en el concentrado de raps canola en vacas con alimentación base a de pastos, en la producción y calidad nutricional de la leche, especialmente sobre la cantidad de CLA total y sus isómeros.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN BOVINA LECHERA EN SISTEMAS CON BASE EN EL PASTOREO EN EL SUR DE CHILE

Se corresponde con el objetivo 1.

Artículos publicados o enviados para su publicación:

**Caracterización productiva de explotaciones lecheras empleando
metodología de análisis multivariado**

*Juan Pablo Avilez, Paul Escobar, Gabrielle von Fabeck, Karen Villagran,
Fernando García, Roberto Matamoros y Antón García Martínez.*

Revista Científica, FCV-LUZ (2010), Vol. XX, Nº 1, 74–80.

Impact Factor (IF) = 0,109; 4º cuartil; 134/145 revistas de VETERINARY SCIENCES

II.1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de leche se caracterizan por su alta complejidad y se influyen por el medio ambiente (Navarro, 2001), el sistema de producción adoptado, el ambiente institucional (tecnología y servicios) y los valores culturales. Así, la planificación de acciones de intervención requiere distinguir los diferentes grupos o tipos que coexisten en la población estudiada, considerando los diversos aspectos en que se desarrollan los sistemas de producción (Ausin, 2001). Aquí cobra importancia aspectos sociales como el nivel educativo de los propietarios, de los trabajadores, años de antigüedad en el sector, asociación de experiencia en el sector y manejo productivo; todo ello contribuiría a la adopción de nuevas tecnologías que mejoren su empresa productiva (Bedotti *et al.*, 2005; Moore y Payne, 2007; Stup *et al.*, 2006). Caracterizar estos sistemas es complejo, por lo que se han propuesto una serie de técnicas de análisis estadísticos como; técnicas de análisis de varianza (Acero *et al.*, 2003; Mainar *et al.*, 1994; Martos *et al.*, 1995), técnicas de análisis multivariante como el análisis de componentes principales, correspondencia múltiple y análisis de conglomerados (cluster) (Castel *et al.*, 2003; Pardos y Olivian, 2000; Paz *et al.*, 2003; Rapey *et al.*, 2001; Siegmund-Schultze y Rischkowsky, 2001; Sraïri y Lyoubi, 2003), que incluyen un conjunto de técnicas y métodos que nos permiten estudiar conjuntos de variables en una población de individuos. Por lo anterior, se planteó un estudio para caracterizar explotaciones lecheras de la zona de Vilcún (IX Región-Chile) empleando una metodología multivariada que permite analizar variables técnicas, productivas y características del recurso humano disponibles en las explotaciones.

II.2. MATERIAL Y MÉTODO

II.2. 1. Selección de la muestra y diseño del instrumento de recolección de datos.

El estudio se realizó en la comuna de Vilcún, provincia de Cautín, IX Región, Chile, a partir de la evaluación de 56 explotaciones lecheras en este sector (INE, 1998) de las cuales se muestrearon 24 fundos, lo que representa un 43% de la población. De estos, 11 productores fueron considerados como pequeños con una producción de leche menor a 50.000 L año⁻¹, 7 medianos con una producción de 50.000-100.000 L año⁻¹ y 6 grandes productores lecheros con producciones superiores a 100.000 L año⁻¹. La información fue recogida mediante una encuesta de elaboración propia, siguiendo metodologías establecidas (Anrique, 1999) y descritas en trabajos previos (Avila *et al.*, 2000; Ferrando *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Una vez realizadas las encuestas se tabuló la información y se elaboró una base de datos con las variables que representan la dimensión de las explotaciones y la productividad de las mismas como son: inventario ganadero (número, edad aproximada de las vacas, raza, manejo reproductivo), alimentación de las vacas (manejo del pastoreo y nivel de uso de concentrados), inventario de praderas, cultivos suplementarios y formas de conservación de forraje (números de corte para ensilaje y heno, edad y calidad de las praderas, y niveles de fertilización), aspectos sanitarios del rebaño (terapia de secado), inventario de mano de obra (tiempo dedicado al rubro lechero por cada trabajador, años de educación, capacitación) y nivel tecnológico; como datos que causan mayor impacto productivo en los sistema lecheros en Chile. El modelo matemático sigue un Análisis Factorial, el cual puede ser exploratorio o confirmatorio (Benson y Nasser, 1998; Gorsuch, 1990). El análisis exploratorio se caracteriza porque no se conocen a priori el número de factores y es en la aplicación empírica donde se determina este número. Por el contrario, en el análisis de tipo confirmatorio los factores están fijados a priori, utilizándose contrastes de hipótesis para su corroboración, lo cual corresponde a este trabajo.

Cada variable se expresa como una combinación lineal de factores no directamente observables.

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

$X_{ij} = F_{1i} a_{i1} + F_{2i} a_{i2} + \dots + F_{ki} a_{ik} + V_i$ Siendo:

X_{ij} la puntuación del individuo i en la variable j .

F_{ij} son los coeficientes factoriales.

a_{ij} son las puntuaciones factoriales.

V_i el factor único y se llama especificidad, representando la contribución del factor único a la variabilidad total de X_i .

II.2.2. Análisis estadísticos

Para realizar un adecuado procesamiento estadístico de los datos de las encuestas, se utilizó el método de clasificación multivariado. A cada variable se le asignó un código para su posterior análisis, luego se procedió a su traspaso a una planilla electrónica Microsoft office Excel 2003. Los datos cuantitativos y cualitativos obtenidos a través de la encuesta fueron sometidos a un análisis de parámetros estadísticos descriptivos. Luego los datos cualitativos recopilados fueron sometidos a un análisis de correspondencias simples, que es una técnica de reducción de dimensiones en el contexto de tablas de contingencia. Este método permite estudiar la relación entre variables según las distancias en puntos representados en un plano, el fin es representar gráficamente la relación entre variables. Se trata de una técnica de análisis multivariable, aplicable al análisis de matrices de datos (Vivanco, 1999). El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences SPSS versión 13,0 para Windows (SPSS Inc, Chicago IL, USA) y JMP versión 5,0 (SAS Institute Inc).

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Características de los sistemas lecheros

En el caso de los pequeños y medianos productores tienen un promedio de 160 hectáreas destinadas a la producción de leche; en cambio los grandes productores poseen en promedio de 240 hectáreas destinadas a lechería. El total de productores realiza ordeño mecanizado y dos veces al día, excepto un 8 % que realiza un solo ordeño. Respecto al período de lactancia en el caso de los pequeños productores de leche, se tiene que un 63,6 % de los encuestados mantienen una lactación entre 200-250 días, y sólo un 18,2 % tiene lactaciones entre 250-280 días. Esto contrasta con una óptima lactación estandarizada de 305 a 325 días (Erdman y Varner, 1995). En lo referente a los grandes productores, un 66,7 % declaró tener lactaciones entre los 280-300 días, y el otro 33,3 % mayor a los 300 días. La producción promedio por vaca correspondía a 9 L diarios en el caso de los pequeños y medianos productores y de 14 L para los considerados grandes. La producción de leche en este sector se basa en praderas naturales mayoritariamente, con un manejo de pastoreo continuo en todos los sistemas estudiados.

II.3.2. Análisis Multivariado

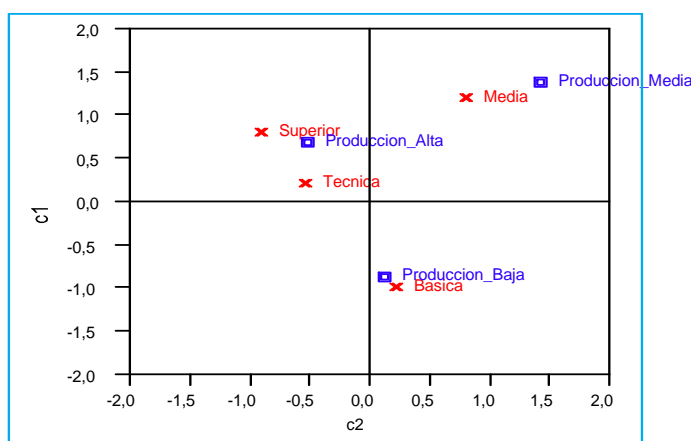
II.3.2.1. Análisis de correspondencia entre producción total de leche y educación del propietario.

La asociación entre estas dos categorías es alta y corresponde a un 86%. De acuerdo a la Figura II.1, existe una mayor cercanía entre los productores con educación superior y una alta producción de leche ($>100.000 \text{ L año}^{-1}$). Así mismo se puede ver que existe una asociación entre los productores con educación media y una producción media de leche ($50.000-100.000 \text{ L año}^{-1}$). También se puede observar una relación entre los productores con educación básica y una baja producción de leche ($<50.000 \text{ L año}^{-1}$). El nivel educacional del productor es una limitante, tanto para tomar decisiones

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

técnicas como administrativas (Gatica, 1985; Lerdon y Aspe, 2000). En este sentido, los individuos más preparados poseen una mayor flexibilidad intelectual y una mayor capacidad de razonamiento, lo que sería un factor positivo para la adopción de nuevas tecnologías (Craig, 1992; Monardes, 1990). Sin embargo, la rentabilidad y la productividad no parecen ser factores importantes en las decisiones de los productores que usan prácticas de gestión de recursos humanos (Stup *et al.*, 2006). Es por ello importante desarrollar programas de extensión para proporcionar a los productores mejores herramientas en la toma de decisiones (Chase, 2006).

Figura II.1. Análisis de correspondencia de producción total de leche y nivel de educación del productor.



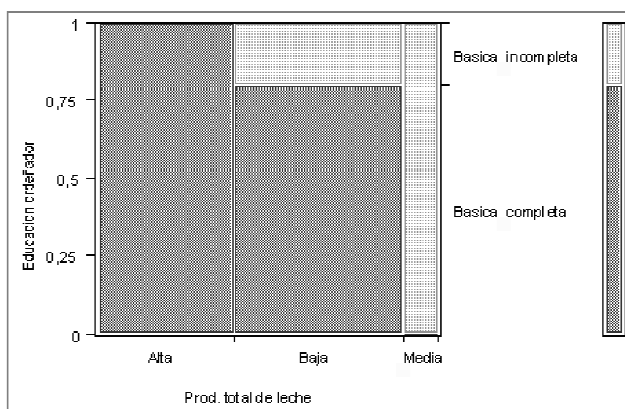
II.3.2.2. Análisis de correspondencia entre educación del ordeñador y producción total de leche

Del total de agricultores encuestados, la categoría de producción total de leche alta (>100.000 L año⁻¹) presenta sólo ordeñadores con estudios de educación básica completa, lo que sumado al nivel de preparación de dueño de la explotación genera mayor adopción de tecnologías y mayor capacidad de respuestas frente a problemas. Los productores considerados medianos presentan solamente ordeñadores con educación básica incompleta. Finalmente en el caso de una producción lechera baja,

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

existe una proporción de ordeñadores con educación básica completa cercana al 80 % en contraste con un 20 % de ordeñadores con educación básica incompleta (Figura II.2). Sin duda que la educación del productor y del ordeñador reduce la vulnerabilidad sanitaria y productiva de un sistema lechero (Moore and Payne, 2007; Stup *et al.*, 2006).

Figura II.2. Gráfico de contingencia de educación del ordeñador y producción total de leche.



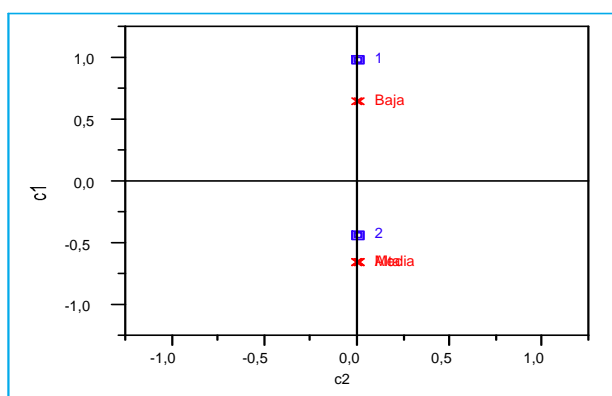
II.3.2.3. Análisis de correspondencia entre número de ordeños diarios y producción total de leche

El análisis de correspondencia entre el número de ordeñas diarios y la producción total de leche muestra un grado de asociación de un 65 %; lo que está indicando una relación alta. De acuerdo a lo observado en la Figura II.3, en el gráfico perceptual existe una mayor relación entre producciones de leche altas y medias superiores a 50.000 L año⁻¹ y realizar dos ordeños al día. Se puede observar que existe una mayor cercanía entre producciones bajas de leche (menor a 50.000 L año⁻¹) con realizar una ordeña diaria. La frecuencia de la ordeña aumenta la producción de leche (Speicher *et al.*, 1994), pasar de un a dos ordeños y a tres ordeños se obtiene más kg día⁻¹ en la medida que se aumenta la frecuencia, siendo similares estos aumentos para

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

vacas primíparas y multíparas (Erdman y Varner, 1995). Actualmente existe una corriente en Nueva Zelanda dado por el bienestar animal de ordeñar una sola vez al día en vez de dos, existiendo diferencia en la producción y en el tamaño de la ubre; sin embargo, en cuanto al nivel de estrés no existe diferencia significativa (Tucker *et al.*, 2007).

Figura II.3. Análisis de correspondencia de número de ordeños diarios y producción total de leche.



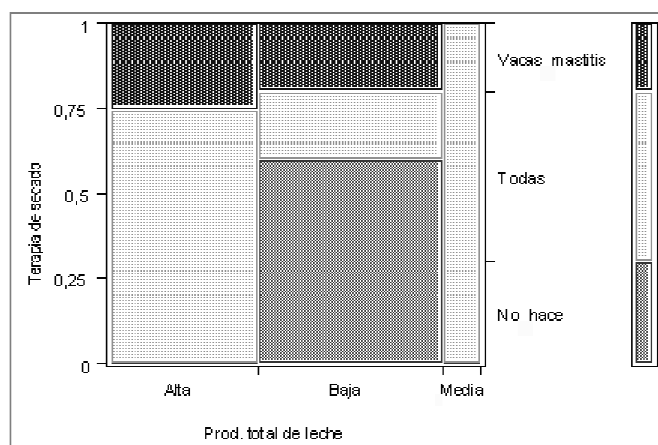
II.3.2.4. Análisis de correspondencia entre terapia de secado y producción total de leche

Del total de los productores lecheros encuestados, en la categoría de producción lechera alta aproximadamente un 75 % realiza terapia de secado a todas las vacas del plantel, en contraste con un 25 % que realiza terapia de secado sólo a las vacas con mastitis. Los productores medianos la totalidad realiza terapia de secado a todas las vacas. En el caso de los productores pequeños, aproximadamente un 60 % no realiza terapia de secado, un 20 % hace terapia de secado a todas las vacas y el otro 20 % sólo a las vacas con mastitis (Figura II.4). La terapia de secado junto con el tratamiento antibiótico al término de la lactación es una de las medidas más ampliamente difundidas en el mundo para el control de la mastitis (Kruze, 1998). Otros autores señalan que la terapia de secado se debería utilizar solo en animales con problemas de mastitis (Philpot, 1999). Todos los productores encuestados practican una terapia de secado de

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

al menos 60 días. La terapia de secado óptima se realiza entre los 40 y 60 días, y existen diferencias productivas de leche corregida al 4 % al acortar el periodo seco (Sorensen y Enevoldsen, 1991). Estudios realizados recientemente señalan que no hay diferencias significativas en la producción de leche corregida y en la ingesta de materia seca entre vacas con periodos secos de 28 días ó de 70 días. Por otro lado se afirma que la eliminación del periodo seco mejora el balance energético y el estado metabólico de los animales (Rastani, 2005).

Figura II.4. Gráfico de contingencia de terapia de secado y producción total de leche.



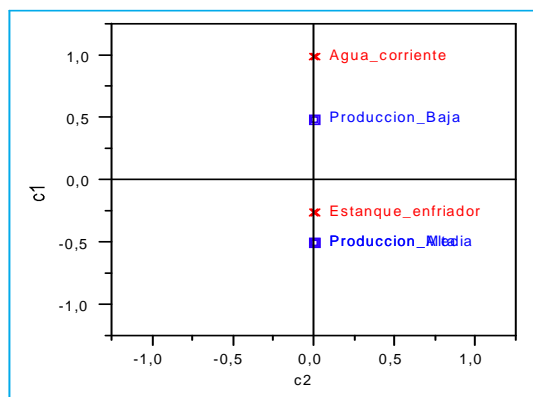
II.3.2.5. Análisis de correspondencia entre producción total de leche y sistema de enfriamiento

En acuerdo con el análisis de correspondencia las variables estudiadas tienen un grado de asociación del 50 %. De acuerdo a la Figura II.5, perceptualmente existe una mayor asociación entre uso del tanque enfriador en los predios con producciones altas y medias de leche. Además, se observa que existe una mayor cercanía entre uso de agua corriente y baja producción lechera. El enfriamiento de la leche es importante, ya que la leche tibia es un medio excelente para el crecimiento de microorganismos y el número aumentará significativamente en un corto período de tiempo si la leche no es

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

enfriada (Philpot, 1999) y por ello el recuento de células somáticas en el tanque pasa a ser un excelente indicador de la sanidad mamaria (Jayara *et al.*, 2004).

Figura II.5. Análisis de correspondencia de producción total de leche y sistema de enfriamiento.

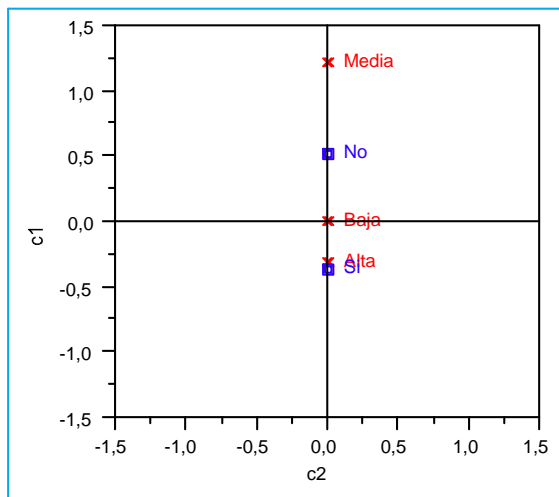


II.3.2.6. Análisis de correspondencia entre registros reproductivos y producción total de leche

La asociación de estas categorías es de un 43 %, lo que indicaría una asociación media a baja (Figura II.6). Al observar esta figura, se puede ver que existe una mayor cercanía entre producciones bajas a medias de leche y el no uso de registros reproductivos, como así también se puede apreciar una mayor proximidad entre producciones altas de leche y el uso de registros reproductivos de los planteles lecheros. Los registros son muy importantes en todo lo que se refiere al manejo del ganado, ya que permiten, por ejemplo, determinar en qué día se debe secar la vaca, determinar la fecha probable de parición de la vaca, adaptar la ración por grupos e ir manejando su condición corporal; ello con el fin de evaluar el ciclo productivo una vez finalizado, lo que sin lugar a dudas permite lograr una mejor gestión y una mejor rentabilidad (Ausín, 2001). Además, es importante usar la información reproductiva en rebaños como herramienta útil en la toma de dediciones comerciales del ganado lechero (Caraviello *et al.*, 2006).

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

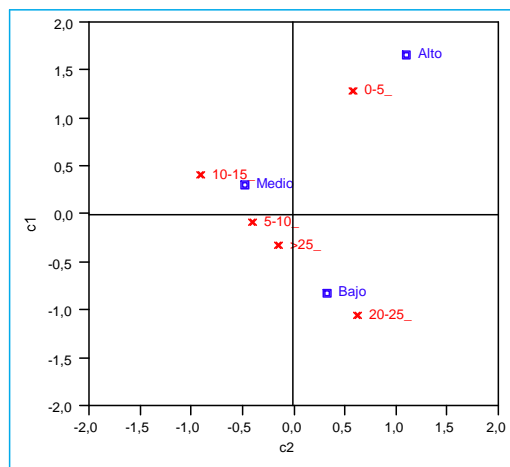
Figura II.6. Análisis de correspondencia de registros reproductivos y producción total de leche



II.3.2.7. Análisis de correspondencia entre mastitis y tiempo como lechero

En acuerdo con el análisis de correspondencia, se observa un grado de asociación entre las categorías medidas es de un 77 %, lo que indicaría una asociación alta. De acuerdo a la figura II.7 se observa que existe una mayor cercanía entre los productores que llevan menos tiempo en el rubro lechero (0-5 años) y un alto nivel de mastitis. Así mismo se puede ver que existe una relación entre los productores más antiguos en el rubro (20-25 años) y un bajo nivel de mastitis en los predios. El resto de las categorías de tiempo como productor lechero tendría una mayor cercanía con niveles de mastitis medios. También se puede observar que los niveles medios a altos de prevalencia de mastitis están asociados a tiempos recientes como productor en el rubro lechero y viceversa.

Figura II.7. Análisis de correspondencias de mastitis y tiempo como lechero.



II.4. REFERENCIAS

- ACERO, R.; MARTOS, J.; GARCÍA, A.; LUQUE, M.; HERRERA, M.; PEÑA, F. 2003. Characterization of extensive goat systems through factorial analysis. International Symposium. Animal Production and natural resources utilization in the Mediterranean Mountain Areas. Grecia: 305.
- ANRIQUE, R. 1999. Caracterización del Chile lechero. En: Producción animal. Serie B-22. Latrille, L (Ed). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 140-157 p.
- AUSÍN, J. 2001. Aprovechados manejos post-parto para mantener la producción y eficiencia. Agroanálisis. Chile. 202: 27-29.
- AVILA, L.; MUÑOS, M.; RIVERA, B. 2000. Tipificación de los sistemas de producción agropecuaria en la zona de influencia del programa UNIR (CALDAS). Universidad de Caldas, Departamento de sistemas de producción. Programa UNIR. pp:231.
- BEDOTTI, D.; GÓMEZ, A.; SÁNCHEZ, M.; GARCÍA A.; MARTOS J. 2005. Aspectos sociológicos de los sistemas de producción caprina en el oeste pampeano (ARGENTINA). Arch. Zoot. . 54: 599-608.
- BENSON, J., NASSER, F. 1998. On the use of factor analysis as a research tool. Journal of Vocational Education Research. 23:13-33.
- CARAVIELLO, D.; WEIGEL, K.; FRICKE, P.; WILTBANK, M.; FLORENT, M.; COOK, N.; NORDLUND, K.; ZWALD, N.; RAWSON, L. 2006. Survey of Management Practices on Reproductive Performance of Dairy Cattle on Large US Commercial Farms. J. Dairy Sci. 89: 4723-4735.
- CASTEL, J.M.; MENA, Y.; DELGADO-PERTÍNEZ, M.; CAMÚÑEZ, J.; BASULTO, J.; CARAVACA, F.; GUZMÁN J.; ALCALDE, M. . 2003. Characterization of semi-extensive goat production systems in southern Spain. Small Rum Res. 47: 133-143.
- CHASE, L.; ELY, L.; HUTJENS, M. 2006. Major Advances in Extension Education Programs in Dairy Production. J Dairy Sci . 89: 1147-1154.
- CRAIG, G. 1992. Capacidades del ser humano. Desarrollo Psicológico. 6° Ed. Universidad de Massachusetts. Estados Unidos. 685 pp.

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

- ERDMAN, R.; VARNER, M. 1995. Fixed Yield Responses to Increased Milking Frequency. *J Dairy Sci.* 78: 1199-1203.
- FERRANDO, A.; ANRIQUE, R.; BALOCCHI, O.; SMITH, R.; OPITZ, H.; ECHEÑIQUE, J. 2002. Caracterización técnico – productiva de las explotaciones ganaderas bovinas de la región de Aysén. XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal, Chillán, Chile. 212. pp.
- GATICA, F. Producción Animal. 1985. Capacitación de agentes de extensión en ganadería. Depto. de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 1-11 pp.
- GORSUCH, R. 1990. Common Factor Analysis versus Component Analysis: Some Well and Little Known Facts. *Multivariate Behavioral Research.* 5:34-42.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS. I.N.E. 1998. Síntesis Estadística Regional, IX Región. Temuco, Chile. 75 p.
- JAYARA O, B.; PILLAI, S.; SAWANT, A.; WOLFGANG, D.; HEGDE, N. 2004. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. *J Dairy Sci* 87: 3561-3573.
- KRUZE, J. 1998. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Arch. Med. Vet..* Vol. 30 (2): 07-16.
- LERDON, J.; ASPE H. 2000. Análisis Económico de 13 Empresas Lecheras de la localidad de Panguipulli. Estudio de Casos. *Agro Sur.* Vol. 28 (1): 1 – 12.
- MAINAR, R.; CUESTA, P.; MÉNDEZ, I.; ASENSIO, M.; DOMÍNGUEZ, L.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. 1994. Caracterización de la explotación ovina y caprina de la C.A.M. mediante encuestas y análisis multivariante: Bases para una planificación en ganadería y sanidad animal. XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C. Burgos. España: 437-443. 22-24 septiembre.
- MARTOS, J.; GARCÍA A.; RODRÍGUEZ, J.; ACERO DE LA CRUZ, R. 1995. Clasificación técnico económica de las explotaciones lácteas de la Campiña Baja Cordobesa. *Arch de Zoot.* Vol 44 (165): 39-48.
- MONARDES, A; COX T; COX M; NIÑO DE ZEPEDA, A; ORTEGA, H. Evaluación de adopción de tecnología. Centro de Estudios para América Latina sobre

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

- Desarrollo Rural, Pobreza y Alimentación (CEDRA). Santiago, Chile. 117 pp. 1990.
- MOORE, D.; PAYNE, M. 2007. An Evaluation of Dairy Producer Emergency Preparedness and Farm Security Education. *J Dairy Sci*: 90: 2052-2057. 2007.
- PARDOS, L.; OLIVIAN, A. Aspectos técnico-económicos de las explotaciones ovinas de la raza Aragonesa. *Ovis*. 68: 53-65. 2000.
- PAZ, R.; LIPSHITZ, H.; ÁLVAREZ, R.; USANDIVARAS, P. 2003. Diversidad y Análisis económico en los sistemas de producción lecheros caprinos en el área de riego del Río Dulce-Santiago del Estero Argentina. *ITEA Vol. 99 (1)*: 10-40.
- PHILPOT, N. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de la leche y la reducción de la mastitis. Curso de perfeccionamiento y mejoramiento de la calidad higiénica de leche en pequeños productores. Osorno, Chile. 13 Octubre 1999. 49-84 pp.
- RAPEY, H.; LIFRAN, R.; VALADIER, A. 2001. Identifying social, economic and technical determinants of silvopastoral practices in temperate uplands: results of a survey in the Massif central region of France. *Agric Syst*. 69: 119-135.
- RASTANI, R.; GRUMMER, R.; BERTICS, S.; GÜMEN, A.; WILTBANK, M.; MASHEK, D.; SCHWAB, M. 2005. Reducing Dry Period Length to Simplify Feeding Transition Cows: Milk Production, Energy Balance, and Metabolic Profiles. *J Dairy Sci* 88: 1004-1014.
- SPEICHER J. A.; TUCKER, H.; ASHLEY, R.W.; STANISIEWSKI, E.P.; BOUCHER, J.F.; SNIFFEN, C.J. 1994. Production Responses of Cows to Recombinantly Derived Bovine Somatotropin and to Frequency of Milking. *J Dairy Sci*. 77: 2509-2517.
- SIEGMUND-SCHULTZE, M.; RISCHKOWSKY, B. 2001. Relating household characteristics to urban sheep keeping in West Africa. *Agrycultural Systems*. 67: 139-152.
- SMITH, R.; MOREIRA, V.; LATRILLE, L. 2002. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. *Revista Agricultura Técnica (Chile)* 62(3): 375-395.

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

- SORENSEN, J. T.; ENEVOLDSEN, C. 1991. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1277–1283.
- SRAÏRI, M. T.; LYOUBI, R. 2003. Typology of dairy farming systems in Rabat Suburban region, Morocco. *Archivos de zootecnia.*52: 47-58.
- STUP R. E.; HYDE, J.; HOLDEN, L.A. 2006. Relationships Between Selected Human Resource Management Practices and Dairy Farm Performance. *J Dairy Sci.* 89: 1116-1120.
- TUCKER C. B.; DALLEY, D. E.; BURKE, K.; CLARK, D.A. 2007. Milking Cows Once Daily Influences Behavior and Udder Firmness at Peak and Mid Lactation. *J Dairy Sci.* 90: 1692-1703.
- VIVANCO, M. 1999. El Análisis de Correspondencia. Análisis estadístico multivariable. Teoría y práctica.. Primera Edición.. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 234 p.

CAPÍTULO II. Caracterización de la producción lechera en sistemas con base en el pastoreo en el sur de Chile

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE ACIDO LINOLEICO CONJUGADO EN ALIMENTOS LÁCTEOS EN CHILE. EFECTO DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE FRESCA EN PRODUCTOS LÁCTEOS.

Se corresponde con los objetivos 2 y 3.

Artículos publicados o enviados para su publicación:

Conjugated linoleic acid content of commercial dairy products in Chile and effect of processing methods.

Juan Pablo Aviléz, Paul Escobar, Cristian Diaz, Gabrielle von Fabeck, Roberto
Matamoros, Fernando García, Marcelo Alonzo, Manuel Delgado-Pertíñez.

Food chemistry. Trabajo enviado para su publicación.

5-Year Impact Factor (IF) = 4,268; 1^{er} cuartil; 6/128 revistas de FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

III. 1. INTRODUCCION

El ácido linoleico conjugado (CLA) representa entre 20 y 28 isómeros del ácido linoleico C18: 2 (Lock y Garnsworthy, 2003) que se ha indicado como uno de los ácidos grasos (AG) más beneficiosos para la salud humana (Pariza y Park, 2001). De todos los isómeros, sólo el *cis*-9, *trans*-11 y el *trans*-10, *cis*-12 han mostrado una actividad biológica interesante (Wahle *et al.*, 2004). El isómero *cis*-9, *trans* 11, también conocido como ácido ruménico, se ha documentado que tiene un efecto anticancerígeno (Visonneau *et al.*, 1997; Aro *et al.*, 2000) y efecto antioxidante (Devery *et al.*, 2001), mientras que el isómero *trans*-10, *cis*-12 es responsable de pérdida de peso y aumento de la masa muscular sin grasa (Gaullier *et al.*, 2004; Malpuech-Brugere *et al.*, 2004). A pesar que se han utilizado una serie de estrategias para estimar la ingesta de CLA total, la evaluación rigurosa del consumo de CLA requiere de más documentación y además hay que conocer la composición de CLA en el suministro de alimentos (Ma *et al.*, 1999).

El CLA se ha encontrado en diversos alimentos como lácteos, carnes, productos vegetales y alimentos de origen marino, sin embargo, los productos de rumiantes como la leche y la carne constituyen la principal fuente de CLA para los seres humanos (Chin *et al.*, 1992). En este sentido y expresado en g de CLA/100 g de AG totales se han señalado cantidades de 0,11 g en carne de conejo, 1,20 g en carne de cordero, 0,09 g en carpa y entre 0,40 y 1,7 g en diversos quesos (Fritsche and Steinhart, 1998). En cambio, en aceites vegetales y en margarinas se ha observado menos de 0,01 g/100 g de AG totales (Fritsche and Steinhart, 1998). La dieta en los animales tiene una influencia importante en el CLA de grasa en leche y ha sido ampliamente investigado (Bauman *et al.*, 2000). Varios estudios nutricionales en rumiantes han sido realizados para aumentar el contenido de CLA en productos animales y para mejorar sus propiedades nutricionales. Por ejemplo, se ha informado de que el forraje fresco y alimentos ricos en aceites aumentan la concentración de CLA (Khanal *et al.*, 2005; Dewhurst *et al.*, 2006). En este sentido, la alimentación de vacas teniendo como base el pastoreo en praderas naturales y mejoradas proporciona altos contenidos de CLA, tanto

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

en leche fresca como en leche procesada (Zlatanov *et al.*, 2002, Avilez *et al.*, 2012). En el caso de Chile se ha estudiado el contenido de ácidos grasos en leche bovina recepcionada en planta y su relación con la estacionalidad anual y el sector geográfico, obteniéndose valores de CLA de 1,75 y 1,41 g/100 g de AG totales en las regiones VIII y IX, respectivamente (Pinto *et al.*, 2002). Sin embargo; en ese estudio sólo se analiza el isómero *cis*- 9, *trans*-11, por lo que se hace necesario conocer el CLA total y de los isómeros en productos lácteos que se comercializan y están disponibles en Chile.

La leche y productos lácteos generalmente sufren diferentes cambios durante su preparación o procesamiento, que pueden incluir tratamientos térmicos moderados o severos y que conducen a cambios no deseables en los lípidos o proteínas (Herzallah *et al.*, 2005). Semma (2002) señala que los lípidos de la leche pueden sufrir cambios químicos y físicos durante el procesamiento y almacenaje, tales como auto-oxidación y formación de ácidos grasos *trans*. Sin embargo; los resultados del efecto de las condiciones de procesamiento, almacenamiento y envasado en el contenido de CLA en diversos tipos de productos lácteos no son claros. En lo que respecta a los quesos, los trabajos presentan los resultados para distintas variedades de éstos, y a menudo se cree que los niveles de CLA pueden variar debido a diferentes condiciones de procesamiento. Herzallah *et al.* (2005) señalan un descenso de CLA de 21 y 53% en los quesos calentados en un horno de microondas durante 5 y 10 min, respectivamente. Sin embargo, estos efectos tienden a ser pequeños, y las variaciones en los niveles de CLA son similares a los niveles en la leche cruda utilizada como materia prima (Gnädig and Sebedio, 2002; Luna *et al.*, 2005). Sin embargo, otros estudios han detectado nuevos isómeros de CLA en quesos madurados (Werner *et al.*, 1992; Lavillonière *et al.*, 1998; Sehat *et al.*, 1998) y se planteó la hipótesis de que la biohidrogenación del ácido linolénico en queso podría conducir a la formación de isómeros de CLA como productos intermedios. En otro estudio (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2007), señalan que los isómeros predominantes de CLA (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-10 CLA, *trans*-12) no se vieron afectados significativamente por el tratamiento, pero una disminución de CLA total en queso fresco se detectó en las muestras después de las 10 semanas de almacenamiento refrigerado. Además, en ese estudio se ha observado que el almacenamiento refrigerado y el tratamiento térmico resultó en una disminución

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

significativa o desaparición de algunos de isómeros de CLA considerados como isómeros que se presentan en pequeña cantidad, y en un aumento significativo de isómeros *trans, trans, cis, trans, trans, cis* y *cis, cis* sobre todo en la leche fortificada en polvo, así como también en la leche fermentada, yogur, leche y jugo en mezcla.

Por lo anterior, es que el objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de CLA total y sus isómeros en productos lácteos de vacuno, como son la leche recepcionada en planta y sus productos derivados de esta para consumo humano (leche en polvo, leche condensada, queso, mantequilla). Con respecto a la leche recepcionada en planta, el estudio se hace en dos regiones importantes en Chile en producción de leche bovina y diferenciada principalmente por el tipo de alimentación de los animales: sistemas basados en el pastoreo (X Región de los Lagos) y sistemas con mayor estabulación y basados en ración total mezclada (TMR) (VIII Región del Bio-Bio). También se ha evaluado el efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos (leche en polvo y leche condensada) sobre el contenido en CLA.

III. 2. MATERIAL Y METODO

III. 2.1. Muestras experimentales

Leche de tanque de recepción. Se tomaron muestras de leche de dos regiones de Chile, con sistemas de producción bovinos lecheros diferenciados principalmente por el tipo de alimentación de los animales: sistemas basados en el pastoreo (X Región de los Lagos) y sistemas con mayor estabulación y basados en TMR (VIII Región del Bio-Bio). De tanques de recepción de leche cruda de la planta NESTLÉ-Chile proveniente de los predios lecheros ubicados en la zona de Osorno (X Región de los Lagos; con 6 tanques de recepción) y en la zona de los Ángeles (VIII Región del Bio-Bio; con 5 tanques de recepción), con una capacidad de 120.000 L y a una temperatura de 8 °C, se tomaron tres muestras de leche de 100 mL cada una cada 15 días en el verano (n=18), otoño (n=18) y primavera (n=18) del año 2004, según protocolo del International Dairy Federation (1995). Estas muestras fueron transportadas al laboratorio ANALACU de la Universidad Católica de Temuco en cajas termo aisladas a una temperatura de 4°C y conservadas a – 80 °C hasta su análisis.

Productos lácteos. Durante los años 2003, 2004 y 2005, se tomaron muestras de leche condensada (peso de cada muestra: 0,40 kg) producidas por la empresa NESTLÉ-Chile ubicada en la zona de Los Ángeles (VIII Región del Bio-Bio) (dos muestras/mes, n = 48) y de leche en polvo (peso de cada muestra: 4 kg) producida por la empresa NESTLÉ-Chile ubicada en la zona de Osorno (X Región de los Lagos) (dos muestras/mes, n=48). Además de supermercados se tomaron muestras de mantequillas (peso de cada muestra: 0,12 kg; n= 14) y quesos Gouda (peso de cada muestra: 1 kg; n = 14) más consumidos en Chile de dos importantes industrias lácteas del sur de Chile. Todas las muestras se enviaron en cajas termo aisladas a 4 °C al laboratorio y conservadas a 4 °C hasta su análisis.

Transferencia de CLA de leche cruda a productos. De tanques de recepción de leche cruda de la planta NESTLÉ-Chile proveniente de los predios lecheros ubicados en la zona de Osorno (X Región de los Lagos; 6 tanques de recepción) y en la zona de Los Ángeles (VIII Región del Bio-Bio; 5 tanques de recepción), con una capacidad de

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

120.000 L y a una temperatura de 8 °C, se tomaron 3 muestras de leche cada 10 días durante 10 meses en el año 2006 (n= 90), según protocolo del International Dairy Federation (1995). Paralelamente se tomaron muestras de los productos procesados de la leche cruda procedente de los tanques anteriores: leche en polvo (tres muestras por mes, n=30) obtenida por evaporación (55-70°C) y atomización (150-250°C) y leche condensada obtenida por evaporación a 100 °C (tres muestras por mes, n= 30). Todas las muestras se enviaron en cajas termo aisladas a 4 °C al laboratorio y conservadas a 4 °C hasta su análisis.

III. 2.2. Contenido de CLA y sus isómeros

Se determinaron los isómeros de CLA (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *Cis*-10 *cis*-12) contenidos en muestras de leche y los productos lácteos. Los lípidos totales se extrajeron por el método de Folch *et al* (1957), utilizando una mezcla de cloroformo y metanol (2:1. V v-1). Los AG se han determinado por cromatografía de gases después de su transesterificación a ésteres metílicos (Morrison y Smith, 1964), como se ha escrito previamente por Avilez *et al.* (2012).

III. 2.3. Análisis estadístico

Para el análisis del contenido de CLA se utilizó el modelo lineal general (GLM) utilizando el programa SPSS 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), incluyendo el efecto fijo del tipo de producto (contenido de CLA en los productos lácteos) o tipo de producto y mes (efecto en el contenido en CLA del procesamiento de la leche fresca en productos Lácteos). Las comparaciones por pares de medias se llevaron a cabo, en cada caso, usando las pruebas de Tukey.

III. 3. RESULTADOS Y DISCUSION

III.3.1. Contenido de CLA en los productos lácteos

En la tabla III.1 se presenta el contenido de CLA en leche cruda de tanque de recepción y el contenido de CLA en productos lácteos. La leche cruda ha presentado valores medios de CLA total entre 1,72 g/100 g de AG totales de la leche de primavera de la zona de Osorno y 0,42 g de la leche de verano de la zona de Los Ángeles. Los productos lácteos presentaron niveles promedios muy variados en cuanto a sus contenidos de CLA total, que van desde 0,88 g/100 g de AG totales en queso hasta 1,50 g en mantequilla, 1,49 g en leche condensada y 1,97 g en leche en polvo. Comparando el contenido de CLA total y sus isómeros entre todos los productos analizados, se puede observar que, excepto para la leche de primavera de la zona de Osorno, los productos lácteos han presentado contenidos significativamente mayores ($p < 0,05$) que la leche cruda. También se puede observar que las cantidades de CLA en leche cruda por estación del año y por región geográfica presentan diferencias significativas ($p < 0,05$), encontrándose mayores niveles de CLA en los silos de primavera y localizados en Osorno, no observándose diferencias en la estación de otoño entre regiones. Por otro lado, se han observado diferencias entre los años analizados en leche condensada y en leche el polvo, encontrándose mayores niveles de CLA en el año 2004 en comparación con los años 2003 y 2005.

