

**EFFECTS OF FEEDING DIFFERENT VEGETAL FAT SOURCES TO INCREASE  
CONJUGATED LINOLEIC ACID IN MILK OF SMALL RUMINANTS AND  
INTERACTION WITH FIBROLYTIC ENZYMES**

**EFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE GRASA VEGETAL  
PARA INCREMENTAR EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN LECHE DE  
PEQUEÑOS RUMIANTES E INTERACCIÓN CON ENZIMAS FIBROLÍTICAS**

**Tesi doctoral presentada per  
M. Amine Bouattour**

**Dirigida per  
Dr. Ramon Casals i Costa**

**Per a accedir al grau de Doctor en el Programa de Producció Animal de la**

**Universitat Autònoma de Barcelona,  
Departament de Ciència Animal i dels Aliments**

**Bellaterra, Febrer 2007**

**Ramon Casals i Costa**, professor titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifica:

Que la memòria titulada “**Effects of feeding different vegetal fat sources to increase Conjugated Linoleic Acid in milk of small ruminants and interaction with fibrolytic enzymes**” presentada per M. Amine Bouattour per a optar al grau de Doctor en Producció Animal, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la conclosa, autoritza la seva presentació per que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I per que així consti, signa la present a Bellaterra el dia 1 de febrer de 2007.

Dr. Ramon Casals i Costa

L'autor d'aquesta memòria ha gaudit d'una beca de 3 anys de la Agència Espanyola de Cooperació Internacional des de l'octubre de 2004 fins al setembre del 2006.

La realització d'aquest treball fou possible gràcies al projecte CICYT AGL2001-2617 del Ministeri de Ciència i Tecnologia.

Celui qui prendrait ce que j'écris pour la vérité serait peut-être moins dans l'erreur que celui  
qui le prendrait pour une fable.

Denis Diderot, *Jacques le Fataliste*

No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un  
camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.

Paulo Coelho, *El peregrino de Compostela*

À ma chère famille,

À mes très chers parents pour leurs sacrifices, patience, générosité et proximité,  
Vous qui nous avez appris l'importance du savoir,  
Vous qui avez tout donné afin que nous arrivions au plus haut,  
C'est bien grâce à vous que ce jour est arrivé et que la récolte commence,  
Vous avez bien réussi !

A ma sœur et mon frère, ma grande source de patience, de courage et d'espoir,  
C'est à vous que je dois la force de volonté des moments difficiles,  
Merci pour la relation de fraternité spéciale et exceptionnelle qui nous unit,  
Et surtout ne changez jamais !

Trouvez dans ces quelques lignes ma profonde reconnaissance et gratitude,

Je vous adore !

### Amine

---

---

---

*Agradecimientos*

---

---

He esperado mucho este momento, no sólo durante los últimos cuatro años, sino desde el primer día que salí de casa con tres añitos de edad y con la merienda en mi mochila. Era mi primer día en la guardería, mi madre cuenta que lloró entonces porque para ella mi lucha diaria comenzaba, pues 26 años después puedo confirmarlo. En realidad, les debo mucho a mis padres, ellos que me han hecho creer firmemente en el valor del trabajo y en que lo importante no es hacer algo que nos guste, sino querer lo que hacemos y volcarnos en ello. Les debo también todo el sacrificio e interés que no han cesado de demostrar durante todos estos años, una contribución muy importante para la formación de cualquier persona, tal vez lo más valioso.

Después de todo lo dicho, llega una de las tareas que más me cuestan, agradecer, y no es por falta de mérito de las personas que citaré, ni mucho menos, sino es por temor a olvidarme de algunos o no saber como expresarles debidamente mi reconocimiento a los que citaré. En cualquier caso, como primer paso quiero dirigir mi más sincera gratitud a todas aquellas personas, figuren aquí o no, que han contribuido de alguna u otra forma en mi llegada a este punto, cada uno por su parte y cada uno con su granito de arena.

A mi director de tesis, el Dr. Ramon Casals, por aceptar dirigirme y por todo lo que es, una persona excelente y un jefe de lo mejor que se puede tener, su paciencia, respeto y buen trato son lo que más ayudan, y me han ayudado muchísimo a sentirme bien y llevar a cabo mis tareas con mucha comodidad.

A los profesores de la Unitat de Producció Animal, por la simpatía y el buen trato que siempre he gozado.

A los diferentes integrantes del Servei de Granges experimentals como del Laboratori de Producció Animal, por estar siempre dispuestos a echar una mano. Sin olvidar los/las alumnos/as que me han ayudado en el trabajo experimental, Carles, Monica, Núria, Marta y Deborah.

Volviendo al pasado, mi reconocimiento va a todos los profesores del INAT a los que debo buena parte de mi formación, así como a mis compañeros *les INATiens* por los años inolvidables y la amistad tan profunda que nos une, especialmente agradezco a Samia, Hanéne, Olfa, Bassem, Gader, Anis, por nuestra gran amistad.

Al personal del IAMZ por un primer año excelente y un aterrizaje muy cómodo, así como a la peña de Zaragoza, actualmente ya repartidos por el mundo, por la multiculturalidad y las amistades que espero que sigan por mucho tiempo más.

Ahora sí, de nuevo en Barcelona, agradezco a mis compañeros de la lucha, tanto en Producció Animal como fuera, a Glauber, Vinz, Paul, Mario, Toni, Ana, Begoña, M. Carmen,

Diego, Ahmed, Cristobal, Irene, Nuno, Aida, Faust, Cristina, Feliu, Betty, Pedro y Montse, desde aquí mucho ánimo tanto para los que les queda poco como para los que están empezando. Agradezco especialmente a los que pasaron a ser algo más para mí, Marta, Roser, Martha Liliana, Luciano, Elier y Vanesa, gracias por la amistad y por hacerme sentir como en casa. A mi querida compañera de piso Ruby por aguantarme durante estos años de convivencia. También a los tunecinos, tanto a los de origen como a los de adopción, por ser como son, Ali, Aymen, Cristina, Sahar, Hedia, y en especial a Ghizlen, así como a mi querido hermano Kais.

A la que apareció sin avisar, cambió mi rumbo y mis planes y me considero muy afortunado por haberla conocido, estoy seguro que la vida nos seguirá sonriendo cada día más y que el destino seguirá a nuestro lado, a María Català.

Finalmente, a Catalunya, un país increíble y precioso y a su gente, muy especial y magnífica. Me considero totalmente enamorado de esta tierra, y si no fuera por las complicaciones de la Europa de los papeleos, sería mi segunda tierra. Le deseo toda la prosperidad y el progreso del mundo y *Endavant Catalunya*.

---

---

*Lista de abreviaciones*

---

---

**AA:** aminoácidos.

**ADF:** acid detergent fiber.

**AG:** ácidos grasos.

**AGCC:** ácidos grasos de cadena corta.

**AGCL:** ácidos grasos de cadena larga.

**AGCM:** ácidos grasos de cadena media.

**AGMI:** ácidos grasos monoinsaturados.

**AGPI:** ácidos grasos poliinsaturados.

**AGV:** ácidos grasos volátiles.

**BCS:** body condition score.

**BW:** body weight.

**CLA:** conjugated linoleic acid.

**CN:** caseinic nitrogen.

**CP:** crude protein.

**CSFA:** calcium soap of fatty acids.

**DMI:** dry matter intake.

**ECM:** Energy corrected milk.

**FAD:** fibra ácido-detergente.

**FND:** fibra neutro-detergente.

**IMS:** ingestión de materia seca.

**JC:** jabones cálcicos.

**LC:** Lacaune.

**LCFA:** long chain fatty acids.

**MCFA:** medium chain fatty acids.

**MN:** Manchega.

**MO:** materia orgánica.

**MS:** materia seca.

**MUFA:** monounsaturated fatty acids.

**NDF:** neutral detergent fiber.

**PB:** proteína bruta..

**PUFA:** polyunsaturated fatty acids.

**PV:** peso vivo.

**RA:** rumenic acid.

**SCFA:** short chain fatty acids.

**TMR:** total mixed ration.

**TVA:** trans vaccenic acid.

---

---

*Resúmenes*

---

---

## Resumen

La presente Tesis Doctoral se llevó a cabo con el objetivo principal de estudiar la posibilidad de mejorar la calidad nutritiva de la leche de oveja y de cabra, y en particular la concentración de ácido linoleico conjugado (CLA) mediante la incorporación de diferentes fuentes de lípidos vegetales a la ración. Al CLA se le atribuyen varios efectos beneficiosos para la salud humana, y entre otras, propiedades anticancerígenas, antidiabetes y antiobesidad. La parte experimental de esta tesis consta de 4 capítulos, con 5 ensayos experimentales realizados, utilizando un total de 110 ovejas y 24 cabras lecheras a fin de responder a los objetivos experimentales.

El primer capítulo hace referencia a un experimento realizado para investigar los efectos de la utilización de Semillas Enteras de Lino (WLS) o de Aceite de Lino (LSO) en la ración de ovejas lecheras sobre la producción y composición de leche, así como el perfil de ácidos grasos (AG) de leche y queso, en comparación con una ración isoenergética conteniendo jabones cárnicos de aceite de palma (CSFA). Treinta ovejas de raza Lacaune fueron distribuidas en 3 lotes de 10 animales cada uno. El diseño experimental fue un cuadrado latino 3 x 3 (periodos de 20 d). Las ovejas recibieron una ración con un 53% forraje, 43.6% concentrado y 3.4% de cebada grano. Los tratamientos fueron (en % del concentrado): 1) C (control, 6% CSFA); 2) WLS (15%); y 3) LSO (5%). La ingestión de alimentos fue más alta en el grupo WLS, pero la producción de leche, la leche corregida por energía y las concentraciones de proteína y caseína no fueron afectadas por los tratamientos. Las concentraciones de grasa y de extracto seco aumentaron con LSO y tendieron al aumento con WLS. Ambos tratamientos con lino aumentaron la concentración de triglicéridos en sangre pero no afectaron el resto de parámetros sanguíneos. La concentración de AG de cadena corta no varió mientras que las de AG de cadena media y de AG saturados fueron más bajas, y las de AG insaturados y de cadena larga más altas en la leche de los tratamientos con lino. El ácido  $\alpha$ -linolénico aumentó más con la semilla que con el aceite, mientras que el CLA (ácido ruménico, RA) aumentó más con el aceite que con la semilla. En paralelo, el ácido *trans*-11 vaccénico (TVA) aumentó únicamente con el aceite. De manera general y salvo algunas diferencias en los AG de cadena corta, la composición en AG de quesos curados (60 días de maduración) fue similar a la de la leche del correspondiente tratamiento experimental.

En el segundo trabajo experimental se utilizaron 24 ovejas de raza Lacaune a partir de los  $49\pm7$  días de lactación para estudiar los efectos de la utilización de semillas enteras de cártamo (WSF) sobre la producción y composición de leche, así como sobre su perfil de AG, en particular CLA, en comparación con una ración isoenergética conteniendo CSFA. Las

raciones experimentales contenían una mezcla de 53% de forraje y un 47% de concentrado, al cual se añadieron o no las semillas de cártamo. Los tratamientos fueron: 1) Control (6% CSFA en el concentrado) y 2) WSF (16,3%). El experimento consistió en un diseño *crossover 2 x 2* (períodos de 20 d). La alimentación con WSF redujo la ingestión de alimentos, la producción de leche y la leche corregida. La proteína verdadera de la leche aumentó, mientras que las producciones diarias de grasa y proteína se redujeron debido a la menor producción de leche. En la leche producida por el grupo WSF, las concentraciones de AG de cadena larga y de AG insaturados fueron más altas, mientras que las de AG de cadena corta y de AG saturados fueron más bajas. Las concentraciones de CLA (RA) y de TVA en leche fueron mayores en el grupo WSF. Además, la semilla de cártamo redujo el ratio de AG saturados/insaturados así como el índice de aterogenicidad de la leche, aunque aumentó el ratio n-6/n-3.

En el tercer capítulo, se realizaron dos ensayos experimentales con el objetivo de estudiar los efectos de la inclusión del aceite de soja (SBO) y de un complejo de enzimas fibrolíticas (E) con actividad celulasa y xilanasa sobre la digestibilidad de los nutrientes de la ración (experimento 1) y la producción y composición de leche (experimento 2). La digestibilidad fue medida en un experimento *in vivo* con 8 ovejas de raza Manchega (MN) en secado en un diseño de bloques al azar (2 períodos de 20 d). Los tratamientos fueron: 1) C (control); 2) SBO (3% de la ración total); 3) E (Promote<sup>®</sup>, 2 ml/kg de la ración total); y 4) SBO+E. Las raciones consistieron en un 60% de forrajes (mezcla 1:1 de festuca y alfalfa deshidratadas) y un 40% de concentrado. Las enzimas se aplicaron al forraje el día antes de ser consumido. Cuando el aceite de Soja (SBO) se utilizó solo, incrementó la digestibilidad del extracto etéreo sin tener consecuencias sobre las digestibilidades de MS, MO y FND. El tratamiento con enzimas (E) incrementó las digestibilidades de MS, MO y FND. Sin embargo, cuando fueron utilizados conjuntamente (SBO+E) el aceite de soja redujo las digestibilidades de MS, MO y FND, siendo E incapaz de mejorar la digestibilidad de los nutrientes. Por lo tanto, el complejo E pareció ser inhibido por la presencia del aceite, y no permitió recuperar la perdida de digestibilidad causada por aquél. En el experimento de ordeño, 24 ovejas de raza MN y 24 de raza LC ( $49\pm7$  días de lactación) fueron distribuidas en 4 grupos de 6 animales por raza, y utilizadas según un cuadrado latino 4 x 4 replicado (periódos de 20 d) con tratamientos análogos a los de la prueba de digestibilidad. Las respuestas de las dos razas a los tratamientos experimentales fueron en general similares, a pesar de las diferencias observadas a nivel de producción entre ellas. La ingestión de alimentos no se vio afectada por los tratamientos. La adición de SBO incrementó la producción de leche, la de grasa exportada

en la leche, y la concentración de AG de cadena larga, pero redujo la producción de proteína verdadera, y los contenidos de caseína, y de AG de cadena media y de cadena corta en leche. Las concentraciones de ácido oleico, TVA, linoleico y CLA fueron más altas por efecto del aceite, con respuestas más evidentes en raza Lacaune que en Manchega. La adición de enzimas incrementó las producciones de leche y de proteína verdadera, pero disminuyó las concentraciones de grasa, proteína bruta y caseína de la leche.

El cuarto capítulo consistió en un experimento llevado a cabo con 24 cabras Murciano-Granadinas con el objeto de estudiar los efectos de la inclusión de aceite de soja en el concentrado de cabras lecheras sobre la producción y composición de leche, y su perfil de AG, especialmente de CLA y de TVA. El experimento consistió en un diseño *cross-over* con dos periodos (28 d cada uno) y dos tratamientos experimentales: C (control) y SBO (6% en el concentrado). Las cabras recibieron festuca deshidratada *ad libitum*, alfalfa peletizada (0,5 kg/d) y el concentrado experimental (1 kg/d), al cual se añadió o no el aceite. El contenido total de SBO en las dietas ingeridas fue de un 2,5% (del total de MS). No hubo ningún efecto sobre la ingestión de alimentos, la producción de leche, la leche corregida, el peso vivo y la condición corporal. La inclusión de SBO incrementó (10%) la grasa de la leche y el extracto seco sin afectar la proteína bruta ni la proteína verdadera, aunque redujo el contenido y la producción de caseína. La concentración de AG de cadena corta y media en leche se redujo, mientras que la de AG de cadena larga aumentó en el tratamiento con aceite. La ingestión de ácido linoleico a través del aceite aumentó las concentraciones de ácido linoleico, oléico y esteárico en leche. Como consecuencia, el aceite de soja redujo el ratio de AG saturados/insaturados así como el índice de aterogenicidad, aunque aumentó el ratio n-6/n-3. Comparado con el control, las concentraciones de CLA y TVA en la leche fueron triplicadas por efecto del aceite de soja.

En conclusión, los lípidos de origen vegetal incrementaron el CLA (ácido ruménico) y el ácido *trans-11* vaccénico, obteniéndose los incrementos más altos con la utilización de aceites vegetales, especialmente con aceite de soja en ovejas de raza Lacaune o en cabras Murciano-Granadinas. Por el contrario, las semillas enteras de lino permitieron un mayor aumento del ácido  $\alpha$ -linolénico, de tipo n-3. A la dosis utilizada, el aceite de soja no afectó la digestibilidad de la fibra, excepto cuando se combinó con enzimas fibrolíticas, en cuyo caso anuló el efecto positivo de las mismas sobre las digestibilidades de MS, MO y FND.

## Abstract

The present Doctoral Thesis was carried out to study the possibility of enhance the nutritive quality of sheep and goat milk using the incorporation of different sources of vegetal fat to the diet. Conjugated Linoleic Acid (CLA) is considered as functional foods because of its potential health benefits for human consumers such as anticarcinogenic and antidiabetic. The experimental part of the present thesis consist on 4 chapters containing a total of 5 experiments carried out with a total of 110 dairy ewes and 24 dairy goats in order to respond to the experimental objectives.

The first chapter consisted in an experiment performed to investigate the effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) to dairy ewes on lactational performance, and milk and cheese fatty acids profile and CLA content when compared with an isoenergetic diet containing CSFA. Thirty Lacaune dairy ewes were blocked in 3 pens of 10 animals, and used in a  $3 \times 3$  Latin square (20 d periods). Ewes were fed a diet with 53% forage, 43.6% concentrate, and 3.4% barley grain. Treatments were (in % of concentrate): 1) C (control, 6% CSFA); 2) WLS (15%); and, 3) LSO (5%). Feed intake was increased by WLS, but milk yield, ECM and milk protein and casein contents were unaffected by treatments. In contrast, true protein content was reduced. Milk fat and total solids content were increased by LSO and tended to be increased by WLS. Regarding blood metabolites, both linseed treatments increased triglycerides concentration but did not affect other blood parameters. Short chain fatty acids (FA) remained unchanged while medium chain and saturated FA were decreased and large chain and unsaturated FA (including mono and poly-unsaturated FA) were increased by WLS and LSO. Feeding WLS was more useful on increasing milk  $\alpha$ -linolenic acid content, while feeding LSO allowed a higher increase of rumenic acid. Similarly, *trans*-11 C18:1 (*trans* vaccenic acid or TVA), precursor of CLA, was only increased by LSO. Except for short chain FA, the FA profile of 60-d-old cheeses made from milk of the ewes receiving the experimental treatments was similar to the FA profile of the milk.

In the second study, a total of 24 Lacaune dairy ewes at  $49 \pm 7$  DIM were used to study the effects of adding whole safflower seeds (WSF) to the concentrate on dairy performance and Conjugated Linoleic Acid (CLA) in milk when compared with an isoenergetic diet containing CSFA. Ewes were allocated to two balanced groups and kept in two separate pens. Experimental diets contained a mixture of 53% forage and 47% concentrate, to which the WSF was or not added. Dietary treatments were (in % of concentrate): 1) Control (6% CSFA) and 2) WSF (16.3%). The experiment consisted of a 2x2 crossover design (20 days period). Feeding WSF decreased DMI, milk yield, energy corrected milk and milk conversion rate.

True protein content was increased and fat and protein yields were decreased by the WSF treatment, because of the milk yield depression. Feeding WSF increased concentrations of long chain and unsaturated FA, and decreased short chain and saturated FA. Concentrations of rumenic (*cis*-9, *trans*-11 CLA) and TVA acids in milk were increased in animals fed WSF. In addition, WSF reduced the saturated/unsaturated FA ratio and the atherogenicity index of the milk fat, but increased the ratio n-6/n-3 FA.

In the third chapter, two experiments were performed to study the effects of feeding soybean oil (SBO) and a fibrolytic enzyme complex (E) with cellulase and xylanase activities on nutrients digestibility (trial 1) and lactational performance of dairy ewes (trial 2). The digestibility of the diets was measured in a digestibility trial on 8 dry and open Manchega (MN) ewes in a randomized block design (two periods of 20 d). Dietary treatments were: 1) C (control); 2) SBO (3% of TMR on DM basis of TMR); 3) E (Promote<sup>®</sup>, 2 ml/kg TMR on DM basis); and, 4) SBO+E. Total mixed rations consisted of 60% forage (alfalfa and fescue dehydrated mixture, 1:1) and 40% concentrate. The fibrolytic enzyme complex was sprayed on the forage 24 hours before feeding. When used alone, feeding SBO increased ether extract digestibility without varying the DM, OM and NDF digestibilities, while the E treatment increased DM, OM and NDF digestibilities. In contrast, when fed together with the enzyme complex, SBO reduced digestibilities of DM, OM and NDF, being the enzyme supplement unable to reincrease nutrients digestibility. Therefore, in terms of digestibility, the E complex seemed to be inhibited by the presence of oil in the SBO+E diet. In a milking trial, 24 MN and 24 LC dairy ewes (49 DIM) were blocked in 4 pens of 6 ewes per breed, and used in a replicated 4 × 4 Latin square for periods of 20 d under similar experimental treatments than in the digestibility trial. Breed responses to SBO and E treatments were similar despite the differences of DMI and milk yield observed between breeds. Feed intake did not vary between treatments. The addition of SBO increased milk and milk fat yields, and long chain FA content, but decreased milk true protein yield, as well as contents of casein and medium and short chain FA. Milk FA variations were higher in Lacaune than in Manchega ewes. Oleic acid, TVA, linoleic acid and CLA were increased. Addition of enzymes increased milk and true protein yields, but decreased milk fat, CP and true protein, and casein contents.

The fourth chapter consisted in an experiment where a total of 24 Murciano-Granadina dairy goats milked once daily were used to study the effects of feeding soybean oil (SBO) on lactational performance and milk fatty acids (FA) content, particularly CLA and TVA. The experiment consisted of a two period (28 d each) crossover design with two dietary treatments: C (control) and SBO (6% as fed in the concentrate). Goats were fed dehydrated

fescue *ad libitum*, alfalfa pellets (0.5 kg/d), and experimental concentrate (1 kg/d), to which the SBO was or was not added. Final SBO content in the consumed SBO diet was 2.5% (dry matter basis). There was no effect of SBO on dry matter intake, milk yield, energy corrected milk, energy corrected milk conversion rate, BW, and BCS. Feeding SBO increased (10%) the milk fat content and yield as well as total solids content. SBO had no effect on milk crude protein and true protein contents, whereas it reduced milk casein content. Short and medium chain FA were reduced by SBO, while long chain FA increased. Feeding preformed linoleic acid trough SBO increased milk concentrations of linoleic, oleic and stearic FA, but reduced levels of linolenic and palmitic. As a consequence, feeding SBO reduced the saturated to unsaturated FA ratio and the atherogenicity index, but increased the n-6/n-3 FA ratio. Compared with the control, milk contents of *cis*-9, *trans*-11 CLA and TVA in the SBO treatment were almost triplicated.

In conclusion, vegetal fat increased CLA (rumenic acid) and TVA, being the highest increases obtained in the case of feeding vegetal oils, particularly when using soybean oil in Lacaune ewes or Murciano-Granadina goats. In contrast, whole linseed grains enhance better the  $\alpha$ -linolenic acid (n-3). Under the circumstances of our experiment, soybean oil did not affect fiber digestibility except when used together with the fibrolytic enzyme complex, in which case reduced DM, OM and fiber digestibilities.

## Résumé

La présente Thèse Doctorale a été réalisée avec l'objectif principal d'étudier la possibilité d'améliorer la qualité nutritive du lait de brebis et de chèvre, et en particulier son contenu en Acide Linoléique Conjugué (CLA) à travers de l'utilisation de différentes sources de lipides végétales dans l'alimentation. Le CLA est déclaré un aliment fonctionnel grâce à ces propriétés bénéfique à la santé humaines telles que son effet anticancérigène ou antidiabète entre autres. La partie expérimentale de cette thèse comporte 4 chapitres, avec 5 études expérimentaux réalisés avec un total de 110 brebis et 24 chèvres laitières afin de répondre aux objectifs expérimentaux.

Le premier chapitre a consisté en une expérience réalisée pour étudier les effets de l'utilisation des Graines Entières de Lin (WLS) ou de huile de lin (LSO) dans la ration de brebis laitières sur les performances productives et la composition en acides gras (AG) du lait et du fromage, en comparaison avec une ration iso- énergétique contenant des savons calcique de l'huile de palme (CSFA). Trente brebis de race Lacaune ont été distribuées en trois lots de 10 animaux chacun. Le model expérimental était un carré latin 3 x 3 (périodes de 20 j). Les brebis ont reçu une ration avec un 53% de fourrage, un 43.6% d'aliment concentré et un 3.4% de grains d'orge. Les traitements étaient (en % du concentré) : 1) C (contrôle, 6% CSFA); 2) WLS (15%); et 3) LSO (5%). L'ingestion d'aliments a été élevée pour le groupe WLS, mais la production de lait, le lait corrigé et les concentrations de protéine et caséines n'ont pas été affectées par les traitements. Les concentrations de matière grasse et de solides totaux ont augmenté avec le traitement LSO et il y a eu une tendance à l'augmentation avec WLS. Les deux traitements de lin ont augmentée la concentration de triglycérides dans le sang mais sans affecter le reste de paramètres sanguins. Les AG de chaîne courte n'ont pas varié, celle des AG de chaîne moyenne et des AG saturés a été moins élevée, et celle des AG insaturés et ceux de chaîne longue a été plus élevée dans le lait des traitements de lin (WLS et LSO). L'acide  $\alpha$ -linolénique a augmenté plus avec les graines qu'avec l'huile alors que le CLA (acide ruménique, RA) a augmenté plus avec l'huile qu'avec les graines. En parallèle, l'acide *trans*-11 vaccénique (TVA) a été uniquement augmenté par LSO. De façon générale, et à l'exception de quelques différentes pour les AG de chaîne courte, la composition en AG des fromages (60 j) a été semblable à celle du lait.

Dans le deuxième travail expérimental, 24 brebis laitières de race Lacaune à  $49 \pm 7$  j de lactation ont été utilisées pour étudier les effets de l'utilisation des graines entières de carthame (WSF) sur la production et la composition du lait, ainsi que sur son profil d'AG, en particulier CLA, en comparaison avec ration isoénergétique contenant CSFA. Les rations

expérimentales contenaient un mélange de 53% de fourrages et 47% d'aliment concentré, auquel les graines de carthame ont été ou non incorporées. Les traitements ont été : 1) Control (6% CSFA incorporé au concentré) et 2) WSF (16.3). L'expérience a consisté en un modèle *cross-over 2 x 2* (périodes de 20 j). L'alimentation avec WSF a réduit l'ingestion des aliments, la production de lait et le lait corrigé. La protéine vraie du lait a augmenté, alors que les productions quotidiennes de matière grasse et de protéine ont été réduites, à cause de la baisse de la production du lait. Dans le lait produit par le groupe WSF, les concentrations des AG de chaîne longue et des AG insaturés ont été plus élevées, alors celles des AG de chaîne courte et des AG saturés ont été moins élevées. Les concentrations de CLA (RA) et de TVA dans le lait ont été plus élevées dans le groupe WSF. De plus, les graines de Carthame ont réduit le ratio d'acide gras saturés/insaturés ainsi que l'index d'atherogénicité alors que le ratio n-6/n-3 a augmenté.

Dans le troisième chapitre, 2 expériences ont été réalisées avec l'objectif d'étudier les effets de l'inclusion de l'huile de soja (SBO) et d'un complexe d'enzymes fibrolytiques (E) avec une activité cellulase et xylanase sur la digestibilité des nutriments de la ration (expérience 1) ainsi que la production et composition du lait (expérience 2). La digestibilité des rations a été mesurée dans un essai expérimental de digestibilité *in vivo* sur 8 brebis de race Manchega (MN) sèches selon un modèle de blocs au hasard (2 périodes de 20 j). Les traitements ont été : 1) C (control); 2) SBO (3% de la ration totale); 3) E (Promote<sup>®</sup>, 2 ml/kg de la TMR totale); et 4) SBO+E. Les rations consistaient en un 60% de fourrages (mélange 1 : 1 de fétuque et luzerne déshydratées) et 40% d'aliment concentré. Les enzymes ont été appliquées au fourrage un jour avant d'être consommé. Quand SBO a été utilisé seul, il a augmenté la digestibilité de l'extrait éthéré sans avoir aucune conséquence sur les digestibilités de MS, MO et NDF. Le traitement E a augmenté les digestibilités de MS, MO et NDF. Cependant, quand ils ont été utilisés ensemble (SBO+E), l'huile de soja a réduit les digestibilités de MS, MO et NDF, tout en étant E incapable d'améliorer la digestibilité des nutriments. C'est à dire, en termes de digestibilités, le complexe E semble avoir été inhibé par la présence de SBO dans la ration SBO+E. Dans l'expérience de lactation, 24 brebis de race MN et 24 de race LC à 49 j de lactation ont été distribuées en 4 lots de 6 animaux pour chaque race, et utilisées dans un carré latin 4 x 4 répliqué (périodes de 20 j) avec les mêmes traitements que l'expérience de digestibilité. Les réponses des deux races aux traitements expérimentaux ont été similaires de façon générale, malgré les différences observées au niveau de la production entre elles. L'ingestion d'aliments n'a pas été affectée par les traitements. L'addition de SBO a augmenté la production de lait, celle de la matière grasse

exportée dans le lait, et la concentration d'AG de chaîne longue, mais elle a réduit la production de protéine vraie et les contenus en caséine, et d'AG de chaîne moyenne et de chaîne courte du lait. Les concentrations de l'acide oléique, TVA, acide linoléique et du CLA ont été plus élevée par effet de l'huile. L'addition d'enzymes a augmentée la production du lait et de la protéine vraie, mais elle a baissée la matière grasse, la protéine brute et la caséine du lait.

Le quatrième chapitre a consisté en une expérience réalisée avec 24 chèvres Murciano-Granadina avec l'objectif d'étudier les effets de l'inclusion d'huile de soja (SBO) dans le concentré de chèvres laitières sur les performances productives ainsi que la composition en AG, spécialement les concentrations de CLA et TVA. L'expérience a consisté en deux périodes (28 j chacun) selon le modèle *cross-over* avec deux traitements : 1) C (Control) et 2) SBO (6% dans le concentré). Les chèvres ont reçu de la fétuque déshydratée *ad libitum*, luzerne pelletisé (0,5 kg/j) et le concentré expérimental (1 kg/j), auquel l'huile a été ou non ajouté. Le contenu total de SBO dans les rations ingérées a été de 2,5% (du total de MS). Il n'y a eu aucun effet sur l'ingestion d'aliments, la production de lait, le lait corrigée, le poids vif et la note corporelle. L'inclusion de SBO a augmenté (10%) la matière grasse du lait et l'extrait sec sans affecter la protéine brute et la protéine vrai, malgré qu'elle ait réduite la protéine. Les AG de chaîne courte et moyenne ont été réduites par SBO, alors que la concentration des AG de chaîne longue a été augmentée. L'ingestion d'acide linoléique à travers SBO a augmentées les concentrations de l'acide linoléique, oléique et stéarique. Par conséquent, l'huile de soja a réduit le ratio des AG saturés/insaturés ainsi que l'indice d'athérogénicité, alors qu'il a augmenté le ratio n6-n3. En comparaison avec le contrôle, les concentrations de CLA et TVA dans le lait ont été triplées sous l'effet de l'huile de soja.

En conclusion, les lipides d'origines végétales ont augmenté le CLA (RA) et le TVA et les gains plus importants ont été obtenus avec l'utilisation d'huiles végétales, spécialement avec l'huile de soja chez les brebis de race Lacaune ou les chèvres de race Murciano-Granadina. Au contraire, les graines entières de lin ont permis le gain le plus élevé de l'acide  $\alpha$ -linolénique, du type n-3. A la dose utilisée, l'huile de soja n'a pas affectée la digestibilité de la cellulose, sauf lorsqu'il était combiné avec les enzymes fibrolytiques, dans ce cas il a annulé l'effet positif des enzymes sur les digestibilités de MS, MO et NDF.

---

---

*Índice*

---

---

I. Introducción general.....	1
II. Revisión bibliográfica.....	5
1. Los ácidos grasos en la leche de rumiantes.....	7
1.1. Origen.....	7
1.2. Clasificación.....	9
1.3. Introducción al CLA.....	10
2. Efectos beneficiosos del consumo de CLA.....	12
2.1. Efecto anticarcinógeno.....	14
2.2. Efecto sobre la aterosclerosis.....	16
2.3. Efecto antidiabético.....	18
2.4. Efecto sobre la relación músculo/grasa.....	18
2.5. Efecto sobre los adipositos.....	19
2.6. Efecto sobre el sistema inmunitario.....	20
2.7. Efecto sobre el sistema óseo.....	21
3. Biosíntesis del CLA.....	23
3.1. Biohidrogenación en el rumen.....	23
3.2. Síntesis en la glándula mamaria.....	25
4. Factores que afectan el nivel de CLA en leche.....	27
4.1. Factores fisiológicos.....	27
4.2. Tipo de alimento.....	29
4.2.1. Pasto.....	29
4.2.2. Ensilado.....	31
4.2.3. Concentrado.....	31
4.3. Suplementos lipídicos.....	32
4.3.1. Semillas de oleaginosas.....	32
4.3.2. Aceites vegetales.....	33
4.3.3. Aceites marinos.....	34
4.3.4. CLA.....	35
4.3.5. Lípidos protegidos.....	36
4.3.5.1. Jabones cárnicos.....	36
4.3.5.2. Lípidos encapsulados.....	37
4.3.6. Sebo.....	37
5. Resultados básicos de la utilización de lípidos en rumiantes.....	38
5.1. Producción de leche.....	38
5.2. Grasa de la leche.....	39
5.3. Perfil de AG de la leche.....	40
5.4. Proteína de la leche.....	42

5.5. Consumo de alimentos.....	44
5.6. Efectos no deseados.....	44
5.6.1. Digestibilidad de la fibra.....	45
5.6.2. Metabolismo del rumen.....	46
6. Uso de enzimas fibrolíticas en la alimentación de rumiantes.....	48
6.1. Objetivos.....	48
6.2. Fuentes de enzimas utilizadas.....	48
6.3. Vías de acción.....	49
6.4. Efectos sobre el alimento previos a la ingestión.....	50
6.5. Efecto a nivel ruminal e intestinal.....	51
6.6. Efecto sobre la digestibilidad de los alimentos.....	52
6.7. Resultados productivos en vacuno.....	53
6.8. Resultados productivos en pequeños rumiantes.....	55
7. Referencias bibliográficas.....	59
 III. Objetivos.....	81
 IV. Milk fatty acid composition and dairy performance of Lacaune sheep fed whole linseed or linseed oil with reference to Conjugated Linoleic Acid .....	85
Abstract.....	87
Introduction.....	88
Material and methods.....	90
Experimental design, animals and feeding.....	90
Measurement, sampling and analysis.....	90
Cheese making and analyses.....	92
Statistical analysis.....	93
Results and discussion.....	93
Feed intake and nutritive value of experimental diets.....	93
BW and BCS.....	94
Blood metabolites.....	94
Dairy performance.....	95
Fatty acids composition .....	96
Fatty acids composition of cheeses.....	99
Conclusion.....	99
References.....	100
 V. Effects of feeding whole safflower seeds to dairy ewes on dairy performance and Conjugated Linoleic Acid in milk.....	113

---

Abstract.....	115
Introduction.....	116
Material and methods.....	117
Experimental design, animals and feeding.....	117
Measurement, sampling and analysis.....	118
Statistical analysis.....	120
Results and discussion.....	120
Nutritive value of experimental diets and feed intake.....	120
BW and BCS.....	121
Blood metabolites.....	121
Dairy performance.....	122
Milk fatty acids.....	122
Conclusions.....	125
References.....	125
 VI. Effects of soybean oil and fibrolytic enzymes supplementation on nutrients digestibility and dairy performance of Manchega and Lacaune ewes.....	135
Abstract.....	137
Introduction.....	138
Material and methods.....	139
Animals, experimental design, and feeding.....	139
Measurement, sampling and analysis.....	140
Statistical analysis.....	142
Results and discussion.....	142
Nutritive value of feeds.....	142
Digestibility trial.....	142
Milking trial.....	144
Feed intake.....	144
Body weight .....	144
Milk yield .....	145
Milk composition.....	146
Milk fatty acids.....	147
Conclusions.....	149
References.....	150
 VII. Feeding Soybean Oil to Dairy Goats Increases Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk.....	162
Abstract.....	163

Introduction.....	164
Material and methods.....	165
Animals, feeding, and experimental design.....	165
Measurement, sampling and analysis.....	166
Statistical analysis.....	167
Results and discussion.....	168
Feed intake and nutritive value of final diets.....	168
BW and BCS.....	168
Dairy performance.....	169
Milk fatty acids.....	170
Conclusions.....	173
References.....	173
 VIII. Discusión general.....	185
 IX. Conclusiones.....	195

## Índice de tablas

### **Capítulo II**

<b>Tabla 4.1.</b> Concentración de CLA (RA, % del total de AG) en leche de vacas Frisonas bajo diferentes regímenes de alimentación.....	30
--	----

<b>Tabla 6.1.</b> Efectos productivos de la utilización de enzimas fibrolíticas en vacas lecheras.....	57
--	----

### **Capítulo IV**

<b>Table 1.</b> Feed ingredients of the experimental concentrates and diets containing or not whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) fed to dairy ewes.....	106
---	-----

<b>Table 2.</b> Chemical composition and nutritional values of experimental concentrates and diets containing whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) fed to Lacaune dairy ewes.....	106
---	-----

<b>Table 3.</b> FA composition of whole linseeds (WLS), linseed oil (LSO) and experimental concentrates and diets .....	107
---	-----

<b>Table 4.</b> Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) to Lacaune dairy ewes on DMI, BW and BCS.....	107
---	-----

<b>Table 5.</b> Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) on blood serum metabolites concentrations of Lacaune dairy ewes.....	108
--	-----

<b>Table 6.</b> Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) to Lacaune dairy ewes on milk production and composition.....	108
---	-----

<b>Table 7.</b> Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) on milk fatty acids methyl esters (FAME) concentrations in Lacaune dairy ewes milk.....	109
---	-----

<b>Table 8.</b> Effects of feeding whole linseed (WLS) and linseed oil (LSO) on fatty acids concentrations of cheese from Lacaune dairy ewes.....	111
---	-----

### **Capítulo V**

<b>Table 1.</b> Feed ingredients of the experimental concentrates and diets containing or not whole safflower grains (WSF).....	130
---	-----

<b>Table 2.</b> Chemical composition (% DM) and nutritional value of experimental concentrates and diets containing or not whole safflower grains (WSF).....	130
--	-----

<b>Table 3.</b> Fatty acids (FA) profile of whole safflower grains (WSF) and experimental concentrates and diets.....	131
---	-----

<b>Table 4.</b> Effects of feeding whole safflower grains (WSF) on DMI, BW and BCS of dairy ewes.....	131
---	-----

<b>Table 5.</b> Effects of feeding whole safflower grains (WSF) on blood metabolites concentrations in serum samples of Lacaune dairy ewes.....	132
---	-----

<b>Table 6.</b> Effects of feeding whole safflower grains (WSF) on milk production and composition of Lacaune dairy ewes.....	132
---	-----

---

<b>Table 7.</b> Effects of feeding whole safflower grains WSF on milk fatty acids profile of Lacaune dairy ewes milk.....	133
<b>Capítulo VI</b>	
<b>Table 1.</b> Feed ingredients of the experimental concentrates and diets of dairy ewes...	156
<b>Table 2.</b> Nutritional value of experimental concentrates and diets.....	156
<b>Table 3.</b> FA profile of the experimental diets containing or not soybean oil (SBO) or fibrolytic enzymes (E) fed to dairy ewes.....	157
<b>Table 4.</b> Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzymes (E) supplementation on nutrients digestibility (%) in dry MN dairy ewes.....	157
<b>Table 5.</b> Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzyme (E) supplementation on milk production and composition of Lacaune (LC) and Manchega (MN) dairy ewes..	158
<b>Table 6.</b> Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzymes (E) supplementation on milk fat FA composition.....	159
<b>Table 7.</b> Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzyme (E) on body weight and BCS of dairy ewes.....	160
<b>Capítulo VII</b>	
<b>Table 1.</b> Ingredients of the experimental concentrates containing or not soybean oil (SBO).....	178
<b>Table 2.</b> Chemical composition and nutritional value of forages, experimental concentrates and consumed diets (DM basis) of dairy goats, containing or not soybean oil (SBO).....	178
<b>Table 3.</b> Fatty acids (FA) content of forages, soybean oil (SBO), experimental concentrates and diets consumed by dairy goats.....	180
<b>Table 4.</b> Effects of feeding soybean oil (SBO) on body weight and body condition score in dairy goats.....	180
<b>Table 5.</b> Effects of feeding soybean oil (SBO) on DMI, and milk yield and composition of dairy goats.....	181
<b>Table 6.</b> Effects of soybean oil (SBO) supplementation on fatty acids (FA) composition of dairy goat milk.....	182

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema de la digestión de lípidos en el rumen.....	8
<b>Figura 2:</b> Esquema de la absorción de lípidos en el intestino delgado de los rumiantes.....	8
<b>Figura 3:</b> Síntesis de Novo de los AG y enzimas involucradas: ejemplo del acetato...	9
<b>Figura 4:</b> Diferencias geométricas y posicionales entre el ácido linoléico (C: C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12) y dos isómeros del CLA: el <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (A) y el <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (ácido ruménico; B).....	11
<b>Figura 5:</b> Posibles hipótesis sobre los efectos del CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 en los adipocitos y los preadipositos.....	20
<b>Figura 6:</b> principales vías de biohidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico en el rumen .....	24
<b>Figura 7:</b> Relación entre los niveles de CLA y de C18:1 <i>trans</i> -11 en la leche de vaca .....	25
<b>Figura 8:</b> Principales vías de la síntesis del TVA y del RA de la leche.....	26
<b>Figura 9.</b> Concentración de C18:2 no conjugados, C18:2 conjugados y C18:3 antes y después de la salida al pasto.....	31
<b>Figura 10.</b> Relación entre la ingestión de aceites marinos y la concentración de CLA en raciones a base de: ensilado de maíz; ensilado de maíz + heno; ensilado de hierba;ensilado de hierba + heno.....	35
<b>Figura 11.</b> Relación entre la ingestión de aceites marinos y la concentración de C18:1 en raciones a base de: ensilado de maíz; ensilado de maíz + heno; ensilado de hierba; ensilado de hierba + heno; heno.....	35
<b>Figura 12.</b> Concentraciones de TVA en los diferentes experimentos realizados.....	191
<b>Figura 13.</b> Concentraciones de CLA ( <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2) en los diferentes experimentos realizados.....	191

---

---

*I. Introducción General*

---

---

La leche es una fuente muy importante de nutrientes ricos en energía, en proteína de alta calidad y en minerales y vitaminas. La materia grasa es la que más contribuye al contenido energético y es una fracción que influye en gran parte sobre las propiedades físicas, las características de procesado y la calidad organoléptica de la leche y de los productos lácteos. La grasa de la leche supone, por otro lado, el mayor coste en la producción de leche y es una fracción determinante de la productividad y del rendimiento lechero. Además, de todos los componentes principales de la leche, la materia grasa es la fracción más variable y su síntesis es afectada por varios factores, especialmente nutritivos y ambientales (Palmquist et al., 1993; Doreau et al., 1999; Bauman et al., 2001).

La leche y los productos lácteos suministran entre el 25% y 60% de los lípidos saturados consumidos por los europeos, lo cual ha convertido la grasa de la leche en diana de muchas críticas. Durante la última década, sin embargo, esta idea negativa que tenía el consumidor de la grasa de origen animal ha ido cambiando después de descubrirse que algunos ácidos grasos (AG) saturados no son necesariamente aterogénicos, como es el caso del ácido esteárico, que los AG que son aterogénicos lo son exclusivamente en el caso de ingerir cantidades excesivas, y que varios AG insaturados poseen propiedades positivas para la salud humana (Chilliard et al., 2006).

A raíz de estudios sobre el papel biológico de los diferentes AG, que permiten relacionar varios de ellos con funciones biológicas muy específicas en el organismo humano, ha habido un creciente interés por mejorar el impacto de los lípidos lácteos sobre la salud, tratando de diseñar una fracción lipídica cada vez más adaptada para responder a las necesidades dietéticas del consumidor. Este hecho es de extrema importancia dado el papel crucial de los alimentos tanto en el desarrollo como en la prevención de varias enfermedades. El término “alimentos funcionales” (en inglés *functional foods*) fue utilizado para describir ciertos alimentos o nutrientes que tienen efectos beneficiosos sobre la salud más allá de su valor nutritivo convencional (Milner et al., 1999), y entre ellos se encuentra el ácido linoleico conjugado o CLA.

El término CLA, correspondiente a la terminología inglesa *Conjugated Linoleic Acid*, se refiere a un grupo de isómeros del ácido linoleico cuya estructura puede variar según la posición *cis* o *trans* de sus dobles enlaces y la posición de los mismos en la cadena de

carbono. Aunque la denominación inglesa es la más extendida, se ha traducido eventualmente al castellano con el nombre de CAL o conjugados del ácido linoleico (Álvarez-Nogal (2004). El término conjugado hace referencia a que los dos carbonos que tienen doble enlace están únicamente separados por un carbono. El grupo del CLA esta compuesto por un total de 28 isómeros descubiertos hasta el momento, aunque teóricamente pueden existir más de diez isómeros posicionales diferentes y 4 isómeros geométricos, por lo que hay más combinaciones posibles. El isómero más destacado del CLA tanto desde el punto de vista cuantitativo como de efectos sobre la salud humana es el *cis*-9, *trans*-11 C18:2. Este isómero se encuentra de forma natural en la leche de rumiantes, y puede sintetizarse tanto en la glándula mamaria como en el rumen de los mismos, por lo que también recibe el nombre de ácido ruménico.

Más allá de la variedad de isómeros del CLA, solo en algunos de ellos se han comprobado científicamente efectos beneficiosos para la salud, básicamente en modelos animales. El ácido ruménico tiene efecto anticancerígeno, aún en concentraciones muy bajas, reduciendo la incidencia de tumores mamarios y/o inhibiendo su crecimiento. Además se le atribuyen, entre otros, efectos antiaterogénicos, así como la prevención de enfermedades cardiovasculares (Ip et al., 1991; McGuire y McGuire, 2000). Otro efecto del CLA, específicamente del isómero *trans*-10, *cis*-12 C18:2, el segundo en importancia en la leche de vacuno, sería modificar el reparto de la energía en el organismo. En este sentido contribuiría a reducir la deposición de grasas (Pariza et al., 1996), por que se le atribuyen efectos contra la obesidad. A su vez, aunque no se saben aún con precisión y exactitud cuales son los isómeros responsables ni el grado de la aplicación de los resultados a sujetos humanos, los isómeros del CLA actuarían contra la diabetes (Delury et al., 1999), fomentarían el buen funcionamiento del sistema inmunitario (Song et al., 2005) y mejorarían la absorción de calcio y la formación del sistema óseo.

La presencia de CLA en la alimentación humana tiene que ver mayoritariamente con productos de rumiantes. Por esta razón es importante conocer las vías metabólicas de su biosíntesis en rumiantes así como los factores que pueden modificarla, con especial énfasis en la alimentación de los animales. Los estudios disponibles hasta el momento se han desarrollado sobre todo en vacuno, mientras que la disponibilidad de información sobre alimentación y CLA en leche de ovino y caprino es más limitada.

---

---

***II. Revisión Bibliográfica***

---

---

## 1. LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE DE RUMIANTES

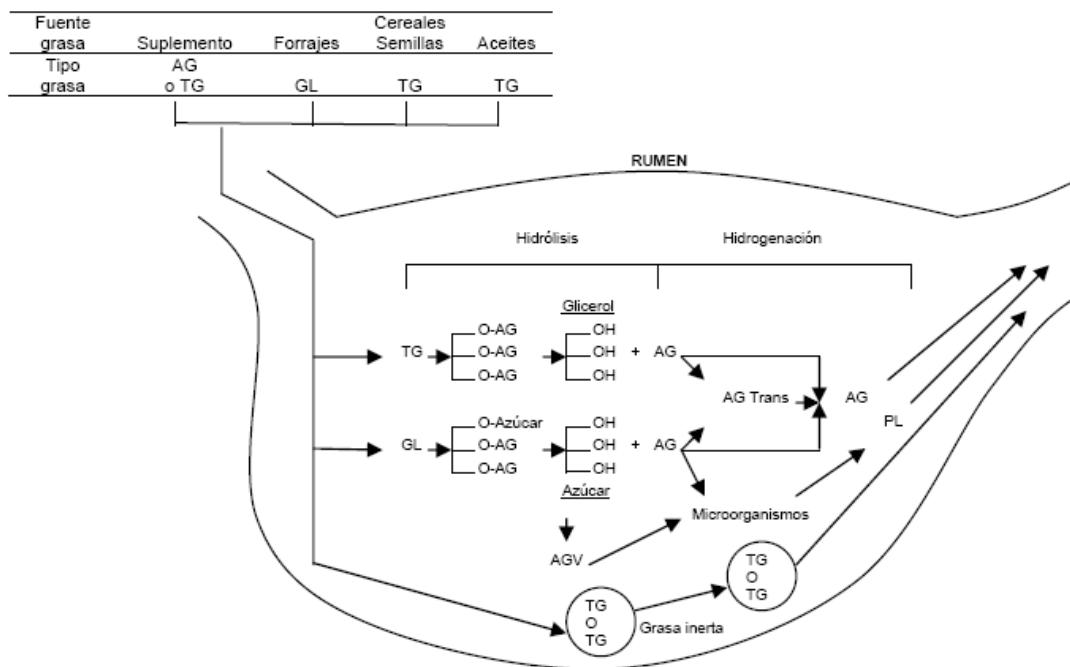
Varios factores pueden llegar a modificar la composición de la leche, de entre los cuales podemos mencionar la especie animal, así como factores fisiológicos y ambientales (Grummer, 1991). Entre los factores ambientales, la alimentación es, sin lugar a duda, el factor predominante (Bauman y Griinari, 2001). De forma general, la leche contiene lípidos, proteínas, lactosa, minerales y vitaminas. Sin embargo, nos centraremos en los ácidos grasos (AG), componente básico de los lípidos.

La complejidad de la grasa de la leche se debe al hecho de que contiene más de 400 AG diferentes (Bauman *et al.*, 2001). Según Hermansen (1995), este número sería aún más alto, pudiendo llegar hasta 500, de los cuales sólo de 15 a 20 han sido estudiados. En los primeros estudios (Bloor, 1943), se habló de sólo 11 AG que poseían cierta importancia tanto en animales como en humanos.

Los AG de la leche aparecen en forma de triglicéridos que consisten en tres AG asociados a una molécula de glicerol (Figura 1). Los triglicéridos representan entre el 95 y el 98% del total de la grasa de la leche, y la mayoría de ellos tienen AG que pueden contener de 4 a 18 átomos de carbono. En la sangre, una parte mínima de los AG es convertida a fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, mono y diglicéridos, y el resto quedan bajo forma de AG libres (Bauman *et al.*, 2001).

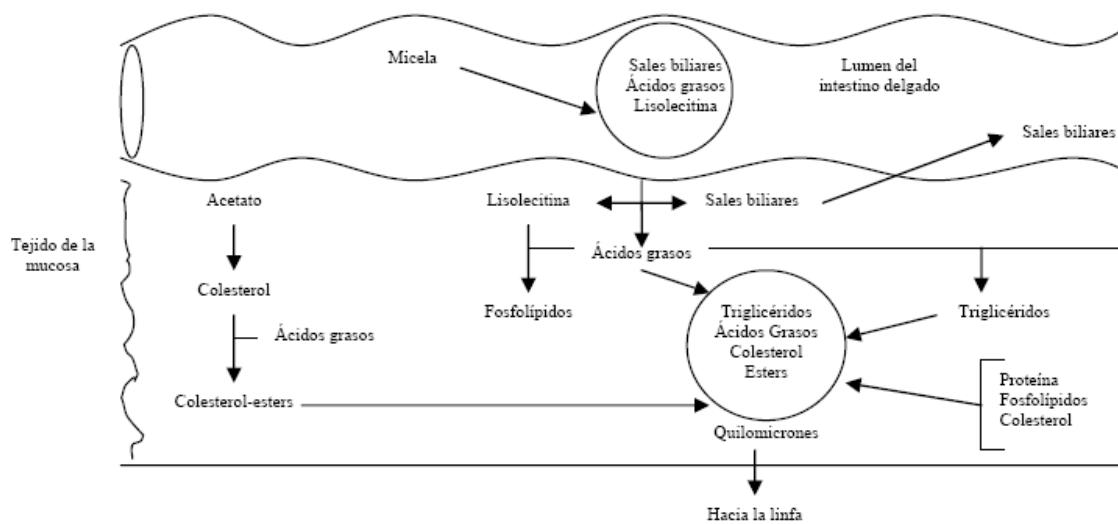
### 1.1. Origen

Los ácidos grasos de la leche tienen dos orígenes: pueden provenir de los AG transportados por el plasma sanguíneo (60%), básicamente de origen alimenticio, o son sintetizados *de novo* (40%) en la glándula mamaria (Chilliard *et al.*, 2001a). Los lípidos provenientes del alimento son rápidamente hidrolizados en el rumen para producir glicerol y AG libres (Figura 1), siendo el glicerol transformado ulteriormente en ácidos grasos volátiles (AGV). En el rumen, los AG libres sufren un proceso de biohidrogenación por la acción de isomerasas y reductasas, tal como se detalla más adelante (apartado 3.1). Las enzimas isomerasas transforman los enlaces etilénicos (dobles) de la forma *cis* a la forma *trans*, mientras que las reductasas saturan estos enlaces (Sauvant y Bas, 2001) añadiendo unidades de hidrógeno.



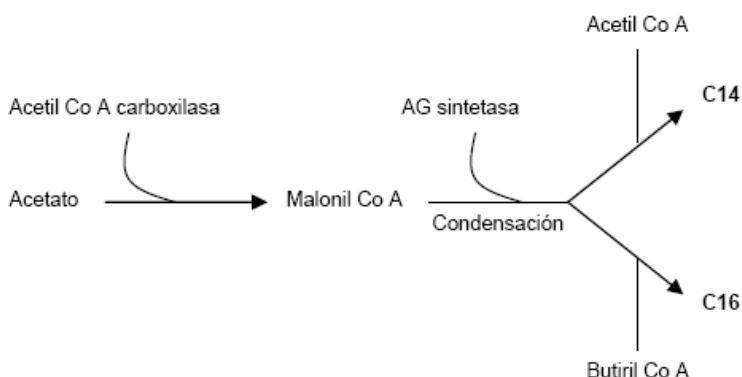
**Figura 1:** Esquema de la digestión de lípidos en el rumen (GL: glicolípidos; TG: triglicéridos; AGV: AG volátiles).

A la salida del rumen, los AG libres y los triglicéridos, una vez descompuestos estos últimos por las lipasas pancreáticas, son absorbidos en el intestino delgado, concretamente a nivel del yeyuno, y pasan al plasma sanguíneo (Figura 2). Los AG libres circulan en el plasma bajo la forma de AG no esterificados (AGNE o NEFA) o bien de lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad: VLDL). Los AG liberados a partir de los triglicéridos llegan a la glándula mamaria tras sufrir en la sangre la acción de la lipoproteína lipasa que se encarga de hidrolizar los triglicéridos del plasma sanguíneo.



