



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Tesis Doctoral

**Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la
manipulación nutricional en vacas lecheras:
el papel del rumen**

Mari Carmen Fuentes Álvarez

Bellaterra, 2009

**Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la
manipulación nutricional en vacas lecheras:
el papel del rumen**

**Tesis doctoral presentada por
Mari Carmen Fuentes Álvarez**

**bajo la dirección del
Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort**

**Para acceder al grado de Doctor en el programa de Producción Animal de la
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS**

Bellaterra, 2009

Sergio Calsamiglia Blancafort, Catedrático del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifico:

Que la memoria titulada “**Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la manipulación nutricional en vacas lecheras: el papel del rumen**” presentada por **Mari Carmen Fuentes Álvarez** para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona, ha sido realizada bajo mi dirección, y considerándola concluida, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y, para que así conste, firmo el presente en Bellaterra, Enero de 2009.

Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

L'autora d'aquesta memòria ha disfrutat d'una Beca de Formació de Personal Investigador de la Generalitat de Catalunya, amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, i del Fons Social Europeu.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la gente que ha estado cerca de mí en estos años y que, directa o indirectamente, ha colaborado en esta tesis:

Sergio, gracias por la libertad, la confianza, la comprensión y la paciencia, creo que por encima de ser un gran director eres una gran persona.

A todos los profesores, compañeros y amigos del departamento quiero agradecerles su ayuda tanto en el trabajo experimental como en el apoyo moral. También agradecerles los buenos momentos que hemos vivido dentro y fuera de la facultad. Me llevo un montón de buenos recuerdos de estos años juntos.

A David, agradecerle su ayuda con los fermentadores y que me enseñara que lo más importante en esta vida es tener voluntad para hacer las cosas. A Santiago también agradecerle que colaborara en parte de este trabajo.

A Carmen, Blas, Antonio de Vega y la gente de Zaragoza, gracias por vuestra ayuda y por hacer más llevaderas las horas en el laboratorio. I want also to thank the people of the Laboratory for Animal Nutrition and Animal Product Quality for helping me so much during my fatty acid analysis.

A Carlos, Adrián y a todo el personal de Tauste les agradezco su ayuda en los muestreos, sus charlas, el tratarme tan bien y el cuidar de mis vacas.

Thank you to Veerle and Bruno for answering all my questions and for being always available for helping me.

A Xavi, Laura, Sandra, Tere, Pedro y Raúl gracias por animarme siempre y por estar cerca en los momentos difíciles.

A mis padres, Baltasar y Mari Carmen, agradecerles su apoyo en todas las decisiones que he tomado...y decirles que esté aquí o al otro lado del mundo siempre les estaré eternamente agradecida por todo lo que han hecho y hacen por mí.

A mi hermana, Cristina, agradecerle su sinceridad, sus consejos, sus charlas y por alegrarme la vida con sus historias y su inocencia.

A Xavi agradecerle su paciencia por aguantar los altibajos emocionales de la fase final y su energía para hacerme seguir con ilusión renovada. Gracias por estar siempre a mi lado en este viaje y en todos los que nos quedan por delante...

Al resto de familia, gracias por vuestra preocupación y ánimos en estos años.

Esta tesis no hubiera sido posible sin vuestro apoyo...GRACIAS A TODOS!

RESUMEN

La leche es un alimento de un alto valor nutricional pero su perfil de ácidos grasos (AG) no es el más adecuado desde un punto de vista de salud humana. Es por esto por lo que en los últimos años ha aumentado el interés por modificar el perfil de AG de la leche hacia uno más saludable. Esta tesis se divide en tres estudios, uno *in vivo* y dos *in vitro*. En el primero de ellos se estudia cómo modificar el perfil de AG de la leche a través de la nutrición animal, y en los dos siguientes se estudian diferentes factores que pueden influir en el proceso de biohidrogenación ruminal, ya que este proceso determina la composición de los AG que abandonan el rumen y que quedan disponibles para ser absorbidos a nivel intestinal.

En el primer experimento se utilizaron 356 vacas en un diseño de bloques al azar y se estudió cómo la suplementación de las dietas de vacas lecheras al inicio de la lactación con semilla de lino extrusionada afectaba a la producción y la composición de la leche, y a la reproducción. Las dietas utilizadas tenían una relación forraje:concentrado de 40:60 (17,9% PB, 27,7% FND y 6,0% EE), se administraron *ad libitum* y eran similares en su composición entre tratamientos, excepto en el suplemento proteico donde la dieta control (CTR) tenía un 4,9% de semilla de soja extrusionada, mientras que la dieta lino (LIN) tenía un 5,5% de semilla de lino extrusionada. Se midió la producción y la composición de la leche cada 15 días y se tomaron datos reproductivos de todos los animales a lo largo del periodo experimental. Se seleccionaron al azar 20 animales de cada grupo para estudiar el efecto de la suplementación con semilla de lino sobre la ingestión individual, el perfil de AG de la leche y la secreción de progesterona y prostaglandinas plasmáticas. Las vacas se alojaron en naves de 200 animales que eran idénticas en localización, diseño y orientación y fueron ordeñadas tres veces al día (0800, 1600, 2400). La ingestión individual medida utilizando alcanos como marcadores en los días 40 (23,0 kg/d) y 90 postparto (24,2 kg/d) y la producción de leche (45,0 kg/d) no se vieron afectadas por el tratamiento, pero el menor porcentaje de grasa láctea en el grupo LIN (2,65%) respecto al grupo CTR (2,86%) resultó en una menor producción de leche corregida al 4% de grasa en el grupo LIN (35,4 kg/d) comparado con el CTR (37,7 kg/d). El contenido de proteína láctea fue mayor en el grupo LIN (3,04%) que en el CTR (3,00%). La concentración de AG saturados fue menor en la grasa láctea de LIN (56,2%) que de CTR (60,2%) pero las concentraciones de AG monoinsaturados (35,7 vs. 32,7%) y poliinsaturados (8,0 vs. 6,9%) fueron mayores en LIN

que en CTR. La suplementación con semilla de lino también incrementó la concentración de ácido vaccénico (2,21 vs. 1,55%), ácido linoleico conjugado (CLA) (0,91 vs. 0,72%) y AG n-3 (1,21 vs. 0,54%) en la leche respecto al CTR. En cuanto al rendimiento reproductivo, a pesar de que las concentraciones plasmáticas de prostaglandinas fueron numéricamente menores ($P = 0,16$) en LIN (106 pg/ml) que en CTR (120 pg/ml), no se produjo una mejora de los resultados reproductivos en LIN respecto a CTR. En conclusión, la suplementación con semilla de lino extrusionada redujo el porcentaje de grasa láctea y la producción de leche corregida por grasa e incrementó el porcentaje de proteína láctea, así como también mejoró el perfil de AG de la leche hacia uno más saludable, todo ello sin modificar la ingestión de MS, la producción de leche y el rendimiento reproductivo de los animales.

Para estudiar si las diferencias observadas en el porcentaje de grasa láctea entre tratamientos en el primer estudio se debían a diferencias en los procesos de fermentación y/o de biohidrogenación ruminal entre tratamientos, se diseñó el segundo estudio de esta tesis. En este estudio se utilizaron 8 fermentadores (1320 mL) de doble flujo continuo en dos periodos de 7 d (4 d adaptación y 3 d muestro) y se estudiaron, en un diseño factorial 2×2 , los efectos del pH (Alto = 6,4 vs. Bajo = 5,6) y de la dieta (Soja (SOY) vs. Lino (LIN)) sobre la fermentación microbiana ruminal, la lipólisis y la biohidrogenación ruminal, el flujo de AG del efluente y la concentración de DNA de bacterias implicadas en los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal. Las condiciones de fermentación se mantuvieron constantes: temperatura (39°C), ritmo de paso de la fracción líquida (10%/h) y ritmo de paso de la fracción sólida (5%/h). Las dietas se formularon para ser similares a las utilizadas en el primer estudio, tenían una relación forraje:concentrado de 40:60 y fueron similares en su composición básica, difiriendo únicamente en el suplemento graso, donde la dieta SOY tenía soja extrusionada y la dieta LIN tenía lino extrusionado. Las raciones (95 g MS/d) se suministraron a cada fermentador en tres tomas diarias (0800, 1600, 2400 h). Se tomaron muestras del efluente para determinar las concentraciones de N total, N amoniacal y AGV y el resto de la muestra se liofilizó. En las muestras liofilizadas se determinó la cantidad de MS, cenizas, FND y FAD, y el contenido de AG y de purinas. El pH bajo redujo la digestibilidad de la MO y de la fibra, la concentración y el flujo de N amoniacal, el flujo de N bacteriano y la degradación de la PB, e incrementó el flujo de N dietario y no amoniacal. La biohidrogenación aparente del ácido linoleico (AL) y linolénico (ALN) se redujo por el pH bajo (AL = 0,44 vs. 0,82; ALN = 0,54 vs. 0,84). El

pH bajo también redujo la lipólisis de estos AG, pero en menor medida que la biohidrogenación, (AL = 0,92 vs. 0,99; ALN = 0,94 vs. 0,99). El pH bajo redujo la proporción de C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1} y *cis*-9, *trans*-11 CLA, e incrementó la proporción de *trans*-10 C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} y *trans*-10, *cis*-12 CLA en el efluente. La reducción en el pH de 6,4 a 5,6 redujo las concentraciones de DNA de *Anaerovibrio lipolytica* (1,85 vs. 67,0 pg/10 ng DNA total) y del subgrupo de *Butyrivibrio* productor de ácido vaccénico (316 vs. 1149 pg/10 ng DNA total) e incrementó la concentración de DNA del subgrupo de *Butyrivibrio* productor de ácido esteárico (1907 vs. 1216 pg/10 ng DNA total). La dieta LIN tuvo una mayor concentración y flujo de N amoniacal, y tendió (P = 0,06) a incrementar la degradación de la PB. La lipólisis de AL y ALN fue mayor en LIN que en SOY (AL = 0,98 vs. 0,92; ALN = 0,98 vs. 0,94). La dieta LIN redujo la proporción de C_{18:2} y *trans*-10, *cis*-12 CLA, e incrementó la proporción de C_{18:3} y *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} en el efluente comparado con la dieta SOY. Los resultados de este estudio indicaron que el pH inhibió la lipólisis y la biohidrogenación ruminal y que la grasa de la soja extrusionada parecía estar más protegida contra la lipólisis que la del lino extrusionado.

El síndrome de grasa baja en vacas alimentadas con altos niveles de concentrado se ha relacionado con aumentos en las concentraciones lácteas de *trans*-10 C_{18:1} y *trans*-10, *cis*-12 CLA. Estos AG se producen como resultado de la alteración en el proceso de biohidrogenación ruminal de los AG insaturados de origen dietario. Cuando se utilizan dietas ricas en concentrado en la alimentación de vacas lecheras normalmente se observa una reducción en el pH ruminal, por lo que parece haber un efecto confundido entre el pH ruminal y la cantidad de concentrado en la dieta sobre las alteraciones en los procesos de biohidrogenación ruminal observados cuando se usan dietas pobres en fibra en las dietas de vacas lecheras. Por esta razón, se realizó un tercer estudio donde se evaluó el efecto del pH (6,4 vs. 5,6) y de dos niveles de forraje:concentrado en las dietas (70:30 F:C (HF) vs. 30:70 F:C (LF)) sobre la fermentación microbiana ruminal, el perfil de AG del efluente, la concentración de DNA de bacterias involucradas en los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal, y la producción de metano en un sistema de cultivo continuo y en un sistema de producción de gas. El sistema de cultivo continuo consistió en dos periodos de 8 d (5 d adaptación y 3 d muestreo), con un diseño factorial 2 × 2 de los tratamientos. Las dietas utilizadas tuvieron un perfil similar de AG (44,0% C_{18:2}, 9,77% C_{18:3}). Las condiciones de fermentación y de muestreo fueron idénticas a las explicadas en el segundo estudio. El pH bajo redujo la digestibilidad de la MO y FND, el flujo y la

concentración de N amoniacal, y la degradación de la PB, e incrementó el flujo de N no amoniacal y dietario. El pH bajo redujo el flujo de $C_{18:0}$, *trans*-11 $C_{18:1}$, *cis*-9, *trans*-11 CLA y *trans*-10, *cis*-12 CLA, e incrementó el flujo de *trans*-10 $C_{18:1}$, $C_{18:2n-6}$, $C_{18:3n-3}$ y *trans*-11, *cis*-15 $C_{18:2}$ en el efluente. El pH bajo redujo las concentraciones de DNA de *Anaerovibrio lipolytica* (32,7 vs. 72,1 pg/10 ng DNA total) y del subgrupo de *Butyrivibrio* productor de ácido vaccénico (588 vs. 1394 pg/10 ng DNA total). La dieta LF incrementó la digestibilidad de la MO y la FND, el flujo de N no amoniacal y bacteriano, y redujo el flujo y la concentración de N amoniacal. La dieta LF redujo las proporciones de *trans*-11 $C_{18:1}$, e incrementó las de $C_{18:2n-6}$ y $C_{18:3n-3}$ en el efluente. La dieta pobre en fibra incrementó la concentración de DNA de *A. lipolytica* (65,2 vs. 39,7 pg/10 ng DNA total). Las mismas dietas que las utilizadas en el sistema de flujo continuo se incubaron durante 24 h a dos pH diferentes (6,4 vs. 5,6) para estudiar la producción de metano. La mayor producción de metano fue la de la dieta HF a pH 6,4 (7,11 vs. 3,05 mL) y este tratamiento también tuvo la mayor ratio acético:propiónico (2,43 vs. 1,94) comparado con el resto de tratamientos, sugiriendo que la mayor disponibilidad de H_2 tras la inhibición de la biohidrogenación a pH bajo se usó para sintetizar propiónico y no metano. Los resultados indican que el pH bajo es la principal causa de la acumulación de *trans*-10 $C_{18:1}$ y *trans*-10, *cis*-12 CLA a nivel ruminal, aunque un nivel alto de concentrado en las dietas también incrementa la proporción de *trans*-10, *cis*-12 CLA en el efluente.

ABSTRACT

Milk is a food with a high nutritive value however milk fatty acid (FA) profile does not seem to be very healthy from a human health point of view. This is why, in recent years there has been a great deal of interest in modifying milk FA profile towards a more healthy one. This thesis is divided into three experiments: one *in vivo* and two *in vitro*. In the first one, it was studied how to modify the milk FA profile through animal nutrition, and in the following two, different factors which can affect ruminal biohydrogenation processes were studied because these ruminal processes determine the composition of the FA that leave the rumen and are available to be absorbed in the gut.

In the first experiment, 356 early lactation multiparous Holstein cows were used in a randomised complete block design to determine the effects of feeding extruded linseed on milk production and composition, and reproductive performance. Cows were fed a 40:60 forage to concentrate ratio diet (17.9% CP, 27.7% NDF and 6.0% EE) *ad libitum* that was identical in composition between treatments except for the protein supplement that was control (CTR: 4.9% extruded soybean) and linseed (LIN: 5.5% extruded linseed). Milk production and composition were measured every 15 days in all animals, and reproductive data were taken. Twenty cows of each group were randomly selected to study the effects of extruded linseed on individual feed intake, milk FA profile, and plasmatic progesterone and prostaglandin concentrations. Individual feed intake measured at 40 (23.0 kg DM) and 90 (24.2 kg DM) days in milk, and milk yield (45 kg/d) were not affected by treatment, but the lower milk fat percentage in cows fed LIN (2.65%) compared with CTR (2.86%) resulted in lower fat-corrected milk yield for cows fed LIN (35.4 kg/d) compared with CTR (37.7 kg/d). Milk protein content was higher in LIN (3.04%) than in CTR (3.00%). The concentration of saturated FA was lower in milk fat from LIN (56.2%) compared with CTR (60.2%). Monounsaturated FA (35.7 vs. 32.7%) and polyunsaturated FA (8.0 vs. 6.9%) were higher in LIN than in CTR. Supplementation with LIN also increased the proportion of vaccenic acid (2.21 vs. 1.55%), total conjugated linoleic acid (CLA) (0.91 vs. 0.72%) and n-3 FA (1.21 vs. 0.54%) in milk compared with CTR. Although plasma concentrations of prostaglandins were numerically lower ($P = 0.16$) in LIN (106 pg/ml) than in CTR (120 pg/ml), reproductive performance was similar between treatments. In general, linseed reduced milk fat percentage and fat corrected milk yield, and increased

milk protein percentage and the content of healthy FA in milk without modifying DM intake, milk yield and reproductive performance.

The second experiment of this thesis was conducted in order to study if the differences in milk fat percentage between treatments in the first experiment were due to different ruminal fermentation and/or biohydrogenation processes between treatments. In this experiment, 8 dual-flow continuous culture fermenters (1,320 mL) were used in two replicated periods of 7 d (4 d of adaptation and 3 d for sampling) to study, in a 2 × 2 factorial design, the effects of pH (High = 6.4 vs. Low = 5.6) and diet (Soybean vs. Linseed) on rumen microbial fermentation, lipolysis and apparent biohydrogenation, effluent flow of fatty acid and DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes. Ruminal fermentation conditions were maintained constant: temperature (39°C) and liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates. Diets were formulated to be similar to the previous experiment ones, they had a 40 to 60 forage to concentrate ratio and a similar ingredient composition, differing only in the fat supplement, with the soybean diet having extruded soybean and the linseed diet having extruded linseed. Diets (95 g DM/d) were fed in equal portions to the fermenters 3 times per day (0800, 1600, 2400). Samples from solid and liquid mixed effluents were taken for determination of total N, ammonia-N and VFA concentration, and the remainder of the sample was lyophilized. Dry samples were analyzed for DM, ash, NDF and ADF, FA and purine contents. The low pH reduced OM and fiber digestibility, ammonia-N concentration and flow, bacterial N flow and CP degradation, and increased non-ammonia and dietary N flow. Linoleic (LA) and linolenic acid (LNA) apparent biohydrogenation were reduced by the low pH (LA = 0.44 vs. 0.82; LNA = 0.54 vs. 0.84). The low pH also reduced LA and LNA lipolysis but to a lesser extent than biohydrogenation (LA = 0.92 vs. 0.99; LNA = 0.94 vs. 0.99). The low pH reduced the proportion of C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1} and *cis*-9, *trans*-11 CLA, and increased the proportion of *trans*-10 C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} and *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent. Lowering the pH from 6.4 to 5.6 reduced *Anaerovibrio lipolytica* (1.85 vs. 67.0 pg/10 ng total DNA) and *Butyrivibrio* vaccenic acid producer subgroup DNA concentrations (316 vs. 1149 pg/10 ng total DNA) and increased *Butyrivibrio* stearic acid producer subgroup DNA concentration (1907 vs. 1216 pg/10 ng total DNA). The linseed diet increased ammonia-N concentration and flow, and tended (P = 0.06) to increase CP degradation. Lipolysis of LA and LNA was also higher in linseed compared with soybean diet (LA = 0.98 vs. 0.92; LNA = 0.98 vs. 0.94). Linseed diet

reduced the proportion of C_{18:2} and *trans*-10, *cis*-12 CLA, and increased the proportion of C_{18:3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} in the effluent compared with soybean diet. Results indicate that pH inhibited lipolysis and apparent biohydrogenation. Fat of extruded soybean seemed more protected against lipolysis than that of extruded linseed.

Milk fat depression in cows fed high grain diets has been related to an increase in *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk. *Trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA are produced as a result of the alteration in rumen biohydrogenation of dietary unsaturated FA. As a reduction in ruminal pH is usually observed when high concentrate diets are fed, there seems to be a confounding effect between ruminal pH and quantity of concentrate in the diet on the biohydrogenation pathway alterations observed when feeding low fiber diets to dairy cows. For this reason, we developed the third experiment of this thesis where the effect of pH (6.4 vs. 5.6) and two different forage to concentrate ratios (F:C) in the diets (70:30 F:C (HF) vs. 30:70 F:C (LF)) on rumen microbial fermentation, effluent FA profile, DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes, and methane production was investigated in continuous culture and in a gas production trial. The continuous culture study consisted of two periods of 8 d (5 d adaptation plus 3 d sampling), with a 2 × 2 factorial arrangement of treatments. Both diets had a similar FA profile (44.0% C_{18:2}, 9.77% C_{18:3}). Ruminal fermentation conditions and sampling were identical to the second experiment. Low pH reduced OM and NDF digestibility, ammonia-N concentration and flow, and CP degradation, and increased non-ammonia and dietary N flow. Low pH decreased the flow of C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1}, *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA, and increased the flow of *trans*-10 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} in the effluent. Low pH reduced *Anaerovibrio lipolytica* (32.7 vs. 72.1 pg/10 ng total DNA) and *Butyrivibrio vacenic acid* subgroup (588 vs. 1394 pg/10 ng total DNA) DNA concentrations. The LF diet increased OM and NDF digestibility, non-ammonia and bacterial N flow, and reduced ammonia-N concentration and flow. The LF reduced *trans*-11 C_{18:1}, and increased C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} proportion in the effluent. The LF diet increased *A. lipolytica* DNA concentration (65.2 vs. 39.7 pg/10 ng total DNA). The same diets were incubated for 24 h at two different pH (6.4 vs. 5.6) to study methane production. The HF diet at pH 6.4 had the highest methane production (7.11 vs. 3.05 mL) and acetate to propionate ratio (2.43 vs. 1.94) compared with the rest of treatments, suggesting that the higher H₂ availability after the inhibition of biohydrogenation due to low pH was used to synthesize propionate and not methane. Results indicate that low pH is the main cause of

the accumulation of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA, although concentrate rich diets also increase *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. Introducción general	1
CAPÍTULO II. Revisión bibliográfica	
1. Fuentes de grasa para el ganado vacuno lechero	7
1.1. ¿Qué son las grasas?	7
1.1.1. Los lípidos	7
1.2. Estructura de las grasas	8
1.2.1. Los ácidos grasos	9
1.3. Composición de las fuentes de grasa	11
1.4. Digestión ruminal de las grasas	14
1.4.1. Lipólisis	14
1.4.2. Biohidrogenación ruminal	16
1.4.3. Formación de ácidos grasos bacterianos	21
1.5. Tipos de grasa según sus efectos a nivel ruminal	22
1.5.1. Grasas reactivas	22
1.5.2. Grasas inertes	23
2. Utilización de suplementos grasos en ganado vacuno lechero	26
2.1. Efectos a nivel ruminal	28
2.2. Efectos a nivel productivo	30
2.2.1. Efectos sobre la ingestión de materia seca	30
2.2.2. Efectos sobre la producción de leche	33
2.2.3. Efectos sobre la composición de la leche	35
2.2.3.1. Grasa láctea	35
a) Porcentaje de grasa	36
b) Composición en ácidos grasos	39
2.2.3.2. Proteína láctea	42
2.3. Efectos sobre la reproducción	44
3. Utilización de semilla de lino en ganado vacuno lechero	49
3.1. Características de la semilla de lino	49
3.2. Efectos a nivel ruminal	50
3.2.1. Efectos sobre la digestibilidad de la materia seca y de la fibra	50
3.2.2. Efectos sobre la biohidrogenación ruminal	53

3.3. Efectos a nivel productivo	59
3.3.1. Efectos sobre la ingestión, la producción y la composición de la leche	59
3.3.1.1. Perfil de ácidos grasos	63
3.4. Efectos sobre la reproducción	67
4. Conclusiones	70
Capítulo III. Objetivos	73
Capítulo IV. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows	
Abstract	77
1. Introduction	78
2. Materials and methods	79
2.1. Animals, housing and diets	79
2.2. Experimental procedures	80
2.3. Chemical analyses	83
2.4. Statistical analyses	85
3. Results and discussion	87
4. Conclusions	97
Capítulo V. Effect of pH on rumen fermentation and biohydrogenation of extruded soybean and linseed fatty acids in continuous culture	
Abstract	101
1. Introduction	102
2. Materials and methods	103
2.1. Apparatus and experimental design	103
2.2. Sample collection	105
2.3. Chemical analyses	106
2.4. Calculation of lipolysis and apparent biohydrogenation	107
2.5. DNA extraction and quantification	107
2.6. Polymerase chain reaction analyses	108
2.7. Statistical analyses	109

3. Results and discussion	110
3.1. Ruminal fermentation	110
3.2. Lipolysis and apparent biohydrogenation	112
3.3. Proportion of free FA in the effluent	116
3.4. Biohydrogenation kinetics	117
3.5. Quantitative real time PCR	119
4. Conclusions	121
Capítulo VI. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual flow continuous culture	
Abstract	125
1. Introduction	126
2. Materials and methods	128
2.1. In vitro continuous culture trial	128
2.1.1. Apparatus and experimental design	128
2.1.2. Sample collection	129
2.2. In vitro gas production trial	130
2.3. Chemical analyses	131
2.4. DNA extraction and quantification	132
2.5. Polymerase chain reaction analyses	133
2.6. Statistical analyses	134
3. Results and discusión	135
3.1. Ruminal fermentation	135
3.2. Biohydrogenation intermediates	138
3.3. DNA concentrations	140
3.4. In vitro gas production trial	144
4. Conclusions	145
Capítulo VII. Discusión general	149
Capítulo VIII. Conclusiones finales	167
Capítulo IX. Referencias bibliográficas	171

Capítulo X. Anexos

Anexo 1: Manufacture of cheese and fermented milk with polyunsaturated fatty acids enriched milk from extruded linseed fed dairy cows	191
Anexo 2: Preparación de la muestra para la determinación de ácidos grasos de cadena larga en líquido ruminal mediante cromatografía de gases	197

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Capítulo I

Índice de figuras

Figura 1. Relación inversa entre la producción de leche anual y la tasa de concepción en vacas lecheras en el norte de España	1
--	---

Capítulo II

Índice de tablas

Tabla 1. Composición en ácidos grasos (% del total de AG) de algunos suplementos grasos y de otros productos utilizados en la nutrición de rumiantes	13
Tabla 2. Tasa de lipólisis de la grasa de algunos ingredientes utilizados en la nutrición de rumiantes	16
Tabla 3. Efecto del uso de diferentes lípidos dietarios sobre la concentración en ácido linoleico conjugado (CLA) de la leche (mg/100 mg de AG totales)	40
Tabla 4. Respuestas en producción y composición de la leche a varios suplementos grasos en vacas lecheras	44
Tabla 5. Efecto de la suplementación con semilla de lino sobre la digestibilidad ruminal y en el tracto total de la MO, FND y PB	51
Tabla 6. Efecto de la protección de la semilla de lino mediante tratamiento químico o físico sobre las digestibilidades ruminales y en el tracto total de la MO, FND, EE y PB	52
Tabla 7. Efecto de la micronización y la extrusión sobre la composición química de la semilla de lino (en base a MS)	53
Tabla 8. Perfil de ácidos grasos plasmáticos de vacas alimentadas con semilla de lino cruda o tratada por calor (mg/g de ácidos grasos)	54
Tabla 9. Biohidrogenación ruminal del C _{18:2} y C _{18:3} y pH ruminal en vacas	

Holstein alimentadas con un nivel bajo (BC) o alto (AC) de concentrado y suplementadas con un 3% de aceite de lino (BCA y ACA)	56
Tabla 10. Flujo duodenal (g/d) de algunos intermediarios de la biohidrogenación ruminal de vacas Holstein alimentadas con un nivel bajo (BC) o alto (AC) de concentrado y suplementadas con un 3% de aceite de lino (BCA y ACA)	57
Tabla 11. Efecto del nivel de forraje en la dieta y de la adición de buffer sobre el pH ruminal, el porcentaje de grasa de la leche, la biohidrogenación ruminal (BH) y el flujo de AG al duodeno	58
Tabla 12. Efecto de la semilla de lino sobre la ingestión, la producción y la composición de la leche	60
Tabla 13. Efecto de la suplementación con semilla de lino sobre el porcentaje de ácido linolénico de la leche (% sobre total de AG)	64
Tabla 14. Efecto de la suplementación con semilla de lino sobre el porcentaje de ácido linoleico conjugado (CLA) de la leche (% sobre total de AG)	66
 Índice de figuras	
Figura 1. Esquema de formación de un triglicérido	8
Figura 2. Los carbonos de la cadena hidrocarbonada se identifican como α , β , o γ si son el 1 ^o , 2 ^o o 3 ^{er} carbono desde el grupo carboxilo o como ω desde el grupo metilo	10
Figura 3. Ruta de síntesis de los ácidos grasos n-6 y n-3	10
Figura 4. Esquema de los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal	14
Figura 5. Ingestión diaria vs. flujo duodenal de ácido linoleico y esteárico en vacas lecheras alimentadas con dietas sin grasa añadida	17
Figura 6. Proceso de biohidrogenación ruminal	18
Figura 7. Árbol filogenético basado en la secuencia 16S rRNA de diferentes bacterias relacionadas con <i>Butyrivibrio</i>	21
Figura 8. Estructura química de un jabón cálcico	24
Figura 9. Relación entre el contenido en AG dietarios y la ingestión de MS en vacas lecheras para cada categoría de grasa	33
Figura 10. Modelo hipotético que describe los cambios en producción de leche al ir aumentando el porcentaje de grasa en las dietas de vacas lecheras en lactación	35
Figura 11. Esquema simplificado de la síntesis de AG de la leche	36

Figura 12. Porcentaje de grasa láctea durante la infusión abomasal de isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA)	38
Figura 13. Concentraciones en AG de la leche (%) respecto a las concentraciones ideales	39
Figuras 14 y 15. Datos de estudios publicados donde se muestra cómo varían las concentraciones en leche de ácido oleico y linoleico en vacas alimentadas con dietas control o con varias fuentes de grasas protegidas	41
Figura 16. Concentraciones de proteína láctea de vacas alimentadas con grasa añadida respecto a vacas alimentadas con dietas control	42
Figura 17. Reconocimiento materno de la gestación	47
Figura 18. Representación esquemática del metabolismo de los AGPI dietarios n-6 y n-3	48
Figura 19. Perfil de AG de semillas de oleaginosas (% sobre total de AG)	50
Figura 20. Valores medios de lipólisis y biohidrogenación de 3 productos extrusionados y 2 aplastados de semilla de lino después de 6 h de incubación	55
Figura 21. Efecto del pH sobre la producción de isómeros del CLA: <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA y <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA en incubaciones con ácido linoleico y bacterias procedentes de vacas alimentadas con dieta rica en forraje (HFD) o en concentrado (HCD)	59
Figura 22. Comparación entre el contenido lácteo de C _{18:3n3} (% total AG) del grupo control y del grupo suplementado con semilla de lino	64
Figura 23. Proceso de biohidrogenación ruminal del ácido linolénico y formación de CLA por síntesis endógena	65
Figura 24. Comparación entre el contenido lácteo de CLA (% total AG) del grupo control y del grupo suplementado con semilla de lino	67
Figura 25. Concentraciones plasmáticas medias de PGFM en vacas alimentadas con diferentes dietas	68
Figura 26. Efecto de los AGPI dietarios sobre la concentración plasmática de PGFM en respuesta a la administración de oxitocina los días 15, 16 y 17 del ciclo estral	69

Capítulo IV

Índice de tablas

Table 1. Ingredient composition of the two experimental diets	80
Table 2. Chemical and fatty acid composition of the two experimental diets and linseed	81
Table 3. Dry matter intake (DMI), milk production and milk composition of Holstein dairy cows fed control (CTR) and linseed (LIN) diets between weeks 4 and 20 of lactation	88
Table 4. Concentrations of metabolites in plasma at 40 d postpartum in cows fed control (CTR) or linseed (LIN) diets	90
Table 5. Milk fatty acid composition at 40 and 90 DIM of cows fed control (CTR) or linseed (LIN) diets	91
Table 6. Effect of extruded linseed on fertility responses and culling of lactating cows	95
Table 7. Effect of extruded linseed on ovulatory responses after a synchronization of ovulation in lactating cows	96

Índice de figuras

Figure 1. Concentrations of progesterone in plasma in synchronized cows (corpus luteum regression and ovulation) fed control (CTR) or linseed (LIN) diets	93
Figure 2. Mean plasma 13,14-dihydro-15-keto-PGF ₂ α (PGFM) concentrations following an oxytocin challenge on day 15 of a synchronized estrous cycle for lactating Holstein cows fed control (CTR) and linseed (LIN) diets	94
Figure 3. Survival curves for interval from calving to pregnancy in cows fed control (CTR) or linseed (LIN) diets	97

Capítulo V

Índice de tablas

Table 1. Ingredient, chemical and fatty acid composition of the two experimental diets	104
Table 2. Description of forward (F) and reverse (R) primers used in the amplification of <i>Anaerovibrio lipolytica</i> , <i>Butyrivibrio</i> SA subgroup, <i>Butyrivibrio</i> VA subgroup and universal bacteria	109

Table 3. Effect of pH and diet on true organic matter and fiber digestion, and on total VFA concentration and profile in continuous culture	111
Table 4. Effect of pH and diet on N metabolism of rumen microbes in continuous culture	112
Table 5. Extent of lipolysis and apparent biohydrogenation (aBH) of C _{18:2n-6} and C _{18:3n-3} of linseed and soybean diets at two different pH	113
Table 6. Proportion of individual C ₁₈ -FA in free fatty acid form in the effluent (g/100g C ₁₈ -FA)	117
Table 7. Effect of diet, pH and time after feeding on quantification (pg/10 ng total DNA) of <i>A. lipolytica</i> , <i>Butyrivibrio</i> SA subgroup and <i>Butyrivibrio</i> VA subgroup from continuous culture ruminal liquid samples	120

Índice de figuras

Figure 1. Effect of pH, diet and day on C _{18:0} , C _{18:2} , C _{18:3} , <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA, <i>trans</i> -10 C _{18:1} , <i>trans</i> -11 C _{18:1} and <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA proportions in the effluent (% C ₁₈ FA) along the experimental days in dual flow continuous culture	115
Figure 2. Extent of linoleic (C _{18:2}) and linolenic acid (C _{18:3}) apparent biohydrogenation at 2, 4 and 8 hours postfeeding of days 5 to 7	118

Capítulo VI

Índice de tablas

Table 1. Ingredient, chemical and fatty acid composition of the two experimental diets	129
Table 2. Description of forward (F) and reverse (R) primers used in the amplification of <i>Anaerovibrio lipolytica</i> , <i>Butyrivibrio</i> SA subgroup, <i>Butyrivibrio</i> VA subgroup and universal bacteria	134
Table 3. Effect of pH and diet on true organic matter and fiber digestion, and on total VFA concentration and profile in continuous culture	136
Table 4. Effect of pH and diet on N metabolism of rumen microbes in continuous culture	137
Table 5. Effect of pH and diet on 1-h postfeeding and 24 h effluent fatty acid profile	140
Table 6. Effect of diet, pH and day on quantification (pg/10 ng total DNA) of <i>A.</i>	

<i>lipolytica</i> , <i>Butyrivibrio</i> SA subgroup and <i>Butyrivibrio</i> VA subgroup from continuous culture ruminal liquid samples	143
--	-----

Table 7. Effect of pH and diet on a 24 h <i>in vitro</i> batch culture rumen microbial fermentation trial	144
--	-----

Capítulo VII

Índice de tablas

Table 1. Effect of pH and diet on <i>trans</i> -10 C _{18:1} and <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA 24 h effluent proportion, and at 2, 4 and 8 h postfeeding in the second experiment	161
---	-----

Table 2. Effect of pH and diet on <i>trans</i> -10 C _{18:1} and <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA 24 h effluent proportion and at 1h postfeeding in the third experiment	162
---	-----

Índice de figuras

Figure 1. Effect of linseed supplementation on the change in milk C _{18:3} concentration compared with the control group	150
--	-----

Figure 2. Relationship between <i>Anaerovibrio lipolytica</i> DNA concentration (pg/10 ng DNA) and C _{18:2} and C _{18:3} effluent proportion in the second and third experiment	156
--	-----

Figure 3. Relationship between <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> VA subgroup DNA concentration (pg/10 ng DNA) and the proportion of <i>trans</i> -11 C _{18:1} (VA) and CLA in the effluent in the second and third experiment	157
--	-----

Figure 4. Relationship between <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> SA subgroup DNA concentration (pg/10 ng DNA) and C _{18:0} effluent proportion in the second and third experiment	158
--	-----

Figure 5. <i>Trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA concentration in milk and effluent in the first (in vivo) and second (in vitro) experiment, respectively	159
--	-----

Figure 6. Effect of pH on DNA concentrations of <i>Anaerovibrio lipolytica</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> VA and <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> SA subgroup in the second and third experiment	163
---	-----

Capítulo X

Índice de tablas

Table 1. Effect of the fermentative process in the FA profile of fermented milk and cheese compared with the FA profile of raw milk	193
--	-----

Table 2. Effect of the fermentative process in the CLA distribution of cheese compared with the FA profile of raw milk	194
---	-----

Índice de figuras

Figure 1. pH evolution during the fermentative process in fermented milk elaborated from control or PUFA-enriched milk	192
Figure 2. Sensory analysis of fermented milk by the triangle test (ISO, 2004)	195

LISTA DE ABREVIACIONES

Castellano

AG	ácidos grasos	EE	extracto etéreo
AGI	ácidos grasos insaturados	EPA	ácido eicosapentanoico
AGMI	ácidos grasos monoinsaturados	FAD	fibra ácido detergente
AGNE	ácidos grasos no esterificados	FND	fibra neutro detergente
AGPI	ácidos grasos poliinsaturados	IFN-τ	interferón tau
AGS	ácidos grasos saturados	MO	materia orgánica
AGV	ácidos grasos volátiles	MS	materia seca
AL	ácido linoleico	PB	proteína bruta
ALN	ácido linolénico	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
CLA	ácido linoleico conjugado	PG	prostaglandinas
DHA	ácido docosaheptaenoico	RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico		

Inglés

ADF	acid detergent fiber	MCFA	medium chain fatty acids
CP	crude protein	MUFA	monounsaturated fatty acids
DIM	days in milk	NDF	neutral detergent fiber
DM	dry matter	NFC	nonfibrous carbohydrates
DNA	desoxirribonucleic acid	OM	organic matter
EMPS	efficiency of microbial protein synthesis	PCR	polymerase chain reaction
FA	fatty acids	PGFM	13,14-dihydro-15keto-PGF _{2α}
FAME	fatty acid methyl esters	PUFA	polyunsaturated fatty acids
FFA	free fatty acids	RNA	ribonucleic acid
IGF	insulin growth factor	SEM	standard error of the mean
LA	linoleic acid	TAG	triacylglycerols
LCFA	long chain fatty acids	TMR	total mixed ratio
LNA	linolenic acid	UFA	volatile fatty acids
		VFA	unsaturated fatty acids

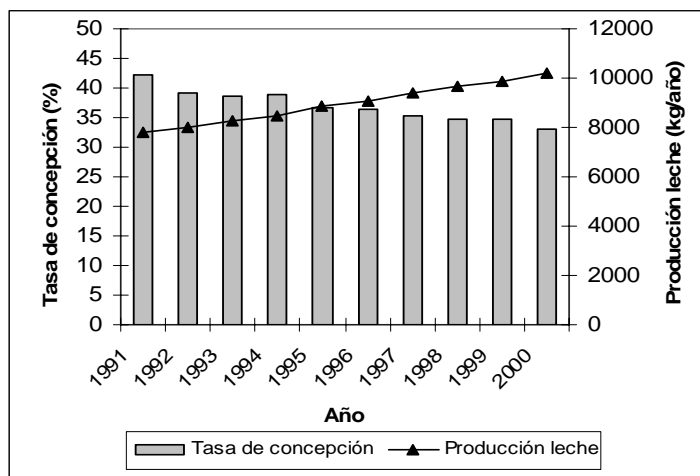
Capítulo I

Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

El inicio de la lactación supone una serie de cambios fisiológicos dramáticos para las vacas lecheras de alta producción. La producción de leche aumenta y las vacas no consumen lo suficiente para cubrir sus requerimientos energéticos por lo que se encuentran en un estado de balance energético negativo. Cuando la diferencia que existe entre la energía consumida en la dieta y la que se necesita para la síntesis de leche es excesiva se pueden producir pérdidas productivas, incidencia de patologías metabólicas y/o reducción de la eficacia reproductiva (Jenkins, 1998). Para intentar paliar este problema es necesario incrementar la densidad energética de las raciones. Esto puede conseguirse mediante la reducción de la relación forraje:concentrado, pero puede resultar en efectos negativos sobre la digestión y el porcentaje de grasa en leche como consecuencia de la aparición de acidosis y la reducción de la ingestión (Coppock y Wilks, 1991). Para incrementar esta densidad energética sin riesgo de provocar acidosis, la atención se ha dirigido a los suplementos grasos, ya que la concentración energética de las grasas es de dos a tres veces superior a la de los carbohidratos. La adición de grasa no sólo aumenta la concentración energética de las dietas y mejora los rendimientos productivos (Palmquist, 1996), sino que también se ha observado que puede influir positivamente sobre la reproducción (Staples *et al.*, 1998). Este efecto reproductivo de las grasas resulta muy interesante en los rebaños actuales, donde el aumento de producción de los últimos años se ha acompañado de una reducción de la fertilidad (Figura 1) (López-Gatius, 2003).

Figura 1. Relación inversa entre la producción de leche anual y la tasa de concepción en vacas lecheras en el norte de España. Adaptado de López-Gatius (2003).



Aunque esta reducción de la fertilidad se ha asociado con cambios hormonales relacionados con la intensa selección por producción de los últimos años (Nebel y Gilliard, 1993) y con el balance energético negativo postparto (Jenkins, 1998), existen evidencias de que las grasas en general (Staples *et al.*, 1998), y algunos ácidos grasos (AG) en particular (Staples *et al.*, 1998), pueden mejorar la fertilidad. Parte de esta bajada de fertilidad podría mejorarse reduciendo las pérdidas embrionarias, ya que hasta un 60% de los embriones se pierden entre la fertilización y el nacimiento (Moore y Thatcher, 2006).

En la actualidad, existe un gran interés en modificar el perfil de AG de la leche para responder a las demandas de los consumidores. Los ácidos grasos saturados (AGS) tienden a aumentar los niveles de colesterol plásmatico incrementando la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Hu *et al.*, 2001). La leche contiene alrededor de un 70% de AGS (Jenkins y McGuire, 2006), lo que motiva la necesidad de modificar su perfil hacia uno más insaturado. Además, algunos ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que se encuentran en cantidades insuficientes en la mayoría de dietas humanas como el ácido linolénico y algunos isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) parecen tener efectos beneficiosos para la salud humana (reducen la incidencia de cáncer, obesidad y diabetes, reducen la presión arterial y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, tienen propiedades antiinflamatorias, y mejoran la visión) (Parodi, 1999; Tricon *et al.*, 2005) por lo que el enriquecimiento de la leche con estos AG aportaría un valor añadido a ésta.

El enriquecimiento en AGPI de la leche a través de la dieta va a depender de la capacidad de estos AGPI de llegar como tales a nivel intestinal, donde van a poder ser absorbidos, ya que los AGPI aportados en la dieta se metabolizan en el rumen hacia AG más saturados en el proceso de biohidrogenación ruminal. La conversión de AG insaturados a saturados es incompleta y una amplia gama de intermediarios se pueden acumular a nivel ruminal (Harfoot y Hazlewood, 1988), entre ellos compuestos que pueden ser beneficiosos para la salud humana como el *cis*-9, *trans*-11 CLA, pero también otros que pueden afectar a la síntesis de grasa láctea por parte del animal como el *trans*-10, *cis*-12 CLA. Por todo esto, la biohidrogenación juega un papel fundamental en el aporte de AG beneficiosos para ser incorporados en la leche y es importante conocer qué factores pueden afectarla para de esta manera poder controlarlos. Además, las nuevas técnicas moleculares que identifican y cuantifican microorganismos según sus secuencias de rRNA, como la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-PCR), permiten estudiar cómo cambios en la dieta o en

las condiciones de fermentación pueden afectar a la población microbiana ruminal responsable del proceso de biohidrogenación, y pueden servir como herramientas para seleccionar una población microbiana ruminal más adecuada para conseguir nuestros objetivos de enriquecimiento.

Capítulo II

Revisión Bibliográfica

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. FUENTES DE GRASA PARA EL GANADO VACUNO LECHERO

1.1. ¿Qué son las grasas?

El término grasa se emplea generalmente para referirse tanto a grasas como a aceites. Las grasas y aceites son constituyentes tanto de las plantas como de los animales, y su función principal es la de actuar como fuentes de energía, aunque también actúan como aislantes térmicos. Ambos tienen la misma estructura general pero con diferentes propiedades físicas y químicas. Los aceites son líquidos a temperatura ambiente y más reactivos químicamente, mientras que las grasas tienen consistencia sólida o semisólida a temperatura ambiente. Químicamente hablando, grasas y aceites se clasifican como lípidos y constituyen el grupo más numeroso dentro de éstos.

1.1.1. Los lípidos

Los lípidos son un grupo de sustancias que se encuentran en los tejidos vegetales y animales y están formados básicamente por carbono, hidrógeno y, en menor proporción, oxígeno, aunque en ocasiones también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Los lípidos pueden actuar como transportadores de electrones, como transportadores de sustratos en reacciones enzimáticas, como componentes de las membranas biológicas, y como fuente y almacén de energía. Los lípidos constituyen un grupo de sustancias muy heterogéneas que comparten dos características: ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Una forma de clasificarlos sería basándose en si son saponificables (si forman jabones con sosa y potasa) o insaponificables (si no tienen dicha propiedad) (De Blas *et al.*, 1987):

Saponificables

<p>Ácidos grasos Glicéridos Fosfoglicéridos Esfingolípidos Glicolípidos Ceras</p>

Insaponificables

<p>Esteroides Terpenos Prostaglandinas</p>
--

Los lípidos presentes en los vegetales, desde un punto de vista funcional, son de dos tipos:

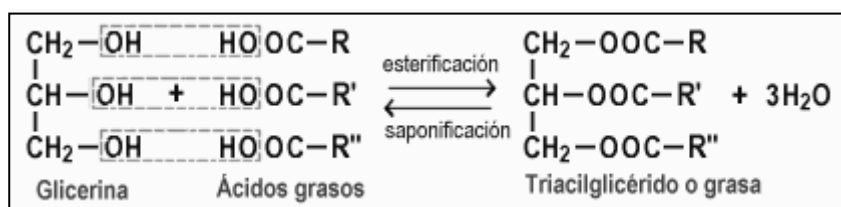
- Estructurales: forman parte de las membranas celulares y de las capas superficiales de protección de las hojas de las plantas.
- De reserva: son los lípidos que se encuentran en los frutos y semillas. La mayoría de este tipo de lípidos están en forma de triglicéridos.

Los lípidos predominantes en las plantas que almacenan energía en forma de hidratos de carbono, como los cereales, son los estructurales. En las plantas que almacenan energía en forma de lípidos, como las semillas de oleaginosas, los predominantes son los triglicéridos. En los animales, la principal reserva de energía son los lípidos que se encuentran en forma de grasa, que puede llegar a constituir el 97% del tejido adiposo en un animal obeso. Los lípidos estructurales (principalmente fosfoglicéridos) constituyen entre el 0,5 y 1% del tejido muscular y adiposo.

1.2. Estructura de las grasas

Las grasas o glicéridos son ésteres de AG con el alcohol trihídrico glicerol. Cuando los tres grupos alcohol se esterifican con AG se habla de triglicéridos. Aunque los triglicéridos son los más abundantes, los mono- y los diglicéridos también pueden ocurrir naturalmente, pero en menores cantidades. Estos glicéridos se forman en una reacción de esterificación donde cada AG se une a un alcohol mediante un enlace covalente y se libera una molécula de agua (Figura 1).

Figura 1. Esquema de formación de un triglicérido.

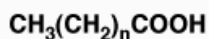


Los triglicéridos se clasifican en diferentes tipos según la naturaleza y la situación de los AG que los forman. Si los tres AG son los mismos se llaman triglicéridos simples, y si son diferentes se habla de triglicéridos mixtos. Las grasas y aceites naturales son mezclas de triglicéridos mixtos y simples. El aceite de lino, por ejemplo, presenta un 75 por ciento de

triglicéridos mixtos y un 25 por ciento de triglicéridos simples. Dependiendo del tipo de AG mayoritario presente en las grasas éstas se pueden clasificar como: saturadas (con presencia mayoritaria de AGS), monoinsaturadas (si la mayor parte de los AG que las forman son monoinsaturados) y poliinsaturadas (si la mayor parte de los AG son poliinsaturados). La composición en AG de los triglicéridos determina sus características físicas.

1.2.1. Los ácidos grasos

Los AG son moléculas formadas por una cadena hidrocarbonada lineal larga con un extremo de la cadena acabado en un grupo carboxilo (-COOH):

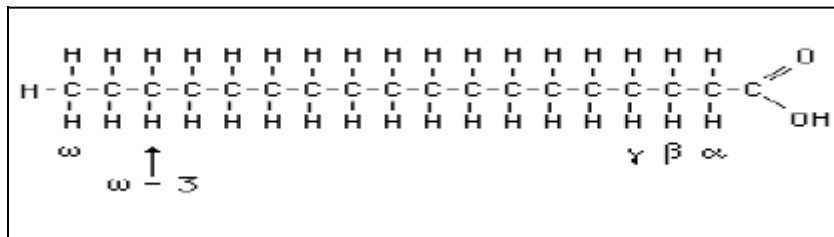


Los AG se diferencian por la longitud de su cadena de átomos de carbono (entre 4 y 22) y por el número de dobles enlaces que contienen. La gran mayoría de los AG, tanto de la dieta como del organismo, contiene de 16 a 18 átomos de carbono. Según el número de dobles enlaces que poseen se clasifican como: AGS si no contienen dobles enlaces, AG monoinsaturados (AGMI) si contienen un doble enlace y AGPI si presentan dos o más dobles enlaces. Mientras que los saturados suelen ser sólidos a temperatura ambiente, los insaturados suelen ser líquidos ya que tienen un punto de fusión más bajo que los saturados. Además, los insaturados son más reactivos químicamente. Cuando hay un doble enlace en la cadena pueden presentarse dos formas del AG en función de la disposición en el espacio de los átomos de hidrógeno unidos a los átomos de carbono del doble enlace:

- *Cis*: cuando los dos átomos de hidrógeno se encuentran en el mismo lado del doble enlace. La mayoría de los AG que se encuentran en la naturaleza son de este tipo.
- *Trans*: cuando se encuentran uno a cada lado.

Los AGPI se pueden clasificar, a su vez, en cuatro familias según donde se encuentre el primer doble enlace en la cadena empezando a contar por el extremo del grupo metilo (Figura 2): n-3 (o ω-3), n-6 (o ω-6), n-7 (o ω-7) y n-9 (o ω-9).

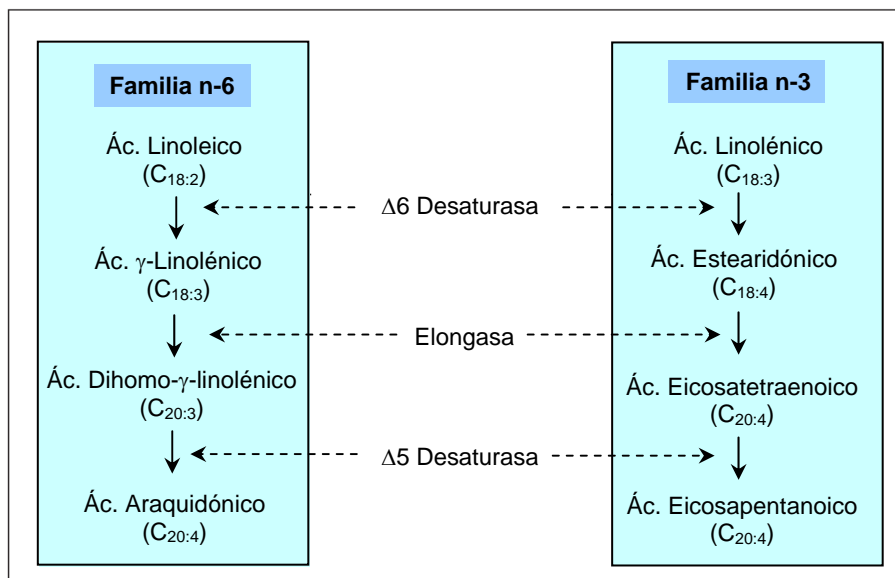
Figura 2. Los carbonos de la cadena hidrocarbonada se identifican como α , β , o γ si son el 1º, 2º o 3º carbono desde el grupo carboxilo o como ω desde el grupo metilo.



Los AG de la familia n-7 se sintetizan a partir del ácido palmítico ($C_{16:0}$) mientras que los de la familia n-9 lo hacen a partir del ácido esteárico ($C_{18:0}$). Estas dos familias no son consideradas esenciales ya que pueden sintetizarse en el propio cuerpo. En cambio, los AG n-3 y n-6 se consideran esenciales para el hombre, ya que son vitales para la salud y no pueden ser sintetizados en cantidad suficiente en nuestras células y, por tanto, deben ser administrados con los alimentos.

El ácido linoleico ($C_{18:2}$) pertenece a la familia n-6 mientras que el ácido linolénico ($C_{18:3}$) pertenece a los n-3 (Figura 3). Al procesar AG de una familia sólo pueden generarse AG de la misma familia. Por ejemplo, un AG de la familia n-3 no puede convertirse a uno de la familia n-6, y viceversa.

Figura 3. Ruta de síntesis de los ácidos grasos n-6 y n-3. Adaptado de Mattos *et al.* (2000).



El ácido linoleico y linolénico, como otros AGPI, forman parte de varias membranas y tienen un papel importante en el transporte de lípidos y en la actividad de ciertas enzimas lipoproteicas. Además, estos AG son los precursores de la síntesis de los eicosanoides, que incluyen las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos. Los eicosanoides son sustancias de tipo hormonal que regulan muchas funciones fisiológicas incluyendo la coagulación sanguínea, la presión sanguínea, la contracción de la musculatura lisa y la respuesta inmune. Estos AG esenciales son también la fuente de otros AG importantes de veinte carbonos como el ácido eicosapentanoico (EPA), hidroxieicosatrienoico y docosahexaenoico (DHA). El EPA es el precursor de las PG de la serie 3, de los tromboxanos y de los leucotrienos de la serie 5. El DHA se cree que juega un papel importante en la función cerebral y retinal. El EPA y el hidroxieicosatrienoico tienen un efecto modulador en la producción de eicosanoides a partir del ácido araquidónico.

1.3. Composición de las fuentes de grasa

El aporte principal de lípidos en las dietas de rumiantes son los forrajes y los granos de cereales, aunque el contenido en grasa de las dietas se puede aumentar usando suplementos grasos. Estos suplementos pueden clasificarse según su origen en animales, vegetales y mezclas. Dentro de las grasas de origen animal tenemos grasas poliinsaturadas (origen marino), grasas insaturadas (grasa de aves), moderadamente insaturadas (manteca de porcino), saturadas (sebo de vacuno) y mezclas de todas las anteriores. Asimismo, dentro de las grasas vegetales, los aceites de semillas procedentes del girasol, maíz o soja son más insaturados que los de oliva, palma o coco. Un tercer grupo de lípidos de interés creciente es el formado por subproductos de diversas industrias cuya materia prima original es la grasa. En este grupo están las oleínas (residuos del refinado de las grasas comestibles), las lecitinas (gomas de los procesos de refinado industrial), las grasas de freiduría (resultantes del reciclado de grasas comestibles), los subproductos industriales y los destilados procedentes de la industria del glicerol y otros (Mateos *et al.*, 1996).