En el caso de Chile se ha estudiado el contenido de ácidos grasos en leche bovina recepcionada en planta y su relación con la estacionalidad anual y el sector geográfico, obteniéndose valores de CLA de 1,75 y 1,41 g/100 g de AG totales en las regiones VIII y IX, respectivamente (Pinto *et al.*, 2002). Sin embargo, en ese estudio sólo se analiza el isómero *cis*-9, *trans*-11. A nivel internacional se han señalado valores máximos de CLA en leche cruda de 1,16 g/100 g del total de AG en Alemania (Fritsche y Steinhart, 1998), 0,04 en Francia (Laloux *et al.*, 2007) y 0,72 en Portugal (Martins *et al.*, 2007). Estos valores son más bajos que los encontrados en este estudio tanto en la zona de los Ángeles (0,89 g/100 g del total de AG) como en la zona de Osorno (1,48 g/100 g of total FA). Los valores encontrados en esos países son igualmente más bajos

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

que los obtenidos en Chile en el estudio previo de Pinto *et al.*, (2002), de acuerdo a la estación del año (1,75 en primavera-verano; 1,59 g en otoño-invierno). Sin embargo, los valores de CLA de los trabajos anteriores hacen referencia al isómero *cis-9, trans-11* como único isómero, encontrado en el trabajo de Alemania, al CLA total en el trabajo Francés y a un conjunto de 17 isómeros, con mayor proporción para el *cis-9, trans-11*, en el trabajo de Portugal.

Los valores encontrados en este estudio según la región podrían estar relacionados con los sistemas de producción bovinos lecheros característicos de cada región y principalmente con el tipo de alimentación de los animales. En el caso de la región de Los Lagos donde se localiza Osorno, la alimentación tiene como base la pradera (Balocchi *et al.*, 2001), a diferencia de los sistemas productivos de la región del Bio-Bio donde se localiza Los Ángeles, que son principalmente estabulados. Esto podría explicarse porque los animales con dieta a base de pastoreo tienen mayores concentraciones de CLA en la leche (Butler *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2008), en comparación con los animales con baja alimentación en base a pradera. También las diferencias estacionales en el contenido de CLA pueden estar relacionados con diferencias en la alimentación (principalmente debido a la ingestión y la composición nutricional del forraje) (Dewhurst *et al.*, 2006). Menores contenidos de CLA en la leche se han observado con el consumo de pastos maduros, y este efecto se ha atribuido a la disminución de la calidad y cantidad del forraje (Lock y Garnsworthy, 2003; Ward *et al.*, 2003; Avilez *et al.*, 2012). A este respecto, el contenido de CLA de la leche aumentó en primavera cuando las vacas fueron alimentadas con pastos de mayor calidad (1,2 g/100 g del total de AG), en comparación a verano (0,9 g) y otoño (1,0 g) (Thomson *et al.*, 2003). En los trabajos de los países citados anteriormente no se mencionan ni los lugares de recolección de las muestras, ni los tipos de sistemas productivos utilizados. Para el caso chileno, la cantidad de CLA encontrada en Osorno es de gran importancia ya que la mayor parte de la leche recepcionada en planta viene de ésta región, con un volumen superior al 71% del total la leche nacional (ODEPA, 2010), lo cual indica que la leche cruda y la leche procesada tiene altos niveles de CLA, superior a la señalada en la literatura.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

Tabla III. 1. Contenido de ácido linoléico conjugado (CLA, g/100 g de ácidos grasos) en leche cruda y en productos lácteos

Producto	CLA Total					Isómeros CLA			
	n	Media±ED ⁽²⁾	Mínimo	Máximo	Media±ED	Cis-9, trans-11		Cis-10, cis-12	
						Media±ED	Media±ED	Media±ED	Media±ED
Leche de Estanque¹									
Verano Los Ángeles	18	0.41±0.12 e	0.28	0.49	0.26±0.06 f	0.15±0.06 c	0.00	0.18±0.23 e	0.00
Otoño Los Ángeles	18	0.82±0.08 d	0.74	0.91	0.32±0.15 e	0.33±0.09 b	0.00	0.44±0.02 a	0.00
Primavera Los Ángeles	18	0.93±0.28 d	0.41	1.33	0.49±0.02 d	0.21±0.00 c	0.00	0.41±0.12 d	0.00
Verano Osorno	18	0.61±0.01 e	0.59	0.62	0.40±0.01 e	0.00	0.00	1.19±0.41 a	0.00
Otoño Osorno	18	0.89±0.14 d	0.74	1.01	0.48±0.04 d	0.00	0.00		
Primavera Osorno	18	1.72±0.07 b	0.55	2.96	0.81±0.44 a				
Productos lácteos									
Mantequilla	14	1.50±0.41 b	1.26	2.22	0.92±0.38 a	0.56±0.24 a	0.53±0.21 c	0.41±0.21 d	0.00
Quesos	14	0.88±0.55 d	0.37	1.47	0.47±0.34 d	0.05±0.06 d	0.00	0.55±0.09 c	0.00
Leche condensada 2003	48	1.03±0.24 d	0.73	1.46	0.44±0.15 d	0.00	0.00	0.75±0.29 b	0.00
Leche condensada 2004	48	1.49±0.49 b	1.14	2.20	0.74±0.23 b	0.57±0.60 a	0.10±0.20 f	0.10±0.15 c	0.00
Leche condensada 2005	48	1.31±0.26 c	0.96	1.61	0.79±0.55 b	0.18±0.10 c	0.00	0.57±0.15 c	0.00
Leche en polvo 2003	48	1.43±0.26 b	1.06	2.14	0.68±0.11 c	0.00	0.00	0.10±0.16 f	0.00
Leche en polvo 2004	48	1.97±0.37 a	1.61	2.59	0.97±0.23 a	0.24±0.33 b	0.00	0.54±0.13 c	0.00
Leche en polvo 2005	48	1.46±0.2 b	1.24	1.79	0.73±0.13 b				

Valores de la media en columnas con diferente letras (a, b, c, d) indican diferencia significativas ($p<0.05$).

¹ Las muestras de leche han sido tomadas en dos regiones de Chile, con sistemas de producción bovinos lecheros diferenciados principalmente por el tipo de alimentación de los animales, sistemas basados en el pastoreo (zona de Osorno) y sistemas estabulados y basados ración mezcla total (zona de Los Ángeles)

² ED: desviación estándar

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

En productos lácteos se señalan valores de 0,40 g/100 g del total de AG de CLA en quesos maduros y de 0,29 a 0,71 g en quesos frescos en Alemania (Fritsche y Steinhart, 1998), 0,39, 0,8 y 0,16 g en quesos Beaufort, Blue y Camembert, respectivamente, en Francia (Laloux *et al.*, 2007) y 0,48 g en queso sin tipo específico en Portugal (Martins *et al.*, 2007). Quesos como el Parmesano y el Romano, que tienen una edad de maduración mayor a 10 meses, están entre los quesos con más baja cantidad de CLA (menor a 0,50 g/100 g del total de AG) (Henning *et al.*, 2006). En el caso de la mantequilla se señalan valores de 0,48 (Mir *et al.*, 2003), 0,51 (Laloux *et al.*, 2007) y 0,49 g (Martins *et al.*, 2007), respectivamente, En leche condensada tan sólo se conoce el trabajo de Chin *et al.* (1992), quienes señalan cantidades inferiores a los 0,7 g. En este estudio, los valores obtenidos en estos productos (queso, mantequilla y leche condensada) han sido superiores que los encontrados en los trabajos anteriores.

En este estudio, los productos lácteos han presentado contenidos de CLA significativamente mayores que la leche cruda. Las diferencias en el contenido de CLA en los diferentes productos puede deberse a muchos factores, siendo la cantidad de CLA de la materia prima el más importante (Zlatanov *et al.*, 2002). Otros factores que influyen es el procesamiento de la leche, como consecuencia de reacciones de isomerización durante la elaboración de los alimentos (Lin *et al.*, 1995). No obstante, hasta el momento actual hay pocos trabajos relacionados con el tema, lo que hace necesario investigaciones futuras para establecer una mejor relación causa-efecto.

En la Tabla II.1 se muestra también el contenido de los isómeros CLA. El isómero *cis*-9, *trans*-11 se encuentra en un rango que va de 0,26 g/100 g del total de AG en el silo de leche de verano en la zona de los Ángeles y un máximo de 1,26 g en mantequilla en la zona de Osorno. Este isómero representa un 53% del CLA total, siendo más altos los valores encontrados en la zona de Osorno. En el caso de la leche condensada, este isómero varió entre 0,44 y 0,74 g, dependiendo del año estudiado, mientras que el queso y la mantequilla presentaron unos rangos de 0,37-1,47 y 1,22-2,22 g, respectivamente.

El isómero *trans*-10, *cis*-12 presentó un rango de 0,15 y 0,43 g/100 g del total de AG en los silos de leche, y no se encontró en las muestras de otoño y primavera. En el caso de los productos se encontraron niveles de 0,05 a 0,57 g. El isómero *cis*-10, *cis*-12

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

se encontró en alta proporción en el silo de leche de primavera en la planta de Osorno, en la leche condensada y en la leche en polvo. En relación a la cantidad total de CLA, este isómero alcanzó sobre un 50 % en la leche condensada y en la leche en polvo, siendo el mayor isómero encontrado en Osorno en los silos de primavera.

El isómero *cis*-9, *trans*-11 se encuentra en mayor proporción que el resto de isómeros, alcanzando un 75-90% del CLA total de la leche (Ip *et al.*, 1999), siendo uno de los dos isómeros con acción biológica más conocida. Los contenidos de este isómero obtenidos en el presente estudio en los diferentes productos, han sido superiores que los observados en otros trabajos. En el caso de la leche condensada, la literatura muestra valores de 0,63 (Gagliostro *et al.*, 2002) y de 0,70 g/100 g del total de AG (Shantha *et al.*, 1995). En el queso se señala un rango entre 0,32 y 0,89 g (Campbell *et al.*, 2003), con un promedio de 0,35 g (Martins *et al.*, 2007). Para la mantequilla se observan valores de 0,38 (Martins *et al.*, 2007), 0,94 (Gagliostro *et al.*, 2002) y 1,32 g (Shantha *et al.*, 1995).

El isómero *trans*-10, *cis*-12 estaría presente en cantidades de sólo 3 a 5 % del CLA total en leche (Parodi, 1999) y menos del 1 % en productos lácteos (Martins *et al.*, 2007). En el presente estudio, los valores obtenidos han sido superiores a los señalados en la literatura, lo cual es de destacar dado su importante rol fisiológico. También, los valores obtenidos del isómero *cis*-10, *cis*-12 han sido superiores a los señalados en la literatura. A este isómero no se le ha atribuido ningún efecto beneficioso y en estudios en leche se señalan valores menores del 0,01%, no detectándose ni en mantequilla ni en quesos (Martins *et al.*, 2007). Por ello y dada la alta proporción encontrada en este estudio, es importante determinar su función biológica.

En Alemania el consumo de CLA provenientes de productos lácteos es de 0,24 g/día (Fritsche *et al.*, 1998), en Francia de 0,17-0,21 g d⁻¹ (Laloux *et al.*, 2007) y en Portugal de 0,40-0,72 g d⁻¹ (Martins *et al.*, 2007), sugiriéndose consumos medios óptimos para el hombre de 15-20 g/día (Ritzenthaler *et al.*, 2001) y consumo ricos de 65 g d⁻¹ total (Park *et al.*, 2001). Sin embargo, Ip *et al.* (1999) estimaron que una persona de 70 kg que consume 3,0 g de CLA en el día obtiene un máximo beneficio en su salud.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile. Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

De acuerdo a los valores de CLA encontrados y considerando que el consumo de leche en Chile es de 127 L/persona (ODEPA, 2010), se estima un consumo diario de CLA entre 0,03 y 0,24 g/día.

III.3.2. Transferencia en el contenido de CLA en productos lácteos

Las cantidades de CLA total y de cada uno de los isómeros de la leche líquida recepcionada en planta y de los productos obtenidos a partir de ella, se presentan en la tabla III.2. Se ha obtenido una interacción significativa entre el tipo de producto y el mes de muestreo (Tabla III.3 y Figura III.1). En general, en la leche líquida original se observan mayores contenidos de CLA en los meses de otoño (de marzo a mayo) y primavera (de octubre a diciembre) que en invierno (de junio a septiembre). En cambio, en los productos leche en polvo y leche condensada, se observan mayores valores en los meses de invierno, aunque con mayor variabilidad en estos productos, especialmente en la leche condensada. Por otro lado, tanto para el CLA total como para sus isómeros, la leche condensada presentó en la mayoría de los meses (concretamente en 6 de los 10 meses estudiados) menores valores que la leche líquida original y la leche en polvo. En cambio, la leche en polvo presentó valores cercanos a los de la leche líquida, e incluso en 4-5 meses del estudio presentó valores superiores, coincidiendo la mayoría de ellos con los meses de menor valor (invierno) obtenidos en la leche líquida.

Si bien la variación en la concentración de CLA en los productos lácteos es esencialmente una función de la concentración en la leche cruda, apenas hay trabajos que estudien el efecto de las condiciones de procesamiento, almacenamiento y envejecimiento en el contenido de CLA de varios tipos de productos lácteos, y los resultados obtenidos no son claros. Coakley *et al.* (2007) señalan que los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *cis*-10, *trans*-12 no fueron afectados significativamente por el procesamiento de la leche a queso a través de los procesos estándares de elaboración (pasteurización de la leche y posterior enfriado a 30 ° C; maduración de 6 meses del queso a 8 ° C). Sin embargo, Shantha *et al.* (1992) detectaron una disminución del CLA total en muestras de queso fresco a las 10 semanas de almacenamiento refrigerado (4 °

C). También Herzallah *et al.* (2005) observan disminuciones de CLA total del 21 y 53%, en quesos calentados a $94,3 \pm 1,0$ °C en horno de microondas durante 5 y 10 minutos, respectivamente. Estos autores observan igualmente una disminución de los isómeros *trans* del queso pasteurizados a 63 °C durante 30 minutos o calentados en el microondas a 96 °C durante 5 minutos. La disminución en el contenido de CLA al calentar la leche podría ser debido a la acción de los radicales libres que se forman como resultado de la oxidación de los lípidos (Leung y Liu, 2000). Otros estudios han detectado nuevos isómeros CLA en quesos tras el proceso de maduración (Sehat *et al.*, 1998). Por otra parte, el tratamiento térmico tanto de la leche en polvo (pasteurización HTST- High-temperature, short-time a 95 °C) como del queso fresco (pasteurización a 100 °C durante 30 s), con posterior almacenamiento refrigerado a 4 °C, resultó en una reducción significativa o la desaparición de algunos de los isómeros de CLA que se encuentran en menor proporción y un aumento significativo de los isómeros *trans-trans*, *cis-trans*, *trans-cis* y *cis-cis*, sobre todo en leche en polvo, leche fermentada y yogurt (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2007). En nuestro estudio, el CLA aumentó en la leche en polvo, sobre todo en aquellos meses en los que la leche líquida original presentó menores valores de CLA, lo que podría explicarse por el aumento de los isómeros *trans*, sin embargo solo se analizaron tres isómeros. Sin embargo se necesita mayores estudios para observar el efecto de las condiciones de procesamiento y almacenamiento de la leche y productos lácteos sobre el contenido del CLA.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

Tabla III.2. Contenidos de ácido linoléico conjugado (CLA) en productos lácteos fabricados a partir de leche líquida de vaca durante el período experimental de 2006

CLA (g/100 g ácidos grasos)	Tipo de producto			Effects, <i>p</i> ¹		
	Leche líquida	En polvo	Condensada	T	M	TxM
Total CLA	1.35 ± 0.51	1.45 ± 0.28	0.93 ± 0.61	ns	ns	***
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.58 ± 0.41	0.73 ± 0.16	0.45 ± 0.35	ns	***	***
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.67 ± 0.24	0.72 ± 0.20	0.45 ± 0.19	ns	ns	*
CLA <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12	0.77 ± 0.45	0.56 ± 0.27	0.87 ± 0.13	ns	ns	*

¹T. tipo de producto; M. mes de muestreo; TxM. Tipo de producto x mes interacción; * *P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.001; ns: no significativa. *P*>0,05

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

Tabla III.3. Contenidos de ácido linoléico conjugado (CLA, g/100 g ácidos grasos) en productos lácteos fabricados a partir de leche líquida de vaca durante los meses de muestreo en el período experimental de 2006

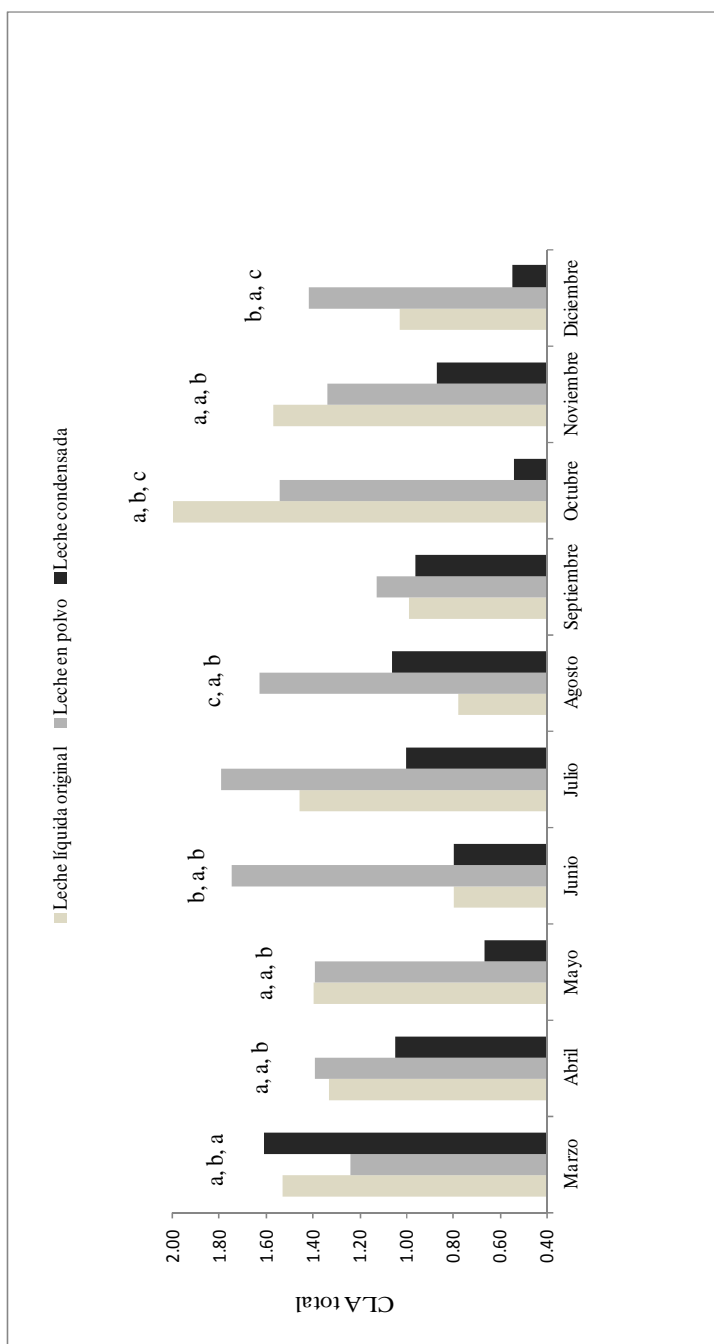
Mes	CLA total			CLA cis-9, trans-11			CLA trans-10, cis-12; CLA cis-10, cis-12		
	Leche cruda	Polvo	Cond. ¹	Leche cruda	Polvo	Cond.	Leche cruda	Polvo	Cond.
Marzo	1.53 B	1.24 B	1.61 A	0.58 b, C	0.58 b, C	0.97 a, A	0.95 a, A	0.66 b, B	0.64 b, A
abril	1.33 B	1.39 B	1.05 B	0.51 b, C	0.81 a, A	0.47 b, C	0.83 a, B	0.59 b, C	0.58 b, A
Mayo	1.40 B	1.39 B	0.67 C	0.67 b, C	0.86 a, A	0.30 c, C	0.70 a, B	0.53 b, C	0.37 c, B
Junio	0.80 C	1.75 A	0.80 C	0.24 b, D	0.84 a, A	0.43 b, C	0.56 b, C	0.90 a, A	0.37 c, B
Julio	1.46 B	1.79 A	1.00 B	1.03 a, B	0.89 a, A	0.58 b, B	0.44 b, C	0.90 a, A	0.43 b, B
Agosto	0.78 C	1.63 A	1.06 B	0.18 c, D	0.78 a, A	0.53 b, B	0.64 b, C	0.85 a, A	0.53 b, B
Septiembre	0.99 B	1.13 C	0.96 B	0.25 b, D	0.50 a, C	0.50 a, C	0.74 a, C	0.63 a, B	0.46 b, B
Octubre	2.15 A	1.54 A	0.54 C	1.32 a, A	0.69 b, B	0.29 c, D	0.82 a, C	0.85 a, A	0.24 b, C
Noviembre	1.57 B	1.34 B	0.87 B	0.41 b, C	0.63 a, B	0.52 a, B	1.16 a, A	0.71 b, B	0.35 c, C
Diciembre	1.03 C	1.42 B	0.55 C	0.40 b, C	0.71 a, B	0.19 c, D	0.63 b, C	0.72 a, B	0.43 c, C

Medias en filas (a, b, c) o columnas (A, B, C, D) con diferencias significativas ($p < 0.05$).

¹ Cond.: leche condensada

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

Figura III.1. Contenidos de ácido linoléico conjugado total (CLA, g/100 g de ácidos grasos) en productos lácteos fabricados a partir de leche líquida de vaca durante los meses de muestreo en el período experimental de 2006. Medias en meses con diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



III. 4. REFERENCIAS

- ARO, A. S., MANNISTO, I., SALMINEN, M.L., OVASKAINEN, V., KATAJA, M., UUSITUPA, P. 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer*, 38, 151-157.
- AVILEZ, J.P., ESCOBAR, P., DIAZ, C., VON FABECK, G., MATAMOROS, R., GARCÍA, F., ALONZO, M., DELGADO-PERTÍÑEZ, M. (2012). Effect of extruded whole soybean dietary concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Jersey cows under pasture conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(2), 409-418
- BALOCCHI, O., PINOCHET, D., WITWER, F., CONTRERAS, P.A., ECHEVERRÍA, R., GUZMÁN, F. (2001). Rendimiento y composición mineral del forraje de una pradera permanente fertilizada con magnesio. *Pesquisa agropecuarias*, 36, 1309-1317.
- BAUMAN, D.E., BAUMGARD, L.H, CORL, B.A., GRIINARI J.M. (2000). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings American Society Animal Science*. Cornell University, Ithaca, N.Y. 14853
- BRUCE, T. C., LIGHTSTONE, F. C. (1999). Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions. *Accounts of Chemical Research*, 32, 127–136.
- BUTLER, G., NIELSEN, J.H., SLOTS, T., SEAL, C., EYRE, M.D., SANDERSON, R., LEIFERT, C. (2008). Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 88, 1431–1441.
- CHIN, S.F., LIU, W., STORKSON, J.M., HA, Y.L., PARIZA, M.W. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 185–197.
- CAMPBELL, W., DRAKE, M.A., LARICK, D.K. 2003. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 43-51.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

- COAKLEY, M.E., BARRETT, J. J., MURPHY, R. P., ROSS, R., STANTON, C. 2007. Cheese Manufacture with Milk with Elevated Conjugated Linoleic Acid Levels Caused by Dietary Manipulation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2919–2927.
- DESTAILLATS, F., JAPIOT, C., CHOUINARD, P. Y., ARUL, J., ANGERS, P. (2005). Rearrangement of rumenic acid in ruminant fats: A marker of thermal treatment. *Journal of Dairy Science*, 88, 1631–1635.
- DEVERY, R., MILLER, A., STANTON, C. 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, 29, 341-344.
- DEWHURST, R.J., SHINGFIELD, K.J., LEE, M.R., & SCOLLAN, N.D. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 168–206.
- FOLCH, J., LESS, H., & SLOANE-STANLEY, G.H. 1957. A simple method for the insolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 726, 497-509.
- Fritsche, J., Steinhart, H. 1998. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods evaluation of daily intake. *Z. Lebensm Unters Forsh*, 206, 77-82.
- GAGLIOSTRO, G.A., VIDAURRETA, L.I., SCHROEDER, G.F., RODRIGUEZ, A., GATTI, P. 2002. Incrementando los valores basales de ácido linoleico conjugado (ALC) en la grasa butirosa de vacas lecheras en condiciones de pastoreo. *Revista Argentina Producción Animal*. 22 (Suplem. 1); 59-60.
- GAULLIER, J. M., HALSE, J., HOYE, K., KRISTIENSEN, K., FAGERTUN, H., VIK, H., GUDMUNDSEN, O. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 year reduces body fat mass in healthy overweight humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1118–1125.
- Gnädig, S., Sébédio, J.L. 2002. Relation between CLA contents in milk and in ripened cheese. XXVI IDF World Dairy Congress, Paris, France.
- HENNING, D.R., BAER, R.J., HASSAN, A.N., DAVE, R. 2006. Major Advances in Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal of Dairy Science*, 89, 1179-1188.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

- HERZALLAH, S.M., HUMEID, M.A., AL-ISMAIL, K.M. 2005. Effect of heating and processing methods of milk and dairy products on conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid isomer content. *Journal of Dairy Science*, 88, 1301–1310.
- International Dairy Federation. 1995. Milk and milk products-Guidance on sampling. FIL-IDF Standard 50 C. Int. Dairy Fed. Brussels, Belgium.
- IP, C., BANNI, S., ANGIONI, E., CARTA, G., MCGINLEY, J., THOMPSON, H.J., BARBANO, D., BAUMAN D. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *Journal of Nutrition*, 129, 2135–2142.
- KHANAL, R.C., DHIMAN, T.R., URE, A.L., BRENNAND, C.P., BOMAN, R.L., MCMAHON, D.J. 2005. Consumer Acceptability of Conjugated Linoleic Acid-Enriched Milk and Cheddar Cheese from Cows Grazing on Pasture. *Journal of Dairy Science*, 88, 1837-1847.
- LALOUX, L., DU CHAFFAUT, L., RAZANAMAHEFA, L., LAFAY, L. 2007. *Trans* fatty acid content of foods and intake levels in France. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 918–929.
- LAVILLONNIÈRE, F., MARTIN, J.C., BOUGNOUX, P., SÉBÉDIO, J. L. 1998. Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 343–352.
- Leung, Y.H., Liu, R.H. 2000. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid isomer. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 5469–5475.
- LIN, H.D., BOYLSTON, M.J., CHANG, L.O., LUEDECKE, H., SHULTZ, T.D. 1995. Survey of the Conjugated Linoleic Acid Contents of Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 78 (11) 2358-2365.
- LOCK, A.L., GARNSWORTHY, P.C. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science*, 74, 163–176.
- LUNA, P., DE LA FUENTE, M. A., JUAREZ, M. 2005. CLA unprocessed cheeses during the manufacturing stages. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53, 2690–2695.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

- Ma, D.W., WIERZBICKI, A.A., FIELD, C.J., CLANDININ, M.T. 1999. Conjugated linoleic acid in Canadian dairy and beef products. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 47, 1956–1960.
- MARTINS, S.V., LOPES, P.A., ALFAIA, C.M., RIBEIRO, V.S., GUERREIRO, T.V., FONTES, C.M., CASTRO, M.F., SOVERAL, G., PRATES, J.A. 2007. Contents of conjugated linoleic acid isomers in ruminant-derived foods and estimation of their contribution to daily intake in Portugal. *British Journal of Nutrition*, 98, 1206-1213.
- MALPUECH-BRUGERE, C. W., VERBOEKET-VAN DE VENNE, H. G., MENSINK, R. P., ARNAL, M. A., MORIO, B., BRANDOLINI, M., SAEBO, A., LASSEL, T. S., CHARDIGNY, J. M., SÉBÉDIO, J. L., BEAUFRERE, B. 2004. Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obesity Research*, 12, 591–598.
- MIR, P.S., OKINE, E.K., GOONEWARDENE, L., HE, M.L., MIR, Z. 2003. Effects of synthetic conjugated linoleic acid (CLA) or bio-formed CLA as high CLA beef on rat growth and adipose tissue development. *Canadian Journal of Animal Science*, 83 (3), 583-592.
- MORRISON, W.R., SMITH, L.M. 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600-608.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) 2010. Estadísticas agropecuarias. Santiago: ODEPA. Disponible en URL: <http://www.odepa.gob.cl>.
- PARIZA, M.W., PARK, M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40, 283-298.
- PARK, Y., ALBRIGHT, K.J., CAI, Z.Y., PARIZA, M.W. 2001. Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl) diazomethane. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49, 1158–1164.
- PARODI, P.W. 1999. Conjugate linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 82, 1339-1349.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

- PINTO, M., RUBILAR, C., & CARRASCO, E. 2002. Efecto estacional y del área geográfica en la composición de ácidos grasos en la leche de bovinos. *Agro sur*, 30 (2), 75-90.
- REGO, O.A., ROSA, H.J., REGALO, S.M., ALVES, S.P., ALFAIA, C.M., PRATES, J.A., VOUZELA, C.M., BESSA, R.J. 2008. Seasonal changes of CLA isomers and other fatty acids of milk fat from grazing dairy herds in the Azores. *Journal of Science Food and Agriculture*, 88, 1855–1859.
- RITZENTHALER, K.L., MCGUIRE, M.K., FALEN, R., SHULTZ, T.D., DASGUPTA, N., MCGUIRE, M.A. 2001. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *Journal of Nutrition*, 131, 1548–1554.
- RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L.M., FONTECHA, J. 2007. Hot Topic. Fatty Acid and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomer Composition of Commercial CLA-Fortified Dairy Products: Evaluation After Processing and Storage. *Journal of Dairy Science*, 90, 2283-2290.
- SEHAT, N., KRAMER, J.K.G., MOSSOBA, M. M., YURAWECZ, M. P., ROACH, J. A. G., EULITZ, K., MOREHOUSE, K. M., KU, Y. 1998. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, 33, 963–971.
- SEMMA, M. 2002. *Trans* fatty acids: Properties, benefits and risks. *Journal Health Science*, 48, 7-13.
- SHANTHA, N. C., RAM, L. N., O'LEARY, J., HICKS, C. L., DECKER, E. A. 1995. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *Journal Food Science*, 60, 695–697.
- SHANTHA, N.C., DECKER, E.A., & USTUNOL, Z. 1992. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 425–428.
- SEHAT, N., RICKERT, R., MOSSOBA, M.M., KRAMER, J.K.G., YURAWECZ, M.P., ROACH, J.A.G. 1999. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids*, 34, 407–413.

- THOMSON, N.A., CHAND, A., KAY, J.K. 2003. Predicting Δ^9 -desaturase activity and the association with conjugate linoleic acid (ALC) concentration in bovine milk. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 63, 25-30.
- VISONNEAU, S., CESANO, A., TEPPER, S.A., SCIMECA, J.A., SANTOLI, D., KRITCHEVSKY, D. 1997. Conjugated linoleic Acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID Mice. *Anticancer Research*, 17, 969-973.
- WARD, A.T., WITTENBERG, K.M., FROEBE, H.M., PRZYBYLSKI, R., MALCOLMSON, L. 2003. Fresh Forage and Solin Supplementation on Conjugated Linoleic Acid Levels in Plasma and Milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 1742-1750.
- WAHLE, K. W., HEYS, S. D., ROTONDO, D. 2004. Conjugated linoleic acids: Are they beneficial or detrimental to health?. *Progress Lipid Research*, 43, 553–587.
- WERNER, S. A., LUEDECKE, L. O., SHULTZ , T. D. 1992. Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: Effects of cheese cultures, processing and aging. *Journal of Food Chemistry*, 40, 1817–1821.
- ZLATANOS, S., LASCARIDIS, K., FEIST, C., SAGREDOS, A. 2002. CLA content and fatty acids composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 78, 471–477.

CAPÍTULO III. Caracterización de los niveles de CLA) en alimentos lácteos en Chile.
Efecto del procesamiento de la leche fresca en productos lácteos

CAPÍTULO IV

ESTRATEGIAS DE MEJORA DEL CONTENIDO EN ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO EN LECHE EN SISTEMAS BOVINOS A BASE DE PASTOREO MEDIANTE EL EMPLEO DE SEMILLAS OLEAGINOSAS (SOJA Y CANOLA)

Se corresponde con los objetivos 4 y 5.

Artículo publicados o enviados para su publicación:

Effect of extruded whole soybean dietary concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Jersey cows under pasture conditions.

Juan Pablo Aviléz, Paul Escobar, Cristian Diaz, Gabrielle von Fabeck, Roberto Matamoros, Fernando García, Marcelo Alonzo, Manuel Delgado-Pertíñez.

Spanish Journal of Agricultural Research 2012 10(2), 409-418.

5-Year Impact Factor (IF) = 0,724;2º cuartil; 24/57 revistas de AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY

Effect of rape seed (*Brassica napus*) dietary concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Frison Negra Chilena cows under pasture conditions

Juan Pablo Avilez, Gabrielle von Fabeck, Fernando Garcia, Marcelo Alonzo.
Manuel Delgado-Pertíñez

Spanish Journal of Agricultural Research. Trabajo enviado para su publicación.

IV. 1. INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (CLA) representa entre 20 y 28 isómeros del ácido linoleico C18: 2 (Lock and Garnsworthy, 2003) que corresponde a uno de los ácidos grasos más beneficiosos para la salud humana (Pariza y Park, 2001). De todos los posibles isómeros, sólo los ácidos *cis-9*, *trans-11* y *trans-10*, *cis-12* han mostrado una actividad biológica interesante (Wahle *et al.*, 2004). El isómero *cis-9*, *trans-11*, también conocido como ácido ruménico, se ha documentado que tiene acción anticancerígena (Aro *et al.*, 2000) y antioxidante (Devery *et al.*, 2001), mientras que el isómero *trans-10*, *cis-12* es capaz de disminuir la grasa corporal y aumentar la masa corporal magra.

La alimentación es el factor con mayor influencia en la cantidad de CLA en leche, el cual ha sido ampliamente investigado (Bauman *et al.*, 2001). Muchos de estos estudios nutricionales han sido dirigidos a aumentar el contenido de CLA en productos animales y con ello mejorar sus propiedades nutricionales. Se ha documentado cómo el consumo de forrajes frescos y alimentos ricos en aceites aumentan la concentración de CLA (Khanal *et al.*, 2005; Dewhurst *et al.*, 2006). En este sentido, el CLA de la leche y carne de rumiantes puede ser aumentado con dietas a base de pastos (Khanal *et al.*, 2005), siendo el pastoreo uno de los factores dietarios más importantes que lo afecta.

Con respecto a la suplementación con semillas de oleaginosas, la soja (*Glycine max*) ha sido estudiada como ingrediente en dietas TMR en diferentes proporciones, observándose que el tratamiento de semillas (tostado o de extrusión) resulta en un mayor aumento en el contenido de CLA, comparado con el uso de semillas intactas (Chouinard *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados en los efectos de la suplementación de soja y el contenido de CLA en la leche en sistemas de alimentación basada en forraje fresco son contradictorios,

En este sentido, hay estudios que no encontraron efectos sobre la concentración de CLA en la leche al adicionar soja en la dieta (Bartolozzo *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2005), mientras que otros trabajos observaron un aumento en el uso de CLA en ganado lechero y de carne (Lawless *et al.*, 1998; Paradis *et al.*, 2008). También dentro de las semillas de oleaginosas, la colza o raps canola (*Brassica napus*) se ha utilizado en las dietas TMR en vacas lecheras (Bayourthe *et al.*, 2000; Chouinard *et al.*, 2001, Ward *et al.*, 2002; Chichlowski *et al.*, 2005), con diversos efectos en la cantidad de CLA en

leche. Sin embargo, no se conocen trabajos que evalúen el efecto de esta semilla en animales sometidos a pastoreo como dieta base.

Por otro lado, otros factores tales como la raza, periodo de lactación y la edad al parto afectan el contenido de CLA en la grasa de la leche, pero han sido menos estudiados. Así por ejemplo, Kelsey *et al.* (2003) observaron que al comparar las razas Holstein y Brown Swiss, la edad al parto y los días de producción de leche presentaron una variación de <0,1, <0,3 y <2,0 % en la concentración de CLA en la grasa láctea, respectivamente. También se ha documentado que la concentración de CLA en la leche de vacas Jersey fue un 18 % menor que la observada en vacas Holstein (White *et al.*, 2001). En el caso chileno, la raza Friesian Negro Chileno (Holstein X Overo Negro) es la raza más importante y produce casi el 80 % de la leche recibida en plantas, pero la incorporación de ganado Jersey en las explotaciones lecheras se ha incrementado en la última década, debido al alto contenido de sólidos totales de la leche producida (INE, 2007). No obstante y respecto al contenido de CLA en la leche, son pocos los estudios realizados en estas razas.

Aunque los alimentos funcionales se han considerado un área prometedora para la salud humana (Starling, 2002), a menudo se ha observado que los consumidores esperan productos de valor añadido sin costo adicional sustancial, lo que sugiere que el desarrollo de enfoques de bajo costo será importante (Dewhurst *et al.* , 2006).

En el caso de las oleaginosas, la soja es un alimento importado en la mayoría de los países como en Chile, y está siendo ampliamente usado en alimentación animal, a pesar del alto precio en el mercado. Por otra parte, en la Región Araucanía en los últimos años ha aumentado el área cultivada de raps canola, haciendo del grano y el subproducto de la industria aceitera un alimento económico para la alimentación animal, sobre todo en vacas de lechería (INE, 2007). Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores, los objetivos del presente capítulo han sido evaluar en sistemas con alimentación a base de pastos, el efecto de dietas con soja (0.5 and 1.0 kg d⁻¹) en vacas de raza Jersey y el efecto de dietas con raps canola en grano entero, molido y grano entero agregado en el concentrado en vacas de raza Friesian Negro Chileno, en la producción, calidad nutricional de la leche (especialmente sobre la cantidad de CLA total y sus isómeros) y el perfil metabólico.

IV. 2. MATERIAL Y MÉTODO

IV. 2.1. Animales y dietas con soja

El ensayo se llevó a cabo en una granja en el sector Entre Lagos comuna de Osorno (Chile), cumpliendo con los principios y normas específicas sobre el cuidado de los animales y el bienestar animal según la ley de Chile (SAG 2010). El predio estaba ubicado a unos 72° 36 '24" de longitud W y 40° 41' 26" S de latitud, El predio se encuentra en la precordillera de los Andes chilenos, X Región, que se caracteriza por una precipitación media de 2.250 mm por año, con una temperatura promedio de 21.8 ° C en enero y 3 ° C en agosto.

Se utilizaron animales Jersey bajo sistema de alimentación a pastoreo más concentrado, desde el 15 de noviembre de 2005 al 25 de enero 2006 (estación de primavera). La duración del estudio fue de 75 días, de los cuales los primeros 15 días fueron de adaptación a cada una de las dietas experimentales (periodo pre-experimental). Del hato completo de 90 animales, se seleccionaron aleatoriamente 21 vacas con número de partos entre 2 y 7, con una condición corporal de $2,75 \pm 0,7$, sin problemas sanitarios, con una producción media de leche de $18,45 \pm 3,7$ kg d⁻¹ y entre 60 y 120 días en lactación (DIM $92 \pm 4,6$). Las vacas fueron seleccionados para el estudio sobre la base de la producción de leche anterior con el fin de hacer tres grupos homogéneos de 7 animales cada uno y a cada grupo se le asignó una dieta o tratamiento en función del nivel de soja extruida incorporado al concentrado de la ración: control sin soja (0TS), con soja al 11 % (0,5 kg d⁻¹, 11TS) y con soja al 20 % (1 kg d⁻¹, 20TS). A cada animal se le suministró 5 kg d⁻¹ de concentrado isoenergético (Tabla IV.1), distribuido dos veces en la sala de ordeña, en la mañana a las 6 h y en la tarde a las 16 h, asegurándose del consumo total del concentrado. La alimentación base de forraje para los 21 animales fue una pradera polifítica natural mejorada predominando especies gramíneas sobre leguminosas (*Lolium perenne* 70 %, *Trifolium repens* 25 %, *Bromas sp.*), manejada con pastoreo rotativo en franjas, con cerco eléctrico, en dos parcelas de 18 hectáreas cada una, siendo trasladados los animales

CAPÍTULO IV. Estrategias de mejora del contenido de CLA en leche

de una franja a otra cada 24 h. Las dietas fueron formuladas de acuerdo a los requerimientos para los animales del NRC (2001).