**Figura 2:** Esquema de la absorción de lípidos en el intestino delgado de los rumiantes

La síntesis *de novo* de los AG de la leche (básicamente del C10 hasta el C16) tiene como origen el acetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato, ambos provenientes de los AGV producidos en el rumen. Hay básicamente dos enzimas involucradas en esta síntesis: la primera es la Acetil CoA Carboxilasa que cataliza la formación del malonil CoA a partir del acetato, la segunda es la AG sintetasa que cataliza la condensación del malonil CoA con el acetil CoA o el butiril CoA, dependiendo del sustrato de origen (acetato o  $\beta$ -hidroxibutirato). La condensación continúa (Figura 3) hasta formar AG de 14 y 16 átomos de carbono (Chilliard *et al.*, 2001a).



**Figura 3:** Síntesis de Novo de los AG y enzimas involucradas: ejemplo del acetato (adaptado de Chilliard *et al.*, 2001a)

## 1.2. Clasificación

De manera general, los AG se pueden clasificar en diversas categorías atendiendo a diferentes criterios como la longitud de cadena, su origen o bien el grado de saturación. La clasificación según la longitud de cadena o número de átomos de carbono fue establecida por Bloor (1943) en tres categorías:

- AG de cadena corta (AGCC o SCFA), de 4 a 6 carbonos;
- AG de cadena media (AGCM o MCFA), de 8 a 14 carbonos;
- AG de cadena larga (AGCL o LCFA), de 16 a 24 carbonos.

Otra clasificación es la que tiene que ver con el grado de saturación de los AG, clasificándose como saturados, si no tienen dobles enlaces, o insaturados, si los tienen. Los AG insaturados pueden ser mono-insaturados (AGMI o MUFA) o poli-insaturados (AGPI o PUFA), dependiendo del número de dobles enlaces que hay en la cadena de carbonos. Los MUFA tienen solamente un doble enlace mientras los PUFA tienen al menos dos. La leche de

rumiantes contiene en torno a un 4-5% del total de AG en forma de PUFA, siendo los más importantes el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3), un 21-25% de MUFA, siendo el más abundante el ácido oleico (C18:1) y un 70-75% de AG saturados, siendo los más importantes desde el punto de vista nutritivo el palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0).

En el caso de ser insaturado, cada ácido graso puede tener una cierta forma de configuración geométrica: *cis* o *trans*. Estas diferentes formas se llaman isómeros. La forma *cis* posee a nivel del doble enlace los dos átomos de carbono en la misma orientación, mientras que en la forma *trans* estos dos átomos tienen orientaciones contrarias. Esta isomerización afecta el punto de fusión en el sentido que es más alto en el caso de la forma *trans* (Masanori, 2002). Por otro lado, la mayoría de AG de tipo *trans* son considerados negativos para la salud humana, salvo algunas excepciones como el *trans*-11 C18:1 o *trans* vaccénico (TVA; Shingfield *et al.*, 2005).

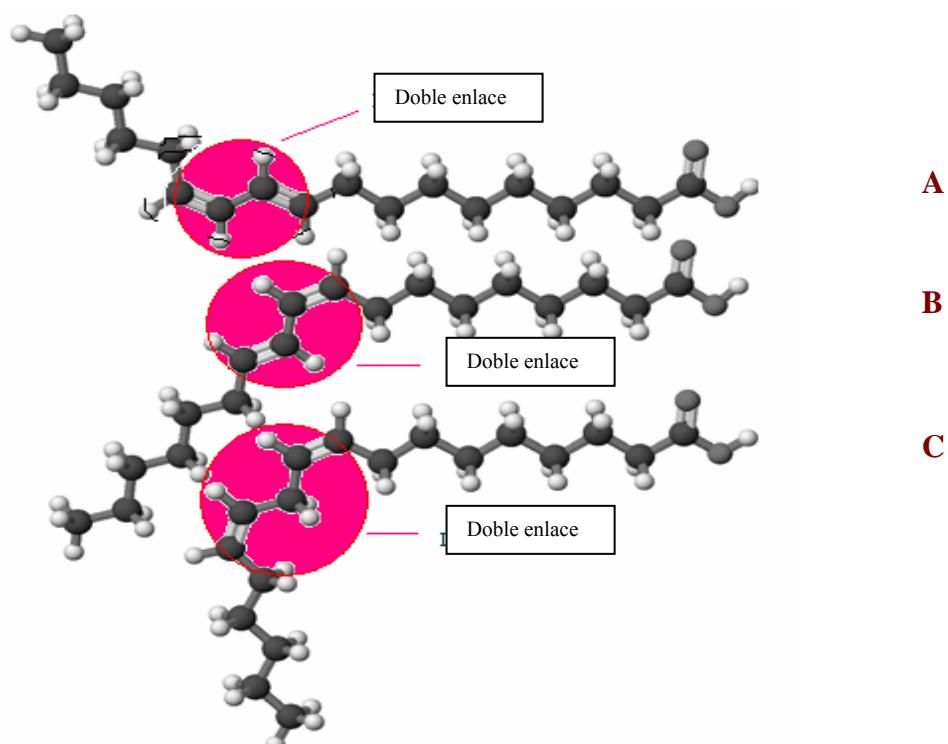
Entre las razones que justificarían el efecto beneficioso de la dieta mediterránea sobre la salud humana, básicamente por ser rica en frutas, verdura y aceite de oliva, estarían los MUFA y en especial el ácido oleico proveniente del mismo. Sus efectos se resumirían básicamente en la reducción del tejido graso y de la obesidad (Schroder *et al.*, 2004). Por otro lado los ácidos grasos esenciales (el ácido linoleico y el ácido linolénico, n-6 y n-3 respectivamente), llamados así por su importancia en el metabolismo de los lípidos en el organismo humano, constituyen otro factor clave de este efecto beneficioso. Sin embargo, el desarrollo de las características organolépticas de los derivados de la leche está directamente relacionado con los AG libres, especialmente los AG libres entre C6:0 y C9:0, y más específicamente con los C9 y C10 volátiles ramificados como los 4-metil- y 4-etil-C8, que son más abundantes en la grasa de leche de pequeños rumiantes que en la de vaca (Chilliard *et al.*, 2003).

### 1.3. Introducción al CLA

De forma general, en esta revisión nos centraremos en estudiar una clase particular de PUFA: el ácido octadecadienoico (*octadeca*: 18 C; *dien*: 2 dobles enlaces) y en especial sus isómeros conjugados. El ácido octadecadienoico es comúnmente llamado ácido linoleico y forma parte de los llamados n-6 o bien ω6 refiriéndose al número de carbonos que restan después del segundo doble enlace. El término CLA (ácido linoleico conjugado o conjugados del ácido linoleico) hace referencia a un conjunto de isómeros del ácido linoleico cuya estructura química varía según la configuración de los dobles enlaces (*cis* y *trans*) y su posición en la

cadena carbonada. El término conjugado se refiere a que solo un enlace simple separa los dos dobles enlaces. A este grupo del CLA pertenecen unos 28 isómeros, aunque en la práctica los más importantes, al menos en leche de vaca, son el *cis*-9, *trans*-11 y el *trans*-10, *cis*-12.

La presencia de AG conjugados fue observada por primera vez en la grasa de leche de vacas en pastoreo durante la primavera (Booth *et al.*, 1935). El isómero más destacado del CLA, tanto desde el punto de vista cuantitativo como de efectos sobre la salud humana, es el *cis*-9, *trans*-11 C18:2. Este isómero es el más abundante de los del grupo CLA en la leche de rumiantes, y se conoce también como ácido ruménico (RA; Kramer, 1998), dado que aparece en el rumen como un intermediario en la biohidrogenación de algunos AG y en particular del ácido linoleico. El RA fue el primero en ser descubierto (Parodi, 1977) y representa entre el 75 al 85% de los CLA totales en la grasa de la leche de vaca (Piperova *et al.*, 2004), entre el 78 y el 89% en la leche de oveja (Antongiovanni *et al.*, 2004), y un  $64\% \pm 0,21$  (Nudda *et al.*, 2006) en leche de cabra. También se ha prestado atención en vacuno al *cis*-7, *trans*-9 y al *trans*-10, *cis*-12. Sin embargo, teóricamente pueden existir más de diez diferentes isómeros posicionales (8-10; 11-13 etc...) y 4 isómeros geométricos (*cis-cis*; *cis-trans*; *trans-cis* y *trans-trans*; Sehat *et al.*, 1998). La figura 4 muestra las diferencias geométricas y posicionales entre el ácido linoleico y 2 isómeros de CLA (Pariza *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Diferencias geométricas y posicionales entre el ácido linoleico (C: C18:2 *cis*-9, *cis*-12) y dos isómeros del CLA: el *trans*-10, *cis*-12 (A) y el *cis*-9, *trans*-11 (ácido ruménico; B).

## 2. EFECTOS BENEFICIOSOS DEL CONSUMO DE CLA

El papel de la alimentación ha sido el objeto de numerosos estudios científicos a lo largo de los últimos años. En la actualidad, se sabe que la ingestión de grandes cantidades de algunas substancias aumenta los riesgos de cáncer. Algunas de las sustancias con más riesgos cancerígenos son el benzo(a)pirena, abundante en las partes carbonizadas de la carne asada, la aflatoxina, presente en los cacahuetes, además de ciertos tipos de hidracinas, que se pueden encontrar en determinadas setas comestibles. Partiendo de este hecho, la dieta es considerada como un factor que contribuye a la formación o progresión de algunos tipos de cáncer. De hecho, algunos estudios epidemiológicos indican que la composición de la dieta puede estar relacionada con el 35% de los casos de cáncer mortales en humanos (Doll, 1992).

Por otro lado, la investigación destinada a mejorar la alimentación humana ha podido identificar también algunas sustancias naturales anticancerígenas, la mayoría de origen vegetal y presentes en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, el CLA, siendo un componente de la grasa de rumiantes, aportó un nuevo giro a los conocimientos sobre la relación entre la nutrición y el cáncer y parece una alternativa bien prometedora.

En la última década se han publicado varios trabajos sobre las propiedades fisiológicas del CLA, revisados principalmente por Pariza (1999), McGuire y McGuire (2000) y Whigham *et al.* (2000), estudiando los efectos de los diferentes isómeros del CLA sobre la carcinogénesis y la composición corporal, y concluyendo que el CLA también tiene un papel en el control del sistema inmunitario y en la prevención de diabetes mellitus.

El CLA es conocido por estar presente en los productos lácteos y en otros derivados de alimentos que provienen de rumiantes, como la carne. La carne más rica en CLA es la de vacuno, aunque el CLA también se encuentra a niveles bastante importantes en la carne de ovino y en un grado menor en las de cerdo, pollo y pavo. En consecuencia, la carne, leche y queso de rumiantes son la principal fuente de CLA en la cadena alimenticia. Debido a sus efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, los isómeros del CLA han sido objeto de un número creciente de trabajos de investigación en los últimos años. La mayoría de estudios se han realizado en modelos animales, observándose que el CLA inhibe la carcinogénesis (Scimeca, 1999), reduce la grasa corporal (Park *et al.* 1997), baja la aterogénesis (Lee *et al.*, 1994), y presenta características antidiabéticas (Belury *et al.*, 1999). Las principales

actividades biológicas fueron atribuidas básicamente a los isómeros *cis*-9, *trans*-11 (Ha *et al.*, 1990) y *trans*-10, *cis*-12 (Park *et al.*, 1999) del ácido octadecadienoico, que son por otra parte los dos isómeros mayoritarios del CLA en la leche de vaca.

El CLA se comercializa como un aditivo nutricional para humanos con el fin de responder a la demanda de reducción de las grasas corporales, al culturismo y a la demanda de productos anticatabólicos. Se ha demostrado que el *trans*-10, *cis*-12 C18:2 fue responsable de la reducción de la lipogénesis en la canal de roedores (Pariza *et al.*, 2001). Por otra parte, el ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 C18:2), cuando fue derivado de la grasa de la leche, pudo prevenir con más eficiencia el crecimiento de las células humanas de cáncer de mama que un producto sintético del *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (O'Shea *et al.*, 2000). Las respuestas metabólicas al *cis*-9, *trans*-11 C18:2 y al *trans*-10, *cis*-12 C18:2 parecen ser distintas, pero ambos isómeros podrían tener un impacto positivo sobre la salud humana. Sin embargo, el isómero C18:2 *cis*-9, *trans*-11 C18:2 representa cerca del 90% del total de CLA en la grasa de la leche de vacas alimentadas con raciones estándar. (Bauman *et al.*, 2001; Piperova *et al.*, 2000) mientras que el isómero *trans*-10, *cis*-12 C18:2 representa menos de 2% del total de CLA.

Las evidencias científicas de la última década indican que el CLA mejora también la actividad antioxidante (inhibiendo la betaoxidación) de la enzima carnitina palmitoiltransferasa (Park *et al.*, 1997). El conjunto de efectos mencionados previamente llevó al reconocimiento del CLA como un alimento funcional. Según el NRC (1994) el término “alimentos funcionales” es utilizado como una descripción genérica de los alimentos o ingredientes de alimentos que son capaces de generar beneficios a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que puedan contener.

Un gran número de estudios atribuyeron al CLA, en conjunto, los efectos descritos previamente sobre la salud del consumidor. En los siguientes apartados, detallaremos estos efectos. Cabe destacar que algunos autores lograron identificar los isómeros del CLA responsables de cada efecto. Así, el ácido ruménico es el responsable del efecto anti cancerígenos y de la inhibición de la aterosclerosis (Bauman *et al.*, 2006), el *trans*-10, *cis*-12 es responsable de la reducción del tejido adiposo marrón (Akahoshi *et al.*, 2003) y , en general, de los cambios de la composición corporal (Park *et al.* 1999), así como la reducción de peso general y del desarrollo de la resistencia a la insulina (Roche *et al.*, 2002).

## 2.1. Efecto anticarcinógeno

El descubrimiento de la inhibición de la carcinogénesis por el CLA se debe sobre todo al trabajo del equipo del Dr. Michael Pariza de la Universidad de Wisconsin. Este equipo de investigación descubrió, estudiando la formación de mutagénos en muestras de carne bovina picada y frita, un inhibidor de la mutagénesis (Pariza *et al.*, 1979, 1983). La actividad inhibitoria estaba presente en la carne picada tanto frita como cruda, lo que sugirió que no era necesariamente un resultado de la cocción de la carne (Pariza *et al.*, 1979). Posteriormente, Pariza y Hargraves (1985) demostraron que la carne cruda o fracciones parcialmente purificadas de carne frita inhibían en ratas la iniciación de los tumores epidérmicos provocados por DMBA (7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, un compuesto aromático conocido por inducir tumores cancerígenos mamarios).

Más tarde, la purificación de las fracciones llevó a detectar la presencia de derivados del ácido linoleico con doble enlaces (Ha *et al.*, 1990). La aplicación cutánea de CLA antes de tratar con DMBA y promocionar la formación de tumores mediante TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), utilizado comúnmente en estudios biomédicos para activar la enzima de la señal de transducción proteína kinasa C, consiguió reducir el número de papilomas y la incidencia de tumores (Ha *et al.*, 1989).

Posteriormente, Ip *et al.* (1991) incorporaron por primera vez CLA a la ración de ratas y demostraron un efecto significativo de este producto sobre los tumores mamarios previamente inducidos por el uso del DMBA. Los autores observaron que esta reducción de los tumores conseguida mediante el uso del CLA está condicionada por la dosis utilizada. La reducción de tumores de cáncer de mama en roedores de laboratorio que fueron alimentadas con dietas conteniendo un 0,5 o un 1,5% de CLA fue respectivamente de un 32 y un 56%. A partir de una dosis de CLA del 1%, no se observó ninguna correlación entre la respuesta y la dosis, pero tampoco se observó ningún efecto negativo, ni siquiera en el caso de tratamiento crónico con CLA (Ip, *et al.*, 1991). Por otra parte se ha demostrado que el CLA inhibe el desarrollo no solo de los tumores benignos, sino también de los malignos.

Más tarde, Ip *et al.* (1994) determinaron que incluso pequeñas cantidades de CLA eran eficaces para reducir la incidencia y número de tumores mamarios; de hecho un 0,1% de CLA en la dieta redujo el número total de tumores encontrados tras la autopsia. En este estudio, los

autores optaron por tratamientos a corto plazo en los cuales el CLA fue incluido en la dieta de los animales a partir del destete durante únicamente 5 semanas.

Estudios posteriores demostraron que un tratamiento dietético de ratas con CLA limitado a la fase de desarrollo de la glándula mamaria fue suficiente para suprimir los tumores mamarios, que pudieron ser inducidos posteriormente mediante metilo-nitrosourea cuando se dejó de tratar los animales con CLA (Ip *et al.*, 1995). Las investigaciones sobre los mecanismos de acción del CLA ante la carcinogenesis mamaria indican que el CLA no afecta el nivel total de fosfolípidos en el tejido mamario, sino que disminuye la densidad del epitelio mamario y la síntesis de ADN tanto en los brotes de las terminaciones como en los brotes lobuloalveolares (Thompson *et al.*, 1997). Además, estudios sobre casos de cáncer de mama humano de dos tipos (líneas celulares sensibles al estrógeno llamadas comúnmente MCF-7 y no sensibles al estrógeno llamadas MDAMB-231) indican que el CLA disminuyó el crecimiento de las células MCF-7, pero no las células del segundo tipo. Este efecto sobre el primer tipo de células desapareció cuando fueron transferidas a un medio que no contenía CLA.

Cuando la administración del producto carcinógeno tuvo lugar al final de la ingestión de una dieta sin presencia del CLA, la inhibición de la tumorogénesis requirió un tratamiento continuo con CLA, siendo administrado el CLA posteriormente al MNU (N-metil nitrosourea), un inductor de la aparición de tumores (Ip *et al.*, 1995, 1997a). La evaluación de los efectos del momento de inicio y la duración del tratamiento con CLA sobre el cáncer de mama demostraron que la administración de CLA durante la fase de desarrollo mamario previene significativamente el cáncer de mama. Además, Ip *et al.* (1999) demostraron que este efecto preventivo del CLA contra el cáncer de mama es independiente del nivel y el tipo de grasa existente en la dieta (p.e. aceite de maíz vs. grasa animal). El mismo equipo (Ip *et al.*, 1997b) concluyeron que la anulación de la formación de tumores mamarios mediante el CLA no fue influida por el consumo de ácido linoleico cuyo nivel puede provocar, en algunos casos, la formación de tumores.

Otros estudios evidenciaron también el efecto que ejerce el CLA, en humanos, contra el cáncer de mama (Visonneau *et al.*, 1997), así como en animales con deficiencias en el sistema inmunitario que sufrieron un cáncer de próstata provocado (Cesano *et al.*, 1998). La evidencia de que los productos lácteos pueden prevenir el cáncer fue la conclusión de los estudios de Ip *et al.* (1999). Utilizando un modelo de tumores mamarios provocados por la administración

de MNU, las ratas experimentales recibieron una dieta sin o con diferentes fuentes de CLA desde el destete y hasta la edad de 50 días. La reducción de la incidencia de tumores tuvo lugar independientemente de que la fuente del CLA fuera un producto comercial o simplemente mantequilla. El ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 CLA) fue identificado como el isómero relativamente puro que posee la capacidad de inhibir el cáncer. Este isómero se encuentra de forma natural en productos lácteos y cárnicos de rumiantes. McGuire *et al.* (1999) indicaron que la evidencia de la existencia de otros isómeros del CLA con propiedades anticarcinógenas requiere más estudios. Además, Lock *et al.* (2004; 2005) demostraron que el ácido *trans* vaccénico (TVA), principal precursor del RA mediante la biosíntesis mamaria a través de la desaturación, tiene también características anticancerígenas, pero indirectas, condicionadas a su transformación en RA en el sujeto receptor de tratamiento.

## 2.2. Efecto sobre la aterosclerosis

Proveniente del griego, *athero* (pasta) y *skleros* (duro/piedra), la aterosclerosis es un tipo de arteriosclerosis, un término que se refiere al endurecimiento de las paredes arteriales (arterio de arteria y esclerosis de endurecimiento). El término arterioesclerosis abarca varias afecciones que llevan al endurecimiento, incluyendo la aterosclerosis, que consiste básicamente en el depósito de sustancias lipídicas formando la llamada placa de ateroma en las arterias de mediano y grueso calibre, a causa del exceso de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Se han realizado estudios en animales de laboratorio que indicaron que el CLA podría tener efectos beneficiosos para reducir el proceso de aterosclerosis (Lee *et al.*, 1994; Deckere *et al.*, 1999). Lee *et al.* (1994) alimentaron durante 22 semanas a conejos con dietas aterogénicas conteniendo o no 0,5 gramos diarios de CLA, observando reducciones muy notables de los niveles de colesterol total, de colesterol LDL y de triglicéridos en el plasma, a partir de la semana 12. No se observaron diferencias en cuanto a los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), y el ratio LDL/HDL fue más bajo en el grupo de animales recibiendo el tratamiento de CLA. Tras el examen histológico, los autores observaron que en los animales tratados con CLA la fracción de la superficie aorta afectada por las lesiones ateroescleróticas fue un 12% más baja, pero solo numéricamente. Por otra parte, la evaluación histológica de la deposición de reservas de grasa en las aortas torácicas y abdominales indicó que en el grupo de conejos suplementados con CLA se registraron menos animales con casos severos que en

el grupo control (Lee *et al.*, 1994). Utilizando el mismo modelo animal, Kritchevsky (1999) observó que, después de haber desarrollado lesiones ateroescleróticas, los conejos que recibieron un tratamiento con CLA tuvieron un 30% de regresión en estas lesiones.

Se sabe también que el CLA mejora la sensibilidad a la insulina y por lo tanto puede controlar los niveles de insulina, como se indica en el apartado 2.3. Debido a que los niveles altos de insulina pueden promover arteriosclerosis, el CLA podría contribuir a neutralizar esta enfermedad. Nicolosi *et al.* (1997) alimentaron a hámsters con dietas aterogénicas a las cuales incorporaron varios niveles de CLA, y concluyeron que la concentración total de colesterol en la sangre fue reducida aunque la formación de tejido graso no fue afectada.

Es importante señalar que, en contra de lo que a veces se piensa, en un estudio epidemiológico en que se compararon la mantequilla y la margarina, no hubo ningún aumento del riesgo de enfermedades vasculares con altas ingestiones de mantequilla, mientras que el consumo de margarina (de origen vegetal), pobre en CLA, fue asociado con una creciente incidencia de problemas vasculares (Gillman *et al.*, 1997). Munday *et al.* (1999), utilizando ratas que presentaban un determinado tipo de aterosclerosis, observaron que las ratas que recibieron CLA presentaron un aumento en el ratio colesterol-HDL/colesterol total del suero sanguíneo, así como una reducción de la concentración total de triglicéridos. Sin embargo, en este mismo estudio se observó un incremento del desarrollo de las capas de grasa en la aorta por lo que los efectos antiaterogénicos del CLA estarían en discusión. Asimismo, se requieren más estudios para confirmar con más certeza si el CLA es realmente útil para frenar el desarrollo de la aterosclerosis en humanos (Mc.Guire y Mc.Guire, 2000).

En la actualidad, las respuestas a las diferentes dosis de CLA están siendo investigadas. Además de la necesidad continua de seguir descubriendo sus mecanismos de acción, es también necesario determinar la aplicabilidad de estos efectos a la salud humana, pues no se puede afirmar con certeza que todos los efectos positivos del CLA observados en modelos animales lo serán enteramente en humanos.

### 2.3. Efecto antidiabético

El posible efecto de los isómeros del CLA sobre la insulina de la sangre suelen ser en general confusos dadas las diferencias observadas en la respuesta de distintas especies. Cuando los suplementos de CLA se administraron a ratones, estos desarrollaron una ligera resistencia a la insulina (DeLany *et al.*, 1999), lo cual puede estar relacionado con un cambio hacia un uso mejorado de AG como fuente de energía. Por el contrario, en ratas obesas y sufriendo diabetes, el CLA aportado en la dieta restableció la sensibilidad a la insulina. Este hecho llevó los autores a proponer que el CLA podría ser útil para tratar la diabetes tipo-2 (Belury *et al.*, 1999). No se sabe todavía con claridad si estos efectos se deben al mismo isómero, ni tampoco se pueden relacionar con certeza con un mecanismo bioquímico bien definido. Pariza *et al.* (2001) observaron, tras estudiar durante 6 meses 71 casos de pacientes obesos, que los niveles de insulina y glucosa en el plasma no cambiaron en el caso del grupo que recibió suplementos de CLA (3 g/d) comparados con el grupo control que recibió aceite vegetal. Por lo tanto, concluyeron que es posible que ninguno de los efectos del CLA observados en ratones (DeLany *et al.*, 1999) o en ratas (Belury *et al.*, 1999) sea aplicable a humanos a la dosis utilizada (3 g/d). Los estudios tendrían que ser replicados y extendidos a un mayor número de dosis de utilización para poder saber con certeza si este efecto es trasladable a la salud humana. De hecho, McGuire y McGuire (2000) indicaron que si el CLA puede mejorar la homeostasis de la glucosa e inhibir la acumulación de la grasa en organismos como ratones, ratas y cerdos, tendría que ser también efectivo en el caso de humanos sufriendo diabetes, por lo que este área sigue siendo de mucho interés para la investigación en términos de salud humana.

### 2.4. Efecto sobre la relación músculo/grasa

La suplementación con CLA ayuda a mejorar el ratio de masa corporal respecto a grasa, especialmente en la zona del abdomen, y a mejorar el crecimiento muscular. La explicación de este efecto podría ser la mejora de la sensibilidad a la insulina que puede provocar el CLA, facilitando de esta manera el transito de AG a través de la membrana de las células musculares y evitar que lleguen al tejido graso.

En un ensayo realizado por Park *et al.* (1997), los ratones que recibieron una suplementación con CLA (0,5% CLA del peso vivo) presentaron hasta un 60% de reducción de la grasa

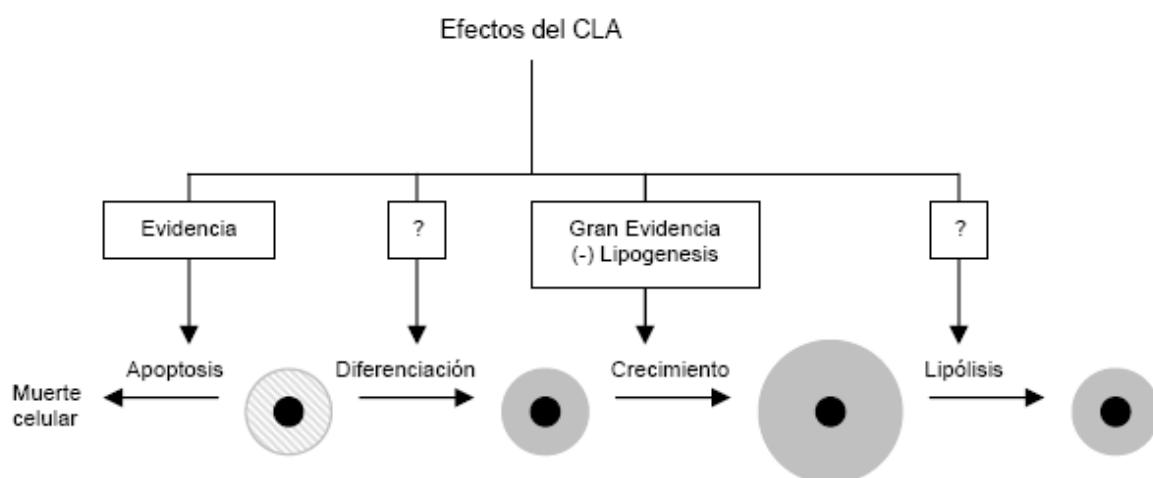
corporal y hasta un 14% de incremento de la masa muscular en comparación con individuos control, siendo más alta la energía total disponible tanto en el tejido graso como en el muscular. El autor atribuyó estos efectos a la reducción de la acumulación de grasa y al aumento de la utilización de la misma. También es posible que el CLA mejore la combustión de grasa tanto en las células musculares como en las mismas partículas de grasa. Para entender mejor sus efectos metabólicos, DeLany *et al.* (1999) ofrecieron a ratones suplementos con CLA una dieta con diferentes contenidos de grasa. La respuesta de los animales fue reducir la acumulación de grasa corporal, incluso con dosis relativamente bajas e independientemente del nivel de consumo de alimentos. Por este motivo, existen en el mercado suplementos de CLA, utilizables tanto en humanos como en la alimentación de mascotas, para controlar el peso corporal y las reservas grasas.

## 2.5. Efecto sobre los adipositos

Parece evidente según varios autores que el isómero del CLA responsable de los cambios de la composición corporal es el *trans*-10, *cis*-12 (De Deckere *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). El modo de acción de este isómero del CLA sobre los adipositos se indica en la Figura 5. La evidencia supone que este efecto se debe básicamente a una reducción de la absorción de lípidos por parte de los adipositos (Evans *et al.*, 2000) que es, a su vez, consecuencia del efecto negativo del CLA sobre la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL; Park *et al.*, 2000). El mecanismo de reducción de la actividad de la LPL se desconoce hasta el momento, sin embargo Pariza *et al.* (2001) encontraron que se debe más bien a la acción directa del isómero y no a un metabolito.

Tsuboyama-Kasaoka *et al.* (2000) observaron que se indujo apoptosis en el tejido adiposo de ratones alimentados con un 1% de CLA (mezcla de isómeros conteniendo un 40% de *trans*-10, *cis*-12 C18:2). Este mismo isómero pudo inducir la apoptosis en cultivos *in vitro* de adipocitos de ratones (Brodie *et al.*, 1999). Sin embargo, Azain *et al.* (2000) concluyeron que una suplementación de un 0,25 o un 0,5% de CLA durante 5 semanas a ratas redujo el tamaño de los adipocitos pero no su número total. Por lo tanto, el efecto del CLA sobre la apoptosis de los adipositos puede ser dependiente de la especie dado que se observó en ratones (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000), pero no fue el caso en ratas (Azain *et al.*, 2000).

Como se indica en la Figura 5, varios autores observaron *in vitro* (Evans *et al.*, 2000) e *in vivo* (Park *et al.*, 1999) que el CLA, y concretamente el isómero *trans*-10, *cis*-12, podría inducir la apoptosis en preadipocitos y bloquear su diferenciación. De manera general, se puede predecir que el *trans*-10, *cis*-12 CLA puede bloquear la ganancia de grasa en el organismo, pero no necesariamente reducir el nivel de grasa acumulado con anterioridad a la ingestión de CLA. En este sentido, Zambell *et al.* (2000) indicaron que los suplementos de CLA no pudieron reducir la grasa corporal en mujeres adultas, mientras que Atkinson (1999) y Blankson *et al.* (2000) concluyeron que el CLA fue eficaz para reducir la ganancia de grasa corporal en voluntarios adultos, siendo el resultado apoyado también por resultados *in vitro*. Esto indica que el efecto del CLA sobre los adipositos se debe mayoritariamente a una reducción de la absorción de lípidos por parte de los adipositos. En cambio, el efecto sobre la lipólisis, que permitiría la liberación de ácidos grasos a partir de los adipocitos, es minoritario o casi nulo ya que los datos en la literatura son muy variables.



**Figura 5:** Posibles hipótesis sobre los efectos del *trans*-10, *cis*-12 CLA en los adipocitos (relleno gris) y los preadipocitos (relleno rallado; adaptado de Park *et al.*, 1997).

## 2.6. Efecto sobre el sistema inmunitario

La mayoría de trabajos que han investigado el efecto del CLA sobre el sistema inmunitario se han realizado en modelos animales, a excepción de un único y reciente estudio llevado a cabo en humanos (Song *et al.*, 2005). Cuando el CLA fue administrado a un cultivo *in vitro* de linfocitos extraídos de la especie porcina, se incrementó la blastogénesis de linfocitos, su actividad citotóxica y la capacidad letal de los macrófagos (Michal *et al.*, 1996). En otros dos

ensayos en los que el CLA fue administrado a razón de 0,5% de la dieta de pollos o ratones, respectivamente, los autores (Cook *et al.*, 1993) observaron un incremento de la actividad fagocitaria de los macrófagos en ratones.

El mecanismo de acción de este efecto del CLA no está suficientemente estudiado. Varios autores sugirieron que podría ser debido a las propiedades antioxidantes del CLA demostradas *in vitro* (Ha *et al.*, 1990), en microsomas del hígado (Pariza *et al.*, 1991) y en la glándula mamaria (Ip *et al.*, 1991). Por otra parte, Hayek *et al.* (1999) demostraron que el CLA incorporado a la dieta mejoraba la actividad *in vitro* de los linfocitos T sin tener ningún efecto sobre su actividad *in vivo* ni tampoco sobre la actividad de los linfocitos B y los NK (*Natural Killer*). Por otra parte, y según Cook *et al.* (1993), el CLA, siendo isómero del ácido linoleico que es un precursor de la prostaglandina, podría ser eficaz en la prevención de la perdida excesiva de peso que acompaña el hecho de estimular las células de este sistema.

Finalmente, en un estudio reciente realizado sobre 28 sujetos humanos de edades variando entre 25 y 50 años, donde se consumieron 3 gramos diarios de una mezcla de los 2 mayores isómeros del CLA (RA y *trans*-10, *cis*-12), Song *et al.* (2005) observaron incrementos en la concentración de inmunoglobulinas A y M y en la de las citokinas anti-inflamatoria, así como una reducción de las citokinas pro-inflamatorias. Este estudio representó la primera evidencia del efecto positivo del CLA sobre el sistema inmunitario en humanos.

## 2.7. Efecto sobre el sistema óseo

En los últimos años, varios investigadores han estudiado el posible efecto del CLA sobre la absorción de Ca en el tejido óseo. Park *et al.* (1997) indicaron que, entre otros efectos, el CLA incrementó el contenido de cenizas en organismos de ratones, suponiendo que el incremento de la ceniza es una consecuencia de la mejora de mineralización de los huesos. Este resultado fue confirmado por Cook *et al.* (1993) al ver que pollos alimentados con CLA tuvieron un nivel más alto de cenizas en la tibia que los animales control. Watkins *et al.* (1997) indicaron que el CLA estimuló la velocidad de formación del hueso en pollos en crecimiento mediante la modulación de la producción de la prostaglandina de tipo E2 (PGE2) en el hueso, siendo la PGE2 un lípido sintetizado en las células del sistema óseo a partir del ácido araquidónico, imprescindible en la regulación local de la formación del hueso (Pilbeam *et al.*, 2002). Sin embargo, Li *et al.* (1999) indicaron que la administración de una dosis muy alta (1%) de CLA

en la dieta durante 8 semanas llevó a reducir la producción *in vivo* de PGE2 en animales recibiendo una dieta rica de por si en PUFA y especialmente en n-3 y n-6. Los autores concluyeron que hay situaciones en las cuales el efecto del CLA y, respectivamente, el de los AG de tipo n-3 y n-6 pueden interactuar, siendo la presencia de AG n-3 la causante de la reducción de la biosíntesis de la PGE2 y, como consecuencia de la reducción de la velocidad de deposición de minerales y de formación de hueso en los animales suplementados con CLA.

Watkins *et al.* (2003), tras estudiar el efecto del CLA sobre el metabolismo óseo en ratas y otros mamíferos, indicaron que la acción de los diferentes isómeros del CLA depende del perfil de AG de la dieta, y en especial del balance de los PUFA (básicamente el ratio n-6/n-3), confirmando la teoría de Li *et al.* (1999) de la interacción negativa entre el CLA y los AG n-3. Además, los autores citaron otros factores de variación a nivel molecular que condicionan la acción del CLA.

En estudios mediante el modelo celular *in vitro* Caco-2, que es utilizado para predecir la absorción de Ca en humanos (Fleet y Wood, 1999), se sugirió que una exposición de entre 2 y 3 semanas de estas células a ciertos isómeros del CLA puede estimular el transporte paracelular de Ca (Jewell y Cashman, 2003). Por lo tanto, el CLA podría influir indirectamente en la masa ósea incrementando la disponibilidad de Ca para la calcificación. Sin embargo, hasta la fecha, no se dispone de estudios que hayan investigado el efecto del CLA sobre la absorción *in vivo* de Ca.

### 3. BIOSINTESIS DEL CLA

La biosíntesis de los diferentes isómeros del CLA puede tener lugar durante dos procesos diferentes. El primero tiene lugar en el rumen y ocurre durante la biohidrogenación de los AG poliinsaturados; el segundo tiene lugar en la glándula mamaria y consiste en una desaturación del ácido *trans*-11 vaccénico por medio de una desaturasa. En los siguientes apartados se detallan cada una de estas vías de síntesis.

#### 3.1. Biohidrogenación en el rumen

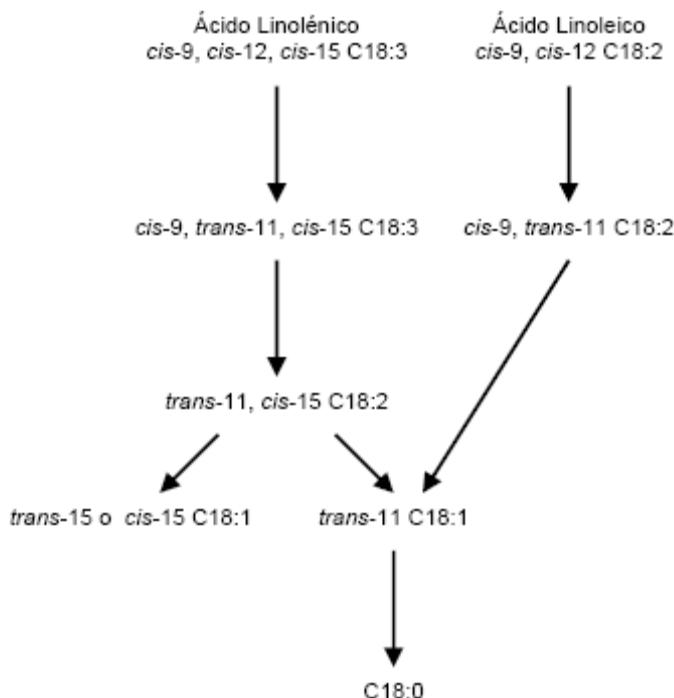
La hidrogenación del ácido linoleico en el rumen se lleva a cabo por efecto de la microflora ruminal (Kepler *et al.*, 1966). Algunos autores describen la bacteria *Butyrivibrio fibrisolven* como la única capaz de realizar la biohidrogenación de dicho ácido graso (Qiu *et al.* 2001; Bell y Kennelly 2003), sin embargo, otras bacterias pueden estar implicadas en este proceso (Bauman *et al.* 1999). Según Martin y Jenkins (2002), las bacterias son más activas que los protozoos o los hongos, siendo las bacterias celulolíticas las más involucradas en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos.

El proceso de biohidrogenación se desarrolla en dos etapas (Kepler *et al.*, 1966; Bauman *et al.*, 1999). La primera etapa es la hidrogenación del ácido linoleico y del ácido linolénico hasta llegar a ácido *trans*-11 vaccénico (*trans*-11 C18:1), pasando por diferentes intermediarios dependiendo del AG de origen tal como se indica en la figura 6. La segunda es la hidrogenación del ácido *trans* vaccénico para transformarlo en ácido esteárico (C18:0). A continuación se detallarán ambas etapas:

##### **Etapa 1: Hidrogenación a *trans*-11 C18:1**

Partiendo del ácido linoleico, dos tipos de reacciones tienen lugar, la primera es una reacción de isomerización del doble enlace *cis*-12 a *trans*-11 por una enzima isomerasa (*cis*-9, *trans*-11 isomerasa, llamada también linoleata isomerasa), responsable de la formación de dobles enlaces conjugados a partir de los enlaces *cis*-9 y *trans*-12. Así pues, cuando se parte del C18:2, esta enzima conduce a la formación de uno de los isómeros del CLA, el *cis*-9, *trans*-11 C18:2 o RA), pero esto no ocurre cuando se parte del C18:3 (Figura 6). La segunda reacción es la reducción del *cis*-9, *trans*-11 C18:2 a *trans*-11 C18:1 (TVA), precursor del RA en la glándula mamaria.

En el caso del ácido linolénico, se tienen en consideración dos isómeros de tipo *cis*: el ácido  $\alpha$ -linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3) y el ácido  $\gamma$ -linolénico (*cis*-6, *cis*-9, *cis*-12 C18:3). Ambos son isomerizados en el doble enlace *cis*-12, seguido de una reducción de los dobles enlaces *cis* hasta la formación también del mismo C18:1 *trans*-11 (Figura 6).



**Figura 6:** principales vías de biohidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico en el rumen (adaptado de Griinari y Bauman, 1999).

### Etapa 2: Formación del ácido esteárico

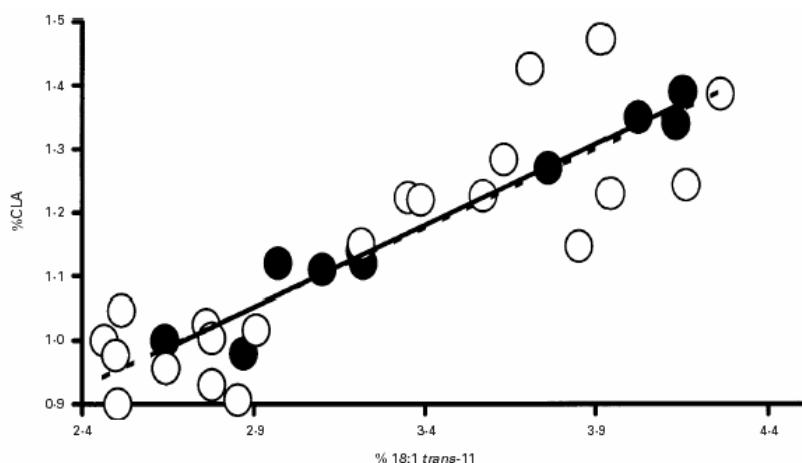
Consiste en la hidrogenación del ácido *trans* vaccénico para dar lugar al ácido esteárico (C18:0), ya totalmente saturado. Esta etapa ocurre de forma menos rápida que la primera y, por lo tanto, puede tener lugar en el rumen un incremento de la concentración del producto intermedio (*trans*-11 C18:1 o ácido *trans*-vaccénico), que lo hace más disponible para ser posteriormente absorbido en el intestino (Bauman *et al.* 1999).

Estos autores (Bauman *et al.*, 1999) clasificaron las bacterias involucradas en la biohidrogenación en dos grupos, según la etapa en la que actúan: al grupo A corresponden las bacterias que hidrogenan los ácidos linoleico y linolénico para dar lugar al TVA, mientras que al grupo B pertenecen las que convierten el ácido *trans* vaccénico en ácido esteárico. Es importante destacar que el factor alimenticio puede llevar la población microbiana hacia otras

vías de biohidrogenación, involucrando por ejemplo a la *cis*-9, *trans*-10 isomerasa en el lugar de la *cis*-9, *trans*-11 isomerasa. En este caso, el ácido linoleico es isomerizado para dar lugar al C18:2 *trans*-10, *cis*-12, otro isómero del CLA, caracterizado por sus efectos negativos sobre la grasa de la leche, que a su vez, y si la hidrogenación continúa, es reducido a C18:1 *trans*-10 (Bauman *et al.* 1999).

### 3.2. Síntesis en la glándula mamaria

Tal como observaron Chilliard *et al.* (2001b) y Wijesundera *et al.* (2003), suele haber una relación lineal entre la concentración del ácido octadecenoico *trans*-11 (*trans*-11 vaccénico) y la del ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 CLA) en la leche de vaca (Figura 7), lo que hizo pensar en una posible síntesis del CLA a partir del TVA.

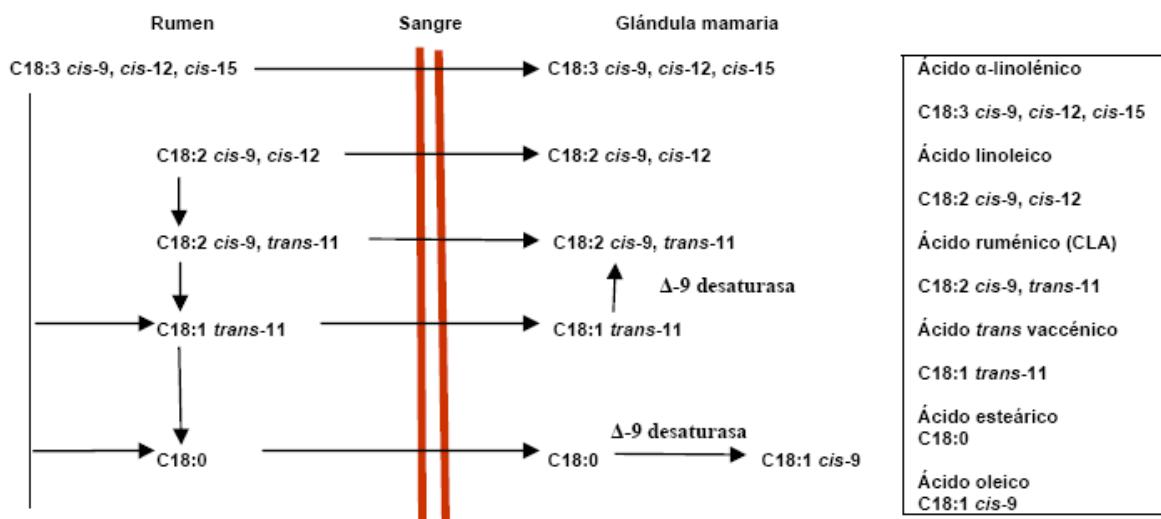


**Figura 7:** Relación entre los niveles de CLA y de C18:1 *trans*-11 en la leche de vaca (Wijesundera *et al.* 2003).

En efecto, el *cis*-9, *trans*-11 CLA puede originarse en la glandula mamaria gracias a la acción de la Stearoyl CoA Desaturasa ( $\Delta 9$ -Desaturasa), una enzima que actua sobre el C18:1 *trans*-11, introduciendo un doble enlace *cis* en la posición del carbono 9 (Bauman *et al.* 1999; Chilliard *et al.* 2001a) tal como indica la Figura 8.

La desaturasa es todo un complejo de enzimas que incluye el citocromo NADH b5-reductasa, el citocromo b5, la Acil Co A-sintetasa y el Stearoyl Co A-desaturasa. Según Bauman *et al.* (1999) este mismo sistema enzimático no solo participa en la formación del isómero *cis*-9, *trans*-11 C18:2 en la grasa de la leche, sino también en la formación de otros isómeros del

ácido octadecadienoico *cis*-9, *trans*-n, como es el caso del *trans*-7, *cis*-9 o bien del *cis*-9, *trans*-13.



**Figura 8:** Principales vías de la síntesis del *trans*-11 C18:1 (TVA) y del CLA (RA) de la leche (adaptado de Chilliard *et al.* 2001a).

Sin embargo, el isómero *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (RA), el más frecuente entre todos los isómeros del CLA en la leche (Pariza *et al.* 2000; Mir *et al.* 2000), es parcialmente absorbido a través de la pared intestinal tras la isomerización del C18:2 *cis*-9, *cis*-12 que tiene lugar en el rumen (aunque parte del C18:2 escapa de la biohidrogenación en el rumen), y posteriormente llega a la glándula mamaria para ser secretado en la leche. Aún y así, parece que la mayor parte (75%) del ácido ruménico presente en la leche proviene de la desaturación del ácido *trans*-11 vaccénico en la glándula mamaria (Chilliard *et al.* 2001b). La concentración de RA en leche así como de otros isómeros del CLA es muy variable y depende de varios factores que se presentan con más detalles en el siguiente apartado.

## 4. FACTORES QUE AFECTAN AL NIVEL DE CLA EN LECHE

Tal como se ha visto, la síntesis de CLA en la leche de rumiantes depende de la producción en el rumen tanto del principal isómero del CLA (ácido ruménico) como del *trans*-11 C18:1 (TVA), así como de la actividad de la estearil-CoA desaturasa en la glándula mamaria. Los factores que afectan la concentración final actúan a través del aumento o de la reducción por una parte de la actividad y expresión de los microorganismos responsables de la biohidrogenación, y por otra parte de la actividad de la estearil CoA desaturasa en la glándula mamaria.

Si bien la alimentación suele tener la mayor influencia sobre la variación observada en la concentración del CLA en leche, otros factores de tipo fisiológico como la especie, la raza y el estado de lactación, entre otros, también pueden afectarla.

### 4.1. Factores fisiológicos

Varios estudios han demostrado el efecto de la alimentación (ver apartado 4.2.) sobre la concentración de CLA en la leche, sin embargo los factores fisiológicos han sido mucho menos estudiados. Partiendo de las diferencias por especies, Parodi (2003) indicó que, como valor medio entre diferentes tipos de raciones, la concentración de CLA en la leche de oveja fluctúa entre el 1,2 y el 3% del total de AG, dependiendo del tipo de alimento, y que en la leche de cabra esta concentración varía entre el 0,58 y valores superiores al 2%. Nudda *et al.* (2005) indicaron que esta concentración fue del 2,5% cuando las ovejas se alimentaron con pasto fresco de primavera e incluso del 3,9% utilizando un 6% de aceite de girasol en la ración (Hervás *et al.*, 2006). Sin embargo, en estudios recientes con pequeños rumiantes, se han observado valores mucho más altos (hasta un 5%) de la concentración de CLA (Chiliard *et al.*, 2006). También en vacas, la concentración de CLA puede variar bastante en función de la alimentación, fluctuando desde valores bajos (0,41-0,44%) en raciones a base de ensilado de alfalfa y maíz (White *et al.*, 2001) o con raciones estándar conteniendo semillas de algodón (Kelsey *et al.*, 2003), a niveles ligeramente más altos (0,71%) en el caso de alimentación con pasto suplementado con semillas de algodón (White *et al.*, 2001). En caso de la utilización de lípidos, el incremento de CLA suele ser más evidente: La concentración de CLA fue de un 2,1% en vacas que recibieron aceite de soja (Dhiman *et al.*, 2000), y llegó a valores extremos (5,15%) con una alta dosis de aceite de cártamo (Bell *et al.*, 2006). Por otro lado, Kelsey *et al.*

(2003) demostraron que las diferencias observadas en la grasa de la leche y su índice de saturación y especialmente en la concentración de CLA fueron muy variables entre animales consumiendo la misma ración. Esto indicaría que otros factores como la raza, el estado fisiológico, el número de partos y la edad del animal afectarían también el nivel de CLA en leche. Asimismo, tanto el nivel del CLA como la actividad de desaturasa son completamente independientes del nivel de producción de leche, grasa de la leche y producción diaria de grasa (Kelsey *et al.*, 2003).

En lo que respecta a las diferencias entre razas, en el estudio de Kelsey *et al.* (2003) se observó una concentración más alta de CLA en la raza Frisona (0,44%) que en la raza Parda Alpina (0,41%), habiendo consumido los animales la misma ración. En cambio, en el mismo estudio, no se observó ninguna diferencia en la concentración de CLA en la leche, bajo las mismas condiciones de la alimentación, entre las vacas primíparas y las multíparas. Por su parte, White *et al.* (2001) observaron que las vacas de raza *Holstein* produjeron leche más rica en CLA (0,41%) que las de raza *Jersey* (0,32%). DePeters *et al.* (1995) indicaron diferencias significativas entre las razas *Holstein*, *Jersey* y *Brown Swiss* en las concentraciones de los AG saturados y el CLA. Los autores atribuyeron estas diferencias a la actividad de la Δ-9 desaturasa. Tras el proceso de identificación de marcadores genéticos para estos factores, concluyeron que las diferencias en la actividad de dicha enzima están relacionadas también con la diferencia genética entre razas. Este tipo de factores se ha estudiado muy poco en ovino lechero.

Con respecto al efecto del estado de lactación, Auldist *et al.* (1998) observaron que el nivel de CLA en la leche de vaca subió de un 0,78 a un 0,97% del total de AG entre el principio y el final de lactación, tratándose de una media de todas las estaciones del año. Igualmente, Kelsey *et al.* (2003) observaron que las concentraciones de CLA y de *trans*-11 C18:1 fueron incrementándose a medida que avanzaba la lactación. En cambio, Stanton *et al.* (1997) concluyeron que el estado de lactación no tuvo ningún efecto sobre el nivel de CLA en leche. En cuanto al efecto de la estación, Auldist *et al.* (1998) observaron que, en Nueva Zelanda y con vacas Frisianas, la primavera es la estación con mayores concentraciones de CLA en leche (media de 1,11%) seguida del otoño (0,93%), el invierno (0,80%) y finalmente el verano (0,72%). Por lo tanto, la estación del año afecta la concentración de CLA en leche, siendo más alta en primavera y otoño que en verano, probablemente debido a cambios en la calidad y frescura de la hierba pastada.

## 4.2. Tipo de alimento

Tal como puede observarse en la Tabla 4.1, el nivel de CLA en vacas de raza Frisona es muy dependiente del tipo de alimentos que reciben. Según Bauman *et al.* (1999), hay una serie de factores nutricionales que pueden afectar el nivel de CLA en leche, lo que permitiría clasificar el tipo de alimentos o raciones utilizadas en tres grupos, de acuerdo con su mecanismo de acción:

- 1- Raciones que contienen suplementos que proporcionan AG poliinsaturados (C18:2 o C18:3) para la producción del CLA o del C18:1 *trans*-11 en el rumen, como son las semillas y aceites vegetales o las grasas protegidas
- 2- Factores relacionados con el tipo de ración que afectan, mediante la alteración de las condiciones del ambiente ruminal, a las bacterias del rumen responsables de la biohidrogenación, como es el nivel de concentrado, la utilización de ensilado, y la mayor o menor presencia de forrajes verdes.
- 3- Suplementos alimenticios de CLA o de C18:1 *trans*-11.

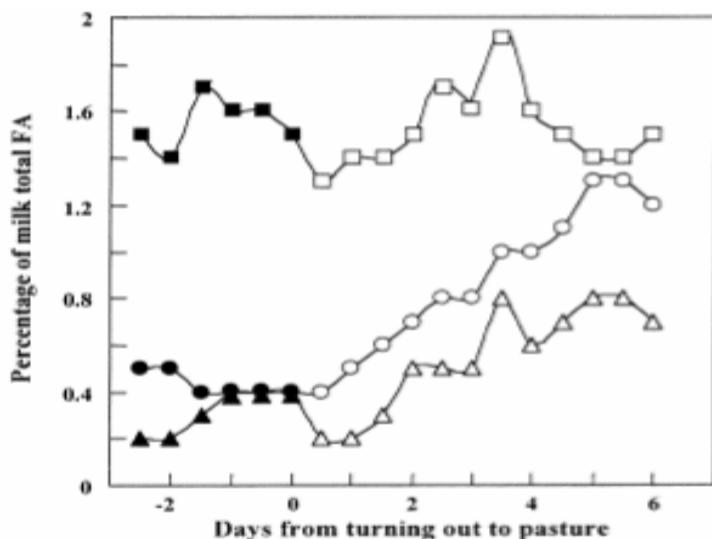
### 4.2.1. Pasto

La alimentación en pastoreo suele incrementar el CLA en leche comparado con ofrecer a los animales una ración total mezclada o un forraje conservado, aún teniendo el mismo nivel de extracto etéreo (Kelly *et al.* 1998; Bauman *et al.* 1999; Chilliard *et al.* 2001b; White *et al.* 2001; Wijesundera *et al.* 2003). Tal como se observa en la Figura 9, los niveles de C18:2, C18:2 conjugados y C18:3 aumentan al sacar las vacas al pasto después de un tiempo bajo alimentación en pesebre Chilliard *et al.*, 2001b).

Por lo tanto, el CLA en leche de vaca aumenta con la disponibilidad de forrajes verdes, siendo más alto en animales alimentados con forraje tierno que en animales alimentados con forraje maduro, así como en animales consumiendo forrajes de primer corte que de segundo (Bauman *et al.*, 1999; Chilliard *et al.*, 2001b). Los estudios llevados a cabo con ovejas lecheras (Nudda *et al.*, 2005) o cabras (Chilliard *et al.*, 2006) indican tendencias similares.