Los forrajes contienen de un 4 a 6% del peso seco de los tejidos de las hojas como lípidos, la mayor parte de los cuales son glicolípidos y fosfolípidos. El contenido en lípidos de los concentrados es generalmente mayor que el de los forrajes y la mayor parte de ellos están presentes en forma de triglicéridos. En los AG de los forrajes abundan el ácido linoleico ($C_{18:2}$) y linolénico ($C_{18:3}$), mientras que las semillas de oleaginosas usadas en los

concentrados contienen sobretodo ácido linoleico ($C_{18:2}$) y oleico ($C_{18:1}$) (Tabla 1). En los suplementos grasos, que son subproductos de la industria animal y del refinamiento del aceite vegetal, los lípidos predominantes son los triglicéridos, mientras que las sales cálcicas están constituidas por AG libres.

En general, los aceites vegetales y marinos, sobretodo el aceite de pescado, son considerablemente más insaturados que las grasas de origen animal. Esto es debido a la presencia de cantidades variables de los ácidos linoleico y linolénico en estas fuentes más insaturadas, además del ácido oleico que es cuantitativamente el AG mayoritario en la mayoría de grasas naturales (McDonald *et al.*, 2002). Los aceites de pescado, además, tienen concentraciones significativas de ácidos altamente insaturados como el $C_{20:5}$ (EPA) y $C_{22:6}$ (DHA). En la grasa de origen animal, la proporción de ácidos grasos insaturados (AGI) es menor y hay mayores proporciones de AGS de alto peso molecular como el ácido palmítico ($C_{16:0}$) y esteárico ($C_{18:0}$), con menores pero significativas contribuciones de ácido láurico ($C_{12:0}$) y mirístico ($C_{14:0}$). Esta es la razón por la que estas grasas son firmes y duras, mientras que las anteriores son frecuentemente más blandas o líquidas.

Todas las fuentes de grasa poseen AG de cadena larga (C_{18} o más) mientras que las principales fuentes de AG de cadena media ($C_{12:0}$ - $C_{16:0}$) son la semilla de algodón y los aceites de palma. Las principales fuentes de ácido linolénico son la semilla de lino y los forrajes verdes. Así, por ejemplo, el ensilado de raigrás contiene hasta un 60% de ácido linolénico como porcentaje sobre el total de AG (Dewhurst y King, 1998). Por el contrario, las principales fuentes de ácido linoleico son la soja y la semilla de girasol.

Tabla 1. Composición en ácidos grasos (% del total de AG) de algunos suplementos grasos y de otros productos utilizados en la nutrición de rumiantes. Adaptado de Dhiman *et al.* (2005).

Alimento**	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	Otros*
AG, % del total de AG								
Pasto								
Gramíneas	0,5	19,2	0,2	1,6	2,2	20,4	55,9	0
Trébol	0,5	22,9	0,3	3,4	3,6	21,1	48,2	0
Gram.+legum.	1,5	20,0	1,2	2,6	4,2	18,9	51,6	0
Ensilado								
Gram.	5,4	24,0	0,6	2,9	6,3	14,5	46,2	0
Maíz	1,1	15,2	0,5	3,5	18,9	40,9	6,1	13,8
Heno alfalfa	1,2	22,9	0,4	4,0	4,9	18,1	23,5	25,0
Concentrados								
Cebada	0	27,6	0,9	1,5	20,5	43,3	4,3	1,9
Maíz	0	16,3	0	2,6	30,9	47,8	2,3	0
Avena	0	22,1	1,0	1,3	38,1	34,9	2,1	0,5
Trigo	0	20,0	0,7	1,3	17,5	55,8	4,5	0,2
Subproductos								
Gluten meal	0	17,2	0,9	0,8	26,7	53,0	1,4	0
DDG	0	15,6	0	2,7	24,2	54,5	1,8	1,2
Semillas oleag.								
Soja	0	11,0	0	3,8	23,3	54,5	5,9	1,5
Soja ext.	0	14,5	0	3,8	19,5	53,2	9,1	0
Algodón ext.	0	23,4	0,5	2,2	16,5	57,4	0	0
Girasol	0	4,0	0	5,4	21,2	69,4	0	0
Cacahuete	0	12,3	0	3,2	51,5	30,2	0	2,8
Semilla lino	0	6,5	0	4,0	22,7	15,4	51,4	0
Aceite pescado	8,0	22,0	11,0	3,0	21,0	2,0	1,0	32,0
Grasa animal	3,2	24,8	5,3	14,5	45,9	5,9	0,3	0

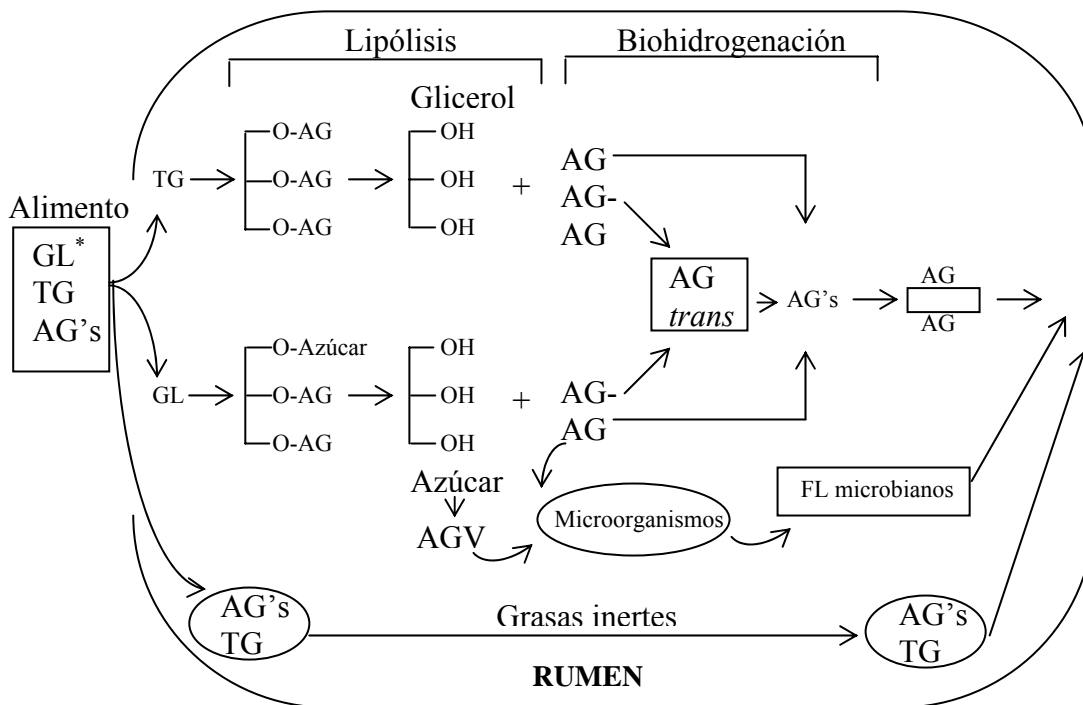
*Otros AG presentes en el aceite de pescado son C_{20:5} (14%), C_{22:6} (10%), y otros AGPI (8%).

**Gram. = gramíneas, legum. = leguminosas, DDG = granos de destilería, oleag. = oleaginosas, extr. = extrusionada.

1.4. Digestión ruminal de las grasas

Las grasas sufren un extenso metabolismo a nivel ruminal, lo cual resulta en una marcada diferencia entre el perfil de AG de la dieta (mayoritariamente insaturado) y el que abandona el rumen (mayoritariamente saturado). Los dos principales procesos que ocurren en el rumen son la hidrólisis de los enlaces éster de los lípidos (o lipólisis) y la biohidrogenación de los AGI (Bauman *et al.*, 2003). Además, las bacterias sintetizan AG *de novo* a partir de precursores carbonados, por lo que los lípidos que alcanzan el duodeno están compuestos de AG de origen dietario y microbiano.

Figura 4. Esquema de los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal. Adaptado de Bauman *et al.* (2003).



* Abreviaciones: GL: glucolípidos; TG: triglicéridos; AG's: mezcla de ácidos grasos; AG-: ácidos grasos insaturados; FL: fosfolípidos; AGV: ácidos grasos volátiles; \square AG: ácidos grasos unidos a partículas de alimento.

1.4.1. Lipólisis

El primer paso que ocurre cuando los lípidos llegan al rumen es la hidrólisis de los enlaces éster de los triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos, siendo este paso un requisito para

la biohidrogenación de los AGI. Las lipasas responsables de esta hidrólisis han sido aisladas de diferentes cepas bacterianas. Los protozoos no participan en gran medida en este proceso a excepción de la lipólisis de los fosfolípidos. Las lipasas salivares presentes en los rumiantes y las procedentes de las plantas también tienen una actividad muy baja. La hidrólisis es un proceso extracelular, y el glicerol y los azúcares que se liberan son rápidamente metabolizados por las bacterias ruminales que los convierten a ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente propionato y butirato. Los productos finales de la hidrólisis son AG libres y no se han encontrado otros compuestos intermediarios, como mono- o diglicéridos, en contenidos ruminales.

Moate *et al.* (2004) desarrollaron un modelo matemático utilizando datos de varios trabajos publicados para calcular la tasa de lipólisis de diferentes ingredientes usados en las dietas de rumiantes (Tabla 2). El grado de lipólisis es muy alto para la mayoría de lípidos no protegidos: 0.85-0.95. Sin embargo, diferentes factores tales como el pH ruminal bajo, el aumento del nivel de grasa dietaria y la presencia de antibióticos pueden afectar al grado y tasa de lipólisis al afectar al crecimiento y actividad de las bacterias involucradas en este proceso (Bauman *et al.*, 2003).

La bacteria ruminal que ha sido identificada como responsable mayoritaria de los procesos de lipólisis de los triglicéridos es *Anaerovibrio lipolytica* mientras que la que hidroliza fosfolípidos y glicolípidos (presentes en los forrajes) es *Butyrivibrio fibrisolvens* (Harfoot y Hazlewood, 1988). *A. lipolytica* produce una esterasa ligada a la célula y una lipasa que muestra actividad ante triglicéridos y AG esterificados. La lipasa es una enzima extracelular que se encuentra almacenada en partículas membranosas compuestas de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La actividad fosfolipasa de *B. fibrisolvens*, sin embargo, se encuentra asociada a la célula. Ambas enzimas tienen su actividad máxima a pH comprendidos entre 6,5 y 7,5. A pesar de la alta actividad lipasa de *A. lipolytica*, su actividad esterasa general es menor que la de muchas bacterias no lipolíticas. Fay *et al.* (1990) identificaron 74 cepas de bacterias ruminales que fueron capaces de hidrolizar el enlace éster del p-nitrofenilpalmitato, aunque cepas lipolíticas conocidas como *A. lipolytica* y *B. fibrisolvens* tuvieron niveles bajos de hidrólisis en dicho ensayo. Además, bacterias con actividad esterasa general no son necesariamente capaces de hidrolizar los ésteres lipídicos. Por ejemplo, Hespell y O'Bryan-Shah (1988) encontraron una gran

variedad de bacterias ruminales con actividad esterasa, incluyendo 30 cepas de *B. fibrisolvens* pero sólo unas pocas bacterias pudieron hidrolizar AG de cadena larga.

Tabla 2. Tasa de lipólisis de la grasa de algunos ingredientes utilizados en la nutrición de rumiantes. Adaptado de Moate *et al.* (2004) .

Alimento	Expts ¹	Dietas ²	K ³	L ⁴	Klip ⁵	Lipolisis ⁶
Ensilado maíz	6	28	500	0	500	0,99
Heno alfalfa	1	5	65	0	65	0,93
Maíz	1	3	35	0	35	0,83
Maíz molido	6	26	309	0	309	0,98
Cebada	1	5	29	0	29	0,81
Cascarilla soja	1	4	17	0	17	0,77
Algodón	1	2	500	0	500	0,99
Colza picada	1	2	500	0	500	0,99
Harina soja	4	19	500	0	500	0,99
Soja (extrusionada)	2	2	29	0	29	0,81
Soja (entera, cruda)	1	1	9	0	9	0,56
Soja (entera, tostada)	1	1	16	0	16	0,70
Soja (molida, tostada)	1	1	35	0	35	0,83
Harina pescado	1	2	23	0	23	0,77
Aceite girasol	1	2	52	0	52	0,88
Sebo	1	1	500	0,37	79-500	0,92-0,99
Megalac	3	5	6	0	6	0,47

¹ Número de experimentos donde se utilizó este ingrediente.

² Número de dietas que utilizaron este ingrediente.

³ K es la tasa de lipólisis (%/h) sin corregir los efectos del nivel de AG en el ingrediente.

⁴ L es la constante que describe el efecto del nivel de AG en el ingrediente.

⁵ Klip (%/h) = $K * \text{Exp}(-L * \text{TLCFA} \%)$, donde TLCFA es el % de la dieta que corresponde a ácidos grasos de cadena larga que provienen del ingrediente.

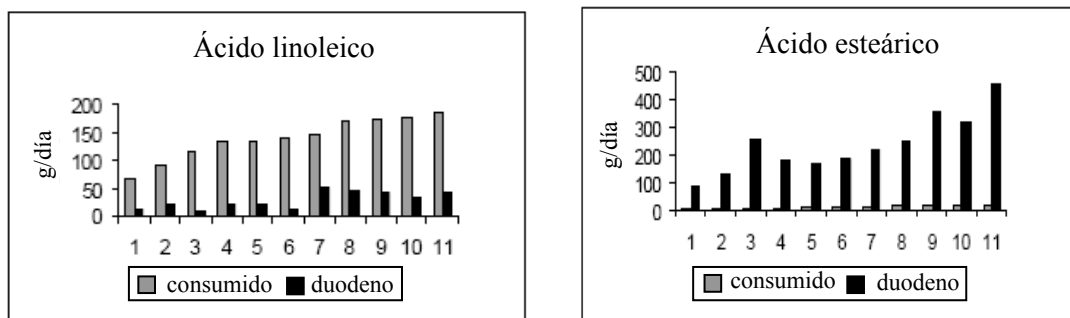
⁶ $\text{Klip}/(\text{Klip} + \text{Kp})$, asumiendo que Kp es 7%/h para los concentrados y 5%/h para los forrajes.

1.4.2. Biohidrogenación ruminal

La biohidrogenación de los AGI es la segunda transformación que los lípidos dietarios sufren en el rumen. Para que la biohidrogenación se produzca es necesario que haya un grupo carboxilo libre en el AG, por lo que la lipólisis debe preceder a la biohidrogenación,

y ésta se verá influida por el grado de lipólisis, por lo que las tasas de biohidrogenación serán menores que las de lipólisis y los factores que afecten a la lipólisis también afectarán a la biohidrogenación. Los AG liberados de la lipólisis se adsorben a las partículas de alimento, ya que la mayor parte de la biohidrogenación (>80%) ocurre en asociación con las partículas de alimento, donde son hidrogenados y/o incorporados a la fracción lipídica de las bacterias de la fase sólida (Demeyer y Doreau, 1999). La biohidrogenación ruminal reduce claramente la cantidad de AGI de origen dietario que llega al intestino delgado de la vaca. La ingestión de ácido linoleico en vacas lecheras va desde unos 70 a 200 g/d y sólo de unos 10 a 50 g de ácido linoleico alcanzan el intestino delgado al día. Y en cambio, hasta unos 500 g de ácido esteárico llegan cada día, incluso cuando sólo unos gramos de ácido esteárico son consumidos por el animal (Figura 5). Por tanto, el ácido esteárico es el principal AG absorbido en vacas, independientemente de la cantidad de AGI consumidos en la dieta. Sin embargo, la biohidrogenación ruminal no es siempre completa y aproximadamente de un 10 a 25% de los AGI ingeridos pueden quedar sin modificar para ser absorbidos a nivel intestinal y ser transportados a los tejidos (Staples *et al.*, 1998).

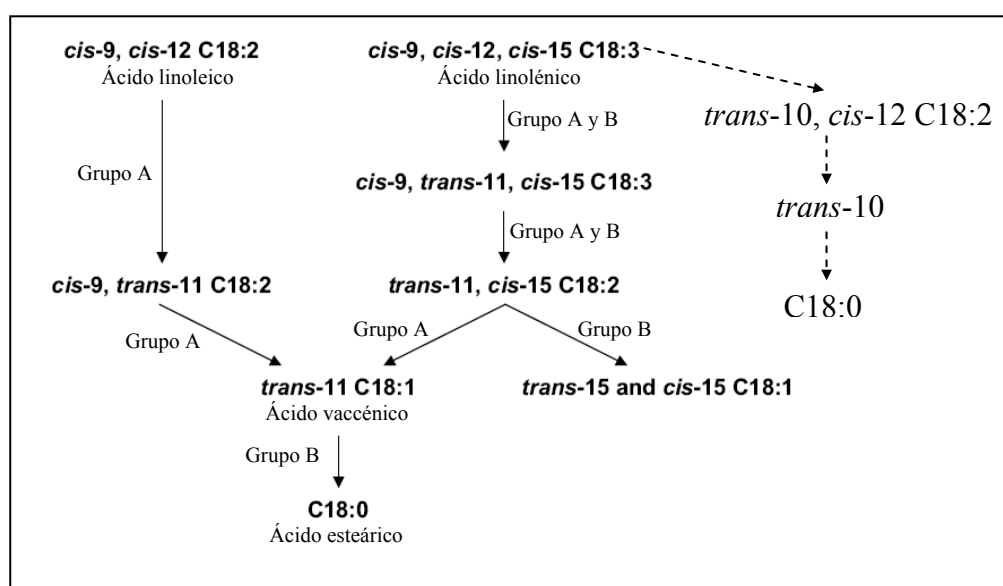
Figura 5. Ingestión diaria vs. flujo duodenal de ácido linoleico y esteárico en vacas lecheras alimentadas con dietas sin grasa añadida. Adaptado de Jenkins (2004).



Los principales sustratos de la biohidrogenación ruminal son el ácido linoleico y linolénico (Figura 6) y la tasa de biohidrogenación ruminal aumenta al aumentar la insaturación de los AG. El paso inicial de la biohidrogenación ruminal consiste en la isomerización del doble enlace *cis*-12 a una configuración *trans*-11 resultando en un AG conjugado di- o trienoico (Figura 6). Después se produce una reducción del doble enlace *cis*-9 resultando en un AG *trans*-11. Y el paso final es una hidrogenación del doble enlace *trans*-11 para producir ácido esteárico (vías del ácido linoleico y linolénico) o *trans*-15

C_{18:1} (vía del ácido linolénico). El último paso de la biohidrogenación se considera el paso limitante de todo el proceso (Harfoot and Hazlewood, 1988). En el caso del ácido oleico se observó, *in vitro* (Mosley *et al.*, 2002), que podía ser o no hidrogenado, isomerizado a *trans*-C_{18:1} con dobles enlaces en las posiciones 6 hasta 16 de la cadena carbonada, o hidrogenado directamente hasta C_{18:0}.

Figura 6. Proceso de biohidrogenación ruminal. Adaptado de Bauman *et al.* (2003).



En estudios recientes, se han identificado más de 10 isómeros posicionales de AG *trans*-C_{18:1} y más de una docena de isómeros del CLA en contenidos intestinales de rumiantes, confirmando que las vías de biohidrogenación no son siempre completas. Bauman y Griinari (2001) observaron que en los casos en los que se incluía un aporte de AGPI en las dietas y se alteraban los procesos microbianos ruminales se producían alteraciones en los procesos normales de biohidrogenación, produciéndose intermediarios como el *trans*-10 C_{18:1} y el *trans*-10, *cis*-12 CLA (Figura 6). Se ha observado (Bauman *et al.*, 2003) que estas alteraciones en los procesos de biohidrogenación se producen en dos situaciones: cuando se utilizan dietas pobres en fibra y ricas en AGPI, y cuando se utilizan aceites de pescado en las dietas de rumiantes.

Doreau y Ferlay (1994), en una extensa revisión, mostraron que la tasa de biohidrogenación del ácido linolénico varió del 0,85 al 1,0 con un valor medio del 0,92, mientras que la tasa de biohidrogenación del ácido linoleico varió del 0,70 al 0,95, con una

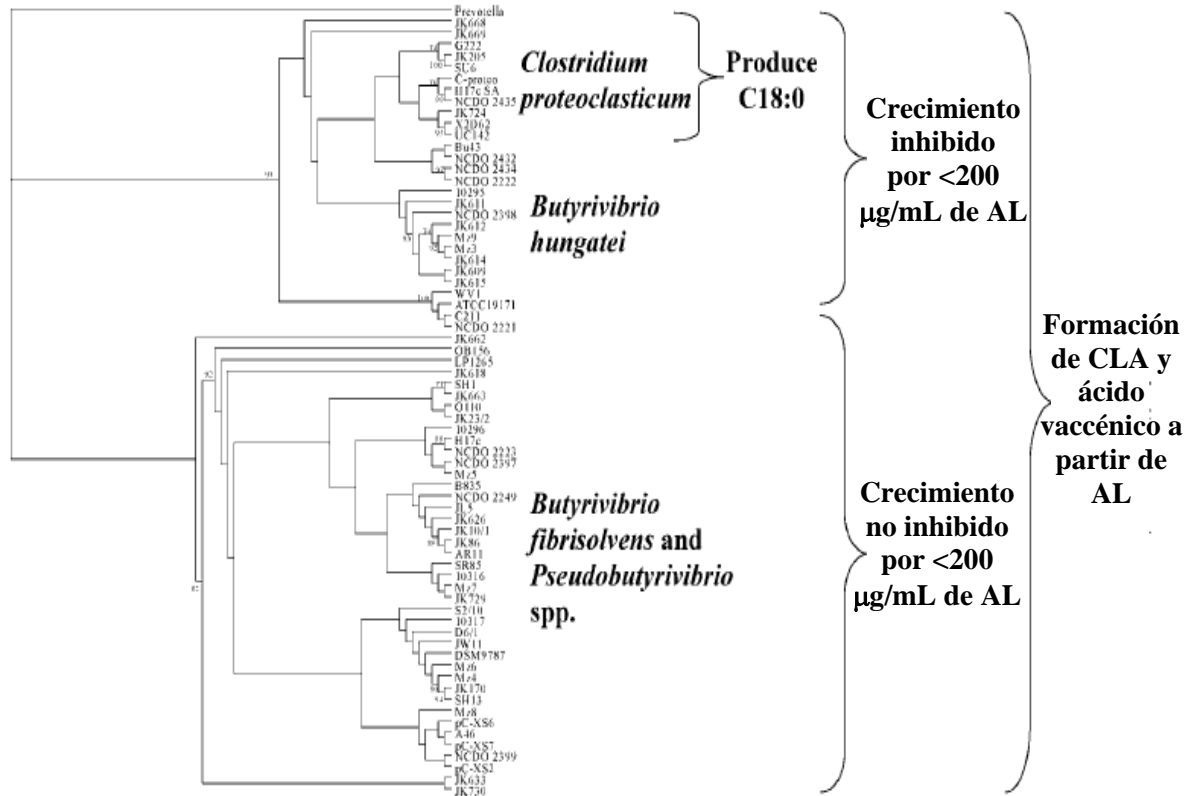
media del 0,80. También observaron que en estudios donde se usaba un alto nivel de concentrado en las dietas (70 a 93% MS), los valores de biohidrogenación fueron más bajos (0,40-0,70 para el linolénico y 0,50-0,70 para el linoleico). La biohidrogenación también se afecta negativamente cuando se añade una gran cantidad de lípidos no protegidos en la dieta (Bauman *et al.*, 2003), cuando se añaden ionóforos (Fellner *et al.* 1997), o cuando se reduce el pH ruminal, aunque la biohidrogenación es menos sensible que la lipólisis (Van Nevel y Demeyer, 1996). También se ha observado que es posible afectar selectivamente diferentes pasos del proceso de biohidrogenación. Por ejemplo, los suplementos de aceite de pescado inhiben el último paso de la biohidrogenación, incrementando el flujo de AG trans C_{18:1} y reduciendo el de ácido esteárico (Wachira *et al.*, 2000; Shingfield *et al.*, 2003).

En los primeros estudios microbiológicos, se identificó a *Butyrivibrio fibrisolvens* como la bacteria capaz de biohidrogenar el ácido linoleico y formar CLA y AG *trans* como intermediarios (Polan *et al.*, 1964). Sin embargo, se observó que no era capaz de formar ácido esteárico a partir de ácido linoleico. En estudios posteriores, se identificaron otras bacterias que también eran capaces de biohidrogenar AG (Kemp *et al.*, 1975; Hazlewood *et al.*, 1976). Estas bacterias fueron clasificadas por Kemp y Lander (1984) en dos grupos, A y B. Para obtener una biohidrogenación completa de los AGPI es necesaria la presencia de ambos grupos bacterianos (Figura 6). El grupo A hidrogena mayoritariamente el ácido linoleico y linolénico a *trans*-11 C_{18:1} o a otros isómeros posicionales del mismo ácido, aunque algunas cepas también producen *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} a partir del ácido linolénico. Las bacterias del grupo A parecen incapaces de hidrogenar los AG C_{18:1}, contrariamente a las bacterias del grupo B, que hidrogenan una gran variedad de isómeros *cis* y *trans* C_{18:1} a ácido esteárico (C_{18:0}).

Butyrivibrio fibrisolvens es un nombre que se ha utilizado para identificar genética y funcionalmente diversos grupos de bacterias Gram positivas. Por esta razón, recientemente, Paillard *et al.* (2007a) utilizaron 45 cultivos de diferentes especies del grupo *Butyrivibrio* y estudiaron sus productos de fermentación, su mecanismo de formación de butirato, su metabolismo lipídico y su sensibilidad a la inhibición del crecimiento por el ácido linoleico. De esta manera pudieron dividir estos cultivos en tres claros subgrupos (tanto filogenética como metabólicamente): el grupo VA1 tipificaba a la mayoría de cultivos de *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrovibrio*, mientras que los grupos VA2 y SA estaban

formados por *Butyrivibrio hungatei* y *Clostridium proteoclasticum* (Figura 7). Varias características fenotípicas se correspondían con la posición de las diferentes bacterias en el árbol filogenético. Así, la actividad lipasa era mayor en VA2 y SA que en cepas VA1. Todas las cepas del árbol eran capaces de formar ácido vaccénico a partir de ácido linoleico, incluso aquellas que crecían muy débilmente o que formaban *cis*-9, *trans*-11 CLA. Sin embargo, sólo las bacterias SA producían ácido esteárico. En cuanto a la sensibilidad de las bacterias a la inhibición de su crecimiento por el ácido linoleico, las cepas VA1 crecían después de 96 horas en 200 µg/ml de ácido linoleico, mientras que VA2 y SA eran mucho más sensibles. De estos resultados, Paillard *et al.* (2007a) concluyeron que los grupos SA y VA2 son genética y fenotípicamente diferentes de VA1 y de otras bacterias relacionadas productoras de butírico. La única característica fenotípica que separa a los grupos SA y VA2 es la producción de ácido esteárico a partir de ácido linoleico. Wallace *et al.* (2006) realizaron un *screening* de 400 bacterias ruminales aisladas de ovejas y estudiaron su metabolismo del ácido linoleico. Todas las bacterias que producían cantidades substanciales de *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-11 C_{18:1} o ambos a partir de ácido linoleico eran productoras de butírico. Sin embargo, no todas las productoras de butirato formaban estos intermediarios. Sólo las bacterias del grupo *B. fibrisolvens* formaron *cis*-9, *trans*-11 CLA o *trans*-11 C_{18:1}. Sin embargo, los productores de butirato *Eubacterium* y *Clostridium* spp., no los formaron. Además, observaron que algunas de las bacterias que formaron CLA, *trans*-11 C_{18:1} o ambos, también formaron ácido esteárico. Los análisis filogenéticos realizados basados en la secuencia 16S rRNA indicaron que estos productores de esteárico hacían “cluster” en una rama con *C. proteoclasticum*.

Figura 7. Árbol filogenético basado en la secuencia 16S rRNA de diferentes bacterias relacionadas con *Butyrivibrio*, su metabolismo del ácido linoleico (AL) y su inhibición del crecimiento por sensibilidad al AL. Adaptado de Jenkins *et al.* (2008).



1.4.3. Formación de ácidos grasos bacterianos

Las bacterias ruminales pueden sintetizar y/o incorporar AG del medio a sus membranas celulares (Demeyer y Doreau, 1999). Cuando hay gran cantidad de AG libres disponibles, la incorporación supera la síntesis, mientras que lo contrario ocurre en ausencia de lípidos añadidos (Bauchart *et al.*, 1990). Las bacterias ruminales se caracterizan por tener una gran proporción de AGs en su composición, sobretodo C_{16:0} y C_{18:0} (Katz y Keeney, 1966; Bas *et al.*, 2003), que provienen tanto de la incorporación de los lípidos dietarios como de la síntesis *de novo*. Además, los AG bacterianos contienen varios mono- (e.j., *trans*-10 C_{18:1}, *trans*-11 C_{18:1}) y poliinsaturados AG C₁₈ (e.j. *cis*-9, *trans*-11 C_{18:2}, *trans*-10, *cis*-12 C_{18:2}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}) (Katz y Keeney, 1966) derivados de la biohidrogenación de los AG dietarios C_{18:2n-6} y C_{18:3n-3}. Además, las bacterias ruminales se caracterizan por tener una gran proporción de AG de cadena impar y ramificados en sus membranas lipídicas (C_{15:0}, *iso* C_{15:0}, *anteiso* C_{15:0}, C_{17:0}, *iso* C_{17:0}, *anteiso* C_{17:0}) (Bas *et al.*, 2003). Incluso parece que

las bacterias son capaces de sintetizar (*de novo*) AG ramificados de cadena par (sobretudo *iso* C_{14:0} y *iso* C_{16:0}) (Bas *et al.*, 2003). Jenkins (1993) estimó que la síntesis de lípidos microbianos era de unos 15 g/kg de MO digerida en el rumen libre de grasa. Aproximadamente del 85 al 90% de los AG que dejan el rumen son AG libres y del 10 al 15% son fosfolípidos microbianos. Los protozoos no son capaces de producir CLA y *trans*-11 C_{18:1} ellos mismos, pero pueden influir en la disponibilidad de estos AG para el animal, ya que se ha observado que los protozoos incorporan preferencialmente en sus membranas CLA y *trans*-11 C_{18:1} formados por las bacterias que tienen fagocitadas en su interior y algunos protozoos ciliados son retenidos selectivamente en el rumen, por lo que de esta manera van a interferir en el flujo que llega al duodeno de estos AG, y en su posterior incorporación a carne y leche (Jenkins *et al.*, 2008).

1.5. Tipos de grasa según sus efectos a nivel ruminal

Desde el punto de vista fisiológico ruminal, la manera más útil de clasificar los diferentes suplementos grasos en las raciones de rumiantes es según sus efectos a nivel ruminal. A la hora de clasificarlos se consideran dos aspectos: por un lado, cómo afecta la fuente de grasa a la digestibilidad de los otros nutrientes de la ración y, por otro lado, en qué grado la grasa resiste a la biohidrogenación ruminal. Según estos criterios podemos clasificar las grasas como reactivas a nivel ruminal e inertes a nivel ruminal.

1.5.1. Grasas reactivas

Las grasas de la ración pueden sufrir modificaciones a nivel ruminal, ya explicadas anteriormente, como la lipólisis y la biohidrogenación. Estos procesos ocurren en las grasas que son reactivas a nivel ruminal, y tienen el potencial de interferir con la fermentación microbiana en el rumen y reducir la digestibilidad de otros nutrientes. La fracción más susceptible a esta acción de las grasas es la fibra. Generalmente, los AGI deprimen en mayor grado la digestibilidad de la fibra que los saturados. Entre las grasas reactivas a nivel ruminal se incluyen las semillas o aceites de oleaginosas (algodón, soja, canola, girasol, etc.), las grasas de origen animal como el sebo y la grasa animal, aunque éstas son menos reactivas por ser ricas en AGS, y los subproductos con un contenido en grasa elevado. Las grasas reactivas sufren el proceso de biohidrogenación por microorganismos ruminales y, normalmente, tienen poco impacto a la hora de modificar el

perfil de AGI de la leche, por lo que los AGI deben ser adicionados en alguna forma que resista la biohidrogenación ruminal para poder aumentar el grado de insaturación de la leche (Kennelly, 1996). Las grasas reactivas a nivel ruminal serían, en cambio, adecuadas para aumentar el contenido en leche de intermediarios de la biohidrogenación (como el CLA o el *trans*-11 C_{18:1}), ya que, en este caso, sería necesaria cierta biohidrogenación ruminal para obtener estos productos intermediarios.

1.5.2. Grasas inertes

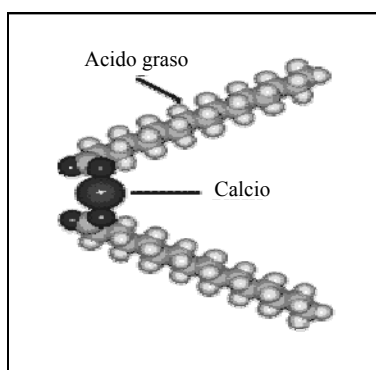
Las grasas inertes, mal llamadas protegidas o *by-pass*, engloban a un grupo de productos diseñados para rumiantes caracterizados por tener un efecto inhibitorio mínimo sobre el metabolismo de las bacterias Gram positivas y protozoos, con poco o ningún efecto negativo sobre la digestibilidad del resto de componentes de la ración. Esta protección se obtiene sin detrimento aparente de su digestibilidad intestinal, pudiendo modificar así el perfil de AG de la leche y los tejidos (Mateos *et al.*, 1996). Aunque sean consideradas inertes a los niveles usados, estas grasas aún pueden ser hidrolizadas si son triglicéridos o hidrogenadas si son insaturadas a nivel ruminal, aunque este proceso ocurre lentamente. Las grasas consideradas inertes son sales que tienen un pKa bajo, y por esta razón son poco solubles en el rumen a un pH normal. Las grasas inertes existentes en el mercado corresponden principalmente a dos grandes grupos: los jabones cálcicos y las grasas parcialmente hidrogenadas. Una ventaja importante de este tipo de grasas es su naturaleza sólida, lo que permite su uso en fábricas pequeñas sin instalaciones para líquidos o bien directamente en granja, sobre pesebre o en carro mezclador.

Los jabones cálcicos resultan de la saponificación de los AG libres con iones de calcio (Figura 8). A pH normales del rumen (> 6,0), estos jabones permanecen sin disociar, son insolubles en el líquido ruminal y, por tanto, inertes. En el abomaso, sin embargo, el pH disminuye por lo que se disocian, dando lugar a calcio y a los AG libres correspondientes que son entonces digeridos y absorbidos mayoritariamente en el yeyuno. Los jabones cálcicos permiten que una mayor proporción de AGI alcance el intestino delgado, con lo que la digestibilidad intestinal de la grasa aumenta. Aunque en la mayoría de los casos estos jabones cálcicos no afectan el metabolismo microbiano ruminal, en ocasiones, como consecuencia de un pH ruminal bajo o de una gran cantidad de AGI en el jabón, puede producirse la disociación de la sal cálcica, pudiéndose de esta manera afectar al

metabolismo microbiano ruminal y a la tasa de hidrogenación de los AG que formen el jabón cálcico (Demeyer y Doreau, 1999). Entre los inconvenientes de los jabones cálcicos cabe destacar su baja palatabilidad (son jabones) y su alto contenido en calcio (aproximadamente del 10 al 15%) (Chouinard *et al.*, 1998).

La mayoría de las grasas cálcicas disponibles en el mercado se fabrican a partir de AG destilados de palma, aunque existe la posibilidad de fabricar jabones cálcicos con aceites de otros orígenes (coco, pescado, girasol, etc.), pero los jabones cálcicos de AGI son más inestables. La biohidrogenación de AG C₁₈ *in vitro* fue del 0,47 en dietas que contenían jabones cálcicos de aceite de palma y del 0,71 en dietas que contenían una mezcla de grasa vegetal y animal (Wu *et al.*, 1991). También, se observó que al utilizar jabones cálcicos de ácido linoleico en las dietas de ovejas no se aumentó el flujo de AGI al duodeno (Fotouhi y Jenkins, 1992). Chouinard *et al.* (1998) observaron que la adición de AGI en forma de jabones cálcicos en las dietas de vacas lecheras no aumentó la cantidad de estos AGI en la leche, por lo que concluyeron que estos jabones cálcicos no protegieron los AGI de la biohidrogenación a nivel ruminal. Fotouhi y Jenkins (1992) propusieron que los jabones cálcicos de AGI se debían proteger de la disociación a nivel ruminal encapsulando estos AGI dentro de una matriz insoluble de jabones cálcicos de AGS, lo cual limita la cantidad de AGI que pueden ser incorporados en carne o leche.

Figura 8. Estructura química de un jabón cálcico.



Por otro lado, el proceso por el que se obtienen grasas hidrogenadas consiste en hidrogenar parcialmente los dobles enlaces de diversas fuentes lipídicas a fin de elevar su punto de fusión, reduciendo de esta forma su reactividad en el rumen por ser más insolubles. Las principales fuentes lipídicas utilizadas en la confección de estas grasas son las oleínas de

palma y sebo. El problema a considerar con este tipo de grasas es que la hidrogenación de los AG, especialmente de los de cadena larga, reduce su digestibilidad en el intestino delgado. Algunas de las ventajas de estas grasas inertes son su mayor estabilidad por ser más saturadas, su mayor palatabilidad y su mayor contenido en grasa respecto a los jabones (Mateos *et al.*, 1996).

Otras estrategias de protección se basan en envolver una matriz de AGI con una cápsula protectora, como proteínas tratadas con formaldehído, por ejemplo la caseína, que protege los AGI de la biohidrogenación. Otra posibilidad consiste en modificar químicamente los AGI para transformarlos en formas que resistan la biohidrogenación, como las amidas. Esta estrategia se basa en la baja tasa de degradación de las amidas por poblaciones bacterianas, y en el bloqueo del grupo libre carboxilo de la grasa necesario para que se lleve a cabo la biohidrogenación por parte de los microorganismos ruminales.

A pesar de las diferencias comentadas entre grasas reactivas e inertes a nivel ruminal, algunas fuentes de grasa pueden clasificarse en los dos grupos anteriores. Por ejemplo, a niveles normales de suplementación, el sebo no produce problemas de digestión de la fibra y se consideraría inerte. Sin embargo, cuando se incluye a niveles elevados, la frecuencia de problemas de digestibilidad es mucho mayor que para las grasas inertes y se consideraría reactiva. Así, las semillas enteras de oleaginosas también ofrecen algo de protección de la biohidrogenación al tener una cubierta externa dura que impide que los microorganismos ruminales puedan acceder a los AG y podrían también considerarse grasas protegidas. Ahora bien, al procesar estas semillas se puede afectar el grado de protección, ya que al alterar la cubierta externa podemos exponer el aceite a la población microbiana. Esta cubierta se puede alterar suficientemente con la masticación y la rumia o por técnicas de procesado como la extrusión o la molienda. Por este motivo, el efecto sobre el perfil de AG de la leche es menor si se ofrecen las semillas procesadas que si se ofrecen las semillas enteras (Kennelly, 1996), ya que al procesar las semillas se rompen las cubiertas de protección y esto hace que los AG estén más disponibles para ser biohidrogenados, de manera que el perfil de AG que llegue al intestino será diferente del de la semilla y la modificación del perfil de los AG lácteos será diferente del esperado al administrar aquella semilla entera.

2. UTILIZACIÓN DE SUPLEMENTOS GRASOS EN GANADO VACUNO LECHERO

Las demandas energéticas de las vacas lecheras durante los primeros 80 a 100 días postparto superan la ingestión de energía. Para incrementar la densidad energética de las raciones sin riesgo de provocar acidosis se pueden utilizar suplementos grasos. Las dietas convencionales para vacas lecheras sin grasa añadida o sin ingredientes ricos en grasa contienen menos de un 3% de extracto etéreo, y esta grasa proviene generalmente del forraje y de los granos de cereales. En general, la grasa dietaria total no debería sobrepasar el 6-7% de la MS (Bauman *et al.*, 2003). Alimentar con concentraciones mayores de grasa puede ocasionar reducciones de la ingesta de MS, aunque las grasas utilizadas tengan poco efecto a nivel ruminal. Jenkins (1997) desarrolló algunas guías que permiten orientar sobre la cantidad máxima de grasa a suplementar en las dietas de vacas lecheras. Jenkins (1997) evaluó de forma individual y combinada varias variables de la dieta (FND, FAD y PB) y de la grasa a suplementar (% grasa total añadida, % AGPI, % AGI) para estudiar cómo éstas se correlacionaban con la respuesta en producción de leche obtenida al suplementar con grasas las dietas, y de esta manera calcular el porcentaje óptimo de grasa a incluir en las dietas para maximizar la producción de leche. El mejor predictor fue la ratio (AGI de la grasa/FAD de la dieta), y la producción de leche se relacionó inversamente con dicha ratio, por lo que se asume que el factor principal que va a limitar la producción de leche al utilizar grasas en las dietas son los problemas de digestibilidad de la fibra. Jenkins (1997) propuso la siguiente fórmula:

$$\% \text{ máximo de grasa añadida (\% de MS)} = (6 \times \text{FAD}) / (\text{AGI})$$

donde FAD debe estar expresada como % de MS de la dieta y AGI sería la suma de C_{18:1}, C_{18:2} y C_{18:3} expresado como % del total de AG en el suplemento graso. Sin embargo, la cantidad óptima de grasa a incluir en las dietas de vacas lecheras dependerá de muchos factores, incluyendo el tipo de grasa, la composición de la dieta basal, el estado de lactación, el ambiente, el nivel de producción de leche y el manejo de la alimentación.

En cuanto a cuál sería el momento de la lactación en que sería conveniente suplementar con grasa, desde un punto de vista productivo Jerred *et al.* (1990) y Chilliard (1993) observaron que suplementar con grasa al inicio de la lactación no tuvo efecto en la producción de leche ni en el balance energético de vacas lecheras, porque la ingestión de

MS se redujo al aumentar la densidad energética de la ración. Por esto, al inicio de la lactación, desde el parto hasta la semana 3 a 5 postparto, sería recomendable incluir menos de un 5% de grasa, ya que es cuando se observa la mayor depresión en ingestión de MS debido a la inclusión de grasa (Jerred *et al.*, 1990). Después del pico de lactación, Chilliard (1993) observó que la suplementación con grasa de las raciones no afectó a la ganancia de peso ni a la condición corporal, y sí que aumentó la producción de leche (0,72 kg/d respecto al control). Sin embargo, parece que resultaría innecesario suplementar con grasa después de superada la mitad de la lactación debido a que el balance energético en que se encontraban las vacas pasa a ser positivo (Palmquist y Jenkins, 1980).

Desde un punto de vista reproductivo, estudios recientes sugieren que suplementar con grasa en el preparto puede ser una estrategia que afecte positivamente tanto a la salud uterina y del animal como a la movilización de reservas. El periodo alrededor del parto está asociado con un mayor riesgo de problemas metabólicos y está ampliamente aceptado que el manejo nutricional en el periodo seco afecta al *status* metabólico de la siguiente lactación. Thatcher *et al.* (2006) estudiaron cuál era el mejor momento para iniciar la suplementación con grasa (Megalac[®]) en dietas de vacas lecheras (n = 47) sobre el rendimiento reproductivo de las primeras 14 semanas postparto. Los cuatro tratamientos que utilizaron fueron: 1) control sin grasa suplementada; 2) suplementación con Megalac[®] desde el día 28 preparto; 3) suplementación con Megalac[®] desde el día del parto; 4) suplementación con Megalac[®] desde el día 28 postparto. De las vacas que ovularon el día 72 postparto con el protocolo Ovsynch[®], la suplementación con Megalac[®] tendió (P = 0,09) a aumentar la tasa de concepción al primer servicio comparado con el grupo control (1: 27,8%, 3/11; 2: 40%, 4/10; 3: 70%, 7/10; 4: 63,6%, 7/11). Las vacas suplementadas en el preparto con Megalac[®] tuvieron mayores concentraciones plasmáticas de prostaglandinas durante los primeros 12 d postparto comparado con el resto de tratamientos. Esto puede resultar positivo para la salud uterina postparto y para la inmunocompetencia del animal, como se pudo observar en este experimento, ya que las vacas que recibieron Megalac[®] en el periodo seco tuvieron menos problemas de mastitis, retención de placenta y metritis en los 10 primeros días postparto comparado con las vacas que no recibieron Megalac[®] en el preparto. Por tanto, puede resultar rentable empezar a suplementar con grasas en el preparto para mejorar la función reproductiva posterior, salvo con fuentes de grasa ricas en AG n-3, ya que pueden influir negativamente en la involución uterina al suprimir la secreción de prostaglandinas de la serie 2. Andersen *et al.* (2008)

estudiaron cómo afectaba la suplementación de las dietas de vacas lecheras ($n = 29$) preparto con grasa saturada o insaturada (semilla de lino entera) respecto a una dieta control pobre en grasa sobre el *status* metabólico postparto. Las vacas que recibieron las dietas suplementadas con grasa saturada e insaturada tuvieron mayores concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en el preparto comparado con la dieta control. Sin embargo, al inicio de la lactación, la concentración de grasa hepática y los niveles plasmáticos de AGNE fueron menores en el tratamiento con grasa saturada que en los otros dos. La ingestión de MS, la producción y la composición de la leche en el postparto no se vieron afectados por el tratamiento dietario en el periodo seco. Este trabajo, y otros de la bibliografía, sugieren que la suplementación de las vacas en el preparto con ácidos grasos saturados puede ser una buena estrategia para primar la movilización de reservas en la siguiente lactación. Por tanto, el uso de determinadas grasas en el preparto puede tener efectos positivos a nivel reproductivo y metabólico postparto y puede resultar en una interesante estrategia a aplicar.

2.1. Efectos a nivel ruminal

La suplementación con lípidos en las dietas de vacas lecheras reduce la digestión de los carbohidratos estructurales (Doreau y Chilliard, 1997), incluso hasta en un 50% o más con menos de un 10% de grasa añadida (Jenkins, 1993). Cuando los suplementos grasos inhiben la fermentación ruminal de la fibra, se ha observado que la fermentación en el intestino grueso puede compensar la disminución de la digestibilidad de la fibra en el tracto total (Jenkins, 1993), pero se continúa produciendo mayor excreción de fibra en heces (Jenkins, 1993). Debido a esta acción de las grasas sobre la fracción fibrosa, la digestión ruminal de la materia orgánica también se reduce, pero no se modifica la digestibilidad del almidón. La reducción de la digestibilidad de la fracción fibrosa también reduce la producción de AGV, hidrógeno, metano y modifica el perfil de AGV, produciéndose un incremento en las proporciones de ácido propiónico y una reducción en las de acético, butírico y en la relación acético-propiónico (Jenkins, 1993). El metabolismo ruminal de la proteína también se altera cuando los suplementos grasos interfieren con la fermentación. Por ejemplo, la infusión de aceite de lino en el rumen de ovejas disminuyó la digestión de la proteína y resultó en la disminución de la concentración de amoníaco y en el aumento del flujo de N dietario al duodeno (Ikwuegbu y Sutton, 1982). Cambios similares ocurrieron cuando las ovejas se alimentaron con lípidos adicionales en forma de aceite de

maíz o lecitina (Jenkins y Fotouhi, 1990). Estos cambios en la digestión de la proteína se acompañaron a menudo de aumentos en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Esta mayor eficiencia ha sido atribuida a la reducción del número de protozoos ruminales y a un menor reciclaje del N bacteriano (Ikwuegbu y Sutton, 1982) o a una mayor dilución de los sólidos en el rumen debido a la grasa añadida (Boggs *et al.*, 1987).

Todas estas modificaciones generalmente ocurren a la vez y dependen de:

- a) La cantidad de grasa administrada en la dieta: estos efectos negativos son menores cuando las dietas contienen menos de 50 g de grasa/kg dieta.
- b) La naturaleza de la grasa: los AGPI generan más problemas que los más saturados (Palmquist y Jenkins, 1980; Jenkins, 1993), a excepción de los aceites de pescado que se ha observado que tienden a incrementar la digestibilidad (Doreau y Chilliard, 1997).
- c) La naturaleza de la dieta basal: la grasa tiene menos efectos negativos en dietas ricas en heno que en dietas ricas en ensilado de maíz (Smith *et al.*, 1993).
- d) La forma de presentación de la grasa, ya que el grupo carboxilo libre es importante para inhibir la fermentación. Así, los derivados de AG, como los jabones cálcicos, los triglicéridos y las amidas inhiben menos la fermentación que los AG libres. Por último, las mezclas de grasas pueden mejorar la fermentación comparadas con las fuentes de grasa individuales, aunque se desconoce el motivo de esta mejora ya que no se debe a efectos sinérgicos de los AG.

La acción de los lípidos sobre la población microbiana ruminal explica casi todos los efectos de las grasas mencionados anteriormente. Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo los lípidos interfieren con la fermentación ruminal, pero dos son los que han recibido mayor atención: por un lado, se cree que las grasas pueden hacer una película sobre las partículas de alimento que puede inhibir la digestión de la celulosa, ya sea inhibiendo la unión de las propias bacterias o de sus enzimas hidrolíticas. Por otro lado, las grasas tienen efectos antimicrobianos ya que se ha demostrado que inhiben el crecimiento bacteriano *in vitro* (Galbraith *et al.*, 1971), especialmente los AGI no esterificados, que se ha observado que son muy tóxicos para las bacterias gram positivas (celulolíticas), las bacterias metanogénicas y los protozoos ruminales (los cuales contribuyen a la celulolisis) (Palmquist, 1996). Se cree que estos efectos negativos de las

grasas son debidos a la acción citotóxica de los lípidos sobre la función de la membrana de la célula procariota (Jenkins, 1993).

Aunque es una idea ampliamente extendida que los AGI afectan la digestión ruminal, experimentos recientes parecen no confirmar dicha idea. Doreau *et al.* (1991) no encontraron ningún efecto en la degradación de la MO cuando suplementaron una dieta de vacas lecheras que contenía un 50% de heno de festuca con un 10% de aceite de colza. Palmquist (1996) sugirió que el efecto negativo de los AGI en la digestión ruminal podía minimizarse si la dieta contenía niveles altos de forraje debido a la capacidad del forraje para promover una función ruminal normal. También se ha observado que el administrar AGPI en forma de semilla entera tiene efectos mínimos sobre la fermentación (NRC, 2001), por lo que parece que la tasa a la que los AGI se liberan de los alimentos y quedan expuestos a los microorganismos ruminales es la que determina si la fermentación ruminal se afecta por la adición de AGI en las dietas.

2.2. Efectos a nivel productivo

2.2.1. Efecto sobre la ingestión de materia seca

Los suplementos grasos aumentan la densidad energética de las raciones y, asumiendo que las vacas comen para cubrir sus necesidades energéticas, a menudo se observa una reducción de la ingestión de MS cuando la grasa reemplaza a los carbohidratos como fuente de energía en las raciones (NRC, 2001). Los mecanismos por los que las grasas pueden deprimir la ingestión de MS no están claros y se justifican con varios argumentos (Allen, 2000):

- a) Efecto de llenado ruminal: las grasas afectan a la fermentación ruminal y la digestibilidad de la fibra (Palmquist y Jenkins, 1980; Chalupa *et al.*, 1984, 1986), contribuyendo al llenado del rumen y a la disminución del ritmo de paso.
- b) Liberación de hormonas intestinales: se ha observado que al suplementar las dietas con grasa aumentan las concentraciones postprandiales de colecistoquinona. El efecto hipofágico de la colecistoquinona se debe a que actúa directamente sobre los receptores de la saciedad en el cerebro y, además, aumenta la distensión e inhibe el vaciado gástrico mediante una acción periférica a nivel intestinal.

- c) Oxidación de la grasa en el hígado: al adicionar grasa a las dietas de vacas lactantes, las concentraciones plasmáticas de AGNE incrementan, aumentando la captación y oxidación de éstos por el hígado. Una mayor tasa de oxidación de los AG en el hígado altera las señales aferentes que se generan en los nervios vagales hepáticos que dan la señal de saciedad a los centros cerebrales.

Aunque la tendencia es hacia la reducción de la ingestión de MS al adicionar grasas a las dietas, algunos estudios (Skaar *et al.*, 1989; Pantoja *et al.*, 1996) encontraron incrementos en la ingestión de MS. Las razones por las que incrementa la ingestión al adicionar grasas a las dietas pueden ser debidas a que se produce un menor incremento calórico al metabolizar dietas ricas en grasas que dietas ricas en carbohidratos, lo cual puede aumentar el consumo en épocas de estrés por calor. Por otro lado, al sustituir el cereal de la ración por grasa se produce una reducción de la producción de propionato. Al realizar infusiones intraruminales de propionato en vacas lecheras, se ha observado que la ingestión de MS se reduce en una proporción mayor que cuando se infunde acetato. El mecanismo por el que el propionato reduce la ingestión de MS parece ser debido a un incremento de la secreción de insulina (Allen, 2000).

Una de las ventajas de utilizar grasa en las raciones es aumentar la densidad energética de éstas. Sin embargo, cualquier aumento en la densidad energética puede tener poco efecto sobre la ingestión de energía si se acompaña de reducciones del consumo. Por ejemplo, Jenkins y Jenny (1992) utilizaron una dieta control (1,67 Mcal/kg de ENI) y la compararon con la misma dieta suplementada con un 5% de aceite de canola (1,88 Mcal/kg de ENI). La ingestión de MS del grupo control fue de 18,8 kg/d o 31,4 Mcal de ENI. Si las vacas suplementadas con canola hubieran comido la misma cantidad que el grupo control su ENI hubiera sido de 35,3 Mcal/d. Sin embargo, el consumo observado en las dietas con aceite de canola fue de 18,2 kg/d, por lo que el aceite de canola incrementó la ENI en 2,8 Mcal/d, en vez del supuesto 3,9 Mcal/d.

Allen (2000) analizó los efectos de la suplementación con grasa sobre la ingestión de MS para diferentes tipos de suplementos grasos utilizando datos de experimentos en los que comparaban diferentes fuentes de grasa o evaluaban diferentes porcentajes de grasa añadida. En todos los experimentos, la grasa se incluyó en una ración total mezclada. El análisis de regresión reveló que no había diferencias en los efectos sobre la ingestión de

MS entre fuentes de grasa similares, por lo que agrupó las fuentes de grasa en cuatro categorías: semillas de oleaginosas (extrusionadas y enteras), grasas animales no procesadas (sebo y grasa), AG hidrogenados y triglicéridos, y jabones cálcicos. Dentro de cada categoría había medias de 26 tratamientos. Las medidas del contenido de grasa variaron entre estudios, ya que algunos midieron la cantidad de AG totales y otros el extracto etéreo. Para estandarizar las unidades entre experimentos desarrolló una ecuación para calcular el porcentaje de AG a partir del extracto etéreo:

$$AG = -0,98 + 1,03 \times EE$$

donde AG es el contenido en AG de la dieta (expresado en % sobre la MS) y EE es el contenido en extracto etéreo (expresado en % sobre la MS).