Tabla IV.1. Ingredientes y composición química de los concentrados en las dietas con soja

	Tratamientos (concentrados suplementados) ^a		
	0TS	11TS	20TS
Ingredientes (kg d⁻¹)			
Soja en el concentrado	-	0,50	1,00
Grano triticale	0,95	0,30	0,30
Afrecho de trigo	1,15	2,50	2,90
Grano maíz	2,50	1,50	0,70
Afrecho de raps	0,35	0,15	-
Fosfato tricálcico	-	0,05	0,05
Bicarbonato de sodio	0,05	-	0,05
Composición química (% Base MS)			
Proteína bruta	16,7	19,0	21,0
Fibra bruta	13,6	8,5	9,0
Fibra detergente neutro	32,1	31,3	32,3
Extracto etéreo	2,6	3,4	4,5
Energía Metabolizable (Mcal kg ⁻¹) ^b	3,01	3,03	3,04

^a grupo control sin soja (0TS), grupo con soja 0,5 kg d⁻¹ (11TS), y grupo con soja 1,0 kg d⁻¹ (20TS)

^b Estimado de acuerdo a NRC (2001)

IV. 2.2. Animales y dietas con raps canola

Se realizaron tres experimentos en tres sectores representativos de la zona sur de Chile, cumpliendo con los principios y normas específicas sobre el cuidado de los animales y el bienestar animal según la ley de Chile (SAG 2010). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando la raza Frisón Negra Chilena y bajo sistema de alimentación a base pradera. Las dietas experimentales fueron formuladas de acuerdo a los requerimientos para los animales del NRC (2001). La duración de cada estudio fue de 60 días, de los cuales los primeros 15 días fueron de adaptación a cada una de las dietas.

Experimento 1. El estudio se llevo a cabo en Vilcún (IX Región de Chile, localizado aproximadamente 38° 39' 0" S de latitud y 72° 14' 0" W longitud, en la precordillera de los Andes chilenos, caracterizado por una precipitación media de 1.400 mm por año, con una temperatura promedio de 23,6 ° C en enero y 1,5 ° C en agosto. La altitud es de 950 m sobre el nivel del mar. Este ensayo fue realizado en los meses de noviembre y diciembre. Del hato completo de 122 vacas se seleccionaron 14 vacas con el fin de hacer dos grupos homogéneos de 7 animales cada uno, con número de partos entre 2 y 7 ($3,6 \pm 0,8$), con una condición corporal de $2,50 \pm 1,0$, sin problemas sanitarios, con una producción media de leche de $13,75 \pm 1,2$ kg d⁻¹ y entre 20 y 60 días en lactación (DIM $45 \pm 10,7$). A cada grupo se le asignó una dieta en función de la incorporación o no de canola en grano entero más concentrado como complemento de la ración: al grupo control se le suministró 5 kg d⁻¹ de concentrado comercial sin canola (0-TC1) y grupo tratamiento al que se le suministró 3,75 kg d⁻¹ de concentrado comercial más 1,16 kg d⁻¹ canola en grano (1,16-TC1) (Tabla IV.2). Los concentrados se distribuyeron en dos porciones en comederos individuales en la sala de ordeña, en la mañana a las 6:00 h y en la tarde a las 14:30 h, asegurándose del consumo total del concentrado. La alimentación base para los 14 animales fue pradera natural (mezcla de *Trifolium*, *Dactylis glomerata*, *Bromus*, *Lolium*, *Taraxacum officinale*, *Palntago lanceolata* mayoritariamente) y pradera natural mejorada, la cual fue fertilizada y además regenerada con ballica (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), más 6,0 kg d⁻¹ de MS (materia seca) de ensilaje promedio de ballica-avena (*Lolium perenne-Avena sativa*) (Tabla IV.2). El pastoreo fue de tipo continuo en un área de 57 hectáreas con 8 potreros (1 de 8 hectáreas, 5 de 6 hectáreas y 2 de 9,5 hectáreas), con un cambio de franja, según necesidad, dejando 5 cm la altura residual de planta.

Experimento 2. El estudio se ha llevado a cabo en San Pablo (X Región of Chile, aproximadamente a 40° 24' 0" S de latitud y 73° 1' 0" W de longitud), en un predio que se encuentra en el valle central de Chile, caracterizado por una precipitación media de 1.380 mm por año, con una temperatura promedio de 23,4 ° C en enero y 4,2 ° C en agosto. La altura es de 65 metros sobre el nivel del mar. Este estudio fue realizado entre los meses de octubre y Noviembre, contando el predio con 230 animales. Del hato completo se seleccionaron 20 vacas con el fin de hacer dos grupos homogéneos de 10

animales cada uno, con número de partos entre 2 y 5 ($2,2 \pm 0,8$), con una condición corporal de $2,75 \pm 0,50$; con una producción media de leche de $29,50 \pm 5,8 \text{ kg d}^{-1}$ y entre 20 y 60 días en lactación (DIM $44 \pm 10,7$). Se formaron 2 grupos de 10 animales cada uno y a cada grupo se le asignó una dieta en función de la incorporación o no de canola en grano molido más concentrado como suplemento de la ración: al grupo control se le suministró 8 kg d^{-1} de concentrado comercial sin canola (0-TC2) y al grupo tratamiento se le suministró $6,2 \text{ kg d}^{-1}$ de concentrado comercial más $1,2 \text{ kg d}^{-1}$ de canola en grano molido (1,2-TC2) (Tabla IV.3). Los concentrados se distribuyeron en dos porciones en comederos individuales en la sala de ordeña, en la mañana a las 4:30 h y en la tarde a las 15:30 h., asegurándose del consumo total del concentrado. La alimentación para los 20 animales fue pradera mejorada a base de ballica-trébol (*Lolium perenne*, *Trifolium repens*) (Tabla IV.3). Los animales pastoreaban en 10 parcelas de 0,5 hectáreas cada una, con un sistema rotacional y con cerco eléctrico. Los animales fueron transferidos de una franja a otra cada 12 ó 24 h.

Experimento 3. El estudio se ha llevado a cabo en Vilcún (IX Región de Chile), en un predio con 342 animales. Del hato completo se seleccionaron 20 vacas con el fin de hacer grupos homogéneos de 10 animales cada uno, con número de partos entre 2 y 6 ($3,3 \pm 0,5$), con una condición corporal de $2,75 \pm 0,25$, sin problemas sanitarios, con una producción media de leche de $15,35 \pm 2,6 \text{ kg d}^{-1}$ y entre 20 y 60 días en lactación (DIM $32 \pm 8,4$). Se formaron 2 grupos de 7 animales cada uno y a cada grupo se le asignó una dieta en función del porcentaje de incorporación de semilla entera de canola en el concentrado suplementado de la ración: control sin canola (0-TC3) y con canola al 20 % ($1,2 \text{ kg d}^{-1}$, 1,2-TC3) (Tabla IV.4). A cada grupo se le suministró 6 kg d^{-1} de concentrado distribuyéndose en dos porciones en comederos individuales en la sala de ordeña, en la mañana a las 5:30 h y en la tarde a las 15:30 h. La alimentación base para los 20 animales fue ensilaje de avena (*Avena sativa*) y ballica-trébol (*Lolium perenne*, *Trifolium repens*) de 6 kg d^{-1} promedio, col forrajera (*Brassica oleracea*) con un $1,5 \text{ kg d}^{-1}$ de consumo y pradera artificial compuesta por Avena y Ballica-Trébol (Tabla IV.4) Los animales pastaron en potreros de 20 hectáreas cada uno, y logró con vallas de rotación strip-pastoreo y eléctricos. Los animales fueron transferidos de una tira al otro cada 12 h.

Tabla IV.2, Ingredientes y composición química de los concentrados suplementados y del forraje en el experimento 1 con Raps canola

Ingredientes (kg d ⁻¹)	Tratamientos ^a		Grano Canola	Pradera Natural ^b	Pradera mejorada ^c	Ensilaje ^d
	0-TC1	1,16-TC1				
Grano de Raps canola		1,16				
Concentrado comercial ^e	5,00	3,75				
Composition química (% Base MS)						
MS (%)	86,7	87,3	88,1	33,7	17,7	17,3
Proteína bruta	18,1	19,1	21,1	10,1	20,2	11,0
Extracto etéreo	3,4	7,8	22,9	0,1	0,8	0,6
Fibra detergente neutro	40,0	37,8	30,7	43,1	50,7	54,7
Fibra detergente ácida	17,0			23,8	29,6	35,3
Fibra bruta	14,0	21,9	48,4	26,5	16,5	38,9
Cenizas	5,6	5,0	3,3	4,0	4,4	1,1
Energía metabolizable (Mcal kg ⁻¹) ^f	2,80	2,85	3,02	2,42	2,61	2,27

^a 0-TC1: Grupo control con concentrado comercial sin canola (5 kg d⁻¹); 1,16-TC1: Grupo tratamiento con concentrado comercial 3,75 kg d⁻¹ más 1,16 kg d⁻¹ de canola en grano

^b Compuesta de *Trifolium*, *Dactylis glomerata*, *Bromus*, *Lolium*, *Taraxacum officinale* y *Plantago lanceolata*

^c Compuesta de *Lolium perenne* y *Trifolium repens*

^d Compuesta de *Lolium perenne* y *Avena sativa*

^e Maíz, Afrecho, germen de gluten, gluten, vitaminas y minerales premix

^f Estimada de acuerdo a NRC (2001)

Tabla IV.3, Ingredientes y composición química de los concentrados suplementados y del forraje en el experimento 2 con Raps canola

Ingredientes (kg d ⁻¹)	Tratamiento ^a		Pradera mejorada ^b
	0-TC2	1,2-TC2	
Canola molida		1,2	
Concentrado Comercial ^c	8,0	6,2	
Composición química (% MS)			
MS (%)	89,1	88,4	13,9
Proteína bruta	14,0	15,1	23,9
Extracto étéreo	4,0	7,0	1,6
Fibra detergente neutra	38,5	37,2	48,6
Fibra detergente ácida	16,2		24,5
Fibra bruta	7,9	14,4	25,2
Cenizas	3,2	3,2	7,0
Energía Metabolizable y (Mcal kg ⁻¹) ^d	3,00	3,02	2,34

^a 0-TC2: Grupo control con concentrado comercial sin canola (8 kg d⁻¹); 1,2-TC2: Grupo tratamiento con 6,2 kg d⁻¹ de concentrado comercial más 1,2 kg d⁻¹ de grano de canola molida

^b Compuesta de *Lolium perenne* y *Trifolium repens*

^c Grano cereales, gluten, melaza, afrecho, harina, vitaminas y minerales

^d Estimado de acuerdo a NRC, 2001)

Tabla IV.4. Ingredientes y composición química de los concentrados suplementados y del forraje en el experimento 3 con Raps canola

	Tratamiento ^a		Pradera Artificial ^b	Col Forrajera	Ensilaje ^c
	0-TC3	1,2-TC3			
Ingredientes del concentrado (kg d ⁻¹)					
Canola grano		1,2			
Triticale grano	2,8	0,6			
Afrecho Trigo	0,6	2,0			
Maíz Grano	0,3	0,6			
Lupino	2,3	0,6			
Cebada brote		1,0			
Composition química (% Base MS)					
MS (%)	88,6	87,2	17,4	15,2	24,3
Proteína bruta	16,9	17,4	24,2	22,6	10,5
Extracto etéreo	4,4	7,7	1,5	1,8	1,7
Fibra detergente neutra	44,3	40,4	25,0	36,5	52,3
Fibra detergente ácida	18,2	16,7	42,0	26,6	42,1
Fibra bruta	9,7	10,6	18,3	13,2	34,4
Genizas	6,3	6,5	9,0	11,5	6,4
Energía Metabolizable (Mcal kg ⁻¹) ^d	3,01	3,02	2,43	2,47	2,17

^a 0-TC3: Grupo control con concentrado comercial (6 kg d⁻¹) y sin canola ; 1,2-

TC3: grupo tratamiento con 6 kg d⁻¹ de concentrado comercial con 20% de canola (1,2 kg d⁻¹),

^b Compuesta de *Avena sativa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*

^c Compuesta de *Avena sativa*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*

^d Estimada de acuerdo a NRC (2001)

IV. 2.3. Análisis de los alimentos

En el ensayo con soja, las muestras de pradera y de concentrados fueron tomadas cada 10 días para determinar su composición química y nutricional (Tablas IV.1 y IV.5), mientras que en los experimentos con raps canola se tomaron al inicio de cada ensayo (Tablas IV.2, IV.3 y IV.4). Las muestras de pasto se tomaron antes del pastoreo a una altura de 8 cm por encima del suelo, utilizando un cuadrante de 1 m². El contenido de materia seca (MS) de los forrajes frescos se determinó mediante un horno de aire forzado a 60 ° C durante 48 h. Posteriormente, tanto las muestras de forrajes como de concentrados fueron trituradas y pasadas por un tamiz de 1 mm en un molino Willey antes del análisis. En el análisis del alimento se realizó la determinación de la materia seca (método 934.01), cenizas (método 942.05), extracto etéreo (método 920.39), N (método 984.13) y fibra bruta (método 978.10) de acuerdo a los métodos de la AOAC (2005). Los valores de N se determinaron por el procedimiento de Kjeldahl, que se convierte en proteína bruta mediante la multiplicación por el factor de 6,25. Los análisis de la fibra detergente neutro (NDF) y fibra detergente ácida (FDA) se llevaron a cabo de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991), y ambos NDF y FDA fueron expresados sin la ceniza residual. Todas las fracciones de fibra fueron analizadas en un Extractor Fibertec 1030 Hot (Tecator AB, Suecia). El contenido de grasa se midió por extracción con éter de petróleo (punto de ebullición, de 40 a 60 ° C) en una unidad de extracción Soxtec System 1040 (FOSS Tecator AB, Suecia).

La energía metabolizable (EM) de la dieta se estimó de acuerdo con NRC (2001). La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de la pradera se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Tilley y Terry (1963), modificado por Van Soest (1991) y la ME se estimó de acuerdo con la ecuación: $ME = 0,279 + 0,0325 \times DIVMS$ (Garrido, 1981).

IV. 2.4. Producción y composición química de la leche

La producción de leche se determinó los días 1 y 15 (período pre-experimental) y los días 1, 15, 30 y 45 del período experimental en los distintos ensayos, utilizando para ello un equipo Waikato ®. En cada control, se tomó una muestra de leche de 30 ml a la

CAPÍTULO IV. Estrategias de mejora del contenido de CLA en leche

que se le añadió 0,03 g de dicromato de potasio al 0,1 %. Los contenidos de grasa, proteína y urea se han determinado automáticamente mediante un espectrofotómetro infrarrojo (Milkoscan 4000, Foss Electric Dinamarca). Para las células somáticas se utilizó un Fossomatic cell counter (Fossmatic 5000, Hillerod, Denmark).

Tabla IV.5, Composición nutricional del pasto en el ensayo con soja

	Muestra (días)					
	1	15	30	45	60	75
Materia seca (MS, %)	17,6	14,3	18,8	19,7	22,6	30,6
Ceniza (% MS)	10,6	11,6	11,9	12,9	10,1	11,2
Proteína cruda (% MS)	24,8	21,1	18,0	19,8	15,0	11,4
Fibra cruda (% MS)	17,7	24,5	22,0	24,6	27,7	26,4
Fibra detergente neutro (%MS)	43,7	56,4	50,2	51,3	62,0	59,3
Fibra detergente ácida (% MS)	22,5	30,7	30,0	30,5	33,8	35,2
IVDMD (%) ^a	84,2	73,2	70,8	73,2	61,9	60,3
ME (Mcal kg ⁻¹) ^b	2,75	2,41	2,33	2,36	2,06	2,07

^a Digestibilidad *in vitro* de MS (IVDMD) determinado de acuerdo a Tilley and Terry (1963) y modificado por Van Soest (1991)

^b Energía metabolizable (ME) estimada por la ecuación: $ME = 0,279 + 0,0325 \times IVDMD$ (Garrido, 1981)

IV. 2.5. Análisis de isómeros de CLA en la leche

Para medir la producción el CLA se utilizó un equipo Waikato ® del control lechero los días 1 y 15 (período pre-experimental) y los días 1, 15, 30 y 45 del período experimental. En cada control se tomaron 100 ml de muestras de leche, que se enviaron al laboratorio en recipientes con aislamiento térmico a 4 ° C. Para el análisis de isómeros de CLA (*cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12, *cis*-10, *cis*-12), se realizó la extracción de los lípidos de la grasa en leche de 100 mg de muestra. Esta fue separada por centrifugación (8000 g, 45 min) de acuerdo con los procedimientos descritos por Folch *et al.*, (1957), usando una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v). La metilación de los ácidos grasos de las muestras se realizó mediante el método recomendado por Morrison y Smith (1964). Los esteres metílicos de los ácidos fueron analizados por cromatografía de gases (HP 6890 - Hewlett Packard), detector de ionización de llama (FID), utilizando una columna capilar SP-2560 (100 m, 0,25 mm con 0,20 m de espesor en la fase estacionaria; Supelco Inc., Bellefonte, PA). Las

condiciones de cromatografía de gases fueron las siguientes: el volumen de inyección fue de 0,5 l (70:1 v/v); donde hidrógeno fue el gas portador, y el inyector y detector de temperatura fue de 250 y 300 ° C, respectivamente. La temperatura inicial fue de 70 ° C (durante 1 min), aumentó en un 5° C por minuto a 100 °C (durante 3 min), aumentando en 10 °C por minuto para llegar a 175 °C (que tuvo lugar durante 40 minutos), y luego aumentó en un 5 °C por minuto hasta los 220 °C (que tuvo lugar durante 19 min) para un tiempo total de 86,5 min. Los datos fueron cuantificados utilizando el software HPCHEM que expresa el resultado como un porcentaje del área de acuerdo con el total de ácidos grasos identificado.

IV. 2.6. Perfil metabólico

Al inicio y al final de cada ensayo se tomaron muestras de sangre (5 mL/animal) mediante venopunción coccígea caudal y fueron adicionados a un tubo con heparina sódica. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a 3000 rpm y el plasma fue alicuotado y congelado (-18 °C) en microtubos de 1.5 mL. En cada muestra se midió, colesterol (cholesterol-oxidasa method, CHOLESTEROL Liquicolor 10028 Human), albúmina (Albumin Liquicolor Method BCG-Bromo cresol), proteína total (Total protein Liquicolor-Biuret Method), calcio (Arsenazo III AA), Mg (Mg-color AA), fósforo (Fosfataria UV AA), aspartato aminotransferasa (IFCC Mod. LiquiUV test) y urea (ureasa/NADH method. UREA LiquiUV 10521 Human). Las muestras de plasma fueron analizadas automáticamente con el analizador bioquímico Selectra Vitalab. Merk.

IV. 2.7. Análisis estadístico

Los resultados de producción, composición química y composición de isómeros CLA de la leche y perfiles metabólicos fueron analizados con medidas repetidas (semana de la lactación fue la medida repetida) usando el Modelo lineal general en el programa SPSS (software statistical package - SPSS Inc., 2006). El modelo lineal usado para cada parámetro fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_{ij} + S_k + (T \times S)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} = es la observación de la variable dependiente; μ = media; T_i = efecto de tratamiento en cada grupo; A_{ij} = efecto del animal aleatorio j ; S_k = efecto de la semana de lactación; $T \times S$ = interacción entre ambos factores, y ε_{ijk} = efecto residual del error. Se realizó análisis de ANOVA de medias y prueba de comparación múltiple de Tukey , El nivel de significación utilizada fue del 5%. El coeficiente de correlación de Pearson entre la concentración de grasa de leche y el contenido de *trans*-10, *cis*-12 isómero también fue determinado.

IV. 3. RESULTADOS

IV. 3.1. Resultados del ensayo con soja

IV. 3.1.1. Producción y calidad básica de la leche

En el día inicial no se observaron diferencias en la producción y la calidad de leche ($P = 0,390$) entre los tres grupos experimentales (datos no mostrados). En el periodo experimental (día 15 al 75) la producción de leche ($P = 0,706$) y la producción de leche corregida por materia grasa ($P = 0,241$) fueron similares en todos los grupos (Tabla IV.6). Las cantidades de grasa de leche (kg d⁻¹) ($P = 0,010$), así como proteína ($P = 0,045$) y el porcentaje de la grasa de leche ($P = 0,015$) fueron inferiores en el tratamiento 20TS, mientras que las cantidades de proteína ($P = 0,926$) y urea ($P = 145$) fueron similares entre todos los tratamientos.

Los componentes de la leche y la producción de ella a lo largo de la lactación se vieron afectados por el día de la lactación para todos los componentes (Tabla IV.6). La producción de leche disminuyó significativamente en función de la semana y respecto a la composición química, los valores más altos para estos componentes se encontraron en las últimas semanas.

IV. 3.1.2. Contenido y composición de CLA en la leche

En el día inicial no se observó diferencias en el CLA total ($P = 0,791$) y de cada uno de sus isómeros entre los tres grupos experimentales. En el período experimental, no hubo efecto de la inclusión de la soja extrusada sobre el contenido total de CLA ($P = 0,290$) o el contenido de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 ($P = 0,582$), *trans*-10, *cis*-12 ($P = 0,136$) and *cis*-10, *cis*-12 ($P = 0,288$) (Tabla IV.6). Aunque los valores más altos se encontraron en el isómero *cis*-9, *trans*-11 (53-59% del total de CLA), los isómeros *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12 también presentaron valores más altos (17-23 % y 20-25% de CLA total, respectivamente) que lo reportado en la literatura.

La composición de ácidos grasos a través de la lactación fue afectada por el día de lactación para todos los componentes (Tabla IV.6; Figura IV.1). En el contenido de CLA total y de cada uno de sus isómeros, se observó una tendencia similar en todos los tratamientos. Los valores más bajos de CLA durante las semanas del ensayo se obtuvieron cuando el forraje presentó la peor calidad nutricional (Tabla IV.5). El isómero *cis*-10, *cis*-12 fue el único que disminuyó desde el día 1 al día 45, y aumentó después del día 60.

IV. 3.1.3. Perfil metabólico

A lo largo de cada experimento, las vacas se encontraban en buen estado de salud y no mostraron ninguna enfermedad relevante. Todos los metabolitos evaluados, excepto la urea sanguínea al final del ensayo, se encontraron dentro del rango normal (Tabla IV.7), no observándose diferencias significativas entre los tratamientos al inicio y fin del ensayo.

Tabla IV.6. Producción y composición química (media ± S.E.) de la leche de vacas Jersey suplementadas con soja

	Tratamientos ¹			Efectos, P ²			
	OTS	11TS	20TS	T	S	TxS	
Producción de leche (kg d ⁻¹)	19,28 ± 4,13	18,75 ± 2,76	20,43 ± 4,21	ns	***	ns	ns
Producción de leche al 4 % FCM ³ (kg d ⁻¹)	21,89 ± 3,22	21,21 ± 3,03	20,79 ± 4,14	ns	***	ns	ns
Grasa (%)	5,02 ± 0,73 ^a	4,90 ± 0,63 ^a	4,14 ± 0,57 ^b	*	*	ns	ns
Grasa (kg d ⁻¹)	0,95 ± 0,12 ^a	0,92 ± 0,14 ^a	0,84 ± 0,02 ^b	*	**	ns	ns
Proteína (%)	3,77 ± 0,21 ^a	3,73 ± 0,31 ^a	3,53 ± 0,20 ^b	*	***	ns	ns
Proteína (kg d ⁻¹)	0,73 ± 0,04	0,67 ± 0,51	0,72 ± 0,46	ns	***	ns	ns
Urea (mg/100 ml)	0,048 ± 0,01	0,043 ± 0,01	0,052 ± 0,0	ns	***	ns	ns
CLA (g/100 g ácidos grasos)							
Total CLA	1,21 ± 0,42	1,34 ± 0,38	1,38 ± 0,39	ns	**	ns	ns
C18:2 <i>cis</i> -9. <i>trans</i> -11	0,67 ± 0,23	0,75 ± 0,20	0,69 ± 0,17	ns	***	ns	ns
C18:2 <i>trans</i> -10. <i>cis</i> -12	0,19 ± 0,18	0,25 ± 0,22	0,29 ± 0,26	ns	***	ns	ns
C18:2 <i>cis</i> -10. <i>cis</i> -12	0,34 ± 0,30	0,33 ± 0,28	0,42 ± 0,32	ns	***	ns	ns

^{a,b}. Valores de medias de las filas con letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05)

¹ Control sin soja (OTS), con soja 11% (11TS. 0,5 kg d⁻¹), con soja 20% (20TS, 1 kg d⁻¹). La alimentación base de forraje para los tres grupos de animales estuvo constituida por pasto de pradera polifítica natural mejorada, predominando especies gramíneas sobre leguminosas (*Lolium perenne*. *Trifolium repens*. *Bromas sp.*)

² T. tratamiento; S. semana; TxS: Interacción; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; ns: no significativo. P <0.10

³FCM= Factor de corrección de leche al 4% (Orth, 1992)

Tabla IV.7. Perfiles metabólicos de las vacas al inicio y al final del ensayo con soja

Metabolitos	Rangos de referencia	Tratamientos ^a						Efectos, P ^b	
		OTS		11TS		20TS		Inicio	Final
		Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final		
Colesterol (mmol/L)	3-5	4,14	5,0	4,86	5,71	4,5	5,14	ns	ns
Albumina (g/L)	29-41	33,5	37,4	33,8	39,3	32,3	36,1	ns	ns
Proteína total (g/L)	66-90	62,6	68,2	65,0	72,1	65,7	68,8	ns	ns
Calcio (mmol/L)	2,0-2,6	2,20	2,87	2,20	3,05	2,25	2,90	ns	ns
Mg (mmol/L)	0,65-1,14	0,80	0,90	0,83	0,97	0,82	0,87	ns	ns
Fósforo (mmol/L)	1,1-2,3	1,54	2,02	1,53	2,16	1,68	2,90	ns	ns
AST ^c (U/L)	45-105	84,0	94,4	101,1	106,7	98,9	101,1	ns	ns
Urea (mmol/L)	2,6-7,0	7,0	10,93	5,91	9,77	6,60	10,63	ns	ns

^a Control sin soja (OTS). con soja 11% (11TS 0,5 kg d⁻¹), con soja 20% (20TS 1 kg d⁻¹).

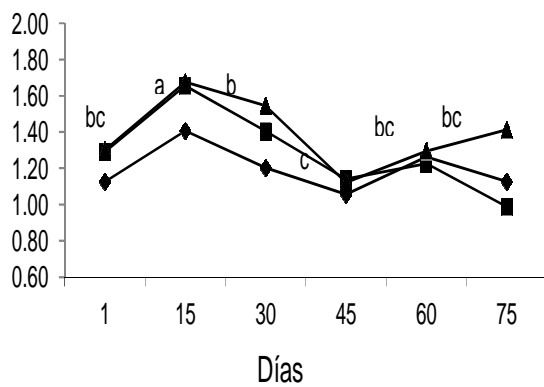
^b ns: no significativo, P<0,10

^c Aspartato Aminotransferasa

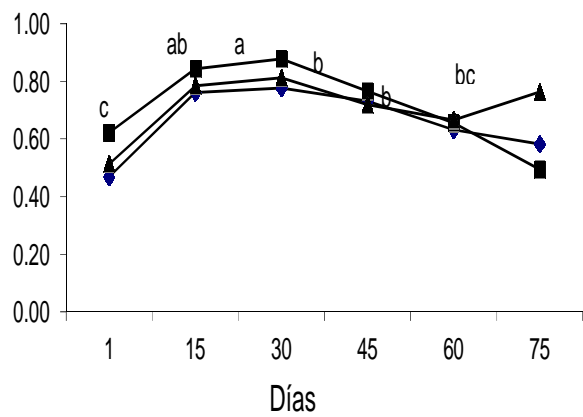
CAPÍTULO IV. Estrategias de mejora del contenido de CLA en leche

Figura IV.1. Representación en el tiempo del contenido de isómeros del ácido linoléico conjugado (CLA) (g/100g ácidos grasos totales) en leche de vacas Jersey suplementadas con concentrados con diferentes cantidades de soja. Control sin soja (OTS) (—◆—), con soja 11% (11TS, 0,5 kg d⁻¹) (—■—), con soja 20% (20TS, 1 kg d⁻¹) (—▲—). Las mediciones iniciales (d 1) se hicieron cuando los animales fueron alimentados con pasto con diversas especies botánicas. Los valores de las medias fueron comparados en cada fecha, y aquellos con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

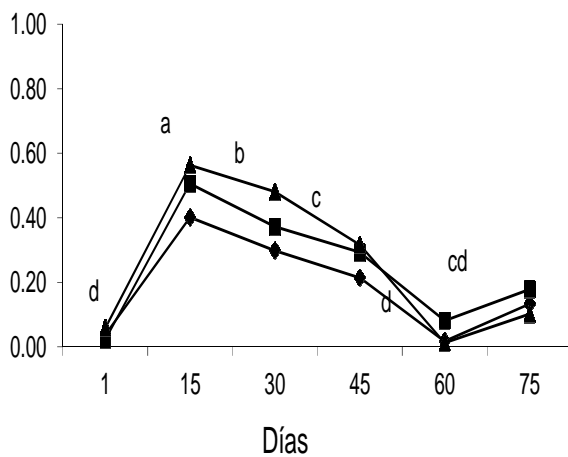
a) CLA total



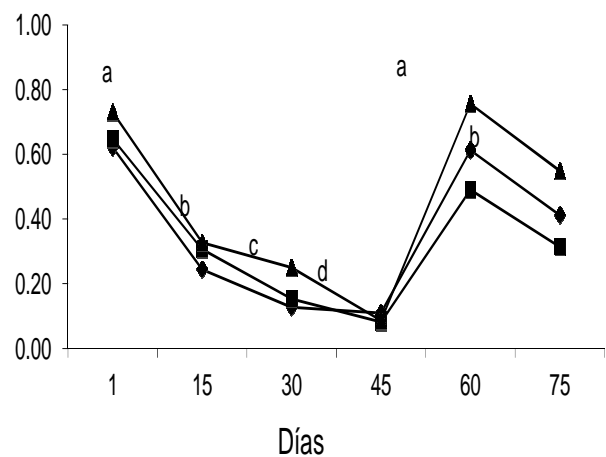
b) CLA *cis*-9, *trans*-11



c) CLA *trans*-10, *cis*-12



d) CLA *cis*-10, *cis*-12



IV. 3.2. Resultados con los ensayos con Raps Canola

IV.3.2.1. Producción y calidad de leche.

En el período pre-experimental no se observaron diferencias significativas en la producción de leche y la calidad entre los grupos experimentales de cada ensayo (datos no mostrados). En el período experimental (de día 15 al día 60), no se obtuvieron diferencias en la producción de leche ($P = 0,542$ en el experimento 1, $P = 0,622$ en el experimento 2, $P = 0,454$ en el experimento 3), en la producción de leche corregida (FCM, kg d-1) ($P = 0,361$ en el experimento 1, $P = 0,742$ en el experimento 2, $P = 0,677$ en el experimento 3), en el porcentaje de grasa ($P = 0,891$ en el experimento 1, $P = 0,772$ en el experimento 2, $P = 0,214$ en el experimento 3), en el porcentaje de proteína ($P = 0,793$ en el experimento 1, $P = 0,886$ en el experimento 2, $P = 0,642$ en el experimento 3), ni en las cantidades de grasa ($P = 0,243$ en el experimento 1, $P = 0,901$ en el experimento 2, $P = 0,910$ en el experimento 3), proteína ($P = 0,161$ en el experimento 1, $P = 0,254$ en el experimento 2, $P = 0,153$ en el experimento 3) o de urea ($P = 0,254$ en el experimento 1, $P = 0,091$ en el experimento 2, $P = 0,119$ en el experimento 3) (Tabla IV.8). En todos los ensayos, tanto la producción como los distintos componentes de la leche tuvieron diferencias significativas a través de la semana de la lactación (Tabla IV.8).

IV.3.2.2. Contenido y composición de CLA en la leche

En el día inicial no se observaron diferencias en el CLA total y de cada uno de sus isómeros entre los grupos experimentales en cada experimento (datos no mostrados). En el período experimental, no hubo efecto de la inclusión de las semillas de canola sobre el contenido total de CLA ($P = 0,121$ en el experimento 1, $P = 0,232$ en el experimento el 2, $P = 0,961$ en el experimento 3), tampoco en el isómero *cis*-9, *trans*-11 ($P = 0,242$ en el experimento 1, $P = 0,166$ en el experimento 2, $P = 0,125$ en el experimento 3), ni en el isómero *trans*-10, *cis*-12 ($P = 0,263$ en el experimento 1, $P = 0,082$ en el experimento 2, $P = 0,161$ en el experimento 3) y ni en el isómero *cis*-10-, *cis*-12 ($P = 0,233$ en el experimento 2, $P = 0,143$ en el experimento 3) (Tabla IV.8).

El valor más alto se encontró para el isómero *cis*-9, *trans*-11 (entre 49 y 51% de CLA total en el experimento 1; entre 31 y 42% de CLA total en el experimento 2; entre 42 y 46% del total CLA en el experimento 3), aunque el isómero *trans*-10, *cis*-12 también presentó valores altos (entre 49 y 51% de CLA total en el experimento 1; entre 31 y 32% de CLA total en el experimento 2; entre 36 y 42 % de CLA total en el experimento 3) y el isómero *cis*-10, *cis*-12 (no fue detectado en el experimento 1, se presento entre un 27 y 37% en el experimento 2, y entre el 16 y 20% en el experimento 3), este isómero normalmente no se encuentra en la literatura. La composición de ácidos grasos a través de la lactación fue afectada por el día para todos los componentes (Tabla IV.8, Figura IV.2).

IV.3.2.3. Perfil metabólico

A lo largo de cada experimento, las vacas se encontraban en buen estado de salud y no mostraron ninguna enfermedad relevante. Todos los metabolitos evaluados, excepto la urea en sangre al final del ensayo, se encontraron dentro del rango normal, sin diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla IV.9).

Tabla IV.8. Efecto de la suplementación con canola (*Brassica napus*) sobre la producción y composición química de la leche en cada uno de los experimentos

	Tratamiento ^a						SEM ^b	Efectos (P =) ^c					
	Ex. 1		Ex. 2		Ex. 3			Ex. 1		Ex. 2		Ex. 3	
	0-TC1	1,16-TC1	0-TC2	1,2-TC2	0-TC3	1,2-TC3		S	S	S	S	S	
Prod. de leche(kg d ⁻¹)	14,8	12,8	27,6	30,5	14,3	16,2	2,01	0,010	0,000	0,010	0,000	0,020	
FCL al 4% (kg d ⁻¹) ^d	13,8	11,9	26,7	27,5	13,9	15,5	1,73	0,002	0,030	0,002	0,030	0,000	
Grasa (%)	3,60	3,52	3,42	3,34	3,76	3,41	0,275	0,023	0,045	0,023	0,045	0,001	
Grasa (Kg d ⁻¹)	0,53	0,45	1,04	1,02	0,54	0,55	0,192	0,004	0,010	0,004	0,010	0,007	
Proteína (%)	3,10	3,00	3,10	3,15	3,10	3,12	0,062	0,024	0,003	0,024	0,003	0,009	
Proteína (Kg d ⁻¹)	0,46	0,38	0,44	0,59	0,44	0,59	0,034	0,012	0,056	0,012	0,056	0,056	
Urea (mg/100 mL)	0,025	0,028	0,023	0,059	0,023	0,031	0,0224	0,344	0,548	0,344	0,548	0,274	
Células somáticas (x 10 ³ /mL) ^e	0,015	0,022	0,023	0,030	0,023	0,031	0,0056	0,756	0,22	0,756	0,22	0,620	
CLA (g/100 g FA)	0,91	1,08	1,50	1,41	0,88	0,88	0,364	0,023	0,002	0,023	0,002	0,004	
Total CLA	0,43	0,56	0,63	0,43	0,50	0,44	0,295	0,006	0,005	0,006	0,005	0,000	
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,48	0,52	0,46	0,25	0,34	0,31	0,282	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
CLA <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12	0,00	0,00	0,41	0,53	0,23	0,17	0,241	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

^a Ex. 1 (experimento 1): Grupo control sin canola y con concentrado (5 kg d⁻¹); (0-TC1); Grupo tratamiento con concentrado comercial (3,75 kg d⁻¹ kg d⁻¹) más raps canola entero (1,16 kg d⁻¹) (1,16-TC1), Ex. 2 (experimento 2): Grupo control con concentrado comercial y sin canola (8 kg d⁻¹) (0-TC2); Grupo tratamiento con concentrado comercial (6,2 kg d⁻¹) más 1,2 kg d⁻¹ de canola molida (1,2-TC2). Ex. 3 (experimento 3): Grupo control con concentrado comercial sin canola (6 kg d⁻¹) (0-TC3); Grupo tratamiento con concentrado comercial (6 kg d⁻¹) y con canola agregada al concentrado al 20% (1,2-TC3).
^b Error estándar de la media.

^c S: Semana. En todos los experimentos no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ni en la interacción tratamiento x semana (P <0.05).

^d Producción de leche corregida al 4 % FCL (kg/d)

^e Para análisis estadístico los valores fueron transformados a logaritmo base 10.