**Tabla 4.1.** Concentración de CLA (RA, % del total de AG) en leche de vacas Frisonas bajo diferentes régimenes de alimentación.

Tipo de ración	RA	Autor
Alfalfa deshidratada + copos de maíz + cáscaras de soja + semillas enteras de algodón	0,44	Kelsey <i>et al.</i> (2003)
Pasto (50%) + concentrado a base de cebada	1,57	Ward <i>et al.</i> (2003)
Pasto (80%) + concentrado a base de cebada	1,90	Ward <i>et al.</i> (2003)
Ensilado de alfalfa y cebada + cebada grano	1,4	Ward <i>et al.</i> (2002)
Ensilado de alfalfa y cebada + cebada grano + semillas lino	1,2	Ward <i>et. al</i> (2002)
Ensilado de alfalfa y maíz	0,41	White <i>et al.</i> (2001)
Pasto + maíz picado + semillas enteras de algodón	0,72	White <i>et al.</i> (2001)
Ensilado de maíz + 1% aceite de pescado + 2% grasa rica en C18:0.	0,70	AbuGhazaleh <i>et al.</i> (2003)
Ensilado de maíz + 1% aceite de pescado + 2% semillas de girasol ricas en linoleico	1,70	AbuGhazaleh <i>et al.</i> (2003)
Ensilado de maíz + maíz grano + 5,3% aceite de lino	1,67	Kelly <i>et al.</i> (1998)
Ensilado de alfalfa y maíz + maíz grano + 3,6% aceite de soja	2,1	Dhiman <i>et al.</i> (2000)
Pasto + 150 g aceite de pescado	3,3	Kay <i>et al.</i> (2003)
Pasto (mayoritariamente Rye Grass)	1,21	Kay <i>et al.</i> (2004)
Pasto + 450 g/d aceite de girasol	1,16	Kay <i>et al.</i> (2004)
Ensilado de alfalfa y maíz + maíz picado + 1,5% aceite de maíz	0,89	Leonardi <i>et al.</i> (2005)
Ensilado de alfalfa y maíz + maíz picado	0,45	Leonardi <i>et al.</i> (2005)
Ensilado de alfalfa y cebada y heno de alfalfa	0,45	Bell <i>et al.</i> (2006)
Ensilado de alfalfa y cebada + heno de alfalfa + 6% de aceite de cártamo.	3,36	Bell <i>et al.</i> (2006)
Ensilado de alfalfa y cebada y heno de alfalfa + 6% de aceite de cártamo + 24 ppm de monensina	5,15	Bell <i>et al.</i> (2006)



**Figura 9.** Concentración de C18:2 no conjugados (□ o ■), C18:2 conjugados (○ o ●) y C18:3 (Δ o ▲) antes (símbolos llenos) y después (símbolos vacíos) de la salida al pasto (Chilliard *et al.*, 2001b).

#### 4.2.2. Ensilado

French *et al.* (2000), en un estudio llevado a cabo con terneros de engorde, concluyeron que los animales alimentados en pastoreo presentaron concentraciones de CLA en carne más altas que con ensilado de la misma planta. En cuanto al tipo de ensilado, el de maíz es más rico en ácido linoleico que el ensilado de hierba; de hecho, el C18:2 representa hacia el 60% del total de AG del grano de maíz. Sin embargo, no existe una gran diferencia entre la concentración de PUFA en la leche de animales recibiendo ensilado de hierba o de maíz. Por otro lado, las concentraciones de C18:1 *trans* y de los isómeros del CLA en leche son, por término medio, dos veces menor con ensilado de maíz que con ensilado de hierba fresca (Chilliard *et al.* 2001b), lo que pone de manifiesto la peor aptitud de este ensilado, aún siendo más rico en ácido linoleico, para fomentar la síntesis de CLA.

#### 4.2.3. Concentrado

En general, un nivel alto de concentrado en la ración incrementa tanto la producción a nivel del rumen como la concentración en leche de los AG C18:1 *trans*, siendo el isómero *trans*-10 el predominante. Sin embargo el incremento del *trans*-10 C18:1 suele ir acompañado de un aumento del isómero *trans*-10, *cis*-12 del CLA en leche y de un descenso del contenido de *cis*-9, *trans*-11 CLA, resultando además globalmente en una caída en la concentración de CLA en

la grasa de la leche (Bauman *et al.*, 1999; Bauman y Griinari, 2001; Schmidely y Sauvant, 2001). Análogamente, Wijesundera *et al.* (2003) observaron un efecto negativo de la suplementación con 5 kg diarios de cebada en grano sobre la concentración de CLA en leche en comparación con animales en pastoreo sin recibir ningún tipo de suplemento.

Al parecer, el pH ruminal tiene también un papel importante. De forma general, alimentar con raciones que reducen el pH del rumen por debajo de 6, como es el caso de las raciones ricas en cereales, podría reducir la disponibilidad de C18:1 *trans*-11 y, en consecuencia, la concentración de *cis*-9, *trans*-11 CLA en la leche. Por lo tanto, es importante ofrecer raciones que mantengan el pH ruminal por encima de 6 con el fin de optimizar la síntesis de CLA en la leche (Martin y Jenkins 2002), siendo el uso de forrajes verdes un buen remedio.

### 4.3. Suplementos lipídicos

#### 4.3.1. Semillas de oleaginosas

Con respecto a los resultados con semillas de oleaginosas, se dispone de datos de trabajos realizados tanto en vacas como en ovejas y cabras lecheras. En general, cabe destacar que el efecto de las semillas y de sus respectivos aceites (apartado 4.3.2.) sobre el CLA en leche va en la misma dirección, pero con una menor magnitud de respuesta para las semillas enteras. Con respecto a las semillas enteras, Stanton *et al.* (1997) observaron un incremento (+65%) de la concentración del CLA tras suplementar cada vaca con 1650 g/d de semillas enteras de colza. Lawless *et al.* (1998) por su parte concluyeron que las semillas enteras de colza habían sido más eficientes (+43%) que las de soja (+28%) para incrementar la concentración de CLA en leche de vacas, respecto al control que consistía en una alimentación a base de pastoreo. Mir *et al.* (2000) observaron un incremento de la concentración de varios isómeros del CLA en la grasa corporal tras alimentar corderos con raciones enriquecidas con semillas enteras de cártamo de tipo linoleico.

En cuanto a la utilización de semillas procesadas, Dhiman *et al.* (1999) concluyeron que la utilización de semillas de soja extrusionadas (12%) y de algodón (12%) incrementó, respectivamente, un 109% y un 77% la concentración de CLA en leche de vacas. En pequeños rumiantes, Nudda *et al.* (2006) suplementaron cabras lecheras con una dosis moderada (5%) o alta (10%) de semillas de lino extrusionadas y observaron incrementos de las concentraciones

de TVA (+75% y +98%, respectivamente) y de RA (+52% y +67%, respectivamente) en los lotes suplementados. Por su parte, Bernard *et al.* (2005) alimentaron cabras de raza Alpina con un 11,2% de semillas de lino tratadas con formaldehído y observaron un aumento (+42%) del RA. De igual forma, Fuentes *et al.* (2006) observaron también incrementos del CLA (+46%) y TVA (+84%) al suplementar vacas lecheras con un 5,5% de semillas de lino extrusionadas. Por tanto, parece quedar demostrado que los incrementos de las concentraciones de CLA y TVA son mayores con semillas procesadas que con semillas sin tratar.

#### 4.3.2. Aceites vegetales

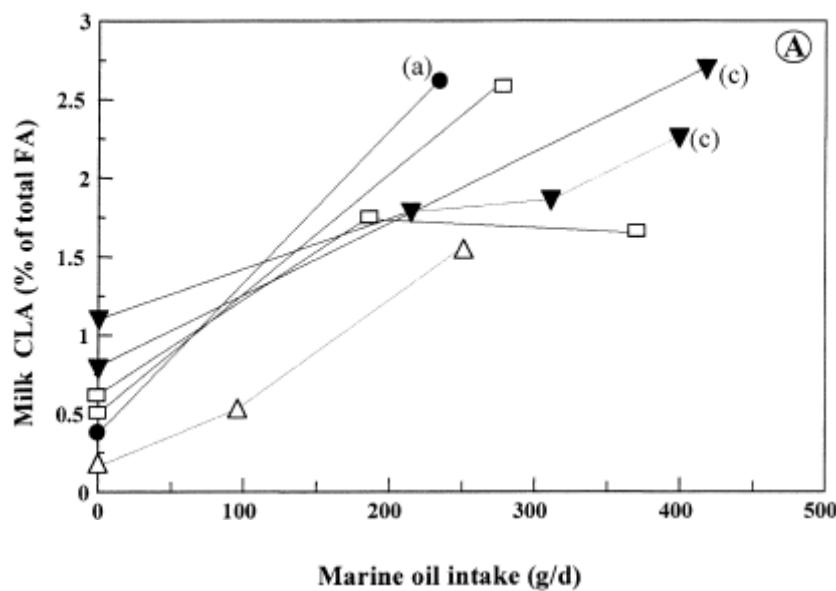
De manera general, la incorporación de aceites vegetales como los de girasol, soja, maíz, colza, lino, cártamo y cacahuete suele producir incrementos importantes en la concentración de CLA. Varios autores observaron efectos positivos de la suplementación con aceite de soja sobre la concentración de CLA en leche de vaca (Kelly *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 2000; Chouinard *et al.*, 2001). Dhiman *et al.* (2000) suplementaron vacas con aceite de soja (3,6%) o con aceite de lino a una dosis moderada (2,2%) o bien alta (4,4%), observando, respectivamente, concentraciones de CLA de 2,10, 1,63, y 1,58 frente a 0,39% del grupo control. Kelly *et al.* (1998) suplementaron vacas lecheras con un 5,3% de aceite de cacahuete (rico en ácido oleico), aceite de girasol (rico en ácido linoleico) o aceite de lino (rico en ácido linolénico) y no observaron ninguna diferencia entre los niveles de CLA obtenidos con aceite de cacahuete (1,33% de la grasa total) y aceite de lino (1,67%), mientras que el aceite de girasol dio una concentración de CLA más alta (2,44%) que los otros dos tratamientos. Por su parte, Loor y Herbein (2003) infundieron a nivel del abomaso de vacas lecheras un 2,5% de aceite de cártamo rico en linoleico o de aceite de girasol rico en oleico, en presencia de una infusión diaria de 15 g de CLA (RA o *trans*-10, *cis*-12). Se observaron mejores resultados con la infusión de RA que con la del otro isómero de CLA. Como consecuencia de la infusión de aceite de girasol, la concentración de RA varió desde un 1,6% a un 2,7%, mientras la infusión de aceite de cártamo incrementó la concentración de CLA desde 1,9% a 3,8%. Los autores concluyeron que los aceites ricos en linoleico son más eficientes para incrementar el CLA en leche que los ricos en oleico y linolénico. Un alto nivel de linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) puede llegar a saturar las bacterias responsables de la biohidrogenación en el rumen y por consiguiente inhibir la biohidrogenación del ácido *trans*-11 vaccénico. De esta forma, este se acumula en el rumen y constituye, por lo tanto, una fuente posteriormente disponible que

servirá para la biosíntesis del *cis*-9, *trans*-11 CLA en la glándula mamaria (Bauman *et al.* 1999).

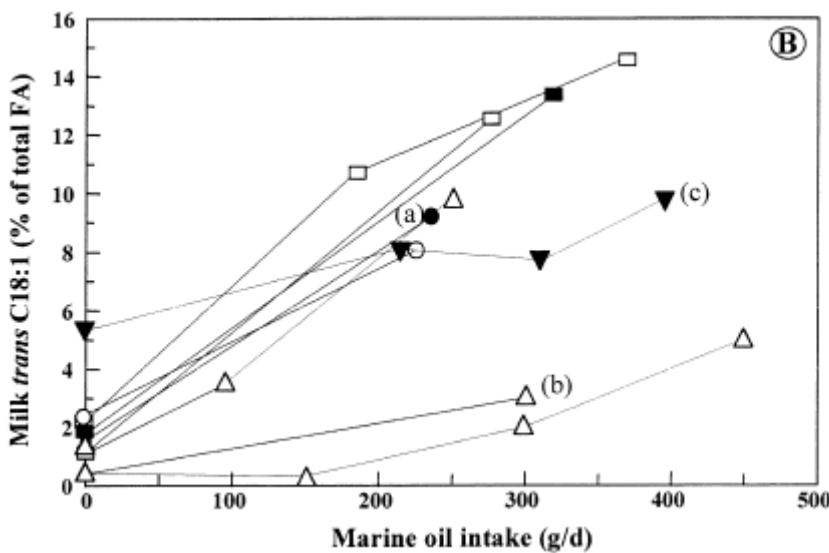
En cabras lecheras de raza Alpina, Bernard *et al.* (2005) observaron un aumento (17%) del nivel de CLA tras suplementar con un 3,6% de aceite de girasol oleico. Este incremento fue menor que el observado (54%) en el mismo estudio cuando se suplementó con semillas de lino tratadas con formaldehído y ello fue atribuido por los autores a una biohidrogenación parcial de los AG poliinsaturados de las semillas de lino. Sin embargo, el incremento obtenido con las semillas es menor que el obtenido con aceite de lino. Chilliard *et al.* (2003), utilizando un 3,4% de aceite de lino, observaron un aumento del 133% en el nivel de CLA (RA), al variar su concentración desde 0,6% (control) a 1,4% (aceite).

#### 4.3.3. Aceites marinos

Los aceites de pescado o más correctamente llamados aceites marinos (aceite de pescado, de mamíferos marinos, de plankton y algas), ricos en PUFA, añadidos a una dosis de 200-300 gramos diarios por vaca y día incrementaron la concentración de CLA en leche desde un 0,2-0,6% en los animales del grupo control a un 1,5-2,7% en los que recibieron el suplemento (Figura 10). De hecho, este importante incremento se debe fundamentalmente a la producción de TVA (Chilliard *et al.* 2001a;b), que en la glándula mamaria se desatura a CLA. Las Figuras 10 y 11 muestran la evolución de las concentraciones de CLA y de C18:1 *trans* en leche tras la ingestión de dosis crecientes de aceite de pescado. Además, los aceites de pescado parecen ser más eficientes que los aceites vegetales para incrementar la concentración de CLA en leche (Bauman *et al.*, 1999; Chilliard *et al.*, 2001b). Franklin *et al.* (1999) observaron que al alimentar vacas lecheras con un 3,97% de algas marinas se incrementaron las concentraciones de CLA y de TVA en la leche, y concluyeron que no hubo diferencias en cuanto al olor o sabor de la leche producida bajo los diferentes tratamientos. En cambio, Kitessa *et al.* (2001), respectivamente en ovejas y cabras lecheras, observaron una depresión de la ingestión de alimentos cuando los animales recibieron un 3% aceite de atún no protegido, mientras que el consumo no fue afectado en caso de recibir la misma dosis del mismo aceite pero protegido.



**Figura 10.** Relación entre la ingestión de aceites marinos y la concentración de CLA en leche (Chilliard *et al.*, 2001b) con raciones a base de: □ ensilado de maíz; ● ensilado de maíz + heno; Δ ensilado de hierba; ▲ ensilado de hierba + heno.



**Figura 11.** Relación entre la ingestión de aceites marinos y la concentración de *trans* C18:1 en leche (Chilliard *et al.*, 2001b) con raciones a base de: □, ensilado de maíz; ●, ensilado de maíz + heno; Δ, ensilado de hierba; ▲, ensilado de hierba + heno; ○, heno.

#### 4.3.4. CLA

La utilización del CLA como suplemento en la alimentación de rumiantes suele tener como objetivo incrementar la concentración de CLA en leche y/o controlar el balance energético

negativo al inicio de la lactación mediante el control del nivel de grasa en la leche producida. Varios autores observaron efectos positivos de la suplementación con isómeros del CLA sobre el propio nivel de CLA en leche. Moore *et al.* (2004) incluyeron 78,9 g/d de una mezcla de isómeros CLA (3,0% *trans*-8, *cis*-10; 3,4% *cis*-9, *trans*-11; 4,5% *trans*-10, *cis*-12 y 4,8% *cis*-11, *trans*-13) en la ración de cada vaca observando un incremento de la concentración de CLA (9,3 vs 4,9 mg de CLA por g de grasa total). Por su parte, Castañeda-Gutiérrez *et al.* (2005) suplementaron vacas lecheras con dos niveles (bajo: 31,6 g/d; alto: 63,2 g/d) de jabones cárnicos de una mezcla de isómeros de CLA y obtuvieron concentraciones crecientes de ácido ruménico (0,52% y 0,61%) en comparación con el control (0,4%). Bell y Kennelly (2003) administraron mediante infusión abomasal 150 g/d de una mezcla sintética de CLA (31,7% ácido ruménico y 30,4% *trans*-10, *cis*-12 CLA) observando un incremento (+200%) de la concentración de ácido ruménico (0,59% vs. 1,77%). Sin embargo, Bernal-Santos *et al.* (2003) no observaron ningún efecto sobre la concentración del ácido ruménico tras alimentar las vacas lecheras con 30,4 g/d de otra mezcla de isómeros de CLA.

En cabras lecheras, una mezcla de isómeros del CLA (*cis*-9, *trans*-11 C18:2 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2) protegida mediante encapsulación por una matriz protéica, ofreciendo una protección del orden de 70%, fue administrada a razón de 40 g/d y varió la concentración de RA en la leche desde un 0,58 a un 2,17% del total de AG (Gulati *et al.*, 2000).

#### 4.3.5. Lípidos protegidos

##### 4.3.5.1. Jabones cárnicos

Los jabones cárnicos de AG de cadena larga son lípidos cuya protección se basa en el efecto benéfico de la adición de calcio, que forma con los AG una unión estable en el rumen (pH = 6). Estos jabones se disocian luego en el abomaso (pH = 2-3), liberándose así los AG que pueden ser posteriormente absorbidos en el intestino. En condiciones estándar del rumen (pH>5,5), Jenkins y Palmquist (1984) indicaron que los jabones cárnicos se disocian poco y por consecuente los ácidos grasos se hidrogenan poco, especialmente con dietas forrajeras. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en ovino de leche por Casals *et al.* (2006) que indican que la adición de jabones cárnicos de aceite de palma (monoinsaturado) a raciones ricas en forrajes (60%) no afecta el nivel de CLA en leche. En cambio, cuando el pH ruminal es bajo, los jabones cárnicos de AG insaturados son altamente biohidrogenados en el rumen (Foutouhi y Jenkins, 1992), lo que ayuda a la disociación de los AG, aunque

aparentemente esto ocurre de tal manera que se minimizan los posibles efectos negativos sobre la fermentación microbiana y la digestión de la fibra. Según Chouinard *et al.* (2001), la liberación lenta de los AG insaturados obtenidos a partir de los jabones cálcicos crea unas condiciones favorables para la acumulación de AG C18:1 *trans* y en consecuencia para el incremento de la concentración del CLA en leche.

#### 4.3.5.2. Lípidos encapsulados

La encapsulación consiste en proteger los lípidos de la biohidrogenación del rumen rodeándolos de una matriz de caseína tratada con formaldehídos. El objetivo es intentar mejorar la transferencia de PUFA de la ración a la leche y obtener leche con un bajo contenido en AG saturados (Scott *et al.*, 1971). El uso de lípidos protegidos por este método (a base de una emulsión de aceite vegetal envuelto de una matriz de caseína tratada con formaldehido) se ha utilizado bastante en vacuno de leche (Chilliard *et al.*, 1993) pero menos en pequeños rumiantes, como fue el caso de aceite de pescado (Gulati *et al.*, 1999), semillas de oleaginosas (Gulati *et al.*, 1997; Wilkinson *et al.*, 2000) o soluciones de CLA (Gulati *et al.*, 2000). La utilización de varias semillas de oleaginosas encapsuladas incrementó la concentración de isómeros del C18:1 *trans* la leche de cabra (Gulati *et al.*, 1997). Por otra parte, la protección de una mezcla de isómeros del CLA mediante la misma técnica (Gulati *et al.*, 2000) permitió en ovejas y cabras que la concentración de isómeros del CLA a nivel de la salida del abomoso y disponibles para ser absorbidos en el intestino delgado fuera un 3,5-4% más alta.

#### 4.3.6. Sebo

La adición de sebo a la ración de vacas lecheras incrementó la concentración de *trans*-11 C18:1, y este efecto fue más alto cuando las vacas recibieron ensilado de maíz que con ensilado de hierba (Chilliard *et al.* 2001b). Siendo el *trans*-11 C18:1 precursor del *cis*-9, *trans*-11 CLA en la leche, la concentración de este isómero del CLA se vio también incrementada. Sin embargo, debido a los problemas derivados de la encefalopatía espongiforme bovina (ESB), el uso de este tipo de grasa animal en la alimentación de rumiantes es incompatible con la reglamentación en vigor, que tiene como objetivo la seguridad del animal y del consumidor.

## 5. RESULTADOS BÁSICOS DE LA UTILIZACIÓN DE LÍPIDOS EN RUMIANTES

En general, gran parte de los estudios sobre el uso de lípidos en la nutrición de rumiantes lecheros se han llevado a cabo en ganado vacuno, siendo más escasos los realizados en ovino y caprino. Se puede decir, en términos generales, que el aporte de grasa incrementa la producción lechera en la vaca y casi no la afecta en ovejas, en las que es más frecuente el aumento del contenido graso de la leche. La cabra, por su parte, estaría en una situación intermedia.

### 5.1. Producción de leche

El efecto de los lípidos sobre la producción y composición de leche en pequeños rumiantes fue revisado por Schmidely y Sauvant (2001), mientras que los resultados en ovino lechero en particular lo fueron por Bocquier y Caja (2001). En lo que respecta a ovino de leche, la mayoría de datos provienen de trabajos realizados con jabones cárnicos (Casals *et al.*, 1992; 1999; Cuartero *et al.*, 1992; Horton *et al.*, 1992; Gargouri *et al.*, 1997; Pérez-Alba *et al.*, 1997 y Osuna *et al.*, 1998; 2000) y con semillas enteras de oleaginosas (Osuna *et al.*, 1998; 2000; Pol *et al.*, 2001; Pol, 2003). En los estudios de Casals *et al.* (1992; 1999) no se vio ningún efecto de la suplementación con jabones cárnicos sobre la producción de leche, incluso con dosis crecientes del 5 al 20% en el pienso ofrecido. De igual forma, Osuna *et al.* (2000), utilizando respectivamente jabones cárnicos (3,8% de la MS total), semillas enteras de algodón (14,2%) y de girasol (5,6%), y Pol et al (2001), incorporando un 8% de semillas enteras de lino a la ración total, no observaron ninguna variación de la producción de leche. Sin embargo, como excepciones a la falta de respuesta de las ovejas en producción lechera cabe indicar los trabajos de Cuartero *et al.* (1992) que indicaron un incremento variable (2-8%) de la producción de leche según la dosis de jabón cárneo añadida. Por su parte, Pérez Alba *et al.* (1997) no observaron ninguna respuesta durante el periodo de cría, pero sí una tendencia al incremento de producción en el periodo post destete. Por otro lado, Horton *et al.* (1992) observaron una depresión de la producción de leche durante el periodo de cría, que varió entre el 1 y el 27% respecto al control, tras aplicar dosis crecientes (desde un 7,5 hasta un 30%) de jabones cárnicos al pienso. De forma similar a lo que suele suceder con las ovejas, la utilización de suplementos lipídicos en cabras tampoco modifica la producción de leche (Chilliard *et al.*, 2003), al contrario de lo que suele ocurrir en vacas lecheras (Firkins y Eastridge, 1994; Chillard *et al.*, 2001b).

## 5.2. Grasa de la leche

Los primeros trabajos que describen la incorporación de lípidos protegidos a raciones de ovejas obtuvieron, de forma general, incrementos significativos y muy marcados de la grasa de la leche, tanto en fase de cría (Pérez Hernández *et al.*, 1986; Kovessy *et al.*, 1987) como en ordeño (Casals *et al.*, 1999). La respuesta al uso de jabones cárnicos de aceite de palma es muy significativa en pequeños rumiantes (Schmidely y Sauvant, 2001), y en especial en ovejas (Bocquier y Caja, 2001), a diferencia de lo que ocurre en vacas lecheras, en las que los jabones cárnicos incrementan muy ligeramente la grasa de la leche (Chilliard *et al.*, 1993). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos con ovejas de raza Manchega (Pérez Alba *et al.*, 1997; Casals *et al.*, 1999; 2006), tanto en cría como en ordeño, en que la suplementación con jabones cárnicos dio lugar a incrementos significativos de la grasa de la leche, especialmente durante la primera mitad de la lactación. En cuanto a la incorporación de otras fuentes de grasa como semillas o aceites, las respuestas son muy variables: se observaron incrementos de 1,13 y de 0,80 puntos de porcentaje de grasa, respectivamente, con la administración de semillas enteras de algodón y de girasol (Osuna *et al.*, 2000), mientras que la administración de 60 g/d de aceite de soja supuso una caída de 1,30 puntos de porcentaje de grasa (Zervas *et al.*, 1998).

En el caso de las cabras lecheras, los resultados del aporte de lípidos han sido también revisados por Schmidely y Sauvant (2001). El resultado suele ser el incremento de la grasa de la leche con varios tipos de fuentes de grasa, aunque las variaciones son de menor magnitud que en las ovejas. En efecto, Mir *et al.* (1999) observaron incrementos de 0,40 a 1,10 puntos de porcentaje de grasa en la leche, usando dosis crecientes de aceite de colza (40-80 g/d). Schmidely *et al.* (2001; citado por Schmidely y Sauvant, 2001) administraron semillas de soja extrusionada a cabras lecheras, a dos dosis diferentes (2 y 4 puntos de diferencia de EE respecto al control, respectivamente), y observaron unos incrementos de 0,40 y 0,68 puntos de porcentaje de grasa de la leche. La incorporación de grasa animal (Daccord, 1987; Morand-Fehr *et al.*, 1987 y Lu, 1993), a dosis variando de 20 a 105 g/d, generó incrementos de 0,37 a 0,70 puntos de porcentaje de grasa en leche. Finalmente, y como consecuencia de la inclusión de jabones cárnicos a dosis de entre 50 y 200 g/d, respectivamente, las respuestas en concentración de grasa en la leche fueron también positivas (Baldi *et al.*, 1992; Teh *et al.*, 1994; Rousset et al., 1995), aunque de menor magnitud que en ovejas.

A diferencia de lo que ocurre en pequeños rumiantes, la incorporación de lípidos a la ración de vacas lecheras suele dar resultados muy variables (Chilliard *et al.*, 1993). En general, la adición de grasa no modifica la grasa de la leche, pero las respuestas dependen del tipo de suplemento utilizado. Siempre según la misma revisión, una cantidad moderada de grasas saturadas tiende a aumentar el nivel de grasa en la leche, pero la inclusión de grasas insaturadas suele provocar, generalmente, una depresión de la grasa de la leche. Los estudios indican resultados que varían desde una depresión tras la suplementación ya sea con un 7% de grasa animal (DePeters *et al.*, 1987), con 0,8 kg/d de soja extrusionada (Schingoethe *et al.*, 1988) o con un 4% de aceite de soja (Mohamed *et al.*, 1988), a ligeros incrementos tras utilizar semillas de soja sin tratar (entre 2,5 y 3%; Driver *et al.*, 1990; Knapp y Grummer, 1990).

### 5.3. Perfil de AG de la leche

Los productos animales proporcionan entre el 25 y el 35% del total de la materia grasa saturada consumida por los humanos, lo cual hace de estos productos la diana de las críticas de los dietistas. Sin embargo, frente a esta mala reputación de los AG saturados se tiene que tener en cuenta que algunos de ellos, como el ácido esteárico no tienen ningún efecto aterogénico, y que los que pueden tener un efecto aterogénico como los C12-C16 solo llegan a serlo en caso de consumo de altas cantidades (Chilliard *et al.*, 2006). El interés por incrementar el ratio n-3/n-6 de los PUFA, y el más reciente descubrimiento de las propiedades del CLA, en particular de su principal isómero, el ácido ruménico, son algunos de los objetivos básicos de las investigaciones orientadas a modificar el perfil de grasa de la leche mediante suplementos lipídicos. Existen varias revisiones de estos estudios como las de Kennelly *et al.* (1996), Chilliard *et al.* (2001a;b) y Chouinard *et al.* (2001) en vacas, Chilliard *et al.* (2003; 2006) en cabras, y Schmidely y Sauvant (2001) en cabras y ovejas. De forma general, la grasa de la leche suele tener aproximadamente un 70% de AG saturados. Alrededor de un 40-45% de los AG totales de la leche proviene del alimento, un 50% se sintetiza a nivel de la glándula mamaria y un 5-12% proviene de la movilización de reservas lipídicas. Los AG de cadena corta y media (hasta C16) se sintetizan en la glándula mamaria a partir del ácido acético y butírico (ver Figura 3), excepto el C16 que también puede ser de origen alimenticio (Palmquist y Mattos, 1978). El resto de AG, a partir de 16 átomos de carbonos, es de origen alimenticio.

En general, dado que la leche es relativamente saturada en relación a lo que sería recomendable en términos de salud humana (Grummer, 1991), se intenta modificar el perfil de

AG de la misma, incrementando la proporción de AG insaturados y AG esenciales, y/o aumentando la proporción de algunos intermediarios de la biohidrogenación de los AG insaturados, como es el caso del CLA (ver apartado 1.2.2), muy valorado recientemente por sus posibles efectos anticancerígenos y terapéuticos. También el TVA, precursor del CLA, considerado igual que aquel un alimento funcional, ha ganado importancia.

La suplementación con grasa afecta negativamente, y de forma lineal, la proporción de AG de cadena corta y media (generalmente de origen mamario) en favor de los de cadena larga, de origen alimenticio (Grummer, 1991). Tanto en vacas (Palmquist *et al.*, 1993a) como en ovejas (Gargouri, 1997), la suplementación con AG de aceite de palma (ricos en C16:0 y C18:1), aumentó las proporciones de C16:0 y C18:1, observándose una disminución de los AG de cadena corta y media. Por su parte, Eastridge y Palmquist (1988) observaron una depresión del contenido en C14 en vacas recibiendo el mismo tipo de aditivo. Estos resultados confirman la hipótesis de Clapperton y Banks (1985) según la cual el efecto negativo de la suplementación con grasa sobre el contenido en grasa de la leche se debe principalmente a que la síntesis mamaria de AG de cadena corta se ve inhibida por los AG de cadena larga, de origen alimenticio. Además los mismos autores indicaron que este efecto de inhibición es mayor con grasa insaturada, es decir que el ácido oleico, linoleico y linolénico pueden llegar a ser, en caso de ser mayoritarios, los principales responsables de esta inhibición de los AG de cadena corta. Este hecho puede suceder por ejemplo en el caso del aceite de soja, que contiene como AG mayoritario (55% de los AG totales) el ácido linoleico (C18:2) o en el caso del aceite de lino, que tiene como AG mayoritario el ácido linolénico.

Cabe señalar que el desarrollo de las características organolépticas de los derivados de la leche, y en especial de los quesos, está directamente relacionado con los AG libres, especialmente a los AG libres de cadena corta, por lo que la modificación del perfil de AG de la leche debe tener siempre en cuenta este factor debido a que el incremento de AG de cadena larga es frecuentemente acompañado por una disminución de los AG de cadena corta.

El efecto de la alimentación con semillas enteras de oleaginosas sobre el perfil de AG de la leche fue revisado por Kennelly *et al.* (1996) en vacuno de leche y Schmidely y Sauvant (2001) en pequeños rumiantes lecheros. La composición de los AG de la leche fue estudiada tras aportar semillas enteras o extrusionadas (de colza, rica en C18:1; de soja, rica en C18:2; y de lino, rica en C18:3). De manera global, las proporciones de AG de cadena corta y media

(hasta el C14) se reducen como consecuencia de la adición de semillas vegetales, mediante la inhibición de su síntesis mamaria por los AG de cadena larga, abundantes en este tipo de grasa y que se transfieren a la leche. Esta reducción en los AG de cadena corta es compensada por un incremento de la proporción de C18:1 (menos con aceite de pescado) y del C18:0, reflejando básicamente el bajo grado de protección de los AG de cara a la hidrogenación ruminal y la actividad de la Δ-9 desaturasa mamaria. Parece sin embargo que este incremento no es lineal, sino atenuado, lo que indica una probable saturación de la actividad de esta enzima, que aparece en su nivel máximo en el caso de vacas lecheras cuando las concentraciones de C18:1 *trans*-11 son bajas.

En ovejas lecheras, los datos de Wilkinson *et al.* (2000), suplementando con semillas de lino, asocian el incremento numérico del C18:1 *trans* con la reducción de la actividad de la Δ-9 desaturasa. Los efectos de las semillas vegetales no protegidas sobre las concentraciones de C18:2 y C18:3 varían según el tipo de semilla, dependiendo de su perfil de AG. Según Shmidely y Sauvant (2001), es posible obtener un incremento de la concentración del C18:2 con semilla de soja y del C18:3 con semillas de lino, a consecuencia de la probable protección que representa la semilla. Sin embargo, estos incrementos son generalmente muy bajos, de forma idéntica a lo que ocurre en vacas lecheras (Chilliard *et al.* 2000). Por otro lado, los datos de Pol (2003), utilizando semillas enteras de lino con ovejas lecheras, sugieren un aumento de C18:3 en leche, mientras los de Casals *et al.* (2006) utilizando jabones cárnicos de aceite de palma indican, al igual que en vacas lecheras, un incremento de las concentraciones de C16:0 y C18:1.

#### 5.4. Proteína de la leche

En general, la incorporación de lípidos a raciones de vacuno y de ovino lechero tiene un efecto negativo sobre la proteína de la leche. Varios autores señalaron esta depresión (Chilliard *et al.*, 1993; Palmquist *et al.*, 1993b; Tomlinson *et al.*, 1994; Beaulieu y Palmquist, 1995; Harrison *et al.*, 1995; Simas *et al.*, 1995; Elliot *et al.*, 1996), aunque la producción de proteína diaria suele aumentar (DePeters y Cant, 1992). Para explicar estos resultados, se han propuesto diversas hipótesis sobre el mecanismo de acción:

1. Un efecto de dilución de la proteína, como consecuencia del incremento de la producción de leche (DePeters y Cant, 1992; Doreau y Chilliard, 1992; Elliot *et al.*, 1993). Sin embargo, hay

otros casos en los que se observa una depresión del contenido proteico sin que sea acompañado por un incremento de la producción de leche (Palmquist, 1990; Gagliostro y Chilliard, 1991) por lo que esta hipótesis por si sola no explicaría el hecho.

2. Los lípidos alimenticios podrían originar un aumento de la resistencia a la insulina, provocando perturbaciones a nivel del transporte de los aminoácidos (Palmquist y Moser, 1981; Johnson *et al.*, 1988; Gagliostro *et al.*, 1991) y comprometiendo el contenido protéico de la leche.
3. Los lípidos alimenticios aumentan la concentración sanguínea de AG libres. Estos últimos podrían inhibir la liberación de somatotropina por parte de la hipófisis y por tanto la utilización de aminoácidos en la glándula mamaria (Schneider *et al.*, 1988; Casper *et al.*, 1990; Gaynor *et al.*, 1994).
4. Los lipidos convencionales pueden provocar una bajada de la ingestión de alimentos (Jerred *et al.*, 1990; Beaulieu y Palmquist, 1995) provocando, por lo tanto, una bajada de la ingestión tanto de proteína como de materia orgánica fermentable, limitando así la síntesis de proteína microbiana en el rumen.
5. La inclusión de lípidos en la ración aumenta la eficiencia energética para la síntesis de leche, de manera que se reduce el flujo de sangre requerido en la ubre para producir una determinada cantidad de leche y, como consecuencia, se produce una disminución de la cantidad de aminoácidos disponibles para la síntesis de la proteína láctea. Esta hipótesis, propuesta por DePeters y Cant (1992) y Cant *et al.* (1993), es la que ha obtenido más crédito en los últimos años, y la que, sin duda, mejor explica el problema de la caída del contenido protéico de la leche. De todas formas, tampoco es descartable que otros de los factores citados previamente influyan en mayor o menor medida.

Al igual que en vacas, también en ovejas los lípidos protegidos disminuyen la proteína de la leche. Según Casals (1992), Gargouri (1997) y Casals *et al.* (2006), la respuesta depende del nivel de aporte de grasa y del estado de lactación. La disminución de la proteína de la leche es muy moderada si se utilizan niveles bajos de grasa protegida. Con ovejas de raza Manchega, Casals *et al.* (2006) indicaron que el efecto negativo empieza a partir de la mitad de lactación y es más evidente al final, especialmente con dosis elevadas (más de un 15% de jabones cárnicos)

en el pienso), equivalentes a más de 100 g de jabones cárnicos por oveja y día. Según los datos revisados por Gargouri (1997), las respuestas más negativas se obtuvieron con niveles de lípidos ingeridos superiores a 150 g/d. En cuanto al estado de lactación, no se observaron descensos significativos de la proteína hasta la segunda mitad de la lactación. Con respecto a las cabras lecheras, tanto la revisión de Chilliard *et al.* (2003) como la de Chilliard y Ferlay (2004) afirman que, contrariamente a lo que suele suceder en vacas y ovejas lecheras, la proteína de la leche de cabras no se ve afectada por ningún tipo de suplemento lipídico.

## 5.5. Consumo de alimentos

Los lípidos, esencialmente los convencionales, pueden provocar una bajada de la ingestión de MS. Así por ejemplo, Kowalczyk *et al.* (1977), con ovejas, observaron que la ingestión de hierba deshidratada se redujo cuando consumieron dosis crecientes (2-4%) de sebo. Sin embargo, Jenkins y Fotouhi (1990) no observaron ninguna modificación de la ingestión tras suplementar con un 2,4% aceite de maíz o un 5,4% de lecitina de soja. Por su parte, Kitessa *et al.* (2001) indicaron una bajada del consumo de alimentos en cabras lecheras que recibieron un 3% de aceite de pescado. En vacuno lechero, el uso de diversas fuentes de grasa no protegida y a dosis relativamente altas condujo a la depresión del consumo de alimentos (Palmquist *et al.*, 1993b; Beaulieu y Palmquist, 1995). Por otro lado, y según Jenkins y Palmquist (1984), se observó una reducción de 2,6 kg/día de alimentos ingeridos cuando los animales recibieron sebo o jabones cárnicos de AG de aceite soja. De todas formas, según Allen (2000), la inclusión de lípidos en la raciones a dosis menores del 3% no suele afectar el consumo de alimentos en vacas lecheras. Las hipótesis propuestas para explicar la reducción del consumo de alimentos son varias. Choi y Palmquist (1996) la atribuyen al aumento de la hormona colecistoquinina que es inhibidora de la ingestión, Grummer *et al.* (1990) la relacionan con la reducción de la palatabilidad, y Palmquist (1990) sugiere que las vacas suplementadas con lípidos reducen su ingestión para regular la concentración plasmática de los AG.

## 5.6. Efectos no deseados

En la mayor parte de los estudios realizados en las últimas décadas, especialmente en vacuno lechero (Palmquist y Jenkins, 1980; Bauchart *et al.*, 1985; Jenkins, 1993), se ha indicado que los lípidos convencionales, especialmente aceites, pueden alterar los procesos digestivos del rumen, afectando esencialmente la digestibilidad de las estructuras fibrosas de la ración

(Jenkins, 1987; Jenkins y Jenny, 1989; Pantoja et al., 1996). Se sabe que los lípidos incorporados a la ración pueden inducir fenómenos de interacción digestiva negativa en el rumen. Estos fenómenos son más claros cuando se trata de AG insaturados (Broudiscou et al., 1994), observándose efectos negativos sobre la digestibilidad ruminal de las paredes vegetales y de la materia orgánica, y sobre el perfil de fermentación (Sauvant y Bas, 2001).

### 5.6.1. Digestibilidad de la fibra

Varios estudios (Brooks et al., 1954; Palmquist y Jenkins, 1980; Jenkins y Palmquist, 1984; Jenkins y Jenny, 1989; Jenkins y Fotouhi, 1990) indicaron que la suplementación con lípidos convencionales reduce la digestibilidad de la fibra en el rumen. Esta menor digestibilidad de la fibra conduce a un menor porcentaje de grasa en la leche, debido al descenso del ratio acético/propionico en el rumen, y también puede reducir la energía digestible útil para la producción de leche (Jenkins y Palmquist, 1984). En ovino, Jenkins y Fotouhi (1990) observaron que tanto la adición de lecitina como de aceite de maíz reducían la digestibilidad ruminal de la MS, de la FAD, de los AG y de la energía, y observaron también un efecto negativo sobre la digestibilidad del nitrógeno, no solamente en el rumen, sino también a nivel de todo el tracto digestivo. Además, los suplementos lipídicos redujeron la concentración de amoniaco en el rumen y el flujo de N en el intestino delgado. Por otro lado, este efecto tóxico de los lípidos insaturados sobre la actividad microbiana fue también demostrado por Ikwegbu y Sutton (1982), quienes suministraron a ovejas dosis crecientes de aceite de lino (0, 13, 26 ó 40 ml/d) observando que tanto la digestibilidad ruminal como la del total tracto digestivo de la FAD disminuyeron linealmente al aumentar la dosis de aceite de lino.

Kowalczyk et al. (1977), también en ovino, observaron que la digestibilidad de hierba deshidratada se redujo cuando se administraron dosis crecientes de sebo, pero no se modificó cuando dicha grasa se incorporó bajo forma de una suspensión líquida de tipo “by pass”, protegida contra la hidrólisis en el rumen. Por otra parte, Palmquist y Jenkins (1980) indicaron que el pH del rumen podría alterar también la digestibilidad de la fibra, pero no fue muy evidente la implicación directa de la grasa añadida a la ración en los trastornos de pH. Sin embargo, Beitz y Davis (1964) no observaron ningún cambio en el pH ruminal después de administrar 225 g al día de aceite de hígado de bacalao a vacas lecheras. Por otro lado, Moharrery y Das (2001) observaron una actividad celulolítica creciente en el rumen de ovejas tras la incorporación de un 5% de aceite de cacahuete a la ración, por lo que en los últimos

años se ha puesto en cuestión la posible toxicidad de la grasa y sus efectos negativos sobre la digestibilidad de la fibra. Las recomendaciones prácticas indican que se puede añadir hasta un 2 a 3% de grasa a raciones de rumiantes sin alterar significativamente la digestión (Jenkins y Fotouhi, 1990).

### 5.6.2. Metabolismo del rumen

Varios autores (Palmquist y Jenkins, 1980; Bauchart *et al.*, 1985; Jenkins, 1987; Sauvant y Bas, 2001) confirmaron que el uso de lípidos convencionales o no protegidos altera el proceso de fermentación ruminal en los rumiantes, y en particular también en el caso de ovejas (Jenkins y Fotouhi, 1990). De entre las propiedades de la grasa, una de las que más influye sobre la actividad ruminal es su grado de instauración. Los lípidos insaturados son de lejos más tóxicos para las bacterias del rumen que los saturados (Palmquist y Jenkins, 1980; Henderson, 1973; Maczulak *et al.*, 1981).

El efecto principal de los lípidos, sobre todo insaturados, sería alterar la accesibilidad de los microorganismos del rumen a la fibra, ejerciendo una cobertura física sobre la misma e impidiendo su contacto con las bacterias o con las enzimas hidrolíticas (Devendra y Lewis, 1974; Harfoot *et al.*, 1974), así como modificar las proporciones de AGV debido a la disminución del porcentaje de los ácidos butírico y acético. Este hecho suele tener como consecuencia la bajada de la grasa de la leche (Sauvant y Bas, 2001; Jenkins, 1987; Palmquist y Jenkins, 1980). Además, se ha observado que la producción de metano se reduce a causa del aporte de lípidos, particularmente si son de origen vegetal (Sauvant y Bas, 2001). Este último resultado indica que el aporte de AG insaturados interfiere en el metabolismo del hidrógeno.

Finalmente, las concentraciones bacterianas y sobre todo la densidad de protozoos, pueden ser reducidas por el aporte de lípidos insaturados y no protegidos (aceites vegetales). Los AG provocan una modificación de la población microbiana del rumen, debido a su posible efecto tóxico sobre algunos microorganismos (Palmquist y Jenkins, 1980; Jenkins, 1987; Sauvant y Bas, 2001), afectando también de esta forma la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana. Según Sauvant y Bas (2001), las concentraciones bacterianas, y en particular la densidad de protozoos, se reducen tras el aporte de lípidos insaturados y no protegidos (aceites vegetales, especialmente aceite de lino y aceites marinos). Además, se ha observado un efecto citotóxico directo de los lípidos que, al parecer, inhiben el crecimiento de los

microorganismos fibrolíticos (Michalet-Doreau *et al.*, 1985; Jenkins, 1993) debido a una posible desorganización de la función celular y de la membrana. Por otro lado, las materias grasas captan los cationes  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , que resultan vitales para el funcionamiento de las bacterias (Palmquist y Jenkins, 1980), impidiendo de esta forma su llegada a las bacterias, lo que contribuye en reducir la actividad bacteriana.

## 6. USO DE ENZIMAS FIBROLITICAS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

Las enzimas son catalizadores biológicos de los procesos metabólicos y juegan un papel importante en todas las vías metabólicas de digestión (Wenk, 1992). De forma general, son grandes proteínas tridimensionales con un peso molecular oscilando entre 20 y 70 kDa. Las enzimas necesitan contacto óptimo y continuo con el substrato, y tienen unos rangos óptimos de pH y de temperatura que les permiten una actividad enzimática máxima. Asimismo, la eficiencia de la actividad enzimática es reducida en el caso de no haber en el medio donde actúan suficiente substrato como para saturarlas.

### 6.1. Objetivos

En la actualidad los complejos de enzimas fibrolíticas se utilizan frecuentemente como aditivos en los piensos de monogástricos y con menos asuidad en los de rumiantes, con diferentes fines. Carro y Ranilla (2001), McAllister *et al.* (2001) y Caja *et al.* (2003), de forma general, resumen los objetivos del uso de enzimas fibrolíticas en los siguientes puntos: 1) aumentar la digestibilidad de los nutrientes, 2) eliminar factores antinutritivos de los alimentos, 3) complementar la actividad de las enzimas endógenas de los propios animales y, 4) reducir la excreción de ciertas substancias (p.e. fósforo y nitrógeno) que contaminan el medio ambiente.

En la producción de rumiantes, los preparados enzimáticos se pueden utilizar también en los forrajes destinados al ensilado. En este caso, las enzimas inician la degradación de las paredes celulares, liberando azúcares solubles. Posteriormente, durante el proceso de ensilado, estos azúcares liberados son fermentados por microorganismos que producen ácido láctico, ocasionando un descenso del pH, mejorando así la conservación del ensilado (Carro y Ranilla, 2001).

### 6.2. Fuentes de enzimas utilizadas

Si bien la gama de productos enzimáticos comerciales es grande y variada, la mayoría de los disponibles en el mercado suelen ser extractos concentrados obtenidos de fermentaciones de tres especies fúngicas: *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus Níger* y *Aspergillus oryzae*, que no contienen células microbianas ya que el producto se separa tras la fermentación de

cepas fungicas (Beauchemin *et al.*, 2003). Por el contrario, otros productos enzimáticos pueden proceder esencialmente de alguna de las siguientes especies bacterianas: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*.

En general, las preparaciones comerciales enzimáticas destinadas a los rumiantes se caracterizan por su capacidad de degradar las paredes celulares de los vegetales y por eso se clasifican principalmente como celulasas o xilanases. Sin embargo, ninguno de los preparados comerciales esta formado por una sola enzima, sino que todos presentan actividades enzimáticas secundarias como amilasa, proteasa o pectinasa (McAllister *et al.*, 2001). Por otra parte, y dentro de la misma especie microbiana, los tipos y actividades de las enzimas producidas pueden variar dependiendo de la cepa seleccionada, del medio y de las condiciones de cultivo (Gashe, 1992).

### 6.3. Vías de acción

Los efectos positivos sobre parámetros productivos (apartados 6.7 y 6.8) que se suelen atribuir a las enzimas fibrolíticas están directamente relacionados con su posible efecto sobre la digestibilidad de los nutrientes en el tracto total. En este sentido, McAllister *et al.* (2001) propusieron varias vías de acción como: 1) la hidrólisis previa del alimento, 2) mejora de la fijación de los microorganismos sobre la partícula de alimento, 3) cambios en la viscosidad intestinal y, 4) acción complementaria junto a las enzimas endógenas del rumen.

Tres factores principales hacen complicada la aclaración de los mecanismos que intervienen en el efecto de las enzimas fibrolíticas sobre la digestión de alimentos (Colombatto *et al.*, 2003): 1) los alimentos son estructuras muy complejas, que contienen una gran variedad de componentes como polisacáridos, proteínas, lignina y ácidos fenólicos, y que están estrechamente enlazados; 2) los productos enzimáticos son mezclas de enzimas con diferentes actividades y diferentes condiciones optimas de actuación; y 3) el líquido ruminal es en si un ecosistema microbiano altamente complejo, con cientos de especies microbianas y las respectivas enzimas que secretan.

Según Beauchemin *et al.* (1999), la aplicación de enzimas a forrajes secos puede mejorar la fijación de las mismas sobre el substrato, lo cual incrementa su resistencia a sufrir proteolisis y permite maximizar de esta forma su tiempo de estancia en el rumen. En cambio, las enzimas

aplicadas al ensilado o a las raciones totales mezcladas inmediatamente antes de ofrecerlas a los animales, pueden ser liberadas en el líquido ruminal antes de que puedan asociarse a partículas de alimento y actuar. En este caso, tendrían más impacto en el intestino delgado, donde según los mismos autores podrían alterar la digestión y la absorción de nutrientes.

#### 6.4. Efectos sobre el alimento previos a la ingestión

Se ha demostrado en diversas ocasiones que la aplicación de enzimas exógenas a los alimentos antes de que estos sean consumidos permite liberar azúcares reductores (Beauchemin y Rode, 1996; Hristov *et al.*, 1996). La liberación de azúcares proviene, al menos parcialmente, de la solubilización de FND y de FAD (Hristov *et al.*, 1996) y se considera un indicador de la actividad fibrolítica. La mayoría de trabajos asocian el grado de liberación de azúcares tanto con el tipo de alimento como con el tipo de enzima utilizado. Así, Sheperd y Kung (1996) observaron una disminución de la FND, de la FAD y de la hemicelulosa y un aumento del contenido en glucosa en ensilado de maíz, al aplicar enzimas básicamente celulolíticas y hemicelulolíticas.

Sin embargo, no se han descrito efectos sobre la digestión *in situ* o *in vitro* de la MS (Feng *et al.*, 1996; Hristov *et al.*, 1996). Estos autores concluyeron que los aditivos enzimáticos degradan únicamente los substratos digeribles de forma natural por las enzimas endógenas de la microflora ruminal. Posteriormente, McAllister *et al.* (2001) observaron que altas concentraciones de enzimas fibrolíticas pueden causar la aparición de orificios en las paredes celulares de la paja de cebada, sin embargo este efecto de degradación no fue observado al utilizar las concentraciones recomendadas por la industria.

En el caso de los ensilados, Sheperd *et al.* (1995) observaron que el uso de un aditivo enzimático de actividad celulasa, amilasa y pectinasa, mejoró la fermentación del ensilado, acelerando la caída de pH, aumentando su contenido en MS y bajando su contenido en FAD. Sin embargo, observaron una disminución de la digestibilidad *in vitro* de la FND, atribuible a una posible acción anterior de las enzimas que, probablemente, habrían hidrolizado gran parte de la fracción digerible del forraje en el silo. Por otro lado, las enzimas exógenas tienden a liberar carbohidratos solubles, aunque la parte liberada representa una proporción menor de los carbohidratos presentes en la ración. En cualquier caso, es difícil atribuir únicamente las respuestas positivas observadas a la liberación de carbohidratos previa al consumo del

alimento tratado (MacAllister *et al.*, 2001). Por tanto, es de esperar que al menos una parte de las respuestas productivas observadas sea explicada también por modificaciones tanto a nivel de la digestión ruminal como post-ruminal.

### 6.5. Efecto a nivel ruminal e intestinal

Hasta hace pocos años, se asumía que las enzimas exógenas se degradaban rápidamente en el rumen a causa de las proteasas producidas por los propios microorganismos ruminantes (Kung, 1996) lo que implicaría una evidente caída de su actividad enzimática en dicho medio. Dicha caída de la actividad enzimática en el líquido ruminal se asociaría tanto a la desactivación de las enzimas como a su salida con la fase líquida del contenido ruminal. Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que, en algunos casos, la actividad enzimática puede permanecer constante después de 6 horas de incubación con líquido ruminal (Hristov *et al.*, 1998). Por otra parte, al aplicar un complejo de enzimas fibrolíticas exógenas a vacas, Hristov *et al.* (2000) observaron un aumento de la actividad xilanasa y celulasa en el rumen.

Diferentes autores han concluido que las enzimas exógenas mejoran la degradación de la fibra por los microorganismos del rumen, tanto en condiciones *in vitro* (Feng *et al.*, 1996; Hristov *et al.*, 1996) como *in situ* (Lewis *et al.*, 1996). A pesar de la capacidad de las enzimas fibrolíticas de incrementar la actividad xilanasa y celulasa en el mismo líquido ruminal, la actividad enzimática en la fracción líquida no representa más de un 30% de la actividad enzimática total del rumen, siendo mayoritaria la parte asociada a las partículas del alimento (Brock *et al.*, 1982). La aplicación previa al consumo de enzimas fibrolíticas a un heno de hierba incrementó *in vitro* las actividades endo-glucanasa y xilanasa en el líquido ruminal, pero este incremento representa solo un 0,5% la actividad total endo-glucanasa del rumen (Dong *et al.*, 1999). Por lo tanto, las enzimas exógenas aportarían solamente una pequeña fracción de la actividad enzimática del rumen (MacAllister *et al.*, 1994). Otros autores, como McAllister *et al.* (2001), en vacuno, y Wallace *et al.* (2001), *in vitro* y utilizando líquido ruminal de oveja, concluyeron que es poco probable que las enzimas exógenas mejoren la digestión ruminal de la fibra únicamente a través de la hidrólisis directa.

Mejorar la digestión de la fibra a nivel del rumen parece más probable en el caso de productos enzimáticos que funcionan de manera sinérgica con los propios microorganismos del rumen. Lógicamente, este concepto sugiere que la preparación enzimática debería aportar actividades

que normalmente limitan la digestión de las paredes celulares de las plantas por parte de los propios microorganismos del rumen (MacAllister *et al.*, 2001). Respecto al ritmo de paso, las enzimas parecen mejorar (Feng *et al.*, 1996) el ritmo de paso de partículas desde el rumen lo cual implica un incremento de consumo voluntario del animal. El aumento de dicho ritmo puede explicarse por una mayor velocidad de reducción del tamaño de partícula (Mertens *et al.*, 1984). Sin embargo, en otros estudios (Krause *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 1998) la mejora de la digestión no se vio acompañada de aumentos del consumo de alimentos ni del ritmo de paso de partículas. Estos trabajos sugieren que una parte de los efectos de las enzimas fibrolíticas pueden ser post-ruminales.