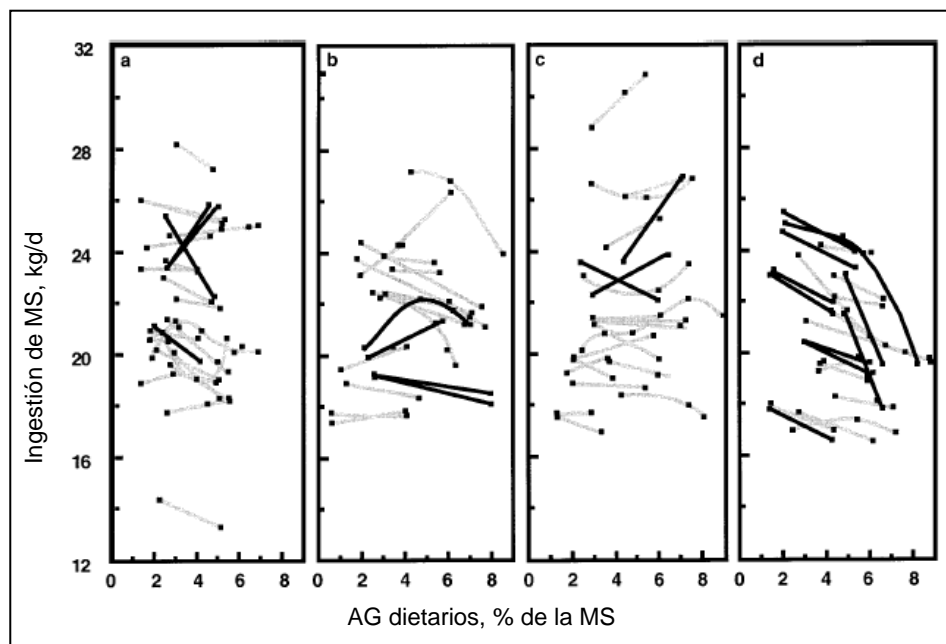
En el caso de la adición de AG de semillas de oleaginosas (Figura 9) se observó un efecto cuadrático sobre la ingestión de MS con un mínimo aproximadamente en el 2% de AG añadidos. La razón de este efecto cuadrático no está clara. La ingestión de MS no se modificó al añadir AG en forma de grasa hidrogenada. La grasa animal y los jabones cálcicos resultaron en efectos lineales negativos. En los casos en los que se usaron jabones cálcicos, en 11 de las 24 comparaciones se observaron descensos significativos de la ingestión de MS, y en 22 de las 24 comparaciones se observaron descensos numéricos. La ingestión de MS decreció en aproximadamente un 2,5% por cada unidad de porcentaje de jabón cálcico que se añadió en la ración comparado con el control, que equivale a dos veces la depresión que se observó al añadir grasa animal.

La cantidad máxima de AG añadidos varió del 5 al 6,2% de la MS de la dieta para las distintas categorías de grasa añadida. Si este porcentaje lo sumamos al que ya tenían las dietas de partida, el porcentaje de AG varió del 7 al 9% de la MS, que está por encima del máximo típicamente incluido en las dietas de vacas lecheras (aproximadamente 5,5 a 6% de AG totales).

Cuando el análisis se restringió a dietas con un contenido total en AG igual o menor al 6%, se observó que la adición de AG de grasa hidrogenada y de semillas de oleaginosas resultó en un efecto cuadrático sobre la ingestión de MS con un mínimo aproximadamente de 2,3 y 3% de AG añadidos, respectivamente, aunque la justificación de este efecto cuadrático

no está clara. La grasa animal y los jabones cálcicos resultaron en efectos lineales negativos, y el efecto de los jabones cálcicos fue de nuevo mayor que el de la grasa animal no procesada. Estos datos demuestran que existen diferencias definidas en los efectos de diferentes AG sobre la ingestión de MS.

Figura 9. Relación entre el contenido en AG dietarios y la ingestión de MS en vacas lecheras para cada categoría de grasa. Adaptado de Allen (2000).



Categorías: (a) semillas de oleaginosas, (b) grasas animales no procesadas, (c) AG hidrogenados y triglicéridos y (d) jabones cálcicos. Las líneas negras representan un efecto significativo mientras que las grises representan un efecto no significativo de los AG sobre la ingestión de MS.

2.2.2. Efecto sobre la producción de leche

La respuesta en producción de leche a la suplementación con grasas puede estar influenciada por diferentes factores como la dieta basal, el estado de lactación, el balance energético, la composición de la grasa, y la cantidad de grasa suplementada. En una extensa revisión, Chilliard (1993) indicó que la respuesta media en producción de leche debida a la suplementación con grasa (incremento medio de un 4,5% de extracto etéreo en la ración) durante el inicio de la lactación fue de 0,31 kg/d, no significativamente diferente a los controles. Si la suplementación con grasa empieza poco después del postparto, puede

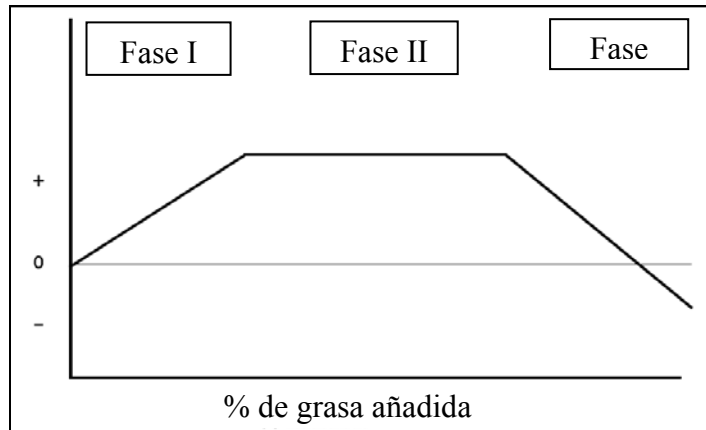
pasar un periodo de tiempo antes de que haya una respuesta en producción de leche (Jerred *et al.*, 1990; Schingoethe y Casper, 1991). La respuesta en producción de leche durante el pico de lactación (incremento medio de extracto etéreo del 3,6% en la ración) fue de 0,72 kg/d, diferente significativamente respecto a los controles. Durante la fase media y final de la lactación la respuesta fue de 0,65 kg/d, significativamente diferente respecto a los controles. Sin embargo, hay que considerar que la producción media de leche en todos los casos anteriores fue menor de 35 kg/d, por lo que las respuestas en vacas que producen más de 40 kg/d no están bien definidas.

En cuanto a la cantidad de grasa suplementada, la producción de leche se comporta siguiendo un patrón común (Jenkins, 1998) (Figura 10):

- Fase I: En esta fase la producción aumenta debido a una mayor densidad energética de la dieta.
- Fase II: No aumenta la producción debido a que la energía adicional de la dieta se ve contrarrestada por los efectos negativos del suplemento graso como la reducción de la digestibilidad de la dieta, la reducción de la ingestión de MS, la baja digestibilidad intestinal del suplemento graso y, quizás, efectos metabólicos negativos.
- Fase III: Estos efectos negativos dominan sobre el incremento en el aporte de energía, produciendo una reducción de la producción.

Todas las fuentes de grasa se comportan de esta manera, aunque pueden diferenciarse en el grado de respuesta de cada fase y en los niveles de grasa que corresponden a cada fase. Las grasas insaturadas tenderán a tener una fase I y II más pequeñas comparadas con las grasas saturadas añadidas en la misma proporción a las dietas. La mayor respuesta en producción de leche se consigue añadiendo grasa según el porcentaje al que corresponda el punto donde se encuentran la fase I y II. Suplementar con grasa por encima de este nivel no es eficiente económicamente ya que no se acompaña de un aumento de la producción. La inclusión de lípidos hasta un 6 a 8% de la dieta en base a MS generalmente incrementa la producción de leche (Tabla 4) (Sutton, 1989) pero la respuesta máxima raramente supera los 3,5 kg de leche corregida al día (NRC, 2001).

Figura 10. Modelo hipotético que describe los cambios en producción de leche al ir aumentando el porcentaje de grasa en las dietas de vacas lecheras en lactación. Comparado con el control, la grasa puede causar aumentos de la producción (+), disminuciones (-) o no cambiar (línea plana). Adaptado de Jenkins (1998).



2.2.3. Efecto sobre la composición de la leche

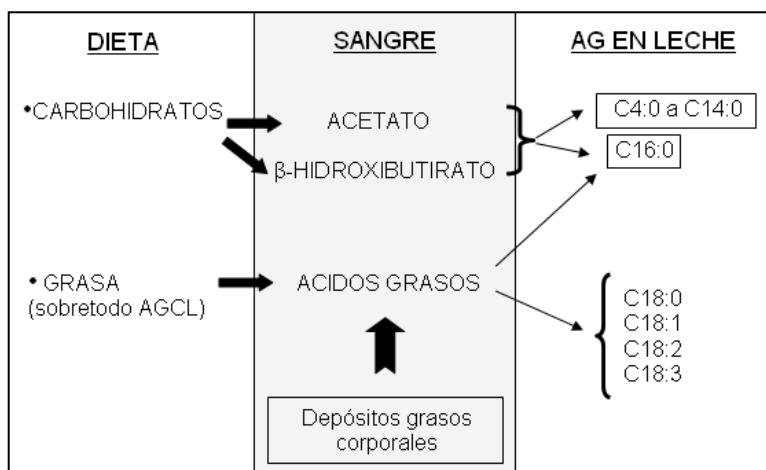
2.2.3.1. Grasa láctea

La grasa láctea es el principal componente energético de la leche y explica muchas de las propiedades físicas y organolépticas de ésta (Bauman y Griinari, 2001). Los lípidos que predominan en la leche son fundamentalmente triglicéridos (98%), fosfolípidos (1%) y esteroides (0,5%). La grasa de la leche bovina es muy compleja y contiene unos 400 AG diferentes. Su composición refleja la naturaleza de los lípidos dietarios, los efectos del metabolismo ruminal sobre los AG y la síntesis de AG a nivel intestinal, mamario y del tejido adiposo. Los AGS que alcanzan la glándula mamaria son después desaturados por la actividad desaturasa mamaria, resultando en una menor ratio $C_{18:0}/C_{18:1}$ en la leche que en el contenido duodenal, mecanismo usado por el rumiante para preservar la fluidez de la leche. Los AG predominantes en la leche son los AGS de cadena corta y media (sobre todo $C_{12:0}$, $C_{14:0}$ y $C_{16:0}$) que representan el 50% del total de AG, y los de cadena larga (sobre todo $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$) representando el 45% del total de AG, e incluyendo pequeñas cantidades de AGPI (2-3% de $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$). El resto lo componen AG ramificados y AGS de número impar derivados de los lípidos bacterianos, así como AG *trans* e isómeros posicionales del $C_{18:1}$ y $C_{18:2}$. Por tanto, la leche contiene concentraciones importantes de

AG de cadena corta y menores concentraciones relativas de AG C₁₈ comparadas con las que se encuentran en otras fuentes de grasa animal como la grasa de cerdo o ternera.

Una parte (alrededor del 40%) de los AG de la leche de rumiantes (la más característica) se sintetiza *de novo* en la propia glándula mamaria utilizando como precursores acetato y β-hidroxiacetato procedentes de la fermentación de los hidratos de carbono en el rumen (Figura 11). Esta síntesis está catalizada por dos enzimas: acetil-CoA carboxilasa y AG sintetasa. Esta vía es el origen de los AGS de cadena corta y media (entre 4 y 14 átomos de carbono) y de aproximadamente la mitad del ácido palmítico (C_{16:0}). El resto del palmítico y los AG de cadena larga (principalmente C_{18:0} y C_{18:1}) proceden de lípidos circulantes en sangre que tienen su origen en la grasa de la dieta, la grasa microbiana y la grasa movilizada de las reservas corporales. Además, en la glándula mamaria existe actividad Δ-9 desaturasa, a través de la cual una parte del ácido esteárico (C_{18:0}) y del ácido *trans*-11 C_{18:1} procedentes de la biohidrogenación ruminal se convierten en ácido oleico (*cis*-9 C_{18:1}) y CLA (*cis*-9, *trans*-11 C_{18:2}), respectivamente (De Blas, 2004).

Figura 11. Esquema simplificado de la síntesis de AG de la leche. Adaptado de Kennelly (1996).



a) Porcentaje de grasa

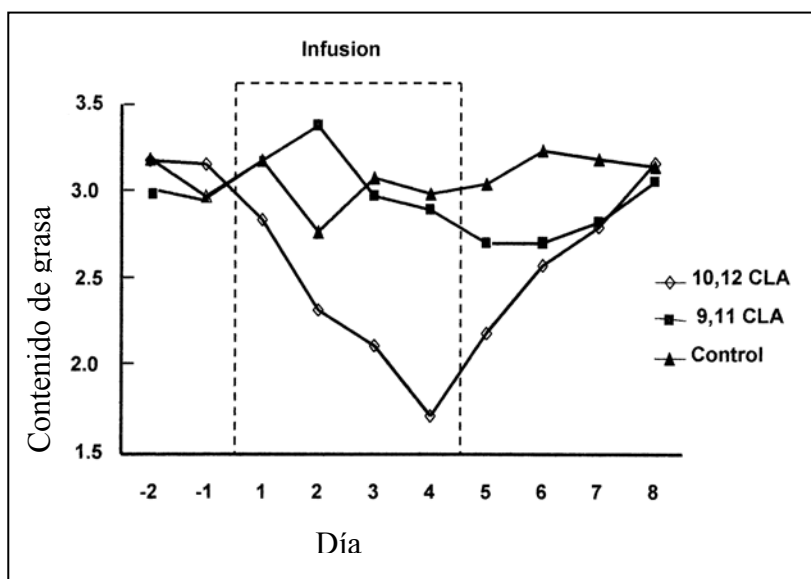
La respuesta a la inclusión de lípidos en la ración sobre la concentración de grasa en la leche varía considerablemente, por lo que es difícil predecir con precisión lo que ocurrirá con la concentración de la grasa láctea como respuesta a un suplemento graso particular.

Los principales factores del suplemento a tener en cuenta son su composición en AG, la cantidad que se añade a la dieta y su forma de presentación (NRC, 2001).

Por lo general, cantidades moderadas de grasa saturada, jabones cálcicos y grasas encapsuladas tienden a no tener efecto o a aumentar ligeramente la concentración de grasa en leche (NRC, 2001). Sin embargo, una cantidad similar de lípidos insaturados, así como una gran cantidad de lípidos en general, resultan frecuentemente en una disminución en el contenido de grasa en leche (a veces en más de una unidad de porcentaje), que se conoce con el nombre de síndrome de grasa baja. La modificación del contenido graso de la leche debido a los lípidos suplementados depende de la combinación de efectos a nivel de la digestión ruminal y del metabolismo mamario. Se han propuesto numerosas teorías basadas en una reducción del aporte de precursores lipogénicos para explicar esta interrelación, aunque datos empíricos ofrecen poco apoyo a éstas. La teoría de la biohidrogenación propuesta por Bauman y Griinari (2003) es la que ha tenido más apoyo en los últimos años y parece ser la que mejor explicaría este síndrome de grasa baja. Esta teoría sugiere que la inhibición de la síntesis de grasa láctea se debe a alteraciones en los procesos de biohidrogenación ruminal que hacen que se produzcan AG *trans* intermediarios que reducen la activación transcripcional de genes que codifican para enzimas lipogénicos como la acetil CoA carboxilasa y AG sintetasa en la glándula mamaria (Peterson *et al.*, 2003). Estas alteraciones en la biohidrogenación se acompañan o son resultado de cambios en la fermentación ruminal, que se caracterizan por una disminución del pH ruminal y un cambio en el perfil de AGV. Los principales factores que determinan el nivel de afectación del metabolismo ruminal son la cantidad y el grado de insaturación de la grasa, y la cantidad de forraje o efectividad de su fibra. Se han desarrollado varios experimentos en los últimos años que demuestran que los AG *trans* son capaces de inhibir la síntesis de grasa láctea. Gaynor *et al.* (1994) infundieron grasa *cis* y *trans* en el abomaso de vacas lactantes y observaron que la producción de leche fue similar entre tratamientos, pero el porcentaje y la producción de grasa láctea fueron menores en el tratamiento *trans*. Otros estudios similares con vacas lecheras mostraron depresiones marcadas en el contenido de grasa láctea durante la infusión abomasal de AG *trans* (Chouinard *et al.*, 1998; Loor y Herbein, 1998). Sin embargo, estudios más recientes han observado que no todos los isómeros *trans* son responsables de la depresión de grasa en leche mencionada anteriormente. Al examinar el perfil de AG *trans* C_{18:1} (Griinari *et al.*, 1998) y CLA (Griinari y Bauman, 1999) relacionado con la depresión de grasa en leche, se

observó que el aumento en leche de los isómeros *trans*-10 C_{18:1} y C_{18:2} estaba más asociado con la depresión de grasa láctea que no el aumento general en *trans*-C_{18:1} o CLA. Sin embargo, se ha observado que el AG *trans*-10 C_{18:1} no controla directamente la síntesis de grasa en vacas, a pesar de que responde de forma muy importante a los cambios dietarios, estando su concentración altamente correlacionada con la respuesta en la producción de grasa láctea en vacas (Bernard *et al.*, 2008). Baumgard *et al.* (2000) proporcionaron evidencia más clara de que la infusión abomasal de *trans*-10, *cis*-12 CLA inhibió la síntesis de grasa láctea en vacas (Figura 12). Posteriormente, otros estudios han observado aumentos en la producción ruminal y en el contenido en leche de *trans*-10, *cis*-12 CLA en condiciones dietarias que produjeron síndrome de grasa baja (Piperova *et al.*, 2000; Whitlock *et al.*, 2002). Más recientemente se ha observado que otros isómeros como el *trans*-9, *cis*-11 CLA y *cis*-10, *trans*-12 CLA (Saebo *et al.*, 2005; Perfield *et al.*, 2007) también podrían reducir la síntesis de grasa láctea, aunque los resultados deben ser tomados con precaución ya que únicamente corresponden a un estudio y a una única dosis de infusión (Bauman *et al.*, 2008). Sin embargo, comparados con una dosis similar de *trans*-10, *cis*-12 CLA, el isómero *cis*-10, *trans*-12 CLA fue igual o incluso ligeramente más efectivo reduciendo la producción de grasa láctea, mientras que el *trans*-9, *cis*-11 CLA fue aproximadamente la mitad de potente.

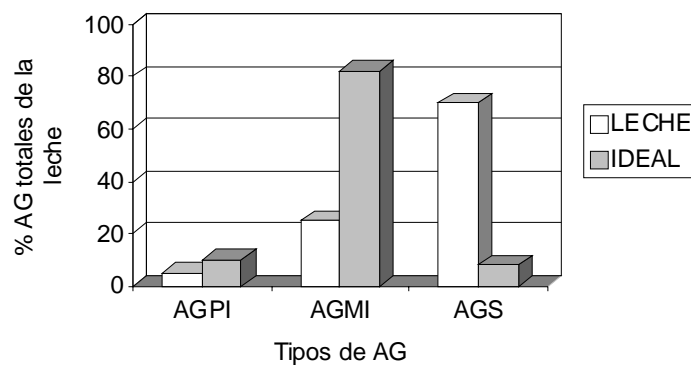
Figura 12. Porcentaje de grasa láctea durante la infusión abomasal de isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA). Las infusiones fueron de 10 g/d de *cis*-9, *trans*-11 CLA o de *trans*-10, *cis*-12 CLA. Adaptado de Baumgard *et al.* (2000).



b) Composición en ácidos grasos

Hasta hace poco, los productores se interesaban por la grasa láctea debido a la mayor sensibilidad a la manipulación dietaria que no la proteína. En la actualidad, la atención a nivel científico se centra en sus propiedades como “alimento funcional”, es decir, se intenta modificar su composición para que pueda prevenir o tratar ciertos desórdenes y enfermedades (Hasler, 2002). La grasa láctea contiene un balance de AG menos favorable que la grasa vegetal o el aceite de pescado. En particular, la leche contiene una concentración importante de $C_{14:0}$ a $C_{16:0}$ y bajas concentraciones relativas de AGMI y AGPI. La leche ideal para el consumo humano debería contener menos de un 10% de AGPI, hasta un 8% de AGS y un 82% de AGMI (O’Donnell, 1989). Sin embargo, la leche de vaca contiene hasta un 70% de AGS y esto difiere claramente de la grasa ideal (Figura 13).

Figura 13. Concentraciones en AG de la leche (%) respecto a las concentraciones ideales. Adaptado de O’ Donnell (1989).



En términos generales, la motivación de modificar el perfil de AG en la leche es reducir las concentraciones de ácido palmítico ($C_{16:0}$), mirístico ($C_{14:0}$) y láurico ($C_{12:0}$) debido a sus efectos hipercolesterolémicos y, por otra parte, aumentar la concentración de AGI y AG esenciales considerados beneficiosos para la salud humana, como el CLA y el ácido linolénico (Tabla 3) (Griinari y Bauman, 2001).

Tabla 3. Efecto del uso de diferentes lípidos dietarios sobre la concentración en ácido linoleico conjugado (CLA) de la leche (mg/100 mg de AG totales). Adaptado de Demeyer y Doreau (1999).

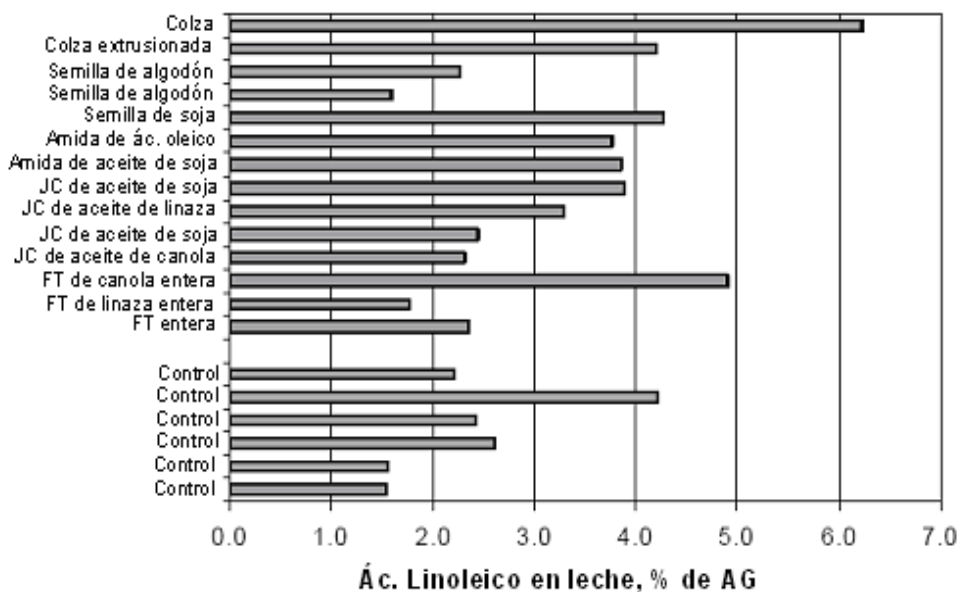
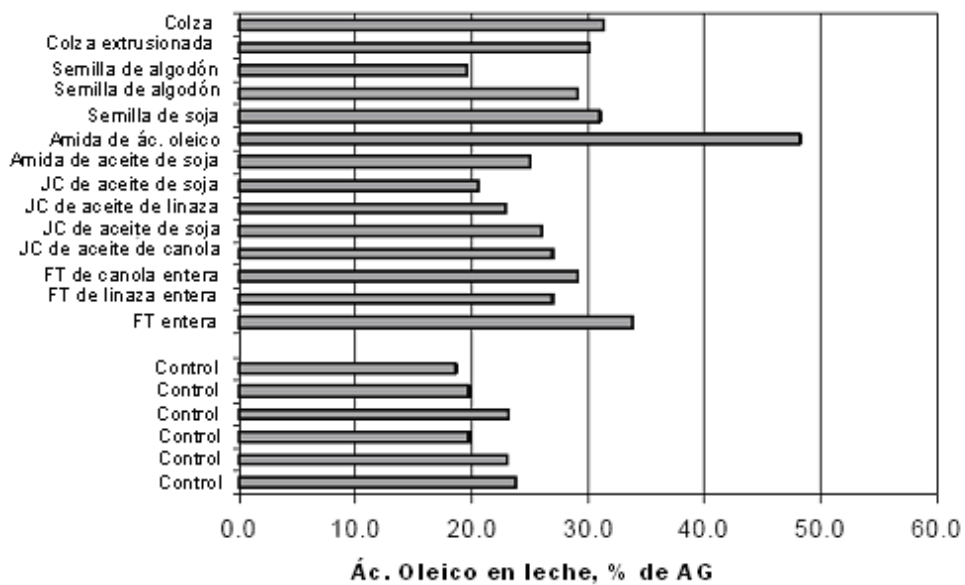
Referencia	CLA < 0,8	CLA 0,8-1,6	CLA > 1,6
Dhiman <i>et al.</i> (1997)	Sem.* de soja cruda y tostada		Ac. de soja Ac. de lino
Kelly <i>et al.</i> (1997)		Ac. de cacahuete Ac. de lino	Ac. de girasol
Chilliard <i>et al.</i> (1999)			Ac. de pescado
Chouinard <i>et al.</i> (1998 ^a)	Sem. de soja no tratada, tostada y micronizada Sebo	JC de colza Sem. de soja extrusionada	JC de soja JC de lino Ac. de pescado
Dhiman <i>et al.</i> (1998)	Sem. de soja extrusionada Sem. de algodón extrusionada		
Griinari <i>et al.</i> (1998)		JC de colza	

*Sem. = semilla, Ac. = aceite, JC = jabones cálcicos.

La composición en AG de la grasa de la leche bovina se puede variar alimentando a las vacas con diferentes fuentes de grasa que cambien el perfil de AG que entran en el intestino procedentes del rumen. Como los AG de cadena larga de origen dietario se pueden incorporar directamente a la grasa de la leche, existe la oportunidad de alterar la relación de AG de cadena corta-larga así como la proporción de AG saturados-insaturados en la leche. En la práctica, nuestra capacidad para alterar el perfil de AG de la leche no va a estar limitada por la capacidad sintética de la glándula mamaria, sino por el hecho de conseguir proteger los AG de la biohidrogenación ruminal, así como mantener el nivel de AGPI dentro de un rango para mantener la calidad organoléptica y la vida media de la leche y productos lácteos. Por esta razón en los últimos años se han realizado esfuerzos considerables por evitar los efectos de la biohidrogenación sobre los AGI en el rumen en un intento de aumentar su absorción y transferencia a la glándula mamaria. Las figuras 14 y 15 muestran ejemplos de cambios en las concentraciones de ácido oleico y linoleico en leche al suplementar con varias formas de grasas protegidas de la fermentación ruminal. La concentración de ácido oleico en la grasa de la leche de vacas control (sin suplemento graso) varió del 18 al 24% del total de AG. Cuando se suplementaron con grasas

protegidas, el ácido oleico varió de un 18 a un 48% en leche. Los efectos sobre el ácido linoleico fueron menos espectaculares. Las concentraciones de ácido linoleico en la leche de vacas con dietas control variaron de un 1,5 a un 4%, y al suplementar grasas protegidas la concentración de ácido linoleico se incrementó hasta un 6,5%.

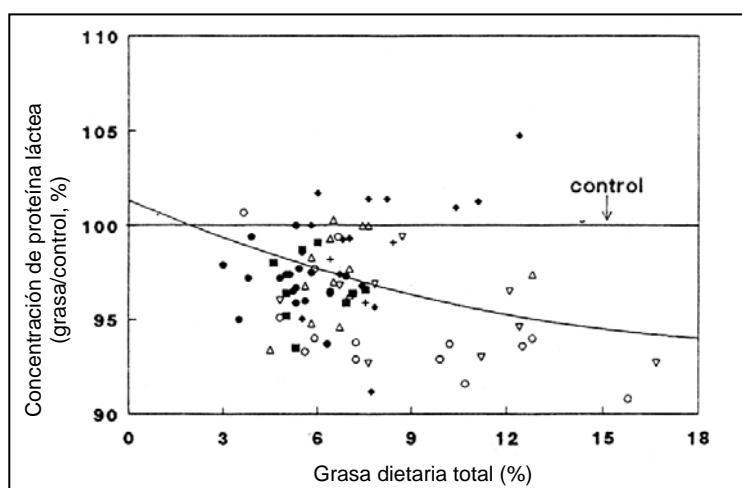
Figuras 14 y 15. Datos de estudios publicados donde se muestra cómo varían las concentraciones en leche de ácido oleico y linoleico en vacas alimentadas con dietas control o con varias fuentes de grasas protegidas: semillas enteras de oleaginosas, amidas de AG, jabones cálcicos (JC) de AG y grasas tratadas con formaldehído (FT). Adaptado de Jenkins y McGuire (2005).



2.2.3.2. Proteína láctea

Los suplementos lipídicos dietarios reducen la concentración de proteína láctea y el efecto disminuye ligeramente al aumentar la cantidad de grasa que se añade (por ejemplo, $y = 101,1 - 0,6381x + 0,0141x^2$, donde $y =$ la concentración de proteína láctea [(suplementado/control, %) x 100] y $x =$ grasa en la dieta total, %) (Wu y Huber, 1994), siendo la caseína la fracción nitrogenada que más se reduce (NRC, 2001). Aunque el porcentaje proteico normalmente disminuye, la producción total de proteína permanece constante o se incrementa (NRC, 2001), ya que la grasa suplementada tiende a tener un efecto positivo sobre la producción de leche. De 83 comparaciones de tratamientos (suplementación con grasa vs. control) resumidos por Wu y Huber (1994), la producción de proteína láctea no se modificó o aumentó en 65 de las comparaciones, y disminuyó en 26. Sin embargo, en 15 de estas 26 comparaciones en las que la producción de proteína disminuyó, la producción de leche también disminuyó.

Figura 16. Concentraciones de proteína láctea de vacas alimentadas con grasa añadida respecto a vacas alimentadas con dietas control (línea basal, 100%). Adaptado de Wu y Huber (1994).



Ninguna forma de presentación de lípidos ha sido capaz de prevenir la reducción de la concentración proteica en leche. De media, el contenido en proteína de la leche se reduce en 0,03% por cada 100 g de grasa suplementada, o sobre 0,1 a 0,3 unidades de porcentaje para los niveles típicos de grasa en las dietas. No se ha encontrado una relación clara entre la cantidad y el tipo de AG suplementados con la reducción en la proteína láctea.

Existen varias teorías que explican la disminución de la concentración de proteína en leche cuando se suplementa grasa en las raciones (DePeters y Cant, 1992):

- a) Los AG son tóxicos para las bacterias ruminales, por lo que el flujo de N bacteriano y, por tanto, el aporte de aminoácidos al intestino delgado disminuye, pudiendo ser esta la razón de la reducción de la síntesis proteica en la glándula mamaria. Sin embargo, el aporte de proteína no degradable o de aminoácidos protegidos no resuelve la depresión proteica observada al suplementar grasa en las raciones.
- b) La incorporación de grasa en una ración provoca un aumento en la ingestión de energía neta de lactación respecto a una ración control. El resultado esperado es un aumento en la producción de leche. Pero la suplementación con grasa no permite un aumento en la producción de proteína diaria en la misma proporción que el aumento que se observa en producción de leche, por lo que el contenido en proteína disminuye por dilución.
- c) Al adicionar grasas a las dietas aumenta el flujo energético a la glándula mamaria, por lo que se requiere un menor flujo sanguíneo a la glándula mamaria para sintetizar el mismo volumen de leche. Este menor flujo de sangre a la glándula mamaria reduce el aporte de aminoácidos y la síntesis de proteína en la glándula mamaria, provocando un menor porcentaje de proteína láctea (Cant *et al.*, 1993).

Wu y Huber (1994) evaluaron en una revisión los diferentes mecanismos propuestos para explicar la disminución en el porcentaje de proteína en leche al suplementar las dietas con grasa y concluyeron que parece ser que la causa principal de dicha disminución es la disponibilidad insuficiente de aminoácidos en la glándula mamaria producida por el incremento en la producción de leche.

Tabla 4. Respuestas^a en producción y composición de la leche a varios suplementos grasos en vacas lecheras. Adaptado de Chilliard *et al.* (2001).

Suplemento ^b	Nº de grupos ^c	Suplem. ^b (g/d)	P ^d . Leche (kg)	Proteína (g/kg)	Grasa (g/kg)	P. Grasa (g/d)
GA	22	688	+ 0,5	- 0,6*	- 1,4	- 18
GA encapsulada	26	941	+ 1,0*	- 1,8*	+ 4,0*	+ 143*
Grasa saturada	10	644	+ 1,7*	- 0,6*	+ 0,5	+ 58*
JC de palma	29	593	+ 0,9*	- 1,2*	+ 0,4	+ 47*
AV	8	573	- 0,6	- 0,9	- 2,8*	- 74*
S. de oleaginosas	34	538	+ 0,3	- 0,4*	- 0,9*	- 18
AV encapsuladas	26	693	0,0	- 0,8	+ 6,4*	+ 120*
Aceites marinos	27	305	+ 0,2	- 1,2*	- 9,1*	- 208*

^a Respuestas expresadas como diferencia respecto al grupo control.

^b Suplem.: suplemento. GA: grasa animal, JC: jabones cálcicos, AV: aceites vegetales, S.: semillas.

^c Grupos de vacas que recibieron la suplementación con lípidos.

^d P. = producción.

* P < 0.05.

2.3. Efectos sobre la reproducción

La suplementación con grasa (sobre un 3% de la MS dietaria) tiene una influencia positiva sobre el rendimiento reproductivo de las vacas: aumento del número y tamaño de los folículos ovulatorios, aumento de las concentraciones plasmáticas de progesterona, reducción de la secreción de prostaglandinas, aumento de la vida media del cuerpo lúteo y mejora de la fertilidad (Mattos *et al.*, 2000). Esta grasa suplementada puede ayudar a paliar el estado energético negativo que sufren las vacas durante el postparto, pero parte del efecto positivo de la grasa sobre la reproducción es independiente del estado energético de la vaca, ya que en la mayoría de los casos se ha observado que al suplementar con grasas el estado energético de las vacas no cambia porque se produce una disminución no significativa de la ingestión de MS o porque hay un aumento de la producción de leche. Staples *et al.* (1998) realizaron una extensa revisión sobre los efectos reproductivos de las grasas. En 11 de los 20 estudios donde se midieron datos reproductivos encontraron mejoras en la tasa de concepción al primer servicio o en la tasa de concepción global al añadir grasa a las dietas. La mejora media que encontraron en la tasa de concepción o de

preñez fue de 17 unidades de porcentaje. El mecanismo por el que la grasa afecta positivamente la reproducción no se conoce con exactitud pero se han propuesto varias hipótesis (Staples *et al.*, 1998):

- a) Efecto sobre el estado energético: la grasa aumenta la densidad energética de la ración y, por tanto, si los animales mantienen la ingestión y la producción se reduciría el balance energético negativo que tiene un efecto negativo sobre la fertilidad. Sin embargo, la ingestión puede disminuir en algunos casos al añadir grasa (Allen, 2000), por lo que, con frecuencia, la energía consumida no aumenta al añadir grasa. Además, normalmente la producción de leche aumenta al suplementar grasas y este incremento puede explicarse por un aumento en el aporte de energía metabolizable.

- b) Efecto sobre la esteroideogénesis: una segunda hipótesis es que las vacas alimentadas con grasa tienen mayores concentraciones circulantes de progesterona, hormona necesaria para la implantación y la nutrición del embrión recién formado. La progesterona es la hormona de la gestación, ya que es necesaria para su mantenimiento. El cuerpo lúteo que se forma a partir del folículo dominante ovulado permanece en el ovario durante toda la gestación para sintetizar progesterona. Una mayor concentración de progesterona plasmática se ha asociado con mejores tasas de concepción en vacas lecheras. Staples *et al.* (1998) observaron que las vacas suplementadas con grasa (sebo, jabones cálcicos, grasa hidrogenada o semillas enteras de algodón) tenían concentraciones más elevadas de progesterona plasmática comparadas con las control. Esto puede explicarse por una reducción de la tasa de desaparición de progesterona de la sangre (Hawkins *et al.*, 1995) o por una mayor concentración de colesterol en sangre (precursor de la síntesis de progesterona) al suplementar las dietas con grasas. Por tanto, la mejora de la fertilidad observada al suplementar las dietas con grasa puede resultar de una mayor disponibilidad de progesterona para mejorar la supervivencia embrionaria.

- c) Efectos sobre la insulina: los efectos de la suplementación con grasas sobre la concentración plasmática de insulina son variados. En la mayoría de los casos en los que se suplementó con grasas, la concentración de insulina disminuyó

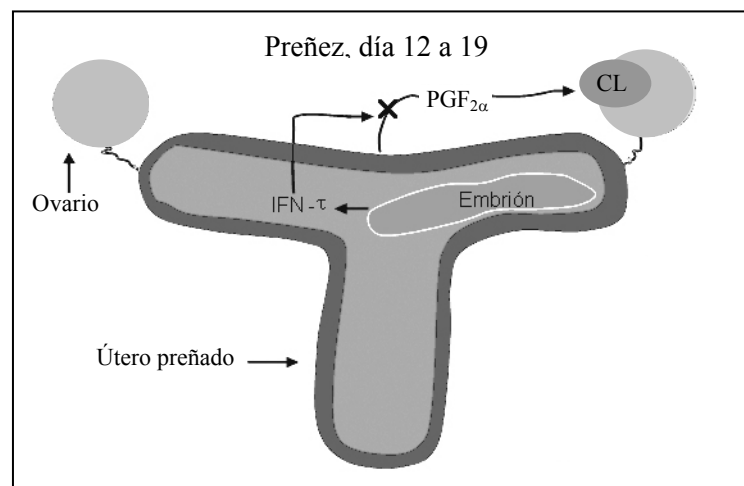
(Staples *et al.*, 1998). Spicer *et al.* (1993) observaron que las células de la granulosa bovina tendían a producir menos “insulin grow factor” (IGF) cuando se les añadía insulina y hormona de crecimiento en el medio. Debido a que el IGF es un potente estimulador de las células de la granulosa *in vitro* (Spicer *et al.*, 1993), la inhibición de la insulina por la suplementación con grasa puede permitir al IGF afectar positivamente el desarrollo folicular.

- d) Efecto sobre la secreción de prostaglandinas: las prostaglandinas (PG) son reguladores locales que se sintetizan en la cercanía de las células a las que van a influir. En el tracto reproductivo de las vacas, el tejido uterino es la principal fuente de síntesis de PG. La liberación de PG por el endometrio se produce como respuesta a la oxitocina secretada por el cuerpo lúteo. Las concentraciones de PG en los 3-4 días postparto son muy altas, ya que son las responsables de la regresión del cuerpo lúteo que ha mantenido la gestación y de la involución uterina. Después de este período, el útero libera $\text{PGF}_{2\alpha}$ regularmente para hacer regresar cada cuerpo lúteo que se forma en los ciclos estrales en los que la vaca no queda preñada para poder iniciar un nuevo ciclo. En el caso del animal gestante, durante el reconocimiento materno de la gestación (días 12 a 19) (Figura 17) se han de producir factores antiluteolíticos para conseguir que el cuerpo lúteo no desaparezca y mantenga la gestación. Este factor antiluteolítico es el interferón tau ($\text{IFN-}\tau$) producido por el embrión, que actúa inhibiendo la expresión de receptores para la oxitocina endometriales, por lo que está inhibiendo la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el útero y, por tanto, evitando la lisis del cuerpo lúteo.

Los AGI de 20 carbonos, como el ácido dihomolinoleico ($\text{C}_{20:3}$), el ácido araquidónico ($\text{C}_{20:4}$) y el ácido eicosapentanoico ($\text{C}_{20:5}$), actúan como substratos para la síntesis de PG de las series 1, 2 y 3, respectivamente. El ácido linoleico ($\text{C}_{18:2}$) puede ser desaturado y elongado hasta ácido araquidónico ($\text{C}_{20:4}$), que sirve de precursor inmediato para las PG de la serie 2, como la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Para los mamíferos, el ácido araquidónico es el principal substrato para la síntesis de PG. El ácido linoléico puede ser desaturado y elongado a ácido eicosapentanoico ($\text{C}_{20:5}$), que sirve de precursor para la síntesis de PG de la serie 3, como la $\text{PGF}_{3\alpha}$. Los mismos enzimas elongasas y desaturasas convierten estos dos AG a ácido

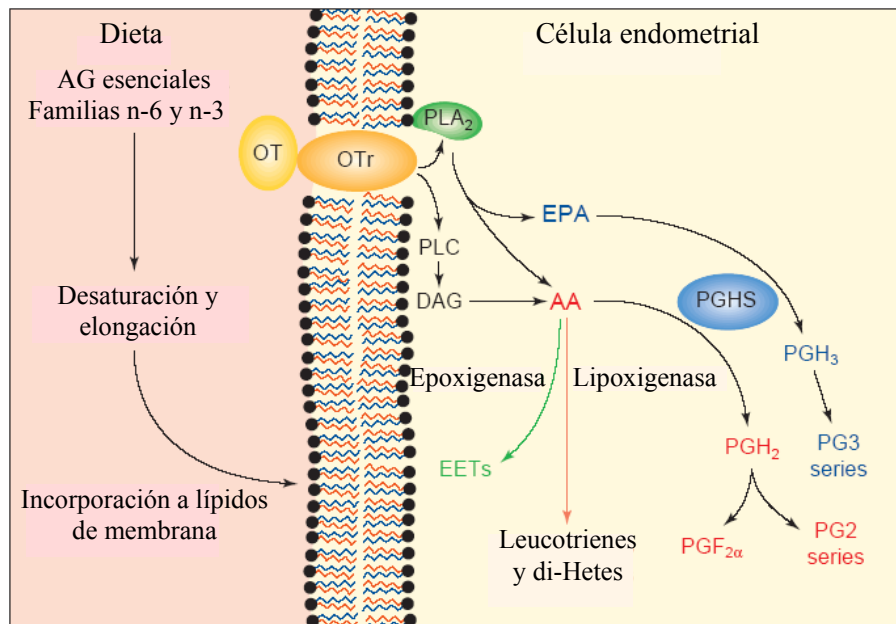
araquidónico y eicosapentanoico, por lo que los precursores de la familia n-3 y n-6 compiten por estas enzimas. Esto significa que un aumento en los aportes de AG n-3 disminuye la producción de PG de la serie 2, y aumenta la producción de PG de la serie 3 (Figura 18). Estas PG de la serie 3 tienen menor actividad biológica que las PG de la serie 2, de manera que si hay menor cantidad de PG de la serie 2 podremos mantener el cuerpo lúteo y mantener la gestación, reduciendo la mortalidad embrionaria y mejorando la fertilidad. Existen evidencias que soportan este mecanismo de las grasas. Burke *et al.* (1997) y Mattos *et al.* (2002) observaron que vacas alimentadas con harina de pescado tenían una regresión más lenta del cuerpo lúteo y una menor capacidad del útero para secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$, respectivamente. Mattos *et al.* (2004) también observaron una menor secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en vacas suplementadas con aceite de pescado.

Figura 17. Reconocimiento materno de la gestación. Adaptado de Santos (2004).



- e) Deficiencia de AG esenciales: un último mecanismo propuesto es que las grasas podrían aliviar una deficiencia en AG esenciales ($\text{C}_{18:2}$ y $\text{C}_{18:3}$) en las vacas de alta producción. Se ha observado que deficiencias en AG esenciales reducen la eficacia reproductiva en animales no rumiantes. Sanchez y Block (2002), usando el submodelo de grasa desarrollado para el CPM-Dairy Model, sugirieron que la cantidad de $\text{C}_{18:2}$ excretada en 45,5 l de leche diaria excedía la cantidad de este AG procedente de la dieta. Por lo tanto, las fuentes de grasa que aporten AG esenciales adicionales pueden minimizar la necesidad de movilizar AG esenciales de los tejidos, protegiendo así su integridad funcional.

Figura 18. Representación esquemática del metabolismo de los AGPI dietarios n-6 y n-3. Adaptado de Mattos *et al.* (2000).



Los AGPI dietarios son desaturados y elongados en la glándula mamaria, el tejido adiposo, el cerebro y la placenta. Los AGPI dietarios y sus productos de elongación y desaturación se incorporan a fosfolípidos de membrana plasmática. La cantidad de cada AG que se incorpora depende de la cantidad de precursor en la dieta. Estímulos externos como la unión de la oxitocina (OT) a su receptor (OTr) estimula la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) y fosfolipasa C (PLC), que liberan los fosfolípidos de la membrana plasmática y aumentan la disponibilidad de AG para ser procesados por la prostaglandina H sintetasa (PGHS). El ácido eicosapentanoico (EPA, C20:5, n-3) es procesado por la PGHS para generar prostaglandinas de la serie 3. El ácido araquidónico (AA, C20:4, n-6) es procesado por la PGHS, la epoxigenasa y la lipoxigenasa para generar prostaglandinas de la serie 2, ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), leucotrienes y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (di-HETEs), respectivamente. DAG=diacilglicerol.

3. UTILIZACIÓN DE SEMILLA DE LINO EN GANADO VACUNO LECHERO

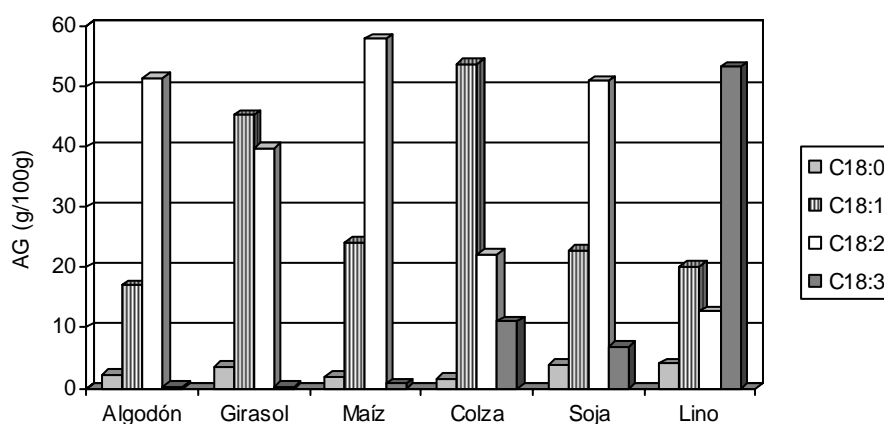
3.1. Características de la semilla de lino

La semilla de lino y las harinas resultantes del proceso de extracción del aceite son materias primas de escasa utilización en nuestro país. Los principales países productores son India, Argentina y, recientemente, Canadá (FEDNA, 1999). Su consumo está aumentando en los países desarrollados como fuente de AG n-3 debido a sus posibles efectos beneficiosos sobre los procesos de inmunidad y salud cardiovascular en humanos.

Comparada con otras semillas oleaginosas, la proteína del lino es de calidad aceptable, en función del tratamiento, pero es deficiente en lisina (en torno a la mitad del contenido en lisina de la soja) y treonina, y relativamente rica en metionina y triptófano, por lo que se complementa bien con la de leguminosas. En rumiantes, la degradabilidad de la proteína de la semilla es alta (80%), reduciéndose en las harinas a niveles que varían entre 55 y 65%, en función del tratamiento térmico sufrido durante la extracción del aceite (FEDNA, 1999).

La semilla de lino contiene un 30% de aceite. La fracción grasa es altamente insaturada (un 85% de ácidos grasos insaturados C_{18}), con una relación saturados:insaturados similar a la de la colza. La característica diferencial de la semilla de lino frente a otras oleaginosas es su alto contenido en ácido alfa-linolénico ($C_{18:3}$: 51%) (Figura 19). La riqueza en $C_{18:3}$ de la semilla se utiliza para producir productos enriquecidos en AG n-3 de mayor valor comercial. Por ello, el precio de mercado de la semilla de lino es superior a lo esperado en base a su valor nutricional. Otra característica muy apreciada de la semilla de lino es el aspecto que da al pelo de vacas y terneros, que aparece brillante y lustroso. Los productos de la semilla de lino son de fácil manejo en fábrica, aunque no son recomendables períodos de almacenamiento largos dado el alto riesgo de enranciamiento de su fracción grasa.

Figura 19. Perfil de AG de semillas de oleaginosas (% sobre total de AG). Adaptado de FEDNA (1999).



3.2. Efectos a nivel ruminal

3.2.1. Efectos sobre la digestibilidad de la materia seca y de la fibra

Existen pocos trabajos en los que se haya estudiado cómo afecta la inclusión de semilla de lino en las raciones de vacas lecheras sobre la digestibilidad de los nutrientes de la ración. Ueda *et al.* (2003), suplementando dietas de vacas lecheras (65:35 forraje:concentrado o 35:65 forraje:concentrado) con un 3% de aceite de lino, observaron que la digestibilidad en el tracto total de la MS y MO aumentó y que también había una tendencia hacia una mayor digestibilidad en el tracto total de la FND y la FAD (Tabla 5). La suplementación con aceite de lino no afectó la producción total de AGV, pero aumentó la proporción de propionato y disminuyó la de butirato, por lo que los autores concluyeron que la suplementación con aceite de lino no afectó a la digestibilidad en el tracto total en vacas, aunque su uso podía disminuir la digestibilidad ruminal de la fibra cuando se suplementaba en dietas ricas en concentrado. Gonthier *et al.* (2004) también observaron que la adición de semilla de lino a la ración no tuvo ningún efecto adverso sobre la fermentación ruminal, pero sí que observaron una reducción en el flujo de proteína microbiana al duodeno. Sin embargo, Petit (2002) observó que las vacas alimentadas con semilla de lino entera tenían menores digestibilidades en el tracto total de la FND (45,5 vs. 51,5%) y del EE (80,0 vs. 86,7%) en comparación con las alimentadas con Megalac[®], lo que sugiere que las bacterias ruminales y/o los enzimas de éstas tienen una mayor accesibilidad a las grasas añadidas en forma de jabones cálcicos que a las grasas añadidas en forma de semilla entera, ya que en

la semilla entera la grasa está íntimamente asociada con la matriz fibrosa-proteica. En cuanto al procesado de las semillas, y cómo éste puede afectar a las digestibilidades de los diferentes nutrientes, da Silva *et al.* (2007) estudiaron cómo afectaba el dar la semilla de lino entera o molida sobre las digestibilidades en el tracto total, y observaron (Tabla 6) que la suplementación con semilla molida incrementó la digestibilidad del EE, y concluyeron que el molido podía contribuir a aumentar la cantidad de aceite liberado en el rumen e intestino.

Tabla 5. Efecto de la suplementación con semilla de lino sobre la digestibilidad ruminal y en el tracto total de la MO, FND y PB

Suplem. ¹ Kg MS/d	Digestibilidad ruminal (%)				Digestibilidad tracto total (%)					
	MO		FND		MO		FND		PB	
	SG ²	LS	SG	LS	SG	LS	SG	LS	SG	LS
0.6 (A)/sin grasa ³	59,5	59,0	43,5	46,2	69,3 ^b	71,7 ^a	56,2 ^t	58,7 ^t	67,4 ^b	72,6 ^a
2 (E)/Meg. ⁴	-	-	-	-	66,8	66,1	51,5 ^a	45,5 ^b	72,7	71,4
1.97 (E)/sin grasa ⁵	57,7	57,8	64,9	66,0	70,9	75,4	63,3	69,8	66,1	73,6

¹ Forma de presentación de la semilla: A = aceite, E = entera.

² SG = sin grasas, LS = semilla de lino.

³ Fuente: Ueda *et al.* (2003).

⁴ Fuente: Petit (2002).

⁵ Fuente: Gonthier *et al.* (2004).

^{a,b} Las medias con diferente exponente difieren ($P < 0,05$).

^t Las medias tienden a ser diferentes ($P < 0,10$).

Como la proteína de las semillas de oleaginosas se caracteriza por su elevada degradabilidad ruminal (Mustafa *et al.*, 2000) y como los AGPI no protegidos de las semillas de oleaginosas pueden tener efectos negativos sobre la fermentación ruminal, y especialmente la fibra (Palmquist y Jenkins, 1980), existen varias formas de proteger las semillas de la degradación ruminal y de esta manera incrementar la cantidad de aminoácidos disponibles a nivel intestinal. Los métodos más comunes son los tratamientos químicos (formaldehído) o físicos (calor). La micronización es un tratamiento por calor seco en el que unos generadores de infrarojos calientan los ingredientes hasta aproximadamente 110-115°C. La ventaja de la micronización sobre otros tratamientos por calor es el menor tiempo de calentamiento aplicado durante el proceso (Mustafa *et al.*, 2002). Mustafa *et al.* (2002) observaron que la micronización redujo la degradabilidad

ruminal *in sacco* de la proteína de la semilla de lino, sin perjudicar la calidad de los aminoácidos no degradados a nivel ruminal y concluyeron que la micronización podía ser un método efectivo para proteger la proteína del lino de la degradación ruminal. Gonthier *et al.* (2004) (Tabla 6) observaron que el tratamiento por calor (semilla de lino extrusionada o micronizada) no tuvo efecto en la digestibilidad del tracto total de la MS ni de la MO. Sin embargo, las vacas que recibieron la semilla extrusionada tuvieron mayor digestibilidad ruminal de la MO, del EE y de la PB comparado con la micronizada, mientras que lo contrario se observó postruminalmente. Parece que la extrusión aumenta la degradabilidad de los nutrientes a nivel ruminal pero esto no afecta a la digestibilidad de la fibra. Petit (2003) estudió cómo afectaba el tratamiento de la semilla de lino con un 2,04% de formaldehído sobre la digestibilidad total de la MS, PB, EE y FND (Tabla 6). El tratamiento de la semilla con formaldehído tendió a incrementar la digestibilidad de la MS, aunque no afectó a la digestibilidad aparente de la FND, la PB ni del EE.

Tabla 6. Efecto de la protección de la semilla de lino mediante tratamiento químico o físico sobre las digestibilidades ruminales y en el tracto total de la MO, FND, EE y PB.

	Suplem.	Tratamiento	Digestibilidad en el tracto total (%)			
			MO	FND	EE	PB
da Silva <i>et al.</i> 2007	1,92 kg MS/d	Entera	49,8 [†]	38,7	73,1 ^b	65,9
	1,92 kg MS/d	Molida	51,3 [†]	37,4	87,4 ^a	69,4
Gonthier <i>et al.</i> , 2004 ¹	1,97 kg MS/d	Cruda	75,4	69,8	74,5	73,6
	1,97 kg MS/d	Micronizada	74,5	69,9	73,8	71,6
	1,97 kg MS/d	Extrusionada	75,3	69,7	75,1	73,3
Petit, 2003	2,63 kg MS/d	No tratada	55,0 ¹²	38,5	62,8	56,0
	2,36 kg MS/d	Formaldehído	60,1 ¹²	46,4	67,5	59,8
			Digestibilidad ruminal (%)			
			MO	FND	EE	PB
Gonthier <i>et al.</i> , 2004	1.97 kg MS/d	Cruda	57,8	66,0	11,6	54,3
		Micronizada	52,0 ^b	64,0	-0,18	39,1 ^b
		Extrusionada	61,3 ^a	67,7	29,2	66,0 ^a

¹ Estadística sólo hecha comparando micronizada y extrusionada.

² Los valores corresponden a digestibilidad de la MS y no de la MO.

^{a,b} Las medias con diferente letra son diferentes ($P < 0,05$).

[†] Las medias tienden a ser diferentes ($P < 0,10$).