Tabla IV.9. Perfiles metabólicos de las vacas Frison Negro Chileno al inicio y al final del ensayo con raps canola

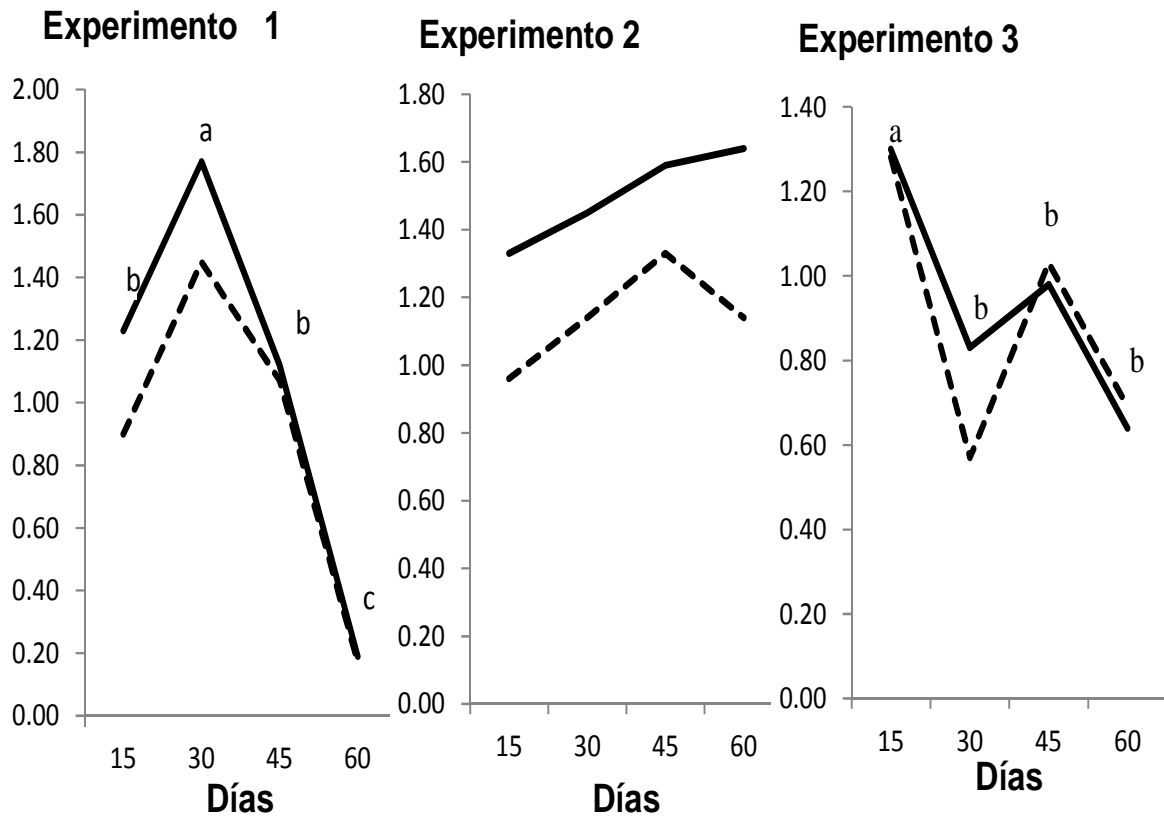
Metabolites	Tratamientos ^a											
	Ex. 1				Ex. 2				Ex. 3			
	OTC1	1.16TC1	1.16TC1	Final	OTC2	1.2TC2	1.2TC2	Final	OTC3	1.2TC3	1.2TC3	Final
Cholesterol(mmol L ⁻¹)	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
	4,46	4,13	3,72	3,77	4,00	5,67	4,21	5,59	6,01	5,46	4,24	5,67
Albumina (g L ⁻¹)	32,3	34,6	35,9	49,1	34,5	42,8	36,0	39,1	49,5	45,2	42,4	42,8
Proteína total (g L ⁻¹)	62,4	58,6	55,6	60,3	65,3	67,0	62,2	70,4	81,5	75,3	73,9	74,4
Calcio (mmol L ⁻¹)	1,96	2,01	1,82	2,22	1,17	1,13	2,14	1,84	3,84	3,74	3,22	3,33
Magnesio (mmol L ⁻¹)	1,10	1,61	0,73	0,31	1,13	1,55	0,91	1,02	1,71	1,22	1,22	1,82
Fósforo (mmol L ⁻¹)	0,94	1,03	0,86	1,22	1,18	1,23	1,01	1,13	3,83	2,92	3,23	3,54
AST ^b (U L ⁻¹)	56,0	98,1	57,2	102,2	106,4	122,6	118,4	119,9	158,0	121,3	132,5	145,2
Urea (mmol L ⁻¹)	8,01	9,22	8,23	8,73	8,26	10,09	9,32	11,05	5,88	6,27	5,24	4,65

^a Ex. 1 (experimento 1): Grupo control sin canola y con concentrado (5 kg d⁻¹); (0-TC1); Grupo tratamiento con concentrado comercial (3,75 kg d⁻¹) más raps canola entero (1,16 kg d⁻¹) (1,16-TC1), Ex. 2 (experimento 2): Grupo control con concentrado comercial y sin canola (8 kg d⁻¹) (0-TC2); Grupo tratamiento con concentrado comercial (6,2 kg d⁻¹) más 1,2 kg d⁻¹ de canola molida (1,2-TC2), Ex. 3 (experimento 3): Grupo control con concentrado comercial sin canola (6 kg d⁻¹) (0-TC3); Grupo tratamiento con concentrado comercial (6 kg d⁻¹) y con canola agregada al concentrado al 20% (1,2-TC3).

Para todos los valores de los metabolitos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

^bAspartato aminotransferasa

Figura IV.2. Representación en el tiempo del contenido de ácido linolólico conjugado total (CLA) (g/100g ácidos grasos totales) en leche de vacas Frison Negro Chileno suplementadas con concentrados con diferentes cantidades de canola. Ex. 1 (experimento 1): Grupo control sin canola y con concentrado (5 kg d⁻¹); (0-TC1); Grupo tratamiento con concentrado comercial (3,75 kg d⁻¹) más raps canola entero (1,16 kg d⁻¹)(1,16-TC1) . Ex. 2 (experimento 2): Grupo control con concentrado comercial y sin canola (8 kg d⁻¹) (0-TC2); Grupo tratamiento con concentrado comercial (6,2 kg d⁻¹) más 1,2 kg d⁻¹ de canola molida (1,2-TC2) . Ex. 3 (experimento 3): Grupo control con concentrado comercial sin canola (6 kg d⁻¹) (0-TC3); Grupo tratamiento con concentrado comercial (6 kg d⁻¹) y con canola agregada al concentrado al 20% (1,2-TC3) Los valores de las medias fueron comparados en cada fecha, y aquellos con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



IV. 4. DISCUSIÓN

IV.4.1. Producción y calidad de leche

Basado en los resultados de la producción de leche y el contenido de urea en leche en ambos trabajos (soja y raps canola), y aunque en el estudio con soja la proteína bruta del concentrado suministrado en la dieta presentó un rango entre 17 y 21 %, los pastos y forrajes aportados contribuyeron a un nivel adecuado de proteína y energía de la dieta, de acuerdo con las recomendaciones del NRC (2001).

A menudo los suplementos con grasa puede resultar en menor producción de leche, lo cual puede explicarse por la inhibición en la fermentación de la fibra o la baja digestibilidad de los ácidos grasos en el rumen (NRC, 2001). Sin embargo, y como ocurrió en todos los experimentos de la presente Tesis, en diversos trabajos utilizado suplementos de soja (Paradis *et al.*, 2008) y canola (Chichlowski *et al.*, 2005; Delbecchi *et al.*, 2001), no se afectó la producción de leche.

En relación a los componentes de la leche, se sabe que las dietas bajas en fibra o dietas altas en concentrado y ricos en aceites vegetales, pueden causar una reducción en la grasa y proteína de la leche. En el caso del ensayo con soja, la reducción en el porcentaje y cantidad de grasa (kg d^{-1}) en el grupo alimentado con una mayor cantidad de ésta (20TS - 1 kg d^{-1}) puede resultar del proceso de extrusión, que rompe las micelas de grasa de la semilla, lo que permite una rápida liberación de los lípidos en el rumen y con ello la reducción del contenido de grasa de leche (Mohamed *et al.*, 1988; DePeters y Cant, 1992). El síndrome de baja grasa en la leche ha sido reconocido desde hace muchos años, pero el mecanismo exacto todavía no está claro. Los datos de varios estudios revivió la teoría de que ácidos grasos *trans*, procedentes de la biohidrogenación ruminal y de la desaturación por parte de la glándula mamaria, como el mecanismo central de la depresión de grasa en leche (Griinari y Bauman, 2003; Looor *et al.*, 2005). En particular, el aumento del C18:1 *trans*-10 y del isómero CLA *trans*-10, *cis*-12 en la glándula mamaria, se ha asociado con una reducción en la síntesis novo de ácidos de cadena corta y media (Banks *et al.*, 1980; Grummer, 1991; Baumgard *et al.*, 2000). En este sentido y en el trabajo con soja, en el tratamiento 20TS,

el isómero CLA *trans*-10, *cis*-12 se encontró en mayor cantidad (aunque tal diferencia no fue significativa) y Además se obtuvo una relación lineal inversa ($r^2 = 0,11$; $P = 0,04$) entre la concentración de grasa de la leche y el contenido de este isómero.

Por otro lado, muchos de los estudios con canola están referidos a dietas TMR y no a sistemas de alimentación en base a pastoreo. En este sentido, dietas TMR que comparan el uso de granos de canola tratadas con peróxido alcalino ($2,4 \text{ kg d}^{-1}$) no aumentaron el porcentaje de grasa de la leche (Aldrich *et al.*, 1997), mientras que el uso de grano de canola comparado con harina de canola extraído mecánicamente, aumentó el porcentaje de grasa en leche (Chichlowski *et al.*, 2005). En los trabajos de la presente Tesis, a pesar de que las dietas de los diferentes experimentos tenían altos niveles de grasa (Tablas IV.2, IV.3 y IV.4), los porcentajes y cantidades de grasa en leche no tuvieron diferencias significativas entre los grupos. Esto pudo deberse a que la fibra y la energía fue similar en la ración total en cada uno de los experimentos (Murphy *et al.*, 2008).

En relación a la proteína en leche, tan sólo el porcentaje fue menor en el grupo 20TS del ensayo con soja, comparado con los grupos OTS y 11TS. Aunque los aportes de grasa y proteína de la dieta fueron mayores en el grupo 20TS, Theurer *et al.* (1995) sugirieron que el aumento de la cantidad de proteína de la dieta con un nivel constante de energía, tiene poco efecto sobre la síntesis de proteína de la leche, aunque si el nivel de proteína de la dieta incrementa la cantidad de proteína en la leche, el efecto parece estar asociado con un incremento de la producción de leche. Sin embargo, en el estudio con soja no se observaron diferencias entre los grupos, ni en la producción de leche ni en la cantidad de proteína de la leche, al igual que lo obtenido en los ensayos con canola y en otros trabajos de la literatura (Guillaume *et al.*, 1991). La disminución en el contenido de proteína de leche en la dieta 20TS con soja, podría ser debido a una mayor disponibilidad de grasa en el rumen (Chouinard *et al.*, 1997). La reducción en el porcentaje de proteína observada en la mayoría de los estudios en animales alimentados con dietas con un alto contenido de grasa, parece estar asociada con los efectos negativos sobre el crecimiento de los microorganismos ruminales y como consecuencia la baja producción de proteína microbiana (Solomon *et al.*, 2000). Además, cuando las vacas están alimentadas con aportes de grasa, la eficiencia

energética de la síntesis de leche se incrementa. Vacas alimentadas con dietas ricas en grasa requieren menos litros de sangre que fluye a la glándula mamaria por kg de leche producida (Cant *et al.*, 1993). Por ello se sugiere que, como la absorción de aminoácidos a nivel mamario depende de la concentración de aminoácidos en la sangre y del flujo sanguíneo que va a la glándula mamaria, la disminución de este flujo por volumen de leche producida, sería limitante a la absorción de aminoácidos para la síntesis de proteínas de leche.

La producción de leche y de sus componentes se vio afectado por la semana de muestreo. Efectos debidos a la fase de lactación y a la alimentación (principalmente a la ingestión y la composición nutricional del forraje) pueden explicar estas diferencias. No obstante, la ingesta total de forraje no se midió en ninguno de los ensayos así como la composición nutritiva en los ensayos con canola, lo cual podría ser determinado en estudios futuros.

IV.4.2. Contenido y composición de CLA en la leche.

Al igual que en los trabajos de la presente Tesis, diversos estudios sobre la suplementación tanto con soja como con canola, no encontraron efectos en la cantidad de CLA en la leche (Bartolozzo *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2005; Chichlowski *et al.*, 2005). Bartolozzo *et al.* (2003) en vacas Friesian alimentadas con pasto más un suplemento de 2,6 kg d⁻¹ de soja cruda, obtuvieron una alta cantidad de CLA (0,96 %) en comparación con dietas TMR utilizando soja cruda o extruida (0,52 %), lo cual está en correspondencia con los resultados de White *et al.* (2001). Khanal *et al.*, (2005) utilizando 2,4 kg d⁻¹ soja extruida en animales Holstein a pastoreo no encontró efecto en la cantidad de CLA en la leche (1,63 % de CLA total en el grupo alimentado solo con pasto y 1,69% de CLA total en el grupo alimentado con pasto + suplemento de soja; estos valores incluyen solo al isómero *cis*-9, *trans*-11. Chichlowski *et al.*, (2005), utilizando en dietas TMR semilla de canola y aceites de canola extraído mecánicamente, tampoco encontraron diferencias significativas en el contenido de CLA total (0,42 % y 0,39 %, respectivamente), ni tampoco en el isómero *cis*-9, *trans*-11 (0,39 y 0,35 %, respectivamente). En los ensayos de la presente Tesis con canola, aunque no

se incrementó el contenido de CLA en la leche, los valores obtenidos han sido más elevados (0,99, 1,45 y 0,88 % de CLA total, en los experimentos 1, 2 y 3 con canola, respectivamente) a los encontrados en las raciones de TMR. Estos mayores contenidos de CLA en leche podrían deberse a la alimentación a base de pastos, dado su conocido efecto para incrementar los niveles de CLA en leche (Khanal *et al.*, 2005, Dewhurst *et al.*, 2006). Además, la falta de efecto de la inclusión de semilla de soja y de canola en los diferentes experimentos, indicarían una mayor influencia del pasto en el contenido de CLA en la leche, que la fuente o nivel de semilla de soja o canola incorporado en la dieta. Los valores de CLA diferentes que se encuentran tanto en los trabajos de la presente Tesis como en los de la literatura, pueden estar relacionados con la distinta composición nutricional del pasto, derivadas las características botánicas y agronómicas en los diversos estudios (Dewhurst *et al.*, 2006). En menor grado, otros factores tales como la raza (White *et al.*, 2001; Kelsey., 2003) influyen en la cantidad de CLA en la leche. A este respecto, White *et al.* (2001) observaron un 18% menos de CLA en la leche de vacas Jersey en comparación con la leche de vacas Holstein. Otros autores en cambio, observaron un incremento en el contenido de CLA total en leche de hasta 2,2% en vacas lecheras alimentadas con pasto más un suplemento de 3,1 kg d⁻¹ de soja tostada (Lawless *et al.*, 1998), y de 2,4 % para el isómero *cis*-9, *trans*-11 en ganado de carne con pastoreo y suplementado con 2 kg d⁻¹ de soya extruida (Paradis *et al.*, 2008). No obstante, la influencia exacta de la raza y su relación con la dieta en el contenido de CLA, además de las posibles interacciones, necesitan futuros estudios.

En relación a los isómeros, el ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11) es típicamente el isómero más abundante, siendo sus valores mayores al 80% del total de CLA (Palmquist *et al.*, 2005). El isómero *cis*-10, *cis*-12, por otro lado, se ha encontrado en bajas cantidades y no tiene función biológica conocida (Khanal y Olson, 2004). En los estudios con soja y canola de la presente Tesis, los isómeros *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12 han presentado valores más altos que lo normalmente señalado en la literatura. La regulación del balance de los isómeros es en gran parte desconocido. Sin embargo, se sabe que el isómero *cis*-9, *trans*-11 se genera principalmente a partir del ácido vaccénico en la glándula mamaria (Mosley *et al.*, 2006), mientras que el *trans*-10, *cis*-12 es un intermediario de la biohidrogenación del rumen (Walker *et al.*, 2004) y es

relativamente poco afectado por los cambios en la dieta, excepto por niveles muy altos de concentrado en la alimentación (Chilliard *et al.*, 2007). Por lo tanto, futuros estudios son necesarios para determinar su función biológica y las rutas metabólicas de producción.

La evolución en el tiempo del contenido de CLA total y de cada uno de sus isómeros (Figuras IV.1 y IV.2), sigue una tendencia similar en todos los tratamientos, tanto en el trabajo con soja como con canola, lo que indicaría una mayor influencia del pasto en el contenido de CLA en la leche que diferentes concentrados suplementados. Esto puede estar relacionado con las diferencias en la composición nutricional del pasto, que también se ha demostrado que afectan a la composición de ácidos grasos de la leche (Dewhurst *et al.*, 2006). A este respecto, un menor contenido de CLA en la leche se ha observado con pastos maduros y este efecto se ha atribuido a la disminución de la calidad y cantidad del forraje (Lock y Garnsworthy, 2003; Ward *et al.*, 2003). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo con soja, donde los valores más bajos de CLA se obtuvieron a finales de diciembre y enero, cuando el pasto es más pobre desde el punto de vista nutritivo (ver Tabla IV.5). El isómero *cis*-10, *cis*-12 fue el único que disminuyó desde el día 1 al día 45, y aumentó después del día 60. En la actualidad, es difícil de explicar, tanto el alto valor obtenido, como también su evolución. En el experimento 2 con canola, no se observaron diferencias significativas entre semanas, mientras que en los experimentos 1 y 3 se obtuvieron menores valores de CLA en las semanas finales del estudio (Figura IV.2). Estos resultados podrían explicarse porque los experimentos 1 y 3 se realizaron en el período en que la calidad y cantidad del forraje disminuye, mientras que el experimento 2 se llevó a cabo en el período de mayor calidad y cantidad del pasto (Ruiz, 1996).

IV.4.3. Perfil metabólico

Todos los metabolitos evaluados, excepto la urea en sangre, se encontraron dentro del rango normal (Tablas IV.7 y IV.9), de acuerdo con los valores reportados para vacas lactantes sanas (Bertoni y Piccioli, 1999). El aumento de urea en sangre se ha observado utilizando dietas con altos niveles de proteína degradable, como es el

caso de animales alimentados a pasto con gramíneas (Pulido, 2009). En estas condiciones, la proteína altamente soluble se asocia con niveles bajos de FND y altas proporciones de hoja/tallo al inicio de la primavera (Van Vuuren *et al.*, 1991), lo que resulta en uso incompleto del nitrógeno en el rumen y en altos niveles de urea en sangre durante la primavera y principios del verano (Wittwer *et al.*, 1993). Estos niveles pueden exceder el rango normal, especialmente al comienzo de la primavera, lo cual se considera normal en Chile (Wittwer *et al.*, 1993).

IV. 5. REFERENCIAS

- ALDRICH, C.G., N.R. MERCHEN, J.K. DRACKLEY, G.C. FAHEY AND L.L. BERGER, 1997. The effects of chemical treatment of whole canola seed on intake, nutrient digestibilities, milk production, and milk fatty acids of Holstein cows. *J Anim. Sci.*, 75: 512–521.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- ARO, A., S. MANNISTO, I. SALMINEN, M.L. OVASKAINEN, V. KATAJA AND M. UUSITUPA, 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr. Cancer*, 38: 151-157.
- BANKS, W., J.L. CLAPPERTON, KELLY, M.E., WILSON, A.G., CRAWFORD, R.J.M., 1980. The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding soybean oil to dairy cows. *J Sci Food Agric* 31, 368–374.
- BARTOLOZZO, A., MANTOVANI, R., SIMONETTO, A., 2003. Effect of pasture and soybean supplementation on fatty acid profile and CLA content in dairy cow milk. *Ital J Anim Sci* 2 (suppl. 1), 216-218.
- BAUMAN, D.E., B.A. CORL, L.H. BAUMGARD AND J.M. GRIINARI, 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Recent Advances in Animal Nutrition. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 221-250.

- BAUMGARD, L.H., CORL, B.A., DWYER, D.A., SAEBO, A., BAUMAN, D.E., 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol* 278, R179-R184.
- BAYOURTHE, C., F. ENJALBERT AND R. MONCOULON, 2000. Effects of different forms of canola oil fatty acids plus canola meal on milk composition and physical properties of butter. *J. Dairy Sci.*, 83: 690–696.
- BERTONI, G. AND F. PICCIOLI-CAPPELLI, 1999. Guida all'interpretazione dei profili metabolici. Università degli Studi di Perugia Ed. Perugia, Italy.
- CANT J.P., DEPETERS, E.J., BALDWIN, R.L., 1993. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *J Dairy Sci* 76, 762-774.
- CHILLIARD, Y., GLASSER, F., FERLAY, A., ROUEL, J., DOREAU, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur J Lipid Sci Technol* 109, 828–855.
- CHICHLOWSKI, M.W., J.W. SCHROEDER, C.S. PARK, W.L. KELLER, D.E. SCHIMEK, 2005. Altering the fatty acids in milk fat by including canola seed in dairy cattle diet. *J. Dairy Sci.*, 88: 3084–3094.
- CHOUINARD, P.Y., CORNEAU, L., BUTLER, W.R., CHILLIARD, Y., DRACKLEY, J.K., BAUMAN, D.E., 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci* 84, 680-690.
- DELBECCHI, L., C.E. AHNADI, J.J. KENNELLY AND P. LACASSE. 2001. Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in holstein cows fed protected or unprotected canola seeds. *J. Dairy Sci.*, 84: 1375–1381.
- DEPETERS, E.J., CANT, J.P., 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J Dairy Sci* 75, 2043–2070.
- DEVERY, R., A. MILLER AND C. STANTON, 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 29: 341-344.
- DEWHURST, R.J., SHINGFIELD, K.J., LEE, M.R.F., SCOLLAN, N.D., 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.

- FOLCH, J., LESS, H., SLOANE-STANLEY, G.H., 1957. A simple method for the insolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 726, 497-509.
- GARRIDO O., 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanente de pastoreo a través del año. *Memoria de Título*. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. [in Spanish]
- GRIINARI, J.M., BAUMAN, D.E., 2003. Update on theories of diet-induced milk fat depression and potential applications. *Rec Adv Anim Nutr* 37, 115–156.
- GRUMMER, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci* 74, 3244–3257.
- GUILLAUME, B., OTTERBY, D.E., STERN, M.D., LINN, J.G., JOHNSON, D.G., 1991. Raw or extruded soybeans and rumen protected methionine and lysine in alfalfa-based diets for dairy cows. *J Dairy Sci* 74, 1912–1922.
- INE. Instituto Nacional de Estadísticas, 2007. Las pequeñas y medianas explotaciones. VII Censo Agropecuario y Forestal 2006-2007. Chile. 89 pp. [in Spanish]
- KELSEY, J.A., CORL, B.A., COLLIER, R.J., BAUMAN, D.E., 2003. The effect of breed, parity and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J Dairy Sci* 86, 2588-2597.
- KHANAL, R.C., T.R. DHIMAN, A.L. URE, C.P. BRENNAND, R.L. BOMAN AND D.J. MCMAHON. 2005. Consumer acceptability of conjugated linoleic acid-enriched milk and cheddar cheese from Cows Grazing on Pasture. *J. Dairy Sci.*, 88: 1837-1847.
- KHANAL, R., OLSON, K.C, 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat and egg: A Review. *Pakistan J Nutr* 3, 82-98.
- LAWLESS, F., MURPHY, J.J., HARRINGTON, D., DEVERY, R, STANTON, C., 1998. Elevation of conjugated *cis-9.trans-11*-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J Dairy Sci* 81, 3259-3267.
- LOCK, A.L., GARNSWORTHY, P.C., 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid Δ (9)-desaturase activity in dairy cows. *Livest Prod Sci* 79, 47-59.

- LOOR, J.J., FERLAY, A., OLLIER, A., DOREAU, M., CHILLIARD, Y., 2005. Relationship among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J Dairy Sci* 88, 726–740.
- MOHAMED, O. E., SATTER, L. D., GRUMMER, R.R., EHLE, F.R., 1988. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. *J Dairy Sci* 71, 2677–2688.
- MORRISON, W.R., SMITH, L.M., 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lip Res* 5, 600-608.
- MOSLEY, E.E., SHAFII, B., MOATE, P.J., MCGUIRE, M.A., 2006. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J Nutr* 136, 570–575.
- MURPHY, J.J., M. COAKLEY AND C. STANTON, 2008. Supplementation of dairy cows with a fish oil containing supplement and sunflower oil to increase the CLA content of milk produced at pasture. *Livest. Sci.*, 116: 332–337.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. Seventh revised edition. National Academy Press. Washington D.C., USA. 381 pp.
- PALMQUIST, D.L., LOCK, A.L., SHINGFIELD, K.J., BAUMAN, D.E., 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res* 50, 179–217.
- PARADIS, C., BERTHIAUME, R., LAFRENIÈRE, C., GERVAIS, R., CHOUINARD, P.Y., 2008. Conjugated linoleic acid content in adipose tissue of calves suckling beef cows supplemented with raw or extruded soybeans on pasture. *J Anim Sci* 86, 1624-1636.
- PARIZA, M.W., PARK, M.E., 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40, 283-298.
- PULIDO, R.G., 2009. Efecto del nivel de suplementación con concentrado sobre la respuesta productiva en vacas lecheras a pastoreo primaveral con alta disponibilidad de pradera. *Arch Med Vet* 41, 197-204.

- RUIZ, I. 1996. Praderas en la IX Región de la Araucanía. Praderas para Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. 2 Ed. Santiago de Chile. 734pp.
- SAG (Servicio Agrícola Ganadero), 2010. Planteles de Animales Bovinos Lecheros Bajo Certificación Oficial. Instructivo Técnico N°3. Exigencias para el ingreso al Programa de Plantel de Animales Bovinos Lecheros Bajo Certificación Oficial. Chile. [in Spanish]
- SOLOMON, R., CHASE, L.E., BEN-GHEDALIA, D., BARMAN, D.E., 2000. The Effect of nonstructural carbohydrate and addition of full Fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J Dairy Sci* 83, 1322–1329.
- STARLING, S., 2002. Functional foods stand poised for further growth. In: Functional Foods and Nutraceuticals. New Hope Natural Media, Boulder, CO, USA. pp. 6–19.
- SCHÜLER, D., H. HARTUNG, S. MÜLLER AND U. JACOBI, 1990. Der Milchnharnstoffgehalt ein Kennwert für das Verhältnis von Protein zu Energie in Milchkuhrationen kann mit Teststreifen gemessen werden. *Tierzucht.*, 44: 14-15.
- THEURER, C.B., HUBER, J.T., SANTOS, F.A.P., 1995. Feeding and managing for maximal milk protein. In Proc. Southwest Nutr. Manag. Conf. Dept. Animal Science, Univ. Arizona, Tucson, AZ. pp. 59-67.
- TILLEY, J.M., TERRY, R.A., 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Br Grassl Soc* 18, 104-111.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J., LEWIS, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74, 3583-3595.
- VAN VUUREN, M. TAMMINGA, S., KETELAAR, R.S., 1991. In sacco degradation of organic matter and crude protein of fresh grass (*Lolium perenne*) in the rumen of grazing dairy cows. *J Agric Sci Camb* 116, 429-436.
- WAHLE, K. W., S. D. HEYS AND D. ROTONDO, 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?. *Prog. Lipid Res.*, 43: 553–587.

- WALKER, G.P., DUNSHEA, F.R., DOYLE, P.T., 2004. Effects of nutrition and management on the production and composition of milk fat and protein: a review. *Aust J Agric Res* 55, 1009–1028.
- WARD, A.T., WITTENBERG, K.M., FROEBE, H.M., PRZYBYLSKI, R., MALCOLMSON, L., 2003. Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleic acid levels in plasma and milk. *J Dairy Sci* 86, 1742-1750.
- WHITE, S.L., BERTRAND, J.A., WADE, M.R., WASHBURN, S.P., GREEN, J.T., JENKINS, T.C., 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 84, 2295-2301.
- WITTWER, F., OPITZ, H., REYES, J., CONTRERAS, P., BÖHMWALD, H., 1993. Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. *Arch Med Vet* 25, 165-172. [in Spanish]
- Ward, A.T., K.M. Wittenberg, H.M. Froebe, R. Przybylski and L. Malcolmson, 2003. Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleic acid levels in plasma and milk. *J. Dairy Sci.*, 86: 1742-1750.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Conclusiones relativas a la caracterización de los sistemas productivos

- Los sistemas productivos de la IX Región de Chile, como región con un sistema de producción intermediario entre la VIII y la X Región. han presentado una relación entre variables cualitativas y variables productivas, dependiendo si el productor es considerado pequeño o grande.
- El nivel educacional y la experiencia como lechero, puede dar una mayor posibilidad de apertura a nuevas tecnologías con un mayor impacto productivo en cantidad y calidad de leche.
- Los sistemas productivos que siguen la norma de acuerdo a las buenas prácticas ganaderas (terapia de secado, existencia de registros, presencia de estanque etc.) obtienen resultados productivos más positivos, que aquellos predios que realizan una rutina fuera de las normas de las buenas prácticas ganaderas

2. Conclusiones relativas al contenido de CLA en productos lácteos en Chile y efecto del procesamiento

- La leche cruda procedente de sectores con sistemas de alimentación a base de pastoreo, en comparación con sectores con sistemas más estabulados y basados en ración mezcla total, han presentado mayores contenidos de CLA, con valores medios entre 1.72 g/100 g total FA de la leche de primavera de la zona de Osorno y 0.42 g de la leche de verano de la zona de Los Ángeles.
- Los productos lácteos han presentado contenidos significativamente mayores de CLA que la leche cruda, con promedios muy variados que van desde 0.88 g/100 g of total FA en queso hasta 1.50 g en mantequilla, 1.49 g en leche condensada y 1.97 g en leche en polvo.
- El isómero *cis*-9, *trans*-11 representa un 53% del CLA total, y se encuentra en un rango que va de 0.26 g/100 g of total FA en el silo de leche de verano en la zona de los Ángeles y un máximo de 1.26 g en mantequilla en la zona

de Osorno. Las cantidades de los isómeros *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12 han sido superiores a las señaladas en la literatura.

- El procesado ha afectado significativamente el traspaso de CLA de leche fresca a producto (leche condensada y leche el polvo). Tanto para el CLA total como para sus isómeros, la leche condensada presentó en la mayoría de los meses menores valores que la leche líquida original y la leche en polvo. En cambio, la leche en polvo presentó valores cercanos o superiores a los de la leche líquida.

3. Conclusiones relativas a las estrategias de mejora del contenido de CLA

- La incorporación de soja extrusada (a niveles de 0,5 and 1,0 kg d⁻¹ en el concentrado en animales de raza Jersey) y de canola (*Brassica napus*), ya sea en grano entero o grano molido (en cantidades de 1,2 kg d⁻¹ en vacas Frisón Negra Chilena) en sistemas de alimentación a base de pastoreo, no incrementó los contenidos de CLA total y de los isómeros *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12. En cambio, dichos contenidos si fueron afectados por la calidad nutritiva del pasto, observándose menores valores conforme se incrementa la madurez del pasto.
- Mayores niveles de los isómeros *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12 en leche se han obtenido, en comparación a los normalmente encontrados en la literatura. En concreto, el isómero *cis*-10, *cis*-12 no aparece señalado en la literatura científica, por lo que son necesarios futuros estudios con el fin de determinar su función biológica y sus rutas metabólicas de producción.

4. Conclusiones generales

- Si bien el consumo de productos lácteos en Chile es más bajo que el de otros países más consumidores de estos productos, la alta cantidad de CLA de los productos estudiados en el presente trabajo, garantizan adecuados niveles para la salud humana.

Capítulo V. Conclusiones

- Se requiere mayor investigación para determinar el efecto de las condiciones de procesamiento y almacenamiento de la leche y productos lácteos sobre el contenido de CLA.
- Se requiere más investigación para establecer nuevas estrategias que incrementen el contenido de CLA en productos lácteos en sistemas bovinos basados en el pastoreo, tanto en praderas naturales, mejoradas y artificiales.
- Toda la información generada puede servir de base para implementar un programa de mejoramiento de aspectos técnicos de manejo y económicos (mayor valor añadido de los productos obtenidos) tanto gubernamental como privado en el sector bovino lechero de los sectores estudiados del sur de Chile, especialmente en los pequeños productores.

Capítulo V. Conclusiones

ANEXO

PUBLICACIONES

CARACTERIZACIÓN PRODUCTIVA DE EXPLOTACIONES LECHERAS EMPLEANDO METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MULTIVARIADO

Productive Characterization of Milk Farms Using Multivariate Analysis

Juan Pablo Avilez¹, Paul Escobar¹, Gabrielle von Fabeck¹, Karen Villagran², Fernando García¹, Roberto Matamoros² y Antón García Martínez³

¹ Facultad de Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco. Montt 56. Temuco. Chile.

² Universidad Santo Tomás. ³ Universidad de Córdoba, España. E-mail: jpavilez@uct.cl

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar sistemas productivos lecheros de la comuna de Vilcún, provincia de Cautín, IX Región, Chile, relacionando variables cualitativas y cuantitativas aplicando para ello análisis estadístico multivariado de correspondencia simple. Se encuestaron 24 fincas lecheras: 11 consideradas pequeñas, 7 medianas y 6 grandes productores lecheros. Los resultados generales muestran que los productores grandes tienen mayor superficie de hectáreas dedicadas a la lechería, mayor número de días de lactancias de sus vacas y una producción promedio de 14 L vaca día⁻¹, en comparación con 9 L vaca día⁻¹ de los medianos y pequeños productores. Por otro lado, el análisis multivariado de correspondencia simple muestra asociación entre el nivel educacional de los productores y la cantidad de leche producida. Es así que los productores grandes poseen un título profesional de nivel superior técnico o de ingeniero. Así mismo, el nivel de escolaridad de los ordeñadores es básico completo para los productores grandes y básico completo e incompleto para los pequeños y medianos productores. Los productores que realizan dos ordeños/día tienen mayor producción total de leche, y la terapia de secado se lleva a cabo más en productores grandes y medianos que en los pequeños. El uso de estanque de frío es de uso permanente en los productores con mayor volumen productivo. Finalmente, los grandes productores usan registros reproductivos asociándose esto a sus altas producciones. En el aspecto sanitario se observa que los productores con mayor antigüedad en el rubro lechero tienen menos problemas de mastitis en su rebaño.

Palabras clave: Caracterización explotaciones lecheras, análisis multivariado.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize dairy productive systems of Vilcún commune, Cautín province, the IXth Region, Chile, linking qualitative and quantitative variables using statistical multivariate analysis of simple correspondence. 24 dairy farms were analyzed: 11 considered small size, 7 medium ones and 6 big dairy producers. The general results show that the big producers have a larger surface of hectares dedicated to the dairy, more days of lactation and an average production of 14 L per day, in comparison with 9 L of the medium and small producers. The multivariable analysis of simple correspondence shows association between the educational level of the dairy producers and the quantity of produced milk. Thus, big producers have possess a professional title of degree senior technician or engineer. On the other hand, the level of education of the milkers was at least secondary level for the big producers and basic complete and incomplete for the small and medium producers. Likewise, the producers who carry out twice-daily milking have bigger total production of milk, and the drying therapy is carried out more in big and medium producers than in the small ones. The use of cooling tank is of permanent use in the producers with a greater productive volume. Finally, the big producers used a reproductive records which are associated with their high productions. About the sanitary aspect was observed that the producers with more seniority in the business have fewer mastitis problems in their herd.

Key words: Characterization, dairy farms, multivariate analysis.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de leche se caracterizan por su alta complejidad y su influencia por el medio ambiente [28], el sistema de producción adoptado, el ambiente institucional

(tecnología y servicios) y los valores culturales. Así, la planificación de acciones de intervención requiere distinguir los diferentes grupos o tipos que coexisten en la población estudiada, considerando los diversos aspectos en que se desarrollan los sistemas de producción [4]. Aquí, cobran importancia aspectos sociales como el nivel educativo de los propietarios, de los trabajadores, años de antigüedad en el sector, asociación de experiencia en el sector y manejo productivo; todo ello contribuiría a la adopción de nuevas tecnologías que mejoren su empresa productiva [6, 27, 42]. Caracterizar estos sistemas es complejo por lo que se han propuesto una serie de técnicas de análisis estadísticos como, técnicas de análisis de varianza [1, 9, 24, 25, 42], técnicas de análisis multivariante como el análisis de componentes principales, correspondencia múltiple y análisis de conglomerados (cluster) [10, 23, 29, 30, 32, 38, 41], los que incluyen un conjunto de técnicas y métodos que permiten estudiar conjuntos de variables en una población de individuos. Por lo anterior, se planteó un estudio para caracterizar explotaciones lecheras de la zona de Vilcún (IX Región-Chile) empleando una metodología multivariada que permita analizar variables, técnicas productivas y características del recurso humano disponibles en las explotaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la muestra y diseño del instrumento de recolección de datos

El estudio se realizó en la comuna de Vilcún [35], provincia de Cautín, IX Región, Chile, a partir de la evaluación de 56 explotaciones lecheras en este sector [17], de las cuales se muestrearon 24 fundos, lo que representa un 43% de la población. De éstos, once (11) productores fueron considerados como pequeños con una producción de leche menor a 50.000 L año⁻¹, siete (7) medianos con una producción de 50.000-100.000 L año⁻¹ y seis (6) grandes productores lecheros con producciones superiores a 100.000 L año⁻¹. La información fue recogida mediante una encuesta de elaboración propia, siguiendo metodologías establecidas [2] y descrita en trabajos previos [3, 5, 14, 39]. Una vez realizadas las encuestas se tabuló la información y se elaboró una base de datos con las variables que representan la dimensión de las explotaciones y la productividad de las mismas como son: inventario ganadero (número, edad aproximada de las vacas, raza, manejo reproductivo), alimentación de las vacas (manejo del pastoreo y nivel de uso de concentrados), inventario de praderas, cultivos suplementarios y formas de conservación de forraje (números de corte para ensilaje y heno, edad y calidad de las praderas, y niveles de fertilización), aspectos sanitarios del rebaño (terapia de secado), inventario de mano de obra (tiempo dedicado al rubro lechero por cada trabajador, años de educación, capacitación) presencia de tanque de frío y nivel tecnológico; como datos que causan mayor impacto productivo en los sistemas lecheros en Chile. Este modelo matemático sigue un análisis factorial, el cual puede ser exploratorio o confirmatorio

[7, 16]. El análisis exploratorio se caracteriza porque no se conocen *a priori* el número de factores y es en la aplicación empírica donde se determina este número. Por el contrario, en el análisis de tipo confirmatorio, los factores están fijados *a priori*, utilizándose contrastes de hipótesis para su corroboración, lo cual corresponde a este trabajo.

Cada variable se expresa como una combinación lineal de factores no directamente observables.

$$X_{ij} = F_{1i} a_{i1} + F_{2i} a_{i2} + \dots + F_{ki} a_{ik} + V_i, \text{ siendo:}$$

X_{ij} : la puntuación del individuo i en la variable j .

F_{ij} : son los coeficientes factoriales.

A_{ij} : son las puntuaciones factoriales.

V_i : sea el factor único y se llama especificidad, representando la contribución del factor único a la variabilidad total de X_i .

Análisis estadísticos

Para realizar un adecuado procesamiento estadístico de los datos de las encuestas, se utilizó el método de clasificación multivariado. A cada variable se le asignó un código para su posterior análisis, luego se procedió a su traspaso a una planilla electrónica Microsoft Office Excel 2003. Los datos cuantitativos y cualitativos obtenidos a través de la encuesta fueron sometidos a un análisis de parámetros estadísticos descriptivos [34]. Luego, los datos cualitativos recopilados fueron sometidos a un análisis de correspondencias simples, que es una técnica de reducción de dimensiones en el contexto de tablas de contingencia [19, 20]. Este método permite estudiar la relación entre variables según las distancias en puntos representados en un plano, el fin es representar gráficamente la relación entre variables. Se trata de una técnica de análisis multivariable, aplicable al análisis de matrices de datos [44]. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences SPSS versión 13,0 para Windows (SPSS Inc, Chicago IL, EUA) y JMP versión 5,0 (SAS 1996) [36].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los sistemas lecheros

En el caso de los pequeños y medianos productores tienen un promedio de 160 has. destinadas a la producción de leche; en cambio, los grandes productores poseen en promedio de 240 has. destinadas a lechería. El total de productores realiza ordeño mecanizado y dos veces al día, excepto un 8%, que realiza un sólo ordeño. Respecto al período de lactancia, en el caso de los pequeños productores de leche, se tiene que un 63,6% de los encuestados mantienen una lactancia entre 200-250 días, y sólo un 18,2% tiene lactancias entre 250-280 días. Esto contrasta con una óptima lactancia estandarizada de 305 a 325 días [13]. En lo referente a los grandes productores, un 66,7% declaró tener lactancias entre los 280-300 días,

y el otro 33,3% mayor a los 300 días. La producción promedio por vaca correspondía a 9 L diarios en el caso de los pequeños y medianos productores y de 14 L para los considerados grandes. La producción de leche en este sector se basa en praderas naturales, con un manejo de pastoreo continuo en todos los sistemas estudiados.

Análisis multivariado

Análisis de correspondencia entre producción total de leche y educación del propietario

La asociación entre estas dos categorías es alta y corresponde a un 86%. De acuerdo a la FIG. 1, existe una mayor cercanía entre los productores con educación superior y una alta producción de leche (>100.000 L año⁻¹). Así mismo, se puede ver que existe una asociación entre los productores con educación media y una producción media de leche (50.000-100.000 L año⁻¹). También se puede observar una relación entre los productores con educación básica y una baja producción de leche (<50.000 L año⁻¹). El nivel educacional del productor es una limitante, tanto para tomar decisiones técnicas como administrativas [15, 22]. En este sentido, los individuos más preparados educacionalmente, poseen una mayor flexibilidad para la adopción de nuevas técnicas [12, 26]. Sin embargo, elementos de gestión que adopte un productor, no parecen estar ligados a su nivel educativo y no serían importantes en el nivel productivo de su empresa [42]. Es por ello importante desarrollar programas de capacitación que proporcione a los productores mejores herramientas en la toma de decisiones [11] para mejorar la cantidad y calidad de la leche.