En cuanto a la acción de las enzimas fibrolíticas en el intestino, Hristov *et al.* (1998; 2000) observaron que las enzimas exógenas no sólo mejoraban la actividad fibrolítica en el rumen sino también en el intestino delgado. Este fenómeno fue evidente sobre todo en el caso de la actividad xilanasa que se incrementó hasta un 30% al aplicar enzimas fibrolíticas (Hristov *et al.*, 1998). En el mismo estudio, el suplemento enzimático incrementó la actividad celulasa en el intestino delgado solo del orden de 2-5%, principalmente porque este tipo de enzimas son altamente desactivadas por el bajo pH y la pepsina presentes a nivel del estómago. Por otra parte, también es posible que las enzimas funcionen sinérgicamente con los microorganismos, incluso en el intestino grueso. Hristov *et al.* (2000) demostraron que la actividad xilanasa en las heces aumenta de forma lineal con niveles crecientes de suplementos enzimáticos. Este aumento de la actividad fibrolítica puede tener consecuencias importantes respecto a la velocidad de descomposición de heces en el medio ambiente.

## 6.6. Efecto sobre la digestibilidad de los alimentos

En la actualidad, se dispone de muchos datos procedentes de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestran el efecto positivo que tiene la adición de enzimas fibrolíticas sobre la digestibilidad de los nutrientes de la ración. Barcena y Peralta (2001) concluyeron que las enzimas exógenas mejoraron la digestibilidad de la MS y de la MO de la alfalfa, siendo la mejora superior en presencia de microorganismos del rumen (líquido ruminal), debido a una posible acción sinérgica entre las enzimas exógenas y la flora ruminal. Por otra parte, Wang *et al.* (2001) estudiaron el efecto de enzimas fibrolíticas *in vitro* (en un sistema RUSITEC), incubando líquido ruminal de vacas lecheras, y observaron un incremento de la digestibilidad de la MS y una bajada del contenido de FND al utilizar cebada en grano como substrato, pero

no fue el caso cuando se utilizó heno de alfalfa. En condiciones *in vitro* más controladas, en un sistema de cultivo continuo, Yang *et al.* (2002) observaron que las enzimas exógenas mejoraron la digestibilidad de la MS, MO, FND y la FAD, pero no la de la proteína.

En ensayos *in vivo* con ovejas lecheras, Lee *et al.* (2000) observaron que la administración de cultivos de hongos con actividad fibrolítica aumentó la digestibilidad de la mayoría de los nutrientes (MS, MO, PB y celulosa). De igual forma, González *et al.* (2002), en cabras lecheras, obtuvieron mejoras en las digestibilidades *in vivo* de la MS y de la MO sin observar ningún cambio en las digestibilidades de la FND ni de la FAD.

En terneros, Beauchemin *et al.* (1995) observaron incrementos de la digestibilidad de la FAD y Feng *et al.* (1996) de la MS y FND. En ambos estudios, las enzimas se aplicaron con anterioridad al consumo del alimento por los animales. En ensayos con vacas lecheras, Beauchemin *et al.* (2000) obtuvieron un incremento de la digestibilidad total de la MS en el tracto total, tras la aplicación de un aditivo con actividades principalmente  $\beta$ -glucanasa, xilanasa y endocelulasa. En otros trabajos la suplementación con enzimas exógenas con actividad celulasa y xilanasa dio mayores rendimientos de producción de leche. Según los autores, la respuesta productiva fue una consecuencia directa del incremento de la digestibilidad, respectivamente, de la MO, FND y PB (Yang *et al.*, 1999), y de la MS y la FND (Beauchemin *et al.*, 1997).

Sin embargo, las respuestas a la utilización de enzimas fibrolíticas son variables, y algunos autores han concluido que una posible mejora de la digestibilidad de los nutrientes puede depender del alimento, ya que en algunos casos se obtuvieron incrementos con cebada en grano, pero no con heno de alfalfa (Wang *et al.*, 2001), y en otros se mejoró la digestibilidad del heno de hierba pero no la de forrajes frescos (Feng *et al.*, 1996). Por otra parte, se sabe que la respuesta al tratamiento con enzimas fibrolíticas no es lineal, tal como observaron Beauchemin *et al.* (2000), que no obtuvieron ningún resultado al administrar altas concentraciones de enzimas.

## **6.7. Resultados productivos en vacuno**

Los estudios sobre la utilización de enzimas fibrolíticas en rumiantes se han llevado a cabo principalmente en vacuno de leche. En estos trabajos se estudiaron varias formas de

aplicación (producto sólido o líquido) y diferentes dosis de complejos enzimáticos oscilando entre 0 y 5 g/kg (Kung *et al.*, 2000; Beauchemin *et al.*, 2003). Por otra parte se estudió la aplicación previa de las enzimas a diferentes fracciones de la ración (forraje o concentrado) y a raciones con diferentes relaciones forraje/concentrado.

Los datos sintetizados en la tabla 6.1 presentan una gran variabilidad de resultados productivos de las vacas lecheras en respuesta a la adición de enzimas fibrolíticas a sus raciones. En términos generales las vacas que recibieron enzimas fibrolíticas ingirieron la misma cantidad de alimentos que las que no los recibieron. Sin embargo, Sánchez *et al.* (1996), con dosis entre 1,25 y 5 g/kg aplicadas a la parte forrajera, y Beauchemin *et al.* (2000) aplicando dosis de 1,2 o de 3,6 g/kg al concentrado, observaron incrementos de la ingestión de alimentos.

En términos de producción de leche, de los 14 ensayos descritos en la tabla 6.1 sólo 3 entre ellos presentan respuestas positivas que, además, no son lineales. Sánchez *et al.* (1996), en vacas al principio de lactación que recibieron enzimas aplicadas al forraje, obtuvieron un incremento de producción únicamente con la dosis de 2,5 g/kg mientras que no hubo mejoras con las otras dosis (1,2 y 5 g/kg). En el mismo sentido, Kung *et al.* (2000), en vacas en mitad de lactación y aplicando la enzima al forraje, describieron un incremento de producción con una dosis de 2 g/kg mientras que una dosis más alta (5 g/kg) bajó la producción. El ensayo de Yang *et al.* (1999) confirmó también la dosis señalada por los dos anteriores como la más eficiente. En este ensayo, vacas en principio de lactación y con la enzima aplicada al forraje, dieron más leche con la dosis de 2 g/kg que con la de 1 g/kg, mientras que las vacas que recibieron el producto enzimático aplicado al concentrado tampoco dieron respuestas positivas.

La adición de enzimas fibrolíticas, aparte de mejorar la producción, generó en algunos casos cambios en la composición de la leche que tampoco parece variar de forma lineal en función de la dosis de enzimas. Kung *et al.* (2000) obtuvieron resultados tanto de la grasa como de la proteína en el mismo sentido que la producción de leche, es decir, incremento con la dosis de 2 g/kg y caída con la de 5 g/kg. Sánchez *et al.* (1996) observaron una caída de la grasa de la leche en las vacas que incrementaron su producción por el mismo tratamiento. En otros casos en donde no se obtuvieron respuestas positivas en producción, la composición de la leche parece responder también a las enzimas fibrolíticas. Beauchemin *et al.* (1999; 2000)

observaron incrementos del contenido proteico tras añadir 2,5 g/kg de enzimas a la cebada, al igual que Sutton et al. (2003) tras aplicar 2 g/kg de enzimas al concentrado, mientras que no ocurrió nada cuando las aplicó a la ración total mezclada o mediante infusión directa en el rumen.

También en vacuno de carne, se han llevado a cabo varios trabajos en la década de los noventa para estudiar el uso de enzimas exógenas en raciones de alto contenido en forrajes verdes. En varios de ellos se observaron mejoras en la eficacia de utilización de alimentos gracias al tratamiento con enzimas fibrolíticas (Beauchemin et al., 1995; McAllister et al., 1999), pero las respuestas fueron variables dependiendo del estado fisiológico del animal y de las condiciones del experimento. De hecho, en el mismo estudio en que se observaron resultados positivos en la ganancia diaria de peso (Beauchemin et al., 1995) al aplicar las enzimas al granulado de alfalfa, no se obtuvo ningún efecto del mismo producto y a las mismas dosis de incorporación cuando se aplicó al ensilado. De forma similar, otros trabajos como los de McAllister et al. (1999), con una dosis de entre 1,25 y 3,5 g/kg de la MS de ensilado, y de Zobell et al. (2000), que utilizaron 2 g de producto enzimático por kg de MS de la ración total mezclada, indican la ausencia de efectos de las enzimas fibrolíticas.

Por otra parte, y contrariamente a lo esperado, los resultados de la aplicación de enzimas exógenas a raciones de alto nivel de concentrado fueron más consistentes y estables que los obtenidos con raciones de alto nivel forrajero. Con un producto enzimático a base de xilanasa a una dosis de entre 2 y 2,5 g/kg MS de la ración (Beauchemin et al., 1997; 1999; Iwaasa et al., 1997) se obtuvieron mejoras del 6 al 12% en la eficacia de utilización del alimento, debido básicamente al incremento de la digestibilidad de la ración (Iwaasa et al., 1997). En cualquier caso, hubo también respuestas variables, pues como se ha indicado, Zobell et al. (2000) no observaron ningún efecto en raciones que contenían un 80% de concentrado.

## 6.8. Resultados productivos en pequeños rumiantes

Hay muy poca literatura que estudie el efecto de las enzimas fibrolíticas sobre los resultados productivos de ovino. La mayoría de estudios sobre el efecto de enzimas en ovino se han centrado en estudiar la digestibilidad y los parámetros ruminales y no las respuestas productivas. Fredeen y McQueen (1993) observaron que las enzimas incrementaron la ingestión de materia seca y su digestibilidad. Resultados similares fueron observados por

Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) en corderos alimentados con heno de alfalfa o de ray-grass y recibiendo una aplicación ruminal diaria de 5 g de enzimas fibrolíticas. El complejo enzimático incrementó la ingestión de alimentos y la concentración total de AGV, así como la digestibilidad de proteína y de la fibra, pero únicamente en el caso del heno de alfalfa.

Sin embargo, otros autores no obtuvieron ninguna respuesta al tratamiento con enzimas fibrolíticas. McAllister *et al.* (1999) concluyeron que las enzimas aplicadas al ensilado o por infusión directa en el rumen no afectaron la ingestión de alimentos, las digestibilidades de la MS y la FND, ni el número de bacterias celulolíticas. De igual forma, McAllister *et al.* (2000) no observaron ningún efecto de las enzimas sobre la ingestión de alimentos, la ganancia de peso ni la digestibilidad de nutrientes en corderos alimentados con raciones tanto forrajeras como ricas en concentrado. Por su parte, Yang *et al.* (2000), utilizando corderos para predecir el efecto de la adición de enzimas sobre la digestibilidad de los nutrientes de una ración de vacuno lechero, no observaron tampoco ninguna respuesta.

En ensayos posteriores en que se estudiaron parámetros productivos, aplicando al concentrado una dosis de 0,47 g/kg de un producto enzimático con actividad celulasa y xilanasa, se concluyó que, con esta dosis y modo de aplicación, el suplemento enzimático fibrolítico no mejoraba los resultados productivos de ovejas (Flores, 2004) ni de cabras (González, 2004) lecheras. En cambio, Titi y Lubbadeh (2004), aplicando también un producto con actividad xilanasa y celulasa a una dosis de 0,15 g/kg de heno, observaron un incremento del 5% en la producción de leche, tanto de ovejas como de cabras, y una mayor concentración de grasa y proteína de la leche. Su conclusión fue que la suplementación con enzimas fibrolíticas mejora la producción de leche sin incremento del consumo de los alimentos, lo cual sugiere una mejora en la eficacia de utilización de los mismos.

Por tanto se observa que las respuestas a las enzimas fibrolíticas son muy variables y, en algunos casos, contradictorias. Tal como se ha hecho en vacuno, también en pequeños rumiantes surge la necesidad de prestar especial importancia al modo de aplicación y a la elección de la actividad enzimática y de la dosis de aplicación de los complejos enzimáticos a fin de optimizar el funcionamiento de este tipo de aditivos.

**Tabla 6.1.** Efectos sobre los parámetros productivos de la utilización de enzimas fibrolíticas en vacas lecheras

Autores	Fase de lactación	Relación F:C	Método de aplicación enzimas (dosis MS)	Resultados			
				IMS (kg/d)	Producción (kg/d)	Grasa en leche (%)	Proteína en leche (%)
Fredden y McQueen (1993)	Media	72:38	Control	18,8	22,8	4,4	3,7
			Silo (1,50 l/t) 1er corte	19,3	22,0	4,4	3,7
	Media	72:38	Control	21,4	24,0	4,16 <sup>a</sup>	3,66
			Silo (1,50 l/t) 2ndo corte	21,3	24,1	4,1 <sup>ab</sup>	3,68
Sánchez <i>et al.</i> (1996)	Principio	—	Control	24,4 <sup>a</sup>	39,6 <sup>b</sup>	3,99 <sup>a</sup>	2,95 <sup>a</sup>
			Forraje (1,25 l/t)	26,2 <sup>b</sup>	40,8 <sup>b</sup>	3,83 <sup>ab</sup>	2,87 <sup>b</sup>
			Forraje (2,5 l/t)	26,2 <sup>b</sup>	45,9 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>	2,88 <sup>b</sup>
			Forraje (5 l/t)	26,6 <sup>b</sup>	41,2 <sup>b</sup>	3,75 <sup>ab</sup>	2,85 <sup>b</sup>
	Beauchemin <i>et al.</i> (1999)	Media	45:55	Control	22,3	29,9	3,7
			Cebada (2,5 g/kg)	22	30,2	3,9	3,28 <sup>b</sup>
			Control	21,8	31,0	3,72	3,27 <sup>b</sup>
			Cebada descascarada (2,50 g/kg)	22,5	32,5	3,75	3,28 <sup>b</sup>
			Forraje (0,70 l/t)	20,6	25,1	3,7	3,3
Schingoethe <i>et al.</i> (1999)	Media	55:45	Forraje (1,00 l/t)	21,4	26,2	3,8	3,4
			Forraje (1,50 l/t)	20,3	26	3,9	3,4
			Control	22,3	27,8	3,8	3,4
			Concentrado (1,30 g/kg)	18,7	35,9	3,87 <sup>b</sup>	3,24
Rode <i>et al.</i> (1999)	Principio	39:61	Control	19,0	39,5	3,37 <sup>a</sup>	3,03
			Concentrado (1,00 l/t)	20,4	23,7 <sup>b</sup>	3,79	3,36
Yang <i>et al.</i> (1999)	Principio	55:45	Alfalfa (1,00 l/t)	20,7	24,6 <sup>ab</sup>	3,88	3,41
			Alfalfa (2,00 l/t)	20,7	25,6 <sup>a</sup>	3,8	3,48
			Concentrado (1,00 l/t)	20,8	25,3 <sup>ab</sup>	3,82	3,49
			Control	20,5 <sup>b</sup>	31,3	3,61	3,28 <sup>b</sup>
Beauchemin <i>et al.</i> (2000)	Principio	45:55	Concentrado (1,2 l/t)	22,0 <sup>a</sup>	30,8	3,62	3,34 <sup>a</sup>
			Concentrado (3,67 l/t)	21,6 <sup>a</sup>	30,8	3,62	3,35 <sup>a</sup>
			Control	22,0	37,0 <sup>a</sup>	2,80 <sup>ab</sup>	3,14 <sup>ab</sup>
Kung <i>et al.</i> (2000)	Media	50:50	Forraje (2,00 l/t)	22,5	39,5 <sup>b</sup>	2,91 <sup>b</sup>	3,19 <sup>b</sup>
			Forraje (5,00 l/t)	21,8	36,2 <sup>a</sup>	2,52 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>
			Control	27,1	39,5	3,29	3,16
Dhiman <i>et al.</i> (2002)	Principio	51 :49	Forraje (1,30l/t)	27,5	38,7	3,21	3,09
Kung <i>et al.</i> (2002)	Principio	45:55	Control	26,9	37,2	3,33	3,10
			Forraje (10,0 l/t)	27,2	36,8	3,29	3,09
Sutton <i>et al.</i> 2003	Principio	57:43	Control	20,7	34,0	4,04	3,36 <sup>b</sup>
			TMR (2,0 g/kg)	21,1	35,5	3,61	3,35 <sup>b</sup>
			Concentrado (2,0 g/kg)	20,9	34,5	3,72	3,45 <sup>a</sup>

			Infusión rumen (2,0 g/kg)	20,4	35	3,93	3,35 <sup>b</sup>
Vicini <i>et al.</i> 2003	Principio 57:43	Control	18,5	28,2	3,95	3,34	
		Forraje (1,25 l/t)	18,3	27,9	3,83	3,35	
		TMR (2,0 l/t)	18,3	28,8	3,69	3,36	
	48:52	Control	21,2	32,9	3,73	3,15	
		Forraje (1,25 l/t)	21,6	32,5	3,7	3,17	
		TMR (2,0 l/t)	21,4	32,4	3,71	3,17	

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AbuGhazaleh, A. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, and K. F. Kalscheur. 2003. Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profiles. *J. Dairy Sci.* 86:944–953.
- Akahoshi A., K. Koba, S. Ohkura-Kaku, N. Kaneda, C. Goto, H. Sano, T. Iwata, Y. Yamauchi, K. Tsutsumi, and M. Sugano. 2003. Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats. *Nut. Res.* 23 (12):1691-1701.
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598–1624.
- Álvarez-Nogal, P. J. 2004. Alteración de la síntesis de grasa láctea a través de la alimentación de las vacas lecheras. *Producción Animal.* 204:56-74.
- Antongiovanni, M., M. Mele, A. Buccioni, F. Petacchi, A. Serra, M. P. Melis, L. Cordeddu, S. Banni, and P. Secchiari. 2004. Effect of forage/concentrate ratio and oil supplementation on C18:1 and CLA isomers in milk fat from Sarda ewes. *J. Anim. Feed Sci.* 13(Suppl.1):669–672.
- Atkinson, R. L. 1999. Conjugated linoleic acid for altering body composition and treating obesity. In: Yurawecz, M. P., M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, G. Nelson, editors. *Advances in conjugated linoleic acid research*, vol. 1. Champaign: AOCS Press, pp. 348–353.
- Auldist, M. J., B. J. Walsh, and N. A. Thomson. 1998. Seasonal and lactation influences on bovine milk composition in New Zealand. *J. Dairy Res.* 65:401–411.
- Azain, M. J., D. B. Hausman, M. B. Sisk, W. P. Flatt, and D. E. Jewell. 2000. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J. Nutr.* 130:1548–1554.
- Baldi, A., F. Cheli, C. Corino, V. DellOrto, and F. Polidori. 1992. Effect of feeding calcium salts of long chain fatty acids on milk yield, milk composition and plasma parameters of lactating goats. *Small Rum. Res.* 6:303-310.
- Barcena, R., y M. C. Peralta. 2001. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad in vitro de MS y MO de Alfalfa (*Medicago Sativa*) y Ballico (*Lolium Perenne*). *Revista científica FCV-LUZ.* 11 (6):510-516.
- Bauchart, D., M. Doreau et F. Legay-Carmier. 1985. Utilisation digestive des lipides et conséquences de leur introduction sur la digestion du ruminant. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA.* 61:65-77.

- Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, and J. M. Griinari. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* Available at: [www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf](http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf).
- Bauman, D. E., B. Corl, L. Baumgard, J. Griinari. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.). *Recent Advances in Animal Nutrition*, Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 221–250.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Prod. Sci.* 70:15-29.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, and V. J. H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages (short communication). *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin, K. A., and L. M. Rode. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: Rode L. M. (Ed.) *Animal Science Research and Development, Meeting Future Challenges*. Minister of Supply and Services Canada, Ontario, pp. 103-131.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, and W. Z. Yang. 1997. Final report to biovance technologies: enzymes as feed additives for lactating dairy cows. Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, Alberta, September 8th.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, M. Maekawa, D. P. Morgavi, and R. Kampen. 2000. Evaluation of a non starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:543-553.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, and W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E Suppl. 2):E37-E47.
- Beaulieu, A. D., and D. L. Palmquist. 1995. Differential effects of high diets on fatty acids composition in milk of Jersey and Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 78:1336-1344.
- Beguin, P., and J.P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13(1):25-58.
- Beitz, D. C., and C. L. Davis. 1964. Relationship between certain milk fat depressing diets to changes in the proportions of volatile fatty acids produced in the rumen. *J. Dairy Sci.* 47:1213-1221.

- Bell, J. A., J. M. Griinari, and J. J. Kennelly. 2006. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89:733–748.
- Belury, M. A., and J. P. Vanden Heuvel. 1999. Modulation of diabetes by conjugated linoleic acid. In: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, G. Nelson, editors. *Advances in conjugated linoleic acid research*, vol. 1. Champaign: AOCS Press, p. 404–411.
- Bernal-Santos, G., J. W. Perfield, D. M. Barbano, D. E. Bauman, and T. R. Overton. 2003. Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:3218-3228.
- Bernard, L., J. Rouel, C. Leroux, A. Ferlay, Y. Faulconnier, P. Legrand, and Y. Chilliard. 2005. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in Alpine goats fed vegetable lipids. *J. Dairy Sci.* 88:1478–1489.
- Blankson, H., J. A. Stakkestad, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein, and O. Gudmundsen. 2000. Conjugated Linoleic Acid Reduces Body Fat Mass in Overweight and Obese Humans. *J. Nutr.* 130:2943–2948.
- Bloor, W.R. 1943. Biochemistry of the Fatty Acids and their Compounds, the Lipids. In: American Chemical Society Monograph Series. Reinhold Publishing Corporation, 330 West Forty-Second Street, New-York, U.S.A.
- Bocquier, F et G. Caja. 2001. Production et composition du lait de brebis: effets de l'alimentation. *INRA Prod. Anim.* 14:29-140.
- Booth, R. G., S. K. Kon, W. J. Dann, and T. Moore. 1935. A study of seasonal variation in butter fat. II. A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. *Biochem. J.* 29:133-137.
- Brock, F. M., C. W. Forsberg, and J. G. Buchanan-Smith. 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Applied Environmental Microbiology.* 44:561-569.
- Brodie A. E., V. A. Manning, K. R. Ferguson, D. E. Jewell, C. Y. Hu. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J. Nutr.* 129:602–606.
- Brooks, C. C., C. B. Garner, C. W. Gehrke, M. E. Muhrer, and W. H. Pfander. 1954. The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 14:210.

Broudiscou, L., S. Pochet, and C. Poncet. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate free defaunated sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 49:189-202.

Caja, G., E. González, C. Flores, M. D. Carro, y E. Albanell. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos (II). Producción Animal. Año 18 - Nº 194 – Diciembre 2003.

Cant, J. P., E. J. DePeters, and R. L. Baldwin. 1993. Mammary aminoacids utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. J. Dairy Sci. 76:762-774.

Carro, M. D., y M. J. Ranilla. 2001. Enzimas como aditivos en la alimentación de los rumiantes. Mundo Ganadero Nº 134. pp. 62-67.

Casals, R. 1992. Efectos de la utilización de lípidos protegidos en la alimentación de ovejas de ordeño durante los periodos de lactación y de cubrición. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 178 pp.

Casals, R., G. Caja, X. Such, C. Torre, and S. Calsamiglia. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. J. Dairy Res. 66:177-191.

Casals, R., G. Caja, M. V. Pol, X. Such, E. Albanell, A. Gargouri and J. Casellas. 2006. Response of lactating dairy ewes to various levels of dietary calcium soaps of fatty acids. Anim. Feed Sci. Technol. 131:312-332.

Casper, D. P., Schingoethe D. J., and W. A. Eisenbeisz. 1990. Responses of early lactation cows to diets that vary in ruminal degradability of carbohydrates and amount of fat. J. Dairy Sci. 73:425-444.

Castañeda-Gutiérrez, E., T. R. Overton, W. R. Butler, and D. E. Bauman. 2005. Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. J. Dairy Sci. 88:1078–1089.

Cesano, A., S. Visonneau, J. A. Scimeca, D. Kritchevsky, and D. Santoli. 1998. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. Anticancer Res. 18:833-838.

Chilliard, Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs and rodents: A review. J. Dairy Sci. 76:3897-3931.

Chilliard, Y., A. Ferlay, R. M. Mansbridge, and M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. Ann. Zootech. 49:181–205.

- Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2001a. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras *trans*, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. INRA Prod. Anim. 14 (5):323-335.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2001b. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Livestock Prod. Sci. 70:31-48.
- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. Reprod. Nutr. Dev. 44:467–492.
- Chilliard, Y., J. Rouel, A. Ferlay, L. Bernard, P. Gaborit, K. Raynal-Ljutovac, A. Lauret and C. Leroux. 2006. Optimising goat milk and cheese fatty acid composition. In: Improving the fat content of foods. C. Williams and J. Buttriss (ed.). Woodhead Publishing Limited (Cambridge, UK):281-312.
- Choi, B., and D. L. Palmquist. 1996. High fat increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. J. Nutr. 12:2913-2919.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, Y. Chilliard, J. K. Drackley, and D. E. Bauman. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. J. Dairy Sci. 84:680-690.
- Clapperton, J. L., and W. Banks. 1985. Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. J. Sci. Food Agric. 36:1205-1217.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin, and E. Owen. 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. J. Anim. Sci. 81:1040-1050.
- Cook, M. E., C. C. Miller, Y. Park, and M. W. Pariza. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. Poultry Sci. 72:1301-1305.
- Cuartero, T. J. R., J. I. Pérez-Sempere Matarredonda, V. Gómez-Martínez, y J. Otal Salaverry. 1992. El empleo de la grasa by-pass en la alimentación de oveja Manchega durante el ordeño. Ed. Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La-Mancha. 13 pp.
- Daccord, R. 1987. Effect of addition of animal or vegetal fat to a hay based on digestibility and Nitrogen balance in the lactating goat. Ann. Zootech. 36:329.

- Deckere, E. A., J. M. Amelsvoort, and G. P. McNeill. 1999. Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.* 82:309-316.
- DeLany, J. P., F. Blohm, A. A. Truett, J. A. Scimeca, and D. B. West. *Am. J. Physiol.* 1999. 276:R1172-R1179.
- DePeters, E. J., S. J. Taylor, C. M. Finley, and T. R. Famula. 1987. Dietary fat and nitrogen of milk from lactating cows. *J. Dairy Sci.* 70:1192-1204.
- DePeters, E. J., and J. P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75 (8):2043-2070.
- DePeters, E., J. F. Medrano and B. A. Reed. 1995. Fatty acid composition of milk fat from three breeds of dairy cattle. *Can. J. of Anim. Sci.* 75:267-269.
- Devendra, C., and D. Lewis. 1974. The interaction of between dietary lipids and fibre in the sheep. 2. Digestibility studies. *Anim. Prod.* 19:67-76.
- Dhiman, T. R., G. R. Anand, L. D. Satter, and M. W. Pariza. 1999. Conjugated Linoleic Acid Content of Milk From Cows Fed Different Diets. *J. Dairy Sci.* 82:2146-2156.
- Dhiman, T. R., L. D. Satter, M. W. Pariza, M. P. Galli, K. Albright, and M. X. 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.
- Dhiman, T. R., M. S. Zaman, R. R. Gimenez, J. L. Walters, and R. Treacher. 2002. Performances of dairy cows fed forages treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 101:115-125.
- Doll, R. 1992. The lessons of life: Keynote address to the Nutrition and Cancer Conference. *Cancer Res.* 52:2024S-2029S.
- Dong, Y., H. D. Bae, T. A. McAllister, G. W. Mathison and K. -J. Cheng. 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes,  $\alpha$ -bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in rumen simulation (RUSITEC) system. *Can. J. Anim. Sci.* 79:491-498.
- Doreau, M. et Y. Chilliard. 1992. Influence d'une supplémentation de la ration en lipides sur la qualité du lait de vache. *INRA Prod. Anim.* 5 (2):103-111.
- Doreau, M., Y. Chilliard, H. Rulquin, and D. I. Demeyer. 1999. Manipulation of milk fat in dairy cows. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 81-109.
- Driver, L. S., R. R. Grummer, and L. H. Schultz. 1990. Effects of feeding heat treated soybeans and niacin to high producing cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 73:463-472.

- Elliot, J. P., J. K. Drackley, D. J. Schauff, and E. H. Jaster. 1993. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 76:775-789.
- Elliot, J. P., J. K. Drackley, and D. J. Weigel. 1996. Digestibility and effects of hydrogenated palm fatty acids distillate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:1031-1039.
- Evans, M., C. Geigerman, J. Cook, L. Curtis, B. Kuebler, and M. McIntosh. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids.* 35:899-910.
- Faldet, M. A. 1989. Heat treated soybeans to maximize protein utilization by ruminants. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin.
- Feng, P. C., C. W. Hunt, G. T. Pritchard, and W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.
- Firkins, J. L., and M. L. Eastridge. 1994. Assessment of the effects of iodine value on fatty acid digestibility, feed intake, and milk production. *J. Dairy Sci.* 77:2357-2366
- Fleet J. C., and R. J. Wood. 1999. Specific 1,25(OH)2D3-mediated regulation of transcellular calcium transport in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.* 276(4):958-964
- Flores, C., G. Caja, R. Casals, E. Albanell, X. Such, G. Vera, E. González, A. Bach, and C. Torre. 2002. Supplementatin of a fibrolytic enzyme complex in the concentrate of dairy ewes during lactation. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl 1):357.
- Flores, C. 2004. Improving the performance of sheep using fibrolytic enzymes in dairy ewes and malate in fattening lambs. Ph D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 106 pp.
- Fogerty, A. C., G. L. Ford, and D. Svoronos. 1988. Octadeca 9,11-dienoic acid in foodstuffs and in the lipids of human blood and breast milk. *Nutr. Rep. Int.* 38:937-944.
- Franklin, S. T., K. R. Martin, R. J. Baer, D. J. Schingoethe, and A. R. Hippen. 1999. Dietary marine algæ (*Schizochytrium sp.*) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexænoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.* 129:2048-2052.
- Fredeen, A.H. and R. E. McQueen. 1993. Effect of enzyme additives on quality of alfalfa/grass silage and dairy cow performance. *Can. J. Anim. Sci.* 73:581-591.
- French, P., C. Stanton, F. Lawless, E. G. O'Riordan, F. J. Monahan, P. J. Caffrey, and A. P. Moloney. 2000. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci.* 78:2849–2855.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, C. Sánchez, A. González, J. E. Santos, J. R. Newbold, L. M. Rodríguez Alcalá, J. Fontecha. 2006. Milk production, milk composition and reproduction

function of dairy cows fed extruded linseed. Proceedings of the 4th European Federation of Lipids congress. pp 561.

Gagliostro, G. A., and Y. Chilliard. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid lactation lactation cows. 2. Voluntary intake, milk production and composition. *J. Dairy Sci.* 74:499-509.

Gagliostro, G. A., Y. Chilliard, and M. J. Davicco. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid lactation cow. 3. Plasma hormones and apparent mammary uptake of metabolites. *J. Dairy Sci.* 74:1893-1903.

Gargouri, A. 1997. Efectos de la utilización de jabones cárnicos de ácidos grasos de cadena larga en ovejas lecheras durante los períodos de cría y de ordeño. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 174 pp.

Gashe, B. A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma sp.* A-001. *Journal of Applied Bacteriology.* 73:11-18.

Gaynor, P. J., R. A. Erdman, B. B. Teter, J. Sampunga, A. V. Capuco, D. R. Waldo, and M. Hamosh. 1994. Milk fat yield and composition during abomasal infusion of cis or trans octadecenoates in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77:157-165.

Gillman, M. W., L. A. Cupples, D. Gagnon, B. E. Millen, R. C. Ellison, and W. P. Castelli. 1997. Margarine intake and subsequent coronary heart disease in men. *Epidemiology* 8:1441-1449.

González, E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evolución de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 124 pp.

González, E., G. Caja, E. Albanell, C. Flores, A. Castro, R. Casals, X. Such, A. Bach, and C. Torre. 2002. Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl 1):355.

Griinari, J. M., and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk ruminants. In: Yurawecz M. P., M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. Nelson, editors. *Advances in conjugated linoleic acid research*, Volume 1. Champaign: AOCS Press: 180–200.

Grummer, R. R., M. L. Hatfield, and M. R. Dentine. 1990. Acceptability of fat supplements in four dairy herds. *J. dairy Sci.* 73:852-857.

Grummer, R. R. 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74:3244-3257.

- Gulati, S. K., E. B. Byers, Y. G. Byers, J. R. Ashes, and T. W. Scott. 1997. Effect of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 66:159-164.
- Gulati, S. K., J. R. Ashes, and T. W. Scott. 1999. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation in to milk fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:57-64.
- Gulati, S. K., S. M. Kitessa, J. R. Ashes, E. Fleck, E. B. Byers, Y. G. Byers, and T. W. Scott. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal biohydrogenation and their incorporation into milk fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:139-148.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm, and M. W. Pariza. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: Identification and quantification in natural and processed cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 37:75–81.
- Ha, Y. L., J. Storkson, and M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50:1097-1101.
- Harfoot, C. G., M. L. Crouchman, R. C. Noble, and J. H. Moore. 1974. Competition between food particles and rumen bacteria in the uptake of long chain fatty acids and triglycerides. *J. Appl. Bacteriol.* 37:633-641.
- Harrison, J. H., R. L. Kincaid, J. P. McNamara, S. Waltner, K. A. Loney, R. E. Riley, and J. D. Cronrath. 1995. Effect of whole cottonseeds and calcium salts of long-chain fatty acids on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:181-193.
- Hayek, M. G., S. N. Han, D. Y. Wu, B. A. Watkins, M. Meydani, J. L. Dorsey, D. E. Smith, and S. N. Meydani. 1999. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. *J. Nutr.* 129:32-38.
- Hermansen, J. E. 1995. Prediction of milk fatty acid profile in dairy cows fed dietary fat differing in fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 78 :872–879.
- Hervás, G., P. Luna, A. R. Mantecón, N. Castañares, P. Frutos, M. A de la Fuente, and M. Juárez. Effect of sunflower oil on sheep milk production and composition, and in Vitro rumen fermentation. Proceedings of the 4th European Federation of Lipids congress. p571.
- Holter, J.B., H. H. Hayes, N. Kiertead and J. Whitehouse. 1993. Protein-fat bypass supplement for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:1480-1494.
- Horton, G. M. J., J. E. Wohlt, D. D. Palatin and J. A Baldwin. 1992. Rumen-protected lipid for lactating ewes and their nursing lambs. *Small Rum. Res.* 9:27-36.

- Hristov, A. N., L. M. Rode, K. A. Beauchemin and R. L. Wuerfel. 1996. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage in vitro and in sacco dry matter degradability. Proceedings of the western section Am. Soc. Anim. Sci. Rapid City, South Dakota. 47:282-284.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister and K. J. Cheng. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzyme supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76:3146-3156.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister and K. J. Cheng. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrients digestion in cattle fed barley grain diets. *J. Anim. Sci.* 78:477-487.
- Ikwegbu, O. A., and J. D. Sutton. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* 48:365-372.
- Ip, C., S. F. Chin, J. A. Scimeca, and M. W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51:6118-6124.
- Ip, C., M. Singh, H. J. Thompson, and J. M. Scimeca. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54:1212-1215.
- Ip, C., J. A. Scimeca, H. J. and Thompson. 1995. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer* 24:241-247.
- Ip, C., C. Jiang, H. J. Thompson, and J. A. Scimeca. 1997a. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:755-759.
- Ip, C., and J. A. Scimeca. 1997b. Conjugated linoleic acid and linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 27:131-135.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. J. Thompson, D. Barbano, and D. E. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129:2135-2142.
- Iwaasa, A. D., L. M. Rode, K. A. Beauchemin, and S. Eivemark. 1997. Effect of fibrolytic enzymes in barley-based diets on performance of feedlot cattle and in vitro gas production. Joint Rowett Res. Inst.-Inst. Nat. Rech. Agr. Rumen Microbiol. Symp., Aberdeen, Scotland, Poster 39.
- Jenkins T. C. 1987. Effects of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous in vitro cultures. *J. Anim. Sci.* 64:1526-1532.
- Jenkins T. C. 1993. Symposium: advances in ruminant lipid metabolism. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863.

- Jenkins T. C and D. L. Palmquist. 1984. Effects of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrients digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67:978-986
- Jenkins T. C. and B. F. Jenny. 1989. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:2316-2324.
- Jenkins, T. C., and N. Fotouhi. 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Anim. Sci.* 68:460-466.
- Jerred, M. J., D. J. Carroll, D. K. Combs, and R. R. Grummer. 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on lactation performance at dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73:2842-2854.
- Jewell, C., and K. D. Cashman. 2003a. The effect of conjugated linoleic acid and medium-chain fatty acids on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* 89:639–647.
- Johnson Jr., J. C., P. R. Utley, B. G. Mullinis Jr., and A. Merrill. 1988. Effects of adding fat and lasalocid to diets of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:2151-2165.
- Kay, J. K., J. R. Roche, N. A. Thomson, J. M. Grinari and K. J. Shingfield. 2003. Increasing milk fat cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in pasture-fed cows. *J. Dairy Sci.* 86 (Suppl. 1):146.
- Kay, J. K., T. R. Mackle, M. J. Auldist, N. A. Thomson, and D. E. 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, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh, and L. D. Muller. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:1630-1636.
- Kelsey J. A., B. A. Corl, R. J. Collier, and D. E. 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.
- Kennelly, J. J. 1996. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:137–152.
- Kepler, C. R., K. P. Hiron, J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241(6):1350–1354.
- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. II. Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 89:201–208.

- Knapp, D. M., and R. R. Grummer. 1990. Effect of supplemental dietary fat on lactating dairy cattle under conditions of heat stress. *J. Dairy Sci.* 73 (Suppl. 1):219.
- Kovessy, M., J. J. Robinson, A. K. Loug, and R. P. Aitken. 1987. The effect of a dietary supplement of protected fat on the yield and composition of milk from ewes receiving different levels of fish meal in their diet. *Anim. Prod.* 44:482.
- Kowalczyk, J., E. R. Orskov, J. J. Robinson, and C. S. Stewart. 1977. Effect of fat supplementation on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. *Brit. J. Nut.* 37:251-264.
- Kramer, J. K. G., P. W. Parodi, R. G. Jensen, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, and R. O. Adlof. 1998. Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids* 33:835.
- Krause M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr, and P. NØrgaard. 1998. Fibrolytic enzymes treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Kritchevsky, D. 1999. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis. *Inform.* 10:S42-S49.
- Kung, L. Jr. 1996. Direct-fed microbial and enzyme feed additives. In: Murihead S. (Ed.) *Direct fed microbial, enzyme and forage additive compendium*. The miller publishing company, Minnetonka, Minnesota, pp. 15-20.
- Kung Jr., R. J., Treacher, and M. A. Cohen. 1998. Enzyme-treated forages for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81 (suppl. 1):196.
- Kung L., Jr., R. J. Treacher, G. A Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres, and M. A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- Kung L., M. A. Cohen, L. M. Rode, R. J. Treacher. 2002. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating cows. *J. Dairy Sci.* 85:2396-2402.
- Lawless, F., J. J. Murphy, D. Harrington, R. Devery, and C. Stanton. 1998. Elevation of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acids in bovine milk because of dietary supplementation. *J. Dairy Sci.* 81:3259–3267.
- Lee, K. N., D. Kritchevsky, and M. W. Pariza. 1994. Conjugated Linoleic Acid and Atherosclerosis in Rabbits. *Atherosclerosis* 108:19–25.

- Lee S. S., J. K. Ha, and K. J. Cheng. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:201-217.
- Lenhinger, A. L. 1985. Short course in Biochemistry. Worth publishers, Inc., NY.
- Leonardi, C., S. Bertics, and L. E. Armentano. 2005. Effect of increasing oil from distillers grains or corn oil on lactation performance. *J. Dairy Sci.* 88:2820–2827.
- Lewis, G. E., C. W. Hunt, W. K. Sanchez, R. Treacher, G. T. Pritchard, and P. Feng. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Li Y., M. F. Seifert, D. M. Ney, M. Grahn, A. L. Grant, K. G. Allen, and B. A. Watkins. 1999. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-1 and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J. Bone. Miner. Res.* 14(7):1153-1162.
- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206.
- Lock, A. L., D. E. Bauman, and P. C. Garnsworthy. 2005. Effect of production variables on the *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid content of cows' milk. *J. Dairy Sci.* 88:2714–2717.
- Loor, J. J., and J. H. Herbein. 2003. Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acid (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Anim. feed Sci. Technol.* 103:63-83.
- Lu, C. D. 1993. Implication of feeding isoenergetic diets containing animal fat on milk composition of Alpine does during early lactation. *J. Dairy Sci.* 76:1137-1147.
- Maczulak, A. E., B. A. Dehority, and D. L. Palmquist. 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:856.
- Marks, S. C., and S. C. Miller. 1993. Prostaglandins and the skeleton: the legacy and challenges of two decades of research. *Endocr J.* 1:337–344.
- Martin, S. A. and T. C. Jenkins. 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 80:3347-3352.
- Masanori, S. 2001. Trans fatty acids: properties, benefits and risks. *J. Health Sci.* 48 (1) 7-13.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, and K. Cheng Jr. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72:3004-3018.

- McAllister, T. A., S. J. Oosting, J. D. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A. N. Hristov, R. J. Treacher, and K. J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McAllister, T. A., K. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford, and K. -J. Cheng. 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80:35-44.
- McAllister T. A., A. N. Hristov, K. A. Beauchemin K. A., Rode, and L. M. Cheng K. J. 2001. Enzymes in ruminants diets. In: Bedford M. R., and G. G. Partridge (Eds), *Enzymes in farm animal nutrition*, CABI Publishing. 2001. pp.273-298.
- McGuire, M. K., M. A. McGuire, K. Ritzenthaler, and T. D. Shultz. 1999. Dietary sources and intakes of conjugated linoleic acid intake in humans. In: *advances in conjugated linoleic acid research*, vol. 1, Yurawecz et al., ed., AOCS Press, Champaign, IL, pp. 369-377.
- McGuire, M. A. and M. K. McGuire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*
- Mertens, D. R., T. L. Strawn, and R. Cardoza. 1984. Modelling ruminal particle size reduction: its relationship to particle size description. In: Kennedy, P. M. (Eds.) *Techniques in particle size analysis of feed and digesta in ruminants*. Can. Soc. Anim. Sci. Publication No 1, Edmonton, Alberta, pp. 134-141.
- Michal, J. J., K. A. Johnson, and R. J. Treacher. 1996. The impact of direct fed fibrolytic enzymes on the growth rate and feed efficiency of growing beef steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 74 (Suppl. 1):296.
- Michalet-Doreau, B., C. Bogaert et D. Bauchart. 1985. Valeur nutritive des graines de soja crues ou extrudées pour les ruminants. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Teix. INRA*, 59:29-38.
- Milner J. A. 2000. Functional foods: the US perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(6 Suppl):1654S-1659S.
- Mir, Z., L. A. Goonewardene, E. Okine, S. Jaegar, and H. D. Scheer. 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Rum. Res.* 33:137-143.
- Mir, Z., M. L. Rushfeldt, P. S. Mir, L. J. Paterson and R. J. Weselake. 2000. Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Rum. Res.* 36:25-31
- Mohamed, O. E., L. D. Satter, R. R. Grummer, and F. R. Ehle. 1988. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. *J. dairy Sci.* 71:2677.

- Moharrery A., and T. K. Das. 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Rep. Nut. Dev.* 41(6):513-529.
- Moore, C. E., H. C. Hafliger, III, O. B. Mendivil, S. R. Sanders, D. E. Bauman, and L. H. Baumgard. 2004. Increasing amounts of conjugated linoleic acid (CLA) progressively reduce milk fat synthesis immediately postpartum. *J. Dairy Sci.* 87:1886–1895.
- Morand-Fehr, P. Bas, D. Sauvant, F. Ternois, and J. Hervieu. 1987. Effect of dietary fat prills on milk performances on early lactation. 4th Internat. Conf. On goats. March 8-13. Brazilia, Brazil. 1420.
- Munday, J. S., K. G. Thompson, and K. A. C. James. 1999. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57bl/6 mouse atherosclerosis model. *Br. J. Nutr.* 81:251-255
- National Research Council. 1994. Opportunities in the Nutrition and Food Sciences. National Academy Press, Washington DC.
- Ngidi, M. E., S. C. Loerch, F. L. Fluharty and D. L. Palmquist. 1990. Effects of calcium soaps of long-chain fatty acids on feedlot performance, carcass characteristics and ruminal metabolism of steers. *J. Anim. Sci.* 68:2555-2565.
- Nicolosi, R. J., E. J. Rogers, D. Kritchevsky, J. A. Scimeca, and P. J. Huth. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22:266-277.
- Nudda, A., M. A. McGuire, G. Battaccone, and G. Pulina. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and Ricotta. *J. Dairy Sci.* 88:1311–1319.
- Nudda, A., G. Battaccone, M. G. Usai, S. Fancellu, and G. Pulina. 2006. Supplementation with Extruded Linseed Cake Affects Concentrations of Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid in Goat Milk *J. Dairy Sci.* 89:277–282.
- O’Shea, M., R. Devery, F. Lawless, J. Murphy, and C. Stanton. 2000. Milk fat conjugated linoleic acid inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Antican. Res.* 20, 3591–3602.
- Osuna, D. R., R. Casals, G. Caja, and S. Peris. 1998. Effects of feeding whole oilseeds to partially replace calcium soaps of fatty acids on dairy ewes intake and milk production and composition. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1):302.
- Osuna, D. R., R. Casals, E. Albanell, and G. Caja. 2000. Effects of feeding calcium soaps or whole oilseeds on feed intake and lactation performances of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 83 (Suppl. 1):278.

- Outen G. E., D. E. Beever, D. F. Osbourn, and D. J. Thomson, 1975. The digestion of the lipids of processed red clover herbage by sheep. *J. Sci. Fd Agric.*, 26, 1381-1389.
- Palmquist, D. L. 1976. A kinetic concept of lipid transport in ruminants. Review. *J. Dairy Sci.* 59:355-363.
- Palmquist, D. L., and W. Mattos. 1978. Turnover of lipoproteins and transfer to milk fat of dietary (1-Carbon-14) linoleic acid in lactating cows. *J. Dairy sci.* 61:561-565.
- Palmquist D. L., and H. R. Conrad. 1980. High fat rations for dairy cows. Comparison of tallow and hydrolyzed, blended animal-vegetable fat at two levels of intake. *J. Dairy Sci.* 63:391.
- Palmquist D. L., and T. C. Jenkins. 1980. Research papers. Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.
- Palmquist, D. L., and E. A. Moser. 1981. Dietary fat effects on blood insulin, glucose utilisation and milk protein content of lactating cows. *J. dairy Sci.* 64:1664-1670.
- Palmquist, D. L. 1988. The feeding value of fats. In: *World Animal Science*. Vol. 4, 293-312. Ed: E. R. Ørskov, Elsevier, Amsterdam.
- Palmquist, D. L. 1990. Using fat strategically in dairy cattle rations. Proceedings, International Animal Nutrition Symposium, Brussels, Belgium. 25 Sept. National Renderer's Association. 24 pp.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu and D. M. Barbano. 1993a. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753.
- Palmquist, D.L., M. R. Weisbjerg, and T. Hvelpund. 1993b. Ruminal, intestinal and total digestibles of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. *J Dairy Sci.* 1353-1364.
- Pantoja, J. J., L. Firkins, M. L. Eastridge, and B. L. Hull. 1996. Fatty acid digestion in lactating dairy cows fed fats varying in degree of saturation and different fiber source. *J. Dairy Sci.* 79:575-584.
- Pariza, M. W., S. H. Ashoor, F. S. Chu, and D. B. Lund. 1979. Effects of temperature and time an mutagen formation in panfried hamburger. *Cancer Lett.* 7:63-69
- Pariza, M. W., L. J. Loretz, J. M. Storkson, and N. C. Holland. 1983. Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. *Cancer Res. (Suppl.)* 43:2444s-2446s.
- Pariza, M. W., and W. A. Hargraves. 1985. A Beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[A]anthracene. *Carcinogenesis* 6:591-593.

- Pariza, M. W. 1999. The biological activities of conjugated linoleic acid. In M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson (ed) Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. I., pp. 12-20. AOCS Press, Champaign, IL.
- Pariza, M. W., Y. Park, and E. M. Cook. 2000. Mechanisms of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 223:8-13.
- Pariza, M. W., Y. Park and M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Prog. Lipid Res. 40:283–298.
- Park, Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook, and M. W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. Lipids 32:853-858.
- Park Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu, and M. W. Pariza. 1999. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. Lipids, 34:235–241.
- Park, Y., J. M. Storkson, J. M., Ntambi, M. E. Cook, C. J. Sih, and Pariza, M. W. 2000. Biochim. Biophys. Acta.
- Parodi, P. W. 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. J. Dairy Sci. 60:1550–1553.
- 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.
- Pérez-Alba, L. M., S. De Souza, M. Pérez, A. Martínez, and G. Fernandez. 1997. Calcium soaps of olive fatty acids in the diets of Manchega dairy ewes: effects on digestibility and production. J. Dairy Sci. 80:3316.
- Pérez-Hernández, M., J. J. Robinson, R. P. Aitken, and C. Fraser. 1986. The effect of dietary supplements of protected fat on the yield and fat content of ewe's milk and on lamb growth rate. Anim. Prod. 42:455.
- Pilbeam, C. C., Harrison, J. R., and Raisz, L. G. Prostaglandins and bone metabolism. In Principles of bone biology. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and G. A. Rodan, editors. Academic Press. San Diego, California, USA. 2002. 979–994.
- Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, R. Barcena, M. A. Cobos, H. Hernández, and M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. J. Anim. Sci. 80:3016-3020.
- Piperova, L. S., B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, J. Fritzsche, K. Ku, and R. A. Erdman. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids

and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr.* 130:2568–2574.

Pol, M. V., R. Casals, E. Albanell, and X. Such. 2001. Effects of feeding whole linseed on milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 84 (suppl. 1):353.

Pol, M. V. 2003. Efecto de la suplementación con semilla entera de lino sobre la producción y composición de leche de ovejas de raza Manchega. Tesis Master. Universitat Autònoma de Barcelona. 103pp.

Qiu, X., D. W. Reed, H. Hong, S. L. MacKenzie, and P. S. Covello. 2001. Identification and analysis of a gene from *calendula officinalis* encoding a fatty acid conjugase. *Plant Physiology*. Vol 125:847-855.

Roche H.M., E. Noone, C. Sewter. 2002. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid. Insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRA $\alpha$ . *Diabetes*, 51:2037–2044.

Rode L. M., W. Z. Yang, and K. A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzymes supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82:2121-2126.

Rousselot, M. C., C. B. Broqua, C. De Araujo et L. P. Borgida. 1995. Effets des fibres et des matières grasses protégées sur la composition du lait de chèvre. *Renc. Rech. Rum.* 2:225-230.

Rovics, J. J., and C. M. Ely. 1962. Response of beef cattle to enzyme supplement. *J. Anim. Sci.* 24:156-160.

Sánchez, W. K., C. W. Hunt, M. A. Guy, G. T. Pritchard, B. L. Swanson, T. B. Warner, J. M. Higgins, and R. J. Treacher. 1996. Effect of fibrolytic enzymes on lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79 (Suppl.):183.

Sauvant D. et P. Bas. 2001. La digestion des lipides chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 14 (5):303-310.

Schingoethe, D. J., D. P. Casper, C. Yang, D. J. Illg, J. L. Sommerfeldt, and C. R. Mueller. 1988. Lactational responses to soybean meal, heated soybean meal and extruded soybean meal with ruminally protected methionine. *J. Dairy Sci.* 71:173-180.

Schingoethe, D. J., G. A. Stegeman, and R. J. Treacher. 1999. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. *J. Dairy Sci.* 82:996-1003.

Schmidely, P. et D. Sauvant. 2001. Taux Butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliment concentré. *INRA Prod. Anim.* 14(5):337-354.

- Schneider, P. L., D. Sklan, W. Chalupa, and D. S. Kronfeld. 1988. Feeding calcium salts of fatty acids to lactating cows. *J. Dairy Sci.* 71:2143-2150.
- Schroder H, J. Marrugat, J. Vila, M. I. Cova, R. Elosua. 2004. Adherence to the traditional Mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J. Nutr.* 134:3355–61.
- Scimeca, J. A. 1999. Cancer inhibition in animals. In: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer,M. W. Pariza, and G. J. Nelson, eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 1.* pp. 420– 443. AOCS Press, Champaign, IL.
- Scott, T. W., L. J. Cook, and S. C. Mills. 1971. Protection of dietary polyinsaturated fatty acids against microbial hydrogenation in ruminants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48:358-364.
- Sehat, N., J. K. G. Kramer, M. M. Mossoba, Yurawecz, M. P., J. A. G. Roach, K. Eulitz, Morehouse, K. M., and Ku, Y. 1999. 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.
- Sheperd A. C., M. Maslanka, D. Quinn, and L. Kung, Jr. 1995. Nutrition, feeding and claves: additives containing bacteria and enzymes for alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 78:565-572.
- Sheperd A.C., and L. Kung, Jr. 1996. Nutrition, feeding and claves: an enzyme additive for corn silage: effect on silage composition and animal performance. *J. Dairy Sci.* 79:1760-1766.
- Shingfield, K. J., C. K. Reynolds, B. Lupoli, V. Toivonen, M. P. Yurawecz, P. Delmonte, J. M. Griinari, A. S. Grandison, and D. E. Beever. 2005. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows fed sunflower oil and fish oil. *Anim. Sci.* 80:225–238.
- Simas, J. M., J. T. Huber, Z. Wu, K. H. Chen, S. C. Chan, C. B. Theurer, and R. S. Swingle. 1995. Influence of steam-flaked sorghum grain and supplemental fat on performance of dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 78:1526-1533.
- Song, H.-J. , I. Grant, D. Rotondo, I. Mohede, N. Sattar, S. D. Heys and K. W. J. Wahle. 2005. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition.* 59:508-517.
- Stanton, C, F. Lawless, G. Kjellmer, D. Harrington, R. Devery, J. F. Connolly, and J. Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62(5):1083-1086.

- Sutton, J. D., M. S. Dhanoa, S. V. Morant, J. France, D. J. Napper, and E. Schuller. 2003. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *J. Dairy Sci.* 86:3620–3633.
- Teh, T. H., L. T. Trung, Z. H. Jia, T. A. Gipson, K. B. Ogden and T. F. Sweeney. 1994. Varying amounts of rumen-inert fat for high producing goats in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77:253-258.
- Thompson, H., Z. Zhu, S. Banni, K. Darcy, T. Loftus, and Ip, C. 1997. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.* 57:5067–72.
- Titi H., and W. F. Lubbadeh. 2004. Effect of feeding cellulase enzyme on productive responses of pregnant and lactating ewes and goats. *Small Rum. Res.* 52:137-143.
- Tomlinson, A. P., H. H. Van Horn, C. J. Wilcox, and Harris Jr. B. 1994. Effects of undegradable protein and supplemental fat on milk yield and composition and physiological responses of cows. *J. Dairy Sci.* 77:145-156.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H. J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto, and O. Ezaki. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534–1542.
- Vicini, J. L., H. G. Bateman, M. K. Bath, J. H. Clark, R. A. Erdman, R. H. Phipps, M. E. Van Amburgh, G. F. Hartnell, R. L. Hintz and D. L. Hard. 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* 86:576-585.
- Visonneau, S., A. Cesano, S. A. Tepper, J. A. Scimeca, D. Santoli, and D. Kritchevsky. 1997. Conjugated Linoleic Acid Suppresses the Growth of Human Breast Adenocarcinoma Cells in Scid Mice. *Anticancer Res.* 17:969-974.
- Wallace R. J., S. J. A. Wallace, N. McKain, V. L. Nsereko, and G. F Hartnell. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1905-1916.
- Wang Y., T. A. McAllister, L. M. Rode, K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, V. L. Nsereko, A. D. Iwaasa, and W. Yang. 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition.* 85:325-332.
- Ward, A. T., K. M. Wittenberg, and R. Przybylski. 2002. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola. *J. Dairy Sci.* 85:1191–1196.