Por tanto, los resultados de estos estudios parecen confirmar que la suplementación con semilla de lino no afecta a la digestibilidad en el tracto total de la MO, la fibra y la proteína, aunque en ocasiones se han observado reducciones a nivel ruminal que son después compensadas postruminalmente. Los tratamientos por calor, como la micronización, se pueden utilizar para aumentar el contenido en proteína no degradable a nivel ruminal de la semilla, y otros, como la extrusión, aumentan la digestibilidad ruminal de la MO, la proteína y el EE.

3.2.2. Efectos sobre la biohidrogenación ruminal

La aplicación de calor a productos ricos en grasa, como la semilla de lino, puede desnaturalizar la matriz proteica que envuelve las gotas de grasa y de esta manera proteger esta grasa de la biohidrogenación ruminal, permitiendo incrementar la concentración de AGPI en leche o carne (Kennelly, 1996). Gonthier *et al.* (2004) estudiaron los efectos de suplementar dietas de vacas lecheras con semilla de lino cruda, micronizada o extrusionada sobre la fermentación ruminal. Los tratamientos por calor alteraron la composición química de la semilla (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la micronización y la extrusión sobre la composición química de la semilla de lino (en base a MS). Adaptado de Gonthier *et al.* (2004).

	Semilla de lino ¹		
	CRU	MCD	EXT
Cenizas	3,7	3,7	3,3
FND	20,2	26,9	15,3
FAD	12,4	17,9	7,8
PB	22,9	22,8	22,5
Proteína soluble, % de PB	33,5	26,8	42,5
Proteína insoluble neutro detergente, % de PB	31,5	50,1	28,0
Proteína insoluble ácido detergente, % de PB	7,0	13,3	4,5
AG totales	35,2	33,6	36,9
Energía bruta, Mcal/kg	6,7	6,7	6,6

¹CRU = cruda, MCD = micronizada, EXT = extrusionada.

La micronización incrementó el contenido de FND y FAD de la semilla de lino en un 33 y 44%, respectivamente. Las proteínas insolubles en soluciones neutro y ácido detergentes también se incrementaron en un 59 y 90%, respectivamente. Los cambios observados en la composición química como resultado de la extrusión fueron contrarios a los observados con la micronización (Tabla 7).

En consecuencia, parece que la micronización puede proteger mejor los AGPI de la semilla de lino contra la biohidrogenación que no la extrusión. Hubiera resultado interesante estudiar cómo los diferentes tratamientos por calor de la semilla de lino afectaban a la biohidrogenación ruminal y al flujo de AG que llegaban al duodeno, pero no fue estudiado por Gonthier *et al.* (2004). Sí que estudiaron, en cambio, el perfil plasmático de AG (Gonthier *et al.*, 2005), y esto nos puede dar una idea de cómo afectó el tratamiento por calor a la biohidrogenación ruminal (Tabla 8). Las mayores concentraciones plasmáticas de C_{18:2}, C_{18:3} y AGPI en el tratamiento con semilla de lino micronizada que en el de semilla de lino extrusionada nos indicarían que hubo una menor biohidrogenación con la semilla micronizada que con la extrusionada, aunque la micronización no mejoró la concentración plasmática de estos AG respecto a la semilla cruda. Petit *et al.* (2002) también observaron que la micronización de la semilla de lino no protegió los AGI de la biohidrogenación ruminal comparado con dar la semilla entera.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos plasmáticos de vacas alimentadas con semilla de lino cruda o tratada por calor (mg/g de ácidos grasos). Adaptado de Gonthier *et al.* (2005).

	Tratamientos ¹					Contraste ²		
	CON	CRU	MCD	EXT	ESM	1	2	3
C _{18:0}	179	177	170	170	5	0,13	0,11	0,99
C _{18:1 trans}	12	24	20	30	4	0,03	0,79	0,12
C _{18:1 cis}	114	123	113	171	5	<0,01	0,02	<0,01
C _{18:2}	449	342	367	324	7	<0,01	0,67	<0,01
C _{18:3}	62	186	169	136	8	<0,01	<0,01	0,02
AGS ³	326	298	306	302	6	<0,01	0,44	0,62
AGMI	149	163	149	223	8	0,01	0,04	<0,01
AGPI	526	539	545	475	11	0,66	0,08	<0,01

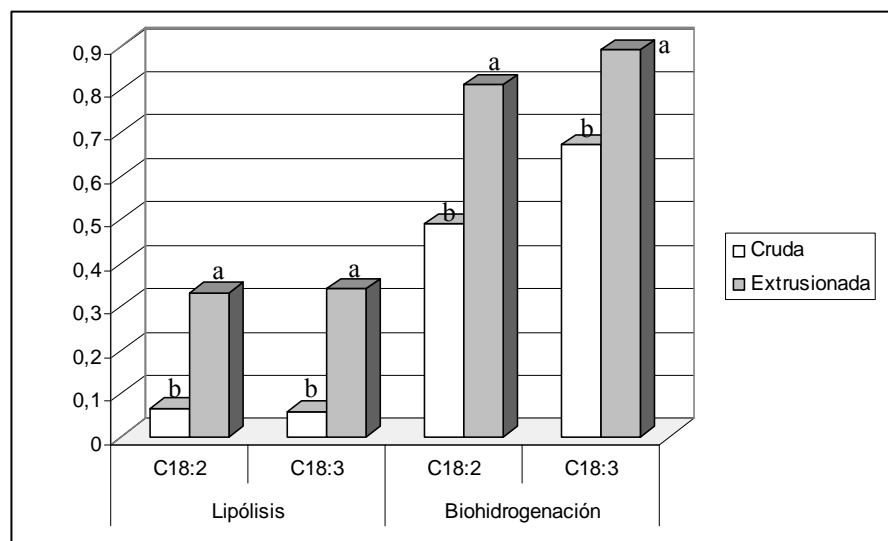
¹ CON = control, CRU = cruda, MCD = micronizada, EXT = extrusionada.

² 1 = control vs. semilla de lino, 2 = cruda vs. tratada por calor, 3 = micronizada vs. extrusionada.

³ AGS = AG saturados, AGMI = AG monoinsaturados, AGPI = AG poliinsaturados.

Chow *et al.* (2003) estudiaron cómo afectaba el proceso de extrusión de la semilla de lino sobre la lipólisis y biohidrogenación de sus AG. En su estudio evaluaron el grado de lipólisis y biohidrogenación ruminal del C_{18:2} y C_{18:3} de 3 productos comerciales extrusionados y 2 aplastados de semilla de lino en incubaciones *in vitro* (Figura 20). Después de 6 h de incubación, la lipólisis y la biohidrogenación del C_{18:2} y C_{18:3} fue superior en la semilla extrusionada que en la semilla aplastada. A las 24 h, la lipólisis del C_{18:3} fue del 0,8 y 0,5 en la semilla extrusionada y en la aplastada, respectivamente. Por tanto, la extrusión de la semilla de lino acelera tanto el proceso de lipólisis como el de biohidrogenación, y la micronización no ofrece ventajas protegiendo contra la biohidrogenación respecto a dar la semilla entera. Es posible que la extrusión destruya la matriz proteína-grasa de la semilla de lino, y que esto aumente la accesibilidad de las bacterias a los nutrientes. De hecho, Reddy *et al.* (1994) observaron que el proceso de extrusión podía liberar los componentes de las semillas al rumen más rápidamente, lo cual coincide con las observaciones de Chouinard *et al.* (2001).

Figura 20. Valores medios de lipólisis y biohidrogenación de 3 productos extrusionados y 2 aplastados de semilla de lino después de 6 h de incubación. Adaptado de Chow *et al.* (2003).



^{a,b}Barras con diferente letra son diferentes ($P < 0,05$).

Como ya se ha comentado anteriormente, las dietas ricas en AGPI y pobres en fibra producen depresión de la grasa láctea y esto parece asociado a las alteraciones que se producen en el proceso de biohidrogenación ruminal y a la formación de AG *trans*

intermediarios de la biohidrogenación que parecen inhibir la síntesis de grasa en la glándula mamaria. La biohidrogenación ruminal se inhibe a $\text{pH} < 6$ (Van Nevel y Demeyer, 1996) y cuando se utilizan dietas ricas en concentrado (Latham *et al.*, 1972). Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se haya estudiado el efecto del pH ruminal y del nivel de concentrado en la dieta sobre la producción de estos intermediarios *trans* a nivel ruminal. Loor *et al.* (2004) estudiaron cómo afectaba la suplementación con un 3% de aceite de lino en base a MS en vacas que recibían una dieta rica (35:65 forraje:concentrado) o pobre (65:35 forraje:concentrado) en concentrado sobre la biohidrogenación ruminal y el flujo de AG intermediarios de la biohidrogenación que llegaban al duodeno. La biohidrogenación fue menor en las dietas ricas en concentrado, pero fue mayor en las dietas suplementadas con aceite de lino (Tabla 9). El pH ruminal fue similar en todos los tratamientos por lo que los autores sugieren que la ratio forraje:concentrado por sí sola puede reducir las tasas de biohidrogenación ruminal y alterar los perfiles de $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{18:2}$ y $\text{C}_{18:3}$ que llegan al duodeno.

Tabla 9. Biohidrogenación ruminal del $\text{C}_{18:2}$ y $\text{C}_{18:3}$ y pH ruminal en vacas Holstein alimentadas con un nivel bajo (BC) o alto (AC) de concentrado y suplementadas con un 3% de aceite de lino (BCA y ACA). Adaptado de Loor *et al.* (2004).

	Dietas				SEM	P-valor ¹		
	BC	BCA	AC	ACA		Conc.	Aceite	C. x A.
BH ² $\text{C}_{18:2}$	57,9	84,5	59,6	74,3	1,7	0,01	0,01	0,28
BH $\text{C}_{18:3}$	89,9	97,1	83,9	93,2	1,7	0,01	0,01	0,49
pH	6,34	6,44	6,31	6,44	0,12	0,84	0,17	0,86

¹ Efecto del nivel de concentrado (conc.), del aceite y de su interacción (C. x A.)

² BH : [(ingestión del AG-flujo duodenal del AG)/(ingestión del AG)]*100

El aporte de un alto nivel de concentrado en la dieta disminuyó la tasa de biohidrogenación del $\text{C}_{18:3}$ (88,6 vs. 93,5), y tendió a correlacionarse con un mayor flujo duodenal de este AG (P = 0,06) (Tabla 10). Las dietas con mayor cantidad de concentrado disminuyeron el porcentaje de grasa láctea (2,31 vs. 3,38%) comparado con las que tenían menor cantidad de concentrado, pero no se observó un aumento en el flujo duodenal de *trans*-10, *cis*-12 $\text{C}_{18:2}$ (0,09 vs. 0,08 g/d), uno de los AG responsables de la depresión de grasa láctea. Sin embargo, sí que se observaron aumentos significativos en el flujo duodenal de *trans*-10 $\text{C}_{18:1}$ en las dietas con mayor cantidad de concentrado (30,4 vs. 4,00 g/d) respecto a las de menos concentrado.

Tabla 10. Flujo duodenal (g/d) de algunos intermediarios de la biohidrogenación ruminal de vacas Holstein alimentadas con un nivel bajo (BC) o alto (AC) de concentrado y suplementadas con un 3% de aceite de lino (BCA y ACA). Adaptado de Loor *et al.* (2004).

AG, g/d	Dietas					P-valor ¹		
	BC	BCA	AC	ACA	SEM	Conc.	Aceite	C. x A.
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1,46	6,61	20,2	50,6	12,1	0,04	0,20	0,38
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0,31	0,52	0,31	0,86	0,14	0,25	0,02	0,25
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 C _{18:2}	0,08	0,07	0,07	0,10	0,01	0,45	0,56	0,14
C _{18:3} n3	8,93	12,9	8,82	29,6	4,10	0,06	0,01	0,06

¹Efecto del nivel de concentrado (conc.), del aceite y de su interacción (C. x A.)

De este estudio se puede concluir que el aporte de grandes cantidades de concentrado en las dietas, aunque no modifique el pH ruminal, es suficiente para reducir y alterar los procesos de biohidrogenación y hacer que se produzcan intermediarios que pueden afectar la síntesis de grasa láctea.

Kalscheur *et al.* (1997) llegaron a una conclusión diferente sobre el efecto del pH ruminal sobre la producción de intermediarios que pueden reducir la síntesis de grasa en la glándula mamaria. Evaluaron los efectos de dos niveles de inclusión de forraje en las dietas: una inclusión alta de forraje (60% de la MS) y una inclusión baja (25% de la MS) y el efecto de la adición o no de un 2% de buffer en las dietas sobre la biohidrogenación ruminal, el flujo duodenal de intermediarios de la biohidrogenación y su incorporación posterior a la leche (Tabla 11). El pH ruminal en este caso fue menor en vacas alimentadas con niveles bajos de fibra y la adición de buffer incrementó el pH ruminal en 0,19 unidades en las vacas alimentadas con la dieta pobre en fibra, pero sólo incrementó en 0,02 unidades en las dietas ricas en fibra. Las vacas alimentadas con niveles bajos de fibra y sin adición de buffer tuvieron un flujo muy elevado de AG *trans* C_{18:1} al duodeno (120 vs. 61 g/d) comparado con las que recibieron las dietas ricas en fibra. Sin embargo, al añadir buffer a las dietas pobres en forraje el flujo de AG *trans* C_{18:1} fue similar al de las vacas alimentadas con dietas ricas en forraje (66 vs. 61 g/d). La grasa láctea se comportó de una manera similar, produciéndose los porcentajes menores en las dietas con bajos niveles de forraje y sin adición de buffer (3,42 vs. 4,09%) comparado con las dietas con alto nivel de forraje y sin buffer. La biohidrogenación ruminal también fue menor en las dietas pobres en forraje sin

adición de buffer (Tabla 11). Los resultados de este estudio apoyan la teoría de que los AG *trans* C_{18:1} que se forman en el rumen están asociados con la depresión de grasa láctea observada cuando se utilizan dietas pobres en fibra. El hecho de que la adición de buffer a las dietas ricas en concentrado disminuyera el flujo de AG *trans* C_{18:1} y aumentara el porcentaje de grasa láctea sugiere que el pH sería el responsable de que se produzcan estos AG intermediarios *trans* y no el concentrado como sustrato.

Tabla 11. Efecto del nivel de forraje en la dieta y de la adición de buffer sobre el pH ruminal, el porcentaje de grasa de la leche, la biohidrogenación ruminal (BH) y el flujo de AG al duodeno. Adaptado de Kalscheur *et al.* (1997).

Item	Dietas ¹				SEM	P-valor ²		
	AF		BF			Conc.	Buffer	C. x B.
	NB	B	NB	B				
pH	6,13	6,15	5,83	6,02	0,04	0,01	0,04	0,07
Grasa láctea, %	4,09	4,22	3,42	3,91	0,14	0,01	0,07	0,25
BH C _{18:2}	79,0	79,3	73,3	79,3	1,2	0,05	0,03	0,05
BH C _{18:3}	87,8	88,1	81,9	85,9	1,0	0,01	0,07	0,11
Flujo duodenal, g/d								
<i>trans</i> C _{18:1}	61	57	120	66	10	0,01	0,02	0,04
C _{18:2}	86	84	166	109	11	0,01	0,03	0,04
C _{18:3}	11,2	10,7	12,9	8,6	1,0	0,86	0,05	0,10

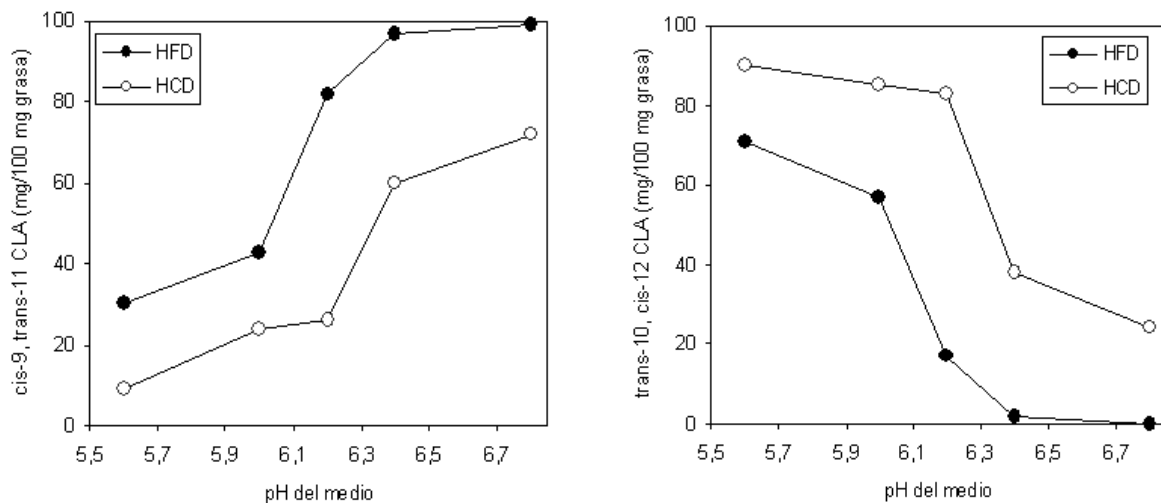
¹AF: dieta rica en fibra (60% MS), BF: dieta pobre en fibra (25% MS), NB: dieta sin buffer, B: dieta suplementada con un 2% de buffer.

²Efecto del nivel de concentrado (conc.), de buffer y de su interacción (C. x B.)

Choi *et al.* (2005) obtuvieron bacterias ruminales de vacas alimentadas durante 5 semanas con una dieta rica en concentrado (63% MS) y de vacas alimentadas con una dieta rica en forraje (77% MS), las incubaron en un medio con líquido ruminal y ácido linoleico y las sometieron a diferentes condiciones de pH para estudiar su efecto sobre la producción de AG *trans* intermediarios de la biohidrogenación. Contrariamente a lo que se había observado anteriormente (Latham *et al.*, 1972) las bacterias que provenían de vacas alimentadas con mucho concentrado en la dieta eran más activas biohidrogenando el ácido linoleico a la mayoría de pH probados (5,6 a 6,8) que aquellas que venían de vacas alimentadas con mucho forraje. Los niveles de *trans*-10, *cis*-12 CLA fueron mayores que los de *cis*-9, *trans*-11 CLA a pH menores a 6 para bacterias que provenían de ambas dietas,

mientras que se detectaron niveles muy bajos de *trans*-10, *cis*-12 CLA a pH mayores a 6 (Figura 21). La producción de *trans*-10, *cis*-12 CLA se relacionó inversamente con el pH ($r^2 = 0,88$). Los resultados de este experimento sugieren que la producción de *trans*-10, *cis*-12 CLA depende del pH ruminal, ya que a pH altos no hay producción de este AG y que las bacterias procedentes de vacas alimentadas con altos niveles de concentrado son capaces de producir mayores cantidades de este intermediario porque son bacterias habituadas a condiciones de pH ruminal bajo.

Figura 21. Efecto del pH sobre la producción de isómeros del CLA: *cis*-9, *trans*-11 CLA y *trans*-10, *cis*-12 CLA en incubaciones con ácido linoleico y bacterias procedentes de vacas alimentadas con dieta rica en forraje (HFD) o en concentrado (HCD). Adaptado de Choi *et al.* (2005).



3.3. Efectos a nivel productivo

3.3.1. Efecto sobre la ingestión, la producción y la composición de la leche

Se han revisado varios trabajos en los que se ha utilizado la semilla de lino en raciones de vacas lecheras y los resultados sobre ingestión, producción y composición de la leche se presentan resumidos (Tabla 12). Las distintas fuentes de AG tienen una influencia diferente sobre la ingestión de MS (Allen, 2000). La semilla de lino es bien aceptada por las vacas y parece no modificar la ingestión de MS al añadir hasta un 15% de la MS de la dieta en forma de semilla.

Tabla 12. Efecto de la semilla de lino sobre la ingestión, la producción y la composición de la leche.

Fuente	N° anim.	Tratamiento (kg MS/d)		Ingestión (kg MS/d)		Produc. leche (kg/d)		GB (%)		PB (%)	
		Control ⁺	Lino [*]	Control	Lino	Control	Lino	Control	Lino	Control	Lino
Ward <i>et al.</i> , 2002	12	Sin grasa	1,6 (E, M)	20,0	19,1	24,7	23,0	3,93	3,96	33,41 ^a	3,31 ^b
Chouinard <i>et al.</i> , 1998	24	Sin grasa	0,90 (JC)	23,5	22,4	35,9 ^a	38,8 ^b	4,05 ^a	3,56 ^b	3,21	3,02
Petit, 2002	90	0,7 (Meg)	2,0 (E)	18,3	19,4	33,5 ^a	35,7 ^b	4,14 ^a	3,81 ^b	2,86 ^a	2,98 ^b
Petit <i>et al.</i> , 2004	4	Sin grasa	2,1 (E)	23,8	21,1	24,8 ^a	32,1 ^b	3,49	3,63	3,92	3,87
Petit <i>et al.</i> , 2002	4	0,5 (Meg)	1,2 (F)	17,8	17,1	22,1	21,7	4,12	3,97	3,25	3,28
Kennelly, 1996	-	-	0,89 (E)	18,0	17,7	26,2	27,4	3,40	3,63	3,21 ^a	3,19 ^b
	-	-	1,8 (E)	18,0	18,3	26,2	27,2	3,40	3,43	3,21 ^a	3,17 ^b
	-	-	2,8 (E)	18,0	18,4	26,2	26,8	3,40	3,50	3,21 ^a	3,13 ^b
Petit, 2003	40	2,8 (Gir)	2,6 (E)	18,4	19,8	23,0	22,4	4,44	4,23	3,25 ^a	3,41 ^b
Petit <i>et al.</i> , 2001	35	2,45 (Mf)	2,3 (F)	13,4	13,6	19,8 ^a	18,6 ^b	4,62 ^τ	4,37 ^τ	2,95 ^a	3,09 ^b
Dhiman <i>et al.</i> , 2000	36	Sin grasa	0,50 (A)	21,6	21,1	29,6	31,1	3,41	3,35	3,34	3,18
	36	Sin grasa	0,90 (A)	21,6	20,0	29,6	30,3	3,41 ^a	2,47 ^b	3,34	3,27
Dhiman <i>et al.</i> , 2000	36	Sin grasa	0,20 (A)	20,6	21,7	27,4	28,4	3,44	3,72	3,53	3,45
Gonthier <i>et al.</i> , 2005	4	Sin grasa	2,0 (M)	15,9	15,8	21,1	20,2	3,82	4,02	3,41	3,23
		Sin grasa	2,0 (M, Mi)	15,9	15,2	21,1	19,6	3,82	3,96	3,41	3,40
		Sin grasa	2,0 (M, Ex)	15,9	15,5	21,1	18,0	3,82	3,56	3,41	3,33
Flowers <i>et al.</i> , 2008	12	Pasto+grano	0,17 (A)	6,92 ¹	6,94	18,9	18,5	3,23	3,44 ²	3,03	3,19 ²
		Pasto+grano	0,34 (A)	6,92 ¹	6,90	18,9	19,6	3,23	3,35	3,03	3,12

		Pasto+grano	0,51 (A)	6,92 ¹	6,96	18,9	19,1	3,23	3,27	3,03	3,08
Bu <i>et al.</i> , 2007	40	Sin grasa	0,64 (A)	16,2	15,9	21,7 ^b	25,0 ^a	3,49	3,26	3,15	3,17
Kelly <i>et al.</i> , 1998	12	A cacahuete	1,12 (A)	21,1	21,1	34,2	35,06	2,26	2,31	3,25	3,22
Loor <i>et al.</i> , 2005	4	Sin grasa	0,61 (A)	20,4	20,4	28,8	26,2	2,40	2,22	3,03 ^b	3,21 ^a
		(HC diet)									
		Sin grasa	0,83 (A)	24,2	27,7	24,2	27,7	3,30	3,45	3,10 ^a	2,95 ^b
		(LC diet)									
Promedio	389	Sin grasa	1,3	19,1	18,5	25,1	25,8	3,56	3,50	3,24	3,23

*Forma de presentación de la semilla de lino: E= semilla entera, M=molida, JC= jabón cálcico, F= tratamiento con formaldehído, A= aceite, Ex= semilla extrusionada, Mi = semilla micronizada.

⁺Alimento usado como control: Meg= megalac, Gir= girasol, Mf= 5,6% Megalac + 12,7% harina de lino, HC = dieta con un 35:65 F:C, LC = 65:35 F:C.

^{a,b} Las medias de una misma fila con diferente exponente son diferentes ($P < 0,05$).

[†] Las medias de una misma fila con diferente exponente son diferentes ($P < 0,10$).

¹ IMS solo correspondiente al grano

² Efecto cuadrático.

Sin embargo, Petit (2003) (Tabla 12) sí que observó una mayor ingestión en vacas que recibieron la dieta con lino comparadas con aquellas alimentadas con girasol (20,2 vs. 18,9 kg/d). Petit (2003) sugiere que la diferencia observada en ingestión pudo ser debida a la diferencia de tamaño entre las semillas, ya que la semilla de lino es más pequeña que la de girasol y, por tanto, tiene un tránsito más rápido por el tracto digestivo.

En el caso de la producción de leche, en la mayoría de trabajos no se observaron cambios al añadir lino a las raciones (25,8 vs. 25,1 kg/d) respecto a la ración control (Tabla 12). En cambio, Petit *et al.* (2001) observaron una menor producción en vacas alimentadas con semilla de lino tratada con formaldehído (18,6 kg/d) respecto a las vacas que recibieron la dieta con jabones cálcicos de AG más un solvente de harina de lino (19,8 kg/d). Por el contrario, Chouinard *et al.* (1998), Petit (2002) y Petit *et al.* (2004) observaron mejoras en la producción de leche al suplementar las dietas con semilla entera de lino (38,8 vs. 35,9, 35,7 vs. 33,5 y 32,1 vs. 24,8 kg/d, respectivamente) respecto a una ración control. Chouinard *et al.* (1998) utilizaron 4 tratamientos: un control y 3 tratamientos con jabones cálcicos (colza, soja y lino). La producción aumentó linealmente al aumentar la insaturación del AG del jabón cálcico, siendo esta mayor para el tratamiento lino. Esta respuesta lineal no se había observado previamente en los trabajos publicados. Los aumentos o reducciones de la producción observados no se pueden relacionar con la forma de presentación de la semilla de lino ni con una cantidad de semilla administrada al día. Por otro lado, contrariamente a lo que cabría esperar, la suplementación con semilla de lino no modificó el contenido de grasa láctea en la mayoría de los trabajos (3,50 vs. 3,56%) respecto a la ración control (Tabla 12). Sin embargo, en algunos de ellos se observó una reducción en el porcentaje de grasa láctea (Chouinard *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2001; Petit 2002) al añadir lino a las raciones. La reducción en el porcentaje de grasa láctea que se observa al suplementar con grasa las raciones es debido al uso de grasas ricas en AGI que afectan la fermentación ruminal (Petit *et al.*, 2002) y se han discutido en el apartado 2.3.

En el caso del contenido de proteína láctea, la respuesta a la suplementación con lino no es muy clara. Mientras en algunos trabajos no se modificó el porcentaje de proteína láctea (Kennelly, 1996; Chouinard *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2004; Gonthier *et al.*, 2005), en otros aumentó (Petit *et al.*, 2001; Petit, 2002 y 2003) y en otros disminuyó (Kennelly, 1996; Ward *et al.*, 2002). Petit (2003) observó que el

porcentaje de proteína láctea fue mayor en vacas alimentadas con semilla de lino (3,41%) respecto a aquellas que recibieron semilla de girasol (3,25%). El lino es de tamaño menor que el girasol y esto podría aumentar su velocidad de paso por el rumen y aumentar el aporte de aminoácidos para la síntesis de proteína de la leche. Petit *et al.* (2001 y 2002) utilizaron semilla de lino tratada con formaldehído y observaron que el porcentaje de proteína aumentó en el primer caso y no se modificó en el segundo, lo que parece indicar que el tratamiento de las semillas con formaldehído resulta eficaz para protegerlas de la degradación ruminal.

3.3.1.1. Perfil de ácidos grasos

Incrementar las concentraciones de determinados AGI en la leche, como el CLA y el ácido linolénico, puede resultar en un producto más interesante para el consumidor y, por tanto, en una mayor aceptación, ya que estos AG se han asociado con beneficios para la salud (Ward *et al.*, 2002). La semilla de lino contiene un 50% de ácido linolénico en el aceite, por lo que una suplementación con esta semilla podría incrementar las cantidades de este AG en la leche, como se demuestra que efectivamente ocurre en los trabajos publicados (Tabla 13). La suplementación con una media de 1,3 kg/d de semilla de lino produjo un aumento medio de un 94% en el porcentaje de ácido linolénico en la leche comparado con el control.

Resulta interesante comparar la concentración de ácido linolénico (% total AG) en la leche del grupo control y del grupo suplementado con semilla de lino en los diferentes trabajos revisados (Figura 22), ya que se puede observar cómo el aumento del aporte diario de semilla de lino en las dietas no aumenta la concentración de ácido linolénico en la leche por encima de aproximadamente un 1,2% del total de AG.

Tabla 13. Efecto de la suplementación con semilla de lino sobre el porcentaje de ácido linolénico en la leche (% sobre total de AG).

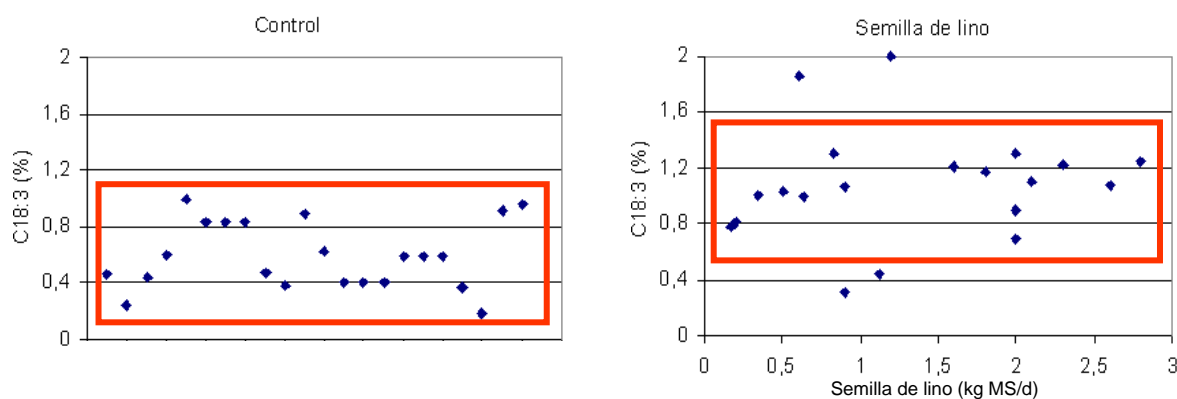
Fuente	Dieta			
	Control C _{18:3} (%)	Semilla de lino C _{18:3} (%)	Diferencia C _{18:3} (%)	Suplem.* (kg/d)
Ward <i>et al.</i> , 2002	0,46 ^a	1,2 ^b	157	1,6 (E,M)
Chouinard <i>et al.</i> , 1998	0,24	0,31	29	0,90 (JC)
Petit, 2002	0,44 ^a	0,90 ^b	105	2,0 (E)
Petit <i>et al.</i> , 2004	0,6 ^a	1,1 ^b	83	2,0 (E)
Petit <i>et al.</i> , 2002b	1,0	2,0	100	1,2 (F)
Kennelly, 1996	0,83 ^a	1,1 ^b	29	0,89 (E)
	0,83 ^a	1,2 ^b	41	1,8 (E)
	0,83 ^a	1,2 ^b	49	2,8 (E)
Kennelly, 1996	0,47 ^a	0,77 ^b	64	2,0 (E)
Petit, 2003	0,38 ^a	1,1 ^b	184	2,6 (E)
Petit <i>et al.</i> , 2001	0,89 ^a	1,2 ^b	37	2,3 (F)
Dhiman <i>et al.</i> , 2000	0,63 ^b	0,82 ^a	30	0,20 (A)
Gonthier <i>et al.</i> , 2005	0,4 ^b	1,3 ^a	225	2,0 (M)
	0,4 ^b	1,3 ^a	225	2,0 (M, Mi)
	0,4 ^b	0,7 ^a	75	2,0 (M, Ex)
Flowers <i>et al.</i> , 2008	0,59	0,78 ¹	32	0,17 (A)
	0,59	1,0 ¹	71	0,34 (A)
	0,59	1,0 ¹	75	0,51 (A)
Bu <i>et al.</i> , 2007	0,37 ^b	1,0 ^a	170	0,64 (A)
Kelly <i>et al.</i> , 1998	0,18	0,44	144	1,1 (A)
Loor <i>et al.</i> , 2005	HC-0,91 ^{Xb}	1,86 ^a	104	0,61 (A)
	LC-0,96 ^b	1,30 ^a	35	0,83 (A)
Promedio			94	1,3

*Forma de presentación de la semilla de lino: E= semilla entera, M=molida, JC= jabón cálcico, F= tratamiento con formaldehído, A= aceite.

^{a,b}Las medias de la misma fila con diferente exponente son diferentes. ^XC18:3 total.

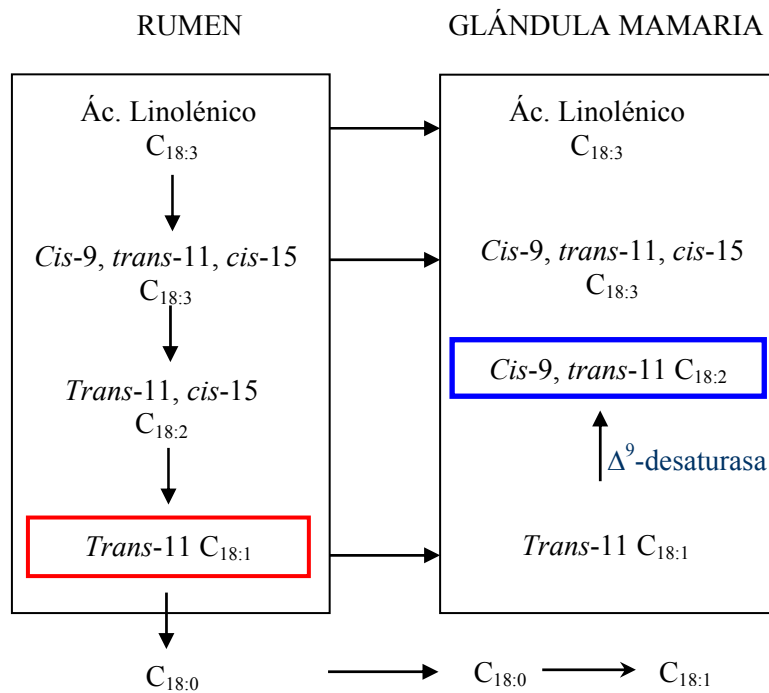
¹Efecto lineal y cuadrático significativo

Figura 22. Comparación entre el contenido lácteo de C_{18:3n3} (% total AG) del grupo control y del grupo suplementado con semilla de lino.



También es posible incrementar las concentraciones de CLA en la leche suplementando las raciones con semilla de lino a través del *trans*-11 C_{18:1}, que es un intermediario de la biohidrogenación del C_{18:3}. Este intermediario de la biohidrogenación puede convertirse a CLA en la glándula mamaria mediante síntesis endógena gracias a la enzima Δ^9 -desaturasa (Figura 23) (Jenkins y McGuire, 2006), aunque ésta no es la única vía para enriquecer la leche en CLA, ya que el CLA se forma también en el rumen durante el proceso de biohidrogenación del ácido linoleico. Sin embargo, Piperova *et al.* (2002) observaron que aproximadamente el 90% del *cis*-9, *trans*-11 CLA que aparece en la leche se sintetiza en la glándula mamaria a partir de ácido vaccénico.

Figura 23. Proceso de biohidrogenación ruminal del ácido linolénico y formación de CLA por síntesis endógena. Adaptado de Chouinard *et al.* (1999).



Existen pocos trabajos en los que se haya medido la influencia de una suplementación con semilla de lino sobre las concentraciones de CLA en la leche (Tabla 14). Una suplementación media de 1 kg/d en base a MS de semilla de lino produjo una diferencia del 80% en el porcentaje de CLA en leche comparado con el control, tomando resultados de los estudios publicados. Dhiman *et al.* (2000) utilizaron aceite de lino al 2% y 4% y observaron que las concentraciones de CLA aumentaron comparadas con el control. El incremento medio fue de un 305% y de un 318%, respectivamente. En un segundo

experimento, en cambio, las concentraciones de CLA no fueron diferentes respecto al control al suplementar con aceite de lino al 1%.

Estos cambios en la composición de los AG en respuesta a los suplementos grasos dependen del estado de lactación (Grummer, 1991). Grummer (1991) sugirió que la eficiencia de transferencia de los AG plasmáticos al tejido mamario decrece al avanzar la lactación, por lo que se puede esperar un mayor cambio en la composición de la grasa láctea al añadir AGI durante el inicio de la lactación que no al final de la lactación.

Tabla 14. Efecto de la suplementación con semilla de lino sobre el porcentaje de ácido linoleico conjugado (CLA) de la leche (% sobre total de AG).

Fuente	Dieta			
	Control	Semilla de lino		
	CLA (%)	CLA (%)	Diferencia CLA (%)	Suplem.* (kg/d)
Gonthier <i>et al.</i> , 2005	0,9 ^b	1,4 ^a	56	2,0 (M)
	0,9 ^b	1,4 ^a	56	2,0 (M, Mi)
	0,9 ^b	1,9 ^a	111	2,0 (M, Ex)
Flowers <i>et al.</i> , 2008	1,12	1,18 ¹	5	0,17 (A)
	1,12	1,39 ¹	24	0,34 (A)
	1,12	1,65 ¹	47	0,51 (A)
Bu <i>et al.</i> , 2007	0,64 ^b	1,60 ^a	150	0,64 (A)
Kelly <i>et al.</i> , 1998	1,33	1,67	26	1,12 (A)
Loor <i>et al.</i> , 2005	HC-0,81 ^x ^b	2,54 ^a	213	0,61 (A)
	LC-0,62 ^b	1,34 ^a	116	0,83 (A)
Promedio			80	1,0

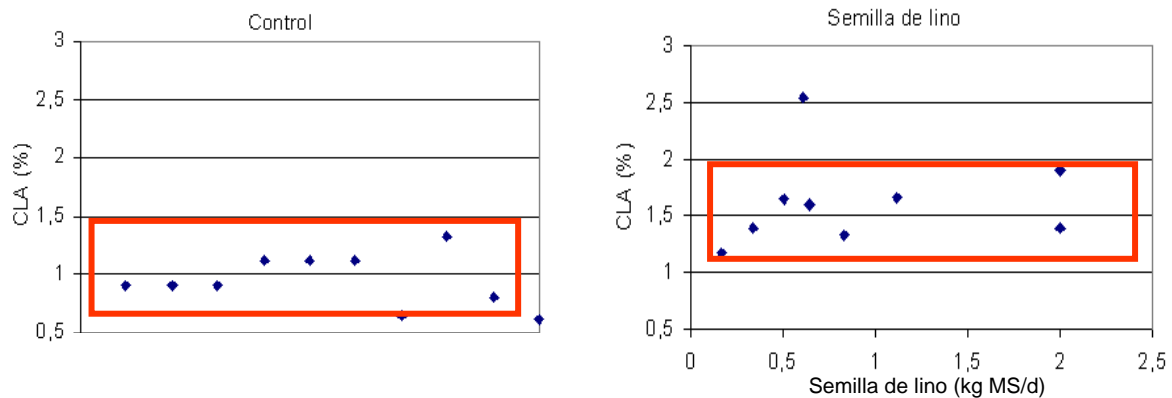
*Forma de presentación de la semilla de lino: E= semilla entera, M=molida, JC= jabón cálcico, F= tratamiento con formaldehído, A= aceite.

^{a,b}Las medias de la misma fila con diferente exponente son diferentes.

¹Efecto lineal y cuadrático significativo

De nuevo si comparamos la concentración láctea de CLA (% total AG) del grupo control con la del grupo suplementado con semilla de lino, se puede observar cómo parece difícil incrementar la concentración de CLA en la leche por encima de aproximadamente un 1,6% del total de AG (Figura 24).

Figura 24. Comparación entre el contenido lácteo de CLA (% total AG) del grupo control y del grupo suplementado con semilla de lino.



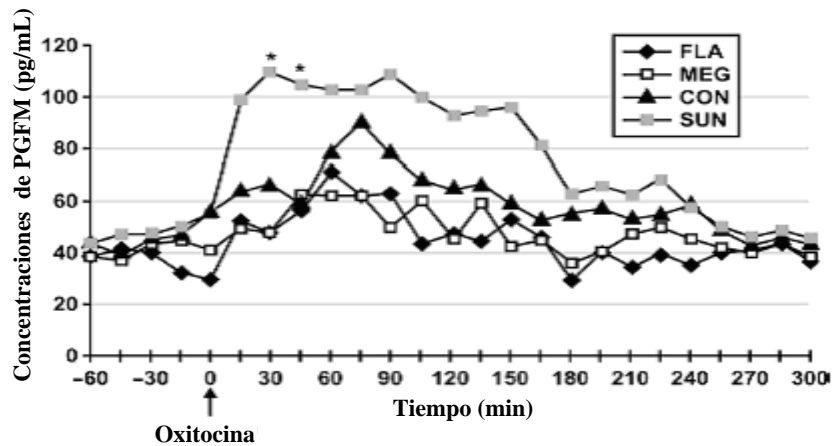
3.4. Efectos sobre la reproducción

Las menores tasas de gestación de las vacas lecheras en los últimos años parecen asociadas a una menor tasa de fertilización (<76%) y a una menor viabilidad de los embriones jóvenes (p. e., 20% no son viables) con mayores pérdidas embrionarias tempranas (p. e., <28 d; 20%) y menores pérdidas tardías (p. e., 24 a 42 d; 12,5%). El total de pérdidas desde la fertilización hasta el nacimiento ascienden hasta un 60% con una tasa de concepción final al nacimiento del 28% (Moore y Thatcher, 2006). Algunas de las pérdidas embrionarias ocurren porque los embriones no son capaces de producir suficiente IFN- τ y, por tanto, no inhiben la secreción de PGF $_{2\alpha}$ y se destruye el cuerpo lúteo que es el productor de progesterona. Si a través de la alimentación aumentamos los aportes de AG n-3, éstos compiten por los enzimas implicados en la transformación del ácido araquidónico (n-6) a PGF $_{2\alpha}$, a favor de la producción de PG de la serie 3, que son menos activas biológicamente. La reducción de la secreción de PGF $_{2\alpha}$ en el momento del reconocimiento materno de la gestación permitiría mantener activo el cuerpo lúteo y que éste produjera progesterona, permitiendo la implantación y el mantenimiento del embrión.

Petit *et al.* (2004) midieron las concentraciones de PGFM (metabolito de la PGF $_{2\alpha}$) en el día 15 del ciclo estral en vacas sincronizadas. Las mediciones las realizaron a diferentes tiempos después de una inyección de oxitocina en vacas que recibían diferentes dietas para comprobar si existía efecto del tipo de AG adicionado en la dieta sobre la secreción de PGF $_{2\alpha}$. La inyección de oxitocina estimula la secreción de PGF $_{2\alpha}$ por parte del útero y simula la oxitocina secretada por el cuerpo lúteo durante el reconocimiento materno de la

gestación. Los tratamientos fueron control (CON), jabones cálcicos de AG (MEG), semilla entera de lino (LIN) y semilla entera de girasol (SUN). Las concentraciones de PGFM fueron significativamente mayores a los 30 y a los 45 min después de la inyección de oxitocina en las vacas alimentadas con SUN que en aquellas que recibieron MEG, que tuvieron las concentraciones más bajas de PGFM, mientras que las dietas FLA y CON tuvieron concentraciones similares pero superiores a aquellas que recibieron MEG (Figura 25). No hubo diferencias entre tratamientos para las otras horas de muestreo.

Figura 25. Concentraciones plasmáticas medias de PGFM en vacas alimentadas con diferentes dietas. Adaptado de Petit *et al.* (2004).

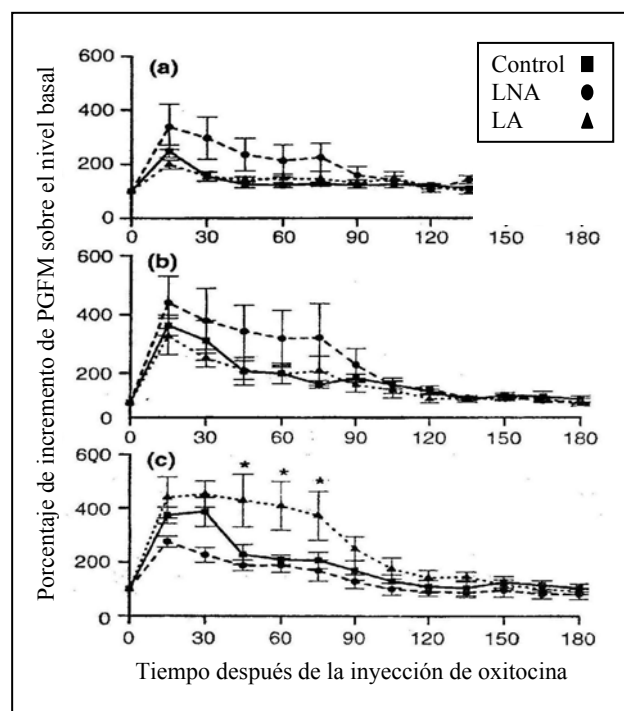


Robinson *et al.* (2002) (Figura 26) usaron 32 vacas en primera lactación que fueron asignadas a uno de los tres tratamientos: control, dieta rica en ácido linolénico (con lino) (LNA) o rica en ácido linoleico (con soja) (LA). Estudiaron la concentración de PGFM a las dos horas de una inyección de oxitocina los días 15, 16 y 17 del ciclo. Observaron que la dieta no tuvo ningún efecto en los días 15 y 16. En cambio, en el día 17 las vacas alimentadas con LA tuvieron mayores concentraciones de PGFM en relación con las vacas control. Parece que estas observaciones apoyan la hipótesis de que el incremento de la ratio n-3/n-6 decrece la síntesis de PG de la serie dos, por lo que sería interesante estudiar qué beneficios pueden observarse a nivel reproductivo como resultado de esta reducción en la síntesis de PG. La comprobación del efecto de la reducción de PG sobre el rendimiento reproductivo requiere un gran número de animales por lo que existen pocos trabajos en los que se haya estudiado este efecto. Petit y Twagiramungu (2006) utilizaron 141 vacas Holstein que fueron divididas en tres grupos y recibieron 3 dietas desde el momento del

parto: semilla de lino entera, jabones cálcicos de AG o semilla de soja micronizada. La mortalidad embrionaria entre el día 30 y 50 postinseminación tendió a ser menor ($P < 0,11$) para las vacas que recibieron semilla de lino (0%) comparadas con las que recibieron jabones cálcicos (15,4%) o soja (13,6%). El diámetro del cuerpo lúteo de las vacas alimentadas con semilla de lino fue mayor que el de las vacas alimentadas con soja (19,7 vs. 16,9 mm), pero no hubo diferencias con las vacas alimentadas con jabones cálcicos (17,5 mm). Petit *et al.* (2001) observaron que el ácido linolénico pudo ser, también, el responsable de la mejora en la tasa de concepción (87,5 vs. 50,0%) de las vacas ($n = 35$) alimentadas con semilla de lino tratada con formaldehído (17% de la MS) comparadas con aquellas que recibieron jabones cálcicos (5,6% de la MS) desde las semanas 9 a 19 postparto.

En conclusión, parece que estas observaciones apoyan la hipótesis de que el incremento de la ratio n-3/n-6 decrece la síntesis de PG de la serie dos y puede reducir la mortalidad embrionaria y mejorar la tasa de concepción.

Figura 26. Efecto de los AGPI dietarios sobre la concentración plasmática de PGFM en respuesta a la administración de oxitocina los días 15 (a), 16 (b) y 17 (c) del ciclo estral. Adaptado de Robinson *et al.* (2002).



4. CONCLUSIONES

Gran parte de la investigación sobre el uso de grasas en nutrición de rumiantes que se ha llevado a cabo en los últimos años viene mediada por el interés creciente por modificar el perfil de AG de la leche hacia uno más saludable. El hecho de que la grasa láctea tenga una mayor sensibilidad a la manipulación dietaria que no la lactosa o la proteína, hace que su estudio haya recibido más atención. El descubrimiento de los efectos beneficiosos de los AGPI n-3 y CLA sobre la salud humana ha hecho aumentar el número de trabajos en los que se ha estudiado cómo aumentar el contenido de éstos en la leche a través de la manipulación nutricional. También se han desarrollado nuevas grasas protegidas para resistir la biohidrogenación y aumentar el contenido de AG insaturados en la leche. Por último, han surgido nuevos estudios relacionando la producción de AG *trans* a nivel ruminal con la depresión de grasa en leche y, como resultado, se han intensificado las investigaciones en el campo de la biohidrogenación ruminal de los AG para conocer el origen de estos isómeros *trans* a nivel ruminal.

Debido a que hay muchos factores que modifican la lipólisis y biohidrogenación ruminal (procesos claves para determinar el perfil de AG que será incorporado en carne y leche) y debido a que aumenta la evidencia de que los efectos benéficos del CLA son isómero-específicos, es necesario seguir realizando investigaciones en este campo para entender los mecanismos que participan en la síntesis de AG a nivel ruminal.

Capítulo III

Objetivos

OBJECTIVES

General objectives

The main objectives of this thesis are: 1) to study the modification of milk fatty acid profile through animal nutrition, specifically using extruded linseed in dairy cow diets, and 2) to study different factors which can influence the production of *trans* intermediates fatty acids during ruminal biohydrogenation.

Specific objectives

- a. To evaluate the effects of feeding extruded linseed to dairy cows during early lactation on milk production and composition, and on milk fatty acid profile.
- b. To evaluate the effects of feeding extruded linseed to dairy cows during early lactation on prostaglandin secretion and reproductive performance.
- c. To evaluate the effects of pH and type of extruded oilseed on ruminal fermentation, lipolysis, biohydrogenation, effluent FA profile and DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes in a dual flow continuous culture.
- d. To evaluate the effects of pH and level of concentrate in the diet on ruminal fermentation, biohydrogenation, effluent FA profile and DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes in a dual flow continuous culture.
- e. To evaluate the effects of pH on methane production when using diets enriched in polyunsaturated fatty acids in a gas production trial.

Capítulo IV

**Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating
dairy cows**

Artículo aceptado para su publicación en el Livestock Science
(Livest. Sci. 2008, 113: 144-154)

**EFFECT OF EXTRUDED LINSEED ON PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE
PERFORMANCE OF LACTATING DAIRY COWS**

Abstract

A total of 356 early lactation multiparous Holstein cows were used in a randomised complete block design to determine the effects of feeding extruded linseed on milk production and composition, and reproductive performance. Forty of these cows were randomly selected to study the effects of extruded linseed on milk fatty acid (FA) profile, individual feed intake and prostaglandin secretion. Cows were fed a 40:60 forage to concentrate ratio diet (17.9% CP, 27.7% NDF and 6.0% EE) *ad libitum* that was similar in composition between treatments except for the protein supplements that differed and were control (CTR: 4.9% extruded soybean) and linseed (LIN: 5.5% extruded linseed). Individual DM intake measured at 40 (23.0 kg/d) and 90 (24.2 kg/d) days in milk, and milk yield (45.0 kg/d) were not affected by treatment, but the lower ($P < 0.05$) milk fat percentage in cows fed LIN (2.65%) compared with CTR (2.86%) resulted in lower ($P < 0.05$) 4.0% fat-corrected milk yield for cows fed LIN (35.4 kg/d) compared with CTR (37.7 kg/d). Milk protein content was higher ($P < 0.05$) in LIN (3.04%) than in CTR (3.00%). The concentration of saturated FA was lower ($P < 0.05$) in milk fat from LIN (56.2%) compared with CTR (60.2%). Monounsaturated FA (35.7 vs. 32.7%) and polyunsaturated FA (8.0 vs. 6.9%) were higher in LIN ($P < 0.05$) than in CTR. Supplementation with LIN also increased ($P < 0.05$) the proportion of vaccenic acid (2.21 vs. 1.55%), total conjugated linoleic acid (0.91 vs. 0.72%) and n-3 FA (1.21 vs. 0.54%) in milk compared with CTR. Plasma concentrations of prostaglandin metabolite were numerically lower in LIN (106 pg/ml) compared with CTR (120 pg/ml) ($P = 0.16$) but reproductive performance was similar between treatments. In summary, extruded linseed reduced milk fat percentage and 4.0% fat-corrected milk yield and increased milk protein percentage and the content of healthy FA in milk without modifying DM intake, milk yield and reproductive performance.

Keywords: extruded linseed, milk fatty acids, reproduction

1. Introduction

In the last decades average milk production in dairy herds has increased considerably while measures of fertility have declined (Butler, 1998). At least part of this decrease in fertility can be attributed to embryonic losses (Moore and Thatcher, 2006). At approximately 17 d after estrus and insemination, the interferon- τ (IFN- τ) produced by the embryo signals the pregnant status to the uterus, resulting in the inhibition of the pulsatile release of PGF_{2 α} from the endometrium, preventing the regression of the corpus luteum and maintaining pregnancy. A proportion of the early embryonic losses in cattle have been attributed to underdeveloped embryos producing inadequate amounts of IFN- τ (Thatcher et al., 2001; Santos et al., 2004). Changing the fatty acid (FA) profile of cattle diets may help the embryos that do not produce enough IFN- τ to maintain pregnancy. Linoleic acid (C_{18:2 n6}) is converted into arachidonic acid (C_{20:4 n6}) which is the precursor of the dienoic prostaglandins, such as PGF_{2 α} , with luteolytic activity in the bovine corpus luteum. However, the same elongase and desaturase enzymes also convert the main dietary n-3 FA (C_{18:3 n3}) into eicosapentanoic acid (C_{20:5 n3}), the precursor of the trienoic prostaglandins, such as PGF_{3 α} (Abayasekara and Wathes, 1999). Competition between n-3 and n-6 precursors for desaturation and elongation enzymes implies that increasing the supply of n-3 FA will decrease the production of dienoic prostaglandins in favour of trienoic prostaglandins. Trienoic prostaglandins have lower biological activity compared with dienoic prostaglandins, so that increasing n-3 FA in cow diets is expected to reduce endometrial synthesis of PGF_{2 α} (Mattos et al., 2002). This effect may contribute to a reduction in embryonic mortality, increasing fertility measures in cattle.

Nutritional modification of milk FA profile has received considerable attention over the last 25 years. The key objective has usually been to reduce saturated fatty acid (SFA) concentration and to increase monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentrations in milk, specially enhancing the content of some unsaturated fatty acids like n-3 FA and conjugated linoleic acid (CLA) (Jenkins and McGuire, 2006). The consumption of a diet rich in these FA may be beneficial for human health because these FA have been linked with a decrease in the incidence of cancer, diabetes, obesity, cardiovascular diseases, hypertension and arthritis (Simopoulos, 1996; Parodi, 1999). Linseed is the vegetable fat source with the highest amount of C_{18:3 n3} (50% of the total FA). The effects of linseed on milk FA profile have been demonstrated previously (Focant

et al., 1998; Dhiman et al., 2000; Petit et al., 2001; Ward et al., 2002; Petit et al., 2004), but there is limited information on the effects of feeding extruded linseed on reproductive performance. Studies with small number of cows indicated that feeding linseed improved conception rates in lactating dairy cattle (Petit et al., 2001; Ambrose et al., 2006) but reproductive outcomes require a larger number of animals to reach significance. Therefore, the objectives of the present experiment were to study the effects of feeding extruded linseed on milk production and composition, and on reproductive performance in a large number of animals.