Análisis de correspondencia entre educación del ordeñador y producción total de leche

Del total de agricultores encuestados, la categoría de producción total de leche alta (>100.000 L año⁻¹) presenta sólo ordeñadores con estudios de educación básica completa, lo que sumado al nivel de preparación del dueño de la explotación genera mayor adopción de tecnologías y mayor capacidad de respuestas frente a problemas. Los productores considerados medianos, presentan solamente ordeñadores con educación básica incompleta. Finalmente, en el caso de una producción lechera baja, existe una proporción de ordeñadores con educación básica completa cercana al 80%, en contraste con un 20% de ordeñadores con educación básica incompleta (FIG. 2). Sin duda que la educación del productor y del ordeñador reduce la vulnerabilidad sanitaria y productiva de un sistema lechero [27, 42].

Análisis de correspondencia entre N° de ordeños diarios y producción total de leche

El análisis de correspondencia entre el número de ordeños diarios y la producción total de leche muestra un grado de asociación de un 65% lo que está indicando una relación alta. De acuerdo a lo observado en la FIG. 3, en el gráfico porcentual

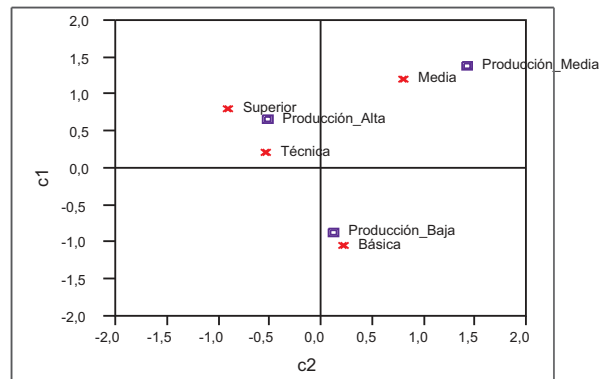


FIGURA 1. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA DE PRODUCCIÓN TOTAL DE LECHE Y NIVEL DE EDUCACIÓN DEL PRODUCTOR/ ANALYSIS OF CORRESPONDENCE: TOTAL PRODUCTION OF MILK AND EDUCATION LEVEL OF THE PRODUCER.

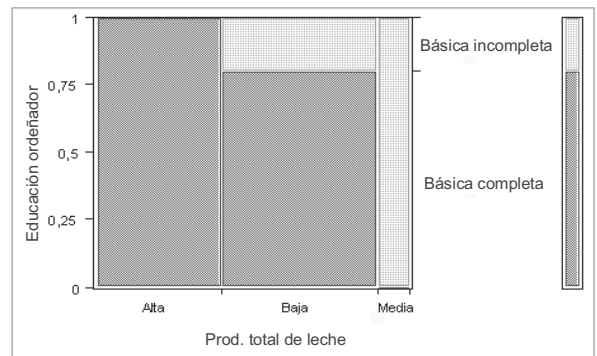


FIGURA 2. GRÁFICO DE CONTINGENCIA DE EDUCACIÓN DEL ORDEÑADOR Y PRODUCCIÓN TOTAL DE LECHE/ A CONTINGENCY GRAPH FOR MILKER EDUCATION AND TOTAL PRODUCTION OF MILK.

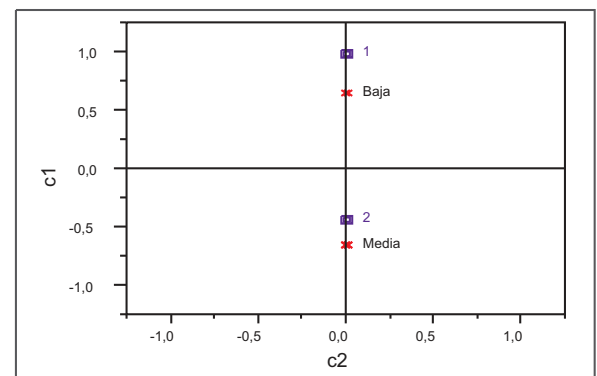


FIGURA 3. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA DE NÚMERO DE ORDEÑOS DIARIOS Y PRODUCCIÓN TOTAL DE LECHE/ CORRESPONDENCE ANALYSIS OF THE NUMBER OF DAILY MILKINGS AND TOTAL PRODUCTION OF MILK.

existe una mayor relación entre producciones de leche altas y medias superiores a 50.000 L año⁻¹ y realizar dos ordeños al día. Se puede observar que existe una mayor cercanía entre producciones bajas de leche (menor a 50.000 L año⁻¹) con realizar un ordeño diario. La frecuencia del ordeño aumenta la producción de leche [37], al pasar de uno a dos ordeños y a tres ordeños se obtiene más kg día⁻¹ en la medida que se aumenta la frecuencia, siendo similares estos aumentos para vacas primíparas y multíparas [13]. Actualmente existe una corriente en Nueva Zelanda, dado por el bienestar animal, de ordeñar una sola vez al día en vez de dos, existiendo diferencia en la producción y en el tamaño de la ubre; sin embargo, en cuanto al nivel de estrés no existe diferencia significativa [43].

Análisis de correspondencia entre terapia de secado y producción total de leche

Del total de los productores lecheros encuestados, en la categoría de producción lechera alta aproximadamente un 75% realiza terapia de secado a todas las vacas del plantel, en contraste con un 25% que realiza terapia de secado sólo a las vacas con mastitis. En relación a los productores medianos, la totalidad realiza terapia de secado a todas las vacas. En el caso de los productores pequeños, aproximadamente un 60% no realiza terapia de secado, un 20% hace terapia de secado a todas las vacas y el otro 20% sólo a las vacas con mastitis (FIG. 4). La terapia de secado junto con el tratamiento antibiótico al término de la lactancia es una de las medidas más ampliamente difundidas en el mundo para el control de la mastitis [21]. Otros autores señalan que la terapia de secado se debería utilizar sólo en animales con problemas de mastitis [31]. Todos los productores encuestados practican una terapia de secado de al menos 60 días. La terapia de secado óptima se realiza entre los 40 y 60 días y existen diferencias productivas de leche corregida al 4% al acortar el periodo seco [40]. Estudios recientes señalan que no hay diferencias en la producción de leche entre vacas con periodos secos de 28 días o de 70 días. Por otro lado, se afirma que la eliminación del periodo seco mejoraría el balance energético y el estado metabólico de los animales [33].

Análisis de correspondencia entre producción total de leche y sistema de enfriamiento

En acuerdo con el análisis de correspondencia, las variables estudiadas tienen un grado de asociación del 50%. En la FIG. 5, porcentualmente existe una mayor asociación entre uso del tanque enfriador en los fundos con producciones altas y medias de leche. Además, se observa que existe una mayor cercanía entre uso de agua corriente y baja producción lechera. El enfriamiento de la leche es importante, ya que la leche tibia es un medio excelente para el crecimiento de microorganismos y el número aumentará significativamente en un corto período de tiempo si la leche no es enfriada [31] y por ello, el recuento de células somáticas en el tanque pasa a ser un excelente indicador de la sanidad mamaria [18].

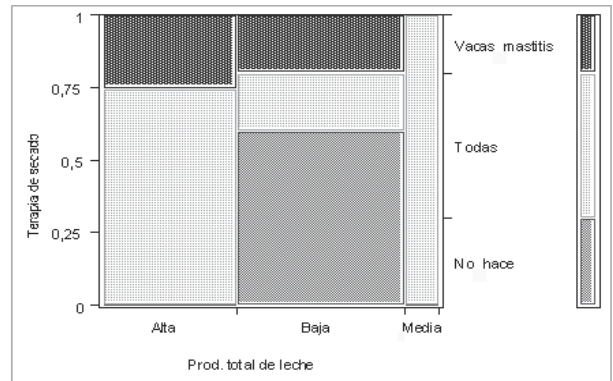


FIGURA 4. GRÁFICO DE CONTINGENCIA DE TERAPIA DE SECADO Y PRODUCCIÓN TOTAL DE LECHE/ GRAPH OF CONTINGENCY FOR DRY THERAPY AND TOTAL PRODUCTION OF MILK.

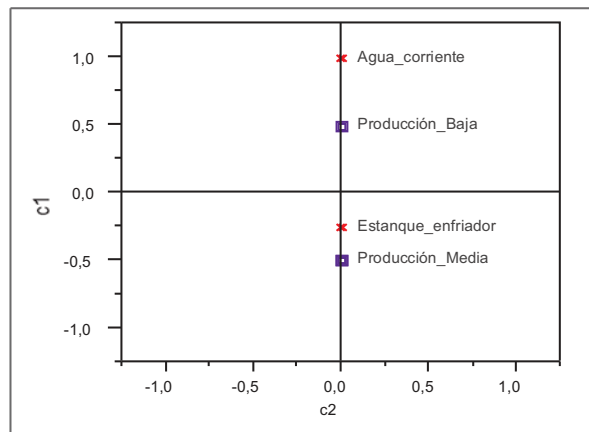


FIGURA 5. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA DE PRODUCCIÓN TOTAL DE LECHE Y SISTEMA DE ENFRIAMIENTO/ CORRESPONDENCE ANALYSIS OF TOTAL MILK PRODUCTION AND MILK COOLING SYSTEM.

Análisis de correspondencia entre registros reproductivos y producción total de leche

La asociación de estas categorías es de un 43%, lo que indicaría una asociación media a baja (FIG. 6). Al observar la FIG. 6, se puede ver que existe una mayor cercanía entre producciones bajas a medias de leche y el no uso de registros reproductivos, como así también se puede apreciar una mayor proximidad entre producciones altas de leche y el uso de registros reproductivos de los planteles lecheros. Los registros son muy importantes en todo lo que se refiere al manejo del ganado, ya que permiten, por ejemplo, determinar en que día se debe secar la vaca, determinar la fecha probable de parición, adaptar la ración por grupos e ir manejando su condición corporal; ello con el fin de evaluar el ciclo productivo una vez finalizado, lo que sin lugar a dudas permite lograr una mejor gestión y

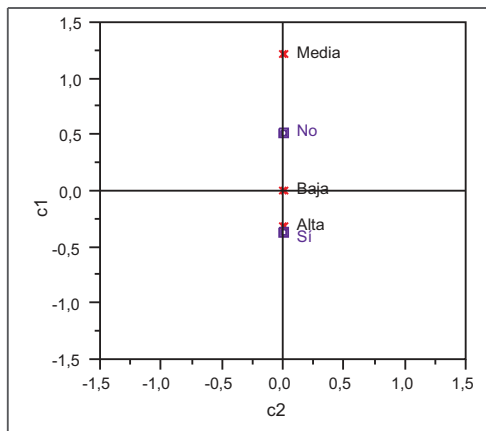


FIGURA 6. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA DE REGISTROS REPRODUCTIVOS Y PRODUCCIÓN TOTAL DE LECHE/ CORRESPONDENCE ANALYSIS OF REPRODUCTIVE RECORDS AND TOTAL PRODUCTION OF MILK.

una mejor rentabilidad [4]. Además, es importante usar la información reproductiva en rebaños como herramienta útil en la toma de decisiones comerciales del ganado lechero [8].

Análisis de correspondencia entre mastitis y tiempo como lechero

De acuerdo con el análisis de correspondencia, se observó un grado de asociación entre las categorías medidas de un 77%, lo que indicaría una asociación alta. De acuerdo a la FIG. 7, se observa que existe una mayor cercanía entre los productores que llevan menos tiempo en el rubro lechero (0-5 años) y un alto nivel de mastitis. Así mismo se puede ver que existe una relación entre los productores más antiguos en el rubro (20-25 años) y un bajo nivel de mastitis en los fundos. El resto de las categorías de tiempo como productor lechero tendría una mayor cercanía con niveles medios de mastitis. También se puede observar que los niveles medios a altos de prevalencia de mastitis están asociados a tiempos recientes como productor en el rubro lechero y viceversa.

CONCLUSIONES

Este estudio revela que existe relación entre variables cualitativas y variables productivas, dependiendo si el productor es considerado pequeño o grande. Queda claro que el nivel educacional da una mayor posibilidad de apertura a nuevas tecnologías y a una mayor capacidad de negocio del productor. En general, los sistemas productivos que siguen la norma de acuerdo a las buenas prácticas ganaderas (terapia de secado, existencia de registros, presencia de tanque, entre otros) obtienen resultados productivos más positivos que aquellos fundos que realizan una rutina fuera de las normas de las buenas prácticas ganaderas. Finalmente se puede señalar que, estos datos deberían servir de base para implementar un programa de mejoramiento, tanto gubernamental como privado,

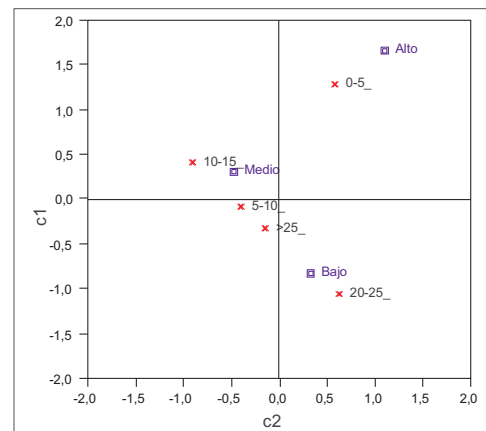


FIGURA 7. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIAS DE MASTITIS Y TIEMPO COMO LECHERO/ CORRESPONDENCES ANALYSIS OF MASTITIS AND TIME AS A DAIRY MAN.

en el sector bovino lechero de Vilcún, especialmente en los pequeños productores.

AGRADECIMIENTO

Proyecto FONDEF N° D0211135. “Desarrollo de productos con alto contenido de principios activos funcionales a partir de leche bovina y sus derivados”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACERO, R.; MARTOS, J.; GARCÍA, A.; LUQUE, M.; HERRERA, M.; PEÑA, F. Characterization of extensive goat systems through factorial analysis. *International Symposium. Animal Production and natural resources utilization in the Mediterranean Mountain Areas*. Ioannina, Epirus, 5-7 June. Grecia, 305 pp. 2003.
- [2] ANRIQUE, R. Caracterización del Chile lechero. En: *Producción Animal*. Serie B-22. Latrille, L (Ed). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 140-157 pp. 1999.
- [3] ANRIQUE, R.; FERRANDO, A.; BALOCCHI, O.; SMITH, R.; OPITZ, H.; ECHEÑIQUE, J. Caracterización de los sistemas productivos ganaderos de la región de Aysén. *XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal*. Chillán, 2-4 octubre. Chile. 212 pp. 2002.
- [4] AUSÍN, J. Apropriados manejos post-parto para mantener la producción y eficiencia. *Agroanál.* Chile. 202: 27-29. 2001.
- [5] AVILA, L.; MUÑOS, M.; RIVERA, B. Tipificación de los sistemas de producción agropecuaria en la zona de influencia del programa UNIR (CALDAS). *Análisis de Conglomerados y Componentes Principales*. Universidad de Caldas, Departamento de sistemas de producción. Programa UNIR. 231pp. 2000.

- [6] BEDOTTI, D.; GÓMEZ, A.; SÁNCHEZ, M.; GARCÍA, A.; MARTOS, J. Aspectos sociológicos de los sistemas de producción caprina en el oeste pampeano (Argentina). **Arch. Zoot.** 54: 599-608. 2005.
- [7] BENSON, J.; NASSER, F. On the use of factor analysis as a research tool. **J. of Vocat. Educ. Res.** 23:13-33. 1998.
- [8] CARAVIELLO, D.; WEIGEL, K.; FRICKE, P.; WILT-BANK, M.; FLORENT, M.; COOK, N.; NORDLUND, K.; ZWALD, N.; RAWSON, L. Survey of Management Practices on Reproductive Performance of Dairy Cattle on Large US Commercial Farms. **J. Dairy Sci.** 89: 4723-4735. 2006.
- [9] CASTALDO, A. Caracterización de la invernada en el nordeste de la provincia de La Pampa Argentina. Modelos de Gestión. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Córdoba. Córdoba. España. Tesis de Grado. 347 pp. 2003.
- [10] CASTEL, J.M.; MENA, Y.; DELGADO-PERTÍNEZ, M.; CAMÚÑEZ, J.; BASULTO, J.; CARAVACA, F.; GUZMÁN, J.; ALCALDE, M. Characterization of semi-extensive goat production systems in southern Spain. **Small Rum Res.** 47: 133-143. 2003.
- [11] CHASE, L.; ELY, L.; HUTJENS, M. Major Advances in Extension Education Programs in Dairy Production. **J. Dairy Sci.** 89: 1147-1154. 2006.
- [12] CRAIG, G. Capacidades del ser humano. **Desarrollo Psicológico.** 6° Ed. Universidad de Massachusetts. Estados Unidos. 685 pp. 1992.
- [13] ERDMAN, R.; VARNER, M. Fixed Yield Responses to Increased Milking Frequency. **J. Dairy Sci.** 78: 1199-1203. 1995.
- [14] FERRANDO, A.; ANRIQUE, R.; BALOCCHI, O.; SMITH, R.; OPITZ, H.; ECHEÑIQUE, J. Caracterización técnico-productiva de las explotaciones ganaderas bovinas de la región de Aysén. **XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal**, Chillán, 2-4 octubre, Chile. 212 pp. 2002.
- [15] GATICA, F. Producción Animal. **Capacitación de agentes de extensión en ganadería.** Depto. de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 1-11 pp. 1985.
- [16] GORSUCH, R. Common Factor Analysis versus Component Analysis: Some Well and Little Known Facts. **Multiv. Behav. Res.** 5:34-42. 1990
- [17] INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (I.N.E). Síntesis Estadística Regional, IX Región. Temuco, Chile. 75 pp. 1998.
- [18] JAYARAO, B.; PILLAI, S.; SAWANT, A.; WOLFGANG, D.; HEGDE, N. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. **J. Dairy Sci** 87: 3561-3573. 2004.
- [19] JHONSON, R.; WICHERN, D. W. Clustering, Distance Methods, and Ordination. **Applied multivariate statistical análisis.** Ed. Prentice Hall. London. 761pp. 2002.
- [20] JOLIFFE, I. T. Principal Components as a Small Number of Interpretable Variables: Some Examples. **Principal Component Analysis.** 2da Ed. Springer-Verlag New York Inc., New York, NY. 478pp. 2002.
- [21] KRUIZE, J. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. **Arch. Med. Vet.** 30(2): 07-16. 1998.
- [22] LERDON, J.; ASPE, H. Análisis Económico de 13 Empresas Lecheras de la localidad de Panguipulli. Estudios de casos. **Agro Sur.** 28 (1): 1-12. 2000.
- [23] MACEDO, R.; GALINA, M.; ZORRILLA, J.; PALMA, J.; PÉREZ, J. Análisis de un sistema de producción tradicional en Colima, México. **Arch. de Zoot.** 52 (200): 463-474. 2003.
- [24] MAINAR, R.; CUESTA, P.; MÉNDEZ, I.; ASENSIO, M.; DOMINGUEZ, L.; VAZQUEZ-BOLAND, J. Caracterización de la explotación ovina y caprina de la C. A. M. mediante encuestas y análisis multivariante: Bases para una planificación en ganadería y sanidad animal. **XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Burgos, 22-24 de septiembre. España. 437-443pp. 1994.
- [25] MARTOS, J.; GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ, J.; ACERO DE LA C, R. Clasificación técnico económica de las explotaciones lácteas de la Campiña Baja Cordobesa. **Arch. de Zoot.** 44 (165): 39-48. 1995.
- [26] MONARDES, A.; COX, T.; COX, M.; NIÑO DE Z., A.; ORTEGA, H. Transferencia de tecnología. **Evaluación de adopción de tecnología.** Centro de Estudios para América Latina sobre Desarrollo Rural, Pobreza y Alimentación (CEDRA). Santiago, Chile. 117 pp. 1990.
- [27] MOORE, D.; PAYNE, M. An Evaluation of Dairy Producer Emergency Preparedness and Farm Security Education. **J. Dairy Sci.** 90: 2052-2057. 2007.
- [28] NAVARRO, H. El enfoque de sistemas en el desarrollo de predios lecheros. **Seminario de Leche.** Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Octubre. Chile. 187 pp. 2001.
- [29] PARDOS, L.; OLIVIAN, A. Aspectos técnico-económicos de las explotaciones ovinas de la raza Aragonesa. **Ovis.** 68: 53-65. 2000.
- [30] PAZ, R.; LIPSHITZ, H.; ÁLVAREZ, R.; USANDIVARAS, P. Diversidad y Análisis económico en los sistemas de producción lecheros caprinos en el área de riego del Río Dulce-Santiago del Estero Argentina. **ITEA.** 99 (1): 10-40. 2003.

- [31] PHILPOT, N. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de la leche y la reducción de la mastitis. **Curso de perfeccionamiento y mejoramiento de la calidad higiénica de leche en pequeños productores**. Osorno, 13 de Octubre. Chile. 49-84 pp. 1999.
- [32] RAPEY, H.; LIFRAN, R.; VALADIER, A. Identifying social, economic and technical determinants of silvo-pastoral practices in temperate uplands: results of a survey in the Massif central región of France. **Agric. Syst.** 69: 119-135. 2001.
- [33] RASTANI, R.; GRUMMER, R.; BERTICS, S.; GÜMEN, A.; WILTBANK, M.; MASHEK, D.; SCHWAB, M. Reducing Dry Period Length to Simplify Feeding Transition Cows: Milk Production, Energy Balance, and Metabolic Profiles. **J. Dairy Sci.** 88: 1004-1014. 2005.
- [34] RODRÍGUEZ-SAONA, L.E.; KHAMBATY, F.M.; FRY, F.S.; DUBOIS, J.; CALVEY, E.M. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **J. Food. Prot.** 67: 2555-2559. 2004.
- [35] RUIZ, I. Praderas en la IX Región de la Araucanía. **Praderas para Chile**. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Ministerio de Agricultura. 2 Ed. Santiago de Chile. 734pp. 1996.
- [36] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS/STAT. Software: Changes and Enhancements Through Release 6.11. 1996.
- [37] SPEICHER J.A.; TUCKER, H.; ASHLEY, R.W.; STANISIEWSKI, E.P.; BOUCHER, J.F.; SNIFFEN, C.J. Production Responses of Cows to Recombinantly Derived Bovine Somatotropin and to Frequency of Milking. **J. Dairy Sci.** 77: 2509-2517. 1994.
- [38] SIEGMUND-SCHULTZE, M.; RISCHKOWSKY, B. relating household characteristics to urban sheep keeping in West Africa. **Agric. Syst.** 67: 139-152. 2001.
- [39] SMITH, R.; MOREIRA, V.; LATRILLE, L. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. **Rev. Agric. Téc.** (Chile). 62(3): 375-395. 2002.
- [40] SORENSEN, J.T.; ENEVOLDSEN, C. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. **J. Dairy Sci.** 74:1277-1283. 1991.
- [41] SRAÏRI, M.T.; LYOUBI, R. Typology of dairy farming systems in Rabat Suburban region, Morocco. **Arch. de Zoot.** 52: 47-58. 2003.
- [42] STUP, R.E.; HYDE, J.; HOLDEN, L.A. Relationships Between Selected Human Resource Management Practices and Dairy Farm Performance. **J. Dairy Sci.** 89: 1116-1120. 2006.
- [43] TUCKER, C.B.; DALLEY, D.E.; BURKE, K.; CLARK, D.A. Milking Cows Once Daily Influences Behavior and Udder Firmness at Peak and Mid Lactation. **J. Dairy Sci.** 90: 1692-1703. 2007.
- [44] VIVANCO, M. El Análisis de Correspondencia. **Análisis estadístico Multivariable**. Teoría y práctica. 1ª Ed. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 234 pp. 1999.

Effect of extruded whole soybean dietary concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Jersey cows under pasture conditions

J. P. Aviléz¹, P. Escobar¹, C. Diaz¹, G. von Fabeck¹, R. Matamoros², F. García³, M. Alonzo⁴ and M. Delgado-Pertíñez^{5,*}

¹ Escuela de Medicina Veterinaria . Universidad Católica de Temuco. Montt 56. Temuco. Chile

² Universidad Santo Tomás. Sede Temuco. Rodríguez 060. Chile

³ Empresa Biotecnología Agropecuaria (BTA). Bilbao 3670. Santiago. Chile

⁴ Nestle-Chile. Francisco del Campo S/N. Fábrica Osorno – Planta Nestle. Chile

⁵ Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1. 41013 Sevilla. Spain

Abstract

Contradictory results has been found on the effects of soybean supplementation and conjugated linoleic acid (CLA) content in milk on feeding systems based on fresh forage. The objective of the study was to evaluate the effect of a dietary supplement with different quantities of extruded whole soybean on the production and composition of milk, and CLA concentration or their isomers in Jersey cows under pasture conditions. Twenty-one Jersey cows were randomly assigned into 3 groups of 7 animals each. The cows were supplemented with a dietary concentrate (5 kg d⁻¹), and each group received one of the three next treatments: control without soybean (0-SB), with extruded whole soybean at 0.5 kg d⁻¹ (0.5-SB) or at 1 kg d⁻¹ (1-SB). The basic diet was a pasture composed of *Lolium perenne* (70%), *Trifolium repens* (25%) and other species. The duration of the study was 75 d. Milk production ($p = 0.706$) and protein production ($p = 0.926$) were not affected by treatments. Fat ($p = 0.015$) and protein ($p = 0.045$) content as well as fat production ($p = 0.010$) were lower in the 1-SB group. There was no effect of the inclusion of extruded soybean on total CLA content ($p = 0.290$) or the content of *cis*-9, *trans*-11 ($p = 0.582$), *trans*-10, *cis*-12 ($p = 0.136$) and *cis*-10, *cis*-12 ($p = 0.288$) isomers. However, concentrations of all isomers were affected by the nutritional quality of the pasture, with low values observed at greater maturity stages of pasture.

Additional key words: CLA; dairy cows; grazing; milk quality.

Resumen

Efecto de la suplementación con concentrado de soja entera extrusionada en vacas Jersey en pastoreo sobre el contenido de ácido linoléico conjugado en la leche

El efecto de la suplementación con soja en sistemas de pastoreo sobre el contenido de ácido linoléico conjugado (CLA) en leche es contradictorio. El objetivo de este estudio fue evaluar en vacas Jersey en pastoreo, el efecto de la suplementación de un concentrado con diferentes cantidades de soja entera extrusionada sobre la producción de leche y su composición, especialmente sobre el contenido en CLA y sus isómeros. 21 vacas Jersey fueron divididas al azar en 3 grupos de 7 animales cada uno. Los animales fueron suplementados con un concentrado (5 kg d⁻¹) y a cada grupo se le asignó uno de los tres siguientes tratamientos: control sin soja (0-SB), con 0.5 kg d⁻¹ de soja (0.5-SB) y con 1 kg d⁻¹ de soja (1-SB). La base de la alimentación fue el pasto, compuesto mayoritariamente por *Lolium perenne* (70%) y *Trifolium repens* (25%). La duración del estudio fue de 75 días. La producción de leche ($p = 0.706$) y la producción de proteína ($p = 0.926$) no se vieron afectados. Los porcentajes de grasa ($p = 0.015$) y proteína ($p = 0.045$) y la producción de grasa ($p = 0.010$) fueron más bajos en el grupo 1-SB. Las cantidades de soja no modificaron los contenidos de CLA total ($p = 0.290$) y de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 ($p = 0.582$), *trans*-10, *cis*-12 ($p = 0.136$) y *cis*-10, *cis*-12 ($p = 0.288$), pero sí fueron afectados por la calidad nutritiva del pasto, observándose menores valores al aumentar la madurez del pasto.

Palabras clave adicionales: calidad de leche; CLA; pasto; vacas de leche.

*Corresponding author: pertinez@us.es
Received: 13-07-11. Accepted: 30-04-12

Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) represents between 20 and 28 isomers of linoleic acid C18:2 (Lock & Garnsworthy, 2003) that has been indicated as one of the most beneficial fatty acids for human health (Pariza & Park, 2001). Likewise, ruminant products as milk and meat constitute the principal source of CLA for humans. Of all possible isomers, only *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 have shown an interesting biological activity (Wahle *et al.*, 2004). The *cis*-9, *trans*-11 isomer, also known as rumenic acid, has been documented to have an anticarcinogenic (Ha *et al.*, 1987; Visonneau *et al.*, 1997; Aro *et al.*, 2000) and antioxidant effect (Devery *et al.*, 2001), whereas the *trans*-10, *cis*-12 isomer is capable of decreasing body fat and increasing lean body mass.

Diet has a major influence on milk fat CLA and it has been extensively investigated (Bauman *et al.*, 2001). Several nutritional studies have been addressed to increase CLA content in animal products and to improve their nutritional properties. For instance, it has been reported that fresh forage and oil-rich feeds increase CLA concentration (Khanal *et al.*, 2005; Dewhurst *et al.*, 2006). Soybean is widely used in total mixed ration (TMR) in different proportions, and it has been observed that seed treatment (roasting or extrusion) results in a higher increase on CLA content than that observed with intact seed (Chouinard *et al.*, 2001). However, contradictory results have been found on the effects of soybean supplementation and CLA content in milk on feeding systems based on fresh forage. Some studies (Bartolozzo *et al.*, 2003; Khanal *et al.*, 2005) did not find effects on milk CLA concentration in dairy cows, while others (Lawless *et al.*, 1998; Paradis *et al.*, 2008) observed an increase in the CLA using dairy and beef cattle.

On the other hand, the effects of other factors such as breed, lactation and parity on CLA content in milk fat have received less attention. Kelsey *et al.* (2003) reported that breed (Holstein vs. Brown Swiss), parity, and days in milk accounted for < 0.1, < 0.3, and < 2.0% of the total variation in CLA concentration in milk fat, respectively. The incorporation of Jersey cattle in dairy farms has been increased in the last decade in Chile due to their high level of total milk solids produced

(INE, 2007). Although, it has been documented that concentration of CLA in milk from Jersey cows is 18% lower than that observed in Holstein cows (White *et al.*, 2001), apparently few studies have been conducted regarding CLA content in Jersey cows.

Whilst functional foods have been considered a promising area for human health (Starling, 2002), it has frequently been observed that consumers expect added-value products without substantial extra cost, suggesting that the development of low-cost approaches will be important (Dewhurst *et al.*, 2006). Considering that soybean is an imported feedstuff in the majority of the countries and given the current prices in the market, the objective of this study was to evaluate the effect of a dietary supplement with different quantities of extruded whole soybean (0.5 and 1.0 kg d⁻¹) on milk yield, CLA isomers content and metabolic profile in Jersey cows maintained in pasture-based systems.

Materials and methods

Animals and diets

The experiment was carried out in a farm with a Jersey herd based on grazing plus the use of concentrate, located in the Entre Lagos sector (district of Osorno, Chile), approximately 72° 36' 24" W 40° 41' 26" S, 250 m above sea level. The farm lies in the pre-mountain range of the Chilean Andes, Region X, which is characterized by an average rainfall of 2250 mm per year, with an average daily temperature of 21.8°C in January and 3°C in August.

The experiment was developed in compliance with the principles and specific guidelines on animal care and welfare as required by Chilean law (SAG, 2010). The duration of the experiment was 75 d, between 15th November 2005 and 25th January 2006 (spring period). The first 15 d were for adaptation to the experimental diets and the experimental period was from day 15 to day 75. Twenty-one healthy cows between 2 and 7 calvings, with a range from 60 to 120 days in milk (92 ± 5 DIM) and a body condition score of 2.75 ± 0.7 were used in the study. An average of 18.4 ± 3.73 kg d⁻¹ of milk production was recorded. Cows were selected for the study based on previous milk production in order to make three ho-

*Abbreviations used: ADF (acid detergent fibre); CLA (conjugated linoleic acid); DIM (days in milk); FCM (fat corrected milk production); GLM (general linear model); IVDMD (*in vitro* dry matter digestibility); ME (metabolizable energy); NDF (neutral detergent fibre); SB (soybean); TMR (total mixed ration).

mogenous groups and they were randomly assigned (n=7/per group) to receive a dietary concentrate or treatment with different quantities of extruded whole soybean: T1= control diet without supplementation (0-SB), T2 = 0.5 kg d⁻¹ (0.5-SB) and T3 = 1 kg d⁻¹ (1-SB). Each animal was fed with 5 kg d⁻¹ of isoenergetic dietary concentrate (Table 1), distributed in two visits to the milking parlour, at 06:00 h in the morning and in the afternoon at 16:00 h. Visual observation of feed intake indicated that cows consumed all concentrate offered. The animals grazed in two paddocks of 18 hectares each, and managed with rotational strip-grazing and electric fencing. The pasture was an improved natural pasture with grasses being the predominant species (70% *Lolium perenne*, 25% *Trifolium repens*, 3% *Bromus* sp). The animals were transferred from one strip to the next every 24 h. The diets were

formulated according to the animal requirements established by NRC (2001).

Chemical composition and nutritional value of feedstuff

Samples of the pasture and concentrates were taken every 10 days to determine their chemical and nutritional composition (Tables 1 and 2). Representative samples of pasture forage were collected from the paddock before grazing at a height of 8 cm above the ground, using a 1-m² quadrant. Dry matter contents of the pasture were determined by forced air oven at 60°C for 48 h. Samples of pasture and concentrates were ground to pass a 1-mm screen in a Willey mill before analysis. Dry matter (method 934.01), ash (method

Table 1. Ingredients and chemical composition of the supplemented dietary concentrates¹

	0-SB	0.5-SB	1-SB
Ingredients (kg d ⁻¹)			
Extruded whole soybean	–	0.50	1.00
Triticale grain	0.95	0.30	0.30
Wheat meal	1.15	2.50	2.90
Maize grain	2.50	1.50	0.70
Rapeseed meal	0.35	0.15	–
Tricalcium phosphate	–	0.05	0.05
Sodium bicarbonate	0.05	–	0.05
Chemical composition (% DM basis)			
Crude protein	16.7	19.0	21.0
Crude fibre	13.6	8.5	9.0
Neutral detergent fibre	32.1	31.3	32.3
Ether extract	2.6	3.4	4.5
Metabolizable energy (Mcal kg ⁻¹)	3.01	3.03	3.04

¹ Control without extruded whole soybean (0-SB), with extruded whole soybean at 0.5 kg d⁻¹ (0.5-SB), and with extruded whole soybean at 1 kg d⁻¹ (1-SB).

Table 2. Nutritional composition of the pasture during the experiment

	Sample days					
	1	15	30	45	60	75
Dry matter (DM, %)	17.6	14.3	18.8	19.7	22.6	30.6
Ash (% DM)	10.6	11.6	11.9	12.9	10.1	11.2
Crude protein (% DM)	24.8	21.1	18.0	19.8	15.0	11.4
Crude fibre (% DM)	17.7	24.5	22.0	24.6	27.7	26.4
Neutral detergent fibre (% DM)	43.7	56.4	50.2	51.3	62.0	59.3
Acid detergent fibre (% DM)	22.5	30.7	30.0	30.5	33.8	35.2
IVDMD ¹ (%)	84.2	73.2	70.8	73.2	61.9	60.3
ME ² (Mcal kg ⁻¹)	2.75	2.41	2.33	2.36	2.06	2.07

¹ IVDMD: *in vitro* DM digestibility. ² ME: metabolizable energy.

942.05), ether extract (method 920.39), N (method 984.13) and crude fiber (method 978.10) were determined according to AOAC (2005) methods. The N values determined by the Kjeldahl procedure, and converted to crude protein by multiplying by a factor of 6.25. The analyses of neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) were carried out according to Van Soest *et al.* (1991), and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. All fiber fractions were analyzed on a Fibertec 1030 Hot Extractor (Tecator, Sweden). The fat content was measured by extraction with petroleum ether (boiling point, 40 to 60°C) on a Soxtec System 1040 Extraction Unit (FOSS Tecator AB, Sweden).

The metabolizable energy (ME) of the supplemented dietary concentrates was estimated according to NRC (2001). The *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of the pasture was determined according to the procedure described by Tilley & Terry (1963) modified by Van Soest (1991) and the ME was estimated according to the equation (Garrido, 1981):

$$ME = 0.279 + 0.0325 \times IVDMD.$$

Milk yield and quality

Cow milk production was determined using a Waikato® measuring equipment, on days 1, 15, 30, 45, 60 and 75. At each control, a milk sample of 30 ml was taken (to which was added 0.03 g of potassium dichromate at 0.1% as a preservative), and the contents of fat, protein and urea were determined automatically using an infrared spectrophotometer (Foss 4200 Milko-scan; Foss Electric, Denmark).

CLA content and composition

At each milk control, milk samples of 100 mL were taken and sent to the laboratory in thermally insulated containers at 4°C for analysis of CLA isomers (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *cis*-12). Total lipids were extracted by the method of Folch *et al.* (1957), using a mixture of chloroform and methanol (2:1, v:v). The methylation of the fatty acids of the samples was done using the method described by Morrison & Smith (1964).

Fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography (HP 6890, Hewlett Packard, Surrey, UK), Flame Ionization Detector (FID), a capillary column

SP-2560 (100 m, 0.25 mm i.d. with 0.20 µm thickness in the stationary phase; Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA) using He as the tracer gas. Gas chromatography conditions were as follow: the injection volume was 0.5 µL, a split injection was used (70:1, v:v); ultrapure hydrogen was the carrier gas; and the injector and detector temperatures were 250 and 300°C, respectively. The initial temperature was 70°C (held for 1 min), increased by 5°C per min to 100°C (held for 3 min), increased by 10°C per min to 175°C (held for 40 min), and then increased by 5°C per min to 220°C (held for 19 min) for a total run time of 86.5 min. Data were then quantified using the HPCHEM Stations software, and expressed as a percentage of area according to the total fatty acids identified.

Metabolic profile

At the beginning and at the end of the experiment blood samples were taken (5 mL animal⁻¹) by coccygeal venipuncture flow and placed in tubes with sodium heparin. The samples were then centrifuged for 3 min at 3000 rpm and the plasma was aliquoted and frozen (-18°C) in microtubes of 1.5 mL. For each sample, the following plasma traits were determined: cholesterol (cholesterol-oxidase method, Cholesterol Liquicolor 10028 Human), albumin (Albumin Liquicolor Method BCG-Bromo Cresol), total protein (Total Protein Liquicolor-Biuret Method), calcium (Arsenazo III AA), Mg (Mg-color AA), phosphorus (Fosfataria UV AA), aspartate aminotransferase (IFCC Mod. LiquiUV test) and urea (ureasa/NADH method, UREA LiquiUV 10521 Human). All plasma traits were determined automatically by biochemical analyser (SelectraVitalab, Merk, Darmstadt, Germany).

Statistical analysis

Data of milk production, milk's constituents and metabolic profile were analysed as repeated measures, using the general linear model (GLM) of the SPSS for Windows 18.0 package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The linear model used for each parameter was as follows:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_{ij} + W_k + (T \times W)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

where Y_{ijk} = observations for dependent variables; μ = overall mean; T_i = fixed effect of treatment group or

dietary concentrate; A_{ij} = random effect of animal j for the i treatment; W_k = fixed effect of the k week of lactation; $T \times W$ = interactions among these factors for the i treatment and k week of lactation, and ε_{ijk} = random effect of residual. Pairwise comparisons of means were carried out, where appropriate, using Tukey's honest significant difference tests. The level of significance for the analyses was 5%. The Pearson correlation coefficient between the milk fat concentration and the content of *trans*-10, *cis*-12 isomer was also determined.

Results

Milk yield and quality

In the initial day no differences in milk production ($p = 0.390$) and quality were observed among the three experimental groups (data not shown). In the experimental period (from day 15 to day 75) milk production ($p = 0.706$) and fat corrected milk production (FCM, kg d^{-1}) ($p = 0.241$) were similar among groups (Table 3). The amounts of milk fat (kg d^{-1}) ($p = 0.010$), as well as protein ($p = 0.045$) and milk fat ($p = 0.015$) concentrations were lower in the 1-SB treatment, while the quantities of protein ($p = 0.926$) and urea ($p = 145$) were similar among all treatments.

The patterns of milk production and basic composition throughout lactation were affected by the lactation day

for all the components (Table 3). Milk yield significantly decreased as a function of the week and for the chemical composition, the highest values for these components were found in the last weeks (data not shown).