- 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.
- Watkins, B. A., C.-L. Shen, J. P. McMurtry, H. Xu, S. D. Bain, K. G. D. Allen, and M. F. Seifert. 1997. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. *J. Nutr.* 127 (6):1084-1091.
- Watkins, B. A., Y. Li, D. R. Romsos, W. E. Hoffman, K. G. D. Allen and M. F. Seifert. 2003. CLA and bone modeling in rats. In J. Sebedio, W. W. Christie and R. Adolf (ed) Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. 2, pp. 218-250. AOCS Press, Champaign, IL.
- Wenk, C. 1992. Enzymes in the nutrition of monogastric farm animals. pp. 205–218 in Biotechnology in the Feed Industry, T. P. Lyons, ed. Nicholasville, KY: Alltech Technical Publications.
- Whigham, L. D., M. E. Cook, and R. L. Atkinson. 2000. conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol. Res.* 42:503-510.
- White, S. L., J. A. Bertrand, M. R. Wade, S. P. Washburn, J. T. Green, and T. C. Jenkins. 2001. Composition of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pastrue or a total mixed ration. *J.Dairy Sci.* 84:2295-2301.
- Wijesundera, C., Shen, Z., Wales, W. J. and Dalley, D. E. 2003. Effesct of cereal grain and fiber supplement on the fatty acid composition of milm fat of grazing dairy cows in early lactation. *J Dairy Res.*, 70:257-265.
- Wilkinson R. G., V. E. Fry, and L. A. Sinclair. 2000. Effect of untreated and formaldehyde treated whole linseed on the performance and fatty acid composition of milk produced by Friesland ewes. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 152A.
- Yang W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 1999. Effect of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.
- Yang W. K., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512-2520.
- Yang W. Z., K. A. Beauchemin, and D. D. Vedres. 2002. Effect of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102 (1-4):137-150.
- Zambell K. L., N. L. Keim, M. D. Van Loan, B. Gale, P. Benito, D. S. Kelley, G. J. Nelson. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* 35(7):777-782.

Zervas, G., K. Fegeros, K. Kyotsotolis, C. Goulas, and A. Mantzios. 1998. Soy hulls as a replacement for maize in lactating dairy ewe diet with or without dietary fat supplements. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:65-75.

Zobell D. R., R. D. Wiedmeier, K. C. Olson, and R. Treacher. 2000. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87 (3-4):279-285.

---

---

*III. Objetivos*

---

---

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la posibilidad de mejorar la calidad nutritiva de la leche de oveja y cabra, y en particular su contenido en CLA, mediante la adición de diversas fuentes de grasa vegetal a la ración.

Los objetivos específicos fueron:

1. Comparar los resultados productivos de ovejas lecheras suplementadas con semillas enteras o con aceite de linaza, así como la concentración de ácidos grasos (AG) en leche y queso, en particular AG de tipo n-3, CLA, y su precursor el *trans* vaccénico o TVA.
2. Estudiar el efecto de la utilización de semillas enteras de cártamo en raciones de ovejas lecheras, en sustitución de jabones cárnicos, sobre la producción y composición de leche y su concentración de AG, especialmente de CLA y TVA.
3. Valorar el efecto de la utilización de aceite de soja sobre la producción y composición de leche de oveja y su concentración de AG, en particular de CLA y TVA.
4. Estudiar los efectos de la utilización de enzimas fibrolíticas en raciones de ovejas lecheras sobre la digestibilidad de los nutrientes y los resultados productivos en lactación, en presencia o no de aceite de soja.
5. Estudiar el efecto de la inclusión de aceite de soja en la ración de cabras lecheras sobre la producción y composición de leche, y su concentración de AG, en particular de CLA y TVA.

---

---

***IV. Milk Fatty Acid Composition and Dairy Performance in Lacaune Ewes***

***Fed Whole Linseed and Linseed Oil with Reference to Conjugated Linoleic Acid***

---

---

## ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) to dairy ewes on lactational performance and milk fatty acids profile, particularly n-3 and CLA content, when compared to a traditional diet containing calcium soap of palm oil fatty acids (CSFA). Thirty Lacaune dairy ewes were blocked in 3 pens of 10 animals and used in a  $3 \times 3$  Latin square (20 d periods). Ewes were fed a diet with 53% forage (alfalfa and fescue dehydrated mixture, 1:1) 43.6% experimental concentrate, and 3.4% of barley grain. Treatments were: 1) Control (CSFA, 6% of experimental concentrate); 2) WLS (15.0%); and, 3) LSO (5.0%). Diets were isonitrogenous (18.6%), and had similar levels of fat (5.14%). Feed intake was higher with WLS(C: 2.65; WLS: 2.72; LSO: 2.70 kg DM/d), but milk yield (1.9 kg/d), ECM (1.6 kg/d) and milk protein (5.23%) and casein (4.1%) contents were unaffected by treatments. In contrast, LSO reduced true protein content (5.20; 5.11; 4.97%) and increased milk fat content (5.70; 5.85; 6.08%) and yield (107; 107; 114 g/d) as well as total solids content (16.3; 16.6; 16.9%) and yield (312, 308, 316 g/d). Regarding blood serum metabolites, both linseed treatments increased total triglycerides concentration (12.7; 19.2; 17.6%) but did not affect glucose (53.6 mg/dL), cholesterol (100.6 mg/dL), NEFA (0.11 mmol/L), HDL (1.78 mmol/L) and LDL (0.67 mmol/L) concentrations. Short chain fatty acids (FA) remained unchanged while medium chain FA and saturated FA were decreased and large chain FA and unsaturated FA (including mono and polyunsaturated FA) were increased by WLS and LSO. Milk content of  $\alpha$ -linolenic acid (n-3) was more positively affected by WLS than by LSO (0.78; 1.91; 1.38% of total FA) while the CLA (rumenic acid) level was higher with LSO than with WLS (0.66; 0.79; 1.46%). *Trans*-11 vaccenic acid (TVA), precursor of CLA, was only increased by LSO (1.31; 1.70; 3.33%). Fatty acids composition of 60-d-old cheeses made in the last experimental period showed a similar FA pattern to milk, particularly for medium and long chain fatty acids. In conclusion, both WLS and LSO were useful in increasing polyunsaturated and decreasing saturated FA of milk and cheese. However, LSO had greater CLA responses and exclusive TVA improvement, while WLS was more useful in increasing n-3 FA content of milk.

**Keywords:** Dairy ewes, Linseed, CLA.

## INTRODUCTION

Available forages in the Mediterranean area are of low-to-medium quality, especially in dry periods of the year, and the energy intake of small dairy ruminants may not be enough for optimum milk yield, especially in early and mid lactation. Supplementing diets with rich cereal grain concentrates is a common method of increasing energy intake. However, farmers face problems of low milk fat content which is related to the feeding of high concentrate diets (Bocquier and Caja, 2001). To overcome this problem, including fat supplements in the diet is recommended (Palmquist, 1988). Because of their high energy content, the use of fats and oils has been proven to be successful not only in increasing the energy density which thereby diminishes the energy deficiency of animals but also in increasing the fat content of milk and modifying its fatty acids (FA) profile. Being easy to use and having positive effects on milk fat content of the milk (Casals *et al.* 1999, Casals *et al.*, 2006), fat sources such as calcium soaps of fatty acids (CSFA) are commonly used by European dairy farmers and frequently included in traditional diets of dairy ewes under intensive feeding systems. Feeding CSFA from palm oil helps to increase the unsaturated to saturated FA ratio (Gargouri, 1997), but has no effect on n-3 FA and conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from dairy ewes (Casals *et al.*, 2006). CLA and n-3 FA are of particular interest because of their potential benefits to human health (Lock and Bauman, 2004; Chilliard *et al.*, 2006) and both can be relatively modified through nutrition of ruminants.

Several studies have investigated the possible beneficial effects of conjugated FA and some *trans* FA on human health. In the case of *trans* FA, the intake of some of them is associated with higher risk factors of cardiovascular diseases and biomarker of inflammation, but the specific *trans* FA isomers responsible have not been identified (Kramer *et al.*, 2006). However, *trans* vaccenic acid is considered a functional food for its direct correlation with the biosynthesis of CLA (Bauman *et al.*, 2006). Positive effects of conjugated linoleic acid (CLA) have been described such as anticarcinogenic (in vivo and in vitro), anti-atherogenic, antidiabetogenic (type II) and several others effects (Bauman *et al.*, 2001; Pariza *et al.*, 2001). Fat sources such as seeds, oils and others, are a variation factor of CLA level in the milk. The biosynthesis of CLA can occur in two principal ways: the first described is the partial biohydrogenation of unsaturated FA, particularly linoleic acid, in the rumen. The second way, which was proposed later and is the most important from a quantitative point of view, is the desaturation of *trans*-11 C18:1 (TVA or

*trans-11* vaccenic acid) in the mammary gland by the action of the enzyme  $\Delta$ -9 desaturase (Griinari *et al.*, 2000). TVA is an intermediate product of the rumen biohydrogenation of linoleic and linolenic acids (Bauman *et al.*, 2001) whose concentrations can be increased if unsaturated FA suffer an incomplete biohydrogenation. Therefore, feeding 18-carbon unsaturated fat supplements, which can suffer a certain degree of rumen biohydrogenation helps to increase the CLA in milk of ruminants (Lock and Bauman, 2004; Chilliard *et al.*, 2006). Whole or processed oilseeds which are high in linoleic or linolenic acid, as well as their oils, have been extensively used in dairy cows and goats (Chilliard *et al.*, 2006), but the available information on their use in dairy ewes is more limited (Pol *et al.*, 2001; Hervás *et al.*, 2006).

There has recently been an effort to increase human consumption of n-3 FA. Western diets typically have an n-6:n-3 FA ratio of 20-30:1 (Lock and Bauman, 2004), whereas the ideal is thought to be 4:1 (Simopoulos, 1999). The World Health Organization (1995) recommendation is not so extreme but between 5:1 and 10:1. Milk content of some important n-3 FA as EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) is very difficult to modify because their transfer efficiency from diet to milk is very low (2-4%) unless they are fed under a rumen-protected form (Lock and Bauman, 2004). In contrast, feeding linseed supplements, rich in linolenic acid (C18:3), is a possible way to increase linolenic acid of milk and, therefore, reduce the n-6:n-3 FA ratio. In a previous work of our group (Pol, 2003), feeding whole linseeds (**WLS**) to Manchega dairy ewes led to an increase in milk fat and linolenic acid contents of their milk, thus reducing the n-6 to n-3 FA ratio. In addition, feeding WLS increased the CLA content of ewe milk. Similar effects on n-3 and the n-6 to n-3 FA ratio have been obtained in dairy cows by Petit (2002) and Petit *et al.* (2004), as well as in dairy goats by Chilliard *et al* (2003). In contrast, Chilliard *et al* (2003) indicated that the CLA content of goat milk was increased when feeding linseed oil (**LSO**), but not whit WLS.

To our knowledge, available information on studying the use of WLS or LSO in dairy ewes is very limited. Therefore the aim of this work was to investigate the effects of feeding WLS or LSO to dairy ewes on their lactational performance and milk fatty acids profile, when compared with a traditional control diet containing CSFA.

## MATERIAL AND METHODS

### *Experimental Design, Animals and Feeding*

Thirty Lacaune dairy ewes (15 primiparous and 15 multiparous) from the herd of the Universitat Autònoma de Barcelona were used in a lactation trial according to a 3x3 Latin square experimental design, with 3 periods of 20 days (14 for adaptation + 6 for sampling) and 3 treatments: 1) Control (6% CSFA in the experimental concentrate); 2) **WLS** (15%); and, 3) **LSO** (5%). At the beginning of the trial, animals were allocated in 6 groups (2 per treatment) of 5 ewes each, balanced according to lactation number, previous milk yield and body weight at 7±1 weeks after lambing.

Ewes were fed twice daily (at 08.30 and 18.30) in the pen feeder, provided with a lock, a TMR with 55% forage (alfalfa and fescue dehydrated mixture, 1:1) and 45% experimental concentrate (Table 1). In addition, a small and constant amount (50 g/ewe) of barley grain was offered at each milking (at 08:00 and 18:00) to encourage ewes to enter the milking parlor. Final diet forage/concentrate ratio was 53:47. Chemical composition (Table 2) of experimental concentrates and diets were designed to be isonitrogenous and with similar levels of fat and NE<sub>L</sub>, after inclusion of CSFA (Magnapac, Norel-Nature S.A., Madrid, Spain) in the control concentrate. Fresh water was permanently available in the pens.

Ewes were milked twice daily in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia Separator Ibérica, Granollers, Spain) with recording jars. Milking was conducted at a vacuum pressure of 42 KPa, a pulsation rate of 120 pulses/min, and a pulsation ratio of 50%, as indicated by Such *et al.* (1999).

### *Measurement, sampling and analysis*

Voluntary feed intake was registered throughout the experiment, but only sampling period data (6 data registration days) was considered. Group (5 animals) TMR intake was calculated as the difference between the total amount of DM offered and the amount refused daily with an accuracy of 10 g. Total DMI was calculated by adding the corresponding quantity of barley (0.9 kg DM/ewe/d) consumed in the milking parlor to the TMR intake. Daily samples of diet ingredients and orts were collected and composited by period throughout the experiment. Feed and orts samples were ground through a 1 mm stainless steel screen and were analyzed for DM and OM (AOAC, 1990). The CP was determined according to the Kjeldahl method (AOAC,

1990) using a Kjeltec Auto 1030 Analyzer (Tecator, Hogänäs, Sweden). NDF and ADF were determined sequentially using the ANKOM system (ANKOM Technology, Fairport, NY) with thermostable  $\alpha$ -amylase and sodium sulphite for NDF analysis and corrected for ashes (Van Soest *et al.*, 1991). The analysis of total FA and FA profiles of feeds was performed according to Sukhija and Palmquist (1988) using nonadecanoic acid as an intern standard.

Milk yield was registered for 3 days during each sampling period, and individual milk samples were collected at each milk yield registration. Milk samples were preserved in 100 ml pots containing 2 tablets of Bronopol (BroadSpectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., USA) as a conserving product, and refrigerated at 4° C before being analyzed for fat, CP (N x 6.38), true protein, casein and TS. The analysis was performed using a near-infrared spectroscopy analyzer (NIRS Systems 5000, Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark). Calibration was checked using the AOAC (1990) reference methods. Two additional milk samples were taken for each experimental period to analyze their FA profile. In this case, the fat fraction was separated by centrifugation (Hettich-Universal 32, Tutlingen, Germany) for 15 min at 9000 rpm and 4°C and then stored at -20°C until posterior analysis. Milk FA were analyzed after extraction of milk fat samples and methylation (Palmquist and Jenkins, 2003) to avoid migration of conjugated double bonds of unsaturated FA. Milk fat samples (60 to 70 mg) were dissolved in 1 ml of benzene, and an alkaline *trans* esterification was completed using 2 ml of 0.5 M sodium methoxide in methanol (10 min at 50 °C). A second methylation with 3 ml of 100 ml/L methanolic HCl (10 min at 80 °C) followed. After addition of 1 ml of heptane and 7.5 ml of 60 g/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and centrifugation, the top solvent layers were transferred to a tube, 1 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added, and the samples were centrifuged at 6000 ×g and 4°C. The clear layers containing the FA methyl esters were transferred to 1 ml auto sampler vials and stored at -20°C until analysis.

Separation and quantification of the methyl esters from milk samples was carried out using a gas chromatograph (HP 6890, N. Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with flame ionization detector and capillary column (CP-Sil-88; 100 m x 0.25 mm i.d. with 0.20- $\mu$ m of capillary thickness; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The initial temperature of 70°C (during 1 min) was increased to 225°C (during 15 min) at an increasing rate of 1°C/min. Individual FA were identified by checking the retention times using those of pure standards (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) and expressed as percentages of the total FA detected as FA methyl esters (**FAME**). In the particular case of CLA identification, 2 patrons were used (Matreya Inc.,

State College, PA, USA) containing, respectively, *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers of CLA. For the vaccenic acid, 2 patrons were used (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) and they consisted respectively of *cis*-11 vaccenic acid and TVA.

Blood samples were collected on the last day of the sampling week of each experimental period, just before the morning milking and before any feed distribution. Samples were extracted in 10 ml evacuated tubes (Venoject, Terumo Europe, Belgium), they were maintained at 4°C for 5 hours and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. Collected serum was conserved at -20°C before being analyzed. The methodologies used were: the enzymatic UV test (method HK/G-6-PDH) for glucose, the ACS-ACOD Method (NEFA C, WAKO®) for NEFA, the enzymatic calorimetric method according to Fossati and Prencipe (1982) for triglycerides (TG), the enzymatic calorimetric test (method CHOD/PAP) for cholesterol, the kinetic enzymatic method (using the 3-hydroxybutyrate deshydrogenase) for hydroxybutyrates, and the enzymatic calorimetric test (Roche®) for both LDL and HDL). The apparatus used were an auto-analyzer (Olympus AU400, Hamburg, Germany) for glucose, NEFAs, TG, cholesterol and hydroxybutyrate, and an auto-analyzer (COBAS MIRA 89, GMI Inc., Minnesota, USA) for LDL and HDL determinations.

Individual BW (0.1 kg accuracy) and BCS of each animal were recorded at the beginning and the end of each experimental period of lactation trial, the BCS being measured on a scale of 0 to 5 according to Russel *et al.* (1969) to the nearest 0.25.

### **Cheese making and analyses**

In the last milk sampling of the last experimental period, the milk of each experimental group of ewes was collected and processed into ripened (60-d-old) cheese in a food technology plant. The milks were made into cheese simultaneously using 3 identical 10-L cheese vats. For each experimental treatment, one cylindrical 1 kg shaped cheese was manufactured for analytical purposes. Cheese ripening took place for 60 days at 14°C temperature and 85% relative humidity. After ripening, samples from the 60-d-old cheeses were taken to be analyzed in order to determine FA content. FA extraction, methyl esters preparation, separation and quantification were performed as previously described for milk samples.

### Statistical analysis

Individual data for BW, BCS, milk yield and composition, and group data for DMI were analyzed using the PROC MIXED procedure with repeated measures of SAS (SAS v. 8.2; SAS Inst., Inc., Cary, NC) using Tukey's multiple comparison test. The statistical model contained the fixed effects of treatments and experimental period, the random effects of the animal inside the group and the residual error. A similar but simplified model, including only data of the last experimental period, was used to analyze the effects of experimental treatments on cheese FA profile. Differences were declared at  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Primiparous and multiparous ewes showed some differences ( $P < 0.05$ ) as in the case of milk yield, BW and BCS, however, this effect did not have any significant interaction with the experimental treatments. Therefore, only main effects will be presented and discussed.

### Feed intake and nutritive value of experimental diets

Data of the experimental concentrates and diets composition are listed in Table 2 and the FA profile of the WSF, LSO and experimental concentrates in Table 3. As expected, the Control, WLS and LSO concentrates contained a close EE content (an average of 9.16%) which led to a similar EE content (average of 5.14%) of the experimental diets. Total FA content was quite similar between C (6.9%) and LSO (6.4%) concentrates but it was higher in the WLS (7.9%) concentrate. This is a direct consequence of the high fat content observed in the WLS, which was not easy to analyze because of the difficulties to obtain a small homogenous sample. As expected, the experimental diets were almost isonitrogenous ( $18.63 \pm 0.59\%$ ). All experimental diets had similar contents of dry matter ( $89.89 \pm 0.06\%$ ), Ash ( $10.43 \pm 0.17\%$ ), NDF ( $30.06 \pm 0.12\%$ ) and ADF ( $17.02 \pm 0.12\%$ ). According to the observed feed intake, we calculated that final diets contained, respectively, a daily amount of 70 g of calcium soap, 177g of WLS and 60 g of LSO (DM basis). As a consequence, FA profile differed between concentrates. The control (CSFA enriched) had a higher content of C16:0 and C18:1 than WLS and LSO, and lower contents of C18:2 (13.3, 22.7 and 29.5%) and C18:3 (0.9, 28.3 and 32%). For fat sources, total FA content of the linseed grains and oil was 40.9% and 89.7%, respectively, while the main FA was linolenic acid (57% and 51%, respectively).

Feed intake was higher ( $P < 0.05$ ) in the WLS group while there was no difference between the control and the LSO group (Table 4). In a previous study of our group, supplementation with WLS did not modify the DMI when including 8% of WLS in sheep diet (Pol *et al.*, 2001). Also, Petit (2002) with 10.8% of linseed in dairy cow diet, and Jenkins and Fotouhi (1990), feeding 2.4% of corn oil to wethers did not observe any modification of DMI. However, Wilkinson *et al.* (2000) observed a decreased DMI after feeding ewes with WLS. DMI is generally affected in the case of high levels of fat or strong flavor sources as fish oil (Kitessa *et al.*, 2001), but in our case the levels of EE (Table 1) and total FA attained in the diets (Table 3) were moderate to low. We think that a low fat control diet would probably show a higher DMI amount than C and LSO, and therefore no differences would be observed between C and WLS; Ngidi *et al.* (1990) feeding CSFA to steers and Harvantine and Allen (2005) feeding CSFA of unsaturated FA to dairy cows observed decreases of DMI.

### **BW and BCS**

BW and BCS were not changed by the experimental treatments during the study in spite of a tendency to a lower BW in the WLS group compared to the control (Table 4). Pol (2003) did not observe BW changes in Manchega dairy ewes fed WLS. However, a positive response of ewes to CSFA supplementation was described by Casals *et al.* (1999) when compared with a low fat control diet. In practice, results of BW have been very variable; several authors indicated no effects of lipid supplementation in dairy cattle (Driver *et al.*, 1990; Jenkins and Jenny, 1989), while other authors (Brandt y Anderson, 1990; Zinn, 1989) observed enhanced BW. In contrast, a BW depression is indicated by Chilliard *et al.* (1993) in the case of lactating dairy cows receiving unsaturated fat, although it depends on the lactation stage. Several factors such as the physiological stage (early or late lactation) and the daily voluntary intake of feed may be conditioning the energy balance and therefore the evolution of these parameters. In our case variations of BW and BCS always showed positive values, indicating that animals were in positive energy balance.

### **Blood metabolites**

Blood parameter data are listed in Table 5. Both linseed supplements increased ( $P < 0.01$ ) TG concentration. However, glucose (53.6 mg/dL), cholesterol (100.6 mg/dL), NEFA (0.11

mmol/L), HDL (1.78 mmol/L) or LDL cholesterol (0.67 mmol/L) concentrations remained unchanged between treatments, probably due to similar EE and total FA content of experimental diets. In contrast, with low fat control diets, Casals (1992) and Pol (2003) observed increases in TG, NEFA and total cholesterol concentrations when feeding CSFA and WLS to dairy ewes. In dairy cows fed WLS or CSFA, under similar circumstances to the present experiment, Petit (2002) observed similar levels of LDL cholesterol, but higher levels of total cholesterol, HDL cholesterol and NEFA in the animals fed CSFA. The fact that plasma TG concentration was increased in the ewes receiving linseed supplements may be related to the greater fat percentage and LCFA content of their milk. As indicated by Grummer *et al.* (1993), approximately 50% of synthesized milk fat is derived from plasma lipids. Moreover, Palmquist and Mattos (1978) estimated that 88% of the FA derived from blood is of dietary origin and 12% is of endogenous contribution.

### Dairy performance

Milk yield and composition data are listed in Table 6. Milk yield (1.88 kg/d), ECM (1.61 kg/d) and milk conversion rate (0.64 kg of ECM/kg DM) are expressed in kg after the application of an average of milk density value corresponding to each treatment, these parameters were not influenced by experimental treatments, probably due to the iso-energetic level of the diets. These results agree with several studies carried out in dairy sheep where it is difficult to improve milk yield (Bocquier and Caja, 2001), even if the control diet is not fat supplemented. Casals *et al.* (1999) and Osuna *et al.* (2000) did not find any modification in milk yield after feeding CSFA to Manchega and Lacaune dairy ewes, and Horton *et al.* (1992) registered a milk yield depression in dairy ewes fed high CSFA levels. Similarly, feeding fat supplements to goats in mid or late lactation did not increase milk yield (Teh *et al.*, 1994; Mir *et al.*, 1999). In contrast, data on dairy cows show that milk yield is generally increased by fat supplementation (DePeters and Cant, 1992, Chilliard *et al.*, 2001).

Regarding milk composition (Table 6), LSO increased ( $P < 0.05$ ) milk fat and TS content and yield, while WLS tended ( $P < 0.10$ ) to increase milk fat content and TS content and yield. The higher milk fat content in the milk of ewes fed linseed supplements could be explained by the increase of triglycerides concentration in their blood plasma, as discussed later. Studies on ruminants in dairy sheep showed clear increases in milk fat (Casals *et al.*, 1999; Osuna *et al.*,

2000) when low fat diets were used as a control, but this effect was not found when using soybean oil (Zervas *et al.*, 1998; Bouattour *et al.*, 2005). Milk content and yield of crude protein and casein were unaffected by treatments. In contrast, true protein content (5.20; 5.11; 4.97%) and yield (99, 95, 93 g/d) were reduced by both linseed treatments. It is not easy to explain why did the milk true protein decreased while the casein remained constant. Although feeding fat supplements to dairy cows (DePeters and Cant, 1992, Chilliard *et al.*, 2003; Beaulieu and Palmquist, 1995) and sheep (Casals *et al.*, 1999; Nudda *et al.*, 2004) often decreases milk protein content, this was not the case of the present study for CP and casein, probably due to the similar level of fat between diets, including the control. Feeding fat usually decreases milk true protein content of ruminants (Chilliard, 1993) when compared with low fat diets.

### Fatty acids composition

The concentrations of individual FA in milk fat are summarized in Table 7. Both WLS and LSO supplementations decreased the total saturated and increased the total unsaturated FA ( $P < 0.001$ ). The increase of unsaturated FA concerned both MUFA (20.8; 24.17; 24.74% of total FAME) and PUFA (3.35; 4.24; 4.37%). This was a direct repercussion of the fat sources fed to the ewes (Table 2), with FA profile of linseed supplements highly rich in unsaturated FA (90%).

Milk from ewes fed WLS and LSO had similar proportions of SCFA (C4 to C10) than control, while their medium-chain FA (MCFA) concentration was decreased (47.2; 42.3; 41.9%;  $P < 0.05$ ). These two groups of FA have mainly a mammary gland origin. LCFA, principally of a dietary origin, were increased (35.1; 41.0; 40.7%;  $P < 0.001$ ) by both linseed treatments. MCFA were decreased in milk of LSO and WLS treatments probably because of the higher level of C14:0 and C16:0 in the control diet. The addition of linseed grains and/or oil, both of them rich in LCFA (more than 90%), probably inhibited the MCFA synthesis in the mammary gland. According to Clapperton and Banks (1985), a higher absorption of LCFA could be responsible for this effect. Hansen and Knudsen (1987) indicated that this inhibitory action on the SCFA is attributed particularly to the increase of the C18:1 isomer concentrations. This could be the reason for the unchanged SCFA concentration, given that the control diet had a higher content of C18:1 isomers.

Regarding the CLA, in the present study only the rumenic acid (**RA**; *cis*-9, *trans*-11 CLA) was identified in the milk samples, but not the *trans*-10, *cis*-12 CLA. The *trans*-10, *cis*-12 CLA is

usually present in cow milk but not in ewe milk, as indicated by Lock *et al.* (2006) who did not find this isomer in ewe milk. CLA was increased ( $P < 0.001$ ) by both linseed treatments, but the increase was greater for LSO (+121%) treatment than for WLS (+19%). The TVA concentration was more than duplicated by LSO treatment ( $P < 0.01$ ) but not modified by WLS (1.3; 1.7; 3.1%). The TVA/RA ratio remained constant (average of 2.0) indicating a uni-sense evolution of RA and TVA. According to Grinaari *et al.*, 2000, the main part of the CLA (64-98%) is synthesized in the mammary gland from the TVA. The remaining CLA is produced during the rumen biohydrogenation. In our experiment this way is supported by the higher C18:1 concentration in both WLS and LSO milks, indicating a more increased ruminal biohydrogenation activity in the linseed treatments than in the control. Nevertheless, TVA, a product of linolenic acid biohydrogenation, was not changed by WLS treatment, which seems to indicate that the FA biohydrogenation was more active in the rumen of ewes receiving LSO than in those receiving CSFA or WLS. If there is a high biohydrogenation activity, rumen TVA content tends to be increased and the next step of biohydrogenation becomes a limiting factor (Chilliard *et al.*, 2006).

In addition, the co-evolution of CLA and TVA (constant ratio of TVA/RA) supports the important role of mammary desaturation of TVA in CLA biosynthesis. The increase of TVA concentration observed only in the case of LSO and the constant ratio TVA/RA of both WLS and LSO treatments agrees with the higher CLA increase observed in milk from LSO group. TVA is a precursor of RA by the mammary gland  $\Delta^9$  desaturase pathway (Grinari *et al.*, 2000). TVA was not changed by WLS treatment, indicating a lower rate of biohydrogenation of the unsaturated FA, relatively protected in the whole grain. Hervás *et al.* (2006) indicated a higher increases of both CLA (1.0 vs 3.9%) and TVA (2.2 vs. 8.6%) feeding a 6% of sunflower oil to dairy ewes. A similar result to those shown in the present study has been observed by Chilliard *et al.* (2003) feeding oilseeds from linseed, soybean, sunflower and lupine to dairy goats, TVA being increased only by sunflower seeds. As in the present study, the TVA increased (+139%) with LSO supplementation but not with WLS. Morales *et al.* (2000) observed that PUFA from soybean are partially protected against biohydrogenation. This result suggests that oilseeds may contain a protected part of PUFA, but also that the other part is slowly but more completely hydrogenated, C18:0, but not TVA, being increased in milk fat. The difference of response of LSO and WLS in terms of TVA and CLA is probably due exclusively to a different biohydrogenation of their respective PUFA in the rumen. In dairy cattle, Fuentes *et al.* (2006)

observed a similar increase of CLA concentration (0.70 vs. 1.02) when cows were fed a 5.5% of extruded linseed, but they observed also a higher concentration of TVA (1.32 vs. 2.43%), contrarily to the present study.

With other main milk FA, oleic acid was increased ( $P < 0.05$ ) by both treatments, probably as a consequence of C18:2 and C18:3 rumen biohydrogenation. Linoleic acid was lower ( $P < 0.05$ ) with WLS, while C18:3 in milk was increased ( $P < 0.01$ ) by both linseed treatments, but the increase was much higher with WLS (+144%) than with WLS (+77%). As indicated for CLA, in WLS form, it seems that FA were less accessible to rumen microorganisms of dairy ewes, which led to a higher concentration of C18:3 in the milk of ewes fed WLS because of a lower degree of rumen biohydrogenation than with the oil. In contrast, in dairy goats, Chilliard *et al.* (2003) observed a higher increase of C18:3 with LSO (+325%) supplementation than with WLS (+200%). The n-6/n-3 ratio decreased ( $P < 0.001$ ) by both linseed treatments (4.17%; 1.46%; 2.29%), basically as a consequence of the increase of C18:3. The ideal n-6/n-3 ratio is thought to be 4:1 (Simopoulos, 1999) and while the World Health Organization (1995) recommends a range between 5:1 and 10:1 for the human diet, but it is well known that the n-6/n-3 ratio of most human diets is usually much higher than this range. The milk produced in the present study, with a very low n-6/n-3 ratio, could help to moderate this ratio of total human diet. In addition to the low n-6/n-3 ratio, both forms of FA (oil or whole grains) led to produce milk with a lower atherogenicity index (3.4; 2.5; 2.5), which is considered an indicator of dietary saturated FA risk factor of coronary disease (Ulbricht and Southgate, 1991). Nevertheless, recent studies (Bauman *et al.*, 2006; Chilliard *et al.*, 2006) indicated that there is a little evidence of the atherogenic effect of C12, C14 and C16 saturated FA. Therefore the atherogenicity index only seems to be relevant in the case of excessive intake of saturated fat.

These results are an illustration of how dietary factors can modify sheep milk FA composition in order to promote potential effects on its quality for human nutrition. Milk FA composition has a number of effects on milk quality, including its physical (e.g. melting point and hardness of butter, crystallization and fractionation of milk fat) and its nutritional properties (e.g. potential effects of specific FA on human health). FA composition also affects the organoleptic properties of milk, due to factors such as the effect of free SCFA and the oxidative changes in FA. In case of milk with high levels of linolenic acid, as when feeding linseed supplements, these properties could be modified.

### Fatty acids composition of cheeses

When cheese making was carried out, the response in terms of FA composition of 60-d-old cheese (Table 8) was in general similar to that of the corresponding milk, except for SCFA that were not modified in the milk, but decreased in the cheese corresponding to both treatments. This exception, in addition to few others particular FA, are probably due to the fact that the cheese was made from milk of the last experimental period. MCFA and LCFA as well as saturated, unsaturated, MUFA, PUFA, TVA and CLA had similar tendencies to those observed in the milk. Because of the CSFA, control cheese had higher contents of C16:0 ( $P < 0.05$ ). Milk from ewes fed WLS or LSO produced cheeses with lower contents of SCFA, MCFA and saturated FA and higher contents of oleic acid, *cis* vaccenic acid, CLA, and C18:3 ( $P < 0.05$ ). As a consequence of these changes, the atherogenicity index was decreased in both linseed treatments.

As in milk, TVA was only increased (+79%) by LSO, and not by WLS. Similarly, CLA increases observed in cheese were higher with LSO (+93%) than with WLS (+15%). In contrast, the increase observed in C18:3 of cheese was higher with WLS (+97%) than with LSO (+45%), as previously indicated in milk. As observed previously by Nudda *et al.* (2005) and Addis *et al.* (2005), FA composition of cheese is usually similar to milk FA composition. In general terms, cheese FA profile was quite similar to milk FA and the enhanced properties of milk were conserved throughout the cheese making. Under the experimental conditions of the present study, we can conclude that the modification of the FA profile of ewe milk by the diet leads to obtain cheeses with a similar FA composition.

## CONCLUSIONS

In Lacaune dairy ewes fed an approximate 1/1 forage to concentrate diet, both whole linseed grains and linseed oil in moderated doses were useful to increase milk fat content and PUFA and to produce, in general terms, a more healthy milk for human consumption. After cheese making we observed that these enhanced properties are conserved. WLS was more useful than LSO to increase n-3 FA content and reduce n-6/n-3 ratio. Only LSO increased milk TVA content. In contrast the increase of milk CLA was higher with LSO than with WLS. Thus, using linseed oil to produce milk and cheese richer in CLA and TVA or using whole linseed to obtain products richer in n-3 FA could be very interesting tools for farming strategies.

## REFERENCES

- Addis, M., A. Cabiddu, G. Pinna, M. Decandia, G. Piredda, A. Pirisi, and G. Molle. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid *cis*-9, *trans*-11. *J. Dairy Sci.* 88:3443–3454.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. Vol I, 15th Ed. AOAC, Arlington, VA.
- Bauman, D. E., B. Corl, L. Baumgard, J. Griinari. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. Pages 221-250 in Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.). Recent Advances in Animal Nutrition, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243
- Beaulieu A. D. and D. L. Palmquist. 1995. Differential Effects of High Fat Diets on Fatty Acid Composition in Milk of Jersey and Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 78:1336-1344.
- Bocquier, F and G. Caja. 2001. Production et composition du lait de brebis: effets de l'alimentation. INRA Prod. Anim., 14, 129-140.
- Bocquier, F., F. Barillet, P. Guillouet, and M. Jacquin. 1993. Prévision de l'énergie du lait de brebis à partir de différents résultats d'analyses: proposition de lait standard pour les brebis laitières. *Ann. Zootech.*, 42:57-66.
- Bouattour, M. A., R. Casals, E. Albanell, E. González, X. Such, and G. Caja. 2005. Effects of fibrolytic enzymes and soybean oil on dairy sheep performance and nutrients digestibility. *J. Dairy Sci.* 88 (Suppl. 1):308 (Abstr.).
- Brandt, R. T. Jr., and S. J. Anderson. 1990. Supplemental fat source affects feedlot performance and carcass traits of finishing yearling steers and estimated diet net energy value. *J. Anim. Sci.* 68:2208-2216.
- Casals, R. 1992. Efectos de la utilización de lípidos protegidos en la alimentación de ovejas de ordeño durante los periodos de lactación y de cubrición. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 178 pp. In Spanish with English abstract.
- Casals, R., G. Caja, X. Such, C. Torre, and S. Calsamiglia. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 66:177-191.

- Casals, R., G. Caja, M.V. Pol, X. Such, E. Albanell, A. Gargouri and J. Casellas. 2006. Response of lactating dairy ewes to various levels of dietary calcium soaps of fatty acids. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 131:312-332.
- Chilliard, Y. 1993. Dietary Fat and Adipose Tissue Metabolism in Ruminants, Pigs and Rodents: A Review. *J. Dairy Sci.* 76:3897-3931
- Chilliard, Y., A. Ferlay and M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Prod. Sci.* 70:31-48.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J Dairy Sci.* 86:1751–1770.
- Chilliard, Y., J. Rouel, A. Ferlay, L. Bernard, P. Gaborit, K. Raynal-Ljutovac, A. Lauret, and C. Leroux. 2006. Optimising goat milk and cheese fatty acid composition. Pages 281-312 in: Improving the fat content of foods. C. Williams and J. Buttriss (ed.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK.
- Clapperton, J. L., and W. Banks. 1985. Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. *J. Sci. Food Agric.* 36:1205.
- DePeters, E. J., and J. P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75 (8):2043-2070.
- Driver, L. S., R. R. Grummer, and L. H. Schultz. 1990. Effects of feeding heat treated soybeans and niacin to high producing cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 73:463
- Fossati P., and L. Prencipe. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28:2077-2080.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, C. Sánchez, A. González, J. E. Santos, J. R. Newbold, L. M. Rodríguez Alcalá, J. Fontecha. 2006. Milk production, milk composition and reproduction function of dairy cows fed extruded linseed. Proceedings of the 4th European Federation of Lipids congress. Madrid, Spain. 561 (Abstr.).
- Gargouri, A. 1997. Efectos de la utilización de jabones cárnicos de ácidos grasos de cadena larga en ovejas lecheras durante los períodos de cría y de ordeño. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 174pp. In Spanish with English abstract.

- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130:2285–2291.
- Grummer, R. R. 1993. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient. Dairy Cows. *J. Dairy sci.* 76:3882-3896.
- Hansen, H.O. and J. Knudsen. 1987 Effect of exogenous long chain fatty acids on individual fatty acid synthesis by dispersed ruminant mammary gland cells. *J. Dairy Sci.* 70:1350-1354.
- Harvatine, K. J., and M. S. Allen. 2005. The effect of production level on feed intake, milk yield, and endocrine responses to two fatty acid supplements in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 88:4018–4027.
- Hervás, G., P. Luna, A. R. Mantecón, N. Castañares, P. Frutos, M. A de la Fuente, and M. Juárez. Effect of sunflower oil on sheep milk production and composition, and in Vitro rumen fermentation. Proceedings of the 4th European Federation of Lipids congress. Madrid, Spain. p 571 (Abstr.).
- Horton, G. M. J., J. E. Wohlt, D. D. Palatin and J. A Baldwin. 1992. Rumen-protected lipid for lactating ewes and their nursing lambs. *Small Rum. Res.* 9:27-36.
- Jenkins, T. C., and N. Fotouhi. 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Anim. Sci.* 68:460-466.
- Kay, J. K., W. J. Weber, C. E. Moore, D. E. Bauman, L. B. Hansen, H. Chester-Jones, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2005. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *J. dairy Sci.* 88:3886-3893.
- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. II. Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 89:201–208.
- Kramer, J. K. G., C. Cruz Hernandez and M. E. R. Dugan. 2006. *Trans*-PUFA isomers, analytical aspects, occurrence in plant and animal lipids. Proceedings of the 4th European federation of lipids congress. Madrid, Spain. p 34 (Abstr.).
- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206

- Lock, A. L., B. M. Teles, J. W. Perfield II, D. E. Bauman, and L. A. Sinclair. 2006. A conjugated linoleic acid supplement containing *trans*-10, *cis*-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. *J. Dairy Sci.* 89:1525-1532.
- Mir, Z., L. A. Goonewardene, E. Okine, S. Jaegar, and H.D. Scheer. 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Rum. Res.* 33:137-143.
- Morales, M. Sol, D. L. Palmquist, and W. P. Weiss. 2000. Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soybeans or tallow. *J. Dairy Sci.* 83:2112-2119.
- Ngidi, M. E., S. C. Loerch, F. L. Fluharty and D. L. Palmquist. 1990. Effects of calcium soaps of long-chain fatty acids on feedlot performance, carcass characteristics and ruminal metabolism of steers. *J. Anim. Sci.* 68:2555-2565.
- Nudda, A., G. Battaccone, R. Bencini, and G. Pulina. 2004. Nutrition and milk quality. Pages 129–149 in *Dairy Sheep Nutrition*. G. Pulina, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Nudda, A, M. A. McGuire, G. Battaccone, and G. Pulina. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and Ricotta. *J. Dairy Sci.* 88:1311–1319.
- Osuna, D. R., R. Casals, E. Albanell, and G. Caja. 2000. Effects of feeding calcium soaps or whole oilseeds on feed intake and lactation performances of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 83 (Suppl. 1):278 (Abstr.).
- Palmquist, D. L., and W. Mattos. 1978. Turnover of lipoproteins and transfer to milk fat of dietary (1-Carbon-14) linoleic acid in lactating cows. *J. Dairy sci.* 61:561-565.
- Palmquist, D. L. 1988. The feeding value of fats. Pages 293-312 in: *World Animal Science*. Vol. 4. Ed: E. R. Ørskov, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81:3250-3254.
- Pariza, M. W., Y. Park and M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40:283–298.
- Petit, H. V. 2002. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *J. Dairy Sci.* 85:1482-1490.

- Petit, H. V., C. Germiquet, and D. Lebel. 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3889-3898.
- Pol, M. V., R. Casals, E. Albanell, and X. Such. 2001. Effects of feeding whole linseed on milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 84 (suppl. 1):353 (Abstr.).
- Pol, M. V. 2003. Efecto de la suplementación con semilla entera de lino sobre la producción y composición de leche de ovejas de raza Manchega. Master Degree Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 103pp. In Spanish with English abstract.
- Russell, A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72:451-454.
- Simopoulos, A. P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70:560-569.
- Such , X., G. Caja, N. Fernández, M. P. Molina, and A. Torres. 1999. The effects of type of pulsator on the evolution of milk emission kinetics during machine milking in Manchega ewes. In: Milking and milk production of dairy sheep and goats. Pages 227-232 in F. Bariellet and N.P. Zervas (Eds.), EAAP Publication No. 95, Wageningen Press., Wageningen, the Neteherlands.
- Sukhija, P. S., and D. L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202-1206.
- Teh, T. H., L. T. Trung, Z. H. Jia, T. A. Gipson, K. B. Ogden and T. F. Sweeney. 1994. Varying amounts of rumen-inert fat for high producing goats in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77:253-258.
- Ulbricht, T. L. V., and D. A. T. Southgate. 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* 338:985-992.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Ward, A. T., K. M. Wittenberg, and R. Przybylski. 2002. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola. *J. Dairy Sci.* 85:1191–1196.
- Wilkinson R. G., V. E. Fry, and L. A. Sinclair. 2000. Effect of untreated and formaldehyde treated whole linseed on the performance and fatty acid composition of milk produced by Friesland ewes. Page 152 A in Proc. Br. Soc. Anim. Sci., York, UK.
- WHO and FAO Joint Consultation: Fats and Oils in Human Nutrition. Nutrition Reviews, 1994:202-205.

Zervas, G., K. Fegeros, K. Kyotsotolis, C. Goulas, and A. Mantzios. 1998. Soy hulls as a replacement for maize in lactating dairy ewe diet with or without dietary fat supplements. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 76:65-75.

Zinn, R. A. 1989. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for steers: feedlot cattle growth and performance. *J. Anim. Sci.* 67:1029-1037.

**Table 1.** Feed ingredients of the experimental concentrates and diets containing or not whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) fed to dairy ewes.

Ingredients, % as fed	Concentrates			Experimental diets <sup>1</sup>		
	Control	WLS	LSO	Control	WLS	LSO
Dehydrated alfalfa	---	---	---	26.57	26.59	26.58
Dehydrated fescue	---	---	---	26.57	26.59	26.58
Ground corn	16.70	16.70	16.70	7.26	7.27	7.26
Ground wheat	16.70	16.70	16.70	7.26	7.27	7.27
Ground barley	33.40	28.30	33.40	14.52	12.31	14.53
Whole barley	---	---	---	3.40	3.32	3.34
Soybean meal-44%	24.00	18.90	24.00	10.4	8.2	10.4
Calcium soap <sup>2</sup>	6.00	---	---	2.61	---	---
Linseed grain	---	15.0	---	---	6.53	---
Linseed oil	---	---	5.00	---	---	2.18
Bicalcic phosphate	0.70	0.70	0.70	0.30	0.30	0.30
Calcium carbonate	---	1.20	1.00	---	0.52	0.44
Magnesium oxide	0.30	0.30	0.30	0.13	0.13	0.13
Sodium bicarbonate	0.60	0.60	0.60	0.3	0.3	0.3
TM Salt	0.60	0.60	0.60	0.26	0.26	0.26
Minerals and vitamins <sup>3</sup>	0.98	0.98	0.98	0.43	0.43	0.43
Vitamin E	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01

<sup>1</sup>Including a constant portion of barley (50 g/ewe) offered in the milking parlor at each milking.<sup>2</sup>Magnapac (Norel SA, Madrid, Spain), containing 96.9% DM and in DM basis: 84.4% of fat; 15.6% of ash; 9% of Ca; 1.2% of 14:0; 37.1% of 16:0; 4.2% of 18:0; 33.8% of 18:1; 8.02% of 18:2.<sup>3</sup>Contains (g/kg): I, 1.22; Mn, 103; Zn, 104; Fe, 130; Cu, 16.6; Co, 0.34; Se, 0.31; (IU/kg): vitamin A, 10.700; vitamin D, 2.700; vitamin E, 56; and antioxidant, 222 g/kg.**Table 2.** Chemical composition and nutritional values of experimental concentrates and diets containing whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) fed to Lacaune dairy ewes.

Composition, % DM	Concentrates			Experimental diets		
	Control	WLS	LSO	Control	WLS	LSO
DM, % as fed	89.62	89.85	89.86	89.83	89.92	89.93
Ash	7.59	8.02	7.27	10.41	10.60	10.27
CP	18.90	20.78	18.28	18.44	19.27	18.18
EE	9.08	9.57	8.70	5.13	5.34	4.96
NDF	12.41	12.84	12.34	30.00	30.20	29.97
ADF	4.90	5.26	4.74	16.99	17.15	16.92
NE <sub>L</sub> <sup>1</sup> , Mcal/kg DM	2.03	1.97	2.00	1.62	1.59	1.61

<sup>1</sup>NEL: Net Energy for Lactation (Mcal/ kg DM).

**Table 3.** FA composition (% of total FAME) of whole linseeds (WLS), linseed oil (LSO) and experimental concentrates and diets

Fatty acids	WLS	LSO	Concentrates			Diets		
			Control	WLS	LSO	Control	WLS	LSO
C12:0	0.00	0.00	1.03	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00
C14:0	0.00	0.00	1.31	0.05	0.07	1.28	0.06	0.09
C16:0	6.23	5.47	42.90	8.92	9.67	42.44	9.36	10.20
C18:0	4.03	4.02	4.60	3.93	3.90	4.54	3.89	3.86
C18:1n-9	18.67	22.07	31.56	17.85	20.25	31.04	17.81	20.14
C18:1 n-7	0.86	0.73	0.25	0.90	0.83	0.27	0.90	0.83
C18:2	12.90	16.73	15.93	17.74	23.21	16.82	18.22	23.65
C18:3	57.31	50.98	1.19	49.67	40.75	1.30	48.69	39.79
C20:0	0.00	0.00	0.13	0.05	0.07	0.08	0.06	0.08
C22:0	0.00	0.00	0.34	0.13	0.35	0.21	0.15	0.22
Total FA (% DM)	40.89	89.74	6.92	7.91	6.45	3.12	3.58	3.03

**Table 4.** Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) to Lacaune dairy ewes on DMI, BW and BCS.

	Treatments <sup>1</sup>			SEM	Effect (P<) <sup>1</sup>		
	Control 1	WLS	LSO		Control vs. WLS	Control vs. LSO	WLS vs. LSO
DMI, kg/day	2.65	2.72	2.70	0.02	*	NS	NS
BW, kg	69.01	67.97	68.46	1.830	+	NS	NS
Variation of BW <sup>2</sup> , kg	2.12	1.41	1.86	0.471	NS	NS	NS
BCS <sup>3</sup>	2.88	2.89	2.86	0.043	NS	NS	NS
Variation of BCS <sup>4</sup>	0.20	0.29	0.23	0.087	NS	NS	NS

<sup>1</sup>+ P < 0.10; \* P < 0.05.<sup>2</sup>Difference between BW on the first and last day of each experimental period.<sup>3</sup>Body Condition Score (scale of 0 to 5 to the nearest 0.25), measured according to Russell *et al.* (1969).<sup>4</sup>Difference between BCS at the beginning and end of each experimental period.

**Table 5.** Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) on blood serum metabolites concentrations of Lacaune dairy ewes.

	Treatments				Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>		
	Control	WLS	LSO	SEM	Control vs. WLS	Control vs. LSO	WLS vs. LSO
Cholesterol (mg/dL)	100.02	103.5	98.3	6.979	NS	NS	NS
Glucose (mg/dL)	53.44	53.58	53.81	2.318	NS	NS	NS
Triglycerides (mg/dL)	12.69	19.2	17.63	1.409	**	**	NS
Hydroxybutyrate (mmol/L)	0.48	0.54	0.51	0.035	NS	NS	NS
NEFA (mmol/L)	0.10	0.12	0.11	0.011	NS	NS	NS
Cholesterol HDL (mmol/L)	1.75	1.78	1.81	0.107	NS	NS	NS
Cholesterol LDL (mmol/L)	0.68	0.70	0.64	0.061	NS	NS	NS

<sup>1</sup> \*\*  $P < 0.01$ .

**Table 6.** Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) to Lacaune dairy ewes on milk production and composition.

	Treatments				Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>		
	Control	WLS	LSO	SEM	Control vs. WLS	Control vs. LSO	WLS vs. LSO
Milk yield, gL/d	1.91	1.86	1.87	0.093	NS	NS	NS
ECM <sup>2</sup> , kg/d	1.61	1.59	1.64	0.073	NS	NS	NS
ECM/DMI, kg/kg DM	0.64	0.63	0.65	0.028	NS	NS	NS
Fat, %	5.7	5.85	6.09	0.108	+	***	**
Fat, g/d	107.7	107.6	113.6	4.88	NS	*	*
Protein, %	5.24	5.21	5.18	0.079	NS	NS	NS
Protein, g/d	99.1	95.7	96.5	4.41	NS	NS	NS
True protein, %	5.2	5.11	4.97	0.085	NS	**	*
True protein, g/d	99.3	95.0	92.9	4.37	NS	**	*
Casein, %	4.07	4.11	4.08	0.069	NS	NS	NS
Casein, g/d	77.7	76.4	76.3	3.58	NS	NS	NS
Total solids, %	16.34	16.57	16.9	0.168	+	***	**
Total solids, g/d	312.1	308.2	316.0	14.67	+	***	**

<sup>1</sup> +  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>2</sup> Energy Corrected Milk estimated according to Bocquier et al. (1993): ECM= Milk Yield (kg/d) x (0.071 x Fat (%)) + 0.043 x CP (%)) + 0.2224).

**Table 7.** Effects of feeding whole linseed (WLS) or linseed oil (LSO) on milk fatty acids methyl esters (FAME) concentrations in Lacaune dairy ewes milk (% of total FAME<sup>1</sup>).

	Treatments			SEM	P< <sup>2</sup>		
	C	WLS	LSO		C vs. WLS	C vs. LSO	WLS vs. LSO
C4:0	2.07	2.17	2.14	0.074	NS	NS	NS
C6:0	2.64	2.53	2.67	0.092	NS	NS	NS
C8:0	3.02	2.71	3.03	0.142	NS	NS	NS
C10:0	9.60	7.89	9.19	0.438	*	NS	NS
C12:0	5.56	4.36	5.19	0.263	NS	NS	NS
C14:0	12.05	10.09	10.85	0.340	**	*	*
C14:1	0.16	0.12	0.15	0.012	NS	NS	NS
C15:0	0.81	0.81	0.86	0.035	NS	NS	NS
C16:0	27.95	27.22	24.16	1.431	NS	NS	NS
C16:1	0.61	0.63	0.62	0.047	NS	NS	NS
C17:0	0.47	0.51	0.51	0.017	NS	NS	NS
C18:0	10.69	12.22	11.19	0.480	**	NS	*
C18:1 n9t	0.25	0.30	0.42	0.028	NS	**	**
<i>trans</i> -11 C18:1 (TVA)	1.31	1.70	3.13	0.337	NS	**	**
C18:1 n9c	17.98	20.9	19.50	0.405	***	*	NS
<i>Cis</i> -11 C18:1	0.45	0.55	0.79	0.107	NS	NS	NS
C18:2 n-6t	0.20	0.21	0.38	0.041	NS	**	**
C18:2 n-6c	3.25	2.78	3.16	0.424	*	NS	*
<i>Cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.66	0.79	1.46	0.135	*	***	**
C18:3 n-3	0.78	1.91	1.38	0.308	***	**	**
n-6 / n-3	4.17	1.46	2.29	0.391	***	***	NS
SCFA	17.4	16.64	17.10	0.658	NS	NS	NS
MCFA	47.24	42.33	41.90	1.07	*	**	NS
LCFA	35.10	41.02	40.70	0.795	***	***	NS
Saturated FA	75.43	71.17	70.45	0.641	***	***	NS
Unsaturated FA	24.16	28.42	29.12	0.640	***	***	NS
MUFA	20.80	24.17	24.74	0.455	***	***	NS
PUFA	3.35	4.24	4.37	0.326	**	**	NS
TVA / CLA	1.93	1.96	2.09	0.103	NS	NS	NS
Atherogenicity index <sup>3</sup>	3.4	2.54	2.52	0.091	***	***	NS
Δ <sup>9</sup> -Desaturase ratios <sup>4</sup>							
C14	0.013	0.010	0.015	0.0013	NS	NS	*
C16	0.022	0.024	0.026	0.0015	NS	NS	NS
C18	0.65	0.66	0.68	0.0164	NS	NS	NS
CLA	0.34	0.33	0.33	0.013	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Fatty Acids Methyl Esters.

<sup>2</sup> Effect: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>3</sup> Calculated according to Ulbricht and Southgate (1991) as:  $(C12 + 4 C14 + C16) / (\text{sum of unsaturated FA})$ .

<sup>4</sup> Calculated for each pair of FA according to Kelsey et al. (2003) as:  $(\text{product of } \Delta 9\text{-desaturase}) / (\text{product of } \Delta 9\text{-desaturase} + \text{substrate of } \Delta 9\text{-desaturase})$ ; ie: C14: C14:1/ (C14:1 + C14:0).

**Table 8.** Effects of feeding whole linseed (WLS) and linseed oil (LSO) on fatty acids concentrations of cheese from Lacaune dairy ewes (% of total FAME<sup>1</sup>).