2. Materials and methods

2.1. Animals, Housing and Diets

Three hundred and fifty six early lactation [25 ± 3 days in milk (DIM)] multiparous Holstein cows were randomly assigned to one of the two dietary treatments in a randomized complete block design. Animals were under the experimental period between weeks 4 and 20 of lactation. During the pretrial period (0 to 25 ± 3 DIM) all cows received the same total mixed ration (TMR) and were housed in the same barn. After this time, animals were randomly assigned to one of the two experimental diets: control (CTR) or linseed (LIN). Data on production (group feed intake and individual milk production and milk composition) and reproductive performance were collected from all cows. Forty of these cows (twenty/treatment) in their second lactation and without clinical signs of disease were selected to study individual feed intake, milk FA profile and concentrations of metabolites and reproductive hormones in blood.

Cows were fed a 40:60 forage to concentrate ratio TMR *ad libitum* once a day (0800 h). The two experimental diets were similar in composition except for the protein supplement. The CTR protein supplement was based on extruded soybeans and calcium salts of palm oil and the LIN protein supplement had whole extruded linseed (Table 1). Targeted daily intake of extruded linseed was 1.7 kg/cow. Diets were designed to yield similar fat intakes as a percentage of total DM intake and were calculated to be isonitrogenous and isoenergetic (Table 2). Both diets were formulated to meet requirements of a 600 kg body weight cow producing 45 kg/d of milk with 3.7% fat (NRC, 2001). Both protein supplements were extruded at 130-133°C and 36-40 atm of pressure during 2 seconds.

Cows were housed in two free stall barns of 200 cows each that were identical in design, size, location and orientation. The free stall barns were equipped with two rows of fans; one row in the feed bunk and the other in the stalls. Cows were milked three times daily (0800, 1600 and 2400 h). Body condition score was evaluated three times during the experiment using a five-point scale (Edmonson et al., 1989).

Table 1. Ingredient composition of the two experimental diets (g/kg DM¹ basis)

	CTR ²	LIN
Corn silage	20.2	20.2
Alfalfa hay	6.3	6.3
Dehydrated alfalfa	13.0	13.0
Corn	20.5	12.9
Soybean meal, solvent extract	7.6	9.8
Whole cottonseed	4.6	3.3
Beet pulp	3.3	2.2
Brewer grains	6.3	6.3
Beet molasses	2.1	2.1
Premix	6.4	6.4
<i>Protein supplement</i>		
Extruded linseed	-	5.5
Extruded soybean	4.9	-
Extruded corn	3.7	7.9
Extruded barley	-	4.1
Ca-soap of palm fatty acids	1.0	-
Rumen protected methionine	0.02	0.02

¹ DM: dry matter.

² CTR: control diet; LIN: linseed diet.

2.2. Experimental Procedures

Diets and refusals were weighed daily and TMR were sampled weekly. Samples were dried in a forced air oven at 70°C for 48 h, ground through a 1 mm sieve (Retsch, SM 2000, Haan, Germany), composited monthly and stored at 4°C for subsequent chemical analyses.

Milk yield from the three milkings were recorded individually twice monthly using the Afimilk[®] system (S.A.E Afikim, Kibbutz Afikim, Israel). Milk composition was analyzed every 15 days for the contents of fat, protein, lactose, somatic cell count (SCC) and solids non fat (SNF). Milk samples were kept refrigerated at 4°C until analysis. Milk samples from the subgroup of 40 cows (20/treatment) were collected at the morning milking at 40 ± 3 and 90 ± 3 DIM to analyze the FA profile. These samples were centrifuged at $9000 \times g$ during 15 min at 4°C (Hettich = Universal 32, Tutlingen, Germany). Fat layer was separated and stored at -25°C until analysis.

Table 2. Chemical and fatty acid composition of the two experimental diets and linseed

	CTR ¹	LIN	Linseed
<i>Chemical composition (% DM)</i>			
DM	58.4	58.6	92.3
NDF	28.2	27.2	-
ADF	16.2	15.5	-
NFC ²	40.7	41.1	-
CP	17.8	18.0	17.8
EE	5.8	6.3	38.2
Ash	7.5	7.4	3.6
<i>Fatty acids (% of total fatty acids)</i>			
C _{16:0}	25.1	18.9	7.6
C _{18:0}	3.5	4.2	5.2
C _{18:1 cis9}	20.8	20.8	20.0
C _{18:2 c9,c12}	42.0	34.5	14.5
C _{18:3 c9,c12,c15}	5.1	17.6	51.3

¹CTR: control diet; LIN: linseed diet. ²NFC = nonfibrous carbohydrates [100-ash+CP+NDF+EE)];

CP: crude protein; EE: ether extract.

Group DM intake was measured daily throughout the experiment. In order to obtain a representative estimate of individual cow DM intake during the study, 20 cows within each treatment were randomly selected to evaluate individual feed intake at 40 ± 3 and 90 ± 3 DIM using n-alkanes as markers. They were dosed with an intraruminal controlled release capsule (Alkane CRC, Captec Pty Ltd, Auckland, New Zealand) which contained the even-chained pair of n-alkanes C₃₂ (n-dotriacontane) and C₃₆ (n-hexatriacontane). The manufacturer guidelines indicate that the capsule delivers approximately 400 mg/d of each

alkane. Fecal sampling started 10 days after the controlled release capsule administration in order to achieve equilibrium of the alkanes in the gastrointestinal tract, and they were collected daily after the morning milking for a period of 6 consecutive days. Fecal samples were composited for each cow within each period and were dried in a forced air oven at 60°C for 72 h. The diets were sampled daily as described for fecal collection within each period, composited and dried at 70°C for 48 h. All samples were ground through a 1 mm sieve (Retsch, SM 2000, Haan, Germany) and stored refrigerated at 4°C until analysis.

Reproductive data from the 356 cows were recorded for the entire experimental period. These cows were not synchronized and the voluntary waiting period for breeding was 50 d postpartum. The method of estrous detection was a combination of visual observation and pedometer readings using the Afimilk[®] system (S.A.E Afikim, Kibbutz Afikim, Israel). Inseminations were performed at approximately 8 h after the activity (steps per hour) of the cow reached two standard deviations above individual mean activity. Semen sire used was randomly distributed across both treatments. Forty randomly selected cows had their estrous cycles synchronized with an initial i.m. injection of GnRH (100 µg of gonadorelin, Fertagyl[®], Intervet International B. V. Bowmeer, Holland) at 30 ± 3 DIM, an i.m. injection of PGF_{2α} (Estrumate[®], Schering-Plough Animal Health, Madrid, Spain) at 37 DIM, and 2 days later cows received a final i.m. injection of GnRH. The last injection of GnRH was assumed to be day zero of a new estrous cycle. Blood samples to determine progesterone concentrations were collected at the time of the PGF_{2α} injection, at the time of the second GnRH injection and 7 days later to confirm cyclicity.

Blood was sampled by puncture of the median coccygeal vein or artery into Vacutainer tubes containing K₂EDTA (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK). Plasma was separated and frozen for later analysis of progesterone. These samples were used to determine if cows responded to the synchronization protocol and had their ovulation synchronized. Cows were considered to be synchronized when progesterone concentration in blood was ≥ 1.0 ng/ml at PGF_{2α} injection, < 1.0 ng/ml at the last GnRH injection, and again ≥ 1.0 ng/ml on day 7 after the last GnRH injection. Cows not synchronized were subsequently removed from the analysis of the oxytocin challenge. On day 15 after the last GnRH, synchronized cows received an i.m. injection of 2 mg of estradiol benzoate (ABCR GmbH & Co. KG, Germany) at least 3 hours prior to a challenge with 100 IU i.v. of oxytocin (Oxiton 1000 U.I., Laboratorios Ovejero, SA[®], León, Spain) to stimulate

uterine production of PGF_{2α}. Blood was sampled using Vacutainer tubes containing K₂EDTA at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 min post oxytocin challenge for analysis of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2α} (PGFM) concentration, the main metabolite of PGF_{2α}. Five days after the challenge with oxytocin, these 40 cows were re-synchronized using the same synchronization protocol and 14 h after the last GnRH injection cows were inseminated by the same technician using the semen from the same sire. Blood samples from these 40 cows were collected to determine progesterone concentrations at days 1, 3, 5, 7 and 10 post insemination to study the effect of PUFA on progesterone concentrations.

Pregnancy was diagnosed by rectal palpation of the uterus at 36 and 60 days after each artificial insemination. Conception rate was defined as the proportion of inseminated cows that became pregnant on day 36 post insemination.

Blood was sampled by puncture of the median coccygeal vein or artery into Vacutainer tubes containing K₂EDTA at 40 days postpartum from 100 cows/treatment to determine concentrations of cholesterol, triglycerides (TG) and non esterified fatty acids (NEFA) in plasma.

All blood samples collected were kept refrigerated until centrifugation (1892 × g during 15 min at 4°C; Hettich = Universal 32, Tutlingen. D). Plasma was stored at -20°C for subsequent analyses.

2.3. Chemical Analyses

Feed samples were analyzed for DM (24 h at 103°C), ash (4 h at 550°C) and crude protein by the Kjeldahl method (AOAC, 1995), neutral detergent and acid detergent fiber (Van Soest et al., 1991) using sodium sulfite and a heat-stable alpha-amylase, and fat by Soxhlet with previous acid hydrolysis (AOAC, 1995). Methyl esters of FA of lipid supplements and TMR were prepared using the boron trifluoride method (AOAC, 1984) and were analyzed in a gas chromatograph (Perkin Elmer 8410, Beaconsfield, UK).

Milk composition was determined in a certified laboratory by near infrared spectrophotometry using a Milk-O-Scan (Milk-O-Scan 303 AB, Foss Electric, Hillerod,

Denmark). Milk fat samples for analysis of FA profile were composited in 5 subgroups of 4 cows each under the same treatment. The subgroups were formed by the same cows at 40 and 90 DIM. Milk fat was extracted following the procedure described by Luna et al. (2005). The fat residue extracted was stored in amber vials and exposed to a stream of N₂. An anhydrous milk fat with a certified FA composition (reference material BCR-164, Commission of the European Communities, Brussels, Belgium) was used to determine the FA methyl ester (FAME) response factors. For quantitative purposes, tritridecanoine (C_{13:0}) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) was used as internal standard. The FAMES were prepared by base-catalyzed methanolysis of the milk fat (2N KOH in methanol) as described in the International Standard ISO-IDF (2002). The FAMES were analyzed on a Perkin-Elmer chromatograph (model Autosystem, Beaconsfield, UK) with a flame ionization detector. Fatty acids were separated using CP-Sil 88 fused-silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d. × 0.2 µm film thickness) containing 100% cyanopropyl siloxane, stationary phase (Chrompack, Middelburg, The Netherlands). The column was held at 100°C for 1 min after injection, temperature-programmed at 7°C/min to 170°C, held there for 55 min, and then temperature-programmed at 10°C/min to 230°C and held there for 33 min. Helium was the carrier gas with a column inlet pressure set at 30 psig and at a split ratio of 1:20. The injector temperature was set at 250°C and the detector at 270°C. Injection volume was 0.5 µl.

In order to determine the concentrations of the n-alkanes, 0.5 g of feed and 1.5 g of fecal samples were weighed into Pyrex tubes containing 200 mg and 100 mg of an internal standard (an heptane solution that contained 1 mg/g of C₂₂ and C₃₄) for feed and feces, respectively. Alkane extraction was performed as described by Mayes et al. (1986) with the modifications of Oliván and Osoro (1999). Alkane analysis was carried out by on-column injection of 1 µl for feces and 0.2 µl for feeds of the eluate onto a 30 m x 0.530 mm HP-1 capillary column (1.5 µm thickness) in a gas chromatograph (Agilent, 6890, Lakeside, UK) fitted with an automatic injector and flame ionization detector. The carrier gas was helium (10 mL/min) as was the make-up gas to the detector (45 ml/min). The injector was programmed to track the oven temperature program as follows: 230°C for 0.2 min and a ramp of 6°C/min to 300°C, and maintained at that temperature for 18 min. The detector was maintained at 350°C throughout the whole process. Peak area data were processed using an integrator (HP 3396 A, Hayward, CA). Detector response factors for individual n-alkanes were determined by injecting into the chromatograph a standard n-

alkane mixture (C₂₁-C₃₆ inclusive) every 8 samples. Dry matter intake for individual cows was estimated during early and mid-lactation according to calculations developed by Mayes et al. (1986), based on the ratio of natural and dosed n-alkanes as follow:

$$DMI = \frac{D_{32} * (F_{C33}/F_{C32})}{Fe_{33} - [(F_{C33}/F_{C32}) * Fe_{32}]}$$

where D₃₂ is the amount of n-alkane dosed (400 mg/d of C₃₂), F_{C32} and F_{C33} are the fecal concentrations (mg/kg DM) of C₃₂ and C₃₃, and Fe₃₂ and Fe₃₃ are the total mixed diets concentrations (mg/kg) of C₃₂ and C₃₃, respectively. The ratio of C₃₃ and C₃₂ (natural:dosed) was utilized rather than C₃₁:C₃₂ because the results obtained with the first ones were closer to the group DM intake. Total tract apparent digestibility of DM was estimated by the relationship of n-alkane C₃₃ concentration in the total mixed diets and feces:

$$D = \frac{1 - C_{33fe}}{C_{33fe}}$$

where C_{33fe} is the concentration of C₃₃ in the diet (mg/kg DM) and C_{33fc} is the concentration of the alkane in feces (mg/kg DM).

Plasma concentrations of NEFA, TG and cholesterol were analyzed using an autoanalyzer Olympus AU400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg). Plasma NEFA concentrations were determined using the ACS-ACOD method (NEFA C, WAKO®, Neuss). For total TG, the glycerol phosphate oxidase/peroxidase method was used (Olympus Diagnostica GmbH, Lismeehan), and cholesterol was analyzed by an enzymatic colorimetric method (cholesterol oxidase/peroxidase) (Olympus Diagnostica GmbH, Lismeehan, Germany). Plasma progesterone concentrations were determined using an enzymatic competitive immunoassay (ELISA EIA-1561, DRG Diagnostics, Marburg, Germany). Concentrations of PGFM (13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2α}) were analyzed using the methodology described in Mann and Lamming (2001).

2.4. Statistical Analyses

Data were tested for normal distribution of the residuals by the PROC UNIVARIATE procedure of SAS (V.8.0. SAS Institute, Cary, NC). Residuals were considered to be normally distributed when the Shapiro-Wilk statistic was equal or greater than 0.90, and transformed if required. Milk yield and milk composition data, including the FA profile, were analyzed as repeated measures using the PROC MIXED of SAS with the following model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + T_i \times D_j + e_{ij},$$

where T is the treatment effect and D is the DIM effect. Cow was considered as a random effect nested within treatment in all the analyses. The relationship between the percentages of CLA and *trans*-11 C_{18:1} was determined by linear regression. Individual feed intake and blood metabolites data were analyzed using the PROC MIXED, and the main source of variation in the model was treatment. Blood PGFM concentrations were analysed as repeated measures with the following model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + H_j + T_i \times H_j + e_{ij},$$

where H is the effect of time (minutes) post oxytocin injection. The Akaike's information criterion was used to identify the best covariance structure for each dependent variable analyzed except for PGFM data, where ANTE(1) was the covariance structure used because it had a more similar pattern compared with results obtained. All data shown are least square means.

Dichotomous data outcomes such as conception rate, proportion of pregnant cows, culling, and estrous detection rate were all analyzed by logistic regression using the LOGISTIC procedure of SAS. All models included the effects of treatment and milk yield during the study. Interval between calving and first AI and interval between the first and second AI for cows observed in estrus prior to pregnancy diagnosis were analyzed by ANOVA using the GLM procedure of SAS, and the model included the effects of treatment and milk yield. Interval between the end of voluntary waiting period and first AI was analyzed by survival analysis using the product limit method of the Kaplan-Meier model by the

LIFETEST procedure of the SAS program. Concentrations of progesterone in plasma were analyzed by ANOVA for repeated measures using the MIXED procedure of the SAS program with cow nested within treatment as the random error. The covariance structure that best fitted the data based on the Schwartz Bayesian criterion was utilized. Significance and tendencies were declared at $P < 0.05$ and $P < 0.10$, respectively, unless otherwise indicated.

3. Results and discussion

The chemical composition of the total mixed diets was similar between treatments except for the FA composition (Table 2), reflecting our formulation objectives. The concentration of C_{18:3} was higher for LIN diet (17.6 vs. 5.1% of total FA) compared with CTR because linseed is rich in linolenic acid, and the C_{18:2} concentration was higher for CTR diet (42.0 vs. 34.5% of total FA) than for LIN diet, as soybean is rich in linoleic acid.

Mean DM intake estimated using n-alkanes for the subgroup of 20 cows/treatment at 40 (23.0 kg/d) and 90 (24.2 kg/d) DIM were not affected by treatment (Table 3), but was lower than the group DM intake estimates (average of 26.5 kg/d). The lack of difference in DM intake between treatments indicates that linseed is readily accepted by dairy cows. This result agrees with other studies (Kennelly, 1996; Chouinard et al., 1998; Dhiman et al., 2000; Petit et al., 2001; Petit, 2002; Petit et al., 2002; Ward et al., 2002; Petit et al., 2004; Gonthier et al., 2005) where feeding up to 15% of the total DM as linseed had no effect on DM intake.

Milk production was not affected by linseed supplementation (Table 3), and this agrees with most studies where linseed was used in cow diets (Kennelly, 1996; Chouinard et al., 1998; Dhiman et al., 2000; Petit et al., 2002; Ward et al., 2002; Petit, 2003; Gonthier et al., 2005), although in some studies a higher milk yield was reported (Petit et al., 2001; Petit, 2002; Petit et al., 2004). Only in one case milk yield decreased in cows that received whole linseed (Kennelly, 1996).

Table 3. Dry matter intake (DMI), milk production and milk composition of Holstein dairy cows fed control (CTR) and linseed (LIN) diets between weeks 4 and 20 of lactation

Item	CTR	LIN	SEM
Digestibility, ¹ %	56.0	56.7	0.01
DMI D40, kg/d	23.6	22.4	1.34
DMI D90, kg/d	24.6	23.9	1.90
Milk yield, kg/d	45.6	44.5	0.68
4% fat-corrected milk yield, kg/d	37.7 ^a	35.4 ^b	0.64
Fat, %	2.86 ^a	2.65 ^b	0.06
Fat yield, g/d	1303 ^a	1174 ^b	2.99
Protein, %	3.00 ^a	3.04 ^b	0.02
Protein yield, g/d	1364	1350	1.89
Lactose, %	4.77	4.77	0.02
Solid non-fat, %	8.51	8.53	0.03
SCC ² , x10 ³ ml ⁻¹	302.3	293.3	38.39

¹ Average apparent total tract dry matter digestibility measured at 40 and 90 DIM.

² SCC: somatic cell count.

^{a,b} Means within a row with different letter differ ($P < 0.05$).

In contrast to milk yield, 4.0% fat-corrected milk yield was lower in cows fed LIN than in those fed CTR because feeding LIN reduced milk fat concentration compared with CTR (Table 3). Although the low average milk fat percentage observed in both treatments is probably due to the low level of NDF and ADF in the diets, the difference observed in the milk fat percentage between treatments is probably an effect of the fat source. This agrees with Petit (2002) who observed that milk fat percentage was lower for cows that received whole linseed at 10% of the diet DM compared with cows that received calcium soaps of palm oil, but yield of fat corrected milk was not affected. In contrast, Petit et al. (2004) found that 4.0% fat-corrected milk yield was higher for cows fed linseed compared with those fed sunflower or the control diet. This effect was justified by an increase in milk production without changes in milk fat content. Linseed inclusion in the study of Petit et al. (2004) was about 10% of DM compared with the 5.5% of DM in the present experiment. Ward et al. (2002) did not find differences in the fat percentage or milk yield between treatments when 8.3% DM was incorporated as whole ground linseed. It may be argued that the use of extruded linseed in the current study could make the fat more available in the rumen and was responsible for the milk fat depression observed. Chow et al. (2003),

using extruded linseed and raw linseed *in vitro*, observed that linoleic and linolenic acids were hydrolyzed and biohydrogenated to a higher proportion in the extruded seed than in the raw seed. This can be the result of the destruction of the protein-fat matrix of the linseed during the extrusion process releasing the fat quicker and increasing its availability to be metabolized in the rumen (Gonthier et al., 2004). If the fat is more available in the rumen, then the proportion of biohydrogenation should also increase. Intermediates of the biohydrogenation process such as C_{18:2 t10,c12} are thought to be responsible for causing the milk fat depression syndrome observed when fat is supplemented to cow diets (Bauman and Griinari, 2003). Consequently, feeding extruded linseed could increase the production of biohydrogenation intermediates and this could increase the risk of milk fat depression. In contrast, Dhiman et al. (2000) used 1, 2 and 4% of linseed oil inclusion in cow diets and observed that milk fat percentage was only reduced in cows that received the diet with the highest concentration of linseed oil. The linseed used in the current experiment had 38% oil, which would be equivalent to an inclusion of 2.1% oil in the ration, suggesting that we should not have found differences in the milk fat percentage between treatments if we expected to have similar results.

Milk protein content was higher for cows fed LIN compared with those fed CTR (Table 3). Reports in the literature on the effects of linseed on milk protein content have not been consistent, with studies reporting increases (Petit et al., 2001; Petit, 2002; Petit, 2003), no changes (Kennelly, 1996; Chouinard et al., 1998; Dhiman et al., 2000; Petit et al., 2002; Petit et al., 2004), or decreases (Kennelly, 1996; Ward et al., 2002). Linseed processing may partially explain the results obtained in the literature. In two of the three studies where linseed increased milk protein content (Petit et al., 2001 and Petit, 2003) the seed was treated with formaldehyde, suggesting that formaldehyde treatment could be effective in protecting the seed-protein from ruminal degradation. In the current study, linseed was heat-processed. Heat treatment of oilseeds may change the site of protein digestion from the rumen to the small intestine without affecting the total tract digestibility (Gonthier et al., 2004). However, extrusion has been shown to be less effective than other heat treatments in protecting oilseed protein from ruminal degradation. Gonthier et al. (2004) observed a lower ruminal and a higher post-ruminal crude protein digestibility for cows fed micronized linseed compared with those fed extruded linseed, but milk protein content was not affected. Although extrusion could increase the amount of amino acids available to be absorbed in the intestine, increasing the pool of amino acids available for protein synthesis

in the mammary gland, it is also possible that the higher milk protein content in LIN cows might have resulted from a numerical lower milk production in LIN cows compared with CTR cows because protein yield was not affected by treatment (Table 3).

Body condition score at 85 ± 3 DIM (2.72 vs. 2.61) and 105 ± 3 DIM (2.96 vs. 2.75) was greater for LIN cows compared with CTR cows. The improved BCS for LIN cows could be the result of the lower fat-corrected milk yield observed in LIN cows compared with CTR cows (Table 3). This would agree with the results of Petit (2002), who suggested that greater fat mobilization could have contributed to the increased milk yield of cows fed calcium salts of palm oil compared with linseed.

Concentrations of cholesterol, TG and NEFA in plasma were not affected by treatments at 40 days postpartum (Table 4). These results agree with Petit et al. (2004) who did not find differences in NEFA and total cholesterol between cows that received isolipidic diets supplemented with linseed and calcium soaps of FA.

Table 4. Concentrations of metabolites in plasma at 40 days postpartum in cows fed control (CTR) or linseed (LIN) diets

	CTR	LIN	SEM
Cholesterol (mg/dl)	263.6	255.0	9.00
Triglycerides (mg/dl)	8.26	8.78	0.40
NEFA ¹ (mmol/l)	0.26	0.28	0.02

¹NEFA = non-esterified fatty acids.

The FA profile differed between 40 and 90 DIM (Table 5). Changes in the FA profile when fat supplements are added to the diet depend on the stage of lactation. Grummer (1991) suggested that the efficiency of FA transfer from plasma to the mammary gland is reduced as lactation advances after 2 or 3 weeks postpartum. Therefore, a larger change was expected at 40 than at 90 DIM when PUFA were added to the diet. However, in the current study, at 40 DIM cows had only received the treatment diets for 15 ± 3 days and, therefore, changes observed at 90 DIM were larger than at 40 DIM (Table 5).

Table 5. Milk fatty acid composition at 40 and 90 DIM of cows fed control (CTR) or linseed (LIN) diets

Fatty acid (%)	Treatment ¹				P-value		
	CTR 40	LIN 40	CTR 90	LIN 90	Treat	Day	TreatxDay
C _{4:0}	3.36	3.17	2.52	2.62	0.79	0.03	0.39
C _{6:0}	2.24	1.96	1.66	1.79	0.50	0.01	0.08
C _{8:0}	1.28 ^a	1.07 ^b	0.95	1.03	0.32	0.01	0.03
C _{10:0}	2.84 ^a	2.28 ^b	2.31	2.33	0.13	0.09	0.06
C _{12:0}	3.02 ^a	2.42 ^b	2.78	2.61	0.07	0.83	0.10
C _{14:0}	9.54 ^a	8.03 ^b	9.98 ^a	8.89 ^b	0.04	0.04	0.45
C _{16:0}	25.86 ^a	22.85 ^b	27.66 ^a	22.54 ^b	0.01	0.15	0.05
C _{18:0}	8.90 ^b	11.35 ^a	8.01	10.00	0.01	0.09	0.71
C _{18:1 cis9}	20.94 ^b	24.67 ^a	19.85 ^b	22.55 ^a	0.01	0.05	0.49
C _{18:1 t10}	2.19	1.70	3.24	2.06	0.09	0.19	0.50
C _{18:1 t11}	1.77	1.99	1.32 ^b	2.43 ^a	0.03	0.98	0.01
C _{18:2}	5.46	5.40	5.33 ^b	6.08 ^a	0.11	0.18	0.06
C _{18:2 t10,c12}	0.01 ^b	0.03 ^a	0.02 ^a	0.01 ^b	0.09	0.02	<0.0001
C _{18:3}	0.48 ^b	0.86 ^a	0.47 ^b	1.11 ^a	0.01	0.10	0.07
CLA ²	0.73	0.79	0.70 ^b	1.02 ^a	0.01	0.08	0.04
n-3	0.54 ^b	1.06 ^a	0.54 ^b	1.36 ^a	0.01	0.08	0.07
n-6	5.17	4.80	4.87	5.02	0.63	0.63	0.01
n-6/n-3	9.50 ^a	5.07 ^b	9.01 ^a	3.71 ^b	<0.0001	0.07	0.36
SFA ²	60.70 ^a	56.77 ^b	59.70	55.64	0.02	0.38	0.96
MUFA ²	32.12 ^b	35.68 ^a	33.31	35.67	0.01	0.56	0.56
PUFA ²	7.02	7.37	6.81 ^b	8.56 ^a	0.01	0.10	0.03
SCFA ²	7.06	6.32	5.27	5.54	0.47	0.01	0.14
MCFA ²	18.01 ^a	14.91 ^b	18.29 ^A	16.43 ^B	0.01	0.11	0.25
LCFA ²	74.77 ^b	78.59 ^a	76.27	77.89	0.01	0.51	0.09

¹CTR40 = control diet at 40 DIM; LIN40 = linseed diet at 40 DIM; CTR90 = control diet at 90 DIM; LIN90 = linseed diet at 90 DIM.

²CLA = total conjugated linoleic acid, SFA = saturated fatty acids, MUFA = monounsaturated fatty acids, PUFA = polyunsaturated fatty acids, SCFA = short chain fatty acids (C4:0 to C12:0), MCFA = medium chain fatty acids (C14:0 to C16:0), LCFA = long chain fatty acids (C18:0 to 20:5).

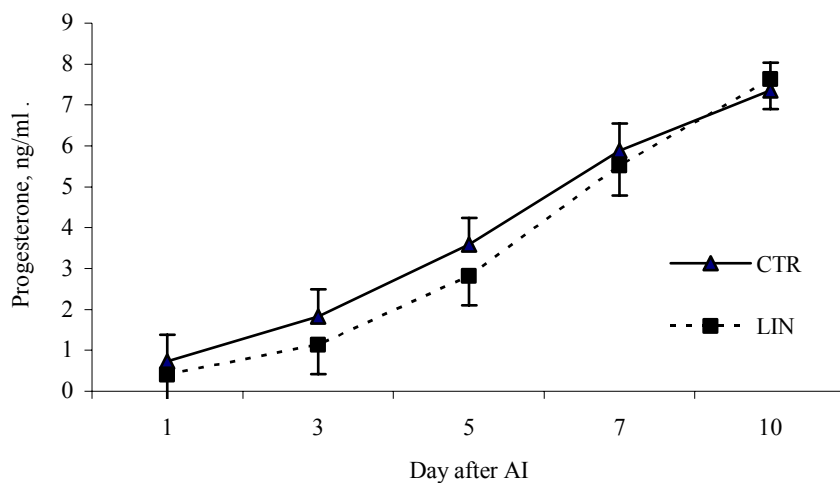
^{a,b} Means within a row and within a day (40 or 90 days postpartum) with different letters differ ($P < 0.05$). ^{A,B} Means within a row and within a day (40 or 90 days postpartum) with different letters differ ($P < 0.10$).

The LIN diet reduced medium chain FA (MCFA) and increased long chain FA (LCFA) concentrations in milk compared with CTR diet (Table 5). Linseed supplementation reduced SFA and increased MUFA and PUFA concentrations in milk. The concentrations of total n-3 FA and C_{18:3} increased in cows that received the LIN diet compared with cows fed the CTR diet, reflecting the greater dietary intake of C_{18:3} with the LIN diet (Table 2), and agrees with Kennelly (1996), Petit (2002 and 2003), Ward et al. (2002) and Petit et al. (2004). Feeding LIN resulted in a smaller n-6 to n-3 FA ratio (4.39 vs. 9.26%) in milk compared with CTR, which would improve the nutritive value of milk from a human health point of view. This agrees with Petit (2002) who reported a decrease in the n-6 to n-3 FA ratio when cows were fed whole linseed compared with calcium soaps of palm oil. Simopoulos (1999) indicated that this ratio should decrease from the current 20-30 to 1 to less than 4 to 1 to reduce the potential risk of coronary heart disease. The reduction in C_{14:0} and C_{16:0}, FA with an hypercholesterolemic effect (Ward et al., 2002), and the increase in C_{18:0} and C_{18:1}, FA that do not have an hypercholesterolemic effect (Hu et al., 2001), in LIN cows may also be beneficial to human health. Moreover, CLA and *trans*-11 C_{18:1} concentrations were higher in LIN cows compared with CTR. There was a trend (P = 0.08) for a positive relationship between CLA and *trans*-11 C_{18:1} in milk ($r^2 = 0.33$; $y = 0.18x + 0.54$) probably due to the tight correlation between linolenic acid and *trans*-11 C_{18:1} in the biohydrogenation metabolic pathway, and between *trans*-11 C_{18:1} and CLA synthesis in the mammary gland through the Δ -9 desaturase (Jenkins and McGuire, 2006). There are few reports where cows were fed linseed and CLA concentration in milk was measured. Dhiman et al. (2000), using linseed oil at 2% and 4% of the dietary DM, observed that CLA concentration in milk increased 305% and 318%, respectively, for the two dietary linseed oil concentrations compared with cows not receiving linseed oil. However, when 1% of linseed oil was used, milk CLA concentration in cows receiving linseed oil did not differ from that of cows not receiving linseed oil. In the current experiment, cows received a diet with an equivalent of 2.1% linseed oil in LIN, and this was sufficient to increase CLA concentration in LIN milk at 90 DIM by approximately 46%.

Plasma progesterone concentrations were not affected by treatment (Figure 1). Our results agree with Petit et al. (2004) who did not observe differences in milk progesterone concentrations among four dietary treatments which differed in the FA profile: control (no supplemental fat, 3.6% EE), calcium soaps of palm oil fatty acids (rich in C_{18:1}, 6.2% EE), linseed (rich in C_{18:3}, 6.6% EE) and sunflower (rich in C_{18:2}, 6.7% EE). However, Robinson

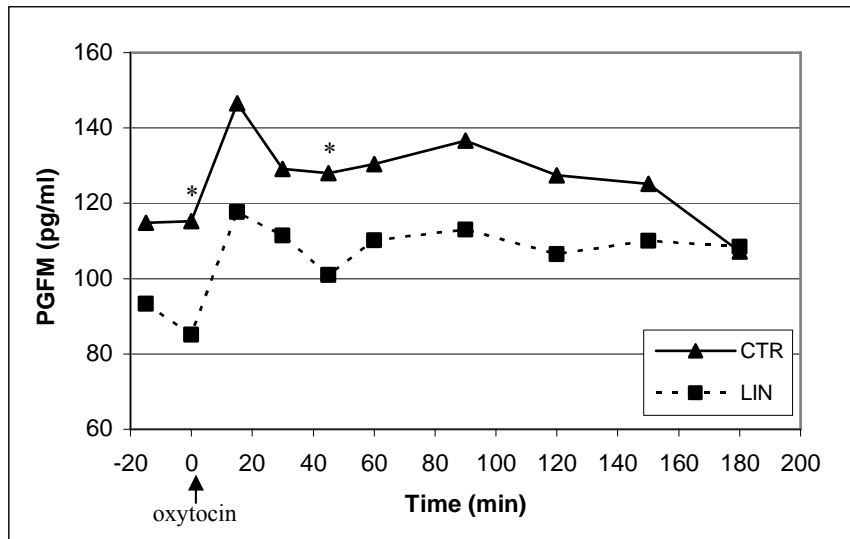
et al. (2002) reported a reduced plasma progesterone concentration in the early luteal phase of cattle supplemented with n-3 (5.0% EE) and n-6 (5.0% EE) rich diets compared with control diets (2.7% EE), indicating that PUFA could have a negative effect on reproductive performance. Similar results were obtained in vitro by Hinckley et al. (1996) who observed that the addition of long chain PUFA to dispersed bovine luteal cells decreased progesterone secretion. These results are in contrast with the majority of studies in cattle using saturated fat supplements, where plasma progesterone is generally increased (Staples et al., 1998). Because diets in the current experiment were rich both in n-3 (LIN) and n-6 (CTR) FA and we did not have a control diet without fat supplemented, the lack of effect was expected.

Figure 1. Concentrations of progesterone in plasma in synchronized cows (corpus luteum regression and ovulation) fed control (CTR) or linseed (LIN) diets. The mean (\pm SEM) were 3.88 ± 0.45 and 3.50 ± 0.49 ng/ml for CTR and LIN cows, respectively. Effect of diet ($P = 0.58$), day after AI ($P < 0.0001$) and interaction between treatment and day after AI ($P = 0.91$).



The concentration of PGFM, expressed as the average value for all sampling times, was numerically smaller ($P = 0.16$) for LIN cows ($n = 13$, 105.7 pg/ml) compared with CTR cows ($n = 16$, 120.0 pg/ml). There was a tendency to an interaction between treatment and time for PGFM concentration, being higher at 0 min ($P = 0.06$) and 45 min ($P = 0.09$) after the oxytocin challenge (Figure 2) for cows fed the CTR diet compared with those fed the LIN diet, and there were no differences between treatments for other sampling times.

Figure 2. Mean plasma 13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM) concentrations following an oxytocin challenge on day 15 of a synchronized estrous cycle for lactating Holstein cows fed control (CTR) (n=16) and linseed (LIN) (n=13) diets



* The PGFM response tended to be higher in cows fed CTR compared with the LIN diet at 0 and 45 min after injection of oxytocin ($P < 0.10$).

This agrees with Petit et al. (2004) who observed that cows fed sunflower (rich in linoleic acid) had higher concentrations of PGFM at 30 and 45 min compared with cows fed linseed, whose concentrations were similar to the ones fed calcium soaps of FA or the control diet. Moreover, Robinson et al. (2002) measured PGFM secretion 2 hours after an oxytocin injection in cows fed three different diets: a control diet, a diet rich in linolenic acid and one rich in linoleic acid, and observed that cows fed the linoleic-rich diet had higher concentration of PGFM at day 17 of the cycle. However, Petit et al. (2002) observed that PGFM concentration tended to be higher for cows fed a mixture of linseed treated with formaldehyde and fish oil compared with cows that received either linseed treated with formaldehyde or the fish oil infusion in the duodenum. The trend for higher concentrations of PGFM for cows fed the mixture of linseed treated with formaldehyde and fish oil was unexpected and it is in contrast with the results of Mattos et al. (2002), who reported reduced plasma PGFM responses for cows fed fish meal. The discrepancy in the results of Petit et al. (2002) may result from the fact that the mixture of linseed treated with formaldehyde and fish oil had a small effect on the n-6 to n-3 ratio of prostaglandin precursors. Therefore, results of the current study suggest that an increase in the n-3/n-6

FA ratio in the diet could tend to decrease the basal level and also the secretion of series two prostaglandins, which has been suggested to have implications in embryonic survival (Thatcher et al., 2001; Santos et al., 2004).

Table 6. Effect of extruded linseed on fertility responses and culling of lactating cows

Response	CTR ¹	LIN	AOR ²	95% CI	P-value
Cows, no.	167	189	---	---	---
DIM at first AI	60.7 ± 0.8	62.3 ± 0.8	---	---	0.14
Estrous detection, %					
By day 21 after first AI	12.9	19.1	1.54	0.72 - 3.31	0.26
By day 35 after first AI	65.4	69.6	1.21	0.69 - 2.15	0.51
Interestrous interval, d	24.8 ± 0.5	24.2 ± 0.6	---	---	0.42
Conception rate 1 st AI, %	39.2	38.8	1.02	0.66 - 1.57	0.94
Conception rate all AI, %	39.7	33.8	0.78	0.57 - 1.06	0.12
Proportion pregnant, %	73.3	65.8	0.70	0.44 - 1.11	0.13
Number of AI					
Median	1	1	---	---	0.93
Mean	1.85 ± 0.09	1.95 ± 0.09	---	---	0.44
Culling, %	7.8	13.2	1.76	0.87 - 3.57	0.12

¹CTR: control diet; LIN: linseed diet.

²AOR = adjusted odds ratio; CI = confidence interval. CTR was considered the reference for comparison.

In spite of the numerical changes observed in PGFM secretion, percentage of estrous detection, conception rate, number of artificial inseminations (Table 6), responses after synchronization of ovulation (Table 7) and interval from calving to pregnancy (Figure 3) were not improved in LIN cows compared with CTR cows.

Table 7. Effect of extruded linseed on ovulatory responses after a synchronization of ovulation in lactating cows

Response	CTR ¹	LIN	AOR ²	95% CI	P-value
Cows, no.	20	19	---	---	---
CL regression, ³ %	70.0	73.7	1.20	0.30 – 4.86	0.80
Ovulation, ⁴ %	85.7	71.4	0.42	0.06 – 2.77	0.37
Synchronization, ⁵ %	60.0	52.6	0.74	0.21 – 2.64	0.64

¹CTR: control diet; LIN: linseed diet.

² AOR = adjusted odds ratio; CI = confidence interval. CTR was considered the reference for comparison.

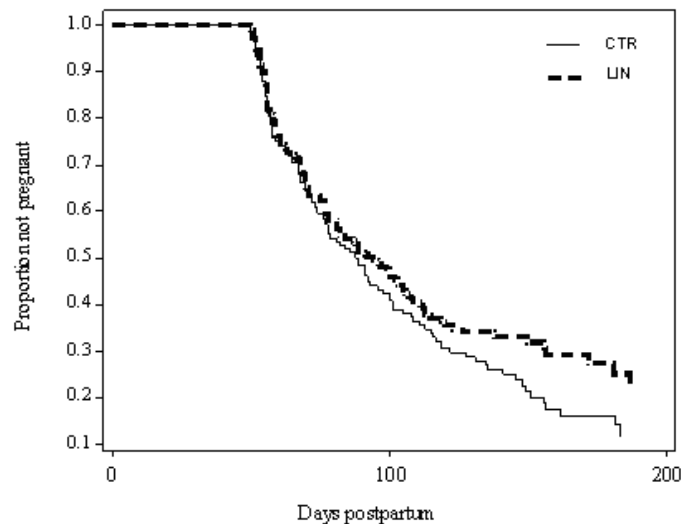
³ CL = corpus luteum. Progesterone < 1 ng/ml 72 h after the injection of PGF_{2α}.

⁴ Cows with progesterone > 1 ng/ml after day 5 from those that regressed the CL.

⁵ CL regression and ovulation.

These results do not agree with other experiments where lower number of animals were used. Petit and Twagiramungu (2002) observed that embryonic mortality from day 30 to 50 post insemination tended ($P = 0.11$) to be reduced in cows that received linseed (0%) compared with cows that received calcium soaps of palm oil (15.4%) or soybean (13.6%), indicating that linseed improved embryonic survival, which could have been mediated by suppression of PGFM secretion and enhanced embryo-uterus cross-talk. Moreover, Petit et al. (2001) observed that feeding linseed increased conception rate compared with cows fed calcium soaps (87.5 vs. 50.0%), indicating that linseed fatty acids, particularly linolenic acid, could have been responsible for these results. They suggested that the better conception rate observed with the linseed supplementation could result from differences in prostaglandin synthesis, thereby improving maternal recognition of pregnancy. Also, changes in progesterone concentrations in cows fed linseed compared with calcium soaps of palm oil could have enhanced embryo development (Mann and Lamming, 2001), further improving fertility. In a recent experiment, Ambrose et al. (2006) observed that supplementing dairy cows ($n = 121$) with linseed at 9% of the DM reduced pregnancy losses and increased the conception rate at first AI. It is not clear if the greater level of production in the current experiment, which was substantially higher than in previous studies, might have masked some of the reproductive benefits of feeding linseed and could have made the response in PGFM secretion insufficient to improve conception rate.

Figure 3. Survival curves for interval from calving to pregnancy in cows fed control (CTR) or linseed (LIN) diets. Nonpregnant cows at the end of the study were censored. Median interval from calving to pregnancy were 88 and 92 days for CTR and LIN, respectively ($P = 0.13$). Mean (\pm SEM) days to pregnancy for CTR and LIN were, respectively, 102.5 ± 3.9 and 111.2 ± 4.1). For CTR, 121 cows experienced the event and 45 were censored, whereas for LIN 123 cows experienced the event and 64 were censored.



4. Conclusions

Feeding extruded linseed did not modify dry matter intake or milk yield but reduced yields of fat and fat-corrected milk, milk fat content, and increased milk protein content. Supplementing diets with extruded linseed reduced short and medium chain fatty acids, and increased long, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid concentrations in milk fat. It also increased n-3, *trans*-11 C_{18:1} and total CLA concentrations, and reduced the n-6 to n-3 fatty acid ratio. This fatty acid profile of milk fat may be beneficial for human health.

The basal concentration of PGFM and the uterine release in response to an oxytocin challenge tended to be lower in cows fed linseed, supporting the hypothesis that increasing the n-3 FA in the diet decreases the synthesis of uterine PGF_{2 α} . Although a reduction in PGF_{2 α} was expected to improve conception rate in LIN cows, reproductive performance was not modified.

Capítulo V

**Effect of pH on rumen fermentation and biohydrogenation of extruded soybean and
linseed fatty acids in continuous culture**

EFFECT OF pH ON RUMEN FERMENTATION AND BIOHYDROGENATION OF EXTRUDED SOYBEAN AND LINSEED FATTY ACIDS IN CONTINUOUS CULTURE

Abstract

Eight dual-flow continuous culture fermenters (1,320 mL) were used in two replicated periods of 7 d (4 d of adaptation and 3 d for sampling) to study the effects of pH (High = 6.4 vs. Low = 5.6) and diet (Soybean vs. Linseed) on rumen microbial fermentation, lipolysis and apparent biohydrogenation, flow of fatty acid (FA) and DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes. Diets had a 40 to 60 forage to concentrate ratio and differed in the fat supplement, with the soybean diet having extruded soybean and the linseed diet having extruded linseed. Samples from solid and liquid mixed effluents were taken for determination of total N, ammonia-N and volatile fatty acids concentration, and the remainder of the sample was lyophilized. Dry samples were analyzed for dry matter, ash, neutral and acid detergent fiber, FA and purine contents. The low pH reduced organic matter and fiber digestibility, ammonia-N concentration and flow, bacterial N flow and crude protein degradation, and increased non-ammonia and dietary N flows. Linoleic (LA) and linolenic acid (LNA) apparent biohydrogenation were reduced by the low pH (LA = 0.44 vs. 0.82; LNA = 0.54 vs. 0.84). The low pH also reduced LA and LNA lipolysis but to a lesser extent than biohydrogenation (LA = 0.92 vs. 0.99; LNA = 0.94 vs. 0.99). The low pH reduced the proportion of C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1} and *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA), and increased the proportion of *trans*-10 C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} and *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent. Lowering the pH from 6.4 to 5.6 reduced *Anaerovibrio lipolytica* (1.85 vs. 67.0 pg/10 ng total DNA) and *Butyrivibrio* vaccenic acid producer subgroup DNA concentrations (316 vs. 1149 pg/10 ng total DNA) and increased *Butyrivibrio* stearic acid producer subgroup DNA concentration (1907 vs. 1216 pg/10 ng total DNA). The linseed diet increased ammonia-N concentration and flow, and tended ($P = 0.06$) to increase crude protein degradation. Lipolysis of LA and LNA was also higher in linseed compared with soybean diet (LA = 0.98 vs. 0.92; LNA = 0.98 vs. 0.94). Linseed diet reduced the proportion of C_{18:2} and *trans*-10, *cis*-12 CLA, and increased the proportion of C_{18:3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} in the effluent compared with soybean diet. Results indicate that pH inhibited lipolysis and apparent biohydrogenation. Fat of extruded soybean seemed more protected against lipolysis than that of extruded linseed.

Key words: biohydrogenation, fatty acid, lipolysis, pH

1. Introduction

Milk fat depression is characterised by the reduction in milk fat content and the alteration in milk fatty acid (FA) composition (higher amounts of *trans*-C_{18:1} and CLA) when feeding certain diets to dairy cows (Palmquist et al., 1993). In a previous in vivo study, supplementation of extruded linseed to dairy cows reduced milk fat percentage (2.65 vs. 2.86%) and yield (1174 vs. 1303 g/d) compared with extruded soybean (Fuentes et al., 2008a). Bauman and Griinari (2003) reviewed several theories to explain the mechanism by which milk fat secretion is reduced: a) alteration in rumen fermentation that results in a lower production of acetate to support milk fat synthesis, b) increased rumen production of propionate which causes an insulin-induced shortage of precursors for milk fat synthesis; and c) inhibition of mammary synthesis of milk fat by unique FA produced as a result of the alterations in rumen biohydrogenation. The third theory has gained support over the last decade even more when it was demonstrated that some biohydrogenation intermediates, such as *trans*-10, *cis*-12 CLA, could be potent inhibitors of milk fat synthesis (Baumgard et al., 2000). Recently, two additional inhibitory biohydrogenation intermediates (*trans*-9, *cis*-11 and *cis*-10, *trans*-12 CLA) were identified as inhibitors of milk fat synthesis (Saebo et al., 2005; Perfield et al., 2007).

Two conditions are required to observe a diet-induced milk fat depression: a dietary supply of PUFA and a change in the microbial processes in the rumen. In low fiber diets, the change in microbial fermentation is characterized by a decline in rumen pH and a shift in the rumen pattern of VFA. The effect of pH on rumen lipolysis and biohydrogenation has been widely studied in short-term fermentation studies (Van Nevel and Demeyer, 1996; Troegeler-Meynadier et al., 2006; AbuGhazaleh and Jacobson, 2007). However, few long-term fermentation experiments have been conducted (Martin and Jenkins, 2002; Qiu et al., 2004). Furthermore, there is no literature available, to our knowledge, regarding the effect of pH on lipolysis and biohydrogenation of extruded oilseeds in continuous culture because the published long-term fermentation studies used soybean oil and linoleic acid, respectively, as unsaturated FA supply. Therefore, the objective of this experiment was to study the effect of two levels of pH (6.4 vs. 5.6) and two diets (soybean vs. linseed) on

ruminal fermentation, lipolysis, biohydrogenation and effluent FA profile in a dual flow continuous culture.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and Experimental Design

Eight 1,320 mL dual-flow continuous culture fermenters (Hoover et al., 1976) were used in 2 replicated periods of 7 d (4 d of adaptation and 3 d for sample collection). On the first day of each period, all fermenters were inoculated with ruminal fluid obtained from 2 rumen-fistulated cows (600 kg BW) fed a 60 to 40 forage to concentrate diet. The inoculum was composed of an equal (vol/vol) composite of the two animals. Temperature (38.5°C) and liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates were maintained constant, and fermentation conditions were monitored with the LabView Software (FieldPoint; National Instruments, Austin, TX). Anaerobic conditions were maintained by infusion of N₂ at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g/L urea to simulate recycled N. Treatments were organised in a 2 × 2 factorial arrangement being the main factors the pH (High = 6.4 vs. Low = 5.6) and two different diets (Soybean (**SOY**) vs. Linseed (**LIN**)). Ruminal pH was controlled by automatic infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH. Diets (95 g DM/d) were fed in equal portions to the fermenters 3 times per day. Diets were designed to be similar to the ones used in a previous in vivo experiment (Fuentes et al., 2008a) but not all the ingredients were suitable to be used in fermenters and some modifications were made. Both diets had a 40 to 60 forage to concentrate ratio and differed mainly in the composition of the fat supplement: with SOY having extruded soybean, extruded corn and calcium soaps of FA and LIN having extruded linseed, extruded corn and extruded barley (Table 1). Fat supplements were extruded at 130-133°C and 36-40 atm of pressure during 2 s. Diets were designed to be isoenergetic, isolipidic and isonitrogenous (Table 1), and to meet or exceed nutrient recommendations for a Holstein cow (650 kg BW) producing 40 kg of milk (NRC, 2001).

Table 1. Ingredient, chemical and fatty acid composition of the two experimental diets (SOY = soybean diet, LIN = linseed diet)

	Diets	
	SOY	LIN
<i>Ingredient, % of DM</i>		
Corn silage	21.7	22.7
Dehydrated alfalfa (pellets)	20.9	21.9
Corn	22.1	14.6
Soybean meal	8.53	11.3
Beet pulp	4.26	0.81
DDG	10.9	8.10
Soybean oil	0.39	0.20
Premix ¹	0.58	0.61
<i>Fat supplement</i>		
Extruded linseed	-	6.24
Extruded soybean	5.43	-
Extruded corn	4.03	8.91
Extruded barley	-	4.62
Ca-soap of FA	1.16	-
Methionin by-pass	0.04	0.02
<i>Chemical composition</i>		
DM, %	91.9	92.4
NDF, % of DM	28.7	29.6
ADF, % of DM	15.3	16.1
NFC ² , % of DM	43.8	39.6
CP, % of DM	16.2	17.7
EE ² , % of DM	4.68	5.80
Ash, % of DM	5.96	6.34
<i>Fatty acid, % of total FA</i>		
C _{16:0}	19.0	12.4
C _{18:0}	3.06	3.36
C _{18:1 cis9}	20.7	17.1
C _{18:2 c9,c12}	46.8	34.4
C _{18:3 c9,c12,c15}	6.86	30.1

¹The premix contained, per kg of DM: 7 mg of Co, 167 mg of Cu, 33 mg of I, 2660 mg of Mn, 27 mg of Se, 4660 mg of Zn, 1000 kIU of vitamin A, 200 kIU vitamin D₃, 1330 mg vitamin E, 267 g of urea, 67 g of NaCl, 33 g of sulfur, and 300 mg of MgO.

²NFC = nonfibrous carbohydrates [100 – (ash + CP + NDF + EE)]; EE: ether extract.

2.2. Sample Collection

Throughout the 7 d of each period, 60 mL of solid and liquid effluents were collected during 30 min at 2 h postfeeding to analyse the effluent FA profile in order to study the adaptation process of the microorganisms to the treatments. Furthermore, during the last 3 d of each period, 60 mL of solid and liquid effluents were also collected during 30 min at 2, 4 and 8 h after the morning feeding to study the lipolysis and biohydrogenation kinetics. At the same hours postfeeding, 1.5 mL of ruminal liquid was collected from the fermenter to determine DNA concentration of *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* stearic acid producer subgroup (***Butyrivibrio SA***) and *Butyrivibrio* vaccenic acid producer subgroup (***Butyrivibrio VA***) (Paillard et al., 2007a) using PCR analyses. During sampling days, effluent collection vessels were maintained at 4°C to impede microbial action. Solid and liquid 24 h effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 500-mL sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluents from the 3 sampling days were composed within fermenter and homogenized for 1 min. Samples were taken for the determination of total N, ammonia-N, and VFA concentrations, and the remainder of the sample was lyophilized. DM content was determined from the lyophilized samples, which were further analysed for ash, NDF, ADF, FA and purine contents.

Bacterial cells were obtained from fermenter flasks on the last day of each experimental period. Solid and liquid associated bacteria were isolated using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. Briefly, 100 mL of a 2 g/L methylcellulose solution and small marbles (30 of 2 mm and 15 of 4 mm diameter) were added to each fermenter and mixed for 1 h at 39°C to remove attached bacteria. After incubation, fermenter flasks were refrigerated for 24 h at 4°C and then agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the fermenter contents were filtered through cheesecloth and washed with saline solution (8.5 g/L NaCl). Bacterial cells were isolated within 4 h by differential centrifugation at $1,000 \times g$ for 10 min to separate feed particles, and the supernatant was centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min to isolate bacterial cells. Pellets were rinsed twice with saline solution and recentrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min. The final pellet was recovered with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N and purine contents.

Digestion of OM, fiber and CP, and flows of total, non-ammonia, bacterial and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

2.3. Chemical Analyses

Feed samples, lyophilized effluent and bacteria were analyzed for DM (24 h at 103°C), ash (4 h at 550°C) and total N (Kjeldahl method) (AOAC, 1995). Neutral and acid detergent fiber of feed and effluents were analyzed by the detergent system using sodium sulfite and a heat-stable alpha-amylase (Van Soest et al., 1991), and fat was analyzed by Soxhlet with previous acid hydrolysis (AOAC, 1995).

Samples for VFA were prepared as described by Jouany (1982) using 4-methylvaleric acid as internal standard. The analysis was performed by GLC (model 6890; Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., UK). Ammonia-N was analyzed in 4-mL sample of filtered fermenter fluid that was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at 15,000 × g for 15 min, and the supernatant was analyzed by colorimetry (UV-120-01; Shimadzu, Kyoto, Japan) for ammonia-N (Chaney and Marbach, 1962). Samples of lyophilized effluent and bacterial cells were analyzed for purine content (adenine and guanine) by HPLC (Beckman Instruments, Palo alto, CA) as described by Balcells et al. (1992), using allopurinol as an internal standard.