CLA content and composition

In the initial day no differences in total CLA ($p = 0.791$) and of each of its isomers were observed among the three experimental groups (data not shown). In the experimental period, there was no effect of the inclusion of extruded soybean on total CLA content ($p = 0.290$) or the content of *cis*-9, *trans*-11 ($p = 0.582$), *trans*-10, *cis*-12 ($p = 0.136$) and *cis*-10, *cis*-12 ($p = 0.288$) isomers (Table 3). Although the highest values were found for the *cis*-9, *trans*-11 isomer (53-59% of total CLA), the *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers presented higher values (17-23% and 20-25% of total CLA, respectively) than normally reported in the literature.

The pattern of fatty acid composition throughout lactation was affected by the lactation day for all components (Table 3; Fig. 1). For the content of total CLA and of each of its isomers, a similar trend is observed in all the treatments. The lowest CLA values were obtained in the lasted weeks, when the herbage presented the poorest nutritional quality (see Table 2). The *cis*-10, *cis*-12 isomer was the only one that diminished from day 1 to day 45, and increased after day 60.

Table 3. Production and chemical composition (mean values) of the milk of Jersey cows supplemented with dietary concentrates during the experimental period

	Treatments ¹ (dietary concentrates supplemented)			SEM ²	Effects ³ ($p =$)		
	0-SB	0.5-SB	1-SB		T	W	T \times W
Milk yield (kg d^{-1})	18.7	18.3	19.7	0.33	0.706	0.000	0.447
4% FCM ⁴ (kg d^{-1})	21.5	20.8	20.2	0.33	0.241	0.000	0.476
Fat (%)	5.08 a	4.91 a	4.17 b	0.073	0.015	0.005	0.375
Fat (kg d^{-1})	0.93 a	0.90 a	0.82 b	0.015	0.010	0.004	0.126
Protein (%)	3.75 a	3.70 a	3.50 b	0.026	0.045	0.000	0.217
Protein (kg d^{-1})	0.70	0.68	0.69	0.011	0.926	0.000	0.328
Urea ($\text{mg}/100 \text{ mL}$)	0.047	0.044	0.052	0.0013	0.145	0.000	0.540
CLA ⁵ ($\text{g}/100 \text{ g}$ fatty acids)							
Total CLA	1.21	1.28	1.44	0.040	0.290	0.007	0.391
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.70	0.73	0.75	0.023	0.582	0.022	0.393
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.21	0.29	0.29	0.023	0.136	0.000	0.909
CLA <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12	0.30	0.27	0.39	0.038	0.288	0.000	0.202

¹ See Table 1. ^{a, b}: mean values within a row with different superscripts are different ($p < 0.05$). ² SEM: standard error of mean.

³ T: Treatment; W: Week; T \times W: Treatment \times Week interaction. ⁴ FCM: fat corrected milk production. ⁵ CLA: conjugated linoleic acid.

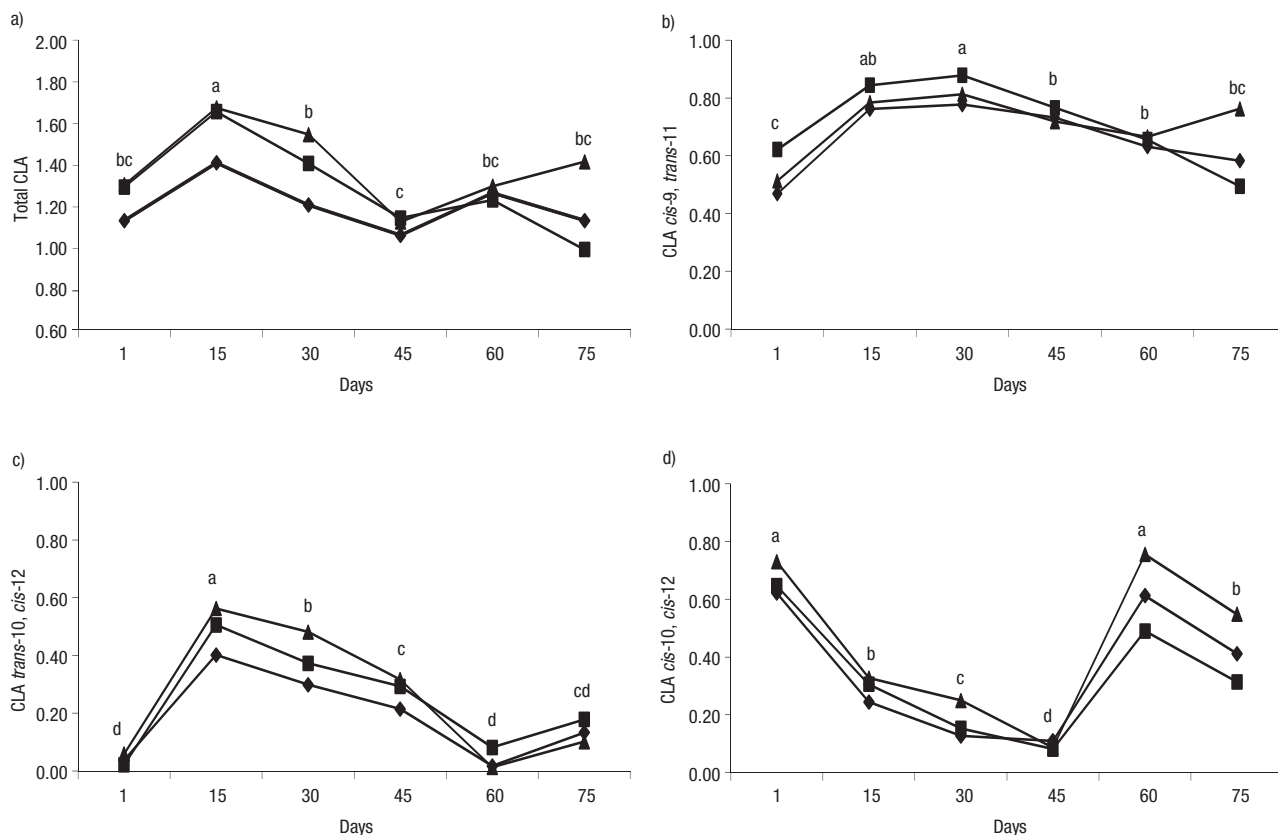


Figure 1. Temporal patterns of the content of conjugated linoleic acid (CLA) isomers (g/100g total fatty acids) in the milk of Jersey cows supplemented with different dietary concentrates: a) total CLA; b) CLA *cis*-9, *trans*-11; c) CLA *trans*-10, *cis*-12; d) CLA *cis*-10, *cis*-12. Control without extruded whole soybean (\blacklozenge), with extruded whole soybean at 0.5 kg d⁻¹ (\blacksquare), and with extruded whole soybean at 1 kg d⁻¹ (\blacktriangle). Initial measurements (d 1) were made when animals were fed with the pasture on the multi-species paddock. The mean values for each date were compared, and those with the same letter do not differ ($p > 0.05$).

Metabolic profile

Throughout the trial the cows were in good health and did not show any relevant pathology. All the me-

tabolites evaluated, except blood urea at the end of the trial, were found to be within the normal range, with no significant differences observed between treatments (Table 4).

Table 4. Plasma metabolic profile of Jersey dairy cows supplemented with dietary concentrates¹ at the beginning and at the end of the experiment

Metabolites	0-SB		0.5-SB		1-SB		SEM ²	Effects ($p =$)	
	Beginning	End	Beginning	End	Beginning	End		Beginning	End
Cholesterol (mmol L ⁻¹)	4.14	5.00	4.86	5.71	4.86	5.14	0.177	0.509	0.161
Albumin (g L ⁻¹)	33.5	37.4	33.8	39.3	32.3	36.1	0.76	0.991	0.065
Total protein (g L ⁻¹)	62.6	68.2	65.0	72.1	65.7	68.8	1.43	0.874	0.349
Calcium (mmol L ⁻¹)	2.20	2.87	2.20	3.05	2.25	2.90	0.075	0.724	0.094
Mg (mmol L ⁻¹)	0.80	0.90	0.83	0.97	0.82	0.87	0.020	0.889	0.270
Phosphorus (mmol L ⁻¹)	1.54	2.02	1.53	2.16	1.68	2.90	0.053	0.309	0.408
AST ³ (U L ⁻¹)	84.0	94.4	101.1	106.7	98.9	101.1	12.01	0.580	0.295
Urea (mmol L ⁻¹)	7.00	10.93	5.91	9.77	6.60	10.63	1.348	0.322	0.420

¹ See Table 1. ² SEM: standard error of mean. ³ AST: aspartate aminotransferase.

Discussion

Milk yield and quality

Although crude protein of supplemented concentrate ranged between 17 and 21%, in all groups the pasture contributed an adequate level of protein and energy in accordance with NRC (2001) recommendations based on milk production and milk urea content (see Table 3).

The reduction in the percentage and amount of fat (kg d^{-1}) in the group fed with a higher quantity of soybean (1 kg d^{-1}) may result from the extrusion process, which breaks up the micelles of fat in the seed, allowing a rapid release of the lipids in the rumen and reducing milk fat content (Mohamed *et al.*, 1988; DePeters & Cant, 1992). Low milk fat syndrome has been recognized for many years, but the exact mechanism is still unclear. Data from several studies revived the theory of *trans* fatty acids, coming from ruminal biohydrogenations and from desaturation by the mammary gland, as the central mechanism of milk fat depression (Grinari & Bauman, 2003; Loores *et al.*, 2005). In particular, the increase of C18:1 *trans*-10 and CLA *trans*-10, *cis*-12 isomers in the mammary gland has been associated with a reduction in the *de novo* synthesis of short and medium chain fatty acids (Banks *et al.*, 1980; Grummer, 1991; Baumgard *et al.*, 2000). The CLA *trans*-10, *cis*-12 isomer was found in the highest quantity (though such difference was not significant) in the 1-SB treatment. Also, in the present study there were an inverse linear relation ($R^2 = 0.11$, $p = 0.04$) between milk fat concentration and the content of this isomer.

The milk protein content was lower in the 1-SB diet when compared with 0-SB and 0.5-SB diets. Although the dietary fat and protein were highest in the 1-SB group, Theurer *et al.* (1995) suggested that increasing the amount of dietary protein within a constant dietary energy level has little effect on milk protein synthesis and whenever dietary protein level increases milk protein yield, the effect seems to be associated with an increase in milk yield. However, in this study no differences between groups were found both in milk protein yield and in milk yield. The decrease in milk protein content might have been due to an increased availability of fat in the rumen in the 1-SB diet (Chouinard *et al.*, 1997). The reduction in the percentage of protein observed in most of studies in animals fed with diets with a high fat content appears to be associated with negative effects on the growth of ruminal micro-

organisms and the production of microbial protein (Solomon *et al.*, 2000). In addition, when cows are fed fat, the energetic efficiency of milk synthesis is increased. Cows fed high fat diets required less liters of blood flowing to the mammary gland per kg of milk produced (Cant *et al.*, 1993). Because mammary uptake of amino acids is dependent upon amino acid concentration in the blood and blood flow to the mammary gland, these data suggest that the decrease in blood flow per volume of milk produced would limit the uptake of amino acids for milk protein synthesis. However, there are studies that did not find any effect (Guillaume *et al.*, 1991) or even others that found an increase of protein concentration in milk (Block *et al.*, 1981).

The differences in feeding (mainly due to ingestion and nutritional composition of the herbage) and lactational effects can explain the changes on milk production and components across the weeks of the study. However, since total forage ingestion was not monitored in this study this will have to be tested in future studies.

CLA content and composition

As in our study, Khanal *et al.* (2005) did not find effects of a mixed supplement containing 2.4 kg d^{-1} of extruded soybean on CLA concentration in the milk of Holstein cows on pasture (1.63 and 1.69% of total FA for groups fed on pasture alone and pasture + supplement mixed with extruded soybean, respectively; these values include the *cis*-9, *trans*-11 isomer). The values obtained by these authors are somewhat higher than those found herein for the three CLA isomers together. Bartolozzo *et al.* (2003), in Friesian cows fed on pasture and fed a mixed supplement containing 2.6 kg of raw soybean, also obtained a high quantity of CLA (0.96%) as compared to TMR diets with raw or extruded soybean (0.52%), which is in agreement with the results of White *et al.* (2001). All these results indicate a greater influence of the pasture than that of the source or level of soybean incorporated into the diet on the CLA milk content. The different CLA values found in the literature may be related to differences in the nutritional composition of the pasture derived from the different botanical and agronomic characteristics of the herbage used in the various studies (Dewhurst *et al.*, 2006) and, to a lesser degree, to the influence of other factors such as the breed (White *et al.*, 2001; Kelsey *et al.*, 2003). In this respect, White *et al.* (2001) observed 18%

less CLA in milk from Jersey cows compared with milk from Holsteins. On the contrary, other authors observed an increase in the CLA milk content as compared to the control groups, with values up to 2.2% for all the CLA isomers in dairy cows on pasture supplemented with 3.1 kg d⁻¹ roasted soybean (Lawless *et al.*, 1998), and 2.4% for only the *cis*-9, *trans*-11 isomer in beef cattle on pasture supplemented with 2 kg d⁻¹ extruded soybean (Paradis *et al.*, 2008). However, the exact influence of breed related to dietary supply, and possible interactions need to be determined in further studies.

Rumenic acid is typically the most abundant CLA isomer, with values greater than 80% of total CLA (Palmquist *et al.*, 2005). The *cis*-10, *cis*-12 isomer, on the other hand, was found in very low quantities and has no known physiological function (Khanal & Olson, 2004). In the present study, the *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers presented higher values than normally reported in the literature. The regulation of isomer balance is largely unknown. Nevertheless the *cis*-9, *trans*-11 isomer is mainly generated from vaccenic acid in the mammary gland (Mosley *et al.*, 2006), while the *trans*-10, *cis*-12 is a minor intermediate of rumen biohydrogenation (Walker *et al.*, 2004) and is relatively unaffected by changes in the diet except at very high levels of concentrate feeding (Chilliard *et al.*, 2007). Therefore future studies are necessary to determine its biological function and metabolic production routes.

In the temporal pattern (Fig. 1) for the content of total CLA and of each of its isomers, a similar trend is observed in all the treatments, which would indicate that the influence of the herbage on the CLA content of the milk is greater than that of the different dietary concentrates supplemented. This may be related to differences in the nutritional composition of the herbage, which has also been shown to affect the fatty acid composition of milk (Dewhurst *et al.*, 2006). In this respect, lower CLA contents in milk have been observed with more mature pasture, and this effect has been attributed to the declining quality and quantity of the herbage (Lock & Garnsworthy, 2003; Ward *et al.*, 2003). This is in agreement with the present work, in which the lowest CLA values were obtained in late December and January, when the herbage presented the poorest nutritional quality (see Table 2). The *cis*-10, *cis*-12 isomer was the only one that diminished from day 1 to day 45, and increased after day 60. At present, it is difficult to explain both the higher quantity and the evolution of this isomer, as observed in the present study.

Metabolic profile

All the metabolites evaluated, except blood urea at the end of the trial, were found to be within the normal range, in agreement with the values for healthy lactating dairy cows (Bertoni & Piccioli, 1999). Previous studies (Pulido, 2009) have shown an increase in blood urea when diets present high levels of degradable protein, which is the case with animals fed to pasture on grass (*L. perenne*). Under this conditions, highly soluble protein is associated with low levels of NDF and high leaf/stalk proportions at the beginning of spring (Van Vuuren *et al.*, 1991), resulting in incomplete use of the nitrogen in the rumen and high levels of blood urea during the spring and early summer (Wittwer *et al.*, 1993). These levels may exceed the normal range, especially at the beginning of spring, and this is considered normal in Chile (Wittwer *et al.*, 1993).

Conclusions

The dietary concentrate with different quantities of extruded soybean (0.5 and 1.0 kg d⁻¹) fed to Jersey cows, on pasture-based systems, did not influence milk production or total CLA content or its *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers. However, CLA contents were affected by the nutritional quality of the pasture, with lower values observed at greater maturity stages of pasture. In the present study, high quantities of the *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers were obtained in comparison to those normally found. The *cis*-10, *cis*-12 isomer does not appear in the scientific literature, therefore future studies are necessary to determine its biological function and metabolic production routes. The failure of the dietary concentrate with different quantities of extruded whole soybean supplemented in Jersey cows on pasture to increase the concentration of CLA *cis*-9, *trans*-11 in milk fat requires further investigation.

Acknowledgments

The authors thank CONICYT (Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología) and Nestlé S.A.-Chile for funding this research (FONDEF Project N° D02I1135 “Development of products with high content of functional active principles from cows’ milk and its derivatives”).

References

- AOAC, 2005. Official methods of analysis, 18th ed. AOAC Int, Gaithersburg, MD, USA.
- Aro A, Mannisto S, Salminen I, Ovaskainen ML, Kataja V, Uusitupa M, 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer* 38: 151-157.
- Banks W, Clapperton JL, Kelly ME, Wilson AG, Crawford RJM, 1980. The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding soybean oil to dairy cows. *J Sci Food Agric* 31: 368-374.
- Bartolozzo A, Mantovani R, Simonetto A, 2003. Effect of pasture and soybean supplementation on fatty acid profile and CLA content in dairy cow milk. *Ital J Anim Sci* 2 (suppl. 1): 216-218.
- Bauman DE, Corl BA, Baumgard LH, Griinari JM, 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: *Recent advances in animal nutrition* (Garnsworthy PC & Wiseman J, eds.), Nottingham Univ Press, Nottingham, UK. pp: 221-250.
- Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebo A, Bauman DE, 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol* 278: R179-R184.
- Bertoni G, Piccioli Cappelli F, 1999. Guida all'interpretazione dei profili metabolici. Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy. [In Italian].
- Block E, Muller LD, Griel LC Jr, Garwood DL, 1981. Brown midrib-3 corn silage and heated extruded soybeans for early lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 64: 1813-1825.
- Cant JP, DePeters EJ, Baldwin RL, 1993. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *J Dairy Sci* 76: 762-774.
- Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Rouel J, Doreau M, 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur J Lipid Sci Technol* 109: 828-855.
- Chouinard PY, Le'Vesque J, Girard V, Brisson GJ, 1997. Dietary soybeans extruded at different temperatures: Milk composition and *in situ* fatty acid reactions. *J Dairy Sci* 80: 2913-2924.
- Chouinard PY, Corneau L, Butler WR, Chilliard Y, Drackley JK, Bauman DE, 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci* 84: 680-690.
- DePeters EJ, Cant JP, 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J Dairy Sci* 75: 2043-2070.
- Devery R, Miller A, Stanton C, 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 29: 341-344.
- Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF, Scollan ND, 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.
- Folch J, Less H, Sloane-Stanley GH, 1957. A simple method for the insolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 726: 497-509.
- Garrido O, 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanente de pastoreo a través del año. Memoria de Título. Facultad de Ciencias Agrarias, Univ Austral de Chile, Valdivia, Chile. [In Spanish].
- Griinari JM, Bauman DE, 2003. Update on theories of diet-induced milk fat depression and potential applications. *Rec Adv Anim Nutr* 37: 115-156.
- Grummer RR, 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci* 74: 3244-3257.
- Guillaume B, Otterby DE, Stern MD, Linn JG, Johnson DG, 1991. Raw or extruded soybeans and rumen protected methionine and lysine in alfalfa-based diets for dairy cows. *J Dairy Sci* 74: 1912-1922.
- Ha YL, Grimm NK, Pariza MW, 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.
- INE, 2007. Las pequeñas y medianas explotaciones. VII Censo Agropecuario y Forestal 2006-2007. Instituto Nacional de Estadísticas, Chile. 89 pp. [In Spanish].
- Kelsey JA, Corl BA, Collier RJ, Bauman DE, 2003. The effect of breed, parity and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J Dairy Sci* 86: 2588-2597.
- Khanal R, Olson KC, 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat and egg: a review. *Pakistan J Nutr* 3: 82-98.
- Khanal RC, Dhiman TR, Ure AL, Brennand CP, Boman RL, McMahon DJ, 2005. Consumer acceptability of conjugated linoleic acid-enriched milk and cheddar cheese from cows grazing on pasture. *J Dairy Sci* 88: 1837-1847.
- Lawless F, Murphy JJ, Harrington D, Devery R, Stanton C, 1998. Elevation of conjugated *cis-9,trans-11*-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J Dairy Sci* 81: 3259-3267.
- Lock AL, Garnsworthy PC, 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid Δ (9)-desaturase activity in dairy cows. *Livest Prod Sci* 79: 47-59.
- Loor JJ, Ferlay A, Ollier A, Doreau M, Chilliard Y, 2005. Relationship among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J Dairy Sci* 88: 726-740.
- Mohamed OE, Satter LD, Grummer RR, Ehle FR, 1988. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. *J Dairy Sci* 71: 2677-2688.
- Morrison WR, Smith LM, 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lip Res* 5: 600-608.
- Mosley EE, Shafii B, Moate PJ, McGuire MA, 2006. *Cis-9,trans-11* conjugated linoleic acid is synthesized directly

- from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J Nutr* 136: 570-575.
- NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, 7th rev ed. National Academy Press, National Research Council. Washington DC, USA, 381 pp.
- Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, Bauman DE, 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res* 50: 179-217.
- Paradis C, Berthiaume R, Lafrenière C, Gervais R, Chouinard PY, 2008. Conjugated linoleic acid content in adipose tissue of calves suckling beef cows supplemented with raw or extruded soybeans on pasture. *J Anim Sci* 86: 1624-1636.
- Pariza MW, Park ME, 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40: 283-298.
- Pulido RG, 2009. Efecto del nivel de suplementación con concentrado sobre la respuesta productiva en vacas lecheras a pastoreo primaveral con alta disponibilidad de pradera. *Arch Med Vet* 41: 197-204. [In Spanish].
- SAG, 2010. Planteles de animales bovinos lecheros bajo certificación oficial. Instructivo Técnico N°3. Exigencias para el ingreso al Programa de Plantel de Animales Bovinos Lecheros Bajo Certificación Oficial. Servicio Agrícola Ganadero, Chile. [In Spanish].
- Solomon R, Chase LE, Ben-Ghedalia D, Barman DE, 2000. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J Dairy Sci* 83: 1322-1329.
- Starling S, 2002. Functional foods stand poised for further growth. In: *Functional foods and nutraceuticals*. New Hope Natural Media, Boulder, CO, USA. pp: 6-19.
- Theurer CB, Huber JT, Santos FAP, 1995. Feeding and managing for maximal milk protein. *Proc Southwest Nutr Manag Conf Dept Anim Sci, Univ Arizona, Tucson, AZ, USA*, pp: 59-67.
- Tilley JM, Terry RA, 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Br Grassl Soc* 18: 104-111.
- Van Soest PJ, Robertson J, Lewis B, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583-3595.
- Van Vuuren M, Tamminga S, Ketelaar RS, 1991. In sacco degradation of organic matter and crude protein of fresh grass (*Lolium perenne*) in the rumen of grazing dairy cows. *J Agric Sci Camb* 116: 429-436.
- Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca JA, Santoli D, Kritchevsky D, 1997. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 17: 969-973.
- Wahle KW, Heys SD, Rotondo D, 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res* 43: 553-587.
- Walker GP, Dunshea FR, Doyle PT, 2004. Effects of nutrition and management on the production and composition of milk fat and protein: a review. *Aust J Agric Res* 55: 1009-1028.
- Ward AT, Wittenberg KM, Froebe HM, Przybylski R, Malcolmson L, 2003. Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleic acid levels in plasma and milk. *J Dairy Sci* 86: 1742-1750.
- White SL, Bertrand JA, Wade MR, Washburn SP, Green JT, Jenkins TC, 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 84: 2295-2301.
- Wittwer F, Opitz H, Reyes J, Contreras P, Böhmwald H, 1993. Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. *Arch Med Vet* 25: 165-172. [In Spanish].

Manuscript Number: FOODCHEM-D-12-04242

Title: Conjugated linoleic acid content of commercial dairy products in Chile and effect of processing methods

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: CLA, cow, milk quality

Corresponding Author: Dr. Manuel Delgado Pertin ez,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Juan Pablo Avilez

Order of Authors: Juan Pablo Avilez; Pablo Escobar; Cristian Diaz; Gabrielle von Fabeck; Fernando Garcia; Marcelo Alonzo; Manuel Delgado Pertin ez

Abstract: The objective of the present study was to assess the contents of total and individual conjugated linoleic acid (CLA) isomers of cow dairy products in Chile. In Addition, the effect of processing fresh milk into dairy products on the CLA content was estimated. Samples of raw milk receptioned in commercial dairy plant in 2004 of two regions of Chile were taken, with dairy cattle production systems differentiated mainly by the type of animal feeding: grazing based systems (Osorno) and housing and based in total mixed ration (TMR) systems (Los Angeles). Also, supermarkets samples were taken of condensed milk, powder milk, butters and Gouda cheese. Furthermore, in 2006 raw milk and processed products (powdered milk and sweetened condensed milk) were taken. The CLA isomers (cis-9, trans-11; trans-10, cis-12; cis-10, cis-12) contents in milk and dairy product samples were determined. Higher levels of CLA in raw milk were obtained from sectors with livestock systems based on grazing compared to sectors with TMR systems, with average values between 1.72 g/100 g total fatty acids in spring milk of Osorno and 0.42 g in summer milk of Los Angeles. Dairy products have presented significantly higher content of total CLA than raw milk. The processing has significantly affected the transfer of fresh milk CLA to products. Sweetened condensed milk presented lower values of CLA than starting milk and powder milk. In contrast, powder milk showed values similar or above to those of fresh milk. In conclusion, although the consumption of dairy products in Chile is lower than in other countries consumers of these products, the high amount of CLA found in the Chilean dairy products studied provide adequate levels for human health. In Addition, more research is needed to elucidate the exact effect of processing and storage conditions of milk and dairy products on the CLA content.

The Editorial Office of Food Chemistry

14 October 2012

I am writing to send you this paper in order to be published in "Food Chemistry".

Conjugated linoleic acid (CLA) has been indicated as one of the most beneficial fatty acids for human health. The rigorous assessment of CLA consumption requires documentation of its content and composition in the food supply. Also, milk and milk products usually undergo different changes during their preparation or processing, nevertheless the results of the effect of processing conditions, storage, and packaging on the CLA content of various types of dairy products are unclear. The goal of the present study was to assess the contents of total and individual CLA isomers of cow dairy products in Chile. In Addition, the effect of processing fresh milk into dairy products on the CLA content was estimated. I think that this paper have a clear relationship to chemical and biochemical composition of foods, so I hope you find it suitable and interesting. I look forward to receiving good news soon.

Yours sincerely:

Manuel Delgado Pertíñez
Professor of Animal Science

Research Highlights

- We estimated the CLA contents of cow dairy products in Chile.
- Effect of processing fresh milk into dairy products on the CLA was evaluated.
- Higher levels of CLA in raw milk were obtained with systems based on grazing.
- Dairy products have presented higher content of total CLA than raw milk.
- The processing has affected the transfer of fresh milk CLA to products.

1 **Title:**

2 Conjugated linoleic acid content of commercial dairy products in Chile and effect of
3 processing methods

4

5 **Running Title:**

6 Conjugated linoleic acid content of dairy products in Chile

7

8 Juan Pablo Aviléz^a, Paul Escobar^a, Cristian Díaz^a, Gabrielle von Fabeck^a, Fernando
9 García^b, Marcelo Alonzo^c and Manuel Delgado-Pertíñez^{c,*}

10

11 ^a Escuela de Medicina Veterinaria . Universidad Católica de Temuco. Montt 56. Temuco.
12 Chile

13 ^b Empresa Biotecnología agropecuaria (BTA). Bilbao 3670. Santiago. Chile

14 ^c NESTLE-Chile. Francisco del Campo S/N. Fabrica Osorno – Planta NESTLE. Chile

15 ^d Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería
16 Agronómica. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1. 41013 Sevilla. Spain

17

18 **Abstract**

19 The objective of the present study was to assess the contents of total and individual
20 conjugated linoleic acid (CLA) isomers of cow dairy products in Chile. In Addition, the
21 effect of processing fresh milk into dairy products on the CLA content was estimated.
22 Samples of raw milk receptioned in commercial dairy plant in 2004 of two regions of Chile
23 were taken, with dairy cattle production systems differentiated mainly by the type of animal
24 feeding: grazing based systems (Osorno) and housing and based in total mixed ration

* Corresponding author: Tel.: +34 954 48 64 50, Fax: +34 954 48 64 36, E-mail:
pertinez@us.es.

25 (TMR) systems (Los Angeles). Also, supermarkets samples were taken of condensed milk,
26 powder milk, butters and Gouda cheese. Furthermore, in 2006 raw milk and processed
27 products (powdered milk and sweetened condensed milk) were taken. The CLA isomers
28 (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *cis*-12) contents in milk and dairy product samples
29 were determined. Higher levels of CLA in raw milk were obtained from sectors with
30 livestock systems based on grazing compared to sectors with TMR systems, with average
31 values between 1.72 g/100 g total fatty acids in spring milk of Osorno and 0.42 g in
32 summer milk of Los Angeles. Dairy products have presented significantly higher content of
33 total CLA than raw milk. The processing has significantly affected the transfer of fresh
34 milk CLA to products. Sweetened condensed milk presented lower values of CLA than
35 starting milk and powder milk. In contrast, powder milk showed values similar or above to
36 those of fresh milk. In conclusion, although the consumption of dairy products in Chile is
37 lower than in other countries consumers of these products, the high amount of CLA found
38 in the Chilean dairy products studied provide adequate levels for human health. In
39 Addition, more research is needed to elucidate the exact effect of processing and storage
40 conditions of milk and dairy products on the CLA content.

41

42 **Additional key words:** CLA, cow, milk quality.

43

44 **1. Introduction**

45 Conjugated linoleic acid (CLA) represents between 20 and 28 isomers of linoleic
46 acid C18:2 (Lock and Garnsworthy, 2003) that has been indicated as one of the most
47 beneficial fatty acids for human health (Pariza and Park, 2001). Of all possible isomers,
48 only *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 have shown an interesting biological activity

49 (Wahle *et al.*, 2004). The *cis*-9, *trans*-11 isomer, also known as rumenic acid, has been
50 documented to have an anticarcinogenic (Visonneau *et al.*, 1997; Aro *et al.*, 2000) and
51 antioxidant effect (Devery *et al.*, 2001), whereas the *trans*-10, *cis*-12 isomer is responsible
52 for the observed weight loss and muscle-mass enhancement effects (Gaullier *et al.*, 2004;
53 Malpuech- Brugere *et al.*, 2004).

54 Although a range of strategies has been used to estimate total CLA intake, the
55 rigorous assessment of CLA consumption requires documentation of its content and
56 composition in the food supply (Ma *et al.*, 1999). The CLA is found in various foods such
57 as dairy, meat, vegetables and seafood, nevertheless, ruminant products as milk and meat
58 constitute the principal source of CLA for humans (Chin *et al.*, 1992). In regard to this and
59 expressed in g of total fat CLA/100 g, have been reported in amounts of 0.11 g in rabbit
60 meat, 1.20 g in lamb meat, 0.09 g in carp and between 0.40 and 1.7 g in various cheese
61 (Fritsche and Steinhart, 1998). In contrast, vegetable oils and margarines have been
62 observed in less than 0.01 g/100 g of total fat content (Fritsche and Steinhart, 1998).

63 Diet has a major influence on milk fat CLA and it has been extensively investigated
64 (Bauman *et al.*, 2000). Several nutritional studies have been addressed to increase CLA
65 content in animal products and to improve their nutritional properties. For instance, it has
66 been reported that fresh forage and oil-rich feeds increase CLA concentration (Khanal *et al.*
67 *et al.*, 2005; Dewhurst *et al.*, 2006). In regard to this, feeding of cows on grazing natural and
68 improved pastures provides high content of CLA, both in fresh milk and in processed milk
69 (Zlatanos *et al.*, 2002, Avilez *et al.*, 2012). In Chile has been studied the content of fatty
70 acids in bovine raw milk receptioned in plant and its relationship to annual seasonality and
71 geographic sector, obtaining values of 1.75 and 1.41 CLA g/100 g of total fat in regions
72 VIII and IX, respectively (Pinto *et al.*, 2002). However, in that study only analyzed the *cis*-

73 9, *trans*-11 and also, the CLA and CLA isomer distribution have not been examined in
74 commercially available dairy products in Chile.

75 Milk and milk products usually undergo different changes during their preparation
76 or processing, which may include moderate or severe heat treatments that can lead to
77 undesirable changes in lipids or proteins (Herzallah *et al.*, 2005). Semma (2002) states that
78 milk lipids can undergo chemical and physical changes during processing and storage, such
79 as auto-oxidation and formation of *trans* fatty acids. Nevertheless, the results of the effect
80 of processing conditions, storage, and packaging on the CLA content of various types of
81 dairy products are unclear. With regard to cheeses, reports and reviews present results for
82 individual varieties, often in the belief that CLA levels may vary due to different processing
83 conditions. Herzallah *et al.* (2005) reported CLA decreases of 21 and 53 % in cheeses
84 heated in a microwave oven for 5 and 10 min, respectively. Nevertheless, these effects are
85 likely to be small, and variations in CLA levels are similar to the levels in the starting milk
86 (Gnädig, S. and Sébédio, 2002; Luna *et al.*, 2005). However, other studies detected new
87 CLA isomers in ripened cheeses (Werner *et al.*, 1992; Lavillonière *et al.*, 1998; Sehat *et al.*,
88 1998) and it was hypothesized that biohydrogenation of linolenic acid in cheese could lead
89 to the formation of CLA isomers as intermediates. In another study (Rodríguez-Alcalá and
90 Fontecha, 2007), the predominant isomers (CLA *cis*-9, *trans*-11, CLA *cis*-10, *trans*-12)
91 were not significantly affected by processing but a decrease in total CLA in fresh cheese
92 samples was detected after 10 wk of refrigerated storage. Also, refrigerated storage and
93 thermal treatment resulted in significant decreases or disappearance of some of the minor
94 CLA isomers and a significant increase of *trans*, *trans* isomers from both *cis*, *trans*, *trans*,
95 *cis*, and *cis*, *cis* isomers especially in CLA-fortified milk powder but also in fermented
96 milk, yogurt, and milk-juice blend.

97 Therefore, the goal of the present study was to assess the contents of total
98 and individual CLA isomers of cow dairy products in Chile, both in raw milk receptioned
99 in commercial dairy plant and derived products for human consumption (powdered milk,
100 sweetened condensed milk, cheese, butter). In regard to raw milk receptioned in plant, the
101 study is done in two regions with dairy cattle production systems important in Chile and
102 mainly differentiated by the type of animal feeding: grazing based systems (X Region of
103 Los Lagos) and housing and based more in total mixed ration (TMR) systems (VIII Region
104 of Bio-Bio). In Addition, the effect of processing fresh milk into dairy products (powdered
105 and sweetened condensed milk) on the CLA content was estimated.

106

107 **2. Material and methods**

108 *2.1. Experimental samples*

109 Raw milk receptioned in commercial dairy plant. Milk samples were taken from two
110 regions of Chile, with dairy cattle production systems mainly differentiated by the type of
111 animal feeding: grazing based systems (X Region of Los Lagos) and housing and based
112 more in TMR systems (VIII Region of Bio-Bio). In tanks receiving raw milk of NESTLÉ
113 plant-Chile from the dairy farms located in the Osorno sector (X Region of Los Lagos, 6
114 reception tanks) and in the Los Angeles sector (VIII Region of Bio-Bio, 5 reception tanks),
115 with a capacity of 120,000 L and a temperature of 8 ° C, three samples of 100 mL of milk
116 were taken every 15 days in summer (n = 18), autumn (n = 18) and spring (n = 18) in 2004,
117 according to the protocol of the International Dairy Federation (1995). These samples were
118 transported to the laboratory ANALACU of "Universidad Católica de Temuco" in isolated-
119 thermo boxes at 4 °C and stored at - 80 ° C until analysis.

120 Dairy products. During the years 2003, 2004 and 2005, samples of sweetened
121 condensed milk (sample weight: 0.40 kg) produced by Nestlé-Chile located in Los Angeles
122 (two samples/month, n = 48) and powdered milk (sample weight: 4 kg) produced by
123 Nestlé-Chile located in Osorno (two samples/month, n = 48). In addition, supermarkets
124 samples were taken of butter (sample weight: 0.12 kg, n = 14) and Gouda cheese (sample
125 weight: 1 kg, n = 14) more consumed in Chile and made in the two major dairies industries
126 of southern Chile. All samples were transported in isolated-thermo boxes at 4 ° C to the
127 laboratory and stored at 4 ° C until analysis.

128 Transfer of CLA raw milk to dairy products. In tanks receiving raw milk of
129 NESTLÉ plant-Chile from the dairy farms located in Osorno and Los Angeles sectors, three
130 samples of milk were taken every 10 days for 10 months in 2006 (n = 90), according to the
131 protocol of the International Dairy Federation (1995). Parallel samples of processed
132 products of raw milk from previous tanks were taken: powdered milk (three samples per
133 month, n = 30) obtained by evaporation (55-70 ° C) and atomization (150-250 ° C) and
134 sweetened condensed milk obtained by evaporation at 100 °C (three samples per month, n
135 = 30). All samples were shipped in isolated-thermo boxes at 4 ° C to the laboratory and
136 stored at 4 ° C until analysis.

137

138 2.2. CLA content and composition

139 The CLA isomers (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *cis*-12) contents in milk
140 and dairy product samples were determined. Total lipids were extracted by the method of
141 Folch *et al* (1957), using a mixture of chloroform and methanol (2:1. v v⁻¹). The fatty acid
142 (FA) profile was analyzed by gas chromatography after transesterification of FA to FA
143 methyl esters (Morrison and Smith, 1964) as previously described by Avilez *et al.* (2012).

144

145 2.3. *Statistical analysis*

146 Data of CLA contents was analysed using the general linear model (GLM) of the
147 SPSS for Windows 18.0 package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), including the fixed effect
148 of type of product (CLA contents in dairy products) or product type and month (effect of
149 processing raw milk into dairy products on the CLA content). Pairwise comparisons of
150 means were carried out, where appropriate, using Tukey's honest significant difference
151 tests.

152

153 **3. Results and discussion**

154 3.1. *CLA content of commercial dairy products*

155 Table 1 presents the CLA contents in raw milk of bulk tank of commercial dairy
156 plants and in dairy products. Raw milk has presented mean values of total CLA between
157 1.72 g/100 g total FA in spring milk of Osorno sector and 0.42 g in summer milk of Los
158 Angeles sector. The total CLA content of dairy products showed average values with
159 greater variability, ranging from 0.88 g/100 g of total FA in cheese up to 1.50 g in butter,
160 1.49 g in sweetened condensed milk and 1.97 g in powdered milk. Comparing the content
161 of total CLA and its isomers among all products tested, the dairy products presented
162 significantly higher contents ($p < 0.05$) than raw milk, except for spring milk of Osorno
163 sector. Also, the amount of CLA in raw milk differ significantly ($p < 0.05$) by season and
164 geographic region, with higher levels found in spring and Osorno sector, and no differences
165 between regions in autumn. Furthermore, differences were observed between the years
166 analyzed in sweetened condensed milk and powdered milk, with higher levels of CLA in
167 the year 2004 compared to 2003 and 2005.

168 In Chile was studied the content of FA in bovine raw milk reception in plant and
169 its relationship to annual seasonality and geographic sector, obtaining values of 1.75 and
170 1.41 CLA g/100 g of total FA in regions VIII and IX, respectively (Pinto *et al.*, 2002).
171 However, in that study only was analyzed the *cis*-9, *trans*-11 isomer. In other countries
172 have been indicated maximum values of CLA in raw milk of 1.16 g/100 g of total FA in
173 Germany (Fritsche and Steinhart, 1998), 0.04 in France (Laloux *et al.*, 2007) and 0.72 in
174 Portugal (Martins *et al.*, 2007). These values are lower than those found in this study, both
175 in Los Angeles (0.89 g/100 g of total FA) as Osorno sectors (1.48 g/100 g of total FA). The
176 values found in these countries are also lower than those obtained in Chile in the previous
177 study of Pinto *et al.* (2002), according to the season (1.75 in spring-summer; 1.59 g in
178 autumn-winter). However, CLA values of previous studies refer to only *cis*-9, *trans*-11
179 isomer in Germany study, total CLA in French study and 17 isomers, with a greater
180 proportion of *cis*-9, *trans*-11, in the study of Portugal.