	Treatments			SEM	P< <sup>2</sup>		
	C	WLS	LSO		C vs. WLS	C vs. LSO	WLS vs. LSO
C4:0	2.58	2.45	2.01	0.380	NS	NS	NS
C6:0	2.90	2.54	2.40	0.326	**	**	NS
C8:0	3.15	2.72	2.66	0.430	**	**	NS
C10:0	9.55	8.36	8.71	0.132	**	**	NS
C12:0	6.35	4.68	5.09	0.041	**	**	NS
C14:0	13.65	11.52	11.67	1.301	*	*	NS
C14:1	0.21	0.16	0.19	0.012	**	NS	*
C15:0	0.89	0.82	0.91	0.034	NS	NS	NS
C16:0	26.30	23.17	23.04	0.941	**	**	NS
C16:1	0.94	0.54	0.67	0.031	**	*	NS
C17:0	0.55	0.47	0.51	0.293	NS	NS	NS
C18:0	10.42	14.72	12.11	0.651	**	NS	NS
C18:1 n9t	0.45	0.31	0.66	0.091	**	**	**
<i>trans</i> -11 C18:1 (TVA)	1.41	1.71	2.52	0.094	NS	**	**
C18:1 n9c	16.51	19.36	19.67	0.631	**	**	NS
<i>Cis</i> -11 C18:1	0.68	0.91	1.15	0.081	*	**	*
C18:2 n-6t	0.39	0.32	0.47	0.0213	NS	NS	NS
C18:2 n-6c	2.88	2.46	2.41	0.198	NS	NS	NS
<i>Cis</i> 9- <i>trans</i> 11 CLA	0.72	0.83	1.39	0.114	*	**	*
C18:3 n-3	1.01	1.99	1.46	0.231	**	*	*
n-6 / n-3	3.25	1.39	1.98	0.166	**	**	*
SCFA	18.18	16.07	15.79	0.851	**	**	NS
MCFA	48.34	40.81	41.58	1.240	**	*	NS
LCFA	34.91	43.03	42.63	0.848	*	*	NS
Saturated FA	76.63	71.73	69.40	0.976	*	*	NS
Unsaturated FA	24.80	28.35	30.59	0.813	*	**	NS
MUFA	20.20	22.90	24.86	0.517	*	*	NS
PUFA	4.60	5.44	5.73	0.470	*	**	NS
TVA / CLA	1.97	2.07	1.83	0.191	NS	NS	NS
Atherogenicity index <sup>3</sup>	3.52	2.61	2.45	0.083	**	**	NS
Δ <sup>9</sup> -Desaturase ratios <sup>4</sup>							
C14	0.015	0.014	0.016	0.0020	NS	NS	NS
C16	0.034	0.023	0.028	0.0022	*	*	NS
C18	0.65	0.60	0.66	0.029	NS	NS	NS
CLA	0.33	0.32	0.32	0.014	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Fatty Acids Methyl Esters.

<sup>2</sup> Effect: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>3</sup> Calculated according to Ulbricht and Southgate (1991) as:  $(C12 + 4 C14 + C16) / (\text{sum of unsaturated FA})$ .

<sup>4</sup> Calculated for each pair of FA according to Kelsey *et al.* (2003) as:  $(\text{product of } \Delta 9\text{-desaturase}) / (\text{product of } \Delta 9\text{-desaturase} + \text{substrate of } \Delta 9\text{-desaturase})$ ; ie: C14: C14:1/ (C14:1 + C14:0).

---

---

*V. Effects of Feeding Whole Safflower Seeds to Dairy Ewes  
on Dairy Performance and Conjugated Linoleic Acid in Milk*

---

---

## ABSTRACT

A total of 24 Lacaune dairy ewes milked twice daily were used to study the effects of adding whole safflower seeds (WSF) to the concentrate on dairy performance and Conjugated Linoleic Acid (CLA) in milk. Ewes were allocated to two balanced groups according to number of lactation, body weight and daily milk yield, and kept in two separate pens. Experimental diets contained a mixture of 53% forage (dehydrated fescue and alfalfa, 1:1) and 47% concentrate, to which the WSF was or not added. Dietary treatments were: 1) Control and 2) WSF (16.3% as fed in the concentrate). Control concentrate contained calcium soaps of palm oil (6%) in order to have a similar level of total fatty acids (FA) and energy density between diets. The experiment consisted of a 2x2 crossover design (20 days period), during which the total mixed ration was offered ad libitum in the pens (08:30 and 18:30). Feeding WSF decreased dry matter intake (2.42 vs. 2.34 kg/d), milk yield (1.58 vs. 1.48 kg/d), energy corrected milk (1.47 vs. 1.34 kg/d) and milk conversion rate (0.60 vs. 0.57 kg/kg DM), but did not modify milk fat, protein, casein and total solids contents. True protein content was increased (5.16 vs. 5.43%) and fat and protein yields were decreased by the WSF treatment, mainly due to the milk yield depression. Feeding safflower seeds increased concentrations of long chain FA (38.09 vs. 48.75%) and unsaturated FA (29.59 vs. 33.70%), and decreased short chain FA (13.46 vs. 12.28%) and saturated FA (70.14 vs. 65.95%). Concentrations of n-3 (0.87 vs. 0.89%) and n-6 (3.17 vs. 3.50%) FA as well as the ratio n-6/n-3 were increased by the addition of WSF. As a consequence of WSF supplementation, concentrations of rumenic (*cis*-9, *trans*-11 CLA, 0.60 vs. 0.88%) and *trans*-11 C18:1 (TVA or *trans*-vaccenic acid; 1.19 vs. 1.70%) acids in milk increased. In addition, feeding WSF reduced the saturated/unsaturated FA ratio (2.37 vs. 1.96), the desaturase index of the oleic acid and the atherogenicity index (2.69 vs. 2.08) of the milk fat. In conclusion, when compared with a traditional and isoenergetic diet containing calcium soaps of palm oil fatty acids, feeding WSF to Lacaune dairy ewes reduced milk yield but improved milk fatty acids profile in terms of human health due to its higher unsaturated FA, CLA and TVA contents.

Keywords: dairy sheep, safflower seeds, milk quality, CLA.

## INTRODUCTION

The Mediterranean type of climate is characterized by a hot dry summer and a mild to cool rainy winter. For dairy ewes on natural rain-fed pastures, the main factor limiting animal performance is the decrease in food quality in late spring when plants eventually dry off (Noy-Meir, 1992). Grazing ewes on pasture legumes in late spring may help in preventing the decrease in performance (Rochon *et al.*, 2004) but legume persistence is not guaranteed because of poor competitiveness against weeds, and intensive systems with confined animals are more frequent.

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), a strongly tap-rooted annual legume, grows naturally in the Middle East. It is resistant to saline conditions and to moisture stress, and can reach the deep-lying water (Aase and Pikul, 2000). In addition, safflower, an oleaginous plant rich in unsaturated fatty acids (**FA**) such as linoleic or oleic, depending on varieties, seems to have a favorable lipid profile to enhance milk fat quality. As shown in dairy cows (Bauman *et al.*, 2001) and goats (Chilliard *et al.*, 2006), feeding unsaturated fat sources helps to increase conjugated linoleic acid (**CLA**) content in milk. CLA is considered a functional food because of its positive effects on health, which are mainly anticarcinogenic, anti diabetes type II or anti obesity (Park *et al.*, 1997, McGuire and McGuire, 2000; Lock and Bauman, 2004).

The biosynthesis of the main isomer of CLA, *cis*-9, *trans*-11 C18:2 or rumenic acid (**RA**), occurs basically in two principal ways: the first described is the partial biohydrogenation of unsaturated FA, particularly linoleic acid, in the rumen (Chilliard *et al.*, 2001); the second, proposed later, is the desaturation of another intermediate product of the rumen biohydrogenation, *trans*-11 C18:1 or *trans* vaccenic acid (**TVA**), by the action of the Δ-9 desaturase in the mammary gland. In cows this pathway usually contributes with the 64-98% of total CLA present in milk (Grinaari *et al.*, 2000).

Compared to data on the factors affecting CLA content of milk from dairy cows, available data on milk CLA and TVA of dairy ewes is very limited. Nudda *et al.* (2004) showed that contents of CLA and TVA in ewe milk from processing plants in the north of Sardinia (Italy) had important seasonal variations, probably due to changes in pasture quality, and Addis et al (2005) obtained higher values of milk CLA when fresh forages fed to Sarda ewes were rich in linoleic acid. Moreover, with hay based diets, Casals *et al.* (2006) obtained low milk CLA values, and observed no differences in CLA content of milk when calcium soap of palm oil fatty acids (**CSFA**) were included in the concentrate of Manchega dairy ewes. Calcium soaps are widely

used as a traditional fat supplement in the European dairy sheep industry in order to increase the fat content of milk (Casals *et al.*, 1999), but due to their more saturated fatty acid profile and partial protection against ruminal biohydrogenation they have no effect on milk CLA.

There are few studies on the effects of whole safflower seeds (**WSF**), a relatively unsaturated source of FA, on dairy performance and milk FA profile, and they have been mainly done with bovine. Scholljegerdes *et al.* (2004) compared the fermentation pathways under supplementation with two kinds of safflower (the first rich in oleic acid and the second rich in linoleic acid) in heifers fitted with ruminal and duodenal cannulas. The authors concluded that both kinds of safflower seeds increased the duodenal flux of *trans*-11 C18:1 or TVA and that the safflower rich in linoleic acid increased it much more.

As TVA is a direct precursor of CLA, and is also considered to be a functional food (Bauman *et al.*, 2006), the aim of this study was to investigate in dairy ewes the effects of feeding rich linoleic WSF on dairy performance and milk fatty acids profile, particularly CLA and TVA, when compared with a traditional and isoenergetic control diet including CSFA.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental Design, Animals and Feeding*

Twenty four Lacaune dairy ewes (12 primiparous and 12 multiparous) from the herd of the Universitat Autònoma de Barcelona were used in a lactation trial according to a 2x2 cross-over experimental design, with 2 periods of 20 days (14 for adaptation + 6 for sampling) and 2 treatments: 1) **C** (control) and 2) **WSF** (16.3% in the concentrate). Experimental groups were balanced at the beginning of the trial according to lactation number, previous milk yield and body weight of the ewes at 14±1 weeks after lambing.

Ewes were fed twice daily (at 08.30 and 18.30) a TMR with 55% forage (alfalfa and fescue dehydrated mixture, 1:1) and 45% experimental concentrate. In addition, a small and constant amount of the same concentrate (50g/ewe) was offered in the milking parlor at each milking (08.00 and 18.00) which modified slightly the final forage/concentrate ratio of the diet to 53:47. The ingredients and the chemical composition of experimental concentrates and diets are shown in Tables 1 and 2. CSFA (6% as fed) were included in the control concentrate (Table 1) in order to have similar ether extract, total FA content and energy density between diets of different treatments (Tables 2 and 3). In the WSF concentrate, WSF replaced the CSFA and part of the

barley. In addition, soybean-meal content was modified (Table 1) to obtain isonitrogenous concentrates and diets. Fresh water was permanently available in the pens.

Ewes were milked twice daily in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia-Surge Ibérica, Granollers, Barcelona, Spain) with recording jars. Milking was conducted as described by Such *et al.* (1999) at a vacuum pressure of 42 KPa, a pulsation rate of 120 pulses/min, and a pulsation ratio of 50%.

### **Measurement, Sampling and Analysis**

Voluntary feed intake was throughout the experiment, but only sampling period data (last 6 days of each period) was considered. Group DMI was calculated as the difference between the total amount of DM offered and the amount refused daily with an accuracy of 10 g. Daily samples of diet ingredients and orts were collected and composited by period throughout the study. Feed and orts samples were ground through a 1 mm stainless steel screen and were analyzed for DM and OM. The CP was determined according to the Kjeldahl method using a Kjeltec Auto 1030 Analyzer (Tecator, Hogänäs, Sweden). NDF and ADF were determined sequentially using the ANKOM system (ANKOM Technology, Fairport, NY) with thermostable  $\alpha$ -amylase and sodium sulphite for the NDF analysis (Van Soest *et al.*, 1991) and corrected for ashes. The analysis of total fatty acids and FA profile of feed was performed according to Sukhija and Palmquist (1988) using nonadecanoic acid as an intern standard.

During each sampling period, milk yield was registered for 3 days, and individual milk samples were collected in each milk yield registration. Milk samples were preserved in 100 ml pots containing 2 tablets of Bronopol (BroadSpectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., San Ramon?, CA, USA) as a conserving product, and refrigerated at 4° C before being analyzed for fat, CP (N x 6.38), true protein, casein and total solids (TS) contents. Analysis was performed using a near-infrared spectroscopy analyzer (NIRS Systems 5000, Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark). Calibration was checked using the AOAC (1990) reference methods. Two additional milk samples were taken for each experimental period to analyze their fatty acids profile. The fat fraction was separated by centrifugation (Hettich-Universal 32, Tutlingen, Germany) during 15 min at 9000 rpm and 4°C and then stored at -20°C until chromatography analysis. Milk FA were analyzed after milk fat extraction and methylation (Palmquist and Jenkins, 2003) to avoid migration of conjugated double bonds of unsaturated FA. Milk fat

samples (60 to 70 mg) were dissolved in 1 ml of benzene, and an alkaline *trans* esterification was completed using 2 ml of 0.5 M sodium methoxide in methanol (10 min at 50 °C). A second methylation with 3 ml of 100 ml/L methanolic HCl (10 min at 80 °C) followed. After addition of 1 ml of heptane and 7.5 ml of 60 g/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and centrifugation, the top solvent layers were transferred to a tube, 1 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added, and the samples recentrifuged at 6000×g and 4°C. The clear layers containing the FA methyl esters (**FAME**) were transferred to 1 ml auto sampler vials and stored at -20°C until analysis. Separation and quantification of the methyl esters was carried out using a gas chromatograph (HP 6890, N. Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with flame ionization detector and capillary column (CP-Sil-88; 100 m x 0.25 mm i.d. with 0.20-μm of capillary thickness; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The initial temperature of 70°C (during 1 min) was increased till 225°C (during 15 min at this temperature) at an increasing rate of 1°C/min. Individual FA were identified by comparison of retention times using those of pure standards (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) and expressed as percentages of the total FA detected as FA methyl esters. In the particular cases of CLA and vaccenic acid identification, 2 patrons were used for each: *cis*-9, *trans*-11 C18:2 and the *trans*-10, *cis*-12 C18:2 being isomers of CLA (Matreya Inc., State College, PA, USA) and *cis*-11 C18:1 and *trans*-11 C18:1 being isomers of vaccenic acid (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA).

Blood samples were collected during the sampling week of each experimental period just before the morning milking and before any feed administration. Samples were extracted in 10 ml evacuated tubes (Venoject, Terumo Europe, Belgium), they were maintained at 0-4°C for 5 hours and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The collected serum was conserved at -20°C before being analyzed. The methodologies carried out to analyze blood metabolites contents were respectively: the enzymatic UV test (the HK/G-6-PDH method) for glucose, the ACS-ACOD Method (NEFA C, WAKO®) for NEFA, the enzymatic calorimetric method according to Fossati and Prencipe (1982) for triglycerides, the enzymatic calorimetric test (the CHOD/PAP method) for cholesterol and the kinetic enzymatic method (using the 3-hydroxybutyrate deshydrogenase) for hydroxybutyrates. The apparatus used for these analyses was the auto-analyzer (Olympus AU400).

Individual BW (0.1 kg accuracy) and BCS were recorded at the beginning and the end of each experimental period of the study, BCS being measured according to Russell *et al.* (1969) on a scale of 0 to 5 to the nearest 0.25.

### Statistical analysis

Milk yield and composition data, milk FA and variation of BW and BCS of the ewes were analyzed using the PROC MIXED of SAS (SAS v. 8.2; SAS Inst., Inc., Cary, NC) according to Tukey's multiple comparison test. The statistical model contained the fixed effects of treatments, the random effects of the animal inside the group and the residual error. DMI data was processed considering each group of 6 animals as an experimental unit. Differences were declared significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Some differences ( $P < 0.05$ ) were detected between primiparous and multiparous ewes in the case of milk yield, BW and BCS, however, these differences did not have any significant interaction with the effect of the main experimental treatment WSF. Therefore, only main effects will be presented and discussed.

### Nutritive Value of Experimental Diets and Feed Intake

After calcium soap and safflower seeds were added to C and WLS concentrates, respectively, EE (Table 2) and total FA content (Table 3) of experimental diets were quite similar, but with a slightly higher content in the C treatment. In contrast, WSF diets showed of protein and fiber (both NDF and ADF) contents slightly higher than control. As expected, FA profile differed between the experimental concentrates. WSF diet had higher contents of LCFA (long chain fatty acids) than C, mainly C18:2 (31 versus 18%) as a consequence of the high content of C18:2 (76.6%) in the safflower seed; In contrast, C diet had more C16:0 (37.4 vs. 20.6%) due to the inclusion of CSFA.

Feed intake data is listed in Table 4. The addition of WSF decreased ( $P < 0.05$ ) DMI per animal from 2.42 kg/d (C) to 2.34 kg. According to this intake, we calculated that ewes consumed 87g of calcium soaps of palm oil (2.8% of total DM) and 170g of safflower seeds (7.7% of total DM), daily, for C and WSF treatments, respectively. DMI is usually affected in the case of high levels of fat or strong flavor sources such as fish oil (Kitessa *et al.*, 2001). For example, oleamide reduced feed intake when it was added to the feed at least with the dose of 5% in cattle (Jenkins, 1998) and sheep (Reeves *et al.*, 1998), or when administered directly into the rumen of cattle, suggesting that the satiety response is physiological rather than palatability-

related (Jenkins, 2000). However, some authors such as Jenkins and Adams (2002) indicated no effects when including at either 1.5 or 5% linoleamide in the diet of sheep, or Jenkins and Fotouhi (1990) including a moderate dose (2.4%) of corn oil to wethers diet. In our opinion the depressive effect of WSF on DMI was basically due to the higher fiber content of WSF diets and also to the hardness of the safflower hull which makes WSF consumption difficult for ewes. Probably, the use of ground safflower seeds could help in the future to avoid or partially reduce this negative effect on DMI.

### **BW and BCS**

There were no changes in BW data between treatments (Table 4), probably due to the similar energy density of the experimental diets (Table 2). In the literature, Casals *et al.* (1999) related a BW gain in ewes fed CSFA in an experiment with a low level of fat in control treatment. In dairy cattle, results are usually extremely variable; in fact, our results agree with several authors who did not find changes in BW in dairy cows (Driver *et al.*, 1990) while other authors (Brandt and Anderson, 1990) observed enhanced BW. The review of Chilliard *et al.* (1993) indicated that BW is usually decreased when cows were receiving unsaturated fat, although this result depends on several factors, mainly the lactation stage. BCS was increased from 3.11 in the control to 3.24 in the WSF treatment, probably because of difference of dietary FA partitioning oriented between milk and body tissues, this difference could be a consequence of the difference of FA supplied by the C and the WSF diets.

### **Blood Metabolites**

The results of blood metabolites concentrations are listed in the Table 5. WSF decreased cholesterol ( $P < 0.01$ ) concentration from 96.2 to 84.5 mg/dL and glucose ( $P < 0.05$ ) from 51.6 to 44.9 mg/dL, whereas triglycerides (16.4 mg/dL), hydroxybutyrate (0.45 mmol/L) and NEFA (0.1 mmol/L) concentrations remained unchanged. The decrease of cholesterol is probably a consequence of the higher unsaturated fat content of WSF. However, the decrease of glucose concentration could be a consequence of the DMI depression and lower energy intake in the WLS group. In general, fat fed animals usually increase the total cholesterol, triglycerides and NEFA concentrations when compared to low fat diets, but in this case the control contained a similar level of fat (because of CSFA) and minimized differences between blood metabolites.

### Dairy Performance

Milk yield, ECM and ECM per DMI are expressed in kg after the application of an average of milk density value corresponding to the milk of each experimental treatment. Feeding WSF decreased ( $P < 0.01$ , Table 6) the daily milk yield (6.3%), the ECM (8.8%) and the milk conversion rate (5%,  $P < 0.05$ ), indicating a lower efficiency in feed utilization when WSF was fed. In dairy cattle, DePeters and Cant (1992) indicated that the response to fat supplementation is usually the increase of milk yield. In contrast, Casals *et al.* (1999) did not find significant variation in milk yield when supplementing diets of dairy ewes with calcium soaps of fatty acids, and Bouattour *et al.* (2005) related enhanced milk yield of ewes being fed soybean oil (2.8% of total diet), compared with a low fat, low energy diet. In our case, the experimental diets had the same level of fat and no differences in milk yield were expected. Probably the milk yield decrease observed in the WSF group was a consequence of reduced DMI and energy intake in this group, whose concentrate had higher NDF and ADF levels.

Concerning milk composition results (Table 5), milk fat (6.7%), protein (5.3%), casein (4.2%) and total solids (17.9%) contents remained unchanged, while true protein content was increased ( $P < 0.01$ ) from 5.16 to 5.43% after WSF addition. In contrast, fat and protein yields were decreased ( $P < 0.01$ ), respectively, from 111 to 99 g/d and from 86 to 80 g/d which seems to be a direct consequence of the depressed milk yield. The similar level of milk fat content between treatments seems to be a consequence of including CSFA in the control group. Studies with protected fat and specifically CSFA in sheep showed clear increases of milk fat content when compared with low fat diets (Casals *et al.*, 1999). Milk protein content, is usually reduced by fat supplements when used in dairy cows (Palmquist and Jenkins, 1980) or dairy ewes (Casals *et al.*, 1999; Bouattour *et al.*, 2005). As is well described in litterature, CSFA usually decreases milk protein content when fed in the last third of lactation, similarly to the present study, but in our case it was not altered, probably because of CSFA inclusion in the control diet. In contrast with dairy cows and ewes, the negative effect of dietary fat on milk CP is unusual in dairy goats (Chilliard *et al.*, 2003; Schmidely and Sauvant, 1991).

### Milk Fatty Acids

Milk FA composition is shown in Table 7. Feeding WSF to dairy ewes decreased ( $P < 0.01$ ) short chain fatty acids (**SCFA**; 13.46 vs. 12.28%) and medium chain fatty acids (**MCFA**;

48.17 vs. 38.61%) of mammary gland origin, while LCFA concentrations (38.09 vs. 48.75%), mainly of dietary origin, were increased ( $P < 0.01$ ). The supplementation with safflower, rich in LCFA (94.68%), may have exerted an inhibitory effect on SCFA and MCFA in the mammary gland. As indicated by Clapperton and Banks (1985), a major part of this action is attributed to the increase of the absorption of LCFA. According to Hansen and Knudsen (1987), this inhibitory action is attributed particularly to the increase of the C18:1 isomers concentrations. Moreover, replacing CSFA by a more unsaturated source of fat such as the safflower decreased ( $P < 0.01$ ) the saturated FA (70.14 vs. 65.95%) and increased the unsaturated FA (29.59 vs. 33.70%) concentrations in milk. Increases ( $P < 0.01$ ) were by 13.16 and 17.30% for **MUFA** (mono-unsaturated FA) and **PUFA** (poly-unsaturated FA), respectively. As a consequence of these changes, the saturated FA/unsaturated FA ratio was decreased from 2.37 (C) to 1.95 (WSF).

Concerning the CLA, only *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (RA) was detected in the ewe milk, whereas *trans*-10, *cis*-12 CLA, often found in cow milk, was not found, as observed recently by Lock *et al.* (2006). RA content was increased ( $P < 0.01$ ) by WSF treatment from 0.60 to 0.88% of total FA, the gain being 47%. Similarly, the milk TVA content increased ( $P < 0.01$ ) from 1.19 to 1.70% (a gain of 43%), while the ratio of TVA/RA remained constant (1.98). All C18:1 isomers concentrations increased ( $P < 0.05$ ) in the WSF milk. The gains were: 70% for stearic acid, 13% for oleic acid and 10% for linoleic acid. The increases observed for stearic and oleic acid in milk from ewes fed WSF seem to be due to the biohydrogenation of linoleic acid. As indicated in Table 3, the linoleic acid content in the WSF diet (31%) was much higher than in the control diet (18 vs. 31%). Given that the C18:1 FA are not synthesized by animal tissue, we can assume that the increase of the C18:1 isomers was a direct consequence of the biohydrogenation of C18:2. Part of the CLA is synthesized during the rumen biohydrogenation, this pathway being supported by the higher C18:1 concentration in the milk of the WSF group. However, the increase of TVA concentration, precursor of RA by the mammary gland  $\Delta^9$  desaturase pathway, in addition to the co-evolution of CLA and TVA (constant ratio of TVA/RA), support the importance of the desaturation way in the CLA biosynthesis. Several authors indicated that the main portion of CLA (from 64 to 98%) in milk fat is produced in the mammary gland by  $\Delta^9$  desaturase from TVA (Griinari *et al.*, 2000).

In other studies carried out with dairy sheep, we observe that CLA, similarly to the case of dairy cattle, is higher with diets based on fresh pasture (Addis *et al.*, 2005). In fact, in general

terms, the CLA concentration is higher in milk from animals fed pasture than in those fed dry diets (Dhiman *et al.*, 1999) and decreases with increasing growth stage of forage or maturity (Chouinard *et al.*, 1998). The level of CLA in the milk of the control group in the present study (0.60%) is quite similar to the values obtained by Casals *et al.* (2006) using a dry diet typical of a semi-intensive system, with or without addition of CSFA. When ewes were fed fresh spring pasture (Nudda *et al.*, 2005), CLA concentration was extremely high (2.5%) but it decreased linearly to concentrations close to 1% in summer. Addis *et al.* (2005) obtained CLA concentrations in winter of 1.2% when ewes were fed ryegrass and 1.2% when fed *sulla*. In the present study, feeding WSF to ewes fed a dry diet allowed to obtain a CLA level relatively close to that obtained with pasture fed ewes.

Adding WSF could be a useful tool to obtain CLA concentrations similar to fresh pasture in systems with low availability of fresh pastures and forage quality. Supplementation with WSF could also be useful to avoid the decrease of CLA concentration caused by the forage maturity and season effect.

In dairy goat studies, Chilliard *et al.* (2003) did not observe any changes in milk CLA and TVA concentrations after linseed (rich in C18:3) supplementation, while the supplementation of sunflower seeds (rich in C18:2) increased RA (+33%) and TVA (+109%). In contrast, when lupine seeds, rich in C18:2 and C18:1, were fed to goats, decreased RA (-50%) without any effects on TVA (Chilliard *et al.*, 2003). In dairy cattle, White *et al.* (2001), adding a mixture of high oil seeds, observed a lower level of CLA (0.72% of total FA) than in our study. In contrast, feeding whole canola and flaxseed grains gave higher CLA levels (respectively 1.4 and 1.2%; Ward *et al.*, 2002). The abomasal infusion of 2.5% of safflower oil to dairy cows increased (45%) the CLA content of the milk (Loor and Herbein, 2003). In addition, Mir *et al.* (2000) observed an increased content of several CLA isomers in body fat, after WSF were fed to lambs.

The desaturase indexes of myristic acid and palmitic acid were unchanged, but the desaturase index of the stearic acid decreased ( $P < 0.01$ ) from 0.72 to 0.64. According to Chilliard *et al.* (2003), the mammary  $\Delta$ -9 desaturase activity could be inhibited by PUFA, which increased when WSF was fed in the present study. The n-6:n-3 ratio increased ( $P < 0.01$ ) from 3.87 to 4.47 basically because of the increase observed in linoleic acid content of the milk. According to the World Health Organization (1995), the range recommended for this ratio for human health is between 5:1 and 10:1. Moreover, the atherogenicity index decreased after WSF

addition ( $P < 0.01$ ) from 2.69 to 2.08. This index (Ulbricht and Southgate, 1991) was considered an indicator of dietary saturated FA risk factor of coronary disease, only in cases of extremely high intake of saturated fat. However, it was discussed recently by Bauman and Lock (2006) and Chilliard *et al.* (2006), in addition to the older observation of several authors (Mensink *et al.*, 2003; Knopp and Retzlaff, 2004) indicating that the atherogenic effect of C12, C14 and C16 saturated FA is not an evidence, and that some saturated FA could be even health protective when compared to a low fat, high carbohydrate diet.

## CONCLUSIONS

Inclusion of whole safflower seeds in the diet of Lacaune dairy ewes enhanced the nutritional quality of the milk increasing CLA (rumenic acid) and *trans* vaccenic acid levels and reducing the saturated FA concentrations as well as the atherogenicity index of the milk fat. We can conclude that, compared with the calcium soaps of fatty acids, the safflower seed has an appropriate FA profile to enhance the CLA content of the milk and reduce its saturated to unsaturated FA ratio. However, these positive effects of the safflower seeds were detrimental for the feed intake and, as a consequence, for the milk, fat and yield. Therefore we suggest further investigations on processing safflower seeds in order to avoid a possible negative effect of the hull hardness on feed intake.

## REFERENCES

- Aase, J. K., and J. L. Pikul, Jr. 2000. Water use in a modified summer fallow system on semiarid Northern Great Plains. *Agric. Water Manage.* 43:345–357.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis*. Vol I, 15th Ed. AOAC, Arlington, VA.
- 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 (ed). Nottingham University Press (Nottingham, UK): 221-250.
- Bauman, D. E., and A. L. Lock. 2006. Concepts in Lipid Digestion and Metabolism in Dairy Cows. Pages 1-14 in Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference, pp 1-14. Fort Wayne, Indiana.

- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243
- Bocquier, F., F. Barillet, P. Guillouet, and M. Jacquin. 1993. Prévision de l'énergie du lait de brebis à partir de différents résultats d'analyses: proposition de lait standard pour les brebis laitières. *Ann. Zootech.*, 42:57-66.
- Bouattour, M. A., R. Casals, E. Albanell, E. González, X. Such, and G. Caja. 2005. Effects of fibrolytic enzymes and soybean oil on dairy sheep performances and nutrients digestibility. *J. Dairy Sci.* Vol. 88 (Suppl. 1): 308 (Abstr.).
- Brandt, RT Jr., and S. J. Anderson. 1990 Supplemental fat source affects feedlot performance and carcass traits of finishing yearling steers and estimated diet net energy value. *J. Anim. Sci.* 68:2208-2216.
- Casals, R., G. Caja, M.V. Pol, X. Such, E. Albanell, A. Gargouri and J. Casellas. 2006. Response of lactating dairy ewes to various levels of dietary calcium soaps of fatty acids. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 131:312-332.
- Casals, R., G. Caja, X. Such, C. Torre, and S. Calsamiglia. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 66:177-191.
- Chilliard, Y. 1993. Dietary Fat and Adipose Tissue Metabolism in Ruminants, Pigs and Rodents: A Review. *J. Dairy Sci.* 76:3897-3931
- Chilliard, Y., A. Ferlay and M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids *Livestock Production Science* 70:31-48.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J Dairy Sci*, 86:1751–1770.
- Chilliard, Y., J. Rouel, A. Ferlay, L. Bernard, P. Gaborit, K. Raynal-Ljutovac, A. Lauret and C. Leroux. 2006. Optimising goat milk and cheese fatty acid composition. In: Improving the fat content of foods. C. Williams and J Buttriss (ed.). Woodhead Publishing Limited (Cambridge, UK):281-312.

- Clapperton, J. L., and W. Banks. 1985. Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. *J. Sci. Food Agric.* 36:1205
- DePeters, E.J., and J.P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75 (8):2043-2070.
- Driver, L. S., R. R. Grummer, and L. H. Schultz. 1990. Effects of feeding heat-treated soybeans and niacin to high producing cows in early lactation. I. *Dairy Sci.* 73:463
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130:2285–2291.
- Hansen, H.O. and J. Knudsen. 1987 Effect of exogenous long chain fatty acids on individual fatty acid synthesis by dispersed ruminant mammary gland cells. *J. Dairy Sci.* 70:1350-1354.
- Jenkins, T. C., and N. Fotouhi. 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Anim. Sci.* 68:460-466.
- Jenkins, T. C. 1998. Fatty acid composition of milk from Holstein cows fed oleamide or high-oleic canola oil. *J. Dairy Sci.* 81:794–800.
- Jenkins, T. C. 2000. Feeding oleamide to lactating Jersey cows 1. Effects on lactation performance and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 83:332–337.
- Jenkins, T. C., and C. S. Adams. 2002. The biohydrogenation of linoleamide in vitro and its effects on linoleic acid concentration in duodenal contents of sheep. *J. Anim. Sci.* 80:533-540.
- Kay, J. K., W. J. Weber, C. E. Moore, D. E. Bauman, L. B. Hansen, H. Chester-Jones, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2005. Effects of Week of Lactation and Genetic Selection for Milk Yield on Milk Fatty Acid Composition in Holstein Cows. *J. dairy Sci.* 88:3886-3893.
- Kelsey J. A., B. A. Corl, R. J. Collier, and D. E. 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.
- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. II. Transfer of fish oil fatty acids into goats milk. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 89:201–208.
- Knopp, R. H., and B. M. Retzlaff. 2004. Saturated fat prevents coronary artery disease? An American paradox. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1102-1103.

- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206
- Loor, J. J., and J. H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128:2411–2419.
- McGuire, M. A., and M. K. McGuire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. In Proc. Am. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg. 1999. Online. Available: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf>.
- Mensink R. P., P. L. Zock, A. D. M. Kester, and Katan M. B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1146–55.
- Mir, Z., M. L. Rushfeld, and P. S. Mir. 2000. Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lambs tissues. *Small Ruminant Research*, 36 (1):25-31.
- Noy-Meir, E. 1992. Structure and dynamics of grazing systems on seasonal pastures. Pages 7-24 in: Alberda, Th. Van Keulen, H. Seligman, N.G. de Wit., C.T. (Eds.), *Food from Dry Lands. An Integrated Approach to Planning of Agricultural Development*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Nudda, A, M. A. McGuire, G. Battaccone, and G. Pulina. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and Ricotta. *J. Dairy Sci.* 88:1311–1319.
- Palmquist D. L., and T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 2003. 81:3250-3254
- Park Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook, and M. W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32:853-858
- Reeves, L. M., M. L. Williams, and T. C. Jenkins. 1998. In vitro biohydrogenation of oleamide and total tract digestibility of oleamide by sheep. *J. Sci. Food Agric.* 77:187–192.
- Rochon, J.C., C. J. Doyle, J. M. Greef, A. Hopkins, G. Molle, M. Sitzia, D. Scholefield, and C. J. Smith. 2004. Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass Forage Sci.* 59:197– 214.

- Russell, A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72:451-454.
- Schmidely, P. and D. Sauvant. 2001. Taux Butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliment concentré. *INRA Prod. Anim.* 14(5):337-354.
- Scholljegerdes E. J., B. W. Hess, G. E. Moss, D. L. Hixon, and D. C. Rule. Influence of supplemental cracked high-linoleate or high-oleate safflower seeds on site and extent of digestion in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2004, 82: 3577–3588.
- Such, X., G. Caja, N. Fernández, M. P. Molina, and A. Torres. 1999. The effects of type of pulsator on the evolution of milk emission kinetics during machine milking in Manchega ewes. In: Milking and milk production of dairy sheep and goats. F. Bariellet and N.P. Zervas (Eds.), EAAP Publication No. 95, Wageningen Press., Wageningen. pp. 227-232.
- Sukhija, P. S., and D. L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1202-1206.
- Ulbricht, T. L. V., and D. A. T. Southgate. 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* 338:985–992.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- White, S. L., J. A. Bertrand, M. R. Wade, S. P. Washburn, J. T. Green, Jr., and T. C. Jenkins. 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.
- WHO and FAO Joint Consultation: Fats and Oils in Human Nutrition. *Nutrition Reviews*, 1994: 202-205

**Table 1.** Feed ingredients of the experimental concentrates and diets containing or not whole safflower grains (WSF).

Ingredients, % as fed	Concentrates		Diets	
	Control	WSF	Control	WSF
Dehydrated alfalfa	---	---	26.40	26.40
Dehydrated fescue	---	---	26.40	26.40
Ground corn	16.70	16.80	7.90	7.90
Ground wheat	16.70	16.80	7.90	7.90
Ground barley	33.40	25.00	15.80	11.80
Soybean meal -44%	24.00	21.90	11.30	10.40
CSFA of palm oil <sup>1</sup>	6.00	---	2.80	---
Whole Safflower seeds	---	16.30	---	7.70
Bicalcic phosphate	0.70	0.70	0.30	0.30
Magnesium oxide	0.30	0.30	0.10	0.10
Sodium bicarbonate	0.60	0.60	0.30	0.30
TM Salt	0.60	0.60	0.30	0.30
Minerals and vitamins <sup>2</sup>	0.98	0.98	0.49	0.49
Vitamin E	0.02	0.02	0.01	0.01

<sup>1</sup>Calcium soaps of fatty acids (Magnapac; Norel SA, Madrid, Spain), containing 96.9% DM and (% DM), fat, 84.4; ash, 15.6; Ca, 9; 14:0, 1.2; 16:0, 37.1; 18:0, 4.2; 18:1, 33.8; 18:2, 8.02.

<sup>2</sup>Contains (g/kg): I, 1.22; Mn, 103; Zn, 104; Fe, 130; Cu, 16.6; Co, 0.34; Se, 0.31; (IU/kg): vitamin A, 10.700; vitamin D, 2.700; vitamin E, 56; and antioxidant, 222 g/kg.

**Table 2.** Chemical composition (% DM) and nutritional value of experimental concentrates and diets containing or not whole safflower grains (WSF).

	Concentrates		Experimental diets	
	Control	WSF	Control	WSF
DM, % as fed	90.7	91.3	90.73	91.05
OM	92.8	91.8	89.74	89.29
CP	18.9	20.7	18.79	19.62
EE	8.4	7.6	5.10	4.70
NDF	12.2	16.1	30.32	32.16
ADF	9.2	13.0	19.54	21.32
NE <sub>L</sub> <sup>1</sup>	2.03	1.98	1.62	1.59

<sup>1</sup>NEL: Net Energy for Lactation (Mcal/ kg DM).

**Table 3.** Fatty acids (FA) profile (% of total FA) of whole safflower grains (WSF) and experimental concentrates and diets.

Fatty acids	WSF	Concentrates		Diets	
		Control	WSF	Control	WSF
C6:0	0.00	0.64	2.56	0.57	1.47
C8:0	0.00	0.57	0.00	0.53	0.26
C14:0	0.00	1.18	0.00	0.82	0.26
C16:0	5.81	47.82	20.57	37.36	24.49
C18:0	2.34	5.05	4.90	4.23	4.16
C18:1 n9c	14.60	29.45	26.81	18.92	17.67
C18:1 w7	0.65	0.72	1.41	0.60	0.93
C18:2 n-6	76.60	13.32	40.95	17.90	30.94
C18:3 n-3	0.00	0.92	1.56	17.86	18.16
C22:0	0.00	0.34	1.24	2.27	2.70
Total FA (% DM)	31.65	7.49	6.39	3.24	3.02

**Table 4.** Effects of feeding whole safflower grains (WSF) on DMI, BW and BCS of dairy ewes.

	Treatments		SEM	Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>
	Control	WSF		
DMI, kg/day	2.42	2.34	0.025	*
BW, kg	71.53	71.26	2.184	NS
Variation of BW <sup>2</sup> , kg	1.61	1.21	0.394	NS
BCS <sup>3</sup>	3.11	3.24	0.056	**
Variation of BCS <sup>4</sup>	-0.03	0.14	0.043	**

<sup>1</sup>\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .<sup>2</sup> Difference between BW at the first and last day of each experimental period.<sup>3</sup> Body Condition Score (scale of 0 to 5 to the nearest 0.25), measured according to Russell *et al.* (1969).<sup>4</sup> Difference between BCS at the beginning and end of each experimental period.

**Table 5.** Effects of feeding whole safflower grains (WSF) on blood metabolites concentrations in serum samples of Lacaune dairy ewes.

	Treatments		SEM	Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>
	Control	WSF		
Cholesterol (mg/dL)	96.2	84.5	4.83	**
Glucose (mg/dL)	51.6	44.9	2.19	*
Triglycerides (mg/dL)	15.5	17.2	1.08	NS
Hydroxybutyrate (mmol/L)	0.5	0.4	0.02	NS
NEFA (mmol/L)	0.1	0.1	0.01	NS

<sup>1</sup>\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

**Table 6.** Effects of feeding whole safflower grains (WSF) on milk production and composition of Lacaune dairy ewes.

	Treatments		SEM	Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>
	Control	WSF		
Milk yield, kg/d	1.58	1.48	0.079	**
ECM <sup>2</sup> , kg/d	1.47	1.34	0.066	**
ECM/DMI, kg/kg DM	0.60	0.57	0.028	*
Fat, %	6.84	6.62	0.151	NS
Fat, g/d	111.1	99.3	4.86	**
Protein, %	5.3	5.3	0.071	NS
Protein, g/d	85.9	80.1	3.75	**
True protein, %	5.16	5.43	0.073	***
True protein, g/d	81.5	80.4	3.43	NS
Casein, %	4.19	4.19	0.069	NS
Casein, g/d	66.2	62.0	2.31	**
Total solids, %	18.06	17.67	0.236	NS
Total solids, g/d	285.3	261.5	12.07	**

<sup>1</sup>\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>2</sup> Energy Corrected Milk, estimated according to Bocquier *et al.* (1993): ECM= Milk Yield (kg/d) x (0.071 x Fat (%)) + 0.043 x CP (%)) + 0.2224).

**Table 7.** Effects of feeding whole safflower grains WSF on milk fatty acids profile of Lacaune dairy ewes milk (g/100 g FAME).

	Treatments <sup>1</sup>		SEM	Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>
	C	WSF		
C6:0	2.15	2.06	0.049	*
C8:0	2.28	2.09	0.072	**
C10:0	7.16	6.19	0.283	**
C12:0	4.33	3.83	0.182	**
C14:0	10.88	10.62	0.362	NS
C14:1	0.22	0.22	0.012	NS
C15:0	0.79	0.84	0.017	NS
C16:0	30.86	22.26	1.033	***
C16:1	1.02	0.73	0.036	***
C17:0	0.49	0.50	0.011	NS
C17:1	0.07	0.06	0.014	NS
C18:0	8.73	14.84	0.391	***
C18:1 n9t	0.48	0.57	0.032	*
Trans-11 C18:1 (TVA)	1.19	1.70	0.137	***
C18:1 n9c	20.72	23.41	0.594	*
Cis-11 C18:1	0.60	0.85	0.034	***
C18:2 n-6t	0.24	0.55	0.033	***
C18:2 n-6c	3.17	3.50	0.133	*
Cis-9, trans-11 CLA	0.60	0.88	0.039	***
C18:3 n-3	0.87	0.89	0.031	NS
n-6 / n-3	3.87	4.47	0.161	**
SCFA	13.46	12.28	0.366	**
MCFA	48.17	38.61	0.811	***
LCFA	38.09	48.75	0.891	***
Saturated FA	70.14	65.95	0.740	**
Unsaturated FA	29.59	33.70	0.736	**
Saturated/Unsaturated	2.37	1.95	0.091	**
MUFA	24.38	27.59	0.602	**
PUFA	5.20	6.10	0.199	**
TVA / RA	2.03	1.93	0.123	NS
Atherogenicity index <sup>2</sup>	2.69	2.08	0.083	***
$\Delta^9$ -Desaturase ratios <sup>3</sup>				
C14	0.02	0.02	0.001	NS
C16	0.07	0.03	0.029	NS
C18	0.72	0.64	0.007	***
CLA	0.34	0.36	0.017	NS

<sup>1</sup> Effect: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .<sup>2</sup> Calculated according to Ulbricht and Southgate (1991) as: (C12 + 4 C14 + C16) / (sum of unsaturated FA).<sup>3</sup> Calculated for each pair of FA according to Kelsey *et al.* (2003) as: (product of  $\Delta^9$ -desaturase) / (product of  $\Delta^9$ -desaturase + substrate of  $\Delta^9$ -desaturase); ie: C14: C14:1 / (C14:1 + C14:0).

---

---

*VI. Effects of Soybean Oil and Fibrolytic Enzymes Supplementation on Nutrients*

*Digestibility and Dairy Performance of Manchega and Lacaune Ewes*

---

---

## ABSTRACT

Two experiments were performed with the aim of studying the effects of feeding soybean oil (SBO) and/or a fibrolytic enzyme complex (E) in dairy sheep. In a digestibility trial, the digestibility of experimental diets was measured on 8 dry and open MN ewes in a randomized block design (two periods of 20 d). Dietary treatments were: 1) C (control); 2) SBO (3% of diet on DM basis); 3) E (Promote®, 2 ml/kg diet on DM basis); and, 4) SBO+E. Total mixed rations consisted of 60% forage (alfalfa and fescue dehydrated mixture, 1:1) and 40% concentrate. Diets were isonitrogenous (18.4% CP), but ether extract varied from 2.7 to 4.3% according to SBO addition. When used alone, SBO increased ether extract digestibility without varying the DM, OM and NDF digestibilities. Supplementing the low fat diet with the enzyme complex (E treatment) increased DM (+8%), OM (+9%) and NDF (+14%) digestibilities. In contrast, when fed together with the oil (SBO+E treatment) the enzyme complex was unable to increase these digestibilities. In addition, compared to the E treatment, the SBO+E showed lower digestibilities of DM (-8.4%), OM (-8.6%), CP (-6.4%), NDF (-14.4%) and ADF (-15.5%), indicating a negative effect of supplemental oil on digestibility when used together with the enzyme complex. In a milking trial, 24 Lacaune (LC) and 24 Manchega (MN) dairy ewes (49 days in milk) were blocked in 4 pens of 6 ewes per breed, and used in a replicated 4 × 4 Latin square for periods of 20 d under similar experimental treatments. Except for some fatty acids, breed responses to treatments were similar despite the differences between breeds (LC vs. MN): DMI (3.06 vs 2.43 kg/d), milk yield (2.07 vs. 1.08 kg/d), and fat (5.60 vs. 6.63%) and casein (3.70 vs. 4.13%) milk contents. Feed intake (2.74 kg DM/d) did not vary between treatments. The addition of SBO increased milk and milk fat yields, and long chain fatty acids (FA) content, but decreased milk protein, casein, and medium chain FA and short chain FA contents. Increases in oleic acid, *trans*-11 vaccenic acid, linoleic acid and CLA due to of SBO addition were of 28.4%, 105.5%, 20.3% and 156.3% respectively. Addition of enzymes increased milk and true protein yields, but decreased milk fat, CP and true protein, and casein. In conclusion, both the soybean oil and the enzymes complex enhanced milk yield, however, in digestibility terms the oil inhibited the positive effect of enzymes when used together.

**Keywords:** fibrolytic enzymes, soybean oil, dairy sheep.

## INTRODUCTION

Dairy producers currently use supplemental lipids in order to avoid the energy deficits in early lactation which are essentially caused by high requirements and limited capacity of feed intake in this lactation phase. Several studies indicated the positive effect of using fat supplements on milk yield of dairy cows (Doreau and Chilliard, 1992; Elliot *et al.*, 1993), but a lack of response on milk yield has been frequently observed in dairy ewes (Bocquier and Caja, 2001). In contrast, increases in the fat content of milk from dairy ewes have been observed by many authors (Schmidely and Sauvant, 2001, Bocquier and Caja, 2001), especially when using protected fat supplements (Casals *et al.*, 1999, 2006). Feeding fat is also an easy way to modify the fatty acids (**FA**) profile of milk (Schmidely and Sauvant, 2001). Several authors have indicated the possible beneficial effects on human health of some polyunsaturated FA (**PUFA**) and/or conjugated FA, such as conjugated linoleic acid (**CLA**). Bauman *et al.* (2001) and Pariza *et al.* (2001) described positive effects of CLA such as anticarcinogenic, antiatherogenic and antidiabetic (type II) effects, among others. The *cis*-9, *trans*-11 C18:2 or rumenic acid (**RA**) is the major CLA isomer found in ruminant milk, and is an intermediate in the rumen biohydrogenation of linoleic acid. If biohydrogenation of linoleic acid is incomplete, some TVA escapes from the rumen and provides CLA to milk. However, *cis*-9, *trans*-11 C18:2 in milk is obtained mainly in the mammary gland as a consequence of desaturation of *trans*-11 18:1 or *trans* vaccenic acid (TVA) by action of the enzyme  $\Delta^9$ -desaturase. TVA is also an intermediate formed in the rumen biohydrogenation of linoleic and linolenic acids (Bauman *et al.*, 2001). Therefore, highly unsaturated fat sources such as vegetable seeds and oils rich in linoleic or linolenic acid have been used, particularly in dairy cows, with the aim of increasing these beneficial milk FA (Chouinard *et al.*, 2001). However, feeding non protected fats, especially unsaturated fats, may depress ruminal fermentation, having a toxic effect on the fibrolytic bacteria of the rumen and reducing fiber digestibility and milk fat content (Jenkins and Palmquist, 1984; Jenkins and Jenny, 1989).

In contrast, positive effects of adding exogenous fibrolytic enzymes to ruminant diets on fiber digestibility (Yang *et al.*, 2002) and productive performance have been reported for some fibrolytic enzyme complexes fed to beef cattle (Beauchemin *et al.*, 1995; McAllister *et al.*, 1999) and lactating dairy cows (Rode *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Unfortunately, the response to fibrolytic enzyme products has been variable, not only in dairy or beef cows (Beauchemin *et al.*, 2001) but also in sheep and goat (Flores *et al.*, 2002; González *et al.*, 2002.). The inconsistency of responses to enzyme supplementation may be due to a number of factors, including diet composition, type of enzyme used, level of enzyme provided, enzyme stability in the digestive tract, and method of application (Yang *et al.*, 2000), and gives a reason for in depth study of the effects of

feeding exogenous fibrolytic enzymes to dairy ewes. Studies on feeding fibrolytic enzymes and/or soybean oil (unsaturated fat) to dairy ewes are limited. In addition, responses are very different depending on breeds.

The main objectives of this study were to investigate the effects of feeding soybean oil and/or fibrolytic enzymes to dairy ewes on lactation performance (milking trial) and nutrient digestibility (digestibility trial). Our hypothesis was that unsaturated fat supplements may have a negative effect on fiber digestibility, while addition of fibrolytic enzymes would help to enhance the fiber digestibility of the diet and, as a consequence, the productive results.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals, experimental design, and feeding.*

Two experimental trials were carried out, a digestibility trial and a milking trial. In the digestibility trial, 8 MN dry ewes ( $n=8$ ,  $62.8\pm3$  kg BW) were used in two consecutive periods of 20 days (14 for adaptation + 6 for sampling) in a completely randomized block design. Treatments were: 1) Control (**C**: without enzyme and oil); 2) Soybean oil (**SBO**: 3% of total DM, added to concentrate); 3) Enzymes (**E**: 2 ml/kg DM, Promote<sup>®</sup> Fibrolytic Enzymes complex, Agribands international, St Louis, MI); and, 4) **SBO+E**. According to the information provided by the manufacturer, the E complex is a mixture of enzymes derived from fungi strains of *Trichoderma Longibrachium* with recognized cellulase and xylanase activities (130,000 and 120,000 UI/g, respectively). Every day, 24 hours before feeding, the fibrolytic enzyme complex was diluted in water (2%), sprayed on forage using a manual watering-can and mixed. Non-enzyme supplemented diets (**C** and **SBO**) received the same volume of water in order to be at the same humidity level. The dose (2 ml/kg of total DM) and application method of E complex were chosen based on previous works of our group (Flores *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2002) where no response was observed when ewes and goats received the same enzyme complex, incorporated in the concentrate, at a lower level (0.47 ml/kg of total diet DM).

The ewes received an *ad libitum* total mixed ration (TMR) containing 60% forage (dehydrated 1:1 mixture of alfalfa and fescue) and 40% experimental concentrate pellets (Table 1), to which the oil was or was not added. Experimental concentrates were made in a commercial plant and soybean oil was sprayed during manufacturing. The TMR was offered once a day (08.30) at the rate of 115% of the voluntary intake from the previous day. Animals were lodged in individual boxes and equipped with digestibility bags attached to the body, which were placed one week before the sampling and measurement period started (the second week of each period) in order to adapt animals to them.

In the milking trial, a total of 48 lactating dairy ewes, 24 Manchega (MN,  $71.9 \pm 1.6$  kg BW) and 24 Lacaune (LC,  $70.2 \pm 1.6$  kg BW), two breeds differing in potential milk yield and composition, were used according to a 4x4 Latin square experimental design, during 4 periods of 20 days (14 for adaptation + 6 for sampling) under 4 experimental treatments. When trial started, animal groups were balanced according to breed, lactation number, and previous milk yield and body weight at  $7 \pm 1$  weeks after lambing.

The treatments (C, SBO, E, and SBO+E), experimental concentrates and TMR of this trial were the same than for the digestibility trial, but with a small difference in the composition of final diets (Table 1 and 2) due to a small and constant amount (50 g/ewe) of barley grain offered at each milking (2/d) to encourage ewes to enter the milking parlour. As a consequence of the supplemental barley, the levels of soybean oil (2.7% of total DM) and fibrolytic enzyme complex (1.80% of total DM) were slightly reduced, as well as the forage to concentrate ratio (58/42).

Ewes were milked twice daily (at 08:00 and 18:00) in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia Separator Ibérica, Granollers, Spain) with recording jars. Milking was conducted at a vacuum pressure of 42 KPa, a pulsation rate of 120 pulses/min, and a pulsation ratio of 50%, as indicated by Such *et al.* (1999) for MN and LC ewes. The TMR was offered twice daily (08.30 and 18.30) after each milking at the rate of 115% of the voluntary intake from the previous day. Fresh water was permanently available in the pens.

### Measurement, sampling and analysis

Feed voluntary intake was registered throughout the 2 experiments, but only sampling period data was considered. For experimental purposes, average DMI was calculated for each group of 6 ewes (milking trial) and/or for each ewe (digestibility trial) as the difference between the total amounts of DM offered and the amount refused daily (10 g accuracy). Daily samples of TMR and orts were collected and composited by period throughout the 2 experiments. In the digestibility trial, during each sampling period, individual faecal excretion amount was registered daily (10 g accuracy). In addition, a 10 % sample of daily faeces was taken and composited to form a proportional mix for chemical composition analysis, and another sample was taken for daily DM content analysis. Feed, orts and faecal samples were ground through a 1 mm stainless steel screen and were analyzed for DM and OM (AOAC, 1990; methods 950.01 and 942.05). The CP was determined by using a Kjeltec Auto 1030 Analyzer (Tecator, Hogänäs, Sweden). NDF and ADF were determined sequentially using the ANKOM system (ANKOM Technology, Fairport, NY) with a thermostable  $\alpha$ -amylase and sodium sulphite for the NDF analysis (Van Soest *et al.*, 1991) and corrected for ashes. Feed FA profile was analyzed on lyophilized samples. Methylation of FA was

performed according to Sukhija and Palmquist (1988) using nonadecanoic acid as an internal standard.