Lipid extraction from the lyophilized effluents and diets was performed as described by Folch et al. (1957) with some modifications as described by Chow et al. (2004). For the effluent extracts, triacylglycerols (**TAG**) and free fatty acids (**FFA**) fractions were separated by thin-layer chromatography as described by Demeyer et al. (1978) with small modifications. Briefly, 10 mL of extract was dried by evaporation at 40°C under N₂ gas. The residue was dissolved in 200 µL chloroform and spotted on a glass plate (20 cm × 20 cm) coated with Silica Gel G (Fluka, Bornem, Belgium), and subsequently developed with hexane–diethylether–acetic acid (70/30/2, vol/vol/vol). Lipid classes were detected under ultraviolet light after spraying with a 0.1% (wt/v) solution of 2,7-dichlorofluorescein in 2-propanol. The TAG and FFA bands were scraped off from the plates into glass centrifuge tubes with screwcaps. Methylation of FA was performed as described by Raes et al. (2001). The fatty acid methyl esters were extracted twice with 2 mL of hexane, and pooled

extracts were evaporated to dryness under N₂ gas. The residue was dissolved in 1 mL of hexane and analysed by gas chromatography (HP 6890, Brussels, Belgium) on a CP-Sil88 column for fatty acid methyl esters (100 m × 250 μm × 0.2 μm, Chrompack, Middelburg, The Netherlands) (Raes et al., 2001). The gas chromatograph conditions were: injector: 250°C; detector: 280°C; H₂ as carrier gas; temperature program: 150°C for 2 min, followed by an increase of 1°C/min to 200°C, then 1°C/min to 215°C. Peaks were identified by comparing the retention times with those of the corresponding standards (Sigma, Bornem, Belgium and Nu-Chek Prep., MN, USA).

2.4. Calculation of Lipolysis and Apparent Biohydrogenation

Lipolysis releases FA from the glycerol backbone of the TAG and hence, the amount of TAG decreases and that of FFA increases as the rate of lipolysis increases. The degree of lipolysis for linoleic (**LA**) and linolenic acid (**LNA**) was calculated as: $(FA_I - TAG_E) / FA_I$, where FA_I is the dietary intake of either LA or LNA, which we considered all in the triacylglycerol form, and TAG_E is the amount of either LA or LNA in the triacylglycerol form in the effluent. Polyunsaturated FA, released by lipolysis from the dietary TAG, are hydrogenated to more saturated FA, decreasing the amount of free PUFA. As no significant change in total FA was observed between the amount fed to the fermenters and the amount that appeared in the effluents, apparent biohydrogenation of LA and LNA can be calculated as: $(FA_I - FA_E) / FA_I$, where FA_I is the intake of either LA or LNA and FA_E is LA or LNA in the effluent, calculated as the sum of LA or LNA in all three fractions (triacylglycerol, free fatty acids and polar lipids).

Effluent biohydrogenation intermediates were expressed as proportion of the sum of C₁₈ FA in the effluent.

2.5. DNA Extraction and Quantification

Bacterial cultures and rumen fluid DNA samples were extracted by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) according to the method described by Whitford et al. (1998) with modifications of M. Blanch (UAB, Barcelona, Spain, personal communication), which were: bacterial culture or rumen fluid (0.6 mL) was mixed with an equal volume of pH 8.0 buffered phenol solution (USB® 75829, Cleveland, OH, USA) in a 2 mL tube with 0.5 g of 0.1 mm glass

beads (Biospec Products, Inc., Ref. 11079101, Bartlesville, OK, USA). After adding 40 μL of 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate, Sigma® L4522, St. Louis, MO, USA), tubes were shaken 3 times for 2 min on a Mini-Beater, and then spun at $11,600 \times g$ for 5 min in a microfuge. The aqueous phase was transferred to a new tube, extracted with buffered phenol and precipitated with ethanol. Samples were suspended in 100 μL of TE 0.5X and were treated with 2 μL RNase (10 mg/mL) for 1 h at 37°C (RNase A, Roche®, Sant Cugat del Vallès, Barcelona), re-extracted with phenol, precipitated with ethanol and suspended in 50-200 μL of TE 0.5X. The DNA concentration was measured by spectrophotometry (NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

2.6. Polymerase Chain Reaction Analyses

The primers set used for PCR is described in Table 2. *Anaerovibrio lipolytica* specific primers were designed from 16S ribosomal DNA sequence available in the GeneBank database (AB034191) using the Primer Express Software (Applied Biosystems, Warrington, UK); BLAST program at the National Center for Biotechnology Information site (NCBI) and CLUSTALW program at the European Bioinformatic Institute site (EBI) were used to ensure specificity of primers. *Butyrivibrio* SA and VA producer subgroup specific primers were modified from the ones described by Paillard et al. (2007b) and R. J. Wallace (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK, personal communication), respectively, to adapt them to our PCR conditions. To evaluate the specificity of the primers, conventional PCR were performed using bacterial DNA of pure cultures of *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and VA producer subgroups, and DNA of ruminal fluid. Moreover, the specificity of the primers were assessed using pure cultures and negative controls by rt-PCR. For universal bacteria, previously published primers EUB008 and EUB338 (Hicks et al., 1992) were adapted for our PCR conditions. Conditions of PCR were: 50°C for 2 min; 95°C for 10 min; 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each conventional PCR mixture (20 μL) contained (final concentrations): 1 \times Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.5 μM each primer, and 10 ng genomic DNA (100 ng genomic DNA for *A. lipolytica*). The PCR were performed in an ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK) using optical grade 96 well-plates. In order to construct a calibration curve and to

determine the PCR efficiency and sensibility, serial dilutions (1/10) of DNA prepared from pure cultures of *A. lipolytica* (ATCC 33276), *Butyrivibrio* sp. (NCFB 2249) and *Butyrivibrio* sp. (NCFB 2434) were used. The standard curve of *A. lipolytica* had a slope of -3.417 with a determination coefficient of 0.997, the one of *Butyrivibrio* SA producer subgroup had a slope of -3.219 with a determination coefficient of 0.997 and the standard curve of *Butyrivibrio* VA producer subgroup had a slope of -3.499 with a determination coefficient of 0.991. Efficiencies of PCR, calculated as described by Ginzinger (2002), were 96.2%, 104.5% and 93.1% for *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and *Butyrivibrio* VA producer subgroups, respectively.

Table 2. Description of forward (F) and reverse (R) primers used in the amplification of *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and *Butyrivibrio* VA producer subgroups, and universal bacteria

Target	Primer sequence (5' to 3')	Product size
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	F-TTG GGT GTT AGA AAT GGA TTC TAG TG	82 bp
	R-TCG AAA TGT TGTCCC CAT CTG	
<i>Butyrivibrio</i> SA	F-TGA AAA ACT CCG GTG GTA TGA GAT	126 bp
	R- CCG TGT CTC AGT CCC AAT GTG	
<i>Butyrivibrio</i> VA	F-TGC ATT GGA AAC TGT AGA ACT AGA GTG T	124 bp
	R-GCG TCA GTA ATC GTC CAG TAA GC	
Universal bacteria	F-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A	-
	R-TGC TGC CTC CCG TAG GAG T	

2.7. Statistical Analyses

The experiment was designed as a randomized complete block design with a factorial arrangement of treatments. Results were analyzed by the Proc Mixed procedure of SAS (v. 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), using the following model:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + P_j + D_i * P_j + e_{ij},$$

where D is the diet effect and P is the pH effect. The period was considered a random effect in all analyses. Results of the effluent FA profile during the adaptation days, measures of lipolysis and biohydrogenation at 2, 4 and 8 h postfeeding, and PCR results were analyzed using the PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998) using the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + P_j + H_k + D_i * P_j + D_i * H_k + P_j * H_k + e_{ijk},$$

where H is the effect of days or time after feeding. Results were subjected to three covariance structures: compound symmetric, autoregressive order one, and unstructured covariance. The covariance structure that yielded the lowest Schwarz's Bayesian criterion was considered the most desirable analysis. When interaction between main variables was significant, multiple comparisons between treatments were performed with the Tukey's test. Results are reported as least square means. Significance and tendencies were declared at $P < 0.05$ and $P < 0.10$, respectively, unless otherwise indicated.

3. Results and discussion

Diets were formulated to be isonitrogenous, isolipidic and similar to the ones used in a previous in vivo experiment (Fuentes et al., 2008a). However, LIN had higher CP and ether extract concentrations compared with SOY (Table 1).

3.1. Ruminal Fermentation

Lowering the pH from 6.4 to 5.6 decreased OM and fiber digestion, total VFA and branch-chained VFA (**BCVFA**) concentrations, acetate and butyrate proportions and the acetate to propionate ratio, and increased propionate and valerate proportions (Table 3). The low pH also reduced ammonia-N concentration and flow, bacterial N flow and CP degradation (Table 4), and increased non-ammonia and dietary N flows. These results agree with the reported effects of low pH on rumen microbial fermentation (Shriver et al., 1986; Calsamiglia et al., 2002; Cerrato-Sánchez et al., 2007). Fibrolytic bacteria are sensitive to low pH (Russell and Dombrovski, 1980) resulting in reduced OM and fiber digestion and changes in the VFA profile. Undigested fiber within feed could have reduced the access of bacteria and enzymes to the protein (Wallace and Cotta, 1989; Devant et al., 2000), leading

to the observed increase in dietary N flow and reduced CP degradation and ammonia-N concentration. The reduction in the bacterial N flow suggests that the low pH reduced microbial growth. However, this was mainly induced by a reduction in OM digested (Table 3) because the efficiency of microbial protein synthesis (**EMPS**) was not affected (Table 4).

Table 3. Effect of pH and diet on true organic matter (OM) and fiber digestion, and on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in continuous culture

	Treatments ¹				SEM	P-value		
	SOYH	LINH	SOYL	LINL		Diet	pH	D*pH
Digestion, %								
True OM	43.8 ^{ab}	44.8 ^a	41.9 ^b	38.6 ^c	0.92	0.220	0.001	0.035
NDF	36.8	37.2	20.8	17.7	2.03	0.529	< 0.001	0.415
Total VFA, mM	136.7	124.1	110.1	105.9	2.62	0.009	< 0.001	0.137
BCVFA ² , mM	3.64 ^a	3.11 ^b	0.31 ^c	0.60 ^c	0.17	0.401	< 0.001	0.012
VFA, mol/100 mol								
Acetate	58.1	57.1	46.8	48.4	1.59	0.794	< 0.001	0.282
Propionate	21.2	23.3	34.7	35.0	2.40	0.499	< 0.001	0.587
Butyrate	16.1	15.0	11.9	10.8	0.97	0.144	< 0.001	0.952
Valerate	2.05 ^c	2.16 ^c	6.28 ^a	5.31 ^b	0.25	0.107	< 0.001	0.049
Acetate:Propionate	2.76	2.46	1.38	1.42	0.15	0.395	< 0.001	0.244

^{a,b,c} When interaction is significant, different superscripts within a row indicate means differ significantly.

¹SOYH = soybean diet, pH = 6.4; LINH = linseed diet, pH = 6.4; SOYL = soybean diet, pH = 5.6; LINL = linseed diet, pH = 5.6.

²BCVFA = Branch-chained VFA.

Linseed reduced total VFA concentration (Table 3) probably due to the lower NFC concentration compared with SOY (Table 1). Due to the higher CP concentration in LIN (Table 1), ammonia-N concentration and flow (Table 4) was higher in LIN compared with SOY. Degradation of CP tended ($P = 0.06$) to be higher in LIN compared with SOY, also

contributing to the higher ammonia-N concentration and flow in LIN compared with SOY. Heat processing decreases rumen protein degradation by denaturation of proteins and by the formation of protein-carbohydrate (Maillard reactions) and protein-protein cross-links. Because soybean is richer in lysine (2.25% DM) than linseed (0.82% DM) (NRC, 2001) more Maillard reactions are expected, making extruded soybean protein more resistant to rumen degradation. The EMPS was higher in LIN compared with SOY (Table 4) which seems associated with the numerical higher bacterial N flow in LIN at high pH (Table 4) and with the reduction in true ruminal OM degradation in LIN (Table 3) at low pH. This interaction between type of diet and pH for true OM digestion could be explained by the different FA profile of diets. The concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the fermenters was 0.65 mg/mL of incubation fluid and 1 mg/mL of incubation fluid for SOY and LIN, respectively. It is known that FA, particularly polyunsaturates, are inhibitory to cellulolytic bacteria (Palmquist and Jenkins, 1980). However, it seems that the addition of a diet with a higher proportion of PUFA did not affect NDF and true OM digestion at pH 6.4, whereas the addition of a diet with a higher proportion of PUFA at low pH resulted in a numerical lower fiber digestion and, consequently, a lower OM digestion (Table 3).

Table 4. Effect of pH and diet on N metabolism of rumen microbes in continuous culture

	Treatments ¹				SEM	P-value		
	SOYH	LINH	SOYL	LINL		Diet	pH	D*pH
N NH ₃ , mg/100 mL	6.69	8.99	1.35	4.64	0.53	< 0.001	< 0.001	0.369
N flow, g/d								
Ammonia	0.21	0.28	0.04	0.15	0.02	< 0.001	< 0.001	0.341
Non-ammonia	2.89	2.94	3.02	3.12	0.04	0.097	0.002	0.559
Dietary	1.39	1.31	1.59	1.69	0.06	0.817	< 0.001	0.169
Bacterial	1.51	1.62	1.44	1.43	0.05	0.307	0.025	0.234
CP degradation, %	45.0	52.5	37.1	39.0	2.20	0.056	< 0.001	0.232
EMPS ² , g/kg TOMD	38.2	40.4	38.2	41.3	1.01	0.023	0.666	0.670

¹SOYH = soybean diet, pH = 6.4; LINH = linseed diet, pH = 6.4; SOYL = soybean diet, pH = 5.6; LINL = linseed diet, pH = 5.6.

²EMPS = Efficiency of microbial protein synthesis (g N/kg OM truly digested).

3.2. Lipolysis and Apparent Biohydrogenation

Lipolysis of LA and LNA was reduced by pH, but there was an interaction between diet and pH for LA and LNA lipolysis (Table 5). Lipolysis of LA and LNA was reduced in SOY at low pH, but it was not modified in LIN diet at low pH.

Table 5. Extent of lipolysis and apparent biohydrogenation (aBH) of C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} of linseed and soybean diets at two different pH

	Treatments ¹				SEM	<i>P</i> -value		
	SOYH	LINH	SOYL	LINL		Diet	pH	D*pH
<i>Lipolysis</i>								
C _{18:2n-6}	0.98 ^{ac}	0.99 ^a	0.86 ^b	0.97 ^c	0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001
C _{18:3n-3}	0.98 ^a	0.99 ^a	0.90 ^b	0.98 ^a	0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>aBH</i>								
C _{18:2n-6}	0.82	0.81	0.38	0.50	0.05	0.178	< 0.001	0.118
C _{18:3n-3}	0.82	0.86	0.50	0.58	0.04	0.140	< 0.001	0.553

^{a,b,c} When interaction is significant, different superscripts within a row indicate means differ significantly.

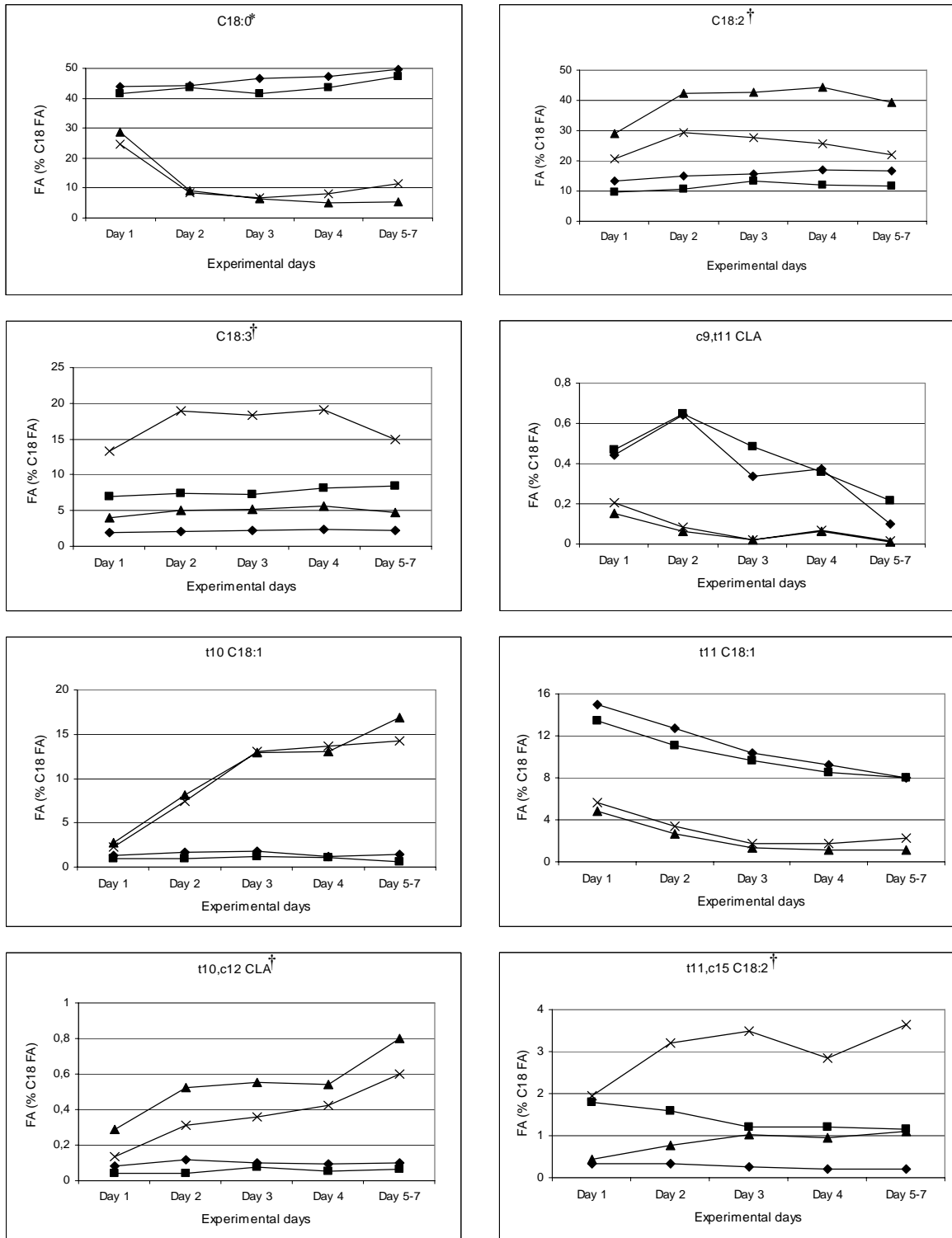
¹SOYH = soybean diet, pH = 6.4; LINH = linseed diet, pH = 6.4; SOYL = soybean diet, pH = 5.6; LINL = linseed diet, pH = 5.6.

Protection of protein is usually paralleled with that of fat, and we hypothesize that the protein rich matrix around fat droplets of oilseeds may protect it from lipolysis (Khorasani et al., 1992). Degradation of CP was reduced at low pH and tended ($P = 0.06$) to be lower in SOY than in LIN diet (Table 4). Therefore, the differences observed in lipolysis at low pH between oilseeds could be the result of a different degree of protein protection. Nevertheless, a reduction in lipolysis at low pH, independent of the protein protection effect, was suggested by Van Nevel and Demeyer (1996), as they tested the effect of pH on lipolysis of soybean oil in batch incubations. Moreover, Van Nevel and Demeyer (1996) observed a higher reduction in lipolysis (40%) when pH decreased from 6.4 to 5.6 than the one we observed in the present experiment, which was approximately 13%. These differences could be explained by the different in vitro method used in these experiments

(24 h in vitro batch vs. continuous culture), because in the continuous culture system rumen microflora may become adapted to the pH conditions. In fact, changes in the FA profile in the effluent indicates that microbes needed two days to adapt to our experimental conditions (Figure 1). Another possible explanation could be that Van Nevel and Demeyer (1996) only used soybean oil as a substrate without any other energy source available for bacteria, and it is not known if bacteria respond in the same way to pH variations with or without addition of an energy substrate. It is also possible that the different fat source presentation (seeds vs. oils) could also explain the results obtained, because the concentration of PUFA/100 mL of incubated fluid was even higher in the present experiment than that of Van Nevel and Demeyer (1996) (10.3 mg/100 mL vs. 8.10 mg/100 mL). Polyunsaturated FA are released faster in oils than in seeds. Therefore, it seems that at low pH conditions, a faster release of PUFA from oils in the in vitro culture could exceed the capacity of bacteria to neutralise these toxic FA, and this could lead to the lower lipolysis observed when using oils as PUFA source.

Low pH inhibited LA and LNA biohydrogenation (Table 5), which agrees with previous experiments (Van Nevel and Demeyer, 1996; Troegeler-Meynadier et al., 2003; Qiu et al., 2004). Doreau and Ferlay (1994) in an extensive review reported that LNA biohydrogenation ranged from 0.85 to 1, with a mean value of 0.92, whereas LA biohydrogenation ranged from 0.70 to 0.95, with a mean value of 0.80. In the studies where a higher level of dietary concentrates (70 to 93% DM) was fed, a reduced biohydrogenation of LNA (0.40-0.70) and LA (0.50-0.70) was observed. This is due to the fact that reduced ruminal pH adversely affects microbial populations, especially cellulolytic bacteria, which also include hydrogenating bacteria, resulting in a reduced ruminal biohydrogenation (Harfoot and Hazelwood, 1997). However, in the present trial, biohydrogenation was more sensitive to low pH than lipolysis in contrast to Van Nevel and Demeyer (1996).

Figure 1. Effect of pH, diet and day on C_{18:0}, C_{18:2}, C_{18:3}, *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10 C_{18:1}, *trans*-11 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA proportions in the effluent (% C₁₈ FA) along the experimental days in dual flow continuous culture. Treatments were: SOYH (◆) = soybean diet, pH = 6.4; LINH (■) = linseed diet, pH = 6.4; SOYL (▲) = soybean diet, pH = 5.6; LINL (X) = linseed diet, pH = 5.6.



*The effect of pH and day was significant for all FA. The effect of diet was only significant in the FA marked as †.

3.3. Proportion of Free FA in the Effluent

The low pH reduced the C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1} and *cis*-9, *trans*-11 CLA proportions and increased the *trans*-10 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} and *trans*-10, *cis*-12 CLA proportions in the effluent (Table 6). The reduction in C_{18:0} proportion and the increase in C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} is reflecting the LA and LNA apparent biohydrogenation inhibition at low pH, and agrees with Qiu et al. (2004). However, this does not agree with Martin and Jenkins (2002), who observed no modification of C_{18:0} and C_{18:2} flow whereas C_{18:3} flow was reduced at low pH. The reduction in the proportion of *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-11 C_{18:1} was also observed in batch cultures by Troegeler-Meynadier et al. (2003). The *trans*-11 C_{18:1} reduction and the *trans*-10 C_{18:1} increase when pH decreased was previously reported by Griinari et al. (1998), who observed that lowering the fiber contents of a diet containing unsaturated FA reduced ruminal pH and resulted in a decreased proportion of *trans*-11 C_{18:1} and an increased proportion of *trans*-10 C_{18:1} in milk. The pH reduction in the current experiment also caused an increase in *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion which confirms the biohydrogenation theory proposed by Bauman and Griinari (2001), which suggested that the alteration in rumen conditions when feeding certain diets to dairy cows could lead to the accumulation of specific FA in the rumen (e.g. *trans*-10, *cis*-12 CLA) which could be responsible for the milk fat depression observed when feeding these diets.

The proportion of C_{18:2n-6} and *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent was higher in SOY than in LIN which is related to the higher content of C_{18:2} in SOY compared with LIN (Table 1). The LIN increased C_{18:3n-3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} proportion compared with SOY which is also an effect of the LIN FA profile.

There was a significant interaction between diet and pH for C_{18:0}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} effluent proportions (Table 6). At low pH, C_{18:0} proportion was higher in LIN than in SOY, and this could be the result of a trend ($P = 0.12$) for a higher LA biohydrogenation in LIN at low pH (Table 5). The C_{18:2n-6} proportion was higher in SOY than in LIN at low pH, whereas the C_{18:3n-3} proportion was higher in LIN compared with SOY at low pH, indicating that low pH inhibited both FA biohydrogenation, but the proportions of each FA in the effluent also depended on the initial amounts of these FA in the diets. Finally, the *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} proportion was higher in LIN compared with

SOY at low pH which is also an effect of different FA profile of diets. The LA biohydrogenation pathway was inhibited by the low pH and there was a shift in the biohydrogenation pathway to the production of *trans*-10, *cis*-12 CLA and *trans*-10 C_{18:1} which agrees with the new pathway proposed by Bauman and Griinari (2001). The LNA biohydrogenation pathway was inhibited both in the last as well as in the before last biohydrogenation steps resulting in the accumulation of the intermediate *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}.

Table 6. Proportion of individual C₁₈-FA in free fatty acid form in the effluent (g/100g C₁₈-FA)

	Treatments ¹				SEM	P-value		
	SOYH	LINH	SOYL	LINL		Diet	pH	D*pH
C _{18:0}	58.8 ^a	54.2 ^a	5.2 ^c	11.4 ^b	2.32	0.663	< 0.001	0.016
C _{18:1 trans} -10	1.62	0.99	23.1	20.2	1.52	0.202	< 0.001	0.400
C _{18:1 trans} -11	9.13	8.86	2.15	1.93	0.52	0.630	< 0.001	0.966
C _{18:2n-6}	9.34 ^c	6.93 ^c	35.9 ^a	20.5 ^b	2.01	< 0.001	< 0.001	0.003
C _{18:3n-3}	0.96 ^{bd}	4.59 ^{bc}	3.96 ^{cd}	15.2 ^a	1.39	< 0.001	< 0.001	0.009
C _{18:2 t11,c15} ²	0.18 ^c	1.34 ^b	1.20 ^b	3.70 ^a	0.12	< 0.001	< 0.001	<0.001
CLA c9,t11	1.41	1.64	0.05	0.04	0.19	0.538	< 0.001	0.510
CLA t10,c12	0.34	0.12	0.73	0.62	0.09	0.041	< 0.001	0.473

^{a,b,c} When interaction is significant, different superscripts within a row indicate means differ significantly.

¹SOYH = soybean diet, pH = 6.4; LINH = linseed diet, pH = 6.4; SOYL = soybean diet, pH = 5.6; LINL = linseed diet, pH = 5.6.

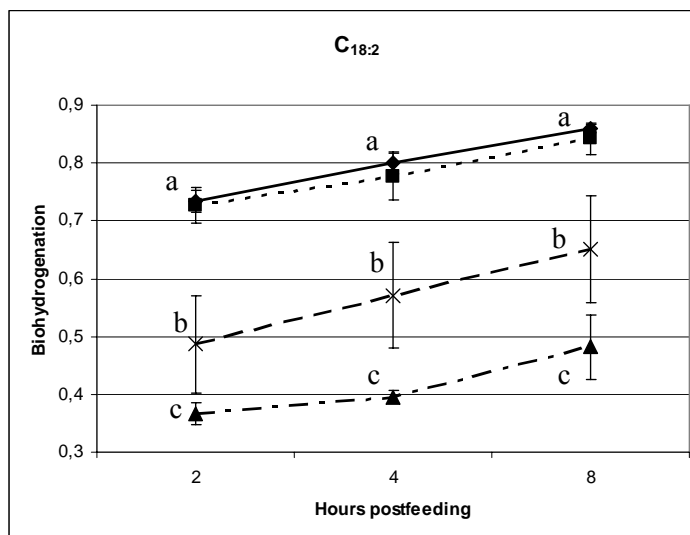
²C_{18:2 t11,c15} = C_{18:2 trans}-11, *cis*-15 ; CLA c9,t11 = CLA *cis*-9, *trans*-11; CLA t10,c12 = CLA *trans*-10, *cis*-12.

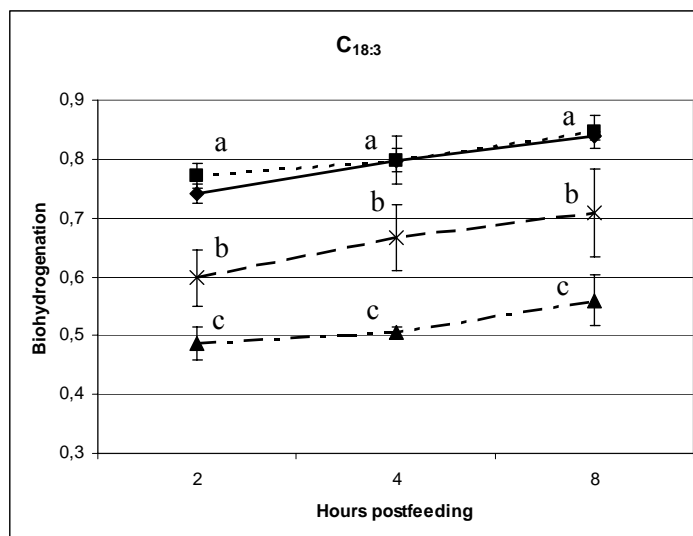
3.4. Biohydrogenation Kinetics

Diet and pH had a significant effect on LA and LNA apparent biohydrogenation kinetics, and the interaction was significant. At high pH, LA and LNA apparent biohydrogenation was similar between diets (Figure 2) for the three sampling hours. However, at low pH, LA

and LNA apparent biohydrogenation rate was higher for LIN than for SOY for the three sampling hours. This effect of diet at low pH can be attributed, as explained before, to the higher protection of fat droplets by the undegraded protein in SOY compared with LIN. There was a significant effect of time after feeding in LA and LNA apparent biohydrogenation, being the highest apparent biohydrogenation for both FA at 8 h and the lowest at 2 h postfeeding. It seems that lipolysis rate after feeding should be faster than isomerisation rate and further biohydrogenation, which would lead to a temporary accumulation of free PUFA in the fermenters. These PUFA might be toxic for hydrolysing and(or) hydrogenating bacteria causing a reduction in apparent biohydrogenation. When these PUFA are gradually hydrogenated, the toxic effect would decrease and the apparent biohydrogenation might increase again.

Figure 2. Extent of linoleic (C_{18:2}) and linolenic acid (C_{18:3}) apparent biohydrogenation at 2, 4 and 8 hours postfeeding of days 5 to 7. Treatments were: SOYH (◆—) = soybean diet, pH = 6.4; LINH (■--) = linseed diet, pH = 6.4; SOYL (▲-·-) = soybean diet, pH = 5.6; LINL (X--) = linseed diet, pH = 5.6.





^{a,b,c} Means within an hour with different superscripts differ ($P < 0.05$).

3.5. Quantitative Real Time PCR

Biohydrogenation of unsaturated FA in the rumen is attributed mainly to strains of the *Butyrivibrio* group (Polan et al., 1964; van de Vossenberg and Joblin, 2003). Paillard et al. (2007a) constructed a phylogenetic tree of 47 ruminal strains of *Butyrivibrio*-like butyrate producers, and using metabolic analysis revealed that 33 of those strains metabolized LA to CLA or *trans*-11 C_{18:1} (*Butyrivibrio* VA producer subgroup), whereas only a small group of strains converted LA to C_{18:0} (*Butyrivibrio* SA producer subgroup). The pH reduction from 6.4 to 5.6 had a significant effect on the DNA concentrations of the three bacterial groups studied (Table 7). The low pH reduced *A. lipolytica* and *Butyrivibrio* VA producer subgroup and increased *Butyrivibrio* SA producer subgroup DNA concentrations. Paillard et al. (2007a) measured lipase activity, by tributyrin hydrolysis, and observed that *Butyrivibrio* SA producer subgroup had a higher activity than *Butyrivibrio* VA producer subgroup. It seems that *Butyrivibrio* SA producer subgroup, which has lipase activity, is more resistant to low pH conditions and this would explain why lipolysis was barely reduced at low pH conditions in the present experiment. The *trans*-11 C_{18:1} and C_{18:0} proportions in the effluent were reduced at low pH (Table 6), and DNA concentration of *Butyrivibrio* VA producer subgroup was lower and that of *Butyrivibrio* SA producer subgroup higher. These results could be explained because *trans*-11 C_{18:1} is the precursor of C_{18:0} in the biohydrogenation process and if *trans*-11 C_{18:1} proportion was reduced then, although the *Butyrivibrio* SA producer subgroup population was maintained at low pH conditions, the C_{18:0} proportion was also reduced. It seems that *Butyrivibrio* VA producer

subgroup would belong to the group A bacteria described by Harfoot and Hazlewood (1997) and the *Butyrivibrio* SA producer subgroup would belong to the group B bacteria. This would explain why the proportion of *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} was higher at low pH conditions (Table 6).

Linseed diet increased *A. lipolytica* and reduced *Butyrivibrio* VA producer subgroup DNA concentrations compared with SOY and there were no differences in *Butyrivibrio* SA producer subgroup DNA concentration between diets (Table 7). The higher *A. lipolytica* DNA concentration in LIN could contribute to explain the differences in lipolysis between diets (Table 6).

Table 7. Effect of diet, pH and time after feeding on quantification (pg/10 ng total DNA) of *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and *Butyrivibrio* VA producer subgroups from continuous culture ruminal liquid samples

	Treatments							SEM
	Diet ¹		pH ²		Time after feeding ³			
	SOY	LIN	H	L	2	4	8	
<i>A. lipolytica</i> ⁴	25.6 ^b	43.4 ^a	67.0 ^a	1.85 ^b	32.7 ^b	30.0 ^c	40.8 ^a	4.71
<i>Butyrivibrio</i> VA	811.5 ^a	652.5 ^b	1148.5 ^a	315.5 ^b	603.0 ^c	693.5 ^b	900.5 ^a	60.3
<i>Butyrivibrio</i> SA	1581.7	1540.9	1215.4 ^b	1907.2 ^a	1299.3 ^c	1529.8 ^b	1854.9 ^a	179.9

^{a,b,c}Means within a row and within a parameter (diet, pH or time after feeding) with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Diet: SOY = soybean diet, LIN = linseed diet.

²pH: H = high pH (6.4), L = low pH (5.6).

³Hour: 2, 4 and 8 hours postfeeding.

⁴*A. lipolytica*: *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* VA: *Butyrivibrio* VA subgroup, *Butyrivibrio* SA: *Butyrivibrio* SA subgroup.

Sampling time after feeding also had an effect on the three bacteria or group of bacteria DNA concentrations, being always higher at 8 than at 2 h postfeeding (Table 7). This result does not agree with Leedle et al. (1982) who observed that total bacterial numbers remained constant along the day in dairy cows and that the number of viable bacteria declined 40 to 60% after feeding and then increased to a maximum at 16 h postfeeding, measured using

anaerobic plating techniques. Our results would suggest that there is an accumulation of bacteria in the fermenters along hours, although these bacteria may not always be viable.

4. Conclusions

The effect of low pH on rumen microbial fermentation and nutrient flow was expected. Low pH reduced LA and LNA lipolysis to a lower extent than expected from previous short term studies, although we observed that ruminal microflora became adapted to low pH conditions after 2 days, so results from short and long term studies may not be comparable. The low pH reduced LA and LNA apparent biohydrogenation resulting in the accumulation of C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3}, and the reduction of C_{18:0} in the effluent. The low pH also reduced *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-11 C_{18:1}, and increased *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}, *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA proportions in the effluent, confirming the hypothesis proposed by Bauman and Griinari (2001) that biohydrogenation pathways are altered and unique FA are produced under certain dietary conditions (such as low ruminal pH and enriched polyunsaturated FA diets). Finally, low pH changed the DNA concentration of bacteria involved in the lipolysis and biohydrogenation processes. Further *in vivo* experiments using molecular techniques are required to detect diet-associated changes of bacteria involved in the biohydrogenation process. The linseed diet had higher ammonia-N concentration and flow and a tendency to a higher CP degradation. These results added to the fact that linseed also had a higher lipolysis suggest that the extrusion process had a different effect on the oilseeds, being more effective in soybean than in linseed.

Capítulo VI

**Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of
biohydrogenation intermediates in a dual flow continuous culture**

EFFECT OF pH AND LEVEL OF CONCENTRATE IN THE DIET ON THE PRODUCTION OF BIOHYDROGENATION INTERMEDIATES IN A DUAL FLOW CONTINUOUS CULTURE

Abstract

Milk fat depression in cows fed high grain diets has been related to an increase in the concentration of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) in milk. These fatty acids (FA) are produced as a result of the alteration in rumen biohydrogenation of dietary unsaturated FA. As a reduction in ruminal pH is usually observed when high concentrate diets are fed, there is a confounding effect between ruminal pH and the quantity of concentrate in the diet on the alteration of the biohydrogenation pathway when feeding low fiber diets to dairy cows. The effect of pH (6.4 vs. 5.6) and two different forage to concentrate ratios (F:C) in the diets (70:30 F:C (HF) vs. 30:70 F:C (LF)) on rumen microbial fermentation, effluent FA profile, DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes, and methane production was investigated in continuous culture and in a gas production trial. The continuous culture consisted of two periods of 8 d (5 d adaptation plus 3 d sampling), with a 2 × 2 factorial arrangement of treatments. Both diets had a similar FA profile (44.0% C_{18:2}, 9.77% C_{18:3}). Low pH reduced organic matter and fiber digestibility, ammonia-N concentration and flow, and crude protein degradation, and increased non-ammonia and dietary N flows. Low pH decreased the flow of C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1}, *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA, and increased the flow of *trans*-10 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} in the effluent. Low pH reduced *Anaerovibrio lipolytica* (32.7 vs. 72.1 pg/10 ng total DNA) and *Butyrivibrio* vaccenic acid subgroup (588 vs. 1394 pg/10 ng total DNA) DNA concentrations. The LF diet increased organic matter and fiber digestibility, non-ammonia and bacterial N flows, and reduced ammonia-N concentration and flow. The LF reduced *trans*-11 C_{18:1}, and increased C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} proportion in the effluent. The LF diet increased *A. lipolytica* DNA concentration (65.2 vs. 39.7 pg/10 ng total DNA). The same diets were incubated for 24 h at two pH (6.4 vs. 5.6) to study methane production. The HF diet at pH 6.4 had the highest methane production (7.11 vs. 3.05 mL) and acetate to propionate ratio (2.43 vs. 1.94) compared with the rest of treatments, suggesting that the higher H₂ availability after the inhibition of biohydrogenation due to low pH was used to

synthesize propionate. Results indicate that low pH is the main cause of the accumulation of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA.

Key words: biohydrogenation, concentrate, PCR, pH

1. Introduction

Several theories have been proposed to explain milk fat depression, but the one which has gained support over the last decade suggests that mammary synthesis of milk fat is inhibited by unique fatty acids (FA) that are produced as a result of alterations in rumen biohydrogenation (Bauman and Griinari, 2001). Numerous studies have shown that concentrations of *trans*-C_{18:1} fatty acids and conjugated linoleic acid (CLA) can be increased in milk via dietary modifications (Griinari et al., 1998; Piperova et al., 2000; Peterson et al., 2003) and can cause reduction of milk fat concentration. However, a more precise examination of the isomer profile of *trans*-C_{18:1} FA (Griinari et al., 1998) and CLA (Griinari and Bauman, 1999) indicated that increases in ruminally derived *trans*-10-containing C_{18:1} and C_{18:2} isomers in milk were more closely associated with milk fat depression than the general increase in total *trans*-C_{18:1} or CLA. However, *trans*-10 C_{18:1} does not directly control milk fat synthesis in cows, despite the fact that it largely responds to dietary factors, with its concentration being negatively correlated with milk fat yield response in cows (Bernard et al., 2008). On the other hand, it has been clearly demonstrated that *trans*-10 *cis*-12 CLA inhibits milk fat synthesis in dairy cows (Baumgard et al., 2000).

Griinari et al. (1998) demonstrated that two conditions were necessary to observe a diet-induced milk fat depression: the availability of dietary unsaturated FA and an altered rumen environment that leads to incomplete biohydrogenation. In low fiber diets, the change in microbial fermentation is characterized by a decline in rumen pH and a shift in the rumen pattern of VFA. Griinari et al. (1998) observed that a 20:80 forage to concentrate (F:C) diet supplemented with unsaturated fat (corn oil, 4% DM) decreased ruminal pH (pH < 6.0) and increased *trans*-10 C_{18:1} concentration in milk (2.90 vs. 0.70%) compared with a 50:50 F:C diet supplemented with the same amount of corn oil. Moreover, Kalscheur et al. (1997) observed that a 25:75 F:C diet reduced ruminal pH (5.83 vs. 6.13) and increased the flow of *trans*-10 C_{18:1} to the duodenum (29.13 vs. 5.73 g/d)

compared with a 60:40 F:C diet (Piperova et al., 2002). As a reduction in ruminal pH is usually observed when high concentrate diets are fed, there seems to be a confounding effect between ruminal pH and the amount of concentrate in the diet on alterations in the biohydrogenation pathway observed when feeding low fiber diets to dairy cows. Kalscheur et al. (1997) observed that the addition of buffer to high concentrate diets increased ruminal pH (6.02 vs. 5.83) and reduced the flow of *trans*-10 C_{18:1} to the duodenum (8.11 vs. 29.13 g/d) (Piperova et al., 2002), suggesting that pH is the factor that results in the alteration of the rumen biohydrogenation pathway resulting in *trans*-10 C_{18:1} accumulation. However, decreasing the F:C ratio from 65:35 to 35:65 did not result in a reduced ruminal pH (6.38 ± 0.12) whereas duodenal flow of *trans*-10 C_{18:1} increased (35.4 vs. 4.04 g/d) (Loor et al., 2004). It is evident that significant interaction must exist between dietary F:C and pH on rumen biohydrogenation of unsaturated FA. However, to our knowledge, there is no literature available in which both factors were studied simultaneously to evaluate their contribution to the flow of FA in continuous culture.

Fats rich in polyunsaturated FA reduce methanogenesis and suppress methanogens and ciliate protozoa in vivo (Dohme et al., 2000), and low pH also reduces methane production (Russell, 1998). Low pH also inhibits biohydrogenation (Van Nevel and Demeyer, 1996), increasing the amount of H₂ available in the rumen which could increase methane production in polyunsaturated FA enriched diets. Therefore, we conducted two experiments, one to study the effect of pH and level of concentrate in the diet on biohydrogenation in a dual flow continuous culture, and an in vitro gas production trial to study the effect of pH on methane production with a diet enriched in polyunsaturated FA.

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* Continuous Culture Trial

2.1.1. Apparatus and Experimental Design

Eight 1,320 mL dual-flow continuous culture fermenters (Hoover et al., 1976) were used in 2 replicated periods of 8 d (5 d of adaptation and 3 d for sample collection). On the first day of each period, all fermenters were inoculated with ruminal fluid obtained from a rumen-fistulated cow (600 kg BW) fed a 60:40 F:C diet. Temperature (38.5°C) and liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates were maintained constant, and fermentation conditions were monitored with the LabView Software (FieldPoint; National Instruments, Austin, TX). Anaerobic conditions were maintained by infusion of N₂ at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into the flasks and contained 0.4 g/L urea to simulate recycled N. Treatments were arranged in a 2 × 2 factorial design, the main factors being the pH (High = 6.4 vs. Low = 5.6) and the F:C ratio in the diet (High fiber (**HF**) = 70:30 F:C vs. Low fiber (**LF**) = 30:70 F:C). Ruminal pH was controlled by automatic infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH. Diets (95 g DM/d) were fed in equal portions to the fermenters 3 times per day. Diets were designed to be isoproteic and to provide equal amounts of total FA with a similar C_{18:2} and C_{18:3} composition (Table 1). Diets were designed to meet or exceed nutrient recommendations for a Holstein cow (650 kg BW) producing 40 kg of milk (NRC, 2001).

Table 1. Ingredient, chemical and fatty acid composition of the two experimental diets (HF = high fiber diet, LF = low fiber diet)

Item	Diets	
	HF	LF
<i>Ingredient, %</i>		
Alfalfa hay	70.0	30.0
Corn	15.0	36.8
Barley	6.50	18.4
Soybean meal	5.00	12.3
Soybean oil	3.00	1.60
Linseed oil	-	0.55
Premix ¹	0.50	0.50
<i>Chemical composition, %</i>		
DM	90.0	88.8
NDF	31.6	21.6
ADF	21.7	12.0
NFC ²	35.6	48.8
CP	18.1	17.5
EE	5.42	5.14
Ash	9.33	6.93
<i>Fatty acid, % of total FA</i>		
C _{16:0}	15.5	14.2
C _{18:0}	4.00	3.22
C _{18:1cis9}	19.4	22.3
C _{18:2c9,c12}	44.0	43.3
C _{18:3c9,c12,c15}	9.03	10.5

¹The premix contained, per kg of DM: 7 mg of Co, 167 mg of Cu, 33 mg of I, 2660 mg of Mn, 27 mg of Se, 4660 mg of Zn, 1000 kIU of vitamin A, 200 kIU vitamin D₃, 1330 mg vitamin E, 267 g of urea, 67 g of NaCl, 33 g of sulfur, and 300 mg of MgO.

²NFC = nonfibrous carbohydrates [100 - (ash + CP + NDF + EE)]; EE = ether extract.

2.1.2. Sample Collection

During the last 3 d of each period, 60 mL of solid and liquid effluents were collected during 30 min at 1 h after the morning feeding to study the effluent FA profile. Throughout

the 8 d of each period, 1.5 mL of fermenter liquid was collected 1 h after the morning feeding to determine DNA concentration of *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* stearic acid producer subgroup (***Butyrivibrio SA***) and *Butyrivibrio* vaccenic acid producer subgroup (***Butyrivibrio VA***) (Paillard et al., 2007a) using PCR analyses to study the adaptation process of the microorganisms to treatments. During sampling days, effluent collection vessels were maintained at 4°C to impede microbial action. Solid and liquid 24 h effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 500-mL sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluents from the 3 sampling days were composed within fermenter and homogenized for 1 min. Samples were taken for the determination of total N, ammonia-N, and VFA concentrations, and the remainder of the sample was lyophilized. DM content was determined from the lyophilized sample, which was further analysed for ash, NDF, ADF, FA and purine contents.

Bacterial cells were obtained from fermenter flasks on the last day of each experimental period. Solid and liquid associated bacteria were isolated using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. Briefly, 100 mL of a 2 g/L methylcellulose solution and small marbles (30 of 2 mm and 15 of 4 mm diameter) were added to each fermenter and mixed for 1 h at 39°C to remove attached bacteria. After incubation, fermenter flasks were refrigerated for 24 h at 4°C and then agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the fermenter contents were filtered through cheesecloth and washed with saline solution (8.5 g/L NaCl). Bacterial cells were isolated within 4 h by differential centrifugation at $1,000 \times g$ for 10 min to separate feed particles, and the supernatant was centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min to isolate bacterial cells. Pellets were rinsed twice with saline solution and centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min. The final pellet was recovered with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N and purine contents. Digestion of OM, fiber and CP, and flows of total, non-ammonia, bacterial and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

2.2. *In vitro* Gas Production Trial

In vitro gas production was determined in 24 h incubations with rumen fluid obtained from fermenters the last day of each period in the continuous culture trial, as described by

Theodorou et al. (1994). Diets and pH were identical to those used in the continuous culture trial. The inoculum was composed of an equal (vol/vol) composite of 2 fermenters per treatment. The particle-free ruminal fluid was mixed in a 1 to 4 ratio with a buffer solution (Goering and Van Soest, 1970), including resazurin as color indicator of oxygen contamination, standardized at pH 5.6 or 6.4 according to the treatment, and infused with CO₂ at 38°C for 10-15 min. Serum bottles (75 mL) were filled with 30 mL of diluted rumen fluid, gassed with CO₂ to remove the O₂ in the overhead, and hermetically pressured-closed with rubber stoppers and aluminum caps, and introduced into a constant-temperature (38.5°C) horizontal shaking waterbath for 24 h. The substrates of fermentation were 0.5 g of the same diets (70:30 F:C and 30:70 F:C) tested in the continuous culture trial. Eight replicates per treatment were incubated in each run and the experiment was repeated 2 times, once after each continuous culture fermentation period. Two replicates per treatment were used to measure total gas production after 24 h of incubation using a pressure transducer. Three replicates per treatment were incubated without substrate and were used as blanks for methane measurement. The remainder three bottles were used to remove a gas sample to measure concentration of methane in the gas phase after 24 h. Samples of the gas produced in each bottle were taken in an additive-free Vacutainer tube (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK) for methane determination. After measurement of total gas production and sampling of the gas phase, bottles were uncapped, pH was measured immediately with a pH meter, and 4 mL from each bottle were taken to determine VFA concentration.

2.3. Chemical Analyses

Feed samples, lyophilized effluent and bacteria were analyzed for DM (24 h at 103°C), ash (4 h at 550°C) and total N (Kjeldahl method) (AOAC, 1995). Neutral and acid detergent fiber of feed and effluents were analyzed by the detergent system using sodium sulfite and a heat-stable alpha-amylase (Van Soest et al., 1991), and fat was analyzed by Soxhlet after acid hydrolysis (AOAC, 1995).

Samples for VFA were prepared as described by Jouany (1982) using 4-methylvaleric acid as internal standard. The analysis was performed by gas chromatography (model 6890; Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK). Ammonia-N was analyzed in 4-mL sample of filtered fermenter fluid that was acidified with 4 mL of 0.2 N

HCl and frozen. Samples were centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min, and the supernatant was analyzed by colorimetry (UV-120-01; Shimadzu, Kyoto, Japan) for ammonia-N (Chaney and Marbach, 1962). Samples of lyophilized effluent and bacterial cells were analyzed for purine content (adenine and guanine) by HPLC (Beckman Instruments, Palo alto, CA) as described by Balcells et al. (1992), using allopurinol as an internal standard.

The 1 h postfeeding effluent samples of days 6 to 8 were composited by fermenter. Lipid extraction from the lyophilized effluents and diets was performed as described by Folch et al. (1957) with some modifications as described by Chow et al. (2004). Methylation of FA was performed as described by Raes et al. (2001). The fatty acid methyl esters were extracted twice with 2 mL hexane, and pooled extracts were evaporated to dryness under N_2 gas. The residue was dissolved in 1 mL of hexane and analysed by gas chromatography (HP 6890, Brussels, Belgium) on a CP-Sil88 column for fatty acid methyl esters ($100 \text{ m} \times 250 \text{ } \mu\text{m} \times 0.2 \text{ } \mu\text{m}$, Chrompack, Middelburg, The Netherlands) (Raes et al., 2001). The gas chromatograph conditions were: injector: 250°C ; detector: 280°C ; H_2 as carrier gas; temperature program: 150°C for 2 min, followed by an increase of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ to 200°C , then $1^\circ\text{C}/\text{min}$ to 215°C . Peaks were identified by comparing the retention times with those of the corresponding standards (Sigma, Bornem, Belgium and Nu-Chek Prep., MN).

Methane was analyzed with a gas chromatograph (Shimadzu GC 14B; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a flame-ionization detector and a column packed with Carboxen 1000 (Supelco, Madrid, Spain). The carrier gas was He and peaks were identified by comparison with a standard of known composition. The volume of gas produced (mL) was corrected for standard conditions (105 Pa, 298 K), and the amount of methane produced (mL) was calculated by multiplying the gas produced (mL) by the concentration of methane in the analyzed sample.

2.4. DNA Extraction and Quantification

Bacterial cultures and rumen fluid DNA samples of days 1, 3, 5 of adaptation and a composited sample of days 6 to 8 were extracted by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK) according to the method described by Whitford et al. (1998) with modifications of M. Blanch (Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain, personal communication), which were:

bacterial culture or rumen fluid (0.6 mL) was mixed with an equal volume of pH 8.0 buffered phenol solution (USB® 75829, Cleveland, OH, USA) in a 2 mL tube with 0.5 g of 0.1 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Ref. 11079101, Bartlesville, OK, USA). After adding 40 µL of 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate, Sigma® L4522, St. Louis, MO, USA), tubes were shaken 3 times for 2 min on a Mini-Beater, and then spun at 11,600 x g for 5 min in a microfuge. The aqueous phase was transferred to a new tube, extracted with buffered phenol and precipitated with ethanol. Samples were suspended in 100 µL of TE 0.5X and were treated with 2 µL RNase (10 mg/mL) for 1 h at 37°C (RNase A, Roche®, Sant Cugat del Vallès, Barcelona), re-extracted with phenol, precipitated with ethanol and suspended in 50-200 µL of TE 0.5X. The DNA concentration was measured by spectrophotometry (NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

2.5. Polymerase Chain Reaction Analyses

The primers set used for PCR is described in Table 2. *Anaerovibrio lipolytica* specific primers were designed from 16S ribosomal DNA sequence available in the GeneBank database (AB034191) using the Primer Express Software (Applied Biosystems, Warrington, UK); BLAST program at the National Center for Biotechnology Information site (NCBI) and CLUSTALW program at the European Bioinformatic Institute site (EBI) were used to ensure specificity of primers. *Butyrivibrio* SA and VA subgroup specific primers were modified from the ones described by Paillard et al. (2007b) and R. J. Wallace (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK, personal communication), respectively, to adapt them to our PCR conditions. To evaluate the specificity of the primers, conventional PCR were performed using bacterial DNA of pure cultures of *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and VA producer subgroups, and DNA of ruminal fluid. Moreover, the specificity of the primers were assessed using pure cultures and negative controls by rt-PCR. For universal bacteria, previously published primers EUB008 and EUB338 (Hicks et al., 1992) were adapted for our PCR conditions. Conditions of PCR were: 50°C for 2 min; 95°C for 10 min; 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each conventional PCR mixture (20 µL) contained (final concentrations): 1 × Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.5 µM each primer, and 10 ng genomic DNA (100 ng genomic DNA for *A. lipolytica*). The PCR were performed in an ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK) using optical grade 96

well-plates. In order to construct a calibration curve and to determine the PCR efficiency and sensibility, serial dilutions (1/10) of DNA prepared from pure cultures of *A. lipolytica* (ATCC 33276), *Butyrivibrio* sp. (NCFB 2249) and *Butyrivibrio* sp. (NCFB 2434) were used. The standard curve of *A. lipolytica* had a slope of -3.417 and a determination coefficient of 0.997, the one of *Butyrivibrio* SA subgroup had a slope of -3.219 and a determination coefficient of 0.997 and the standard curve of *Butyrivibrio* VA subgroup had a slope of -3.499 and a determination coefficient of 0.991. PCR efficiencies, calculated as described by Ginzinger (2002), were 96.2%, 104.5% and 93.1% for *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and *Butyrivibrio* VA producer subgroups, respectively.

Table 2. Description of forward (F) and reverse (R) primers used in the amplification of *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and *Butyrivibrio* VA producer subgroups, and universal bacteria

Target	Primer sequence (5' to 3')	Product size
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	F-TTG GGT GTT AGA AAT GGA TTC TAG TG	82 bp
	R-TCG AAA TGT TGTCCC CAT CTG	
<i>Butyrivibrio</i> SA	F-TGA AAA ACT CCG GTG GTA TGA GAT	126 bp
	R- CCG TGT CTC AGT CCC AAT GTG	
<i>Butyrivibrio</i> VA	F-TGC ATT GGA AAC TGT AGA ACT AGA GTG T	124 bp
	R-GCG TCA GTA ATC GTC CAG TAA GC	
Universal bacteria	F-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A	-
	R-TGC TGC CTC CCG TAG GAG T	

2.6. Statistical Analyses

Results of DM, OM, NDF, ADF, and CP digestibilities, VFA, ammonia-N concentrations, effluent FA profile, and flows of total, non-ammonia, bacterial and dietary N were analyzed as a randomized complete block design. Three DM values from the first period were omitted in the analyses due to problems with lyophilization. Results were analyzed by the PROC MIXED procedure of SAS (v. 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), using the following model:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + P_j + F_i * P_j + e_{ij},$$

where F is the forage level and P is the pH effect. The period was considered a random effect. Results of PCR analyses were analyzed using the PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998) using the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + P_j + D_k + F_i * P_j + F_i * D_k + P_j * D_k + e_{ijk},$$

where D is the day effect. Results of PCR were subjected to three covariance structures: compound symmetric, autoregressive order one, and unstructured covariance. The covariance structure that yielded the lowest Schwarz's Bayesian criterion was considered the most desirable analysis. The computations of the in vitro gas production trial were performed using the proc GLM procedure of SAS using Tukey test, with run considered as a random effect. Results are reported as least square means. Significance and tendencies were declared at $P < 0.05$ and $P < 0.10$, respectively, unless otherwise indicated.