181 The values of CLA contents found in this study according to region could be related
182 to dairy cattle production systems characteristic to each region and especially with the type
183 of animal feeding. In the case of the Los Lagos region where it is located Osorno, feeding
184 management is based on grazing (Balocchi *et al.*, 2001), while the livestock productive
185 systems of the Bio-Bio region where it is located Los Angeles, are mainly housed and
186 based in TMR. This could explain because the grazing animals on grass pasture have higher
187 CLA concentrations in their milk (Butler *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2008), compared to non
188 or low grazing animals. Also, the seasonal differences in CLA contents may be related to
189 differences in feeding (mainly due to ingestion and nutritional composition of the herbage)
190 (Dewhurst *et al.*, 2006). Lower CLA contents in milk have been observed with more
191 mature pasture, and this effect has been attributed to the declining quality and quantity of

192 the herbage (Lock and Garnsworthy, 2003; Ward *et al.*, 2003; Avilez *et al.*, 2012). In this
193 respect, the CLA content of milk increased in spring when cows were fed high quality
194 pasture (1.2 g/100 g of total FA) compared to summer (0.9 g) and autumn (1.0 g) (Thomson
195 *et al.*, 2003). In the studies of the previous countries neither sites of sampling nor the type
196 of animal production systems used are mentioned. In Chile, the amount of CLA found in
197 Osorno sector is very important, because most of the raw milk receptioned in plant comes
198 from this region, with a volume greater than 71 % of total national milk production
199 (ODEPA, 2010), indicating that the raw and processed milk has higher levels of CLA than
200 that reported in the literature.

201 In dairy products are reported CLA values of 0.40 g/100 g of total FA in mature
202 cheese and from 0.29 to 0.71 g in fresh cheese in Germany (Fritsche and Steinhart, 1998),
203 0.39, 0.8 and 0.16 g in Beaufort, Blue and Camembert cheeses, respectively, in France
204 (Laloux *et al.*, 2007) and 0.48 g in cheese without a specific type in Portugal (Martins *et al.*,
205 2007). Cheese such as Parmesan and Romano, with ripeness over 10 months, are among the
206 cheese with lower amount of CLA (less than 0.50 g/100 g of total FA) (Henning *et al.*,
207 2006). In the case of butter were obtained values of 0.48 (Mir *et al.*, 2003), 0.51 (Laloux *et*
208 *al.*, 2007) and 0.49 g (Martins *et al.*, 2007), respectively. In sweetened condensed milk is
209 known only the study of Chin *et al.* (1992), who indicated values below of 0.7 g. In the
210 present study, the values obtained in these products (cheese, butter and condensed milk)
211 were higher than those found in previous works.

212 . In this study also, dairy products presented significantly higher CLA contents than
213 raw milk. The differences in CLA contents in the various products may be due to many
214 factors, though the most important is the amount of CLA of raw material (Zlatanov *et al.*,
215 2002). Other factors influencing is the processing of milk, as a result of isomerization

216 reactions during the preparation of food (Lin *et al.*, 1995). However, to date there are few
217 studies on this topic, therefore future research is necessary to establish a better cause-effect
218 relationship.

219 In Table 1 also shows the content of CLA isomers. The *cis-9, trans-11* presented a
220 range between a minimum of 0.26 g/100 g of total FA in summer raw milk of Los Angeles
221 sector and a maximum of 1.26 g in butter of Osorno sector. This isomer represents 53 % of
222 total CLA, with higher values found in Osorno. In the case of sweetened condensed milk,
223 this isomer ranged from 0.44 to 0.74 g, depending on the year studied, while cheese and
224 butter had a range of 0.37-1.47 and 1.22-2.22 g, respectively.

225 The isomer *trans-10, cis-12* had a range of 0.15 and 0.43 g/100 g of total FA in raw
226 milk receptioned in plant, and was not detected in samples of autumn and spring. In the
227 case of the products, were found levels of 0.05 to 0.57 g. The isomer *cis-10, cis-12*
228 presented high proportions in spring raw milk of Osorno sector and in condensed and
229 powder milk. In relation to total amount of CLA, this isomer reached about 50 % in
230 sweetened condensed milk and powdered milk, being the major isomer found in spring raw
231 milk of Osorno.

232 The *cis-9, trans-11* isomer, one of the two isomers with biological action more
233 known, is found in greater proportion than the other isomers, reaching 75-90 % of the total
234 milk CLA (Ip *et al.*, 1999), The contents of this isomer obtained in the present study in
235 different products, were higher than those observed in other studies. In the case of
236 sweetened condensed milk, the literature shows values of 0.63 (Gagliostro *et al.*, 2002) and
237 0.70 g/100 g of total FA (Shantha *et al.*, 1995). In cheese is reported a range between 0.32
238 and 0.89 g (Campbell *et al.*, 2003), with an average of 0.35 g (Martins *et al.*, 2007). For

239 butter are observed values of 0.38 (Martins *et al.*, 2007), 0.94 (Gagliostro *et al.*, 2002) and
240 1.32 g (Shantha *et al.*, 1995).

241 The isomer *trans*-10, *cis*-12 would be present in amounts of only 3 to 5 % of the
242 total CLA in milk (Parodi, 1999) and less than 1 % in dairy products (Martins *et al.*, 2007).
243 In the present study, the values obtained were higher than those reported in the literature,
244 which is remarkable given its important physiological role. Also, the contents of *cis*-10, *cis*-
245 12 isomer were higher than those reported in the literature. This isomer has been attributed
246 no beneficial effect and milk studies indicate smaller proportions of 0.01 %, in addition was
247 not detected in either butter or cheese (Martins *et al.*, 2007). Therefore, and given the high
248 proportion observed in this study, it is important to determine their biological function.

249 In Germany, human consumption of CLA from dairy products is 0.24 g/day
250 (Fritsche *et al.*, 1998), in France from 0.17 to 0.21 g/day (Laloux *et al.*, 2007) and 0.40 to
251 0.72 g/day in Portugal (Martins *et al.*, 2007), suggesting optimal means of 15-20 g/day
252 (Ritzenthaler *et al.*, 2001) and rich consumption 65 g/day (Park *et al.*, 2001). Nevertheless,
253 Ip *et al.* (1999) estimated that a 70 kg person consuming 3.0 g CLA/day provides maximum
254 health benefit. According to CLA contents found in the present study and considering that
255 milk consumption in Chile is 127 L/person (ODEPA, 2010), is estimated a CLA daily
256 intake between 0.03 and 0.24 g/day.

257

258 3.2. Evaluation of the CLA content of dairy products after processing

259 The amounts of total CLA and each of the isomers in raw milk receptioned in
260 commercial dairy plant and in processed products obtained from that of previous fresh milk
261 are shown in Table 2. A significant interaction between product type and sampling month
262 was observed (Table 3 and Figure 1). In general, the original fresh milk observed higher

263 contents of CLA in autumn (March to May) and spring (October to December) months than
264 in winter (June to September). In contrast, powdered and sweetened condensed milk
265 products, presented higher values in the winter months, although with greater variability in
266 these products, especially in sweetened condensed milk. Furthermore, sweetened
267 condensed milk presented in the most studied months (specifically 6 of the 10 sampling
268 months) lower CLA contents than the starting fresh milk and milk powder. Instead, milk
269 powder showed similar values to those of fresh milk, and even in 4-5 months of the study
270 showed higher values, most of them coinciding with the months of lowest value (winter)
271 obtained in fresh milk.

272 Variation in the concentration of CLA in dairy products is essentially a function of
273 the concentration in the starting milk, nevertheless the results of the effect of processing
274 conditions, storage and packaging on the CLA content of various types of dairy products
275 are unclear. Coakley *et al.* (2007) reported that the *cis*-9, *trans*-11 and *cis*-10, *trans*-12
276 isomers were not significantly affected by the processing of milk to cheese made with
277 standard processes (pasteurization of milk and subsequent cooling at 30 ° C, 6 months of
278 ripening of cheese at 8 ° C). However, Shantha *et al.* (1992) detected a decrease in total
279 CLA in cheese samples after 10 wk of refrigerated storage (4 ° C). Also, Herzallah *et al.*
280 (2005) reported CLA decreases of 21 and 53 % in cheeses heated to 94 ± 1.0 ° C in a
281 microwave oven for 5 and 10 min, respectively. These authors also observed a decrease of
282 the *trans* isomers of pasteurized cheese at 63 ° C for 30 min or heated in a microwave at 96
283 ° C for 5 min. The decrease in milk CLA's content after heating may be due to the action of
284 free radicals which are formed as a result of the oxidation of lipids (Leung and Liu, 2000).
285 Other studies detected new CLA isomers in ripened cheeses (Werner *et al.*, 1992;
286 Lavillonière *et al.*, 1998; Sehat *et al.*, 1998) and it was hypothesized that biohydrogenation

287 of linolenic acid in cheese could lead to the formation of CLA isomers as intermediates.
288 Moreover, refrigerated storage and thermal treatment resulted in significant decreases or
289 disappearance of some of the minor CLA isomers and a significant increase of *trans, trans*
290 isomers from both *cis, trans, trans, cis*, and *cis, cis* isomers especially in CLA-fortified
291 milk powder but also in fermented milk, yogurt, and milk-juice blend (Rodríguez-Alcalá
292 and Fontecha, 2007). In the present study, the CLA content increased in powdered milk,
293 especially in those months in which the original raw milk had lower values, which could be
294 explained by the increase in *trans* isomers, though only three isomers were analyzed.
295 However, more research is needed to elucidate the exact effect of processing and storage
296 conditions of milk and dairy products on the CLA content.

297

298 **4. Conclusions**

299 Regarding to CLA content of commercial dairy products, higher values were found
300 in fresh milk obtained from sector with livestock production systems based on grazing
301 compared to sector with livestock systems based in total mixed ration and housing, with
302 values between 1.72 g/100 g total FA in spring milk of Osorno sector and 0.42 g in summer
303 milk of Los Angeles sector. Dairy products have presented significantly higher CLA
304 content than raw milk, with averages ranging from 0.88 g/100 g of total FA in cheese up to
305 1.50 g in butter, 1.49 g in sweetened condensed milk and 1.97 g in powdered milk. The *cis-*
306 *9, trans-11* isomer represents 53 % of total CLA, and presented a range between a
307 minimum of 0.26 g/100 g of total FA in summer raw milk of Los Angeles sector and a
308 maximum of 1.26 g in butter of the Osorno sector. The amounts of the isomers *trans-10*,
309 *cis-12* and *cis-10, cis-12* were higher than those reported in the literature. Although the
310 consumption of dairy products in Chile is lower than in other countries consumers of these

311 products, the high amount of CLA found in the Chilean dairy products studied provide
312 adequate levels for human health.

313 The processing has significantly affected the transfer of CLA from fresh milk to
314 dairy products (sweetened condensed milk and powdered milk). For both total CLA and
315 isomers, sweetened condensed milk presented in the most studied months lower CLA
316 contents than the original fresh milk and milk powder. Instead, powder milk showed values
317 similar or above to those of fresh milk. More research is needed to elucidate the exact effect
318 of processing and storage conditions of milk and dairy products on the CLA content.

319

320 **Acknowledgments**

321 The authors thank CONICYT (Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología) and
322 NESTLE S.A-Chile for funding this research (FONDEF Project N° D02I1135
323 “Development of products with high content of functional active principles from cows’
324 milk and its derivatives”).

325

326 **References**

327 Aro, A. S., Mannisto, I., Salminen, M.L., Ovaskainen, V., Kataja, M., & Uusitupa, P.
328 (2000). Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and
329 risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer*, 38, 151-157.

330 Avilez, J.P., Escobar, P., Diaz, C., von Fabeck, G., Matamoros, R., García, F., Alonzo, M.,
331 & Delgado-Pertíñez, M. (2012). Effect of extruded whole soybean dietary
332 concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Jersey cows under
333 pasture conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(2), 409-418

- 334 Balocchi, O., Pinochet, D., Wittwer, F., Contreras, P.A., Echeverría, R., & Guzmán, F.
335 (2001). Rendimiento y composición mineral del forraje de una pradera permanente
336 fertilizada con magnesio. *Pesquisa agropecuarias*, 36, 1309-1317.
- 337 Bauman, D.E., Baumgard, L.H, Corl, B.A., & Griinari J.M. (2000). Biosynthesis of
338 conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings American Society Animal
339 Science*. Cornell University, Ithaca, N.Y. 14853
- 340 Bruice, T. C., & Lightstone, F. C. (1999). Ground state and transition state contributions to
341 the rates of intramolecular and enzymatic reactions. *Accounts of Chemical
342 Research*, 32, 127–136.
- 343 Butler, G., Nielsen, J.H., Slots, T., Seal, C., Eyre, M.D., Sanderson, R., & Leifert, C.
344 (2008). Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and
345 low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the
346 Science Food and Agriculture*, 88, 1431–1441.
- 347 Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L., & Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of
348 conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of
349 anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 185–197.
- 350 Campbell, W., Drake, M.A., & Larick, D.K. (2003). The impact of fortification with
351 conjugated linoleic acid (ALC) on the quality of fluid milk. *Journal of Dairy
352 Science*, 86, 43-51.
- 353 Coakley, M.E., Barrett, J. J., Murphy, R. P., Ross, R., & Stanton, C. (2007). Cheese
354 Manufacture with Milk with Elevated Conjugated Linoleic Acid Levels Caused by
355 Dietary Manipulation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2919–2927.

356 Destailats, F., Japiot, C., Chouinard, P. Y., Arul, J., & Angers, P. (2005). Rearrangement
357 of ruminic acid in ruminant fats: A marker of thermal treatment. *Journal of Dairy*
358 *Science*, 88, 1631–1635.

359 Devery, R., Miller, A., & Stanton, C. (2001). Conjugated linoleic acid and oxidative
360 behaviour in cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, 29, 341-344.

361 Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R., & Scollan, N.D. (2006). Increasing the
362 concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy
363 cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 168–206.

364 Folch, J., Less, H., & Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the insolation and
365 purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 726,
366 497-509.

367 Fritsche, J., & Steinhart, H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German
368 foods evaluation of daily intake. *Z. Lebensm Unters Forsh*, 206, 77-82.

369 Gagliostro, G.A., Vidaurreta, L.I., Schroeder, G.F., Rodriguez, A., & Gatti, P. (2002).
370 Incrementando los valores basales de ácido linoleico conjugado (ALC) en la grasa
371 butirosa de vacas lecheras en condiciones de pastoreo. *Revista Argentina*
372 *Producción Animal*. 22 (Suplem. 1); 59-60.

373 Gaullier, J. M., Halse, J., Hoye, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., & Gudmundsen,
374 O. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation for 1 year reduces body fat
375 mass in healthy overweight humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79,
376 1118–1125.

377 Gnädig, S., & Sébédio, J.L. (2002). Relation between CLA contents in milk and in ripened
378 cheese. XXVI IDF World Dairy Congress, Paris, France.

379 Henning, D.R., Baer, R.J., Hassan, A.N., & Dave, R. (2006). Major Advances in
380 Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal*
381 *of Dairy Science*, 89, 1179-1188.

382 Herzallah, S.M., Humeid, M.A., & Al-Ismail, K.M. (2005). Effect of heating and
383 processing methods of milk and dairy products on conjugated linoleic acid and trans
384 fatty acid isomer content. *Journal of Dairy Science*, 88, 1301–1310.

385 International Dairy Federation. (1995). Milk and milk products-Guidance on sampling.
386 FIL-IDF Standard 50 C. Int. Dairy Fed. Brussels, Belgium.

387 Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D., &
388 Bauman D. (1999). Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary
389 gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *Journal of Nutrition*, 129,
390 2135–2142.

391 Khanal, R.C., Dhiman, T.R., Ure, A.L., Brennand, C.P., Boman, R.L., & McMahon, D.J.
392 (2005). Consumer Acceptability of Conjugated Linoleic Acid-Enriched Milk and
393 Cheddar Cheese from Cows Grazing on Pasture. *Journal of Dairy Science*, 88,
394 1837-1847.

395 Laloux, L., du Chaffaut, L., Razanamahefa, L., & Lafay, L. (2007). Trans fatty acid content
396 of foods and intake levels in France. *European Journal of Lipid Science and*
397 *Technology*, 109, 918–929.

398 Lavillonière, F., Martin, J.C., Bougnoux, P., & Sébédio, J. L. (1998). Analysis of
399 conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. *Journal of the*
400 *American Oil Chemists' Society*, 75, 343–352.

401 Leung, Y.H., & Liu, R.H. (2000). Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits
402 stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9, trans-11-conjugated linoleic
403 acid isomer. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 5469–5475.

404 Lin, H.D., Boylston, M.J., Chang, L.O., Luedecke, H., & Shultz, T.D. (1995). Survey of the
405 Conjugated Linoleic Acid Contents of Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 78
406 (11) 2358-2365.

407 Lock, A.L., & Garnsworthy, P.C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and
408 linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal*
409 *Science*, 74, 163–176.

410 Luna, P., de la Fuente, M. A., & Juarez, M. (2005). CLA unprocessed cheeses during the
411 manufacturing stages. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53, 2690–2695.

412 Ma, D.W., Wierzbicki, A.A., Field, C.J., & Clandinin, M.T. (1999) Conjugated linoleic
413 acid in Canadian dairy and beef products. *Journal of Agriculture Food Chemistry*,
414 47, 1956–1960.

415 Martins, S.V., Lopes, P.A., Alfaia, C.M., Ribeiro, V.S., Guerreiro, T.V., Fontes, C.M.,
416 Castro, M.F., Soveral, G., & Prates, J.A., (2007). Contents of conjugated linoleic
417 acid isomers in ruminant-derived foods and estimation of their contribution to daily
418 intake in Portugal. *British Journal of Nutrition*, 98, 1206-1213.

419 Malpuech-Brugere, C. W., Verboeket-van de Venne, H. G., Mensink, R. P., Arnal, M. A.,
420 Morio, B., Brandolini, M., Saebo, A., Lassel, T. S., Chardigny, J. M., Sébédio, J. L.,
421 & Beaufre, B. (2004). Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat
422 mass in overweight humans. *Obesity Research*, 12, 591–598.

423 Mir, P.S., Okine, E.K., Goonewardene, L., He, M.L., & Mir, Z. (2003). Effects of synthetic
424 conjugated linoleic acid (CLA) or bio-formed CLA as high CLA beef on rat growth

425 and adipose tissue development. *Canadian Journal of Animal Science*, 83 (3), 583-
426 592.

427 Morrison, W.R., & Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acids methyl esters and
428 dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid*
429 *Research*, 5, 600-608.

430 Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) (2010). Estadísticas agropecuarias.
431 Santiago: ODEPA. Disponible en URL: <http://www.odepa.gob.cl>.

432 Pariza, M.W., & Park, M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic
433 acid. *Progress in Lipid Research*, 40, 283-298.

434 Park, Y., Albright, K.J., Cai, Z.Y., & Pariza, M.W. (2001). Comparison of methylation
435 procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial
436 (trimethylsilyl) diazomethane. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49,
437 1158–1164.

438 Parodi, P.W. (1999). Conjugate linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine
439 milk fat. *Journal of Dairy Science*, 82, 1339-1349.

440 Pinto, M., Rubilar, C., & Carrasco, E. (2002). Efecto estacional y del área geográfica en la
441 composición de ácidos grasos en la leche de bovinos. *Agro sur*, 30 (2), 75-90.

442 Rego, O.A., Rosa, H.J., Regalo, S.M., Alves, S.P., Alfaia, C.M., Prates, J.A., Vouzela,
443 C.M., & Bessa, R.J. (2008). Seasonal changes of CLA isomers and other fatty acids
444 of milk fat from grazing dairy herds in the Azores. *Journal of Science Food and*
445 *Agriculture*, 88, 1855–1859.

446 Ritzenthaler, K.L., McGuire, M.K., Falen, R., Shultz, T.D., Dasgupta, N., & McGuire,
447 M.A. (2001). Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary

448 assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate
449 methodology. *Journal of Nutrition*, 131, 1548–1554.

450 Rodríguez-Alcalá, L.M., & Fontecha, J. (2007). Hot Topic. Fatty Acid and Conjugated
451 Linoleic Acid (CLA) Isomer Composition of Commercial CLA-Fortified Dairy
452 Products: Evaluation After Processing and Storage. *Journal of Dairy Science*, 90,
453 2283-2290.

454 Sehat, N., Kramer, J.K.G., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P., Roach, J. A. G., Eulitz, K.,
455 Morehouse, K. M., & Ku, Y. (1998). Identification of conjugated linoleic acid
456 isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid
457 chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of
458 chromatographic elution sequences. *Lipids*, 33, 963–971.

459 Semma, M. (2002). Trans fatty acids: Properties, benefits and risks. *Journal Health
460 Science*, 48, 7-13.

461 Shantha, N. C., Ram, L. N., O’Leary, J., Hicks, C. L., & Decker, E. A. (1995). Conjugated
462 linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage.
463 *Journal Food Science*, 60, 695–697.

464 Shantha, N.C., Decker, E.A., & Ustunol, Z. (1992). Conjugated linoleic acid concentration
465 in processed cheese. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 69, 425–428.

466 Sehat, N., Rickert, R., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Yurawecz, M.P., & Roach, J.A.G.
467 (1999). Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-
468 high-performance liquid chromatography. *Lipids*, 34, 407–413.

469 Thomson, N.A., Chand, A., & Kay, J.K. (2003). Predicting $\Delta 9$ -desaturase activity and the
470 association with conjugate linoleic acid (ALC) concentration in bovine milk.
471 *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 63, 25-30.

472 Visonneau, S., Cesano, A., Tepper, S.A., Scimeca, J.A., Santoli, D., & Kritchevsky, D.
473 (1997). Conjugated linoleic Acid suppresses the growth of human breast
474 adenocarcinoma cells in SCID Mice. *Anticancer Research*, 17, 969-973.

475 Ward, A.T., Wittenberg, K.M., Froebe, H.M., Przybylski, R., & Malcolmson, L. (2003).
476 Fresh Forage and Solin Supplementation on Conjugated Linoleic Acid Levels in
477 Plasma and Milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 1742-1750.

478 Wahle, K. W., Heys, S. D., & Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: Are they
479 beneficial or detrimental to health?. *Progress Lipid Research*, 43, 553–587.

480 Werner, S. A., Luedecke, L. O., & Shultz , T. D. (1992). Determination of conjugated
481 linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: Effects
482 of cheese cultures, processing and aging. *Journal of Food Chemistry*, 40, 1817–
483 1821.

484 Zlatanov, S., Lascaridis, K., Feist, C., & Sagredos, A. (2002). CLA content and fatty acids
485 composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 78, 471–477.

486

487

488 Table 1. Conjugated linoleic acid contents (CLA, g/100 g fatty acids) in raw milk of bulk tank of commercial dairy plants and in dairy
 489 products

Product	CLA Total						CLA Isomer		
	n	Mean \pm SEM ⁽²⁾	Mínimum	Máximum	Cis-9, trans-11		Trans-10, cis-12		Cis-10, cis-12
					Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	
Raw milk¹									
Summer Los Ángeles	18	0.41 \pm 0.12 e	0.28	0.49	0.26 \pm 0.06 f	0.15 \pm 0.06 c	0.00	0.00	0.00
Autumn Los Ángeles	18	0.82 \pm 0.08 d	0.74	0.91	0.32 \pm 0.15 e	0.33 \pm 0.09 b	0.18 \pm 0.23 e	0.18 \pm 0.23 e	0.18 \pm 0.23 e
Spring Los Ángeles	18	0.93 \pm 0.28 d	0.41	1.33	0.49 \pm 0.02 d	0.44 \pm 0.02 a	0.00	0.00	0.00
Summer Osorno	18	0.61 \pm 0.01 e	0.59	0.62	0.40 \pm 0.01 e	0.21 \pm 0.00 c	0.00	0.00	0.00
Autumn Osorno	18	0.89 \pm 0.14 d	0.74	1.01	0.48 \pm 0.04 d	0.00	0.41 \pm 0.12 d	0.41 \pm 0.12 d	0.41 \pm 0.12 d
Spring Osorno	18	1.72 \pm 0.07 b	0.55	2.96	0.81 \pm 0.44 a	0.00	1.19 \pm 0.41 a	1.19 \pm 0.41 a	1.19 \pm 0.41 a
Dairy products									
Butter	14	1.50 \pm 0.41 b	1.26	2.22	0.92 \pm 0.38 a	0.56 \pm 0.24 a	0.53 \pm 0.21 c	0.53 \pm 0.21 c	0.53 \pm 0.21 c
Cheese	14	0.88 \pm 0.55 d	0.37	1.47	0.47 \pm 0.34 d	0.00	0.41 \pm 0.21 d	0.41 \pm 0.21 d	0.41 \pm 0.21 d
Condensed milk 2003	48	1.03 \pm 0.24 d	0.73	1.46	0.44 \pm 0.15 d	0.05 \pm 0.06 d	0.55 \pm 0.09 c	0.55 \pm 0.09 c	0.55 \pm 0.09 c
Condensed milk 2004	48	1.49 \pm 0.49 b	1.14	2.20	0.74 \pm 0.23 b	0.00	0.75 \pm 0.29 b	0.75 \pm 0.29 b	0.75 \pm 0.29 b
Condensed milk 2005	48	1.31 \pm 0.26 c	0.96	1.61	0.79 \pm 0.55 b	0.57 \pm 0.60 a	0.10 \pm 0.20 f	0.10 \pm 0.20 f	0.10 \pm 0.20 f
Powdered milk 2003	48	1.43 \pm 0.26 b	1.06	2.14	0.68 \pm 0.11 c	0.18 \pm 0.10 c	0.57 \pm 0.15 c	0.57 \pm 0.15 c	0.57 \pm 0.15 c
Powdered milk 2004	48	1.97 \pm 0.37 a	1.61	2.59	0.97 \pm 0.23 a	0.00	0.10 \pm 0.16 f	0.10 \pm 0.16 f	0.10 \pm 0.16 f
Powdered milk 2005	48	1.46 \pm 0.2 b	1.24	1.79	0.73 \pm 0.13 b	0.24 \pm 0.33 b	0.54 \pm 0.13 c	0.54 \pm 0.13 c	0.54 \pm 0.13 c

490 Mean values within a column with different superscripts are different ($p < 0.05$).

491 ¹ Milk samples were taken in two regions of Chile, with dairy cattle production systems mainly differentiated by the type of animal
492 feeding: pasture-based systems (Osorno) and housing and based in total mixed ration systems (Los Angeles)

493

494 Table 2. Contents of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products made from cow's fresh milk during the experimental period of

495 2006

CLA (g/100 g FA)	Product			Effects, p^1		
	Raw milk	Powdered milk	Condensed milk	T	M	TxM
N	90	30	30			
Total CLA	1.35 ± 0.51	1.45 ± 0.28	0.93 ± 0.61	ns	ns	***
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.58 ± 0.41	0.73 ± 0.16	0.45 ± 0.35	ns	***	***
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.67 ± 0.24	0.72 ± 0.20	0.45 ± 0.19	ns	ns	*
CLA <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12	0.77 ± 0.45	0.56 ± 0.27	0.87 ± 0.13	ns	ns	*

496 T. Product type; M. Sample months; TxM. interaction; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: not significant, $P > 0.05$

497

498 Table 3. Contents of conjugated linoleic acid (CLA, g/100 g FA) in dairy products made from cow's fresh milk during the months in
 499 the experimental period of 2006

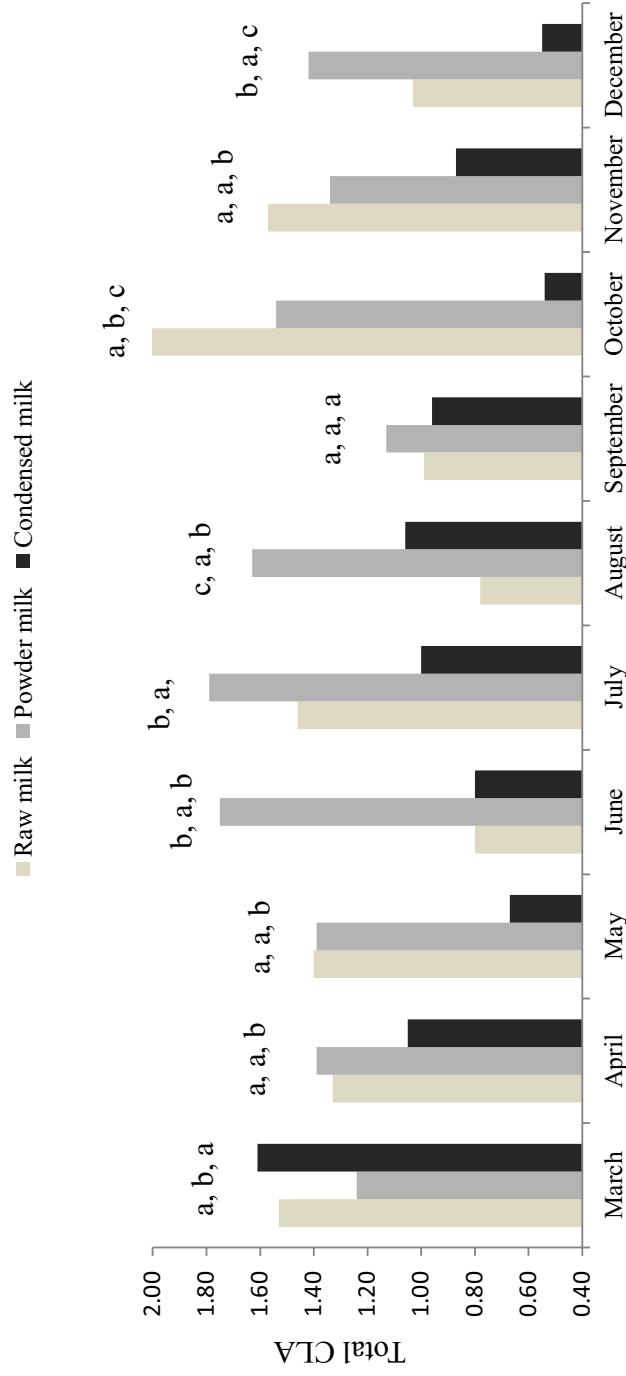
Mes	CLA total			CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11			CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12; CLA <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12		
	Raw milk.	Powdered	Cond. ¹	Raw milk	Powdered	Cond.	Raw milk	Powdered	Cond.
March	1.53 B	1.24 B	1.61 A	0.58 b, C	0.58 b, C	0.97 a, A	0.95 a, A	0.66 b, B	0.64 b, A
April	1.33 B	1.39 B	1.05 B	0.51 b, C	0.81 a, A	0.47 b, C	0.83 a, B	0.59 b, C	0.58 b, A
May	1.40 B	1.39 B	0.67 C	0.67 b, C	0.86 a, A	0.30 c, C	0.70 a, B	0.53 b, C	0.37 c, B
June	0.80 C	1.75 A	0.80 C	0.24 b, D	0.84 a, A	0.43 b, C	0.56 b, C	0.90 a, A	0.37 c, B
July	1.46 B	1.79 A	1.00 B	1.03 a, B	0.89 a, A	0.58 b, B	0.44 b, C	0.90 a, A	0.43 b, B
August	0.78 C	1.63 A	1.06 B	0.18 c, D	0.78 a, A	0.53 b, B	0.64 b, C	0.85 a, A	0.53 b, B
September	0.99 B	1.13 C	0.96 B	0.25 b, D	0.50 a, C	0.50 a, C	0.74 a, C	0.63 a, B	0.46 b, B
October	2.15 A	1.54 A	0.54 C	1.32 a, A	0.69 b, B	0.29 c, D	0.82 a, C	0.85 a, A	0.24 b, C
November	1.57 B	1.34 B	0.87 B	0.41 b, C	0.63 a, B	0.52 a, B	1.16 a, A	0.71 b, B	0.35 c, C
December	1.03 C	1.42 B	0.55 C	0.40 b, C	0.71 a, B	0.19 c, D	0.63 b, C	0.72 a, B	0.43 c, C

500 Means within a row (a, b, c) or column (A, B, C, D) with different superscripts are different (p<0.05).

501 ¹ Cond.: condensed milk

502 Figure 1. Contents of total conjugated linoleic acid (CLA, g/100 g FA) in dairy products made from cow's fresh milk during the
 503 months in the experimental period of 2006. Means within a month (a, b, c) with different superscripts are different ($p < 0.05$).

504



505
 506
 507

1 SJAR [3639] Submission Acknowledgement

2 Dear Manuel Delgado pertiñez:

3

4 Thank you for submitting the manuscript "Effect of canola seed (*brassica napus*) dietary
5 concentrate on conjugated linoleic acid concentration in milk in Chilean Black Friesian cows
6 under pasture conditions" to Spanish Journal of Agricultural Research.

7

8

9 **Effect of canola seed (*brassica napus*) dietary concentrate on conjugated linoleic acid**
10 **concentration in milk in Chilean Black Friesian cows under pasture conditions**

11

12 J. P. Aviléz^a, G. von Fabeck^a, F. García^b, M. Alonzo^c and M. Delgado-Pertiñez^{d,*}

13

14 ^a Escuela de Medicina Veterinaria . Universidad Católica de Temuco. Montt 56. Temuco. Chile

15 ^b Empresa Biotecnología agropecuaria (BTA). Bilbao 3670. Santiago. Chile

16 ^c Nestle-Chile. Francisco del Campo S/N. Fabrica Osorno – Planta NESTLE. Chile

17 ^d Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica.

18 Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1. 41013 Sevilla. Spain

19

20 *corresponding author: pertinez@us.es / Tel.: +34 954 48 64 50 / Fax: +34 954 48 64 36.

21

22 Tables: 5. Figures: 1.

23 **Topic:** Animal production

24 **Short title:** CLA content in milk of Chilean Black Friesian cows supplemented with canola seed on

25 pasture

26

27

28 **Abstract**

29 There are no known works to study the effects of canola (*Brassica napus*) supplementation and
30 conjugated linoleic acid (CLA) content in milk on feeding systems based on pastures. The objective of
31 this study was to evaluate the effect of a dietary supplement with canola seed on the production and
32 composition of milk, and CLA concentration in Chilean Black Friesian cows under pasture conditions.
33 Three experiments were done. Experiment 1: control group was fed 5 kg d⁻¹ of commercial concentrate
34 without canola (0-TC1) and treatment group that was fed 3.75 kg of commercial concentrate plus 1.16
35 kg of whole canola seed (1.16-TC1). Experiment 2: Control group was fed 8 kg d⁻¹ commercial
36 concentrate without canola (0-TC2) and treatment group that was fed 6.2 kg of commercial concentrate
37 plus 1.2 kg of ground canola seed (1.2-TC2). Experiment 3: control group was fed 6 kg d⁻¹ commercial
38 concentrate without canola (0-TC3) and treatment group was fed 6 kg of commercial concentrate with
39 20% of whole canola seed (1.2 kg d⁻¹, 1.2-TC3). The duration of each experiment was 60 days. No
40 differences in milk production and quality were observed among the experimental groups in every
41 experiment. The isomers *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 were higher than those normally found in
42 the scientific literature. There was no effect of the inclusion of canola seed on total CLA content or the
43 content of *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers.

44 **Additional key words:** CLA, dairy cows, grazing, milk quality.

45

46 **Resumen**

47 **Efecto de la suplementación con semilla de canola (*Brassica napus*) en vacas Frisón Negra** 48 **Chilena en pastoreo sobre el contenido de ácido linoléico conjugado en la leche**

49 No se conocen trabajos sobre el efecto de la suplementación con canola (*Brassica napus*) en
50 sistemas de pastoreo sobre el contenido de ácido linoléico conjugado (CLA) en leche. El objetivo de
51 este estudio ha sido evaluar en vacas de raza Frisón Negra Chilena en pastoreo, el efecto de la
52 suplementación con semilla de canola sobre la producción de leche y el contenido en CLA. Se

53 realizaron tres experimentos. Experimento 1: grupo control que fue suplementado con 5 kg d⁻¹ de
54 concentrado comercial sin canola (0-TC1) y grupo tratamiento con 3.75 kg de concentrado comercial
55 más 1.16 kg canola en grano (1.16-TC1). Experimento 2: grupo control que fue suplementado con 8 kg
56 d⁻¹ de concentrado comercial sin canola (0-TC2) y grupo tratamiento con 6.2 kg de concentrado
57 comercial más 1.2 kg de canola en grano molido (1.2-TC2). Experimento 3: grupo control que fue
58 suplementado con 6 kg d⁻¹ de concentrado comercial sin canola (0-TC3) y grupo tratamiento con 6 kg
59 de concentrado comercial con un 20% de semilla de canola en grano entero (1.2 kg d⁻¹, 1.2-TC3). La
60 duración de cada experimento fue de 60 días. La producción de leche y su composición química no se
61 afectó significativamente por los tratamientos. Los isómeros *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12
62 presentaron valores más altos a los encontrados normalmente en la literatura científica. Las cantidades
63 de semilla de canola suplementadas en cada uno de los experimentos, no modificaron los contenidos de
64 CLA total y de los isómeros *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-10, *cis*-12.

65 **Palabras clave adicionales:** calidad de leche, CLA, pasto, vacas de leche.

66

67 **Abbreviations used:** ADF (acid detergent fibre); CLA (conjugated linoleic acid); DIM (days in milk);
68 DM (dry matter); FA (fatty acid); FCM (fat corrected milk production); GLM (general linear model);
69 ME (metabolizable energy); NDF (neutral detergent fibre); TC (treatment canola); TMR (total mixed
70 ration)

71

72

73 **Introduction**

74 Conjugated linoleic acid (CLA) has been indicated as one of the most beneficial fatty acids for
75 human health (Pariza & Park, 2001) and, likewise, ruminant products as milk and meat constitutes the
76 principal source of CLA. Diet has a major influence on milk fat CLA and it has been extensively
77 investigated (Bauman *et al.*, 2001). Several nutritional studies have been addressed to increase CLA

78 content in animal products and to improve their nutritional properties. For instance, it has been reported
79 that fresh forage and oil-rich feeds increase CLA concentration (Khanal *et al.*, 2005; Dewhurst *et al.*,
80 2006). Within the seeds of oilseeds, canola (*Brassica napus*) has been used in diets TMR (Total Mixed
81 Ration) in dairy cows (Bayourthe *et al.*, 2000, Chouinard *et al.*, 2001, Ward *et al.*, 2002; Chichlowski
82 *et al.*, 2005), but there are no known works to study its effect with pastures.

83 In Chile, Chilean Black Friesian (Holstein X Overo Black) is the most important breed and
84 produces almost 80% received in milk plants (INE, 2007). Moreover, in the Araucania Region in recent
85 years has increased the acreage of canola Raps, making grain and oil industry waste (bran of canola) in
86 a low-cost food, which allows it to be incorporated into the concentrates of dairy cattle as a supplement
87 to grazing (INE, 2007). However, no known work to study the effect of canola seed for animals of this
88 breed and based on grazing. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of a dietary
89 supplement with canola seed as (i) whole grain plus commercial concentrate, ii) ground canola grain
90 plus commercial concentrate and iii) whole grain added to commercial concentrate, on milk yield, CLA
91 isomers content and metabolic profile in Chilean Black Friesian cows in pasture-based systems.

93 **Materials and methods**

94 **Animals and diets**

95 Three experiments were done in three representative sectors of the Southern of Chile, in
96 compliance with the principles and specific guidelines on animal care and welfare as required by
97 Chilean law (SAG, 2010). Each experiment was carried out in a farm with a Chilean Black Friesian
98 herd based on grazing plus the use of concentrate. The diets were formulated according to the animal
99 requirements established by NRC (2001). The duration of each experiment was 60 d, the first 15 d were
100 for adaptation to the experimental diets and the experimental period was from day 15 to day 60.