In the milking trial, milk yield was registered on 3 days during each sampling period and individual milk samples were collected daily as a proportional composite of the morning and afternoon milkings. Milk samples were preserved with potassium dichromate (0.5 mL of a 70 mg/L solution in 100 mL of milk) and analyzed for TS, fat, CP (N x 6.38), true protein, and casein by using a near-infrared spectroscopy analyzer (Technicon InfraAlyzer-450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany) according to Albanell *et al.* (1999). Calibration was checked using the AOAC (1990) reference methods (2000.18, 991.20 and 927.03 respectively for fat, protein and casein). ECM (energy corrected milk) was calculated according to Bocquier *et al.* (1993). Additional milk samples were taken and cooled, and the fat fraction was separated by centrifugation (Hettich-Universal 32, Tutlingen, Germany) for 15 min at 9000 rpm and 4°C and then stored at -20°C in order to determine FA profile. Milk FA were analyzed after milk fat extraction and methylation (Palmquist and Jenkins, 2003) to avoid migration of conjugated double bonds of unsaturated FA. Milk fat samples (60 to 70 mg) were dissolved in 1 ml of benzene, and an alkaline *trans* esterification was completed using 2 ml of 0.5 M sodium methoxide in methanol (10 min at 50 °C). A second methylation with 3 ml of 100 ml/L methanolic HCl (10 min at 80 °C) followed. After addition of 1 ml of heptane and 7.5 ml of 60 g/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and centrifugation, the top solvent layers were transferred to a tube, 1 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added, and the samples re-centrifuged at 6000×g and 4°C. The clear layers containing the FA methyl esters (**FAME**) were transferred to 1 ml auto sampler vials and stored at -20°C until analysis. Separation and quantification of the methyl esters was carried out using a gas chromatograph (HP 6890, N. Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with flame ionization detector and capillary column (CP-Sil-88; 100 m x 0.25 mm i.d. with 0.20-μm of capillary thickness; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The initial temperature of 70°C (for 1 min) was increased to 225°C (for 15 min) at a rate of 1°C/min. Individual FA were identified by comparison of retention times using those of pure standards (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) and expressed as percentages of the total FA detected as FA methyl esters. In the particular cases of CLA and vaccenic acid identification, 2 patrons were used for each: *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers of CLA (Matreya Inc., State College, PA, USA); and, *cis*-11 C18:1 and *trans*-11 C18:1 of vaccenic acid (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA).

Individual BW (0.1 kg accuracy) and BCS of each animal were recorded at the beginning and the end of each experimental period of milking trial, the BCS being measured on a scale of 0 to 5 (Russel *et al.*, 1969) to the nearest 0.25.

## Statistical analysis

In the digestibility trial, individual data for DMI and nutrient digestibility were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS (SAS v. 8.2; SAS Inst., Inc., Cary, NC). Comparisons between treatments were performed according to orthogonal contrasts test, and the contrasts were respectively: 1) treatment means vs. control, 2) E treatment vs. SBO+E treatment, and SBO treatment vs. SBO+E treatment. Individual data for BW, BCS, milk yield and composition and group data for DMI of the ewes at each experimental period of the milking trial were analyzed using the PROC MIXED procedure with repeated measures of SAS (SAS v. 8.2; SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA) according to a 2x2 factorial design. The statistical model contained the fixed effects of treatments, experimental period, breed and animal group and first order interactions between treatments, as well as the random effects of the animal inside the group and the residual error. The data analysis was performed using the autoregressive number 1 covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion and differences were declared at P<0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Nutritive value of feeds*

Chemical composition and nutritive value of concentrates and diets are listed in Table 2. All diets were almost isoproteic (18.4% CP) and had similar contents of DM, OM, NDF and ADF. Diets with supplemental fat (SBO and SBO+E treatments) had more EE (2.7 vs. 4.3) and total FA content (2.1 vs. 3.6) than the non fat supplemented groups (C and E); however, their values remained lower than expected according to dose of SBO in the concentrate (Tables 2 and 3). As a consequence of the different FA content of diets, the net energy for lactation was slightly higher (+0.08 Mcal/ kg MS) in SBO and SBO+E diets than in C and E. The incorporation of oil to SBO and SBO+E concentrates and diets increased their long chain FA (LCFA) concentrations, particularly C18:2 and C18:1, and reduced C16:0 and C18:3 (Table 3)

### *Digestibility Trial*

The voluntary DM intake per head was not changed by treatments ( $1.23 \pm 0.11$  kg DM per day), but was considerably different from the DMI of lactating Manchega ewes observed in the milking trial ( $2.43 \pm 0.09$  kg DM per day) probably due to the different physiological state of the ewes, as described previously by Bocquier *et al.* (1988).

As described in several studies with dairy ewes (Flores *et al.*, 2002; Titi and Lubbadeh, 2004) and dairy and beef cattle (Feng *et al.*, 1996; Rode *et al.*, 1999) enzyme supply usually has no effect on feed voluntary intake. In contrast, several authors (Jenkins and Palmquist, 1984;

Olubobokun *et al.*, 1985) observed DMI depression in dairy cows supplemented with different fat sources. However, no difference was reported by Osuna *et al.* (1998) using cottonseed with dairy ewes, or by Jenkins and Fotouhi (1990) feeding wethers with corn oil.

Results of nutrient digestibilities are listed in Table 4. Due to the oil supplementation, EE digestibility was increased ( $P < 0.001$ ) in SBO (+9%) and SBO+E (+8.3%) fed animals. When used alone (treatment SBO), soybean oil did not vary the DM (64.4%), OM (67.9%) and NDF (53.6%) digestibilities. In contrast, the SBO+E treatment showed lower digestibilities ( $P < 0.01$ ) of DM (-8.4%), OM (-8.6%), CP (-6.4%,  $P < 0.05$ ), NDF (-14.4%) and ADF (-15.5%) than the E treatment, indicating a negative effect of supplemental oil on digestibility when used together with the enzyme complex. Therefore, the supply of SBO to E diets (contrast of E vs. SBO+E) decreased digestibilities of all diet nutrients excepted fat, re-establishing low digestibility values, similar to control diets.

Supplementing the low fat diet with the enzyme complex (E treatment) increased ( $P < 0.05$ ) DM (+7.7%), OM (+7.1%), and NDF (+12.3%) digestibilities, and tended to increase ADF digestibility (+11.8%) when compared with the control. In contrast, when fed together with the oil (SBO+E treatment) the enzyme complex was unable to increase these digestibilities.

Positive effects of exogenous fibrolytic enzymes were described in steers respectively on ADF (Beauchemin *et al.*, 1995) and DM and NDF digestibilities (Feng *et al.*, 1992, Beauchemin *et al.*, 1997). Moreover, Yang *et al.* (1999) obtained enhanced ruminal DM, NDF and PB digestibilities with cannulated cows fed a commercial enzymatic product similar to the one used in the present study. The absence of difference between nutrient digestibility values for SBO and SBO+E treatments may indicate changes in the enzymatic activity of the enzyme complex in presence of SBO. The presence of highly unsaturated fat neutralized the positive effects on fiber digestibility of the enzyme complex observed when used alone. This occurred probably by neutralizing the activity of enzymes in the rumen or by preventing their access to the feed particles, or because of both hypothesis. Different studies feeding conventional fat sources to sheep described negative effects on fiber digestibility. Kowalczyk *et al.* (1977) and Jenkins and Fotouhi (1990) observed a depression of fiber digestibility using, respectively, tallow and corn oil. Unsaturated fat is also described to be toxic for rumen microorganisms (Jenkins, 1987; Sauvant and Bas, 2001) and to cover the feed particles and therefore protect them from contact with hydrolytic ruminal enzymes.

## Milking Trial

### Feed intake

As expected, voluntary intake was higher in LC (2.96 kg DM) than in MN (2.33 kg DM) ewes, as it was observed by Pérez-Oguez *et al.* (1997), but was not affected by fat or fibrolytic enzyme supplementation during this experiment (Table 5). This result is consistent with other studies that reported constant DMI when the enzyme was fed to dairy cows (Beauchemin *et al.*, 1999; Kung *et al.*, 2000) or lambs (McAllister *et al.*, 2000). However, Beauchemin *et al.* (2000) in dairy cows and Krause *et al.* (1998) in steers both described positive effects of enzyme supplementation on DMI. The SBO supplementation did not change daily DMI (Table 5) in agreement with other results observed in dairy sheep fed corn oil (Jenkins and Fotouhi, 1990) or fish oil (Kitessa *et al.*, 2001). However, Heinrich *et al.* (1982), feeding cows with a high fat grain mixture, or Kitessa *et al.* (2001) feeding goats with fish oil, indicated a DMI depression. The relatively low EE and total FA content attained in our diets may be the reason for the neutral effect of SBO on DMI. In addition, the incorporation of orange pulp in the concentrates was probably a positive factor to enhance their palatability.

### Body weight

Average BW was similar between MN and LC dairy ewes and between the different experimental treatments (Table 7). Variations of BW were positive, and numerically higher in MN than in LC ewes. BCS was higher in MN (3.04) than in LC ewes (2.60) as was indicated by Pérez-Oguez (1997), in a comparative experiment with LC and MN ewes. However BCS values were not modified by treatments. In contrast, ewes fed SBO showed lower increases of BW than the non fat supplemented. In this case, the supplementary energy intake was probably oriented to improve the milk yield which is a more efficient route of energy conversion in the metabolism of dairy animals organism, especially in mid lactation. A BW depression is indicated in the review of Chilliard *et al.* (1993) in lactating dairy cows receiving unsaturated fat, although it depends on the lactation stage. In contrast, Casals *et al.* (1999) observed a positive BW response to calcium soap supplementation in sheep.

Several studies examined the effects of enzymes on the BW of steers (review of Beauchemin *et al.*, 2003) showing that there is no evidence of any relationship between the increased fiber digestibility and the body weight. Generally, both BW and BCS variations were positive throughout the study showing that animals had in positive energy balance as long as they received the experimental diets.

### Milk yield

Milk yield, ECM, and ECM per DMI are expressed in kg after the application of an average of milk density value for each treatment. Although there was a difference in daily milk yields between breeds ( $P<0.001$ ; LC: 2.07 kg/d and MN: 1.08 kg/d), this difference is in accordance with the results indicated by Pérez-Oguez (1997), comparing milking performance of LC and MN ewes. No interaction was observed between breed and treatment indicating that the responses were similar in both breeds. Milk yield was increased 6.1% by fibrolytic enzyme ( $P<0.05$ ), but the ECM remained unchanged. These results agree with those of Titi and Lubbadeh (2004) who added a cellulose-xylanase activities enzyme to the forage of Awassy ewes and obtained an increased milk yield. On the contrary, Flores *et al.* (2002) did not observe any improvement of MN and LC ewes milk yield using the same enzyme product as our study, but applied to the concentrate fraction of the diet. Similar results were observed by Gonzalez *et al.* (2002) with dairy goats. The form and dose of enzyme application in both studies (0.47ml/kg of concentrate) were certainly not the optimal when positive results of milk production were targeted. In contrast, our results agree with several studies carried out by Beauchemin *et al.* (1997), Rode *et al.*, (1999) and Yang *et al.* (1999) in dairy cattle, feeding similar levels of enzyme (between 1 and 2 g/ kg of DM).

Feeding oil increased the daily milk yield by 6.2% ( $P<0.05$ ). This response was numerically higher in MN (8%) than in LC (5.2%) ewes but without any significant interaction between treatment and breed (Table 5). ECM yield was not changed by SBO addition but the milk conversion rate (kg of ECM/kg of DMI) increased (+11.3%) indicating greater efficiency in feed utilization, probably due to the higher energetic density of the SBO diets and a more efficient use of the diet energy (Baldwin *et al.*, 1980). These results agree with those described in dairy cattle by DePeters and Cant (1992) and Elliot *et al.* (1993) who observed a higher milk yield in fat supplemented diets. However, in dairy sheep, Casals *et al.* (1999) and Osuna *et al.* (2000) did not find any change in milk yield using calcium soaps, and Horton *et al.* (1992) even registered a milk yield depression using high levels of fat supplementation. The increase observed in milk yield in this case was probably not only a consequence of the supplementary energy supply to the diet but also of the enhanced efficiency of the metabolic utilization of the supplied carbohydrates destined to the synthesis of milk. According to BW data, the SBO supplemented animals had the lower BW gain, but they produced more milk. This could indicate that the energy utilization was more favorable to milk production than to weight gain in the animals receiving oil which agree with the increase of the milk conversion rate in the case of fed SBO ewes.

### Milk composition

Responses in milk composition are shown in Table 5. In general, MN ewes had higher ( $P<0.001$ ) milk fat, CP, casein and TS contents than LC. In contrast, LC ewes showed higher yields ( $P<0.001$ ) of milk components than MN, but few interactions were observed between the breed and the treatments, except some cases involving E supplementation that will be discussed in the article body. Ewes receiving the enzyme complex (E and E+O groups) had lower ( $P<0.05$ ) fat, CP, true protein, casein and TS contents than those of the control (C and SBO). An interaction enzyme by breed (data not shown) was significant ( $P < 0.05$ ) for CP, casein and true protein contents. These interactions traduced the different response to E supplementation of the two breeds. The depression of CP because of E was higher in MN ewes (-6.7%) than in LC (-2.5%), and something similar occurred with casein (-7.8 vs. -4%). There was no true protein depression in LC milk while in MN milk this parameter was 5% lower than control. There was also a complicated significant interaction ( $P < 0.05$ ) between the main treatments (SBO x E) concerning CP and casein contents. In this case, the CP and casein values obtained for SBO+E treatment, being lower than the values presented for SBO and E treatments, do not reach the sum of the decrease observed in the case of both treatments.

The decrease of milk fat and protein contents due to E effect is consistent with the study of Rode *et al.* (1999) in dairy cows fed fibrolytic enzymes. However, other authors obtained increases of fat and protein contents in dairy sheep (Titi and Lubbadeh, 2004) and dairy cattle (Lewis *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2000). A hypothesis to explain the milk fat depression can be that the enzymatic activity could have reduced the effective fiber content of the diet, thus, more fiber may be needed to avoid the milk fat depression when enzyme supplements are used. However, the milk fat depression, remaining constant the milk yield, is not evidently a negative result because of the current increasing interest for producing lower fat milk (Rode *et al.*, 1999). The other hypothesis may be that the synthesis of milk fat and protein were not increased as much as milk yield, thus the milk produced as a consequence of the E effect had lower fat and protein contents (dilution effect). Regarding breed differences, there is no bibliographical data showing difference of responses to enzyme supplementation on milk composition. Titi and Lubbadeh (2004), feeding fibrolytic enzymes to ewes and goats, did not observe any interaction between fibrolytic enzyme treatment and specie, in spite of the different fat, CP and TS values of their milk.

Feeding oil lowered ( $P<0.001$ ) milk protein and casein contents, while the milk fat content remained constant. In contrast, ewes receiving the oil supplement had higher milk fat yield ( $P<0.05$ ). This higher milk fat yield seems to be a direct consequence of the higher intake of fat in the SBO diets, while milk yield also increased, as a result fat content remained constant. Feeding fat to dairy ewes usually increases milk fat content but decreases the protein content (Schmidely and

Sauvant, 2001; Bocquier and Caja, 2001). The depression of milk protein and casein contents observed in this work is consistent with several studies performed in dairy cows (DePeters and Cant, 1992; Beaulieu and Palmquist, 1995; Harrison *et al.*, 1995) and ewes (Gargouri, 1997; Casals *et al.*, 1999). Both Casals *et al.* (1999) and Gargouri (1997) observed protein content depression in the second half of lactation. Even in the case of an increased protein yield, DePeters and Cant (1992) observed a reduced milk protein content and attributed it to a “dilution effect” due to the higher increase in milk than in protein yield. However, this hypothesis does not offer any explanation for the mechanisms by which dietary fat affects milk protein yield. Beaulieu and Palmquist (1995) attributed this decrease to a lower feed intake which is not the case of our study. Cant *et al.* (1992; 1993) related the lower milk protein with the reduction of arterial concentrations of essential AA, basically because of the higher efficiency of milk secretion in high fat diets, so that blood flow is not sufficient to cover the mammary gland requirements in AA.

### **Milk fatty acids**

Milk FA composition is shown in Table 6. As expected, the enzyme supplementation had no effect on milk FA profile. In contrast, feeding SBO to dairy ewes decreased ( $P<0.001$ ) short chain FA (SCFA) concentrations (16.76 vs. 10.56%), which are synthesized in the mammary gland, as well as medium chain FA (MCFA; 46.42 vs. 37.57%). Whereas, long chain FA (LCFA) concentrations (36.24 vs. 51.32%), basically of dietary origin, and monounsaturated FA (MUFA; 21.58 vs. 31.16%) and PUFA (6.30 vs. 7.04%) increased ( $P<0.001$ ). Individual FA gains were 37.7% for C18:0, 28.4% for oleic acid and 20.3% for linoleic acid. Feeding SBO increased unsaturated FA concentration (27.89 vs. 38.20%) and decreased saturated FA content (72.16 vs. 60.63%). Feeding soybean oil, rich in long chain FA, may have exerted an inhibitory effect on SCFA and MCFA in the mammary gland. Clapperton and Banks (1985) attributed 80% of this inhibitory action of supplemental fat to the increase of the absorption of LCFA, while Hansen and Knudsen (1987) attributed this result mainly to the increase of the C18:1 isomers concentrations. The concentrate enriched with oil contained higher levels of C18:2 than the control which could partially explain the increase of their concentrations in milk. In addition, given that they are not synthesized by the animal tissue, we can think that part of the increase of C18:1 isomers, and of C18:0, was a direct consequence of the biohydrogenation of C18:2. Due to the increase of linoleic acid, and constant level of linoleic, the n-6:n-3 ratio of milk increased ( $P<0.001$ ) from 4.34 (C and E) to 5.06 (SBO and SBO+E); According to Leskanich *et al.* (1997), humans should ideally be consuming a of n-6:n-3 ratio between 4:1 and 6:1, the ratio obtained in our study was therefore between the recommended range for human health. Nevertheless, other authors have indicated that

a lower n-6/n-3 ratio could be even better. As a consequence of the changes observed in the saturated and unsaturated FA, the atherogenicity index decreased ( $P < 0.001$ ) from 2.95 to 1.69 in the milk of ewes supplemented with oil. The importance of this index is currently under discussion, but seems to be relevant in the case of people consuming an excess of saturated fat.

Regarding CLA, only the *cis*-9, *trans*-11 CLA isomer (RA) was detected in the milk samples. Feeding SBO increased ( $P < 0.001$ ) the CLA content (156%), varying its concentration from 1.01% (C and E) to 2.58% (SBO and SBO+E). Feeding oil also increased the *trans*-11 C18:1 or TVA from 3.73 to 7.67% (105%,  $P < 0.001$ ), while the ratio TVA/CLA remained constant (2.78), showing that CLA and TVA varied in the same way.

A part of CLA is biosynthesized in the rumen during the biohydrogenation process. The increase in both C18:1 and C18:0 concentrations may indicate that the higher CLA level in the milk of SBO supplemented groups is in part a consequence of the higher biohydrogenation activity. However, the increase of TVA concentration, precursor of rumenic acid in the mammary gland, in addition to the constant ratio of TVA/rumenic acid, indicates the important role of desaturation in the CLA biosynthesis. Several authors indicated that the main part of CLA (from 64 to 98%) in milk fat is produced in the mammary gland by  $\Delta$ -9 desaturase from TVA (Griinari *et al.*, 2000).

Comparing the results of the present experiment with others obtained in dairy cattle we observe that cow milk contains lower concentrations of CLA in non fat supplemented diets, which oscillate between 0.42% and 0.53% of the total FA content, but increase to 1.9% after fish oil supplementation (Chouinard *et al.*, 2001), or to 4.02% with sunflower oil (Bauman *et al.*, 2000). Results on FA profile of recent studies using fat supplements in dairy ewes generally agree with those of the present study. Feeding a high dose of sunflower oil (6%) to Assaf dairy ewes receiving a high concentrate (80%) diet increased both CLA and TVA contents of milk by 290% (Hervás *et al.*, 2006). Similarly, Portugal *et al.* (2006) observed increases in several CLA isomers, and especially RA, in milk from ewes fed linseed oil or sunflower oil. The modification of milk FA profile, as in the present work, is attributed to the direct reflection of the lipid source profile on the milk fat profile, increasing abundant fatty acids concentration (in the case of saturated fat or protected unsaturated fat sources) or increasing the concentration of intermediates and final products of rumen biohydrogenation (in the case of unsaturated non protected fat sources).

The interaction between E and SBO was significant for concentrations of some FA, basically SCFA, and specifically C6:0 to C12:0, 15:0, C17:0, oleic and linoleic acids. In several cases, the values of these FA for the SBO+E treatment tended to have a more moderated variation in comparison with the SBO treatment. In fact, the depression of SCFA was less marked in the

SBO+E (-26.2% for MN and -42.5% for LC) than in the SBO treatment (-35.5% and -54.2%), and the increase of the oleic acid was lower in the SBO+E (44.35%) than in the SBO (26.15%) milk. There are no studies on dairy ruminants that relate the FA composition of milk with fibrolytic enzymes. In this study, it is difficult to interpret the interaction between E and SBO in FA contents. Probably there could be a strong relationship with the different modifications of the rumen microflora function as well of the milk secretion and composition due to the fibrolytic enzymes supplementation.

Significant interactions were detected between the SBO treatment and the breed factor for numerous FA, especially for SCFA, MCFA, LCFA, saturated FA, unsaturated FA, MUFA, PUFA, TVA, n-6/n-3 ratio, atherogenicity index, desaturase ratio of CLA, and desaturase index. These interactions affected the response of each breed to the same treatment, indicating probably different aptitudes of the ewes depending of the genetic potential. Compared with MN ewes, LC ewes showed higher increases ( $P < 0.05$ ) of TVA (+145.7 vs. +61.7%), unsaturated FA (+57.9 vs. +31.4%) and MUFA concentration (+66.7 vs. +42.7%), while PUFA concentration increased in LC milk (+47.1%) but reduced in MN milk (-6.9%). In addition, LC ewes showed stronger reductions of saturated FA concentration (-21.2 vs. -12.5%) and atherogenicity index (-52.2 vs. 39.8%) of the milk ( $P < 0.05$ ). CLA desaturase ratio was increased in MN (+30.8%) but decreased in LC (-36.5%) ewes, while the desaturase index was more increased in LC (+26.5%) than in MN (+19.2%) ewes. Therefore, we can conclude that, for several FA, it seems that the Lacaune ewes were more sensitive to the oil supplementation and that they were more efficient to enhance the milk FA composition. Beaulieu and Palmquist (1995) observed different responses of Holstein and Jersey cows to calcium salts of palm oil FA. For example, C18:0 was only increased in Jersey, but remained unchanged in Holstein cows. DePeters *et al.* (1995) have identified significant differences between Holstein, Jersey and Brown Swiss dairy breeds in levels of unsaturated FA and CLA. The authors associated the differences with the activity of  $\Delta$ -9 desaturase. In the process of identifying genetic markers for these traits, the authors observed that the differences in the enzyme level of activity are also genetically linked within breeds.

## CONCLUSIONS

Adding fibrolytic enzymes to the forage fraction of the diet enhanced DM, OM and neutral detergent fiber digestibilities, as well as milk yield of dairy ewes. Nevertheless, under the conditions of this experiment, the positive effect of enzymes on nutrients digestibility was reduced when combined with soybean oil. Feeding a moderate dose of soybean oil increased milk yield, fat yield and long chain FA concentrations, especially CLA and TVA. Fatty acid responses to oil

supplementation were higher in Lacaune than in Manchega dairy ewes, and some interactions between fibrolytic enzymes and oil were also detected for milk fatty acids. Therefore, soybean oil, at a reasonable level, could be an interesting tool to modify milk fat composition and supply energy in early lactation in dairy sheep.

## REFERENCES

- Albanell, E., P. Cáceres, G. Caja, E. Molina, and A. Gargouri. 1999. Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by Near-Infrared Spectroscopy. *J. AOAC Internat.* 82:753-758.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. Vol I, 15th Ed. AOAC, Arlington, VA.
- Baldwin R. L., N. E. Smith, J. Taylor, and M. Sharp. 1980. Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. *J. Anim. Sci.* 51:1416-1428.
- Bauman, D. E., D. M. Barbano, D. A. Dwyer, and J. M. Griinari. 2000. Technical note: production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *J. Dairy Sci.* 83: 2422-2425.
- 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 (ed). Nottingham University Press (Nottingham, UK):221-250.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, and V. J. H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rat of steers fed dry forages (short communication). *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, and W. Z. Yang. 1997. Final report to biovance technologies: enzymes as feed additives for lactating dairy cows. Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, Alberta T1J4B1, September 8th.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, M. Maekawa, D. P. Morgavi, and R. Kampen. 2000. Evaluatin of a non starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:543-553.
- Beauchemin, K. A., D. P. Morgavi, T. A. McAllister, W. Z. Yang, and L. M. Rode. 2001. The use of enzymes in ruminant diets. In: Garnsworthy, P.C.,Wiseman, J. (Eds.), Recent Advances in Animal Nutrition. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 297-322.

Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, and W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E. Suppl. 2):E37-E47.

Beaulieu, A. D., and D. L. Palmquist. 1995. Differential effects of high diets on fatty acids composition in milk of Jersey and Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 78:1336-1344.

Bocquier, F., M. Theriez, S. Prache et A. Brelurut. 1988. Alimentation des ovins. In: R. Jarrige (Ed.), 1988, Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA, Paris, pp. 249-281.

Bocquier, F., F. Barillet, P. Guillouet, and M. Jacquin. 1993. Prévision de l'énergie du lait de brebis à partir de différents résultats d'analyses: proposition de lait standard pour les brebis laitières. *Ann. Zootech.*, 42:57-66.

Bocquier, F. and G. Caja. 2001. Production et composition du lait de brebis: effets de l'alimentation. *INRA Prod. Anim.*, 14 :129-140.

Cant, J. P., E. J. DePeters, and R.L. Baldwin. 1993. Mammary aminoacids utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *J. Dairy Sci.* 76:762-774.

Casals, R., G. Caja, X. Such, C. Torre, and S. Calsamiglia. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy cows. *J. Dairy Res.* 66:177-191.

Casals, R., G. Caja, M.V. Pol, X. Such, E. Albanell, A. Gargouri and J. Casellas. 2006. Response of lactating dairy ewes to various levels of dietary calcium soaps of fatty acids. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 131:312-332.

Chilliard, Y. 1993. Dietary Fat and Adipose Tissue Metabolism in Ruminants, Pigs and Rodents: A Review. *J. Dairy Sci.* 76:3897-3931

Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, Y. Chilliard, J. K. Drackley, and D. E. Bauman. 2001 Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84:680-690.

Clapperton, J. L., and W. Banks. 1985. Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. *J. Sci. Food Agric.* 31:1205-1211.

DePeters, E. J., and J. P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75:2043-2070.

DePeters, E., J. F. Medrano and B. A. Reed. 1995. Fatty acid composition of milk fat from three breeds of dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 75:267-269.

Doreau, M. and Y. Chilliard. 1992. Influence d'une supplémentation de la ration en lipides sur la qualité du lait de vache. *INRA Prod. Anim.* 5 (2):103-111.

- Elliot, J. P., J. K. Drackley, D. J. Schauff, and E. H. Jaster. 1993. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 76:775-789.
- Feng, P., C. W. Hunt, W. E. Julien, S. C. Hacny, and G. T. Pritchard. 1992. Effect of enzyme additives to cool-seaason grass forage on voluntary intake and digestive function in mature beef steers. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl 2):310 (Abstr.).
- Feng, P. C., C. W. Hunt, G. T. Pritchard, and W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:1349-1357.
- Flores, C., G. Caja, R. Casals, E. Albanell, X. Such, G. Vera, E. González, A. Bach, and C. Torre. 2002. Supplementatin of a fibrolytic enzyme complex in the concentrate of dairy ewes during lactation. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl 1):357 (Abstr.).
- Gargouri, A . 1997. Efectos de la utilización de jabones cárnicos de ácidos grasos de cadena larga en ovejas lecheras durante los periodos de cría y de ordeño. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 174pp. In Spanish with English abstract.
- González, E., G. Caja, E. Albanell, C. Flores, A. Castro, R. Casals, X. Such, A. Bach, and C. Torre. 2002. Effects of fibrolytic enzyme supplementation for dairy goats in mid lactation. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl 1):355.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130:2285–2291.
- Hansen, H. O., and J. Knudsen. 1987. Effect of exogenous long-chain fatty acids on individual fatty acids synthesis by dispersent ruminant mammary gland cells: esterification long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 70:1350-1354.
- Harrison, J. H., R. L. Kincaid, J. P. McNamara, S. Waltner, K. A. Loney, R. E. Riley, and J. D. Cronrath. 1995. Effect of whole cottonseeds and calcium salts of long-chain fatty acids on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:181-193.
- Heinrich, A. J., D. L. Palmquist and H. R. Conrad. 1982. Feed intake patterns of cows fed high fat grain mixtures. *J. Dairy Sci.* 65:1325.
- Hervás, G., P. Luna, A. R. Mantecón, N. Castañares, P. frutos, M. A. de la Fuente, and M. Juárez. 2006. Effect of sunflower oil on sheep milk production and composition, and in vitro rumen fermentation. Book of Abstract of the 4th European Federation of Lipids Congress. Madrid, Spain. p 571 (Abstr.).
- Horton, G. M. J., J. E. Wohlt, D. D. Palatin and J. A Baldwin. 1992. Rumen-protected lipid for lactating ewes and their nursing lambs. *Small Rum. Res.* 9:27-36.

- Jenkins, T. C., and D. L. Palmquist. 1984. Effects of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrients digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67:978-986.
- Jenkins T. C. 1987. Effects of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous in vitro cultures. *J. Anim. Sci.* 64:1526-1532.
- Jenkins, T. C., and B. F. Jenny. 1989. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:2316-2324.
- Jenkins T. C. and N. Fotouhi. 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Anim. Sci.* 68:460-466.
- Kay, J. K., W. J. Weber, C. E. Moore, D. E. Bauman, L. B. Hansen, H. Chester-Jones, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2005. Effects of Week of Lactation and Genetic Selection for Milk Yield on Milk Fatty Acid Composition in Holstein Cows. *J. dairy Sci.* 88:3886-3893.
- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants: I. Fish oil metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 89:189-199.
- Kowalczyk, J., E. R. Orskov, J. J. Robinson, and C. S. Stewart. 1977. Effect of fat supplementation on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. *Brit. J. Nut.* 37:251.
- Krause M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr, and P. NØrgaard. 1998. Fibrolytic enzymes treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Kung L., Jr., R. J. Treacher, G. A Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres, and M. A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- Leskanich, O., K. R. Matthews, C. C. Warkup, R. C. Noble, and M. Hazzledine. 1997. The effect of dietary oil containing (n-3) fatty acids on the fatty acid, physicochemical, and organoleptic characteristics of pig meat and fat. *J Anim. Sci.* 75:673-683.
- Lewis, G. E., W. K. Sanchez, C. W. Hunt, M. A. Guy, G. T. Pritchard, B. I. Swanson, and R. J. Treacher. 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance of dairy cows. *J. dairy Sci.* 82:611.
- McAllister, T. A., S. J. Oosting, J. D. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A.N. Hristov, R. J. Treacher, and K. J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McAllister, T. A., K. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, J. Baah, J. A. Shelford, and K-J Cheng. 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility, growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80:35-44.

- Olubobokun, J. A., S. C. Loerch, and D. L. Palmquist. 1985. Effect of tallow and tallow calcium soap on feed intake and nutrient digestibility in ruminants. Nutr. Rep. Int. 31:1075.
- Osuna, D. R., R. Casals, G. Caja, and S. Peris. 1998. Effects of feeding whole oilseeds to partially replace calcium soaps of fatty acids on dairy ewes intake and milk production and composition. J. Dairy Sci. 81 (Suppl. 1):302 (Abstr.).
- Osuna, D. R., R. Casals, E. Albanell, and G. Caja. 2000. Effects of feeding calcium soaps or whole oilseeds on feed intake and lactation performance of dairy ewes. J. Dairy Sci. 83 (Suppl. 1):278 (Abstr.).
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. J. Anim. Sci. 2003. 81:3250-3254
- Pariza, M. W., Y. Park, and M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Prog. Lipid Res. 40:283–298.
- Pérez-Oguez, L. Alimentación y manejo de ovejas lecheras: efectos del nivel y calidad del concentrado durante la lactación y comparación de la eficacia productiva de ovejas de raza Manchega y Lacaune. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 234p. In Spanish with English abstract.
- Portugal, P. V., J. M. B. Ribeiro, M. S. Pereira, J. M. R. Ribeiro, C. C. Belo, C. M. Alfaia, J. Prates, and R. J. B. Bessa. 2006. Effects of supplementation with sunflower or linseed oil on distribution of octadecadienoic conjugated isomers in plasma and milk from grazing ewes. Book of Abstract of the 4th European Federation of Lipids Congress. Madrid, Spain. p 566 (Abstr.).
- Rode L. M., W. Z. Yang, and K. A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzymes supplements for dairy cows in early lactation. J. Dairy Sci. 82:2121-2126.
- Russell, A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. J. Agric. Sci. 72:451-454.
- Sauvant D., and P. Bas. 2001. La digestion des lipides chez le ruminants. INRA Prod. Anim. 14 (5):303-310.
- Schmidely, P., and D. Sauvant. 2001. Taux Butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliment concentré. INRA Prod. Anim. 14(5):337-354.
- Such , X., G. Caja, N. Fernández, M. P. Molina, and A. Torres. 1999. The effects of type of pulsator on the evolution of milk emission kinetics during machine milking in Manchega ewes. Pages 227-232 in: Milking and milk production of dairy sheep and goats. F. Bariellet and N.P. Zervas (Eds.), EAAP Publication No. 95, Wageningen Press., Wageningen. The Netherlands.

- Sukhija, P. S., and D. L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202-1206.
- Titi H., and W. F. Lubbadeh. 2004. Effect of feeding cellulase enzyme on productive responses of pregnant and lactating ewes and goats. *Small Rum. Res.* 52:137-143.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B. A. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Yang W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 1999. Effect of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.
- Yang W. K., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512-2520.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and D. D. Vedres. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102:137–150.
- Zheng, W., D. J. Schingoethe, G. A. Stegeman, A. R. Hippen, and R. J. Treacher. 2000. Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulaseand xylanase enzyme mixture to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2319.

**Table 1.** Feed ingredients of the experimental concentrates and diets of dairy ewes.

Ingredients, % as fed	Concentrates <sup>1</sup>		Experimental TMR <sup>2</sup>		Milking trial diet <sup>3</sup>	
	C and E	SBO and SBO+E	C and E	SBO and SBO+E	C and E	SBO and SBO+E
Alfalfa hay	---	---	30.00	30.00	28.95	28.95
Fescue hay	---	---	30.00	30.00	28.95	28.95
Ground corn	23.76	23.76	9.50	9.50	8.39	8.39
Ground barley	29.33	18.77	11.73	7.51	13.73	10.02
Whole barley	---	---	---	---	3.39	3.39
Soybean-44%	22.77	25.71	9.11	10.28	8.06	9.08
Orange pulp	19.78	19.78	7.91	7.91	6.99	6.99
Soybean oil	---	7.62	---	3.05	---	2.69
Magnesium oxide	0.40	0.40	0.16	0.16	0.14	0.14
Sodium bicarbonate	0.99	0.99	0.40	0.40	0.35	0.35
Mineral & Vitamins <sup>4</sup>	2.97	2.97	1.19	1.19	1.05	1.05

<sup>1</sup> C: Control; E: fibrolytic enzymes (Promote®, 2 ml/kg TMR on DM basis); SBO: soybean oil.<sup>2</sup> Diet of the digestibility trial<sup>3</sup> Including the experimental TMR and a constant portion (100 g/d) of whole barley supplied in the milking parlour.<sup>4</sup> Contains (g/kg): I, 1.22; Mn, 103; Zn, 104; Fe, 130; Cu, 16.6; Co, 0.34; Se, 0.31; (IU/kg): vitamin A, 10.700; vitamin D, 2.700; vitamin E, 56; and antioxidant, 222 g/kg.**Table 2.** Nutritional value of experimental concentrates and diets.

	Concentrates <sup>1</sup>		Experimental TMR <sup>2</sup>		Milking trial Diet <sup>3</sup>	
	C and E	SBO and SBO+E	C and E	SBO and SBO+E	C and E	SBO and SBO+E
DM	89.49	90.49	89.78	90.18	89.79	90.18
OM	89.24	88.27	87.78	87.39	84.90	84.53
CP	18.63	19.01	18.57	18.72	18.32	18.47
EE	3.04	6.90	2.74	4.30	2.73	4.24
NDF	14.58	13.23	32.82	32.28	32.41	31.89
ADF	6.25	5.95	19.00	18.88	18.60	18.48
NEL <sup>4</sup>	1.78	1.98	1.45	1.53	1.46	1.54

<sup>1</sup> C: Control; E: fibrolytic enzymes; SBO: soybean oil.<sup>2</sup> Diet of the digestibility trial<sup>3</sup> Including the experimental TMR and a constant portion (100 g/d) of whole barley supplied in the milking parlour.<sup>4</sup> NEL: Net Energy for Lactation (Mcal/ kg DM).

**Table 3.** Fatty acids (FA) profile (% of total FA) of the experimental TMR and diets containing or not soybean oil (SBO) or fibrolytic enzymes (E).

Fatty acids	Concentrates		TMR		Diet <sup>1</sup>	
	Control and E	SBO and SBO+E	Control and E	SBO and SBO+E	Control and E	SBO and SBO+E
C10:0	0.24	2.67	0.99	2.20	0.99	2.20
C12:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C14:0	0.00	0.00	0.53	0.31	0.53	0.31
C16:0	27.60	23.43	23.80	22.80	23.80	22.80
C16:1	0.27	0.00	0.60	0.30	0.57	0.27
C18:0	5.53	4.48	5.50	4.80	5.46	4.83
C18:1	25.98	24.23	23.50	23.50	22.51	22.48
C18:2	28.51	35.16	19.50	27.50	19.51	27.49
C18:3	5.34	2.78	12.70	8.00	12.70	8.00
C20:0	1.24	0.83	1.70	1.20	1.70	1.20
C22:0	0.60	0.75	0.80	0.80	0.85	0.84
Others	4.68	5.63	10.30	8.60	10.30	8.60
Total FA, %	1.93	5.84	2.15	3.72	2.07	3.58

<sup>1</sup> Experimental diet of the milking trial including the same TMR used in the digestibility trial and a constant portion (100 g/d) of barley offered in the milking parlour.

**Table 4.** Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzymes (E) supplementation on nutrients digestibility (%) in dry MN dairy ewes.

	Treatments				SEM	Contrast (P<) <sup>1</sup>				
	C <sup>2</sup>	SBO	E	SBO+E		SBO vs. C	E vs. C	SBO+E vs. C	SBO vs. SBO+E	E vs. SBO+E
DM	65.2	65.6	70.2	64.3	2.23	NS	*	NS	NS	**
OM	69.3	68.7	74.2	67.8	2.15	NS	*	NS	NS	**
CP	68.3	68.8	71.7	67.1	2.04	NS	NS	NS	NS	*
EE	75.4	84.4	78.9	83.7	1.42	***	*	**	NS	**
NDF	54.5	56.6	61.2	52.4	3.08	NS	*	NS	NS	**
ADF	54.3	54.4	60.7	51.3	3.25	NS	*	NS	NS	**

<sup>1</sup> + P<0.10; \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\*P<0.001.

<sup>2</sup> Control treatment.

**Table 5.** Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzyme (E) supplementation on milk production and composition of Lacaune (LC) and Manchega (MN) dairy ewes.

	Treatments								Effect (P<) <sup>1</sup>				
	Control		SBO		E		SBO+E		SEM	SBO	E	B <sup>2</sup>	SBO*E
	MN	LC	MN	LC	MN	LC	MN	LC					
DMI, kg/d	2.39	3.09	2.24	2.94	2.33	2.94	2.39	2.89	0.060	NS	NS	***	NS
Milk yield, kg/d	1.03	1.91	1.07	2.08	1.04	2.12	1.16	2.16	0.067	**	**	***	NS
Fat, (%)	7.01	5.75	6.68	5.72	6.4	5.48	6.41	5.44	0.105	NS	***	***	NS
Fat yield, g/d	72.3	109.6	71.2	120.4	65.9	114.9	73.4	116.7	3.91	*	NS	***	NS
CP, %	5.80	5.12	5.31	4.72	5.41	4.99	5.09	4.64	0.052	***	***	***	*
CP yield, g/d	59.1	97.9	56.8	98.2	56.3	105.2	59.1	100.8	3.18	NS	NS	***	NS
True Protein, %	5.28	4.61	5.18	4.53	5.02	4.58	5.02	4.53	0.834	NS	**	***	NS
True Protein yield, g/d	53.5	87.7	54.8	93.6	51.7	95.8	57.6	96.9	2.88	**	**	***	NS
Non proteic nitrogen, %	1.31	1.16	1.27	1.16	1.27	1.19	1.26	1.17	0.271	***	NS	NS	NS
Casein, %	4.49	3.96	4.04	3.56	4.14	3.80	3.83	3.47	0.044	***	***	***	*
Casein, % of CP	77.4	77.3	76.3	75.6	76.6	76.5	75.6	74.9	0.23	***	**	NS	NS
Total solids, %	18.04	15.81	16.88	15.39	17.06	15.50	16.78	14.89	0.175	***	**	***	NS
ECM <sup>3</sup> , kg/d	1.16	1.91	1.08	1.91	0.99	1.91	1.08	1.91	0.069	NS	NS	***	NS
ECM/ DMI, kg/kg DM	0.49	0.62	0.48	0.65	0.42	0.65	0.45	0.66	0.022	*	NS	***	NS

<sup>1</sup> + P<0.10; \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\*P<0.001.

<sup>2</sup> Breed effect.

<sup>3</sup> Energy Corrected Milk, estimated according to Bocquier *et al.* (1993): ECM= Milk Yield (kg/d) x (0.071 x Fat (%)) + 0.043 x CP (%) + 0.2224).

**Table 6.** Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzymes (E) supplementation on milk fat FA composition (% of total FAME<sup>1</sup>).

	Treatments								SEM	Effect (P<) <sup>2</sup>					
	Control		SBO		E		SBO+E			SBO	E	B <sup>3</sup>	SBO*E	SBO*B	
	MN	LC	MN	LC	MN	LC	MN	LC							
C4:0	1.91	1.89	2.15	2.23	1.94	1.82	2.21	2.21	0.103	***	NS	NS	NS	NS	
C6:0	2.46	2.61	1.99	1.47	2.49	2.35	2.16	2.86	0.113	***	NS	*	*	*	
C8:0	2.86	3.11	1.77	1.22	2.82	2.60	2.10	1.69	0.144	***	NS	*	*	*	
C10:0	9.66	10.46	5.05	3.40	9.03	8.60	6.01	4.69	0.466	***	NS	*	**	*	
C12:0	5.70	6.28	2.98	2.65	5.48	5.28	3.55	3.01	0.312	***	NS	NS	*	NS	
C14:0	12.60	12.20	9.81	8.97	12.07	10.82	8.72	10.06	0.487	***	NS	NS	NS	*	
C14:1	0.20	0.16	0.22	0.10	0.19	0.23	0.16	0.10	0.028	*	NS	*	NS	*	
C15:0	1.00	1.08	1.01	0.86	1.18	1.37	0.85	0.80	0.087	***	NS	NS	**	*	
C16:0	26.64	25.92	25.12	23.13	26.15	27.47	23.74	21.62	0.931	***	NS	NS	NS	*	
C16:1	0.71	0.63	0.96	0.52	0.78	1.02	0.68	0.53	0.090	NS	NS	NS	NS	NS	
C17:0	0.56	0.63	0.58	0.57	0.69	0.69	0.53	0.53	0.038	**	NS	NS	*	NS	
C17:1	0.16	0.11	0.19	0.14	0.13	0.27	0.13	0.15	0.035	NS	NS	NS	NS	NS	
C18:0	8.86	8.81	12.60	12.96	10.20	7.57	12.10	11.13	0.993	***	NS	NS	NS	NS	
C18:1 n9t	0.35	0.99	0.69	1.07	0.74	0.62	0.99	1.18	0.245	*	NS	NS	NS	NS	
Trans-11 C18:1 (TVA)	3.55	3.65	5.74	8.97	3.71	4.01	5.40	10.55	0.469	***	NS	**	NS	*	
C18:1 n9c	14.78	16.10	22.55	22.02	17.86	16.34	18.86	20.11	1.104	***	NS	NS	**	NS	
Cis-11 C18:1	0.77	0.74	0.95	1.16	0.66	0.78	1.16	1.23	0.620	***	NS	*	NS	NS	
C18:2 n-6t	0.30	0.33	0.49	0.69	0.45	0.38	0.40	0.73	0.100	**	NS	*	NS	*	
C18:2 n-6c	3.56	3.21	3.94	3.56	3.35	2.96	3.85	4.39	0.306	*	NS	NS	*	NS	
Cis-9, trans-11 CLA	1.23	0.79	1.81	2.34	0.79	1.22	2.81	2.77	0.323	***	NS	NS	NS	NS	
C18:3 n-3	0.84	0.90	0.87	0.75	0.90	0.78	0.89	0.81	0.088	NS	NS	NS	NS	NS	
C20:0	0.30	0.33	0.39	0.36	0.34	0.28	0.39	0.32	0.027	**	NS	NS	NS	NS	
C22:0	0.14	0.14	0.20	0.17	0.16	0.13	0.20	0.16	0.016	**	NS	*	NS	NS	
n-6 / n-3	4.73	3.99	3.46	5.75	4.39	4.26	4.72	6.29	0.432	**	NS	*	NS	**	
SCFA	16.92	18.21	10.96	8.34	16.41	15.51	12.49	10.46	0.731	***	NS	*	**	*	
MCFA	46.96	46.39	40.14	36.24	44.72	47.59	39.07	34.82	1.346	***	NS	NS	NS	**	
LCFA	35.60	34.91	48.20	54.93	38.18	36.26	47.89	54.25	1.674	***	NS	*	NS	**	
Saturated FA	72.83	73.71	63.72	58.04	71.55	70.53	63.95	56.79	1.825	***	NS	*	NS	*	
Unsaturated FA	26.64	26.67	35.00	42.10	27.47	30.76	32.95	42.75	1.421	***	NS	*	NS	*	
MUFA	20.55	20.40	29.33	34.01	22.08	23.30	27.41	33.88	1.558	***	NS	**	NS	*	

PUFA	6.09	6.27	5.67	8.09	5.39	7.46	5.54	8.87	0.603	***	NS	NS	NS	*
TVA / CLA	2.87	2.09	2.51	3.82	2.14	3.13	1.77	3.91	0.560	NS	NS	*	NS	NS
Atherogenicity index <sup>4</sup>	3.14	3.14	1.89	1.50	2.69	2.81	1.96	1.39	0.174	***	NS	NS	NS	*
$\Delta^9$ -Desaturase ratios <sup>5</sup>														
C14	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	NS	NS	*	NS	NS
C16	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.002	NS	NS	NS	NS	NS
C18	0.68	0.68	0.69	0.71	0.67	0.74	0.68	0.74	0.028	NS	NS	*	NS	NS
CLA	0.26	0.32	0.34	0.20	0.32	0.26	0.43	0.20	0.061	NS	NS	NS	NS	*

<sup>1</sup> Fatty Acids Methyl Esters.

<sup>2</sup> + P<0.10; \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\*P<0.001.

<sup>3</sup> Effect of breed.

<sup>4</sup> Calculated for each pair of FA according to Kelsey *et al.* (2003) as: (product of  $\Delta^9$ -desaturase)/(product of  $\Delta^9$ -desaturase + substrate of  $\Delta^9$ -desaturase); ie: C14: C14:1/(C14:1+C14:0).

<sup>5</sup> Calculated according to Ulbricht and Southgate (1991) as: (C12 + 4 C14 + C16):(sum of unsaturated FA).

**Table 7.** Effects of soybean oil (SBO) and fibrolytic enzyme (E) on body weight and BCS of dairy ewes.

	Treatments								Effect (P<) <sup>1</sup>				
	Control		SBO		E		SBO+E		SBO	E	B	SBO*E	
	MN	LC	MN	LC	MN	LC	MN	LC	SEM				
BW, kg	71.86	70.22	72.10	69.95	71.98	70.12	71.86	69.84	1.15	NS	NS	NS	NS
Variation of BW <sup>2</sup> , kg	1.40	2.11	0.86	0.48	1.57	1.18	1.62	0.96	0.29	*	NS	NS	NS
BCS <sup>3</sup>	3.03	2.59	3.05	2.59	3.05	2.67	3.04	2.57	0.044	NS	NS	***	+
Variation of BCS <sup>4</sup>	0.05	0.03	0.08	0.163	0.10	0.22	0.05	0.13	0.070	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> + P<0.10; \* P<0.05; \*\*\*P<0.001.

<sup>2</sup> Difference between BW at the beginning and the end of each experimental period.

<sup>3</sup> Body Condition Score (scale of 0 to 5 to the nearest 0.25), measured according to Russell *et al.* (1969).

<sup>4</sup> Difference between BCS at the beginning and the end of each experimental period.

---

---

*VII. Feeding Soybean Oil to Dairy Goats Increases  
Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk*

---

---

## ABSTRACT

A total of 24 Murciano-Granadina dairy goats milked once daily throughout lactation were used to study the effects of including soybean oil (SBO) in their diet on lactational performance and milk fatty acids (FA) content, particularly conjugated linoleic acid (CLA) and *trans*-vaccenic acid (*trans*-11 C18:1, TVA). Three weeks after parturition, goats were allocated to two balanced groups according to number of lactation, BW and daily milk yield, and kept in two separate pens. The experiment consisted of a two period (28 d each) crossover design with two dietary treatments: **C** (control) and **SBO** (6% as fed in the concentrate). Goats were fed dehydrated fescue (ad libitum), alfalfa pellets (0.5 kg/d), and experimental concentrate (1 kg/d) to which the SBO was or was not added. Forage was offered in the pens, and the concentrate was individually fed in two equal portions at milking (09.00) and in the afternoon (17.00). Final SBO content in the consumed SBO diet was 2.5% (dry matter basis). Diets were isonitrogenous (17.4%), but their total FA content varied from 2.2% (Control) to 4.6% (SBO). There was no effect of SBO on dry matter intake (2.1 kg/d), milk yield (1.87 kg/d), energy corrected milk (2.09 kg/d), energy corrected milk conversion rate (0.98 kg/kg DM), BW (40.5 kg), and BCS (2.7). Feeding SBO increased the milk fat content (+10%) and yield as well as total solids content. SBO had no effect on milk crude protein (average of 3.4%) and true protein (average of 2.9%) contents, but it reduced milk casein content (2.5 vs 2.3 %). Short and medium chain FA were reduced by SBO, while long chain FA were increased. Feeding preformed linoleic acid through SBO increased milk concentrations of linoleic, oleic and stearic FA, but reduced levels of linolenic and palmitic FA. As a consequence, feeding SBO reduced the saturated to unsaturated FA ratio (3.01 vs. 2.29) and the atherogenicity index (3.29 vs. 2.2). Compared with the control, milk contents of *cis*-9, *trans*-11 CLA (0.68 vs. 2.03%) and TVA (2.04 vs. 6.41%) in the SBO treatment were increased approximately by 200%. In conclusion, feeding a moderate dose of SBO to dairy goats was a useful way to increase milk fat, CLA and TVA contents and reduce the atherogenicity index, without negative effects on intake, milk yield and protein content.

**Keywords:** Soybean Oil, Dairy Goats, CLA, TVA, fatty acids.

## INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid (CLA) is a term which refers to several isomers of linoleic acid (C18:2) containing a double insaturation in a conjugated configuration. CLA exists in the fat of ruminant milk and meat, and in derivate products. Several studies have investigated, basically in animal models, the possible beneficial effects of CLA on human health. They described positive effects of CLA such as anticarcinogenic (*in vivo* and *in vitro*), antiatherogenic properties, alteration of nutrient partitioning and lipid metabolism, antidiabetic (type II) and reduction of hyperglycemia, immune modulation and, finally, improvement of bone mineralization (McGuire and McGuire, 2000; Bauman *et al.*, 2001; Pariza *et al.*, 2001). These properties of CLA are related to specific CLA isomers. Studies have established that rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 CLA), the major isomer in milk fat of ruminants, is especially anticarcinogenic (Ip *et al.*, 1999, Jahreis *et al.*, 1999). The effects of CLA on nutrient partitioning and lipid metabolism are elicited by the *trans*-10, *cis*-12 CLA isomer (Park *et al.*, 1999), and it has been demonstrated that the antidiabetic effect of CLA is induced also by the *trans*-10, *cis*-12 isomer (Ryder *et al.*, 2001).

The factors of variation of CLA in milk have been studied mainly in dairy cows (Dhiman *et al.*, 1999 and 2000; Chilliard *et al.*, 2001; Chouinard *et al.*, 2001, Kelsey *et al.*, 2003) and are basically divided into two groups: dietary factors, especially forage type and the utilization of different fat sources such as seeds, oils, calcium soaps and others; and physiological factors such as breed and lactation stage. Among the dietary factors, different lipid precursors of CLA biosynthesis in the rumen have been evaluated. In dairy cows, the use of unsaturated fat generally increases the CLA in milk more than when using saturated fat. In the particular case of plant oils, Chouinard *et al.* (2001) compared the effects of 3 different calcium soaps of vegetal oils (canola, soybean and linseed) and observed an increase in the CLA level due to the oil supplementation, the response being higher with soybean and linseed oils. These results could be a consequence of the higher level of PUFA (polyunsaturated fatty acids; C18:2 and C18:3) in these substrates. In fact, the biosynthesis of CLA can happen basically in two main ways (Bauman *et al.*, 2001): the first is the partial biohydrogenation of unsaturated FA in the rumen. The second way, proposed later, is the desaturation of *trans*-11 C18:1 (TVA; *trans*-Vaccenic Acid), a product of the rumen biohydrogenation, in the mammary gland by the  $\Delta^9$  desaturase action (Griinari *et al.*, 2000). In addition, Lock and Bauman (2004) mentioned that TVA helps to prevent cancerous tumors, once it has been desaturated to *cis*-9, *trans*-11 CLA, and TVA has been considered a functional food

for its direct correlation with the biosynthesis of CLA (Bauman *et al.*, 2006). However, this is not the case of all trans FA, the intake of some of them is associated with higher risk factors of cardiovascular diseases and biomarker of inflammation, but the specific *trans* FA isomers responsible have not been identified (Kramer *et al.*, 2006).

Research data on dietary factors affecting milk CLA in dairy goats is less available than in dairy cows and has been described mainly by French researches and was recently revised by Chilliard *et al.* (2006). According to these studies, when fat sources such as oleic or linoleic sunflower oil, or linseed oil were tested, the main factor of variation was the nature of oil, the higher CLA levels being obtained when sunflower oil (C18:2-rich) was fed. In contrast, raw, extruded or formaldehyde treated oilseeds gave poorer results (Bernard *et al.* 2005, Chilliard *et al.* 2006), the milk CLA content depending also on the nature of forage.

Data on lactational effects of feeding other C18:2-rich fat sources, like vegetal oils, to dairy goats is limited (Morand-Fehr *et al.*, 1984), and there is no information on their influence on the CLA and TVA contents in milk. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of including soybean oil (SBO) in the concentrate of dairy goats on milking performance and milk fatty acids profile, with special attention in CLA and TVA contents in milk.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals, feeding, and experimental design*

Twenty-four Murciano-Granadina goats (10 primiparous and 14 multiparous) from the herd of the Universitat Autònoma de Barcelona (**UAB**) were used in a milking trial in the first third of lactation. The experiment was approved by the ethical committee of human and animal experimentation of the UAB and was performed from week 3 to 11 of lactation.

After parturition, the kids were separated from their mothers within the first 8h after birth, and then were reared artificially with milk substitutes. After 21±7 DIM, the goats (40.5±5 kg BW) were divided into two groups according to parity, BW and daily milk yield recorded at weeks 2 and 3. The study was conducted according to a 2x2 cross over design with 2 periods of 28 days each (14 for adaptation and 14 for sampling and data registration). During the experiment, each group of goats was kept in a separate pen with food and fresh water permanently available. In period 1, each group was randomly assigned to one of the two dietary treatments: control (**C**) or soybean oil (**SBO**, 6% as fed in the concentrate), the treatments being

switched in period 2. With the SBO diet, the oil was incorporated in the concentrate during manufacturing. Concentrates and final diets were formulated to be isonitrogenous, but with different levels of EE and total FA (Tables 2 and 3). Goats received a basal diet of dehydrated fescue (ad libitum) and 0.5 kg of alfalfa pellets offered twice daily (09.30 and 17.30) in the pen feeder provided with a feeder lock. In addition, 1 kg/d of experimental concentrates (Tables 1 and 2) were offered in the individual milking parlor feeders in two equal portions at 09.00 and 17.00.