3. Results and discussion

3.1. Ruminal Fermentation

Lowering the pH from 6.4 to 5.6 decreased OM and fiber digestion, total VFA and branch-chained VFA (**BCVFA**) concentrations, acetate proportion and the acetate to propionate ratio, and increased propionate and valerate proportions (Table 3). The low pH also reduced ammonia-N concentration and flow, and CP degradation, and tended to reduce bacterial N flow (Table 4), and increased non-ammonia and dietary N flows. These results agree with the reported effects of low pH on rumen microbial fermentation (Shriver et al., 1986; Cerrato-Sánchez et al., 2007; Calsamiglia et al., 2008). The efficiency of microbial protein synthesis (**EMPS**) was not affected by pH (Table 4) and the tendency to reduce the bacterial N flow at low pH was attributed to a reduction in OM digestion (Table 3).

Table 3. Effect of pH and diet on true organic matter and fiber digestion, and on total VFA concentration and profile in continuous culture

	Treatments ¹				SEM	P-value		
	HF-H	LF-H	HF-L	LF-L		Diet	pH	D*pH
Digestion, %								
True OM	48.3	56.0	44.7	50.8	2.88	**	*	NS ³
NDF	32.5	49.4	16.0	22.9	2.71	**	***	NS
Total VFA, mM	119.1 ^b	133.5 ^a	91.0 ^c	115.6 ^b	3.25	***	***	**
BCVFA ² , mM	2.63 ^b	3.92 ^a	0.58 ^c	0.60 ^c	0.23	***	***	***
VFA, mol/100 mol								
Acetate	64.9	57.1	54.4	45.2	1.27	***	***	NS
Propionate	19.0 ^d	21.7 ^c	28.5 ^b	36.7 ^a	0.74	***	***	***
Butyrate	11.4 ^c	15.5 ^a	12.6 ^{bc}	13.4 ^b	0.55	***	NS	**
Valerate	2.46	2.72	3.85	4.18	0.10	**	***	NS
Acetate:Propionate	3.43	2.64	1.91	1.24	0.08	***	***	NS

^{a,b,c,d} When interaction is significant ($P < 0.05$), different superscripts within a row indicate means differ significantly.

¹HF-H = 70:30 F:C diet, pH = 6.4; HF-L = 70:30 F:C diet, pH = 5.6; LF-H = 30:70 F:C diet, pH = 3.4; LF-L = 30:70 F:C diet, pH = 5.6.

²BCVFA = Branch-chained VFA.

³NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Reducing fiber level in the diet increased true OM and fiber digestion (Table 3). Under in vivo conditions, lowering the F:C ratio did not modify true OM or fiber digestibilities (Hussein et al., 1995; Ueda et al., 2003), except when ruminal pH was reduced (Kalscheur et al., 1997). Using dual flow continuous cultures, Rodríguez-Prado et al. (2004) and Calsamiglia et al. (2008) observed that the fiber content of diet did not affect true OM and fiber digestion. These results suggest that the frequently observed lower OM and fiber digestion with low fiber diets is due to an effect of pH rather than a direct effect of the fiber content of diet. Total VFA concentration was higher in LF than in HF (Table 3) and it is consistent with the higher OM digestion in LF than in HF diets. Molar proportion of acetate was higher, and that of propionate, butyrate and valerate lower in HF than in LF diets (Table 3) consistent with previous in vitro and in vivo reports (Ueda et al., 2003; Rodríguez-Prado et al., 2004). Concentration of BCVFA was lower and the acetate to

propionate ratio higher in HF compared with LF (Table 3), and agrees with Russell (1998) and Rodríguez-Prado et al. (2004).

Table 4. Effect of pH and diet on N metabolism of rumen microbes in continuous culture

	Treatments ¹				SEM	P-value		
	HF-H	LF-H	HF-L	LF-L		Diet	pH	D*pH
N NH ₃ , mg/100 mL	16.4	12.9	8.39	2.30	1.49	**	***	NS ³
N flow, g/d								
Ammonia	0.52	0.41	0.27	0.08	0.05	**	***	NS
Non-ammonia	2.64	2.76	2.90	3.04	0.05	*	**	NS
Dietary	1.24	1.12	1.65	1.51	0.16	NS	**	NS
Bacterial	1.48	1.64	1.25	1.54	0.16	*	†	NS
CP degradation, %	54.9	57.8	39.8	42.9	5.96	NS	**	NS
EMPS ² , g/kg TOMD	35.3	33.0	32.3	34.1	1.97	NS	NS	NS

¹HF-H = 70:30 F:C diet, pH = 6.4; HF-L = 70:30 F:C diet, pH = 5.6; LF-H = 30:70 F:C diet, pH = 3.4; LF-L = 30:70 F:C diet, pH = 5.6.

²EMPS = Efficiency of microbial protein synthesis (g N/kg OM truly digested).

³NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. † $P < 0.10$.

The LF diet resulted in lower ammonia-N concentration and flow than the HF diet (Table 4). Calsamiglia et al. (2008) also observed a lower ammonia-N concentration and flow in a 10:90 F:C than in a 60:40 F:C ratio diet. Russell et al. (1991) observed that amino acid can be incorporated directly into bacteria without deamination if energy is available, which would explain the lower ammonia-N concentration and flow observed in LF diet (Table 4). A lower deamination in LF diet would result in lower concentrations of BCVFA, however, the opposite was observed in the current experiment (Table 3). Another possible explanation to the lower ammonia-N concentration in LF diet could be that LF diet favoured a higher use of ammonia for the *de novo* synthesis of amino acids that are incorporated in bacterial protein. In fact, LF diet increased non-ammonia and bacterial N flows in the effluent compared with HF diet (Table 4). This does however not agree with Calsamiglia et al. (2008) who observed that bacterial N flow was 26% lower in a 10:90 F:C than in a 60:40 F:C ratio diet. Calsamiglia et al. (2008) suggested that the limited growth of bacteria in the 10:90 F:C diet could be due to the less N available in the fermenter fluid because ammonia-N concentration in this diet was below 5 mg of N/100 mL, which is the minimum required for optimal microbial growth (Satter and Slyter, 1974).

The ammonia-N concentration in our experiment was above 5 mg of N/100 mL which would explain the differences observed in bacterial N flow between experiments. The ESPM was not affected by the fiber content of diet (Table 4), probably because LF diet also had higher true OM digestion (Table 3).

3.2. Biohydrogenation Intermediates

The low pH reduced C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1}, *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA proportions and increased *trans*-10 C_{18:1}, *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3} and *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} proportions in the effluent (Table 5). The increase in *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} is reflecting the inhibition of *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} apparent biohydrogenation at low pH which was observed before (Van Nevel and Demeyer, 1996; Qiu et al. 2004). The reduced proportion of *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-11 C_{18:1} at low pH was also observed in batch cultures by Troegeler-Meynadier et al. (2003). The *trans*-11 C_{18:1} reduction and *trans*-10 C_{18:1} increase when pH decreased was previously reported by Griinari et al. (1998), who observed that lowering the fiber contents of a diet containing unsaturated FA reduced ruminal pH and resulted in a decreased proportion of *trans*-11 C_{18:1} and an increased proportion of *trans*-10 C_{18:1} in milk. Kalscheur et al. (1997) also observed that animals fed a low forage diet (25% DM) had lower ruminal pH (5.83 vs. 6.14) and higher duodenal flow of *trans*-10 C_{18:1} (29.13 vs. 5.73 g/d) (Piperova et al., 2002) compared with animals fed a high forage diet (70% DM). Decreasing pH resulted in a 17 fold increase in *trans*-10 C_{18:1} whereas *trans*-11 C_{18:1} and C_{18:0} effluent proportions decreased approximately 80%. A similar effect was observed before when incubating extruded soybean or linseed at pH 6.4 and 5.6 (Fuentes et al., 2008b). *Trans*-10 C_{18:1} is thought to arise from the hydrogenation of *trans*-10, *cis*-12 CLA (Bauman and Griinari, 2001). Nevertheless, reducing pH in the current experiment reduced *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the 24 h effluent (Table 5). This is in contrast with results in vivo (Piperova et al., 2002) and in vitro (Choi et al., 2005; Abughazaleh and Jacobson, 2007), in which *trans*-10, *cis*-12 CLA production was inversely related to pH. The effect of pH on effluent FA proportions at 1 h postfeeding (Table 5) were similar to the ones observed in the 24 h effluents (Table 5), except for *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion, which was higher at low pH at 1 h postfeeding (Table 5). Wallace et al. (2007) also observed a reduction in *trans*-10, *cis*-12 CLA concentration after 4 h in 24 h in vitro incubations of linoleic acid with mixed ovine ruminal microorganisms.

The LF diet increased the proportion of *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3}, reduced the proportion of *trans*-11 C_{18:1}, and tended to reduce ($P = 0.14$) the proportion of *trans*-10 C_{18:1} in the effluent compared with the HF diet (Table 5). These results suggest that biohydrogenation is more active in HF than in LF diets because there is less proportion of biohydrogenation precursors (*cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3}) and a greater proportion of biohydrogenation intermediates, mainly *trans* C_{18:1}, in the effluent. This is in agreement with Looor et al. (2004) who also observed that there was less biohydrogenation of C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} in diets rich in concentrate (65C:35F) (74.5 and 83.9%) compared with diets rich in forage (65F:35C) (77.7 and 89.9%) in vivo. There was a significant interaction between diet and pH for *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:3n-3} and C_{18:2n-6} proportion in the effluent. The proportion of *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:3n-3} and C_{18:2n-6} in the effluent was not affected by pH in the HF diet whereas proportion of *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:3n-3} and C_{18:2n-6} increased when pH was lowered in the LF diet. This result would suggest that the biohydrogenation inhibition observed at low pH could partially be alleviated using higher levels of fiber in the diets. There was no effect of diet on *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the 24 h effluent (Table 5). However there was an effect of diet for its proportion in the 1-h postfeeding effluent (Table 5). The *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion was higher in the LF than in the HF diet at 1 h postfeeding. A number of studies have demonstrated that increasing amounts of readily digestible carbohydrates in the diet are associated with increased proportions of *trans*-10, *cis*-12 CLA and *trans*-10 C_{18:1} in milk fat (Kalscheur et al., 1997; Griinari et al., 1998; Piperova et al., 2000). However, Griinari et al. (1998) and Kalscheur et al. (1997) observed that diets rich in concentrate were accompanied with a lower ruminal pH. Hence, it seems that there is often a confounding effect in the literature between level of concentrate in the diet and ruminal pH. Results of the present experiment indicate that the pH is the main factor affecting the biohydrogenation process that results in the accumulation of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA, however *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent can be also affected by high levels of concentrate in the diet.

Table 5. Effect of pH and diet on 1-h postfeeding and 24 h effluent fatty acid profile (g/100g C18-FA)

Fatty acid	Treatment ¹				SEM	P-value		
	HF-H	LF-H	HF-L	LF-L		Diet	pH	Dt*pH
<i>1 h effluent</i>								
C _{18:0}	47.8	48.5	11.8	10.2	3.15	NS	***	NS ³
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.82 ^c	0.35 ^c	27.1 ^a	18.3 ^b	2.94	*	***	†
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	5.71 ^a	3.21 ^b	1.06 ^c	0.39 ^c	0.46	**	***	†
C _{18:2n-6}	17.7	18.9	27.4	31.8	1.21	*	***	NS
C _{18:3n-3}	3.53 ^c	4.97 ^b	5.11 ^b	7.92 ^a	0.33	***	***	†
<i>c</i> 9 C _{18:1}	14.1 ^c	20.6 ^b	15.8 ^c	24.9 ^a	0.74	*	***	†
<i>t</i> 11, <i>c</i> 15 C _{18:2} ²	0.15	0.12	1.04	1.18	0.09	NS	***	NS
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11 CLA	0.11	0.07	0.03	0.004	0.02	NS	**	NS
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12 CLA	0.14	0.17	0.47	0.60	0.03	*	***	NS
<i>24 h effluent</i>								
C _{18:0}	59.3	62.1	15.5	9.5	3.52	NS	***	NS ³
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.86	0.76	31.4	23.6	3.47	NS	***	NS
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	6.97	4.04	1.71	0.69	0.63	**	***	NS
C _{18:2n-6}	8.01 ^c	8.95 ^c	19.32 ^b	27.89 ^a	1.56	**	***	*
C _{18:3n-3}	1.88 ^c	2.06 ^c	3.95 ^b	6.79 ^a	0.41	**	***	**
<i>c</i> 9 C _{18:1}	11.0 ^c	12.0 ^c	18.6 ^b	24.7 ^a	0.61	***	***	***
<i>t</i> 11, <i>c</i> 15 C _{18:2} ²	0.19	0.19	1.34	1.58	0.17	NS	***	NS
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11 CLA	0.98	0.78	0.11	0.01	0.18	NS	***	NS
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12 CLA	0.68 ^{ab}	0.90 ^a	0.42 ^{bc}	0.22 ^c	0.11	NS	**	†

^{a,b,c,d} When interaction is significant ($P < 0.05$), different superscripts within a row indicate means differ significantly.

¹HF-H = 70:30 F:C diet, pH = 6.4; HF-L = 70:30 F:C diet, pH = 5.6; LF-H = 30:70 F:C diet, pH = 3.4; LF-L = 30:70 F:C diet, pH = 5.6.

²C_{18:2} *t*11,*c*15 = C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15 ; CLA *c*9,*t*11 = CLA *cis*-9, *trans*-11; CLA *t*10,*c*12 = CLA *trans*-10, *cis*-12.

³NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, † $P < 0.10$.

3.3. DNA Concentrations

Lipolysis releases FA from the glycerol backbone of the triglycerides and the main bacteria which has been identified as responsible for this process is *Anaerovibrio lipolytica* (Harfoot and Hazlewood, 1988). Biohydrogenation of unsaturated FA in the rumen is

attributed mainly to strains of the *Butyrivibrio* group (Polan et al., 1964; van de Vossenberg and Joblin, 2003). Paillard et al. (2007a) constructed a phylogenetic tree of 47 ruminal strains of *Butyrivibrio*-like butyrate producers, and using metabolic analysis revealed that 33 of those strains metabolized linoleic acid to CLA or *trans*-11 C_{18:1} (*Butyrivibrio* VA subgroup), whereas only a small group of strains converted linoleic acid to C_{18:0} (*Butyrivibrio* SA subgroup). A reduction in *A. lipolytica* (32.7 vs. 72.1 pg/10 ng total DNA) and *Butyrivibrio* VA producer subgroup (588 vs. 1394 pg/10 ng total DNA) DNA concentrations was observed at low pH (Table 6). In contrast, *Butyrivibrio* SA producer subgroup DNA concentration was not affected by pH (505 vs. 448 pg/10 ng total DNA) (Table 6). The reduced *A. lipolytica* DNA concentration observed at low pH would help to explain the higher C_{18:2n-6} and C_{18:3n-3} proportions in the effluent at low pH (Table 5). Previous research showed growth of *A. lipolytica* and lipase activity was lowered at low pH (Hobson, 1965; Henderson et al., 1969). Moreover, the reduction in *Butyrivibrio* VA producer subgroup DNA concentration at low pH is in line with the reduction in *trans*-11 C_{18:1} and *cis*-9, *trans*-11 CLA proportions in the effluent (Table 5). Besides, FA analyses of pure strains of rumen bacteria have shown that some major cellulolytic bacteria are enriched in *iso*-C_{14:0} and *iso*-C_{15:0} (Minato et al., 1988). Effluent branched-chain FA mainly originate from bacteria leaving the fermenter. The concentrations of *iso*-C_{14:0} and *iso*-C_{15:0} in the effluent were lower at low than at high pH (*iso*-C_{14:0}: 0.06 vs. 0.25%; *iso*-C_{15:0}: 0.09 vs. 0.36% total FA), confirming that low pH inhibited cellulolytic bacteria. Surprisingly, *Butyrivibrio* SA producer subgroup DNA concentration did not decrease when pH was lowered in spite of the large decrease in C_{18:0}. This might suggest *Butyrivibrio* SA producer subgroup is only playing a minor role in the overall C_{18:0} production or its metabolic activity may not be proportional to 16S rDNA gene concentration. In addition, formation of C_{18:0} by *Butyrivibrio* SA producer subgroup was through the saturation of *trans*-11 C_{18:1} whereas lowered C_{18:0} was associated with accumulation of *trans*-10 C_{18:1}. *Butyrivibrio* SA producer subgroup seems to be more resistant to low pH conditions compared with *Butyrivibrio* VA producer subgroup as no reduction in its DNA concentration was observed in the current trial and in a previous in vitro experiment (Fuentes et al., 2008b).

The LF diet increased *A. lipolytica* DNA concentration (65.2 vs. 39.7 pg/10 ng total DNA) and did not modify the other bacterial DNA concentration. Mackie et al. (1978) found an increased proportion of *A. lipolytica* in the rumen of sheep that were stepwise adapted to high concentrate diets. Tajima et al. (2001) also observed an increase in *A. lipolytica* DNA

concentration 3 d after a switch from a high to a low hay diet (0.440 vs. 0.137 millimoles of 16S rDNA per milligram of total rumen DNA), but *A. lipolytica* DNA concentration 28 d after the switch was similar to the concentration at day 0 (0.095 vs. 0.137 millimoles of 16S rDNA per milligram of total rumen DNA). In spite of the increased *A. lipolytica* DNA concentration, amounts of dietary PUFA were not decreased with the LF diet. It is possible that higher *A. lipolytica* DNA concentration is not necessarily linked to higher lipase activity. Regarding *B. fibrisolvens*, Choi et al. (2005) and Kim et al. (2003) observed that biohydrogenation was more active with rumen bacteria from cows fed low fiber compared with high fiber diets using a similar F:C ratio (77:23 F:C ratio) to the one used in the current experiment. Therefore, it seems that bacteria responsible for the biohydrogenation process are not affected by LF diets when a minimum level of fiber is guaranteed. There was a significant interaction (data not shown) between diet and pH for *Butyrivibrio* VA producer subgroup DNA concentration. *Butyrivibrio* VA producer subgroup DNA concentration was higher in the HF than in the LF diet at low pH (583 vs. 136 pg/10 ng total DNA) which is in line with the higher proportion of C_{18:2n-6} in the effluent in LF than in HF diet at low pH (Table 5).

There was a significant effect of day for all the bacteria or group of bacteria DNA concentrations. Two days were needed to adapt bacteria to ruminal conditions in vitro (Table 6). This result agrees with Cardozo et al. (2004) and Busquet et al. (2005) who, evaluating the VFA profile, also observed that 2 d were sufficient for the adaptation of ruminal flora to the fermentation conditions in vitro.

Table 6. Effect of diet, pH and day on quantification (pg/10 ng total DNA) of *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* SA subgroup and *Butyrivibrio* VA subgroup from continuous culture ruminal liquid samples

	Treatments								SEM
	Diet ¹		pH ²		Day ³				
	HF	LF	H	L	1	3	5	6-8	
<i>A. lipolytica</i> ⁴	39.7 ^a	65.2 ^b	72.1 ^a	32.7 ^b	98.0 ^a	33.9 ^b	38.9 ^b	38.8 ^b	20.7
<i>Butyrivibrio</i> VA	1081	901	1394 ^a	588 ^b	1001 ^{ab}	1038 ^{ab}	1083 ^a	841 ^b	149
<i>Butyrivibrio</i> SA	509	443	448	505	379 ^a	497 ^b	496 ^b	533 ^b	48.3

^{a,b,c}Means within a row and within a factor (diet, pH or day) with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Diet: HF = 70:30 F:C diet, LF = 30:70 F:C diet.

²pH: H = high pH (6.4), L = low pH (5.6).

⁴*A. lipolytica*: *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* VA: *Butyrivibrio* VA subgroup, *Butyrivibrio* SA: *Butyrivibrio* SA subgroup.

3.4. *In vitro* Gas Production Trial

Final pH was different among treatments (Table 7), being the highest pH in the HF diet at pH 6.4 (5.74) and the lowest in the LF diet at pH 5.6 (4.94). The HF diet at low pH had the lowest VFA concentration compared with the rest of treatments. This treatment also had the lowest gas production, but it did not differ from the LF diet at low pH. Treatments with low pH had lower BCVFA concentration compared with high pH treatments. Acetate proportion was higher in HF than in LF diets whereas the opposite was observed in butyrate proportion. Propionate proportion was higher at low pH compared with high pH treatments. The HF diet at pH 6.4 was the treatment with the highest methane production.

Table 7. Effect of pH and diet on a 24 h *in vitro* batch culture rumen microbial fermentation trial

	Treatments ¹				SEM
	HF-H	HF-L	LF-H	LF-L	
Total VFA, mM	60.1 ^a	42.5 ^b	57.1 ^a	53.5 ^a	2.84
BCVFA, mM	0.71 ^a	0.40 ^b	0.82 ^a	0.34 ^b	0.07
Individual, mol/100 mol					
Acetate	55.6 ^a	52.3 ^a	46.0 ^b	45.0 ^b	1.84
Propionate	23.0 ^b	26.1 ^{ab}	22.5 ^b	27.8 ^a	1.57
Butyrate	17.4 ^c	15.8 ^c	26.7 ^a	20.9 ^b	1.29
Acetate:Propionate	2.43 ^a	2.01 ^{bc}	2.05 ^b	1.76 ^c	0.10
pH	5.74 ^a	5.11 ^c	5.58 ^b	4.94 ^d	0.04
Gas, mL	92.8 ^{ab}	51.9 ^c	102.4 ^a	64.2 ^{bc}	9.60
CH ₄ , mL	7.11 ^a	2.39 ^b	3.75 ^b	3.02 ^b	0.65

^{a,b,c,d} Means within a row with different superscript differ ($P < 0.05$).

¹HF-H = 70:30 F:C diet, pH = 6.4; HF-L = 70:30 F:C diet, pH = 5.6; LF-H = 30:70 F:C diet, pH = 3.4; LF-L = 30:70 F:C diet, pH = 5.6.

The pH and level of concentrate effects on VFA concentration and gas production, and on VFA proportions were expected. Although low pH inhibited biohydrogenation in the continuous culture trial, this did not increase methane production, probably because the extra H₂ available was used by bacteria to synthesise propionate, as the acetate to propionate ratio was reduced at low pH in both diets (Table 7). This result agrees with Van Kessel and Russell (1996) who observed that ruminal methanogens lose their ability to use

H₂ at low pH, and with Russell (1998) who observed accumulation of H₂ in in vitro incubations at low pH.

4. Conclusions

Results of the present experiment confirm that is the pH, and not the amount of concentrate in the diet, the main factor affecting the biohydrogenation process that results in the accumulation of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA, FA that are associated with the reduction in milk fat percentage observed in vivo. However, diets rich in concentrate also increase, but to a lesser extent, *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent. The inhibition of biohydrogenation observed at low pH did not increase methane production in polyunsaturated FA enriched diets in the in vitro gas production trial.

Capítulo VII

Discusión General

GENERAL DISCUSSION

This chapter of the thesis is divided in two parts: in the first part, the chronological order of the experiments will be explained and the decisions that were taken during their development will be justified. In the second part some of the results between experiments will be compared and discussed.

Research over the past 30 to 40 years has shown that milk and milk products can help to reduce the risk of chronic disorders including osteoporosis, hypertension, cardiovascular diseases, excess body weight and body fat, and colorectal cancer (Huth et al., 2006); this is why official dietary guidelines around the world recommend to increase the intake of milk and milk products to 3 servings per day (Huth et al., 2006). However, they also recommend to reduce the intake of butter and other creamy milk products because milk fat has high levels of saturated (70% of total fatty acids (FA)) and hypercholesterolemic FA (C_{14:0} and C_{16:0}) (Jenkins and McGuire, 2006). In recent years, nutritional control of milk fatty acid profile has received considerable attention, and the main objective has been to enhance the concentration of fatty acids having beneficial health effects in humans, like n-3 FA which are known to be anticarcinogenic, and which contribute to the prevention of cardiovascular diseases (Wright et al., 1998), and some conjugated linoleic acid (CLA) isomers, which are reported to be anti-cancer, anti-atherogenic, anti-diabetogenic and anti-inflammatory (Wahle et al., 2004).

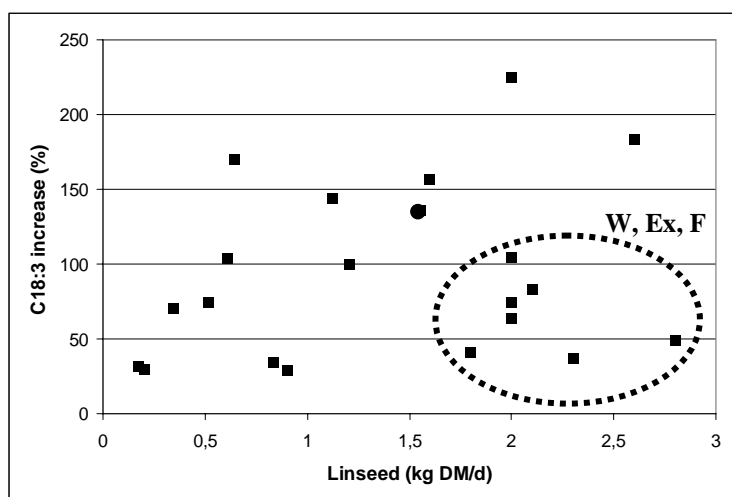
Linseed has been shown in the literature to be an interesting feedstuff to modify milk FA profile (see Chapter II), but it is an expensive feedstuff to be incorporated in dairy cow rations. Some literature showed that linseed may also have a positive effect on reproductive performance in experimental farms (Petit et al., 2001; Petit and Twagiramungu, 2002). The first experiment of this thesis was designed to study if linseed could improve milk FA profile and reproductive performance in commercial conditions which could return the farmer the extra cost of using this feedstuff in dairy cow rations.

Results of this experiment are presented in Chapter IV. The linseed supplemented group had a healthier milk FA profile, with lower saturated (56.2% vs. 60.2%) and higher n-3 FA (1.21% vs. 0.54%) and *cis*-9, *trans*-11 CLA milk concentrations (0.67% vs. 0.51%) compared with the control group. In order to study if this healthier milk FA profile could

be altered by the fermentative process lead by lactic acid bacteria during the production of milk products, fermented milk and cheese were manufactured (see Annex 1). Results seem to indicate that the FA profile observed in milk was maintained in milk products. Moreover, the fermentative process was shorter in linseed than in control fermented milks (8 h vs. 9.5 h). Finally, organoleptic analysis of fermented milk showed no differences between treatments, although results must be taken with caution due to the low number of replicates.

Looking at the results of the literature in which linseed has been used in dairy cow rations, there seems to be a linear tendency (excluding the values inside the circle) ($R^2 = 0.56$; $y = 77.26x + 21.78$) to increase the difference in $C_{18:3}$ milk concentration between linseed and control group as the amount of linseed included in the diet increases (Figure 1). The values inside the circle correspond, surprisingly, to experiments in which linseed was supplemented as whole seed, extruded or treated with formaldehyde, and the values outside the circle correspond mainly to linseed oil.

Figure 1. Effect of linseed supplementation on the change in milk $C_{18:3}$ concentration compared with the control group. (W = whole linseed, Ex = extruded linseed, F = formaldehyde treated linseed)



*Literature used: Kennelly (1996); Chouinard et al. (1998); Kelly et al. (1998); Dhiman et al. (2000); Petit et al. (2001); Petit (2002); Petit et al. (2002); Ward et al. (2002); Petit (2003); Petit et al. (2004); Gonthier et al. (2005); Loor et al. (2005); Bu et al. (2007); Flowers et al. (2008).

Linolenic acid in whole or extruded linseed was expected to be more protected against biohydrogenation than in oil form, increasing the amount of linolenic acid in milk, although the opposite was observed in the literature. However, it must be said that the present experiment result, in which extruded linseed was used (●), is located within the linear response (Figure 1). The different results between experiments in which extruded linseed has been used could be explained by different temperature and pressure conditions applied during the extrusion process.

Extruded linseed has been used to develop a commercial product (Nutex[®]) to enhance the level of healthy FA in dairy cow milk. This product has been used by the biggest dairy company in Dutch supermarkets, Campina[®] (since 2007), and ATO[®] (since 2008) to produce and sell milk enriched in n-3 FA. The milk FA profile obtained by supplementation of Nutex[®] in Spain has a 10% less saturated, and a 20%, 40% and 133% more monounsaturated, polyunsaturated and n-3 FA, respectively, compared with standard milk (www.lletato.cat/natura). As macronutrients, fats are not assigned recommended daily allowances but acceptable intake recommendations. The acceptable intake of n-3 FA is 1.6 g/d for men and 1.1 g/d for women (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine of National Academies, 2005). The WHO (2003) recommends a daily intake of 2 to 3 servings of dairy products, corresponding to 600 mL of milk. In light of these suggestions, consuming 600 mL of n-3 FA enriched milk per day would provide 20% of the n-3 FA suggested acceptable intake, whereas the same consumption of standard milk would only provide 8% of the n-3 FA suggested acceptable intake in women.

The milk fat percentage observed in this experiment was very low in both groups, being even lower in linseed compared with control (2.65% vs. 2.86%). This reduction in milk fat percentage as a result of linseed supplementation may be a positive effect if milk yield is limited by quotas; however, if milk fat percentage is reduced below the standard established by the dairy industry, a price reduction is applied. In relation to reproductive performance, we observed a non significant reduction in conception rate in linseed compared with control group (33.8% vs. 39.7%). If the costs of producing milk enriched in n-3 FA are evaluated, taking as a guide the results obtained in this experiment, Nutex[®] supplementation would represent 0.49–0.65 €/cow per day (www.ucd.ie/lipgene/downloads/pe3_munich_2005/Adding%20value%20to%20milk.pdf) and the 0.2% reduction in milk fat percentage in linseed compared with control group

would represent 0.60 €/100 L milk. On the other hand, Dutch farmers receive a price premium for producing milk enriched in n-3 FA which is about 0.57–0.75 €/100 L milk (being the level of enrichment in n-3 FA between 0.75 and 1.10% of total FA) (www.ucd.ie/lipgene/downloads/pe3_munich_2005/Adding%20value%20to%20milk.pdf). This price premium could compensate for the cost of milk fat percentage reduction. However, the extra cost of using Nutex[®] supplementation would not be compensated (approximately 0.5 €/cow per day). Consequently, this would be the cost that the farmer would face for producing milk enriched in n-3 FA. Furthermore, a possible reduction in reproductive performance (a numerical reduction was observed in the present experiment) should be also taken into account when using linseed to improve milk FA profile. Therefore, linseed supplementation to dairy cow diets is not a profitable way of enhancing n-3 FA in milk in the economic scene described, but in Spain, where there is scarce access to fresh forages, this is the only way of naturally improving the n-3 FA content of milk.

The second experiment was designed to try to justify the different milk fat percentage observed between treatments in the first experiment. The interest was to study if there were differences in ruminal fermentation and biohydrogenation processes between linseed and control diet which could explain the different milk fat percentage observed in vivo. As it was not possible to conduct this experiment in the commercial dairy farm, an in vitro dual flow continuous culture system was used instead. The hypothesis was that the lower milk fat percentage in linseed could be caused by a lower ruminal production of acetate or by a higher ruminal production of *trans* intermediates FA compared with control diet. The low milk fat percentage observed in both treatments (average of 2.76%) along with the low F:C ratio in the diets (40:60 F:C ratio) suggested that diets used in the in vivo experiment could have been acidogenic, and that justified the study of the effect of two levels of pH on microbial fermentation. The objective was to test the same diets used in the in vivo trial, but unfortunately, not all ingredients were suitable to be used in fermenters. For example, whole cottonseed was included in the in vivo diet but could not be included in the in vitro one because the ingredients used in fermenter diets must be ground and cottonseed can not be ground alone because of the high level of fat in the seed. Moreover, even if it is ground with another feedstuff, it is still difficult to ensure that the correct amount is fed along experimental days. Finally, cottonseed grinding allows gossipol (which is toxic) to be released faster than in whole cottonseed which could interfere with ruminal fermentation. Therefore the same protein supplement as in the in vivo experiment was used and other

ingredients were selected to achieve a similar chemical composition to the previous experimental diets.

This was the first time the FA profile of ruminal liquid and the biohydrogenation process were studied in the fermenters of “Servei de digestió i fermentació ruminal” (Facultat de Veterinària, UAB, Spain). The methodology for performing a specific FA profile of ruminal liquid was not ready in the lab, so all these analyses were performed in the “Laboratory for Animal Nutrition and Animal Product Quality” (Ghent University, Belgium) during a 3 months training. The objective of this training was to analyse the samples and learn the methodology in order to apply it later in our lab. On the other hand, as rt-PCR was being used by our group to quantify ruminal bacteria involved in the development of acidosis (*Streptococcus bovis* and *Megaesphaera elsdenii*), this technology was used to develop a probe and quantify *Anaerovibrio lipolytica* and *Butyrivibrio fibrisolvens*, the main bacteria involved in the lipolysis and biohydrogenation processes, respectively. New primers for *A. lipolytica* were developed, and modified primers of the ones described by Paillard et al. (2007b) and R. J. Wallace (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK, personal communication) for *Butyrivibrio* stearic (SA) and vaccenic acid (VA) producer subgroups were used, in collaboration with the “Servei de Genètica Molecular” (Facultat de Veterinària, UAB, Spain). The steps to develop and test new primers were explained by Blanch (2006) and as they were very similar to the ones used in the present thesis, they will not be described again. PCR analyses were also used in the third experiment of this thesis so PCR results and implications will be discussed later in this section.

Regarding the results of the second experiment (Chapter V), there was no effect of diet on acetate proportion, but low pH reduced acetate proportion in both diets. An effect of diet on *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent was observed, with SOY (diet similar to the control in the in vivo experiment) having higher proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent than LIN diet (diet similar to the linseed in the in vivo experiment). A higher milk concentration of *trans*-10, *cis*-12 CLA was also observed in the control group in the in vivo experiment at 90 DIM. It seems obvious that the diet with the higher linoleic acid concentration also had the higher *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent, as *trans*-10, *cis*-12 CLA is an intermediate of linoleic acid biohydrogenation when the normal biohydrogenation pathway is altered. Low pH also increased *trans*-10, *cis*-12 CLA

proportion in the effluent in both diets. Results of this experiment indicate that if diets used in the in vivo experiment were acidogenic either low acetate or high *trans* intermediates FA ruminal production could be the cause of the low milk fat percentage observed in both treatments. However, neither the acetate nor the *trans* intermediates FA would explain the different milk fat percentage observed between treatments in the in vivo experiment.

Over the last 15 years there has been increasing interest in CLA because feeding a mixture of CLA isomers to laboratory animals has been reported to alter tumour growth induced by chemicals, atherogenesis, diabetes, body composition and immune cell functions (Tricon et al., 2005). However, results from human studies relating to the effects of CLA on body composition, blood lipids, insulin resistance and immune function have been variable (Tricon et al., 2005). Most of the published studies used a mixture of CLA isomers containing the two major forms, *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA, in approximately equal amounts, but emerging evidence indicates that the numerous biological effects are a result of the separate actions of the *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers (Pariza et al., 2000). There is accumulating evidence that the *trans*-10, *cis*-12 CLA isomer may adversely influence human health, in particular concerning insulin sensitivity and blood lipids. Dairy products and ruminant meats are the primary source of naturally occurring CLA in the human diet. Dairy products account for approximately 75% of the estimated 100 to 300 mg of CLA consumed per day, which is far from the 700 to 800 mg/d necessary CLA estimated by researchers to provide a protective effect in humans (Huth et al., 2006). Enhancing the content of CLA in milk products can be used to increase CLA intake in humans. Although *trans*-10, *cis*-12 CLA only accounts for about 2 to 5% of the total CLA in milk fat and *cis*-9, *trans*-11 is the predominant CLA isomer accounting for about 75 to 90%, a 3-fold increase in *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent when low ruminal pH was used in an in vitro fermentation system was observed. Moreover, several studies demonstrated that increasing amounts of readily digestible carbohydrates in the diet are associated with increased proportions of *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat (Piperova et al., 2000; Nielsen et al., 2006). Therefore, as the effects of *trans*-10, *cis*-12 CLA on human health are not still well elucidated, the supplementation with polyunsaturated FA sources (specially rich in linoleic acid) to dairy cow diets rich in readily digestible carbohydrates to modify the milk FA profile should be done cautiously; at least, until more controlled studies in specific populations with purified isomers of CLA

are performed and the beneficial and detrimental effects of each individual CLA isomer on human health are defined.

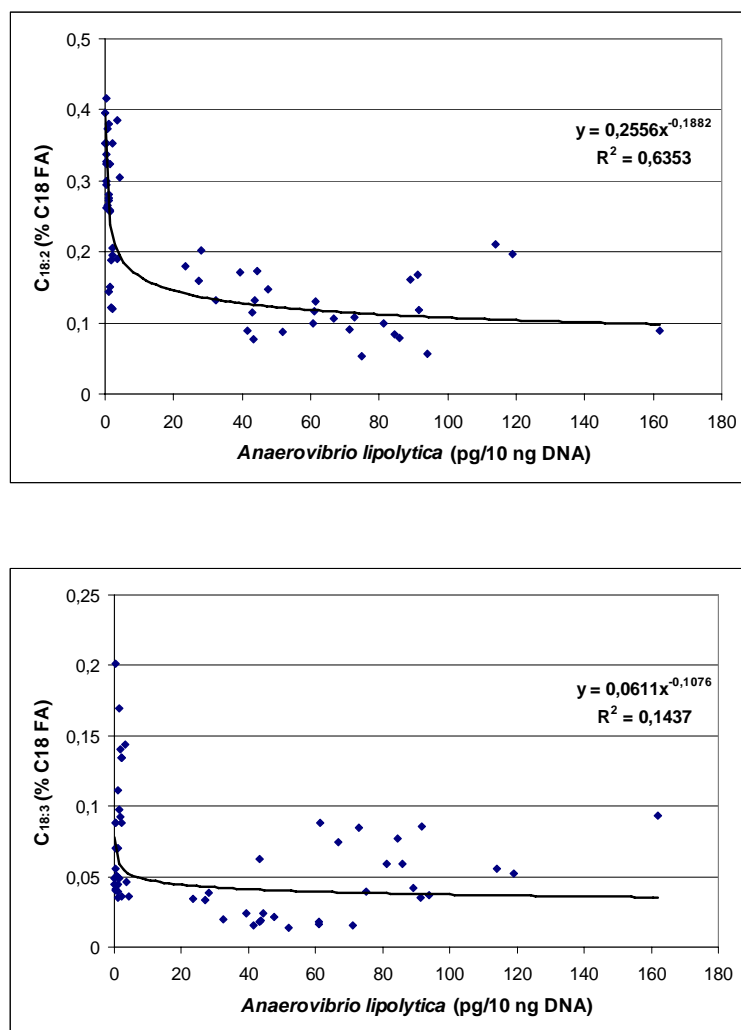
Studying the literature available about factors affecting the production of *trans* intermediates FA in the rumen, there seems to be a confounding effect in in vivo experiments between level of concentrate in the diet and ruminal pH. Therefore, the main objective of the third experiment was to look for the true cause of the accumulation of these *trans* intermediates FA which can cause milk fat depression when using diets rich in concentrate: is it low ruminal pH or the concentrate itself which causes a shift in the normal biohydrogenation pathways? An in vitro system is a good tool to study this type of interaction because it is difficult to achieve a low ruminal pH in animals fed a high forage diet and a high ruminal pH in animals fed a high concentrate diet in vivo. In the second experiment, lipolysis was barely reduced at low pH in continuous culture, which was the opposite of what had been observed in batch culture. We hypothesized that the adaptation period of bacteria in fermenters could explain these different results between in vitro systems. In order to study the adaptation of bacterial population to the fermenters, PCR analyses of ruminal fluid during the adaptation days were conducted. Finally, there was interest in studying methane production at low pH conditions in diets rich in polyunsaturated FA to see if methane production could be increased as a side-effect of the inhibition of the biohydrogenation process at low pH.

Initially, it was planned to perform the ruminal liquid FA analyses in our lab using the knowledge learned at Ghent University (Belgium). However, the extraction procedure of Folch et al. (1957) could not be used. The method of Sukhija and Plamquist (1988) with the modifications described by Palmquist and Jenkins (2003) was used instead (see Annex 2). This method is usually used to extract and methylate FA from feed samples in the “Laboratory of Animal Production” (Facultat de Veterinària, UAB, Spain). However, this method was the least desirable to perform detailed FA analyses of the CLA region because Park et al. (2001) observed that a reduction or even a disappearance of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 CLA isomers peaks could occur when using high temperatures and long time of incubation during the extraction and methylation processes. Moreover, acid esterification is sometimes criticized for its potential to cause migration of conjugated double bonds in unsaturated fatty acids (Kramer et al., 1997). Therefore, in order to be

certain that a correct FA profile was obtained, especially in the CLA region, samples were sent to Ghent University (Belgium) to be analysed using the method of Folch et al. (1957).

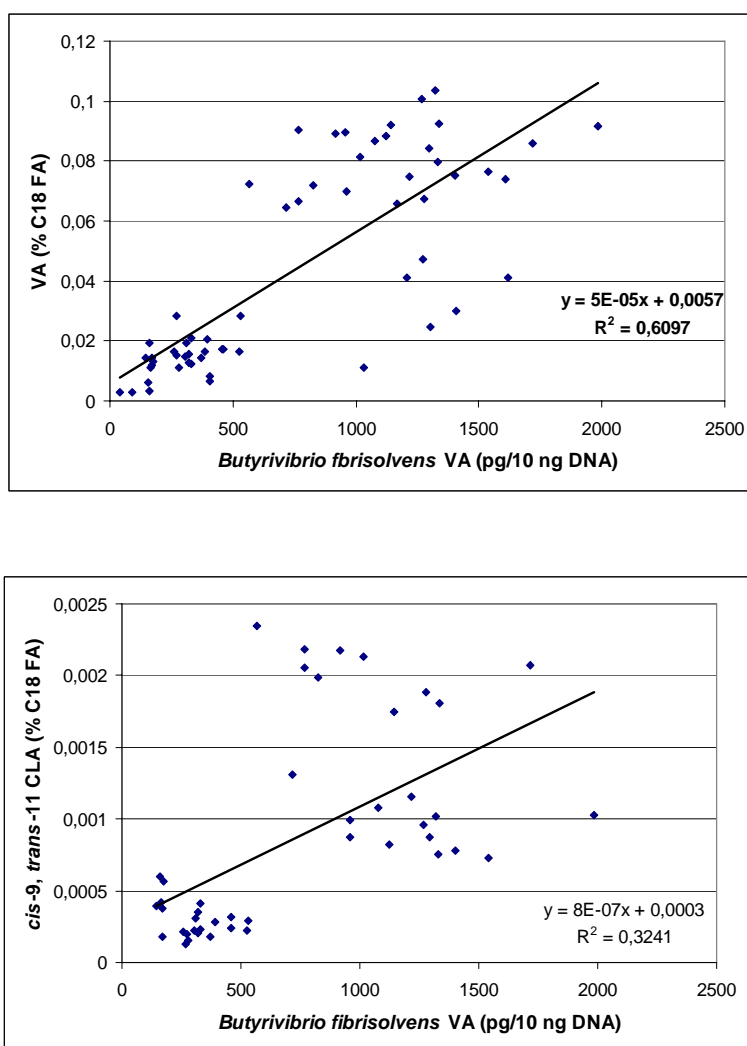
Regarding PCR results, PCR efficiencies, calculated as described by Ginzinger (2002), were 96.2%, 104.5% and 93.1% for *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* SA and *Butyrivibrio* VA producer subgroups, respectively. In both in vitro experiments, *A. lipolytica* DNA concentration was reduced at low pH. *A. lipolytica* is the main bacteria responsible for performing lipolysis. The lower lipolysis and biohydrogenation at low pH would explain the increase observed in the proportions of C_{18:2} and C_{18:3} in the effluent in both experiments at low pH (Figure 2).

Figure 2. Relationship between *Anaerovibrio lipolytica* DNA concentration (pg/10 ng DNA) and C_{18:2} and C_{18:3} effluent proportion in the second and third experiment



Butyrivibrio fibrisolvens VA producer subgroup DNA concentration was also reduced at low pH in both experiments. This group of bacteria is capable of synthesizing *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-11 C_{18:1} from linoleic acid (Paillard et al., 2007a). This lower DNA concentration at low pH also agrees with the lower proportion of *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-11 C_{18:1} in the effluent profile observed in both experiments (Figure 3).

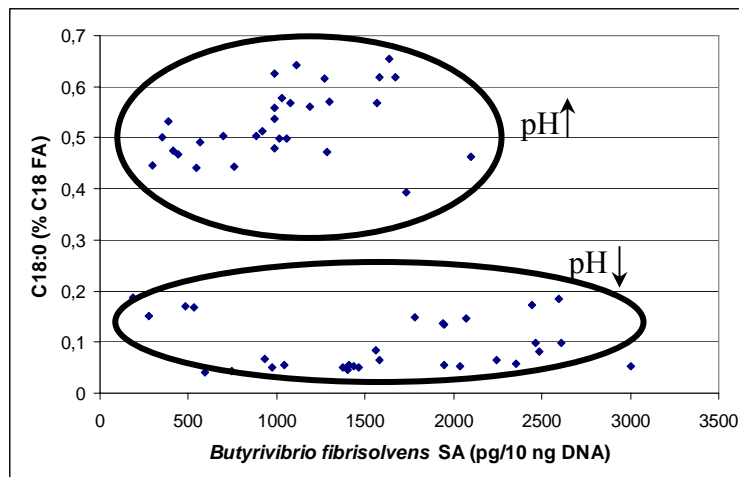
Figure 3. Relationship between *Butyrivibrio fibrisolvens* VA subgroup DNA concentration (pg/10 ng DNA) and the proportion of *trans*-11 C_{18:1} (VA) and *cis*-9, *trans*-11 CLA in the effluent in the second and third experiment



Butyrivibrio fibrisolvens SA producer subgroup is formed by a group of bacteria which can synthesize C_{18:0} when incubated with linoleic acid (Paillard et al., 2007b). If they can synthesize C_{18:0} from linoleic acid, it is possible that they can also use other intermediates

to synthesize C_{18:0}. Although *B. fibrisolvens* SA subgroup seems to be resistant to low pH conditions, a reduction in the proportion of C_{18:0} in the effluent was observed in both experiments at low pH (Figure 4). This could be explained, on one hand, because *B. fibrisolvens* SA producer subgroup needs linoleic acid in the free form to produce C_{18:0}, and if low pH inhibits *A. lipolytica* and lipolysis, then the availability of the precursor is also limited; and on the other hand, because other intermediates of the biohydrogenation process, such as CLA and *trans*-11 C_{18:1}, are also reduced at low pH and *B. fibrisolvens* SA producer subgroup can not use them to synthesize C_{18:0} despite being resistant to low pH conditions. The combination of ruminal liquid FA profile along with PCR analyses of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes provides a new tool to study changes in bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes related to ruminal and dietary changes. However, further studies in animals testing the specificity of the primers used in these experiments are strongly encouraged.

Figure 4. Relationship between *Butyrivibrio fibrisolvens* SA subgroup DNA concentration (pg/10 ng DNA) and C_{18:0} effluent proportion in the second and third experiment

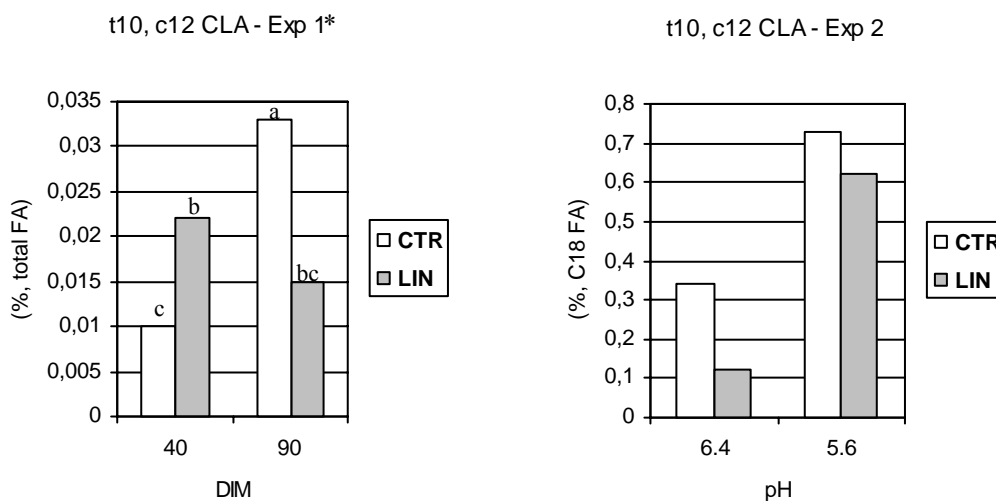


In the second part of this section some of the results obtained between the first and second experiment (Chapter IV and V), and second and third experiment (Chapter V and VI) will be compared:

a) First and second experiment

As discussed previously, milk fat percentage was lower in linseed (2.65%) than in control group (2.86%) in the in vivo experiment. However, the concentration of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk, FA associated with milk fat depression, were higher in control than in linseed group at 90 DIM in the first experiment (Figure 5), and the SOY diet had higher proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent compared with LIN diet in a dual flow continuous culture system in the second experiment (Figure 5). Although results from the first and second experiments are consistent, they contradict the conventional knowledge which indicates that *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA milk concentrations are negatively correlated with milk fat yield (Griinari et al., 1998; Piperova et al., 2000; Peterson et al., 2003) and indicate that the milk FA profile in the first experiment does not explain the differences in milk fat percentage between treatments.

Figure 5. *Trans*-10, *cis*-12 CLA concentration in milk and effluent in the first (in vivo) and second (in vitro) experiment, respectively.



*Exp. 1: Treatment * day interaction was significant ($P < 0.01$). Means with different letters differ ($P < 0.05$).

Exp. 2: Diet ($P = 0.04$) and pH ($P < 0.001$) effects were significant.

There might be an easier explanation to the different milk fat percentage observed in the first experiment. The linseed diet had lower NDF (27.2% vs. 28.2%) and ADF (15.5% vs. 16.2%) concentrations compared with the control diet. Ingestion of polyunsaturated FA (sum of C_{18:2} and C_{18:3}), calculated using individual intakes in the in vivo experiment (CTR: 24.1 kg MS/d vs. LIN: 23.1 kg MS/d), was higher in linseed (758 g/d) than in control group (658 g/d). Moreover, the FA profile of linseed was more unsaturated than in control diet, because linseed had higher proportion of linolenic acid compared with control diet which was richer in linoleic acid. It is known that polyunsaturated FA are inhibitory to microbial growth (Palmquist and Jenkins, 1980), and this effect is greater as the number of unsaturation in the FA increases. There was no effect of diet on acetate proportion in the second experiment, however there was a tendency ($P = 0.06$) for a diet effect on acetate concentration, being higher in SOY (65.5 mM) than in LIN diet (61.0 mM). Therefore, linseed diet which was poorer in fiber and richer in polyunsaturated FA in the first experiment could have affected more negatively cellulolytic bacteria, affecting acetate production, precursor for the mammary synthesis of FA which would explain the lower milk fat percentage in linseed compared with control diet.

b) Second and third experiment

Results of *trans*-10, *cis*-12 CLA and *trans*-10 C_{18:1} effluent proportions in the second and third experiments (Tables 1 and 2) can also be compared for consistency. In the third experiment it was observed that low pH reduced *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the 24 h effluent, which was the opposite of what had been observed in the second experiment. However, *trans*-10, *cis*-12 CLA effluent proportion at 1 h postfeeding in the third experiment was higher at low pH than at high pH. The same was observed at 2 h postfeeding in the second experiment, however, this difference between low and high pH was maintained in the 24 h effluent FA profile in the second experiment.

Why the *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion observed at 1 h postfeeding was not maintained in the 24 h effluent in the third experiment? The reason for these results is not clear but it is true that the difference observed at 1 h postfeeding between high and low pH in the third experiment was not as large as the difference observed at 2 h postfeeding in the second experiment. The synthesis of *trans*-10, *cis*-12 CLA by ruminal bacteria seems to be a fast process as it has been observed in the literature (Wallace et al., 2007), and also in the

second experiment of this thesis, where it was observed that *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the effluent was higher at 2 than at 4 or 8 h postfeeding (Table 1). If effluent samples at 4 and 8 h postfeeding had been taken in the third experiment, it is possible that the proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent would have changed with respect to 1 h postfeeding, and would have probably been higher at high than at low pH. This would have explained the higher *trans*-10, *cis*-12 CLA proportion in the 24 h effluent at high pH in the third experiment. However, the different effect of pH on the proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent between experiments does not have a clear explanation.

Table 1. Effect of pH and diet on *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA 24 h effluent proportions, and at 2, 4 and 8 h postfeeding in the second experiment

FA (% C ₁₈ FA)	Treatments ¹				SEM	P-value ²		
	SOYH	SOYL	LINH	LINL		Diet	pH	Int.
24 h effluents								
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.62	20.7	1.00	19.7	1.69	NS	***	NS
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.34	0.65	0.13	0.60	0.09	†	***	NS
2 h postfeeding								
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.50	16.8	0.99	14.7	0.56	*	***	NS
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.09	0.80	0.06	0.60	0.06	†	***	NS
4 h postfeeding								
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.40	22.3	1.10	19.8	0.81	NS	***	NS
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.08	0.60	0.06	0.46	0.06	NS	***	NS
8 h postfeeding								
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.04 ^c	26.1 ^a	1.04 ^c	21.5 ^b	0.50	**	***	**
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.07	0.44	0.05	0.36	0.04	NS	***	NS

^{a,b,c,d} When interaction is significant ($P < 0.05$), different superscripts within a row indicate means differ significantly.

¹SOYH = soybean diet, pH = 6.4; LINH = linseed diet, pH = 6.4; SOYL = soybean diet, pH = 5.6; LINL = linseed diet, pH = 5.6.

²NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, † $P < 0.10$.