101 Experiment 1. The experiment was carried out in a farm with 122 cows and located in the
102 Vilcún sector (IX Region of Chile, approximately 38° 39' 0" S latitude and 72° 14' 0" W longitude),
103 between November and December (spring period). The farm lies in the pre-mountain range of the
104 Chilean Andes, which is characterized by an average rainfall of 1400 mm per year, with an average
105 daily temperature of 23.6°C in January and 1.5°C in August. The altitude is 950 m above sea level.
106 Fourteen healthy cows between 2 and 7 calvings (3.6 ± 0.8), with a range from 20 to 60 days in milk
107 (45 ± 11 DIM) and a body condition score of 2.50 ± 1.0 were used in the study. An average of $13.8 \pm$
108 1.20 kg d^{-1} of milk production was recorded. Cows were selected for the study based on previous milk
109 production in order to make two homogenous groups and they were randomly assigned ($n=7$ /per
110 group). Each group was given a diet per animal depending on the inclusion or not of whole canola seed
111 plus concentrate commercial as a supplement to the diet (Table 1): control group which was fed 5 kg d^{-1}
112 of commercial concentrate without canola (0-TC1) and treatment group that was fed 3.75 kg of
113 commercial concentrate more 1.16 kg of canola seed (1.16-TC1). Ration supplements were made
114 isoenergetic and were distributed in two visits to the milking parlour, at 06:00 h in the morning and in
115 the afternoon at 14:30 h. Visual observation of feed intake indicated that cows consumed all
116 concentrate offered. The basic diet of all groups was a natural (composed of *Trifolium*, *Dactylis*
117 *glomerata*, *Bromus*, *Lolium*, *Taraxacum officinale* and *Plantago lanceolata*) and an improved
118 (composed of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*) pastures. Also, each animal was provided 6 kg
119 DM d^{-1} of silage (composed of *L. perenne* and *Avena sativa*) (Table 1). Grazing was the continuous
120 type in an area of 57 hectares with 8 paddocks (1 of 8 hectares, 5 of 6 hectares and 2 of 9.5 hectares),
121 with a change of plot as needed, leaving 5 cm residual plant height.

122 Experiment 2. The experiment was carried out in a farm with 230 cows and located in the San
123 Pablo sector, IX Region of Chile, approximately 40° 24' 0" S latitude and 73° 1' 0" W longitude),
124 between October and November. The farm lies in the central valley of Chile, which is characterized by
125 an average rainfall of 1380 mm per year, with an average daily temperature of 23.4°C in January and

126 4.2°C in August. The altitude is 65 m above sea level. Twenty healthy cows between 2 and 5 calvings
127 (2.2 ± 0.8), with a range from 20 to 60 days in milk (44 ± 11 DIM) and a body condition score of 2.75
128 ± 0.5 were used in the study. An average of 29.5 ± 5.84 kg d⁻¹ of milk production was recorded. Cows
129 were selected for the study based on previous milk production in order to make two homogenous
130 groups and they were randomly assigned (n=10/per group). Each group was given a diet per animal
131 depending on the inclusion or not of ground canola seed plus commercial concentrate as a supplement
132 to the diet (Table 2): control group which was fed 8 kg d⁻¹ of commercial concentrate without canola
133 (0-TC2) and treatment group that was fed 6.2 kg of commercial concentrate plus 1.2 kg of ground
134 canola grain (1.2-TC2). Ration supplements were made isoenergetic and were distributed in two visits
135 to the milking parlour, at 04:30 h in the morning and in the afternoon at 15:30 h. Visual observation of
136 feed intake indicated that cows consumed all concentrate offered. The basic diet of all groups was an
137 improved pasture composed of *L. perenne* and *T. repens* (Table 2). The animals grazed in 10 paddocks
138 of 0.5 hectares each, and managed with rotational strip-grazing and electric fencing. The animals were
139 transferred from one strip to the next every 12 or 24 h.

140 Experiment 3. The experiment was carried out in a farm with 342 cows and located in the Vilcún
141 sector (IX Region of Chile), between June and July (winter period). Twenty healthy cows between 2
142 and 6 calvings (3.3 ± 0.5), with a range from 20 to 60 days in milk (32 ± 8 DIM) and a body condition
143 score of 2.75 ± 0.2 were used in the study. An average of 15.4 ± 2.63 kg d⁻¹ of milk production was
144 recorded. Cows were selected for the study based on previous milk production in order to make two
145 homogenous groups and they were randomly assigned (n=10/per group). Each group was given a diet
146 per animal depending on the inclusion or not of whole canola seed in the supplemented concentrate
147 (Table 3): control group which was fed 6 kg d⁻¹ of commercial concentrate without canola (0-TC3) and
148 treatment group that was fed 6 kg of commercial concentrate with 20% of whole canola seed (1.2 kg d⁻¹
149 ¹, 1.2-TC3). Ration supplements were made isoenergetic and were distributed in two visits to the
150 milking parlour, at 05:30 h in the morning and in the afternoon at 15:30 h. Visual observation of feed

151 intake indicated that cows consumed all concentrate offered. The basic diet of all groups was an
152 artificial pasture composed of *A. sativa*, *L. perenne* and *T. repens* (Table 3). Also, each animal was
153 provided 6 kg DM d⁻¹ of silage (composed of *A. sativa*, *L. perenne* and *T. repens*) and 1.5 kg DM d⁻¹ of
154 fodder cabbage (*Brassica oleracea*) (Table 3). The animals grazed in 20 paddocks of 1 hectare each,
155 and managed with rotational strip-grazing and electric fencing. The animals were transferred from one
156 strip to the next every 12 h.

157 **Laboratory analyses**

158 At the beginning of the each experiment samples of the pasture and concentrates were taken to
159 determine their chemical and nutritional composition (Tables 1, 2 and 3). Representative samples of
160 pasture forage were collected from the paddock before grazing at a height of 8 cm above the ground,
161 using a 1 m² quadrant. Dry matter contents of the pasture were determined by forced air oven at 60°C
162 for 48 h. Samples of pasture and concentrates were ground to pass a 1-mm screen in a Willey mill
163 before analysis. Dry matter (method 934.01), ash (method 942.05), ether extract (method 920.39), N
164 (method 984.13) and crude fiber (method 978.10) were determined according to AOAC (2005)
165 methods as previously described by Avilez *et al.* (2012). The analyses of neutral detergent fibre (NDF)
166 and acid detergent fibre (ADF) were carried out according to Van Soest *et al.* (1991), and both NDF
167 and ADF were expressed exclusive of residual ash. The metabolizable energy (ME) was estimated
168 according to NRC (2001).

169 Cow milk production was determined using a Waikato® measuring equipment, on days 1, 15,
170 30, 45 and 60. At each control, a milk sample of 30 mL was taken (to which was added 0.03 g of
171 potassium dichromate at 0.1% as a preservative), and the contents of fat, protein and urea were
172 determined automatically as previously described by Avilez *et al.* (2012). Also somatic cell counts
173 were measured by flow cytometry, using a Fossomatic Electronic Cell Counter (Fossmatic 5000,
174 Hillerod, Denmark).

175 At each milk control, milk samples of 100 mL were taken and sent to the laboratory in
176 thermally insulated containers at 4°C for analysis of CLA isomers (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12;
177 *cis*-10, *cis*-12). Total lipids were extracted by the method of Folch *et al.* (1957), using a mixture of
178 chloroform and methanol (2:1, v:v). The fatty acid (FA) profile was analyzed by gas chromatography
179 after transesterification of FA to FA methyl esters (Morrison & Smith, 1964) as previously described
180 by Avilez *et al.* (2012).

181 At the beginning and at the end of the each experiment blood samples were taken (5 mL animal⁻¹)
182 by coccygeal venipuncture flow and placed in tubes with sodium heparin. The samples were then
183 centrifuged for 3 min at 3000 rpm and the plasma was aliquoted and frozen (-18°C) in microtubes of
184 1.5 mL. For each sample, the metabolic profile was determined as previously described by Avilez *et al.*
185 (2012).

186 **Statistical analysis**

187 Data of milk production, milk's constituents and metabolic profile were analyzed as repeated
188 measures in each experiment, using the general linear model (GLM) of the SPSS for Windows 18.0
189 package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The linear model used for each parameter was as follows:

$$190 Y_{ijk} = \mu + T_i + A_{ij} + W_k + (T \times W)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

191 Where Y_{ijk} = observations for dependent variables; μ = overall mean; T_i = fixed effect of
192 treatment group or dietary concentrate; A_{ij} = random effect of animal j for the i treatment; W_k = fixed
193 effect of the k week of lactation; $T \times W$ = interactions among these factors for the i treatment and k
194 week of lactation, and ε_{ijk} = random effect of residual. Pairwise comparisons of means were carried out,
195 where appropriate, using Tukey's significant difference tests. The level of significance for the analyses
196 was 5%.

197

198 **Results and discussion**

199 Milk yield and quality

200 In the initial day no differences in milk production and quality were observed among the
201 experimental groups in every experiment (data not shown). In the experimental period (from day 15 to
202 day 60), also no differences in milk production ($p = 0.542$ in the experiment 1; $p = 0.622$ in the
203 experiment 2; $p = 0.454$ in the experiment 3), fat corrected milk production (FCM, kg d^{-1}) ($p = 0.361$ in
204 the experiment 1; $p = 0.742$ in the experiment 2; $p = 0.677$ in the experiment 3) or the concentrations
205 (%) of fat ($p = 0.891$ in the experiment 1; $p = 0.772$ in the experiment 2; $p = 0.214$ in the experiment 3),
206 (%) protein ($p = 0.793$ in the experiment 1; $p = 0.886$ in the experiment 2; $p = 0.642$ in the experiment
207 3) or the amounts of fat ($p = 0.243$ in the experiment 1; $p = 0.901$ in the experiment 2; $p = 0.910$ in the
208 experiment 3), protein ($p = 0.161$ in the experiment 1; $p = 0.254$ in the experiment 2; $p = 0.153$ in the
209 experiment 3) and urea ($p = 0.254$ in the experiment 1; $p = 0.091$ in the experiment 2; $p = 0.119$ in the
210 experiment 3) were observed among the experimental groups (Table 4). Milk urea was within the normal
211 range reported by Schuler *et al.* (1990), as well as somatic cell counts remained within the optimal range devices
212 (San Martin *et al.*, 2002) Based on milk production and milk urea content in every experiment, the diet
213 contributed an adequate level of protein and energy in accordance with NRC (2001) recommendations.

214 Many of the studies with canola seed refers to its use in diets as TMR, and not its use in grazing
215 systems until this study. Often fat supplements can result in decreased milk production, which may be
216 due to inhibition of rumen fermentation or the low digestibility of fatty acids in the rumen (NRC,
217 2001). Nevertheless, as noted in this work in all experiments, in cattle diets comparing TMR ground
218 canola seed (1.26 kg d^{-1}) with canola meal mechanically extracted (1.20 kg d^{-1}) (Chichlowski *et al.*
219 2005) or using crushed canola seed well protected (by pass) or unprotected (1 kg d^{-1}) (Delbecchi *et al.*,
220 2001), did not increase milk production.

221 In relation to the components of milk, it is known that low fiber diets or high-rich concentrates
222 or vegetable oils can cause a reduction in milk fat in dairy cattle, as well as supplementation of dietary
223 fat can decreasing the percentage of milk protein. In all three experiments of this work despite the

224 higher percentage of fat in the diet supplements in the groups with canola (Table 1 and 3), the
225 percentages and amounts of fat and milk protein were not different between the groups. This may be
226 due to similar input fiber and energy of the total ration in each of the experiments (Murphy *et al.*,
227 2008). TMR diets, comparing the use of canola seeds treated with alkaline peroxide with ground canola
228 grain (2.4 kg d⁻¹) did not increase the percentage of milk fat (Aldrich *et al.*, 1997), while the use of
229 ground canola seed compared to the control diet canola meal mechanically extracted, increased the
230 percentage of fat (Chichlowski *et al.*, 2005). With regard to the protein, these authors did find a
231 decrease in the percentage of milk protein with the use of canola seed. The reduction in the percentage
232 of protein observed in most of studies in animals fed with diets with a high fat content appears to be
233 associated with negative effects on the growth of ruminal micro-organisms and the production of
234 microbial protein (Solomon *et al.*, 2000).

235 The patterns of milk production and basic composition throughout lactation were affected by
236 the lactation day (Table 4). The differences in feeding (mainly due to ingestion and nutritional
237 composition of the herbage) and lactational effects can explain these differences. However, since
238 ingestion and nutritional composition of the herbage were not monitored in this study, this will have to
239 be tested in future studies.

240 **CLA content and composition**

241 In the initial day no differences in total CLA and of each of its isomers were observed among
242 the experimental groups in every experiment (data not shown). In the experimental period, there was no
243 effect of the inclusion of rape seed on total CLA content ($p = 0.121$ in the experiment 1; $p = 0.232$ in
244 the el experiment 2; $p = 0.961$ in the experiment 3) or the content of *cis*-9, *trans*-11 ($p = 0.242$ in the
245 experiment 1; $p = 0.166$ in the experiment 2; $p = 0.125$ in the experiment 3), *trans*-10, *cis*-12 ($p = 0.263$
246 in the experiment 1; $p = 0.082$ in the experiment 2; $p = 0.161$ in the experiment 3) and *cis*-10, *cis*-12 (p
247 = 0.233 in the experiment 2; $p = 0.143$ in the experiment 3) isomers (Table 4). Although the highest
248 values were found for the *cis*-9, *trans*-11 isomer (49-51%, 31-42% and 42-46% of total CLA in the

249 experiments 1, 2 and 3, respectively), the *trans*-10, *cis*-12 isomers presented higher values (49-51%,
250 31-32% and 36-42% in the experiments 1, 2 and 3, respectively) and *cis*-10, *cis*-12 isomers (not
251 detected in the experiment 1; 27-37% and 16-20% in the experiments 2 and 3, respectively) than
252 normally reported in the literature.

253 Chichlowski *et al.* (2005), in TMR diets compared ground canola seed and canola meal
254 mechanically extracted and the differences were not significant in the contents of total CLA (0.421 and
255 0.386%, respectively) and its isomers (0.390 and 0.350% for the *cis*-9, *trans*-11 isomer, respectively).
256 In the present study, the use of canola seed in grazing based systems has not increased the CLA content
257 in milk, although the values obtained are higher (0.995, 1.450 and 0.880% of total FA, in the
258 experiments 1, 2 y 3, respectively) to those found in TMR rations. On the one hand, the high content of
259 CLA obtained could be due to the use of green fodder, given its known effect to increase CLA levels in
260 milk (Khanal *et al.*, 2005, Dewhurst *et al.*, 2006). Moreover, the lack of effect of inclusion of canola
261 seed in the different experiments indicate a greater influence of the pasture than that of the source or
262 level of canola seed incorporated into the diet on the CLA milk content. The different CLA values
263 found in the various experiments of this study, may be related to differences in the nutritional
264 composition of the pasture and forages derived from the different botanical and agronomic
265 characteristics of the herbage used (Dewhurst *et al.*, 2006).

266 In the present study, in agreement with the results found in a previous work (Avilez *et al.*,
267 2012), the *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers presented higher values than normally reported in
268 the literature. The regulation of isomer balance is largely unknown. Nevertheless the *cis*-9, *trans*-11
269 isomer is mainly generated from vaccenic acid in the mammary gland (Mosley *et al.*, 2006), while the
270 *trans*-10, *cis*-12 is a minor intermediate of rumen biohydrogenation (Walker *et al.*, 2004). Therefore
271 future studies are necessary to determine its biological function and metabolic production routes.

272 The pattern of FA composition throughout lactation was affected by the lactation day for all
273 components (Table 4, Fig. 1). This may be related to differences in the nutritional composition of the

274 herbage, which has also been shown to affect the fatty acid composition of milk (Dewhurst *et al.*,
275 2006). In this respect, lower CLA contents in milk have been observed with more mature pasture, and
276 this effect has been attributed to the declining quality and quantity of the herbage (Lock &
277 Garnsworthy, 2003; Ward *et al.*, 2003, Avilez *et al.*, 2012). In the experiment 2 no significant
278 differences were observed between weeks, while in the experiments 1 and 3 lowest CLA values were
279 obtained in the later weeks (Fig. 1). These results could be explained because the experiments 1 and 3
280 were done in the period, which the quality and quantity of the herbage decrease, while that in the
281 experiment 2 was done in the period of major quality and quantity (Ruiz, 1996).

282 **Metabolic profile**

283 Throughout each experiment the cows were in good health and did not show any
284 relevant pathology. All the metabolites evaluated, except blood urea at the end of the trial, were found
285 to be within the normal range, with no significant differences observed between treatments (Table 5),
286 in agreement with the values for healthy lactating dairy cows (Bertoni & Piccioli, 1999). Previous
287 studies (Pulido, 2009; Avilez *et al.*, 2012) have shown an increase in blood urea when diets present
288 high levels of degradable protein, which is the case with animals fed to pasture on grass (*L. perenne*).

289

290 **Conclusions**

291 The dietary concentrate with canola seed (*Brassica napus*) in whole grain or in ground grain
292 considering quantities of 1.2 kg d⁻¹, fed to chilean black Frison (Holstein X Overo Negro) cows, on
293 pasture-based systems, did not influence milk production or total CLA content or its *cis*-9, *trans*-11,
294 *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-10, *cis*-12 isomers. In the present study, high quantities of the *trans*-10, *cis*-12
295 and *cis*-10, *cis*-12 isomers were obtained in comparison to those normally found. The *cis*-10, *cis*-12
296 isomer does not appear in the scientific literature, therefore future studies are necessary to determine its
297 biological function and metabolic production routes. The failure of the dietary concentrate with canola

298 seed supplemented in chilean black Frison cows on pasture to increase the concentration of CLA *cis*-9,
299 *trans*-11 in milk fat requires further investigation.

300

301 **Acknowledgments**

302 The authors thank CONICYT (Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología) and NESTLE S.A-
303 Chile for funding this research (FONDEF Project N° D02I1135 “Development of products with high
304 content of functional active principles from cows' milk and its derivatives”).

305

306 **References**

- 307 Aldrich CG, Merchen NR, Drackley JK, Fahey GC Jr, Berger LL, 1997. The effects of chemical
308 treatment of whole canola seed on intake, nutrient digestibilities, milk production, and milk
309 fatty acids of Holstein cows. *J Anim Sci* 75: 512–521.
- 310 AOAC, 2005. Official methods of analysis, 18th ed. AOAC Int, Gaithersburg, MD, USA.
- 311 Aviléz JP, Escobar P, Diaz C, Von fabeck G, Matamoros R, García F, Alonzo M, Delgado-pertíñez M,
312 2012. Effect of extruded whole soybean dietary concentrate on conjugated linoleic acid
313 concentration in milk in Jersey cows under pasture conditions. *Span J Agric Res* 10: 409-418.
- 314 Bauman DE, Corl BA, Baumgard LH, Griinari JM, 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy
315 cow. In: *Recent advances in animal nutrition* (Garnsworthy PC & Wiseman J, eds.), Nottingham
316 Univ Press, Nottingham, UK. pp: 221-250.
- 317 Bayourthe C, Enjalbert F, Moncoulon R, 2000. Effects of different forms of canola oil fatty acids plus
318 canola meal on milk composition and physical properties of butter. *J Dairy Sci* 83: 690–696.
- 319 Bertoni G, Piccioli Cappelli F, 1999. Guida all'interpretazione dei profili metabolici. Università degli
320 Studi di Perugia, Perugia, Italy. [In Italian].

- 321 Chichlowski MW, Schroeder JW, Park CS, Keller WL, Schimek DE, 2005. Altering the fatty acids in
322 milk fat by including canola seed in dairy cattle diet. *J Dairy Sci* 88: 3084–3094.
- 323 Chouinard PY, Corneau L, Butler WR, Chilliard Y, Drackley JK, Bauman DE, 2001. Effect of dietary
324 lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci* 84: 680-690.
- 325 Delbecchi L, Ahnadi CE, Kennelly JJ, Lacasse P, 2001. Milk fatty acid composition and mammary
326 lipid metabolism in holstein cows fed protected or unprotected canola seeds. *J Dairy Sci* 84:
327 1375–1381.
- 328 Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF, Scollan ND, 2006. Increasing the concentrations of beneficial
329 polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed*
330 *Sci Technol* 131: 168–206.
- 331 Folch J, Less H, Sloane-Stanley GH, 1957. A simple method for the insolation and purification of total
332 lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 726: 497-509.
- 333 INE, 2007. Las pequeñas y medianas explotaciones. VII Censo Agropecuario y Forestal 2006-2007.
334 Instituto Nacional de Estadísticas, Chile. 89 pp. [In Spanish].
- 335 Khanal RC, Dhiman TR, Ure AL, Brennand CP, Boman RL, McMahan DJ, 2005. Consumer
336 acceptability of conjugated linoleic acid-enriched milk and cheddar cheese from cows grazing
337 on pasture. *J Dairy Sci* 88: 1837-1847.
- 338 Lock AL, Garnsworthy PC, 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid Δ (9)-desaturase
339 activity in dairy cows. *Livest Prod Sci* 79: 47-59.
- 340 Morrison WR, Smith LM, 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from
341 lipids with boron fluoride-methanol. *J Lip Res* 5: 600-608.
- 342 Mosley EE, Shafii B, Moate PJ, Mcguire MA, 2006. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is
343 synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J Nutr* 136: 570-575.

- 344 Murphy JJ, Coakley M, Stanton C, 2008. Supplementation of dairy cows with a fish oil containing
345 supplement and sunflower oil to increase the CLA content of milk produced at pasture. *Livest*
346 *Sci* 116: 332–337.
- 347 NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, 7th rev ed. National Academy Press, National
348 Research Council. Washington DC, USA, 381 pp.
- 349 Pariza MW, Park ME, 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid*
350 *Res* 40: 283-298.
- 351 Pulido RG, 2009. Efecto del nivel de suplementación con concentrado sobre la respuesta productiva en
352 vacas lecheras a pastoreo primaveral con alta disponibilidad de pradera. *Arch Med Vet* 41: 197-
353 204. [In Spanish].
- 354 Ruiz I, 1996. Praderas en la IX Región de la Araucanía. Praderas para Chile. Instituto de
355 Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. 2 Ed. Santiago de Chile. 734pp. [in
356 Spanish]
- 357 SAG, 2010. Planteles de animales bovinos lecheros bajo certificación oficial. Instructivo Técnico N°3.
358 Exigencias para el ingreso al Programa de Plantel de Animales Bovinos Lecheros Bajo
359 Certificación Oficial. Servicio Agrícola Ganadero, Chile. [In Spanish].
- 360 San Martín B, Kruze J, Morales MA, Agüero H, León B, Espinoza S, 2002. Resistencia bacteriana en
361 cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y
362 X^a Región, Chile. *Arch. med. vet.* 34: 221-234. [in Spanish]
- 363 Schüler D, Hartung H, Müller S, Jacobi U, 1990. Der Milchwahstoffgehalt ein Kennwert für das
364 Verhältnis von Protein zu Energie in Milchkuhrationen kann mit Teststreifen gemessen werden.
365 *Tierzucht* 44: 14-15.
- 366 Solomon R, Chase LE, Ben-Ghedalia D, Barman DE, 2000. The effect of nonstructural carbohydrate
367 and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the
368 milk fat of dairy cows. *J Dairy Sci* 83: 1322-1329.

- 369 Van Soest PJ, Robertson J, Lewis B, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and
370 nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583-3595.
- 371 Walker GP, Dunshea FR, Doyle PT, 2004. Effects of nutrition and management on the production and
372 composition of milk fat and protein: a review. *Aust J Agric Res* 55: 1009-1028.
- 373 Ward AT, Wittenberg KM, Przybylski R, 2002. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding
374 diets containing solin, flax and canola. *J Dairy Sci* 85: 1191–1196.
- 375 Ward AT, Wittenberg KM, Froebe HM, Przybylski R, Malcolmson L, 2003. Fresh forage and solin
376 supplementation on conjugated linoleic acid levels in plasma and milk. *J Dairy Sci* 86: 1742-
377 1750.
- 378
- 379
- 380

1 **Table 1.** Ingredients and chemical composition of the supplemented dietary concentrates¹ and forages during experiment 1

Ingredients (kg d ⁻¹)	0-TC1	1.16-TC1	Canola seed	Natural pasture ²	Improved pasture ³	Silage ⁴
Whole canola seed		1.16				
Commercial concentrate ⁵	5.00	3.75				
Chemical composition (% DM basis)						
DM (%)	86.7	87.3	88.1	33.7	17.7	17.3
Crude protein	18.1	19.1	21.1	10.1	20.2	11.0
Ether extract	3.4	7.8	22.9	0.1	0.8	0.6
Neutral detergent fibre	40.0	37.8	30.7	43.1	50.7	54.7
Acid detergent fibre	17.0			23.8	29.6	35.3
Crude fibre	14.0	21.9	48.4	26.5	16.5	38.9
Ash	5.6	5.0	3.3	4.0	4.4	1.1
Metabolizable energy (Mcal kg ⁻¹) ⁶	2.80	2.85	3.02	2.42	2.61	2.27

2 ¹ 0-TC1: Control group to which commercial concentrate without canola (5 kg d⁻¹) was provided; 1.16-TC1: treatment group to which 3.75

3 kg of commercial concentrate plus 1.16 kg of whole canola seed were provided.

4 ² Composed mainly of *Trifolium*, *Dactylis glomerata*, *Bromus*, *Lolium*, *Taraxacum officinale* and *Plantago lanceolata*

- 1 ³ Composed of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*
- 2 ⁴ Composed of *L. perenne* and *Avena sativa*
- 3 ⁵ Corn, wheat bran, gluten meal, gluten feed, premix vitamins y minerals
- 4 ⁶ Estimated according to NRC (2001)

5

6

1 **Table 2.** Ingredients and chemical composition of the supplemented dietary concentrates ¹ and pasture
 2 during the experiment 2

	0-TC2	1.2-TC2	Canola seed	Improved pasture ²
Ingredients (kg d⁻¹)				
Ground canola seed		1.2		
Commercial concentrate ³	8.0	6.2		
Chemical composition (% DM basis)				
DM (%)	89.1	88.4	88.1	13.9
Crude protein	14.0	15.1	21.1	23.9
Ether extract	4.0	7.0	22.9	1.6
Neutral detergent fibre	38.5	37.2	30.7	48.6
Acid detergent fibre	16.2			24.5
Crude fibre	7.9	14.4	48.4	25.2
Ash	3.2	3.2	3.3	7.0
Metabolizable energy (Mcal kg ⁻¹) ⁴	3.00	3.02	3.02	2.34

3 ¹ O-TC2: Control group to which commercial concentrate without canola (8 kg d⁻¹) was provided; 1.2-
 4 TC2: treatment group to which 6.2 kg of commercial concentrate plus 1.2 kg of ground canola seed
 5 were provided.

6 ² Composed of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*

7 ³ Cereal grain, oily brans, comushroom, molasses, flours, minerals and vitamins

8 ⁴ Estimated (according to NRC, 2001)

9

1 **Table 3.** Ingredients and chemical composition of the supplemented dietary concentrates ¹ and forages
 2 during the experiment 3

	0-TC3	1.2-TC3	Artificial pasture ²	Fodder cabbage	Silage ³
Ingredients of concentrate (kg d ⁻¹)					
Whole canola seed		1.2			
Grain triticale	2.8	0.6			
Bran Wheat	0.6	2.0			
Grain maize	0.3	0.6			
Lupins	2.3	0.6			
barley bud		1.0			
Chemical composition (% , DM basis)					
DM (%)	88.6	87.2	17.4	15.2	24.3
Crude protein	16.9	17.4	24.2	22.6	10.5
Ether extract	4.4	7.7	1.5	1.8	1.7
Crude fibre	9.7	10.6	18.3	13.2	34.4
Neutral detergent fibre	44.3	40.4	25.0	36.5	52.3
Acid detergent fibre	18.2	16.7	42.0	26.6	42.1
Ash	6.3	6.5	9.0	11.5	6.4
Metabolizable energy (Mcal kg ⁻¹) ⁴	3.01	3.02	2.43	2.47	2.17

3 ¹ O-TC3: Control group to which commercial concentrate without canola (6 kg d⁻¹) was provided; 1.2-
 4 TC3: treatment group to which 6 kg of commercial concentrate with 20% of whole canola seed were
 5 provided (1.2 kg).

6 ² Composed of *Avena sativa*, *Lolium perenne* and *Trifolium repens*

1 ³ Composed of *A. sativa*, *L. perenne* and *T. repens*

2 ⁴ Estimated according to NRC (2001)

3

4

1 **Table 4.** Production and chemical composition (mean values) of the milk of Chilean Black Friesian cows supplemented with canola seed
 2 during the experimental period

	Treatments (dietary concentrates supplemented) ¹						Effects ($p =$) ³			
	Ex. 1		Ex. 2		Ex. 3		SEM ²	Ex.1	Ex.2	Ex.3
	0-TC1	1.16-TC1	0-TC2	1.2-TC2	0-TC3	1.2-TC3	W	W	W	
Milk yield (kg d ⁻¹)	14.8	12.8	27.6	30.5	14.3	16.2	2.01	0.010	0.000	0.020
4 % FCM (kg d ⁻¹)	13.8	11.9	26.7	27.5	13.9	15.5	1.73	0.002	0.030	0.000
Fat (%)	3.60	3.52	3.42	3.34	3.76	3.41	0.275	0.023	0.045	0.001
Fat (Kg d ⁻¹)	0.53	0.45	1.04	1.02	0.54	0.55	0.192	0.004	0.010	0.007
Protein (%)	3.10	3.00	3.10	3.15	3.10	3.12	0.062	0.024	0.003	0.009
Protein (Kg d ⁻¹)	0.46	0.38	0.44	0.59	0.44	0.59	0.034	0.012	0.056	0.056
Urea (mg/100 mL)	0.025	0.028	0.023	0.059	0.023	0.031	0.0224	0.344	0.548	0.274
Somatic cells (x 10 ³ /mL) ⁴	0.015	0.022	0.023	0.030	0.023	0.031	0.0056	0.756	0.822	0.620
CLA (g/100 g FA)										
Total CLA	0.91	1.08	1.50	1.41	0.88	0.88	0.364	0.023	0.002	0.004
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.43	0.56	0.63	0.43	0.50	0.44	0.295	0.006	0.005	0.000
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.48	0.52	0.46	0.25	0.34	0.31	0.282	0.000	0.000	0.000

CLA <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12	0.00	0.00	0.41	0.53	0.23	0.17	0.241	0.000	0.000	0.000
------------------------------------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------

1 ¹ See Tables 1, 2 and 3. Ex. 1: experiment 1; Ex. 2: experiment 2; Ex. 3: experiment 3.

2 ² Standard error of the mean.

3 ³ W: Week. In every experiment, no significant treatment main effects or treatment \times week interactions were noted ($p > 0.05$).

4 ⁴ For the statistical analysis, the values were transformed to logarithmic scale, base 10.

5

Table 5. Plasma metabolic profile of Chilean Black Friesian cows supplemented with canola seed at the beginning and the end of every

2 experiment

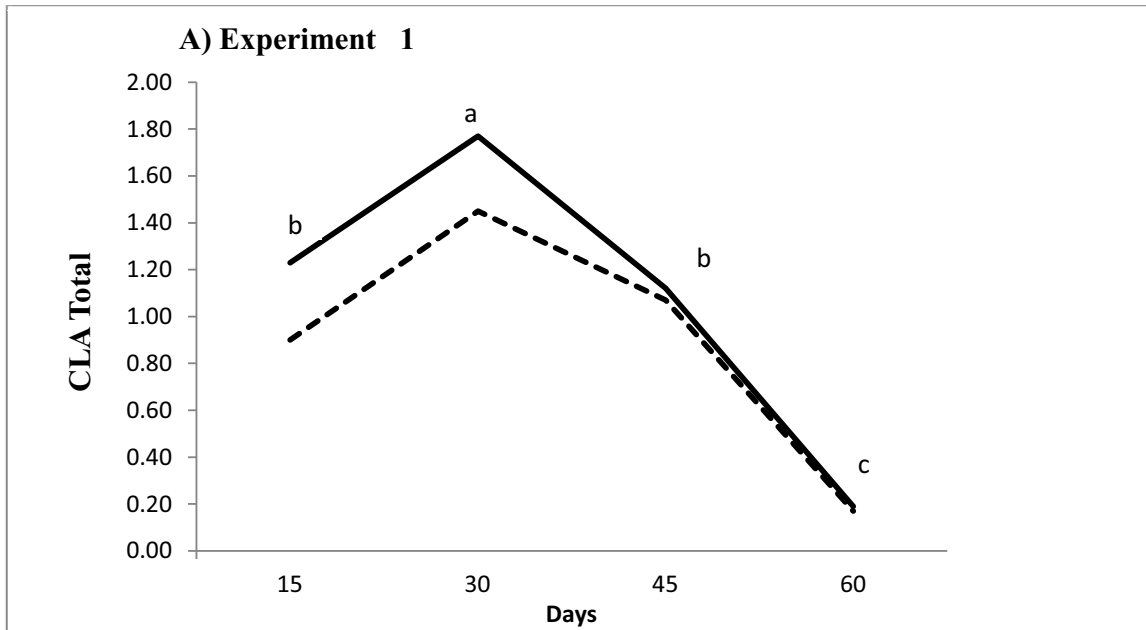
Metabolites	Treatments (dietary concentrates supplemented) ¹														
	Ex. 1					Ex. 2					Ex. 3				
	0TC1	0TC1	1.16TC1	1.16TC1	1.16TC1	0TC2	0TC2	1.2TC2	1.2TC2	1.2TC2	0TC3	0TC3	1.2TC3	1.2TC3	1.2TC3
Beg.	End	Beg.	End	Beg.	End	Beg.	End	Beg.	End	Beg.	End	Beg.	End	Beg.	End
Cholesterol(mmol L ⁻¹)	4.46	4.13	3.72	3.77	4.00	5.67	4.21	5.59	4.24	6.01	5.46	4.24	5.67	4.24	5.67
Albumin (g L ⁻¹)	32.3	34.6	35.9	49.1	34.5	42.8	36.0	39.1	36.0	49.5	45.2	42.4	42.8	42.4	42.8
Total protein (g L ⁻¹)	62.4	58.6	55.6	60.3	65.3	67.0	62.2	70.4	62.2	81.5	75.3	73.9	74.4	73.9	74.4
Calcium (mmol L ⁻¹)	1.96	2.01	1.82	2.22	1.17	1.13	2.14	1.84	2.14	3.84	3.74	3.22	3.33	3.22	3.33
Mg (mmol L ⁻¹)	1.10	1.61	0.73	0.31	1.13	1.55	0.91	1.02	0.91	1.71	1.22	1.22	1.82	1.22	1.82
Phosphorus (mmol L ⁻¹)	0.94	1.03	0.86	1.22	1.18	1.23	1.01	1.13	1.01	3.83	2.92	3.23	3.54	3.23	3.54
AST ² (U L ⁻¹)	56.0	98.1	57.2	102.2	106.4	122.6	118.4	119.9	118.4	158.0	121.3	132.5	145.2	132.5	145.2
Urea (mmol L ⁻¹)	8.01	9.22	8.23	8.73	8.26	10.09	9.32	11.05	9.32	5.88	6.27	5.24	4.65	5.24	4.65

3 ¹ See Tables 1, 2 and 3. Ex. 1: experiment 1; Ex. 2: experiment 2; Ex. 3: experiment 3. Beg.: Beginning. For all the metabolites evaluated no4 significant differences were observed among treatments ($p>0.05$)5 ² Aspartate aminotransferase

6

1 **Figure 1.** Temporal patterns of the content of conjugated linoleic acid (CLA) total (g/100g total fatty
 2 acids) in the milk of Chilean Black Friesian cows supplemented with canola seed. Experiment 1:
 3 control group without canola seed (□□); treatment group to which commercial concentrate plus 1.16
 4 kg of whole canola seed were provided (□ □). Experiment 2: control group without canola seed (□□);
 5 treatment group to which commercial concentrate plus 1.2 kg of ground canola seed were provided (□
 6 □). Experiment 3: control group without canola seed (□□); treatment group to which commercial
 7 concentrate with 20% of whole canola seed were provided (1.2 kg). (□ □). The mean values for each
 8 date were compared, and those with the same letter do not differ ($p>0.05$).

9

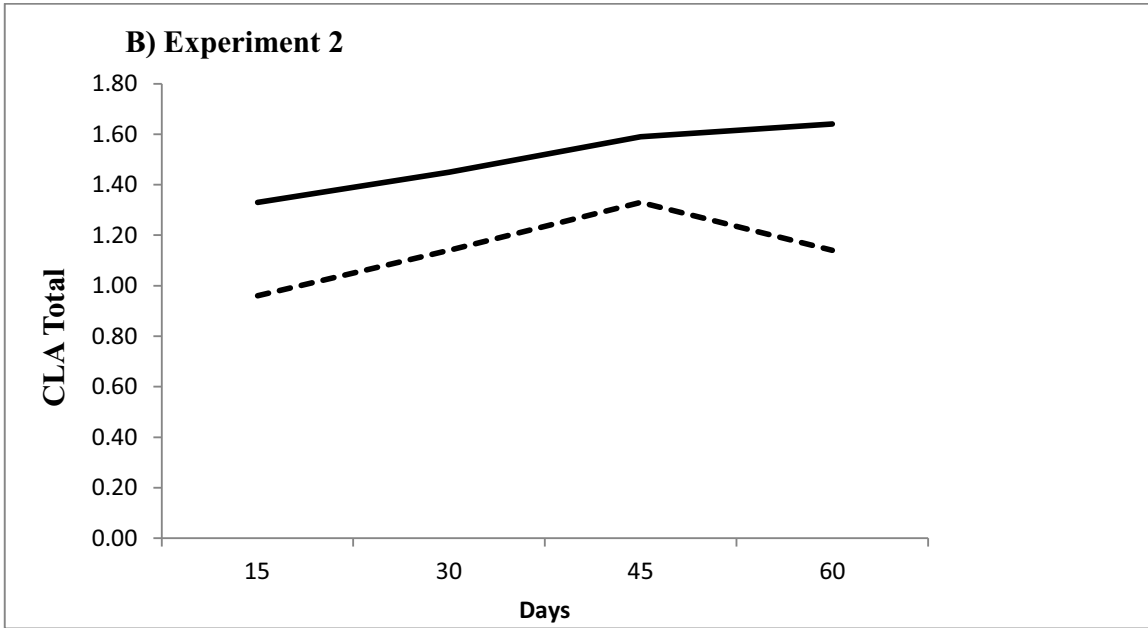


10

11

12

1

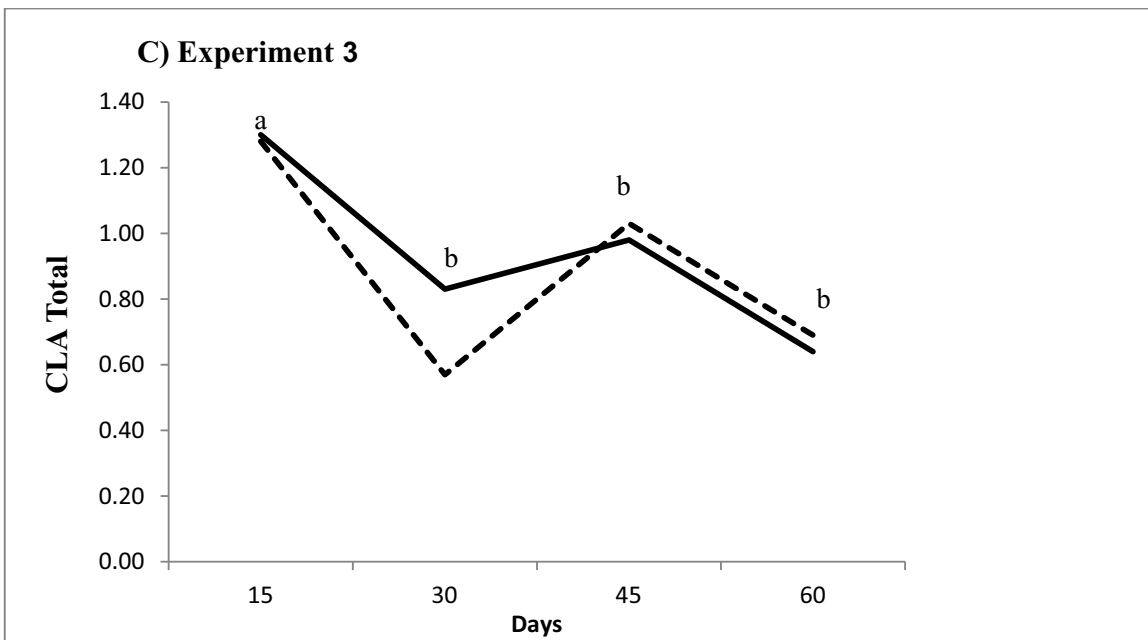


2

3

4

5



6