Animals were milked once daily (09.00) in a double 12 stall parallel milking parlor (Westfalia Landtechnik, Granollers, Spain) with recording jars and down milk pipeline. Milking was conducted at a vacuum pressure of 42 KPa, a pulsation rate of 90 pulses/min, and a pulsation ratio of 66%. The milking routine included machine milking with machine stripping before cluster removal and teat dipping.

### ***Measurement, sampling and analysis***

Voluntary feed intake was registered throughout the experiment, but only sampling period data (last 14 days) was considered. Group DMI was calculated as the difference between the total amounts of DM offered and the amount refused daily with an accuracy of 10g. Daily samples of diet ingredients and orts were collected and composited by period throughout the experiment. Feed and ort samples were ground through a 1 mm stainless steel screen and were analyzed for DM and OM (AOAC, 1990). CP was determined according to the Kjeldahl method (AOAC, 1990) using a Kjeltec Auto 1030 Analyzer (Tecator, Hogänäs, Sweden). NDF and ADF were determined (Van Soest *et al.*, 1991) sequentially using the ANKOM system (ANKOM Technology, Fairport, NY) with a thermostable  $\alpha$ -amylase and sodium sulphite in the specific case of NDF, and corrected for ash. The analysis of FA content of feeds was performed according to Sukhija and Palmquist (1988), using nonadecanoic acid as an intern standard. Milk yield was registered on days 1, 3, 5, 8 and 10 of each sampling period, and individual milk samples were collected during each milk yield registration. Milk samples were preserved in 100 ml pots containing 2 tablets of Bronopol (BroadSpectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., California, USA) as a conserving product. Samples were refrigerated at 4° C before being analyzed for TS, fat, CP (N x 6.38), true protein, and casein. Analysis was performed using a near-infrared spectroscopy analyzer (Technicon InfraAlyzer-450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany) according to Albanell *et al.* (1999). Calibration was checked using the AOAC (1990)

reference methods. On days 1, 3, 5, 8 and 10 of each sampling period, two additional milk samples were taken for each experimental period to analyze their FA profile. In this case, milk was immediately cooled and the fat fraction was separated by centrifugation for 30 min at 6000  $\times g$  and 4°C, and then stored at -20°C. Milk FA were analyzed after extraction of milk fat samples and methylation (Palmquist and Jenkins, 2003) to avoid migration of conjugated double bonds of unsaturated FA. Briefly, milk fat samples (60 to 70 mg) were dissolved in 1 ml of benzene, and an alkaline transesterification was completed using 2 ml of 0.5 M sodium methoxide in methanol (10 min at 50 °C). A second methylation with 3 ml of 100 ml/L methanolic HCl (10 min at 80 °C) followed. After addition of 1 ml of heptane and 7.5 ml of 60 g/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and centrifugation, the top solvent layers were transferred to a tube, 1 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added, and the samples were centrifuged at 6000  $\times g$  and 4°C. The clear layers containing the FA methyl esters were transferred to 1 ml auto sampler vials and stored at -20°C until analysis. The clear layers containing the FA methyl esters (**FAME**) were transferred to 1 ml auto sampler vials and stored at -20°C until analysis. Separation and quantification of the FAME was carried out using a gas chromatograph (HP 6890, N. Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with flame ionization detector and capillary column (CP-Sil-88; 100 m x 0.25 mm i.d. with 0.20-μm of capillary thickness; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The initial temperature of 70°C (for 1 min) was increased to 225°C (for 15 min) at a rate of 1°C/min. Individual FA were identified by comparison of retention times using those of pure standards (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) and expressed as percentages of the total FA detected as FAME. In the particular cases of CLA and Vaccenic Acid identification, 2 patrons were used for each, respectively the *cis*-9, *trans*-11 and the *trans*-10, *cis*-12 isomers of CLA (Matreya Inc., State College, PA, USA) and the *cis*-11 C18:1 and the *trans*-11 C18:1 of vaccenic acid (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA).

Individual goat BW (0.1 kg accuracy) and BCS of each animal were recorded at the start and the end of each experimental period of the trial. The BCS was measured by palpating lumbar and caudal regions on a 0 to 5 scale to the nearest 0.25 according to Hervieu *et al.* (1991).

### **Statistical analysis**

Individual data for BW, BCS, milk yield and composition, and group data for DMI were analyzed using the PROC MIXED procedure with repeated measures of SAS (SAS v. 8.2; SAS Inst., Inc., Cary, NC) using Tukey's multiple comparison test. The statistical model contained the

fixed effects of treatments, experimental period and the treatment sequence, the random effects of the animal and the residual error. Differences were declared significant at  $P<0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Some differences ( $P<0.05$ ) were observed between primiparous and multiparous results in the case of milk yield, crude protein content, BW, BCS, and some FA such as palmitic, stearic, oleic and linoleic acids. However, this effect did not have any significant interaction with the investigated treatments. Therefore, only main effects will be exposed and discussed.

### ***Feed intake and nutritive value of final diets***

As expected, both SBO and C concentrates (20.6% CP) and diets (17.4% CP) were isonitrogenous, and had very similar contents of DM, OM, NDF and ADF (Tables 2 and 3). As a direct consequence of the oil incorporation, the SBO concentrate contained a higher EE (4.6% vs. 10.2%), total FA (3.6% vs. 9.1%), and NE<sub>L</sub> content (1.44 vs. 1.55 Mcal/kg) than the control.

Feeding SBO did not modify the daily DM intake (2.13 kg/d) of dairy goats, but, as a consequence of increased NE<sub>L</sub> content of diets, SBO supplemented goats had an average supplementary EN<sub>L</sub> intake of 0.22 Mcal per goat and day. According to the observed intake of diet ingredients, we calculated that the final SBO diet contained a 2.5% of SBO (DM basis) and a higher total FA content than the control (2.2 vs. 4.6%). Despite these changes in the diet composition, feeding SBO did not change the DMI, in agreement with the results described by Jenkins and Fotouhi (1990) when feeding a similar dose (2.4%) of corn oil to wethers. However, there are other studies such as those of Heinrich *et al.* (1982), feeding cows with a high fat grain mixture, or Kitessa *et al.* (2001), feeding goats with fish oil, which indicate a DMI depression because of fat supplementation. In general, DMI is usually affected in the case of high levels of fat or strong flavor sources such as fish oil. In our case, the moderated SBO level (2.5% of total DM diet) and the high NDF content of the diets could explain the neutral effect of SBO diet on DMI.

### ***BW and BCS***

The evolution of both BW and BCS (Table 4) was positive throughout the experimental periods of the study, indicating that animals were, on average, under a positive energetic balance.

BW and BCS were not changed by SBO treatment in spite of the higher NE<sub>L</sub> content for the SBO diet. Data relating the effects of lipid supplementation on goat BW changes during early lactation is limited, and responses are usually variable and not constant. In fact, BW gain was either higher than in our experiment when using calcium salts of FA (Baldi *et al.*, 1992), unchanged with vegetal sources (Chilliard *et al.*, 2003) while BW loses were observed with animal fat (Gelaye and Amoah, 1988).

In dairy ewes, a BW increase was described by Casals *et al.* (1999) as a response to calcium soaps supplementation. In dairy cows, a BW depression was described by Chilliard (1993) in the case of feeding unsaturated fat, although it depends on the lactation stage. Regarding BCS, few data is available on this parameter in fat supplementation studies with dairy goat.

### **Dairy performance**

Milk yield and composition data is listed in Table 5. Milk yield, ECM and ECM per DMI are expressed in kg after the application of an average of milk density value corresponding to each treatment. The supplementation with SBO did not modify milk yield (1.87 kg/d), ECM (2.03 kg/d) and milk conversion rate (ECM per kg of DMI; 0.86). Contrary to the observed in dairy cows where milk yield is usually increased when fed fat supplements at mid or even late lactation (Chilliard *et al.*, 2001; DePeters and Cant, 1992), goats did not increase milk yield, whereas milk fat content increased by 10%. According to other studies carried out in dairy goats, supplementation of diet with lipids did not modify milk yield (Teh *et al.*, 1994; Mir *et al.*, 1999).

As a consequence of SBO supplementation, milk fat content (4.57% vs. 5.24%;  $P<0.001$ ) and yield (86 vs. 95 g/d;  $P<0.05$ ) increased (Table 5). The improvement of fat content in milk as a response to lipids supplementation agrees with the results of Morand-fehr *et al.* (1987) using fat prills with goats at early-lactation. The response obtained was higher than with dairy cattle (Chilliard *et al.*, 2001) and lower than with dairy sheep (Bouattour *et al.*, 2005). This positive effect of SBO on milk fat content could be useful in order to solve the technological problems of the goat cheese industry linked to the low milk fat syndrome, when fat content falls below protein content. This problem is frequent when diets are poor in fiber or rich in non fiber carbohydrates, which could be partially replaced by an oil supplement in order to increase the milk fat content.

The response of milk fat secretion is usually higher during early-lactation because *de novo* lipogenesis is usually more active after the lactation peak than before it. After the lactation peak, dietary FA would be probably more partitioned to the adipose tissue (Chilliard *et al.*, 2003).

Milk CP (3.38%) and yield (62 g/d), as well as true protein content (2.88%) and yield (53.5 g/d) remained without changes; however SBO treatment decreased ( $P<0.001$ ) casein content and yield, as well as the casein/CP and casein/true protein ratios (Table 5).

Milk protein content is usually reduced by fat supplements when these are fed to dairy cows (Palmquist and Jenkins, 1980, De Peters *et al.*, 1987) or dairy ewes (Casals *et al.*, 1999; Bouattour *et al.*, 2005), and this reduction of milk CP may alter coagulation properties of the transformed milk. In contrast with dairy cows and ewes, this negative effect of dietary fat on milk protein content seems to be unusual in dairy goats (Baldi *et al.*, 1992; Shmidely and Sauvant, 2001; Chilliard *et al.* 2006), as observed in the present study. However, in our case it is difficult to explain the reduction of casein content and casein/protein ratio without modification of milk true protein content. The reduction of milk casein content agrees with data reported by DePeters and Cant (1992) in dairy cows, but disagrees with the results of Chiofalo *et al.* (2004) who fed olive cake to dairy ewes and did not observe any change in milk casein content. Total solids content was increased by the SBO treatment, probably as a consequence of the observed fat content increase and the stable levels of milk yield and protein content.

### ***Milk fatty acids***

Data of milk FA content is listed in Table 6. SBO treatment decreased ( $P<0.001$ ) short chain FA (SCFA) and medium chain FA (MCFA) and increased ( $P<0.001$ ) long chain FA (LCFA). Moreover, the addition of SBO decreased ( $P<0.001$ ) the saturated FA and increased ( $P<0.001$ ) the unsaturated FA concentrations and the mono unsaturated FA (MUFA; 21.8 vs. 29.3%) and polyunsaturated FA (PUFA; 3.73 vs. 4.15%) concentrations. Milk contents of stearic, oleic and linoleic FA were increased, while linolenic was decreased by SBO.

Most of the FA originated from the mammary *de novo* synthesis are saturated (C10 to C16), and LCFA usually inhibit strongly the *de novo* synthesis (Chilliard *et al.*, 2003). This effect is higher when LCFA are more unsaturated, as in the case of the supplement (SBO) used in the present study. The FA profile of the soybean oil was basically characterized by a high concentration of linoleic acid (54% of total FA), a relatively high content of oleic acid (22%), and

lower levels of C18:3 and C18:0. As a consequence, intakes of all C18 FA were higher in the SBO diet than in the control (Table 3). These differences in the FA composition of the diets may explain the increase of C18:2 content in milk from SBO treatment. Nevertheless, this increase of linoleic acid content was relatively low (14%), while linolenic acid content was even decreased in the milk of goats receiving SBO, probably because of the ruminal biohydrogenation of these unsaturated FA. Opposite responses of linoleic and linolenic acids have been observed with different C18:2 or C18:3 supplements, illustrating that the different PUFA are not secreted independently from each other (Chilliard *et al.*, 2006). In accordance with changes observed in linoleic and linolenic acids, the ratio n-6/n-3 was increased from 4.69 to 6.12 in the SBO group. According to the World Health Organization, the n-6/n-3 range recommended for human health is between 5:1 and 10:1.

The increases of stearic and oleic acids may be in part a consequence of higher intakes of these FA in the SBO diet, but also a result of the biohydrogenation process of unsaturated C18 FA in the rumen. Oleic acid can also be increased by action of mammary  $\Delta^9$  desaturase on stearic acid. In addition, the important increase observed in stearic acid content of milk from the SBO treatment could be related with the higher level of milk fat observed in this treatment. As has been pointed out by Chilliard *et al* (2006), stearic acid is a major regulating factor of mammary lipid secretion in goats and positively correlated with milk fat content in that species.

The level of *cis*-9, *trans*-11 CLA (rumenic acid) in the milk of goats fed SBO was almost 3 times superior to the control (0.68 vs. 2.03% of total FAME). In contrast, the *trans*-10, *cis*-12 CLA was not detected in the milk fat samples. Similarly, Chilliard *et al.* (2006) indicated that this isomer always remained at trace levels in goat milk. Rumenic acid is synthesized in the rumen during the biohydrogenation of linoleic acid, but it can also be obtained in the mammary gland by the desaturation action of the  $\Delta^9$  desaturase on TVA, another intermediate product of that process.

The milk TVA content was increased by the SBO supplementation (2.04 vs. 6.41%;  $P < 0.001$ ), and the ratio TVA/CLA remained unchanged, showing that TVA and CLA evolved in the same way (Table 6). This would indicate that the  $\Delta^9$  desaturase way was relevant in the milk CLA biosynthesis. There is generally a wide linear correlation between rumenic acid and TVA levels in milk under a large variety of diets, either in dairy goats (Chilliard *et al.*, 2003; Nudda *et al.*, 2005) or in cows (Griinari and Bauman, 1999; 2003).

In this study, the level of CLA in milk from control goats (0.68% of total FAME) was in the range of normal values observed for goats receiving non fat supplemented diets (Chilliard *et al.*, 2006). In contrast, CLA (RA) in milk from goats fed SBO (2.03% of total FAME) was very close to the level described by Chilliard *et al.* (2005 and 2006) using sunflower oil. The same authors (Chilliard *et al.*, 2006) indicated a considerable increase of RA content (from 0.3 to 5.1%) in goat milk with combinations of five different forages and with or without some oil addition. Similar levels of CLA to those obtained in the present study with SBO have been observed in dairy ewes (Bouattour *et al.*, 2005) after SBO supplementation, and in dairy cows fed either fresh pasture (Dhiman *et al.*, 1999) or Ca soaps of SBO (Chouinard *et al.*, 2001).

According to Chilliard *et al.* (2006), data in dairy cattle suggest that responses in terms of RA and TVA to lipid supplementation could be transient, with maximum values during the first 2 weeks after the beginning of supplementation, and a decrease after 3 weeks. In goats, however, the same authors observed that the CLA response reached its maximum level 2 weeks after the beginning of supplementation and remained relatively high even after 10 weeks of lipid feeding. This indicates that goats are very good responders to unsaturated fat supplements and that the enhanced RA level persists for at least 2 months. These aspects can be especially important if goats have been genetically improved for genotype with high alpha-s1 casein. As shown by Chilliard *et al.* (2006), goats in the high alpha-s1 casein genotype group usually have a lower content of CLA in milk than those with low alpha-s1. Under these circumstances, feeding an unsaturated source of vegetal oil as SBO can help to increase the CLA content of milk when goats are or have been genetically improved for a high alpha-s1 genotype.

Desaturase indexes were not modified for palmitic, oleic and CLA, but decreased ( $P < 0.05$ ) for miristic acid when SBO was fed. This decrease could be a consequence of the increase observed in PUFA. The  $\Delta^9$  desaturase indexes are generally lower in goat milk than in cow milk for MCFA but not for C18 FA, which could suggest a possible species-dependence on the  $\Delta^9$  desaturase activity according to the chain length (Chilliard *et al.*, 2006).

Atherogenicity index was reduced ( $P < 0.001$ ; Table 6) because of SBO supplementation. Traditionally, this index (Ulbricht and Southgate, 1991) was considered an indicator of dietary saturated FA risk factor of coronary disease. However, as discussed by Bauman and Lock (2006) and Chilliard *et al.* (2006), the findings of several authors (Mensink *et al.*, 2003; Knopp and Retzlaff, 2004) indicate that there is little evidence of atherogenic effect of C12, C14 and C16

saturated FA, and that saturated fat could even be protective when compared to a low fat, high carbohydrate diet. Therefore, this index, improved in the SBO diet, could be considered of interest in terms of human health only in cases where there is an excessive fat consumption.

Therefore, the increase of unsaturated FA and CLA content and the decrease of the atherogenicity index confirm the positive effect of SBO addition on milk quality and consumer health.

## CONCLUSIONS

In dairy goats, feeding with a relatively high forage diet including a reasonable dose of soybean oil allowed the production of enriched fat, CLA and TVA milk, without negative effects on DMI, milk yield, and milk protein content, but with a negative effect on milk casein content and yield. This could be a valuable tool for farmers of dairy goats under intensive feeding systems in order to produce enriched MUFA, PUFA, CLA and TVA milk and dairy products, which are considered healthier for human consumers.

## REFERENCES

- Albanell, E., P. Cáceres, G. Caja, E. Molina, and A. Gargouri. 1999. Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by Near-Infrared Spectroscopy. *J. AOAC Internat.* 82:753-758.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis*. Vol I, 15th Ed. AOAC, Arlington, VA.
- Baldi, A., F. Cheli, C. Corino, V. DellOrto, and F. Polidori. 1992. Effect of feeding calcium salts of long chain fatty acids on milk yield, milk composition and plasma parameters of lactating goats. *Small Rum. Res.* 6:303-310.
- Bauman, D. M. Barbano, M. J. Charron, J. R. Zierath, and K. L. Houseknecht. 2001. Isomerspecific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. *Diabetes* 50:1149–1157.
- Bauman, D.E., B. Corl, L. Baumgard, and J. Grinari. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 221–250.
- Bauman, D. E., and A. L. Lock. 2006. Concepts in Lipid Digestion and Metabolism in Dairy Cows. Pages 1-14 in Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference. Fort Wayne, Indiana.

- Bernard, L., J. Rouel, C. Leroux, A. Ferlay, Y. Faulconnier, P. Legrand, and Y. Chilliard. 2005. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in Alpine goats fed vegetable lipids. *J. Dairy Sci.* 88:1478-1489.
- Bouattour, M. A., R. Casals, E. Albanell, E. González, X. Such, and G. Caja. 2005. Effects of fibrolytic enzymes and soybean oil on dairy sheep performances and nutrients digestibility. *J. Dairy Sci.* Vol. 88 (Suppl. 1):308 (Abstr.).
- Casals, R., G. Caja, X. Such, C. Torre, and S. Calsamiglia. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 66:177-191.
- Chilliard, Y. 1993. Dietary Fat and Adipose Tissue Metabolism in Ruminants, Pigs and Rodents: A Review. *J. Dairy Sci.* 76:3897-3931
- Chilliard, Y., A. Ferlay, M. and Doreau. 2001. Review: Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Prod. Sci.* 70:31–48.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751–1770.
- Chilliard, Y., J. Rouel, A. Ferlay, L. Bernard, P. Gaborit, K. Raynal-Ljutovac and A. Lauret. 2005. Effects of type of forage and lipid supplementation on goat milk fatty acids and sensorial properties of cheeses. Special Issue of the International Dairy Federation 0501/Part5. Future of the Sheep and Goats Dairy Sectors. 297-304.
- Chilliard, Y., J. Rouel, A. Ferlay, L. Bernard, P. Gaborit, K. Raynal-Ljutovac, A. Lauret and C. Leroux. 2006. Optimising goat milk and cheese fatty acid composition. Pages 281-232 in: Improving the fat content of foods. C. Williams and J. Buttriss (ed.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK.
- Chiofalo, B., L. Liotta, A. Zumbo, and V. Chiofalo. 2004. Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Rum. Res.* 55:169–176.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, Y. Chilliard, J. K. Drackley, and D. E. Bauman. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84:680-690.

- DePeters, E. J., and J. P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75 (8):2043-2070.
- DePeters, E. J., S. J. Taylor, C. M. Finley, and T. R. Famula. 1987. Dietary fat and nitrogen of milk from lactating cows. *J. Dairy Sci.* 70:1192-1204.
- Dhiman, T. R., L. D. Satter, M. W. Pariza, M. P. Galli, K. Albright, and M. X. 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.
- Dhiman, T. R., G. R. Anand, L. D. Satter, and M. W. Pariza. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* 82:2146-2156.
- Gelaye, S., and E. A. Amoah. 1988. Energy requirement of lactating goats. *J. Anim. Sci.* 66 (Suppl. 1):39-40 (Abstr.).
- Griinari, J. M. and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Pages 180-200 in: Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 1. (M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza and G. J. Nelson, eds.). AOCS Press, Champaign, IL.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130:2285-2291.
- Griinari, J.M. and D.E. Bauman. 2003. Update on theories of diet-induced milk fat depression and potential applications. Pages 115-156 in: Recent Advances in Animal Nutr. (Eds. P.C. Garnsworthy and J. Wiseman) Nottingham University Press, Nottingham UK .
- Heinrich, A. J., D. L. Palmquist, and H. R. Conrad, H. R. 1982. Feed intake patterns of cows fed high fat grain mixtures. *J. Dairy Sci.* 65:1325.
- Hervieu, J., P. Morand-Fehr, Ph. Schmidely, V. Fedele, and R. Delfa. 1991. Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternales, lombaires et caudales utilisées pour estimer l'état corporel des chèvres laitières. Options méditerranéennes. Série Séminaires. 13:43-56.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. J. Thompson, D. Barbano, and D. E. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129:2135-2142.

- Jahreis, G., J. Kraft, F. Tischendorf, F. Schone, and C. von Loeffelholz. 2000. Conjugated linoleic acids: physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102:695–703.
- Jenkins, T. C., and N. Fotouhi. 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Anim. Sci.* 68:460-466.
- Kay, J. K., W. J. Weber, C. E. Moore, D. E. Bauman, L. B. Hansen, H. Chester-Jones, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2005. Effects of Week of Lactation and Genetic Selection for Milk Yield on Milk Fatty Acid Composition in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 88:3886-3893.
- Kelsey J. A., B. A. Corl, R. J. Collier, and D. E. 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.
- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. II. Transfer of fish oil fatty acids into goats milk. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 89:201–208.
- Knopp, R. H., and B. M. Retzlaff. 2004. Saturated fat prevents coronary artery disease? An American paradox. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1102-1103.
- Kramer, J. K. G., V. Fellner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, and Yurawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids.* 32:1219-1228.
- Kramer, J. K. G., C. Cruz Hernandez and M. E. R. Dugan. 2006. *Trans*-PUFA isomers, analytical aspects, occurrence in plant and animal lipids. Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Federation of Lipids Congress. 34 (Abstr.).
- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206.
- McGuire, M. A., and M. K. McGuire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg.* 1999. Online. Available: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf>.
- Mensink R. P., P. L. Zock, A. D. M. Kester, and Katan M. B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and alipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1146–55.

- Mir, Z., L. A. Goonewardene, E. Okine, S. Jaegar, and H.D. Scheer. 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Rum. Res.* 33:137-143.
- Morand-Fehr, P., D. Sauvant, and P. Bas. 1984. Utilisation des matières grasses chez les ruminants. Expériences sur chèvres laitières. Pages D1–D21 in CAAAA: Peut-on et comment utiliser les matières grasses dans les rations des vaches laitières, Nov. 8, ADEPRINA, Paris. France.
- Morand-Fehr, P., P. Bas, and D. Sauvant. 1987. Influence de la nature et de la quantité de lipides ajoutés à la ration sur la sécrétion de lait et de matière grasse chez la chèvre. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 27:309–310.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th. rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- Nudda, A, M. A. McGuire, G. Battaccone, and G. Pulina. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and Ricotta. *J. Dairy Sci.* 88:1311–1319.
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81:3250-3254.
- Palmquist D. L., and T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.
- Palmquist, D.L. and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81:3250–3254.
- Pariza, M. W., Y. Park, and M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40:283–298.
- Park, Y., J. M. Storkson, , K. J. Albright, , W. Liu, and M. W. Pariza,. 1999. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipid* 34:235–241.
- Ryder, J. W., C. P. Portocarrero, X. M. Song, L. Cui, M. Yu, T. Combatsiaris, D. Galuska, D. E. Bauman, D. M. Barbano, M. J. Charron, J. R. Zierath, and K. L. Houseknecht. 2001. Isomerspecific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. *Diabetes* 50:1149–1157.
- Schmidely, P, and D. Sauvant. 2001. Taux butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliment concentré. In French with English abstract. *INRA Prod. Anim.* 14 (5):337-354.

- Sukhija, P. S., and D. L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202-1206.
- Teh, T. H., L. T. Trung, Z. H. Jia, and T. A. Gipson. 1994. Varying amounts of rumen-inert fat for high producing goats in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77:253-258.
- Ulbricht, T. L. V., and D. A. T. Southgate. 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* 338:985-992.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

**Table 1.** Ingredients of the experimental concentrates containing or not soybean oil (SBO).

Ingredients, % as fed	Concentrate <sup>1</sup>	
	Control	SBO
Ground corn	38.47	38.47
Ground barley	28.09	19.50
Soybean meal-44%	28.09	30.68
Soybean oil	---	6.00
Bicalcium phosphate	0.93	0.93
Calcium carbonate	1.31	1.31
Magnesium oxide	0.37	0.37
Sodium bicarbonate	0.94	0.94
Mineral and Vitamin <sup>1</sup>	1.80	1.80

<sup>1</sup> Mineral and vitamins complement, containing: Copper (800 mg/kg), Manganese (5000 mg/kg), Zinc (4000 mg/kg), Vitamin A (750000 UI/kg), Vitamin D (150000 UI/kg), Vitamin E (5000 UI/kg) and Sepiolite as excipient.

**Table 2.** Chemical composition and nutritional value of forages, experimental concentrates and consumed diets (DM basis) of dairy goats, containing or not soybean oil (SBO).

	Dehydrated Fescue	Alfalfa pellets	Concentrate		Diet	
			Control	SBO	Control	SBO
DM, % as fed	90.76	90.92	89.18	90.29	90.14	90.60
Ash, %	11.37	12.83	8.53	8.96	10.59	10.75
CP, %	13.55	16.44	20.54	20.77	17.32	17.45
EE, %	2.49	1.88	4.58	10.25	3.18	5.62
Total FA, %	1.30	1.20	3.60	9.10	2.23	4.59
NDF, %	58.99	47.31	13.46	11.39	36.52	35.36
ADF, %	31.11	33.42	5.45	4.68	21.02	20.51
NE <sub>L</sub> <sup>1</sup> , Mcal/kg DM	1.17	1.14	1.84	2.1	1.44	1.55

<sup>1</sup> Net Energy for Lactation (Mcal/ kg DM; NRC, 2001).

**Table 3.** Fatty acids (FA) content (% of total FA) of forages, soybean oil (SBO), experimental concentrates and diets consumed by dairy goats.

Fatty acids	Fescue	Alfalfa	SBO	Concentrate		Diet		FA intake (g/d)	
				Control	SBO	Control	SBO	Control	SBO
C16:0	28.5	27.4	0.0	17.5	13.7	23.7	21.9	2	4.4
C18:0	4.2	6.2	10.99	3	3.6	4.24	4.52	7.4	14.7
C18:1	7.9	9.5	0.0	25	23.6	15.5	15.1	16.1	34.2
C18:2	17.6	26.4	3.81	50.4	52.7	33.9	35.1	9.4	19.9
C18:3	37.3	26.1	23.82	3.2	5.2	19.7	20.3	0.7	1.3
C20:0	1.9	2.1	53.81	0.5	0.4	1.37	1.32	0.0	0.1
C20:1	0.0	0.0	6.43	0.0	0.3	0.0	0.13	0.8	1.6
C22:0	2.6	2.3	1.14	0.4	0.5	1.59	1.63	47.6	97.4
Total FA (% DM)	1.30	1.20	94.4	3.60	9.10	2.23	4.59		

**Table 4.** Effects of feeding soybean oil (SBO) on body weight and body condition score in dairy goats.

	Treatments		SEM	Effect ( <i>P</i> <)
	Control	SBO		
BW, kg	40.62	40.44	1.037	NS
Variation of BW <sup>1</sup> , kg	0.63	0.38	0.253	NS
BCS <sup>2</sup>	2.70	2.67	0.074	NS
Variation of BCS <sup>3</sup>	0.07	0.04	0.067	NS

<sup>1</sup>Difference between BW at the beginning and the end of each experimental period.

<sup>2</sup>Body Condition Score (scale of 0 to 5 to the nearest 0.25) according to Hervieu *et al.* (1991).

<sup>3</sup>Difference between BCS at the beginning and the end of each experimental period.

**Table 5.** Effects of feeding soybean oil (SBO) on DMI, and milk yield and composition of dairy goats.

	Treatments		SEM	Effect ( $P <$ ) <sup>1</sup>
	C	SBO		
DMI, kg/d	2.13	2.12	0.009	NS
Milk yield, kg/d	1.90	1.85	0.071	NS
ECM, kg/d	2.03	2.15	0.071	NS
ECM/DMI, kg/kg	0.95	1.01	0.033	NS
Fat, %	4.57	5.24	0.083	***
Fat, g/d	85.63	94.99	3.216	*
CP, %	3.37	3.38	0.043	NS
CP, g/d	63.32	61.8	2.203	NS
True protein, %	2.88	2.88	0.049	NS
True protein, g/d	54.1	52.8	0.193	NS
Casein, %	2.48	2.34	0.048	***
Casein, g/d	46.7	42.7	0.176	*
Casein, % of CP	73.4	68.6	0.725	***
Casein, % of true protein	86.6	81.2	0.483	***
TS, %	12.86	13.44	0.109	***
TS, g/d	244,3	248,6	8.15	***

<sup>1</sup> Effect: \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Table 6.** Effects of soybean oil (SBO) supplementation on fatty acids (FA) composition of dairy goat milk (% of total FAME<sup>1</sup>)

	Treatments		SEM	Effect (P>) <sup>2</sup>
	C	SBO		
C10:0	10.83	8.97	0.251	***
C12:0	6.37	4.37	0.147	***
C14:0	11.28	8.66	0.179	***
C14:1	0.22	0.13	0.017	***
C15:0	0.97	0.79	0.022	***
C16:0	27.46	22.57	0.410	***
C16:1	0.64	0.50	0.023	***
C17:0	0.65	0.56	0.013	***
C17:1	0.22	0.12	0.017	***
C18:0	9.09	12.41	0.348	***
<i>trans</i> -9 C18:1	0.18	0.74	0.045	***
<i>trans</i> -11 C18:1 (TVA)	2.04	6.41	0.267	***
<i>cis</i> -9 C18:1	17.82	19.56	0.346	***
<i>cis</i> -11C18:1	0.56	0.80	0.016	***
<i>trans</i> -10, <i>trans</i> -12 C18:2	0.31	0.42	0.016	***
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C18:2	2.91	3.32	0.097	**
<i>Cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2 (CLA)	0.68	2.03	0.041	***
C18:3	0.69	0.62	0.024	***
C20:0	0.26	0.29	0.005	***
n-6 / n-3	4.69	6.12	0.157	***
SCFA	16.90	14.91	0.381	**
MCFA	47.04	37.09	0.591	***
LCFA	35.10	46.94	0.764	***
Saturated FA	73.07	64.68	6.536	***
Unsaturated FA	24.24	28.27	0.417	***
MUFA	19.63	27.87	0.369	***
PUFA	4.60	6.40	0.116	***
TVA / CLA	2.99	3.17	0.183	NS
Atherogenicity index <sup>3</sup>	3.29	2.20	0.077	***
Δ-9Desaturase ratios <sup>4</sup>				
C14	0.017	0.014	0.001	*
C16	0.023	0.021	0.001	NS
C18	0.69	0.69	0.006	NS
CLA	0.26	0.25	0.015	NS

<sup>1</sup> Fatty Acids Methyl Esters.<sup>2</sup> Effect: \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.<sup>3</sup> Calculated according to Ulbricht and Southgate (1991) as: (C12 + 4 x C14 + C16) / (sum of unsaturated FA).<sup>4</sup> Calculated for each pair of FA according to Kelsey *et al.* (2003) as: (product of Δ-9 desaturase) / (product of Δ-9 desaturase + substrate of Δ-9 desaturase); ie: C14: C14:1/ (C14:1 + C14:0).

<sup>5</sup> Calculated according to Kay *et al.* (2005) from (C14:1 + C16:1 + *cis*-9 C18:1 + *cis*-9, *trans*-11 CLA) / (C14:0 + C16:0 + 18:0 + *trans*-11 C18:1 + C14:1 + C16:1 + *cis*-9 C18:1 + *cis*-9, *trans*-11 CLA).

---

---

***VIII. Discusión General***

---

---

Esta tesis doctoral, cuyo desarrollo se ha realizado en el marco del proyecto CICYT AGL2001-2617, es la continuación de una de las líneas de investigación del *Grup de Recerca en Remugants* de la UAB y de anteriores trabajos como los de Casals *et al.* (1992, 1999; 2006), Osuna *et al.* (1998; 2000) y de Pol *et al.* (2001; 2003), cuyo objetivo común era estudiar las modificaciones del rendimiento productivo y de la composición de la leche de ovejas lecheras mediante la utilización de suplementos lípidicos de origen vegetal. Si bien en los cuatro capítulos experimentales de que se compone, ya se han analizado y discutido de forma individual los resultados obtenidos, antes de entrar en las conclusiones finales se intentará en el presente apartado integrar brevemente de forma resumida y concisa los principales resultados obtenidos, así como las posibles relaciones entre ellos.

La primera parte de la tesis está formada por dos trabajos experimentales en que básicamente se estudia el efecto de la suplementación con semillas oleaginosas sobre el contenido del ácido linoleico conjugado (CLA) en la leche. En el primero se compararon los efectos de la inclusión de semillas de lino o de su aceite en las raciones de ovino lechero, y en la segunda se valoró la utilización de semillas de cártamo. Esta parte fue diseñada como continuación de los trabajos de Pol *et al.* (2001; 2003) en que se habían valorado los efectos de la utilización de semillas enteras de lino (rica en ácido linolénico, del tipo n-3), en comparación con raciones control de bajo contenido en grasa, sobre la producción y calidad de la leche. En el caso de la presente tesis, nuestros objetivos fueron comparar entre si los efectos de las semillas con los del aceite de linaza, además de valorarlos en relación a una ración control isograsa e isoenergética, debido a la inclusión en la misma de jabones cárnicos de aceite de palma (ricos en C16:0 y en C18:1). Las principales conclusiones de este trabajo fueron que la utilización tanto de semillas enteras como de aceite de lino mejoró la calidad de la leche desde el punto de vista dietético, incrementando de forma general la grasa insaturada y los ácidos grasos de cadena larga. El aceite de lino fue más eficiente para incrementar la concentración de algunos ácidos grasos con importantes efectos beneficiosos sobre la salud humana como son el ácido linolénico, el ruménico, principal isómero del CLA, y el ácido *trans* vaccénico (TVA, Figura 12), su principal precursor a través de la biosíntesis mamaria. Estos últimos se consideran nutrientes funcionales y son objeto de demanda creciente por parte de determinados consumidores especialmente sensibilizados por los temas relativos a la salud humana. Si bien el contenido en CLA

(ácido ruménico) fue también incrementado con respecto al control por las semillas enteras de lino, el aumento fue mucho menor que con el aceite (Figura 13). La diferencia en los niveles de CLA obtenidos entre tratamientos se justificaría básicamente por un distinto nivel y/o ritmo de biohidrogenación ruminal de los suplementos utilizados, que sería más marcado en el aceite que en la semilla, y mucho menos en el jabón cálcico. Este último, además de ser relativamente monoinsaturado tiene un grado de protección ruminal elevado en raciones con un porcentaje relativamente alto de forraje (más del 50%) como en este caso. Debido probablemente al menor grado de biohidrogenación sufrido en el rumen por los ácidos grasos insaturados, las semilla de lino fue más útil para incrementar la concentración de ácido  $\alpha$ -linolénico (del tipo n-3) en leche, considerado un AG esencial que en muchos casos está en proporciones por debajo de lo deseable en la dieta humana occidental.

Dada la importancia de la industria quesera dentro del sector ovino y caprino lechero, creímos conveniente estudiar que sucedía en el perfil de AG de la leche cuando ésta se procesaba para fabricar un queso curado (60 días). La fabricación de queso alteró poco el perfil de ácidos grasos, obteniéndose quesos cuyas variaciones en el perfil de ácidos grasos reflejaron en gran medida las observadas en la leche, con excepción de los AG de cadena corta que en el queso no se redujeron. En general, los quesos procedentes de ovejas alimentadas con aceite o semilla de lino fueron más insaturados y más ricos en nutrientes funcionales y beneficiosos para la salud que el queso control. De todas formas hay que dejar constancia que en este trabajo no se valoraron otros aspectos, tampoco era el objetivo, como características organolépticas o de conservación del queso. Un punto importante a valorar en futuras experiencias podría ser la susceptibilidad de los quesos a posibles oxidaciones u otras alteraciones derivadas de un mayor porcentaje de AG altamente insaturados.

Tras la comparación de las semillas y el aceite de lino, se planteó la idea de realizar un segundo trabajo experimental con una semilla muy poco estudiada, al menos en ovejas lecheras, como es la de cártamo (*cartamus tinctorius*). Esta semilla proviene de una planta propicia para ser cultivada bajo las condiciones del clima mediterráneo al ser muy resistente al estrés hídrico, a parte de tener un perfil de AG altamente insaturado y con una presencia mayoritaria de ácido linoleico, supuestamente útil para incrementar el nivel de CLA en leche. Como principales resultados, observamos que la

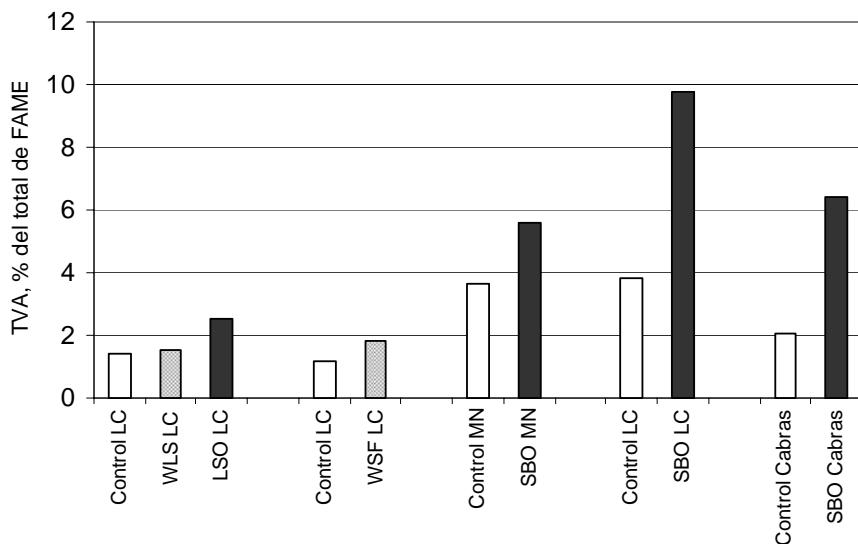
leche de las ovejas que recibieron semillas de cártamo fue más rica en CLA que la del control (Figura 13), con incrementos relativos ligeramente superiores a los obtenidos con las semillas de lino, pero inferiores a los que se habían observado previamente con su aceite. A diferencia de las semillas de lino, las de cártamo incrementaron también la concentración del TVA (Figura 12), un nutriente considerado funcional dado que en el organismo humano puede también ser precursor del propio CLA (Bauman *et al.* 2006). La diferencia observada entre la semilla de lino (rica en n-3) y la de cártamo (rica en n-2) en términos de variación de la concentración de TVA en leche podría tener su origen precisamente en su diferente perfil de ácidos grasos, que implica una sucesión de reacciones químicas también diferente durante el proceso de biohidrogenación. De acuerdo con el esquema general de Chilliard *et al.* (2001), mientras que el ácido linoleico da lugar primero a CLA (en concreto ácido ruménico), y luego se puede seguir hidrogenando a TVA, en el caso de hidrogenación del ácido linolénico, el TVA se obtiene sin pasar previamente por CLA. Si hay una gran acumulación de TVA en el rumen, el siguiente paso del proceso de biohidrogenación suele ser limitante, lo que incrementa el nivel de TVA ruminal y su absorción en el intestino, aumentando su contenido en la glándula mamaria como tal TVA, o desaturándose en parte a CLA.

Otro punto a tener en cuenta es que los resultados en términos de producción de leche fueron peores con la semilla de cártamo que con el control (isograso e isoenergético debido a la inclusión de JC), que era el mismo utilizado previamente con la semilla de lino. Tal como se ha discutido previamente, un aspecto quizás a considerar es la dureza observada en la cáscara de las semillas de cártamo, que podría ser en parte la causa de una menor ingestión de alimento por parte de las ovejas que las consumieron, así como del empeoramiento de los resultados productivos. En cambio, las semillas de lino utilizadas en el experimento anterior mantuvieron alta la ingestión de alimentos en comparación con los tratamientos conteniendo JC o aceite de lino. En futuros trabajos se podría pensar en estudiar el efecto del procesado de las semillas.

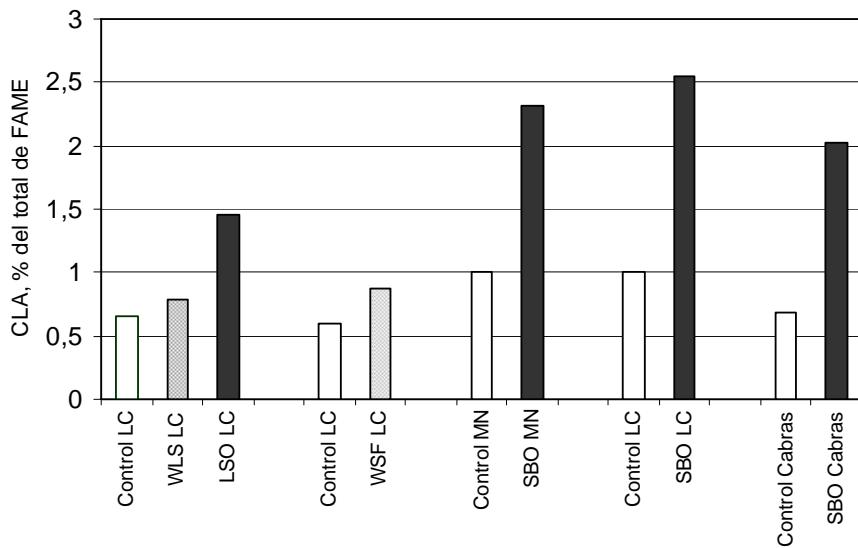
La segunda parte de la presente tesis fue diseñada de manera evolutiva, igual que la primera, y corresponde a los capítulos 3 y 4. En el primero de ellos, diseñado para responder a diferentes objetivos derivados de una bifurcación de líneas de investigación en el marco del Proyecto CICYT citado anteriormente, se estudió la utilización de aceites vegetales y su interacción con enzimas fibrolíticas exógenas,

constando de dos experimentos, uno de digestibilidad *in vivo* y otro de lactación. Además de valorar los efectos del aceite sobre la composición de la leche, uno de los objetivos era intentar incrementar la digestibilidad de los nutrientes mediante el uso de un complejo comercial de enzimas fibrolíticas, y el segundo era ver como actuaba este mismo producto en presencia de una fuente de grasa insaturada, que supuestamente debía tener efectos negativos sobre el funcionamiento de la flora ruminal y por tanto sobre la digestibilidad de la fibra. Las enzimas fibrolíticas mejoran la digestibilidad de la mayoría de nutrientes, especialmente fibrosos, y por tanto la producción de leche. Sin embargo, el efecto positivo de las enzimas sobre la digestibilidad fue neutralizado cuando la misma ración contenía aceite de soja, por lo que la suplementación con enzimas fibrolíticas no fue útil para recuperar la pérdida de digestibilidad causada por el aceite cuando ambos suplementos se utilizaron conjuntamente. Una posible causa podría ser que el aceite recubriera, al menos en parte, las partículas del alimento y dificultara la acción de las enzimas exógenas. De todas formas, esta interacción entre los dos aditivos no se vio reflejada en los resultados de producción y composición de leche, por lo que no es fácil de explicar. De hecho, el aceite de soja no tuvo efectos negativos sobre la digestibilidad cuando fue utilizado con independencia de las enzimas, en parte porque la concentración final de aceite en el concentrado, y por tanto en la ración final, fue inferior a la esperada.

La suplementación con aceite de soja aumentó la producción de leche, muy probablemente a causa del aumento de la densidad energética de la ración, relativamente baja en el control, y de la mejora en la eficiencia de utilización del alimento ingerido. En cuanto al perfil de ácidos grasos de la leche, el aceite de soja mejoró su calidad dietética, incrementando los ácidos grasos insaturados y los de cadena larga y triplicando la concentración de nutrientes funcionales como el CLA y el *trans* vaccénico, en comparación con el control. Cabe destacar que las ovejas de raza Lacaune mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento con aceite de soja y sus respuestas fueron más marcadas que en raza Manchega en cuanto a variaciones en el perfil de ácidos grasos de la leche, particularmente de AG de cadena corta, larga, saturados, mono y poli-insaturados, y TVA. En cambio la respuesta en CLA fue similar entre razas debido a que el grado de desaturación de TVA a CLA en la glándula mamaria fue inferior en Lacaune que en Manchega. Por otra parte es importante destacar que los niveles de TVA y CLA, tanto en la leche control como en la del tratamiento con aceite,



**Figura 12.** Concentraciones de TVA (*trans*-11 C18:1) en leche según el tipo de suplementos (WLS, Semilla Entera de Lino; LSO, Aceite de Lino; WSF, Semilla Entera de Cártamo; SBO, Aceite de Soja) y de animales (Ovejas: MN, Manchega; LC, Lacaune; y Cabras Murciano-Granadinas) utilizados en los diferentes experimentos.



**Figura 13.** Concentraciones de CLA (*cis*-9, *trans*-11 C18:2) en leche según el tipo de suplementos (WLS, Semilla Entera de Lino; LSO, Aceite de Lino; WSF, Semilla Entera de Cártamo; SBO, Aceite de Soja) y de animales (Ovejas: MN, Manchega; LC, Lacaune; y Cabras Murciano-Granadinas) utilizados en los diferentes experimentos.

fueron más altos que en el resto de experimentos. Este hecho podría ser consecuencia del forraje utilizado en este experimento, al tratarse de henos de muy buena calidad, especialmente el de festuca (>15% PB, y alto nivel de linolénico (37% del total de AG)). Aunque no era este exactamente el caso, Chilliard et al. (2001a) indicaron que los forrajes relativamente frescos tienden a aumentar la concentración de CLA en leche.

La idea de estudiar que sucedía con cabras lecheras, animales que suelen responder a la suplementación lipídica de manera ligeramente diferente en cuanto a ciertos parámetros de producción y composición de leche, nos llevó a diseñar el experimento que corresponde al último capítulo del presente trabajo. En el mismo se utilizó aceite de soja, dado que este suplemento había demostrado, al menos en ovino, ser muy útil para mejorar el nivel de CLA en leche. La respuesta de las cabras fue diferente en cuanto a producción de leche, que no se vio modificada, y composición de leche, donde hubo un incremento del contenido graso. Una posible razón para justificar la diferencia de respuesta entre especies podría deberse a la concentración energética de la ración control, que resultó ser más limitante en las ovejas. Respecto al perfil de ácidos grasos de la leche, las cabras respondieron de una forma muy similar a las ovejas, sobre todo de raza Lacaune, incrementando los ácidos grasos insaturados y bajando los saturados, y triplicando también las concentraciones de ácido *trans* vaccénico (TVA, Figura 12) y de CLA (Figura 13). Este último, el TVA, es precisamente uno de los pocos ácidos grasos de tipo *trans* que no es perjudicial para la salud (Dewhurst et al., 2006), siendo además el principal precursor del CLA, incluso en humanos, por lo que se ha propuesto también como alimento funcional.

Como conclusión general, cabe indicar que en todos los experimentos presentados, hubo una clara relación entre el nivel de CLA (ácido ruménico) y el de TVA en leche, aunque mayor en raza Manchega que en Lacaune. Sin restarle importancia a la parte de CLA que pudo ser producida en el rumen durante la biohidrogenación parcial del ácido linoleico presente en la ración, cabe pues resaltar la importancia de la vía endógena de síntesis de CLA en la glándula mamaria a partir del TVA, producto intermedio de la biohidrogenación ruminal tanto de los ácidos linoleico como linolénico presentes en el alimento. Además de los factores citados previamente y que nos indican que todos los suplementos utilizados en este trabajo mejoraron, en general, la calidad dietética de la leche, destacamos también que en todos los ensayos

realizados la relación entre el ácido linoleico y el ácido  $\alpha$ -linolénico (n-6/n-3) ha estado dentro de los intervalos recomendados (5:1 a 10:1) por la organización mundial de salud (WHO), aunque también es cierto que otros autores (Simopoulos, 1999) han recomendado niveles más bajos (4:1). Por otro lado, el índice de aterogenicidad de la grasa de la leche fue rebajado de manera considerable en los lotes suplementados con semillas o aceites de oleaginosas. La importancia de este índice es relativa y últimamente está en discusión, pero se considera que puede ser relevante y por tanto hay que tenerlo en cuenta en el caso de personas que consuman niveles de grasa en exceso.

Por último, cabe considerar que los resultados obtenidos corresponden a unas condiciones de alimentación determinadas, como tipo de forrajes (generalmente deshidratados), relación forraje/concentrado (en torno al 55/45), y niveles de suplementación lipídica moderados (máximo 3% en equivalente aceite). Por tanto, podría ser de interés estudiar las interacciones de estos diferentes tipos de fuentes de materia grasa vegetal con el resto de componentes de la ración, especialmente con los forrajes. El tipo de forraje y la variación de su calidad, por razones de estacionalidad, por ejemplo, podría tener un efecto bastante importante sobre las concentraciones de nutrientes funcionales en leche así como sobre las posibles respuestas a una determinada suplementación lipídica.

## **Referencias**

- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, y A. L. Lock. 2006. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243
- Casals, R. 1992. Efectos de la utilización de lípidos protegidos en la alimentación de ovejas de ordeño durante los periodos de lactación y de cubrición. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona. 178 pp.
- Casals, R., G. Caja, X. Such, C. Torre, y S. Calsamiglia. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 66:177-191.
- Casals, R., G. Caja, M.V. Pol, X. Such, E. Albanell, A. Gargouri y J. Casellas. 2006. Response of lactating dairy ewes to various levels of dietary calcium soaps of fatty acids. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:312-332.

- Chilliard, Y., A. Ferlay, y M. Doreau. 2001a. Contrôle de la Qualité Nutritionnelle des Matières Grasses du Lait par l’Alimentation des Vaches Laitières: Acides Gras trans, Polyinsaturés, Acide Linoléique Conjugué. INRA Prod. Anim. 14 (5):323-335.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, y M. Doreau. 2001b. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Livestock Prod. Sci. 70:31-48.
- Dewhurst, R. J., K. J. Shingfield, M. R. F. Lee, y N. D. Scollan. 2006. increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high forage systems. Anim. Feed Sci. Technol. 131:168-206.
- Osuna, D. R., R. Casals, G. Caja, y S. Peris. 1998. Effects of feeding whole oilseeds to partially replace calcium soaps of fatty acids on dairy ewes intake and milk production and composition. J. Dairy Sci. 81 (Suppl. 1):302.
- Osuna, D. R., R. Casals, E. Albanell, y G. Caja. 2000. Effects of feeding calcium soaps or whole oilseeds on feed intake and lactation performances of dairy ewes. J. Dairy Sci. 83 (Suppl. 1):278 (Abstr.).
- Pol, M. V., R. Casals, E. Albanell, y X. Such. 2001. Effects of feeding whole linseed on milk production and composition of dairy ewes. J. Dairy Sci. 84 (suppl. 1):353 (Abstr.).
- Pol, M. V. 2003. Efecto de la suplementación con semilla entera de lino sobre la producción y composición de leche de ovejas de raza Manchega. Tesis Master. Universitat Autònoma de Barcelona. 103pp.
- Simopoulos, A. P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. Am. J. Clin. Nutr. 70:560-569.
- WHO y FAO Joint Consultation: Fats and Oils in Human Nutrition. Nutrition Reviews, 1994: 202-205.

---

---

*IX. Conclusiones*

---

---

Los diferentes estudios realizados en la presente tesis doctoral, y bajo sus respectivas condiciones experimentales, permiten destacar los siguientes puntos como principales conclusiones:

1. Las semillas enteras y el aceite de lino permitieron producir leche y queso de oveja con un perfil de ácidos grasos (AG) más adecuado para la salud humana al incrementar el ácido  $\alpha$ -linolénico, de tipo n-3, y el CLA (ácido ruménico) en leche.
2. Las semillas enteras de lino fueron más útiles para incrementar el contenido en leche de AG de tipo n-3 y bajar el ratio n-6/n-3, mientras que el aceite fue el único capaz de incrementar el ácido *trans*-vaccénico y, en consecuencia, permitió obtener mayores concentraciones de CLA. Por tanto, sería más apropiado utilizar semillas enteras si se quiere producir leche enriquecida en AG n-3, mientras que el aceite sería más útil para producir leche con mayores niveles de *trans*-vaccénico y de CLA.
3. La alimentación con semillas enteras de cártamo, en sustitución de jabones cárnicos de aceite de palma, mejoró la calidad nutricional de la leche de oveja incrementando las concentraciones de CLA y de ácido *trans*-vaccénico, con aumentos intermedios a los obtenidos con la semilla y el aceite de lino, pero a costa de efectos negativos sobre la ingestión de alimentos y la producción de leche.
4. El aceite de soja incrementó la producción de leche y de grasa en la leche de oveja, así como la concentración de AG poli-insaturados, triplicando la concentración de CLA y de *trans*-vaccénico.
5. Las ovejas de raza Lacaune fueron más sensibles a la suplementación con aceite de soja, mostrando mayores respuestas en TVA y en AG mono y poli-insaturados que las de raza Manchega, así como diferencias en el grado de desaturación en la glándula mamaria.
6. Las enzimas fibrolíticas mejoran la digestibilidad de la material seca y de la fibra neutro detergente, así como la producción de leche de las ovejas. Sin embargo, los efectos positivos sobre la digestibilidad fueron anulados al combinar las enzimas con aceite de soja.

7. Las cabras lecheras suplementadas con aceite de soja respondieron de una forma muy similar a las ovejas, produciendo leche con más grasa, más rica en AG poli-insaturados y en nutrientes funcionales, con concentraciones tres veces más altas de CLA y de ácido *trans*-vaccénico que el control.
8. A diferencia de lo que ocurre en vacuno, en las leches de oveja y de cabra no se detectaron concentraciones significativas del isómero *trans*-10, *cis*-12 CLA.
9. Estos resultados podrían ser de utilidad a ganaderos y técnicos especializados en pequeños rumiantes para producir leche y productos lácteos más ricos en nutrientes funcionales, cada vez más valorados por determinados consumidores.