Table 2. Effect of pH and diet on *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA 24 h effluent proportions and at 1h postfeeding in the third experiment

FA (% C ₁₈ FA)	Treatments ¹				SEM	P-value ²		
	HFH	HFL	LFH	LFL		Diet	pH	Int.
24 h effluents								
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.86	31.4	0.76	23.6	3.47	NS	***	NS
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.68 ^{ab}	0.42 ^{bc}	0.90 ^a	0.22 ^c	0.11	NS	**	†
1 h postfeeding								
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1.82 ^c	27.1 ^a	0.35 ^a	18.3 ^b	3.13	*	***	†
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.14	0.47	0.17	0.60	0.03	*	***	NS

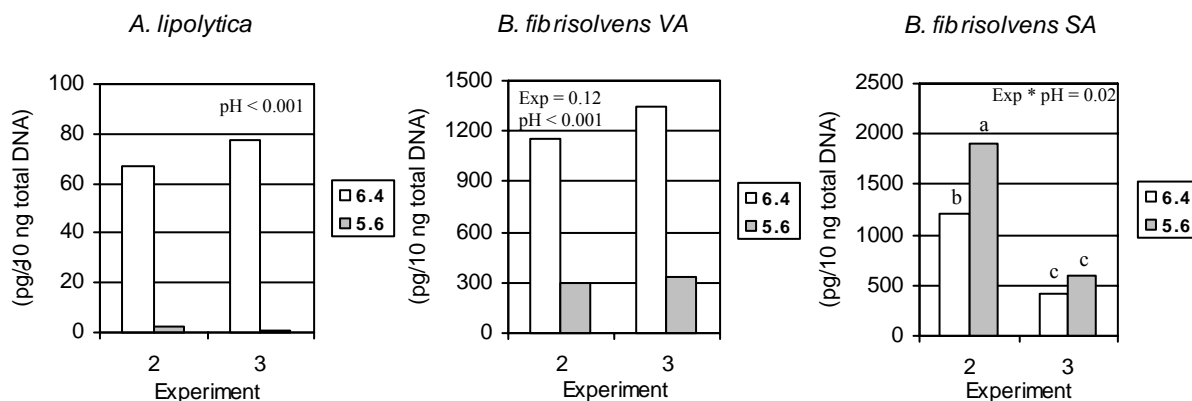
^{a,b,c,d} When interaction is significant ($P < 0.05$), different superscripts within a row indicate means differ significantly.

¹HFH = 70:30 F:C diet, pH = 6.4; HFL = 70:30 F:C diet, pH = 5.6; LFH = 30:70 F:C diet, pH = 3.4; LFL = 30:70 F:C diet, pH = 5.6.

²NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, † $P < 0.10$.

Looking at the results of DNA concentration of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation processes of the second and third experiment (Figure 6), it can be observed that there were some differences between experiments which could explain the different effluent FA profile. The microorganisms and enzymes responsible for *trans*-10, *cis*-12 CLA synthesis are not well characterized (Wallace et al., 2007). It is possible that at high pH bacteria from the *B. fibrisolvens* VA producer subgroup which can also synthesize *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-11 C_{18:1} could be the responsible for producing this intermediate. This would explain that at high pH a higher proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA was observed in the third than in the second experiment because *B. fibrisolvens* VA producer subgroup DNA concentration tended ($P = 0.12$) to be higher in the third than in the second experiment (Figure 6). On the other hand, at low pH bacteria responsible for the synthesis of *trans*-10, *cis*-12 CLA could be of the *B. fibrisolvens* SA producer subgroup which would explain the higher proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent observed in the second experiment at low pH, because DNA concentration of *B. fibrisolvens* SA producer subgroup was also higher in the second experiment at low pH (Figure 6).

Figure 6. Effect of pH on DNA concentrations of *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* VA and *Butyrivibrio fibrisolvens* SA producer subgroup in the second and third experiments



Regarding *trans*-10 C_{18:1} synthesis, results of the second experiment (Table 1) suggest that its synthesis is slower than that of *trans*-10, *cis*-12 CLA, because its proportion in the effluent increases as the hours postfeeding increase. This result seems logical as long as *trans*-10, *cis*-12 CLA is the precursor of *trans*-10 C_{18:1} in the new biohydrogenation pathway proposed by Bauman and Griinari (2001), so the synthesis of the second one must be slower than the synthesis of the former. The proportion of *trans*-10 C_{18:1} at low pH was higher than that at high pH in both experiments. DNA concentration of *B. fibrisolvens* SA producer subgroup was the only bacterial group that was not affected by low pH, so it is possible that some bacteria of this group could have synthesized *trans*-10 C_{18:1} at low pH conditions.

Finally, I would like to finish this discussion with some thoughts on this new line of research that has started in the Servei de Digestió i Fermentació Ruminal (Facultat de Veterinària, UAB, Spain). Previous thesis of the group studied the effect of different additives on ruminal fermentation in order to modulate pH, reduce losses of methane and/or ammonia or increase animal performance. However, current research objectives in animal science are shifting towards areas of animal welfare, environmental implications of animal production and consumer's health implications of animal products. This thesis represents the first approach in our research group to study dietary strategies to improve the quality of animal products from the human-health point of view. During this process, new methodologies have been developed, such as FA analyses of ruminal liquid samples and PCR analyses of bacteria involved in the lipolysis and biohydrogenation processes.

These methodologies can be useful in future research in the same area because the fatty acid profile of milk will continue to receive attention, as it is a reservoir for many of the unique *trans* isomers of ruminal origin having a wide range of physiological effects.

Capítulo VIII

Conclusiones Generales

GENERAL CONCLUSIONS

Taking into account the results obtained and the experimental conditions used in this thesis, it can be concluded that:

- 1.- Extruded linseed supplementation (1.7 kg/d) to dairy cow diets reduced milk fat percentage but increased n-3 and *cis*-9, *trans*-11 CLA milk concentrations, and reduced the n-6 to n-3 fatty acid ratio. This milk fatty acid profile may be beneficial for human health.
- 2.- Linseed supplemented cows tended to have lower basal concentration and uterine release of PGFM in response to an oxytocin challenge, supporting the hypothesis which states that increasing the n-3/n-6 fatty acid ratio in the diet decreases the synthesis of uterine PGF_{2α}. However, this reduction in PGF_{2α} concentration did not improve reproductive performance in commercial conditions.
- 3.- Low ruminal pH reduced lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids in a dual flow continuous culture system. Moreover, low ruminal pH in diets rich in PUFA caused a change in the normal biohydrogenation pathway increasing the proportions of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent.
- 4.- Low ruminal pH was the main factor affecting the biohydrogenation process that results in the accumulation of *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 CLA. However, diets rich in concentrate also increased, but to a lesser extent, the proportion of *trans*-10, *cis*-12 CLA in the effluent.
- 5.- Ruminal biohydrogenation was more active in high forage than in low forage diets. The biohydrogenation inhibition observed at low pH could be partially alleviated using higher levels of fiber in the diet.
- 6.- Low ruminal pH reduced the DNA concentration of *Anaerovibrio lipolytica* and *Butyrivibrio fibrisolvens* vaccenic acid producer subgroup and did not modify *Butyrivibrio fibrisolvens* stearic acid producer subgroup DNA concentration. Low forage diets increased *Anaerovibrio lipolytica* and did not modify *Butyrivibrio*

fibrisolvens vaccenic acid and *Butyrivibrio fibrisolvens* stearic acid producer subgroup DNA concentrations.

Capítulo IX

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abayasekara, D.R.E., Wathes, D.C., 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids*. 61, 275-287.
- AbuGhazaleh, A.A., Jacobson, B.N., 2007. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 11-22.
- Allen, M.S., 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83, 1598-1624.
- Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J.A., Zalkovic, P., 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic Acid. *J. Dairy Sci.* 89, 3066-3074.
- Andersen, J.B., Ridder, C., Larsen, T., 2008. Priming the cow for mobilization in the periparturient period: effects of supplementing the dry cow with saturated fat or linseed. *J. Dairy Sci.* 91, 1029–1043.
- A.O.A.C.-Association of Official Analytical Chemists, 1984. *Official Methods of Analysis*. (11th ed.) AOAC, Washington, DC.
- A.O.A.C.-Association of Official Analytical Chemists, 1995. *Official Methods of Analysis*. (16th Ed) AOAC, Arlington, V A.
- Balcells, J., Guada, J.A., Peiró, J.M., Parker, D.S., 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Cromatogr.* 575, 153-157.
- Bas, P., Archimède, H., Rouzeau, A., Sauvant, D., 2003. Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: Effect of concentration and type of forage. *J. Dairy Sci.* 86, 2940–2948.
- Bauchart, D., Carmier, F.L., Doreau, M., Gaillard, B., 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *Br. J. Nutr.* 63, 563-578.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M., 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70, 15–29.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M., 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 203-227.

- Bauman, D.E., Perfield II, J.W., de Veth, M.J., Lock, A.L., 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. Proc. Cornell Nutr. Conf., pp. 175-189.
- Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J., Lock, A.L., 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. J. Dairy Sci. 89, 1235-1243.
- Bauman, D.E., Perfield, J.W., Harvatine, K.J., Baumgard, L.H., 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. J. Nutr. 138, 403-409.
- Baumgard, L.H., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Saebo, A., Bauman, D.E., 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. Am. J. Physiol. 278, R179–R184.
- Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y., 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. Adv. Exp. Med. Biol. 606, 67-108.
- Blanch, M., 2006. Master thesis: Puesta a punto de la técnica de PCR a tiempo real para la cuantificación de *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii* en líquido ruminal de vaca y ternera. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Boggs, D.L., Bergen, W.G., Hawkins, D.R., 1987. Effects of tallow supplementation and protein withdrawal on ruminal fermentation, microbial synthesis and site of digestion. J. Anim. Sci. 64, 907-914.
- Bu, D.P., Wang, J.Q., Dhiman, T.R., Liu, S.J., 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. J. Dairy Sci. 90, 998–1007.
- Burke, J.M., Staples, C.R., Risco, C.A., de la Sota, R.L., Thatcher, W.W., 1997. Effect of ruminant grade Menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 80, 3386–3398.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. J. Dairy Sci. 88, 2508-2516.
- Butler, W.R., 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. J. Dairy Sci. 81, 2533-2539.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Devant, M., 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. J. Dairy Sci. 85, 574-579.

- Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., Ferret, A., Bach, A., 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86, 702-711.
- Cant, J.P., DePeters, E.J., Baldwin, R.L., 1993. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *J. Dairy Sci.* 76, 762-774.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82, 3230-3236.
- Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., 2007. Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 90, 1486-1492.
- Chalupa, W., Rickabaugh, B., Kronfeld, D.S., Sklan, D., 1984. Rumen fermentation in vitro as influenced by long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 67, 1439-1444.
- Chalupa, W., Vecchiarelli, B., Elser, A.E., Kronfeld, D.S., Sklan, D., Palmquist, D.L., 1986. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 69, 1293-1301.
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130-132.
- Chilliard, Y., 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants. pigs. and rodents: a review. *J. Dairy Sci.* 76, 3897-3931.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M., 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. *Livest. Prod. Sci.* 70, 31-48.
- Choi, N.J., Imm, J.Y., Oh, S., Kim, B.C., Hwang, H. J., Kim, Y.J., 2005. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 643-653.
- Chouinard, P.Y., Girard, V., Brisson, G.J., 1998. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *J. Dairy Sci.* 81, 471-481.
- Chouinard, P.Y., Barman, D.E., Corl, B.A., Baumgard, L.H., McGuire, M.A., Gipsy, J.G., 1999. An update on conjugated linoleic acid. *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, pp. 93-101.

- Chouinard, P.Y., Corneau, L., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K., Bauman, D.E., 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84, 680–690.
- Chow, T.T., Fievez, V., Raes, K., Demeyer, D., De Smet, S., 2003. Lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acid *in vitro*: comparison of linseed products and grass. Available: <http://www.bsas.org.uk/downloads/annlproc/Pdf2003/169.pdf>
- Chow, T.T., Fievez, V., Moloney A.P., Raes, K., Demeyer, D., De Smet, S., 2004. Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112, 79-105.
- Cook, H.W., 1996. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 129–152.
- Coppock, C.E., Wilks, D.L., 1991. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *J. Anim. Sci.* 69, 3826-3837.
- Da Silva, D.C., Santos, G.T., Branco, A.F., Damasceno, J.C., Kazama, R., Matsushita, M., Horst, J.A., dos Santos, W.B.R., Petit, H.V., 2007. Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. *J. Dairy Sci.* 90, 2928–2936.
- De Blas, C., 2004. Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del ácido linoleico conjugado. 1. Rumiantes.
- De Blas, C., González, G., Argamentoría, A., 1987. *Nutrición y alimentación del ganado*. Mundi-prensa, Madrid.
- Demeyer, D., Doreau, M., 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceedings of the Nutrition Society.* 58, 593–607.
- Demeyer, D., Henderson, C., Prins, R.A., 1978. Relative significance of exogenous and de novo synthesized fatty acids in the formation of rumen microbial lipids *in vitro*. *Appl. Microbiol.* 35, 24–31.
- DePeters, E.J., Cant, J.P., 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75, 2043-2070.

- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78: 1667-1676.
- Dewhurst, R.J., King, P.J., 1998. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Grass For. Sci.* 53, 219–224.
- Dhiman, T.R., Satter, L.D., Galli, M.P., 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., Nam, S.H., Ure, A.L., 2005. Factors affecting conjugated linoleic content in milk and meat. *Food Sci. Nutr.* 45, 463-482.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M., 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with rusitec. *Can. J. Anim. Sci.* 80, 473-482.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 45, 379-396.
- Doreau, M., Chilliard, Y., 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *British J. Nutr.* 78 (Supl. 1), S15-S35.
- Doreau, M., Legay, F., Bauchart, D., 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74, 2233-2242 .
- Edmonson, A.J., Lean, J.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition score chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68-78.
- Fay, J.P., Jakober, K.D., Cheng, K.J., Costerton, J.W., 1990. Esterase activity of pure cultures of rumen bacteria as expressed by the hydrolysis of *p*nitrophenylpalmitate. *Can. J. Microbiol.* 36, 585-589.
- FEDNA, 1999. Normas FEDNA para la formulación de raciones. FEDNA, Madrid.
- Fellner, V., Sauer, F.D., Kramer, J.K.G., 1997. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *J. Dairy Sci.* 80, 921-928.
- Flowers, G., Ibrahim, S.A., AbuGhazaleh, A.A., 2008. Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *J. Dairy Sci.* 91, 722–730.

- Focant, M., Mignolet, E., Marique, M., Clabots, F., Breyne, T., Dalemans, D., Larondelle, Y., 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.* 81, 1095-1101.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, S.G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fotouhi, N., Jenkins, T.C., 1992. Resistance of fatty acyl amides to degradation and hydrogenation by ruminal microorganisms. *J. Dairy Sci.* 75, 1527-1532.
- Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Sánchez, C., González, A., Newbold, J.R., Santos, J.E.P., Rodríguez-Alcalá, L.M., Fontecha, J., 2008a. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livest. Sci.* 113, 144-154.
- Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., 2008b. Effect of pH on rumen fermentation and biohydrogenation of extruded soybean and linseed fatty acids in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 91 (Suppl. 1), 82 (Abstract).
- Galbraith, H., Miller, T.B., Paton, A.M., Thompson, J.K., 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* 34, 803-813.
- Gaynor, P.J., Erdman, R.A., Teter, B.B., Sampugna, J., Capuco, A.V., Waldo, D.R., Hamosh, M., 1994. Milk fat yield and composition during abomasal infusion of *cis* or *trans* octadecenoates in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77, 157-165.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene Quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503-512.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- Gonthier, C., Mustafa, A.F., Berthiaume, R., Petit, H.V., Martineau, R., Ouellet, D.R., 2004. Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 1854-1863.
- Gonthier, C., Mustafa, A.F., Ouellet, D.R., Chouinard, P.Y., Berthiaume, R., Petit, H.V., 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 88, 748-756.
- Griinari, M.J., Bauman, D.E., 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. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. Pariza, and G. J. Nelson, ed. AOCS Press, Champaign, IL.
- Griinari, J.M., Bauman, D.E., 2001. Production of low fat milk by diet induced milk fat depression. *Advances in Dairy Technology*. 13, 197-212.
- Griinari, J.M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L., Nurmela, K.V.V., 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81, 1251-1261.
- Grummer, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74, 3244-3257.
- Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P., 1988. Lipid metabolism in the rumen. Pages 285-322. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. P. N. Hobson, ed. Elsevier, London, UK.
- Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P., 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. P. N. Hobson, ed. Elsevier, London, UK.
- Hasler, C.M., 2002. Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition*. 132, 3772-3781.
- Hawkins, D.E., Niswender, K.D., Oss, G.M., Moeller, C.L., Odde, K.G., Sawyer, H.R., Niswender, G.D., 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J. Anim. Sci.* 73, 541-545.
- Hazlewood, G.P., Kemp, P., Lander, D.J., Dawson, R.M.C., 1976. C₁₈ unsaturated fatty acid hydrogenation patterns of some rumen bacteria and their ability to hydrolyse exogenous phospholipids. *British Journal of Nutrition*. 35, 293-297.
- Henderson, C., Hobson, P.N., Summers, R., 1969. The production of amylase, protease, and lipolytic enzymes by two species of anaerobic rumen bacteria, p 189. *Proc. 4th Int. Symp. Continuous Culture Microorganisms*, Prague, 1968.
- Hespell, R.B., O'Bryan-Shah, P.J., 1988. Esterase activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. *Appl Environ Microbiol.* 54, 1917-1922.
- Hicks, R., Amann, R.I., Stahk, D.A., 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158-2163.
- Hinckley, T., Clark, R.M., Bushmich, S.L., Milvae, R.A., 1996. Long chain polyunsaturated fatty acids and bovine luteal cell function. *Biol. Reprod.* 55, 445-449.

- Hobson, P.N., 1965. Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 38, 167-180.
- Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43, 528–534.
- Hu, F.B., Manson, J.E., Willett, W.C., 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 5-19.
- Hussein, H.S., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 1995. Effects of forage level and canola seed supplementation on site and extent of digestion of organic matter, carbohydrates, and energy by steers. *J. Anim. Sci.* 73, 2458-2468.
- Huth, P.J., Dirienzo, D.B., Miller, G.D., 2006. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *J. Dairy Sci.* 89, 1207-1221.
- Ikwuegbu, O.A., Sutton, J.D., 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* 48, 365-376.
- ISO, 2002. Milk fat preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO 15884-IDF 182: 2002.
- Jenkins, T.C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci.* 76, 3851-3863.
- Jenkins, T., 1997. Success of fat in dairy rations depends on choosing the right amount. *Feedstuffs.* 69, 14-24.
- Jenkins, T., 1998. The benefits and limitations of fat in dairy rations. Available: <http://www.txanc.org/proceedings/1998/benefits.pdf>
- Jenkins, T., 2004. Challenges of meeting cow demands for omega fatty acids. Florida ruminant nutrition symposium, 52-66.
- Jenkins, T.C., Fotouhi, N., 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., Jenny, B.F., 1992. Nutrient digestion and lactation performance of dairy cows fed combinations of prilled fat and canola oil. *J. Dairy Sci.* 75, 796-803.
- Jenkins, T.C., McGuire, M.A., 2005. Effects of Nutrition on Milk Composition: A 25-Year Review of Research. Tri-State Dairy Nutrition Conference.
- Jenkins, T.C., McGuire, M.A., 2006. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *J. Dairy Sci.* 89, 1302-1310.

- Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E., 2008. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86, 397–412.
- Jerred, M.J., Carroll, D.J., Combs, D.K., Grummer, R.R., 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on nutrient utilization and lactation performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73, 2842-2854.
- Jouany, J.P., 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments.* 2, 131-144.
- Kalscheur, K.F., Teter, B.B., Piperova, L.S., Erdman, R.A., 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 2104-2114.
- Katz, I., Keeney, M., 1966. Characterization of the octadecenoic acids in rumen digesta and rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 49, 962–966.
- Kelly, M.L., Berry, J.R., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Chouinard, P.Y., Van Amburgh, M.E., Bauman, D.E., 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *American Society for Nutritional Sciences.* 881-885.
- Kemp, P., Lander, D. J., 1984. Hydrogenation *in vitro* of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130, 527–533.
- Kemp, P., White, R.W., Lander, D.J., 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by the bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.* 90, 100-114.
- Kennelly, J.J., 1996. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Anim. Feed Sci. Techn.* 60, 137-152.
- Khorasani, G.R., Boer, G. De, Robinson, P.H., Kennelly, J.J., 1992. Effect of canola fat on ruminal and total tract digestion, plasma hormones, and metabolites in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75, 492-501.
- Kim, Y.J., Lee, K.W., Oh, S., Lee, H.J., 2003. Effects of linoleic acid on conjugated linoleic acid (CLA) production by planktonic rumen bacteria from grain fed cows. *J. Food Sci.* 68, 1696-1700.
- Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., 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.
- Latham, M.J., Storry, J.E., Sharpe, M.E., 1972. Effect of Low-Roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Appl. Microbio.* 24, 871-877.
- Leedle, J.A.Z., Bryant, M.P., Hespell, R.B., 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high- forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3236-3244.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 75, 1216-1231.
- Loor, J.J., Herbein, J.H., 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.
- Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., Doreau, M., 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2472–2485.
- Loor, J.J., Ferlay, A., Ollier, A., Doreau, M., Chilliard, Y., 2005. Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J. Dairy Sci.* 88, 726–740.
- López-Gatius, F., 2003. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in dairy cattle in northeastern Spain. *Theriogenology*. 60, 89-99.
- Luna, P., Juárez, M., de la Fuente, M.A., 2005. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 88, 3377-3381.
- Mackie, R.I., Gilchrist, F.M.C., Robberts, A.M., Hannah, P.E., Schwartz, H.M., 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high-concentrate diets. *J. Agric. Sci.* 90, 241–254.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reprod.* 121, 175-180.
- Martin, S.A., Jenkins, T.C., 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and *trans*-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 80, 3347-3352.
- Martín-Diana, A.B., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2003. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13, 827–833.

- Mateos, G.G., Rebollar, P.G., Medel, P., 1996. Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal. XII Curso de especialización FEDNA. Madrid.
- Mattos, R., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction*. 5, 38–45.
- Mattos, R., Staples, C.R., Williams, J., Amoroch, A., McGuire, M.A., Thatcher, W.W., 2002. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. *J. Dairy Sci.* 85, 755–764.
- Mattos, R., Staples, C.R., Artech, A., Wiltbank, M.C., Diaz, F.J., Jenkins, T.C., Thatcher, W.W., 2004. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF_{2α}, milk composition, and metabolic status of periparturient holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87, 921-932.
- Mayes, R.W., Lamb, C.S., Colgrove, P.M., 1986. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci.* 107, 161-170.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., 2002. *Animal nutrition*. 6th edition. Pearson education.
- Minato, H., Ishibashi, S., Hamaoka, T., 1988. Cellular fatty acid and sugar composition of representative strains of rumen bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34, 303–319.
- Moate, P.J., Chalupa, W., Jenkins, T.C., Boston, R.C., 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. *Anim. Feed Sci. Techn.* 112, 79-105.
- Moore, K., Thatcher, W.W., 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 1254-1266.
- Mosley, E.E., Powell, G.L., Riley, M.B., Jenkins, T., 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. *J. Lipid Res.* 43, 290-296.
- Mustafa, A.F., Christensen, D.A., McKinnon, J.J., Newkirk, R., 2000. Effects of stage of processing of canola seed on chemical composition and protein quality of canola products for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 80, 211–214.
- Mustafa, A.F., McKinnon, J.J., Christensen, D.A., He, T., 2002. Effects of micronization of flaxseed on nutrient disappearance in the gastrointestinal tract of steers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 95, 123–132.
- Nebel, R.L., Mc Gilliard, M.L., 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3257-68.

- Nielsen, T.S., Straarup, E.M., Vestergaard, M., Sejrsen, K., 2006. Effect of silage type and concentrate level on conjugated linoleic acids, *trans*-C18:1 isomers and fat content in milk from dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 699-712.
- NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Rev. Ed. Nat. Acad. Press. Washington DC.
- O'Donnell, J.A., 1989. Milk fat technologies and markets: a summary of the Wisconsin Milk Marketing Board, 1988, Milk Fat Roundtable. *J. Dairy Sci.* 72, 3109-3115.
- Oliván, M., Osoro, K., 1999. Effect of the temperature on alkane extraction from faeces and herbage. *J. Agric. Sci.* 132, 305-312.
- Paillard, D., Mckain, N., Chaudhary, L.C., Walker, N. D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N. R., Kopečný, J., Vercoe, P. E., Louis, P., Wallace, R. J., 2007a. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek.* 91, 417-422.
- Paillard, D., Mckain, N., Rincon, M.T., Shingfield, K.J., Givens, D.I., Wallace, R.J., 2007b. Quantification of ruminal *Clostridium proteoclasticum* by real-time PCR using a molecular beacon approach. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1251-1261.
- Palmquist, D.L., 1996. Utilización de lípidos en dietas de rumiantes. XII Curso de especialización FEDNA. Madrid.
- Palmquist, D.L., Jenkins, T.C., 1980. Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci.* 63, 1-14.
- Palmquist, D.L., Jenkins, T.C., 2003. Challenges with fats and fatty acids methods. *J. Anim. Sci.* 81, 3250-3254.
- Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M., 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76, 1753-1771.
- Pantoja, J., Firkins, J.L., Eastridge, M.L., 1996. Fatty acid digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 79, 429-437.
- Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E., 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine.* 223, 8-13.
- Park, Y., Albright, K.J., Cai, Z.Y., Pariza, M.W., 2001. Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl) diazomethane. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1158-1164.

- Parodi, P.W., 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 82, 1339-1349.
- Perfield, J.W., Lock, A.L., Griinari, J.M., Saebo, A., Delmonte, P., Dwyer, D.A., Bauman, D.E., 2007. Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 2211-2218.
- Peterson, D.G., Matitashvili E.A., Bauman, D.E., 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nutr.* 133, 3098-3102.
- Petit, H.V., 2002. Digestion, milk production, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *J. Dairy Sci.* 85, 1482-1490.
- Petit, H.V., 2003. Digestion, milk production, milk composition and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. *J. Dairy Sci.* 86, 2637-2646.
- Petit, H.V., Twagiramungu, H., 2002. Reproduction of dairy cows fed flaxseed, Megalac, or micronized soybeans. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl. 1), 312 (Abstr).
- Petit, H.V., Twagiramungu, H., 2006. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Therio.* 66, 1316-1324.
- Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H., 2001. Milk production, milk composition, and reproductive function of dairy cows fed different fats. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 263 (Abstr).
- Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H., Mann, G.E., 2002. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J. Dairy Sci.* 85, 889-899.
- Petit, H.V., Germiquet, C., Lebel, D., 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.
- Piperova, L.S., Teter, B.B., Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S.E., Yurawecz, M.P., Fritsche, J., Ku, K., Erdman, R.A., 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, 2658-2674.
- Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M., Erdman, R.A., 2002. Duodenal and milk *trans* octadecenoic acid

- and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 132, 1235–1241.
- Polan, C.E., McNeill, J.J., Tove, S.B., 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 88, 1056-1064.
- Qiu, X., Eastridge, M.L., Griswold, K.E., Firkins, J.L., 2004. Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and *trans* C18:1. *J. Dairy Sci.* 87, 3473-3479.
- Raes, K., Smet, S. De, Demeyer, D., 2001. Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *J. Anim. Sci.* 73, 253–260.
- Reddy, P.V., Morrill, J.L., Nagaraja, T.G., 1994. Release of free fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. *J. Dairy Sci.* 77, 3410–3416.
- Robinson, R.S., Pushpakumara, P.G.A., Cheng, Z., Peters, A.R., Abayasekara, D.R.E., Wathes, D.C., 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction.* 124, 119-131.
- Rodríguez-Alcalá, L.M., Fontecha, J., 2007. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: evaluation after processing and storage. *J. Dairy Sci.* 90, 2083-2090.
- Rodríguez-Prado, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., 2004. Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. *J. Dairy Sci.* 87, 1413-1424.
- Russell, J.B., 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *J. Dairy Sci.* 81, 3222–3230.
- Russell, J.B., Dombrowski, D.B., 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 604-610.
- Russell, J.B., Onodera, R., Hino T., 1991. Ruminal protein fermentation: new perspectives on previous contradictions. In: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*, 681-697. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima, (ed.) Academic press, San Diego, CA.

- Saebø, A., Saebø, P.C., Griinari, J.M., Shingfield, K.J., 2005. Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10,12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids*. 40, 823-832.
- Sanchez, W.K., Block, E., 2002. Nutrition and metabolism of fatty acids in dairy cows. 4th Annual Meeting of Intermountain Nutr. Conf., Utah State Univ., pp. 55-73. Salt Lake City, UT.
- Santos, J.E., 2004. Programa de nutrición para mejorar la fertilidad: proteína y ácidos grasos. Máster en Asesoría y Gestión de explotaciones de bovino lechero. Facultad de Veterinaria. Bellaterra. España.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvão, K.N., 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83C, 513-535.
- Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32, 199-208.
- Schingoethe, D.J., Casper, D.P., 1991. Total lactation response to added fat during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74, 2617-2622.
- Shingfield, K.J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Arola, A., Nurmela, K.V.V., Huhtanen, P., Griinari, J.M., 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77, 165-179.
- Shriver, B.J., Hoover, W.H., Sargent, J.P., Crawford, R.J., Thayne, W.V., 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69, 413-419.
- Simopoulos, A.P., 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 560-569.
- Skaar, T.C., Grummer, R.R., Dentine, M.R., Stauffacher, R.H., 1989. Seasonal effects of prepartum and postpartum fat and niacina feeding on lactation performance and lipid metabolism. *J. Dairy Sci* 72, 2028-2038
- Smith, W.A., Harris, B., Van Horn, H.H., Wilcox, C.J., 1993. Effects of forage type on production of dairy cows supplemented with whole cottonseed, tallow, and yeast. *J. Dairy Sci.* 76, 205-215.
- Spicer, L.J., Alpizar, E., Echternkamp, S.E., 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 71, 1232-1241.

- Staples, C.R., Burke, J.M., Thatcher, W.W., 1998. Symposium: optimizing energy nutrition for reproducing dairy cows. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81, 856-871.
- Stern, M.D., Hoover, W.H., 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17-32 in *Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or Fermentation*. Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.
- Sukhija, P.S., Palmquist, D.L., 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36, 1202-1206.
- Sutton, J.D., 1989. Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.* 72, 2801-2814.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2766-2774.
- Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R., Pru, J.K., 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogen.* 56, 1435-1450.
- Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R., Santos, J.E.P., 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology.* 65, 30-44.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McCallan, A.B., France, J., 1994. A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
- Tricon, S., Burdge, G.C., Williams, C.M., Calder, P.M., Yaqoob, P., 2005. The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proceedings of the nutrition society.* 64, 171-182.
- Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M.C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., Enjalbert, F., 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* 86, 4054-4063.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., Enjalbert, F., 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 713-724.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Looor, J.J., Chilliard, Y., Doreau, M., 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86, 3999-4007.

- Van de Vossenberg, J.L., Joblin, K.N., 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Let. Appl. Microbiol.* 37, 424-428.
- Van Kessel, J.S., Russell, J.B., 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 205-210.
- Van Nevel, C.J., Demeyer, D.I., 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 53-63.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Wachira, A.M., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Hallett, K., Enser, M., Wood, J.D., 2000. Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. *J. Agric. Sci.* 135, 419-428
- Wahle, K.W.S., Heys, S.D., Rotondo, D., 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lip. Res.* 43, 553-587.
- Wallace, R.J., Cotta, M.A., 1989. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 217-250 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, New York.
- Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., McKain N., McEwan, N.R., Richardson, A.J., Vercoe, P.E., Walker, N.D., Paillard, D., 2006. *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 195-201.
- Wallace, R.J., Mckain, N., Shingfield, K.J., Devillard, E., 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J. Lip. Res.* 48, 2247-2254.
- Ward, A.T., Wittenberg, K.M., Przybylski, R., 2002. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola. *J. Dairy Sci.* 85, 1191-1196.
- Weller, R.A., Pilgrim, A.F., 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32, 341-351.
- Whitehouse, N.L., Olson, V.M., Schwab, C.G., Chesbro, W.R., Cunningham, K.D., Lycos, K.D., 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72, 1335-1343.

- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J., Teather, R.M., 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16s rRNA genes. *Anaerobe*. 4, 153-163.
- Whitlock, L.A., Schingoethe, D.J., Hippen, A.R., Kalscheur, K.F., Baer, R.J., Ramaswamy, N., Kasperson, K.M., 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.* 85, 234–243.
- Wright, T., McBride, B., Holub, B., 1998. Docosahexaenoic acid enriched milk. *World Rev. Nutr. Diet.* 83, 160–165.
- Wu, Z., Huber, J.T., 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livest. Prod. Sci.* 39, 141– 155.
- Wu, Z., Ohajuruka, O.A., Palmquist, D.L., 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibilities of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74, 3025-3034.

Capítulo X

Anexos

ANEXO 1

Manufacture of cheese and fermented milk with polyunsaturated fatty acid enriched milk from extruded linseed fed dairy cows.

NOTE: This part of the experiment was conducted by J. Fontecha and L. M. Rodríguez-Alcalá in the Instituto del Frío, CSIC, Madrid, Spain.

Objective

The objective of this experiment was to study if the milk fatty acid pattern obtained supplementing dairy cow diets with extruded linseed could be affected by the fermentative process lead by lactic bacteria during the production of milk products. Moreover, the storage life and organoleptic characteristics of polyunsaturated (PUFA) enriched milk products were also investigated.

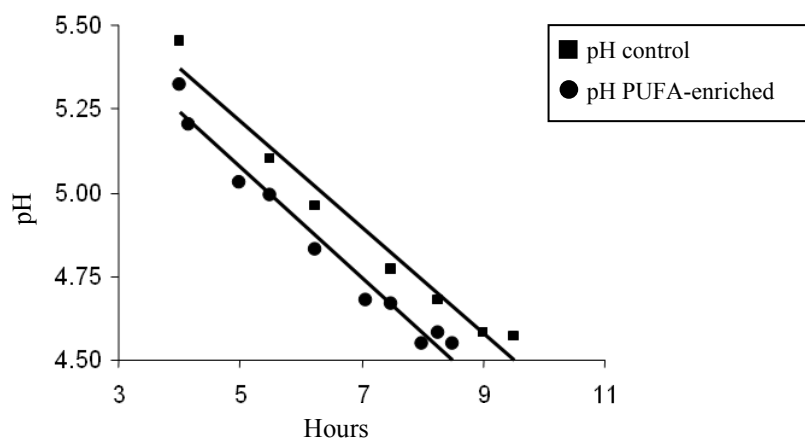
Materials and Methods

Milk samples used to develop PUFA-enriched milk products were obtained from animals of Experiment 1. Six milk samples from control group and six from linseed group were taken at 150 DIM. They were kept in refrigeration and sent to “Instituto del Frío, CSIC, Madrid, Spain”, where all production and analyses of milk products were performed.

Lipid fraction was isolated from milk samples and analyzed by gas chromatography in order to obtain the FA profile, and by Ag⁺-HPLC for the determination of CLA isomers distribution. Furthermore, milk was processed to produce fermented milk and cheese. Briefly, for the manufacture of fermented milk, milk was heated to 80°C for 30 min, then cooled to incubation temperature (44 °C) and inoculated (0.3 U L⁻¹) with the ABT-2 starter culture (Chr. Hansen, Copenhagen, Denmark), which contained *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* BB-12, and *Streptococcus thermophilus* ST-20Y. Inoculated milk samples were transferred to 100 mL tightly covered glass jars and incubated until pH 4.6 was reached. The pH of fermented milks was monitored during the fermentation using a Methohm Model 691 pH-meter (Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland) (Figure 1). Viable bacterial counts were determined in fermented milk samples (1 g) after 1 day of storage

using the differential media described previously by Martín-Diana et al. (2003). Fresh cheese was made using pasteurized milk according to the cheese-making procedure described by Rodríguez-Alcalá and Fontecha (2007). The same chromatographic techniques used for the raw milk were used at 15 days of ripening in fermented milk and cheese to determine the FA profile and CLA distribution to study if there was any effect in the FA profile during processing and storage. Because of technical problems, only 5 fermented milks and 10 cheeses were elaborated.

Figure 1. pH evolution during the fermentative process in fermented milk elaborated from control and PUFA-enriched milk.



In order to test if the PUFA-enriched milk products were well accepted by the consumer, the triangle test (ISO, 2004) was used as a sensory discrimination analysis to differentiate between fermented milks manufactured with control and PUFA-enriched milks. Panellists (15) were presented with randomised samples of three fermented milks, distributed so that in each group two samples were the same and the other was different, and they were asked to identify the odd sample. Based on the number of correct answers, the binomial distribution was used to calculate the significance level of differences.

Results and discussion

The FA profile was not modified during the fermentative process and the healthier FA profile obtained in linseed milk was also maintained in PUFA-enriched milk products (Tables 1 and 2). However, only 5 fermented milks and 10 cheeses were processed and analysed, so data must be taken with caution.

Table 1. Effect of the fermentative process in the FA profile of fermented milk and cheese compared with the FA profile of raw milk

FA, % total FA	Control			PUFA-enriched		
	Milk	Fermented ¹	Cheese	Milk	Fermented ¹	Cheese
C _{4:0}	3,77±0,44	3,33±0,10	3,22±0,19	3,42±0,25	3,19±0,34	3,04±0,19
C _{6:0}	2,10±0,11	1,97±0,07	1,93±0,12	1,97±0,13	1,88±0,21	1,79±0,06
C _{8:0}	1,10±0,06	1,05±0,03	1,05±0,08	1,07±0,06	1,03±0,10	0,97±0,03
C _{10:0}	2,26±0,05	2,26±0,05	2,27±0,22	2,24±0,12	2,26±0,23	2,09±0,06
C _{12:0}	2,38±0,04	2,49±0,09	2,45±0,24	2,42±0,12	2,49±0,17	2,31±0,08
C _{14:0}	8,54±0,11	8,78±0,28	8,76±0,39	8,35±0,23	8,61±0,38	8,32±0,14
C _{16:0}	24,6±1,00	25,4±1,35	25,7±0,73	21,6±0,89	22,3±1,01	22,4±0,33
C _{18:0}	10,9±0,42	11,04±0,26	12,2±0,6	10,2±0,46	10,2±0,50	11,1±0,58
<i>trans</i> -9 C _{18:1}	0,32±0,03	0,31±0,04	0,34±0,05	0,22±0,14	0,26±0,03	0,25±0,16
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	0,71±0,12	0,71±0,17	0,78±0,09	1,08±0,19	0,98±0,12	1,34±0,25
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	1,55±0,07	1,51±0,06	1,68±0,15	1,59±0,07	1,60±0,11	1,74±0,21
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	23,8±0,48	23,6±0,75	22,1±0,8	24,7±0,54	24,5±1,5	23,7±0,66
C _{18:2 n-6}	4,53±0,23	4,66±0,25	4,29±0,18	4,03±0,18	4,36±0,23	4,02±0,15
C _{18:3 n-3}	0,50±0,20	0,44±0,26	0,53±0,14	1,09±0,18	1,14±0,24	1,04±0,09
<i>c</i> -9, <i>t</i> -11 C _{18:2}	0,73±0,06	0,64±0,04	0,63±0,10	0,72±0,03	0,75±0,10	0,74±0,11
SFA ²	58,87±1,60	59,73±2,07	60,82±1,42	54,79±1,33	55,29±2,00	55,68±0,44
MUFA	33,19±1,05	32,59±1,55	31,45±1,07	35,76±0,95	35,19±1,72	34,72±1,22
PUFA	7,42±0,42	7,13±0,48	7,08±1,00	8,43±0,55	8,75±0,74	8,62±0,75
SCFA	7,24±1,09	6,45±0,19	6,31±0,35	6,58±0,45	6,21±0,66	5,91±0,25
MCFA	16,52±0,3	17,24±0,6	45,49±1,01	16,85±0,62	17,03±1,08	42,17±0,74
LCFA	76,48±0,97	76,73±0,54	49,11±1,17	76,50±0,72	76,75±1,3	52,91±0,63
Total <i>trans</i>	4,12±0,20	3,97±0,06	4,41±0,52	4,67±0,39	4,33±0,27	5,13±0,6
Total CLA	0,93±0,15	0,72±0,09	0,85±0,27	0,93±0,06	0,96±0,13	1,14±0,46

¹Fermented = fermented milk. ²SFA = saturated fatty acids, MUFA = monounsaturated fatty acids, PUFA = polyunsaturated fatty acids, SCFA = short chain fatty acids, MCFA = medium chain fatty acids, LCFA = long chain fatty acids.

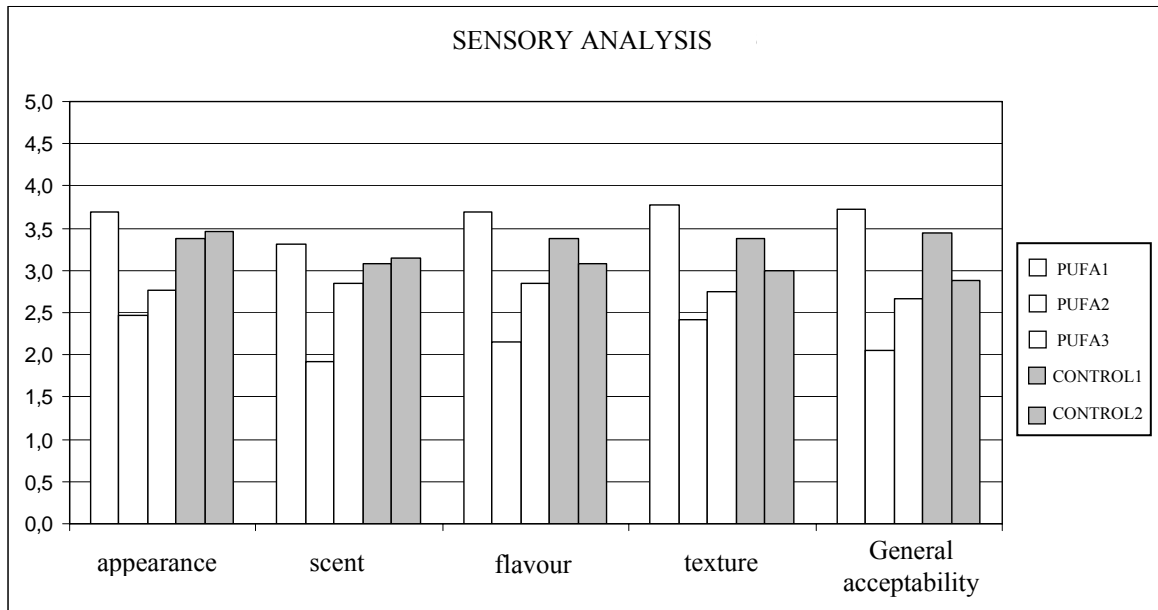
Table 2. Effect of the fermentative process in the CLA distribution of cheese compared with the FA profile of raw milk

CLA, % total CLA	Control		PUFA-enriched	
	Milk	Cheese	Milk	Cheese
12t,14t	0,67±0,17	0,97±0,37	0,36±0,11	0,30±0,05
11t,13t	1,41±0,49	1,74±0,42	2,85±0,42	2,81±0,35
10t,12t	1,36±0,95	1,36±0,23	4,04±0,78	3,99±0,35
9t,11t	0,85±0,61	1,61±0,23	0,77±0,22	0,72±0,04
8t,10t	0,42±0,26	0,33±0,08	1,1±0,45	1,41±0,11
7t,9t	0,50±0,12	0,57±0,09	0,21±0,1	0,16±0,02
12c,14t	0,88±1,15	1,13±0,52	4,13±0,94	4,06±0,48
11t,13c	0,90±0,51	1,1±0,35	2,14±0,4	2,22±0,24
10t,c12	1,56±0,16	1,44±0,18	1,29±0,17	1,39±0,09
9c,11t	82,2±2,87	81,7±1,04	74,9±2,15	74,6±1,2
8t,10c	0,79±0,36	0,37±0,13	0,53±0,27	0,41±0,14
7t,9c	7,84±0,51	7,29±0,56	6,93±0,44	7,05±0,21
Total t,t	5,78±1,43	6,62±0,85	9,92±1,24	9,76±0,69
Total c,t-t,c	94,2±1,43	93,1±0,84	90,1±1,24	89,9±0,79

Furthermore, the fermentative process was shorter in PUFA-enriched than in control fermented milk (Figure 1). The time required to reach pH 4.5 for control was 9.5 h and it was reduced to 8 h for PUFA-enriched fermented milk. The PUFA-enriched fermented milk had higher content of *S. thermophilus* (1.3×10^8 cfu mL⁻¹) in the final product in relation to control fermented milk (4.0×10^7 cfu mL⁻¹). Viable counts of *B. lactis* were also higher in PUFA-enriched (1.6×10^6 cfu mL⁻¹) than in control fermented milk (6.0×10^5 cfu mL⁻¹). However, *L. acidophilus* counts were similar in control and PUFA-enriched fermented milks (2.0×10^6 cfu mL⁻¹ and 3.9×10^6 cfu mL⁻¹, respectively).

Sensory analysis of the fermented milks following the triangle test procedure (Figure 2) showed no significant differences between control and PUFA-enriched fermented milks. This suggests that increasing PUFA content of milk did not influence the organoleptical characteristics of the product. However, it must be taken into account that for having stable enriched milk products it is necessary to increase the amount of vitamin E in the cows ration in order to prevent further oxidation of PUFA.

Figure 2. Sensory analysis of fermented milk by the triangle test (ISO, 2004).



Conclusions

These results suggest that the use of PUFA-enriched milk to manufacture milk products such as fermented milk and cheese is viable. The fermentation process of PUFA-enriched milk did not modify the FA profile, reduced the time required to reach pH of 4.5, and increased the number of viable bacteria in the final product.

ANEXO 2

PNT: Preparación de la muestra para la determinación de ácidos grasos de cadena larga en líquido ruminal mediante cromatografía de gases

1. Introducción

Este documento describe el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para la preparación de las muestras para la determinación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (ver Tabla 1) en líquido ruminal (LR). Esta PNT se basa en el método de Sukhija y Palmquist (1988) con modificaciones de Palmquist y Jenkins (2003). Esta técnica no es apta para determinar isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) en muestras de LR.

2. Ámbito de aplicación

El procedimiento que se describe se desarrolla en el Servicio de Digestión y Fermentación Ruminal (SDFR) del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Las muestras sobre las que se realiza esta determinación son de LR liofilizado.

3. Definiciones

AGCL: ácidos grasos de cadena larga

CLA: ácido linoleico conjugado

LR: líquido ruminal

4. Cualificación del personal

El personal del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos que tenga como mínimo el nivel de cualificación D según la clasificación descrita en el capítulo 6 del Manual de Calidad del Departamento.

5. Responsabilidades

- 5.1. Los usuarios que realicen esta técnica son responsables de leer este PNT, firmar en el registro de lectura de éste y trabajar correctamente y con precaución.
- 5.2. El técnico del servicio es responsable de la redacción de este PNT y ha sido asignado por el responsable del proyecto o director del servicio donde se desarrolla y se le reconoce el conocimiento del método. Además debe procurar que el personal que lo utilice esté capacitado y conozca el PNT.
- 5.3. El responsable del proyecto es el responsable de la aprobación de este PNT y de su difusión entre los miembros del grupo que vayan a seguirlo. Además es responsable de colaborar con el técnico del Servicio en mantener el PNT actualizado.
- 5.4. La *Unitat de Garantia de Qualitat* (UGQ) es responsable de verificar el cumplimiento de este PNT mediante inspecciones.

6. Nivel de riesgo

Existe **riesgo químico** asociado al uso de cloruro de acetilo que es muy corrosivo. Para evitar el riesgo provocado por el contacto con esta sustancia, es preciso realizar todas las acciones dentro de la campana de extracción con la utilización de guantes y máscara de protección.

7. Descripción del proceso

7.1. Material

- Vasos de precipitados de 100-250 ml, 1000 ml
- Matraces aforados de 100 ml
- Probeta de 100 ml
- Pipetas Pasteur
- Viales de 1,5 ml
- Encapsulador
- Zapatilla de cristal
- Tubos de tapón de rosca teflonado (10 ml, 30 ml)

7.2. Equipos

- Balanza analítica de 4 decimales (CAA6014)
- Balanza analítica de 1 decimal
- Agitador magnético
- Pipetas automáticas de 1 ml y 5 ml
- Pipetas de vidrio de 2 ml y 10 ml
- Baño de agua
- Centrífuga refrigerada Hettich (CAA 6036) o similar
- Cromatógrafo de gases
- Vórtex

7.3. Reactivos

- Metanol (CH_3OH) (I-104)
- Cloruro de acetilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}$) (I-103)
- Benceno (C_6H_6) (I-301)
- Ácido nonadecanoico (C19) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA)
- n-Heptano (C_7H_{16}) (I-202)
- Carbonato potásico (K_2CO_3) (T-408)
- Sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) (X-373)
- Carbón activo (C) (X-454)
- Agua destilada

7.3.1. Preparación de soluciones

7.3.1.a. Preparación de la solución de cloruro de metilo (10%)

Poner en un vaso de precipitados:

- Metanol 100 ml

Poner el agitador magnético

Mientras el metanol está en agitación constante, añadir muy lentamente, gota a gota, 20 ml de cloruro de acetilo. Transvasar a un bote herméticamente cerrado y conservar en la nevera a 4°C.

7.3.1.b. Preparación del estándar interno (2 mg/ml)

- a) Pesar 200 mg de ácido nonadecanoico (C_{19:0}) en la zapatilla de cristal. Registrar el peso con 4 decimales.
- b) Pasar al matraz aforado de 100 ml lavando la zapatilla con benceno.
- c) Enrasar a 100 ml con benceno.
- d) Conservar en la nevera a 4°C máximo 15 días hasta su utilización, en un bote herméticamente cerrado para evitar la evaporación del benceno.

7.3.1.c. Preparación de carbonato potásico (6%)

Poner en un vaso de precipitados:

- Carbonato potásico 6 g
- Agua destilada 50 ml

Poner el agitador magnético

Enrasar a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado.

7.4. Derivatización de las muestras

- a) Pesar 0,5 g de la muestra de LR liofilizada en tubos de tapón de rosca teflonado de 30 ml por duplicado. Registrar el peso con 4 decimales.
- b) Añadir 2 ml del estándar interno (4 mg de ácido nonadecanoico) a cada tubo con una pipeta de cristal (lentamente, evitando que toque las paredes).
- c) Añadir 3 ml de cloruro de metilo al 10% (lentamente, evitando que toque las paredes).
- d) Cerrar bien los botes y mezclar en el vórtex a baja velocidad para evitar que el material suba más de 2 o 3 cm del fondo del bote.
- e) Calentar en baño de agua a 90°C durante 2 h.
- f) Enfriar en baño de hielo.
- g) Añadir 1 ml de heptano y 10 ml de carbonato potásico al 6%.
- h) Mezclar vigorosamente los tubos durante mínimo 3 minutos.
- i) Centrifugar a $1,062 \times g$ durante 10 min a 20°C.
- j) Extraer la fracción del heptano (banda superior) con pipeta Pasteur y transferirla a un tubo de tapón de rosca teflonado de 10 ml.

- k) Añadir 1 g de sulfato sódico anhidro y 1 g de carbón activo al tubo de 10 ml.
- l) Cerrar bien los botes y mezclar en el vórtex a velocidad alta.
- m) Centrifugar a $1,062 \times g$ durante 10 min a 20°C.
- n) Recuperar el heptano limpio con pipeta Pasteur y transferir a un vial de 1,5 ml.
- o) Congelar los viales hasta el momento de su análisis.

7.5. Condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases

Las condiciones de trabajo del cromatógrafo que determinará las concentraciones de los metil ésteres de AG de muestras de LR liofilizado y derivatizado preparadas según lo descrito en este PNT son:

Cromatógrafo	GC-6890, Agilent
Columna	Modelo CP-Sil-88 (100 m x 0,25 mm x 0,2 μ m), Varian
Pre-columna	Modelo:: Guard Column Tracsil (5 m x 0,32 mm), Marca: Teknokroma Temperatura inicial: 150°C Tiempo inicial: 2 min
Rampas de temperatura	1°C/min hasta 158°C y mantener 28 min 1°C/min hasta 200°C y mantener 5 min 20°C/min hasta 225°C y mantener 15 min Tiempo total de análisis: 101,25 min
Inyector	Volumen de inyección: 2 μ l (0,2 μ l para muestras muy concentradas) Modo de inyección: split 50:1 Temperatura inyector: 250°C Presión: 23,21 psi Gas portador: hidrógeno Flujo de gas portador: 1,0 ml/min Velocidad media gas portador: 26 cm/s Temperatura FID: 280°C
Detector	Flujo de H ₂ del detector: 30 ml/min Flujo de aire del detector: 400 ml/min Flujo de N ₂ (makeup): 25 ml/min

7.6. Metil ésteres de AG identificados en muestras de LR y tiempos de retención

En las condiciones descritas en el apartado 7.5 se detectaron los metil ésteres de AGCL descritos a continuación con sus tiempos de retención:

T retención (min)	Ácido graso	Nombre abreviado
9,4	Caprílico	C _{8:0}
10,9	Cáprico	C _{10:0}
12,1	Undecanoico	C _{11:0}
13,5	Láurico	C _{12:0}
15,5	Tridecanoico	C _{13:0}
18,2	Mirístico	C _{14:0}
21,3	Miristoleico	C _{14:1}
21,7	Pentadecanoico	C _{15:0}
25,8	cis-10-Pentadecenoico	C _{15:1}
26,5	Palmítico	C _{16:0}
30,8	Palmitoleico	C _{16:1}
32,8	Heptadecanoico	C _{17:0}
38,5	cis-10-Heptadecenoico	C _{17:1}
41,3	Esteárico	C _{18:0}
44,8	Elaidico	C _{18:1n9t}
45,1	Trans-10-octadecenoico	C _{18:1n10t}
45,3	Trans-11-octadecenoico	C _{18:1n11t}
46,4	Oleico	C _{18:1n9c}
47,1	Vaccénico	C _{18:1n11c}
50,1	Nonadecanoico (patrón interno)	C _{19:0}
50,9	Linoelaidico	C _{18:2n6t}
54,1	Linoleico	C _{18:2n6c}
57,7	Araquídico	C _{20:0}
59,3	Gamma-linolénico	C _{18:3n6}
62,0	Cis-11-eicosenoico	C _{20:1}
62,3	Linolénico	C _{18:3n3}
63,9	Cis-9,trans-11-octadecadienoico (CLA) ⁽¹⁾	C _{18:2n9c,11t}
65,0	Trans-10,cis-12- octadecadienoico (CLA) ⁽¹⁾	C _{18:2n10t12c}
65,2	Heneicosanoico	C _{21:0}
68,8	Cis-11,14-eicosadienoico	C _{20:2}
72,2	Behénico	C _{22:0}
73,4	Cis-8,11,14-eicosatrienoico	C _{20:3n6}
75,9	Erúcido	C _{22:1n9}
76,2	Cis-11.14-17-eicosatrienoico	C _{20:3n3}
76,9	Araquidónico	C _{20:4n6}
78,7	Tricosanoico	C _{23:0}
81,9	Cis-13,16-docosadienoico	C _{22:2}
84,4	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA)	C _{20:5n3}
85,3	Lignocérico	C _{24:0}
87,5	Nervónico	C _{24:1}
95,6	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA)	C _{22:6n3}

⁽¹⁾La identificación de estos metil ésteres no se ha podido confirmar.

8. Residuos

Los residuos que se generen, así como los viales que retornan del SAQ, por contener líquidos inflamables, deben ser depositados en envases identificados para su posterior eliminación.