

# Contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche de ganado lechero Holstein estabulado en el noroeste de México

## Conjugated linoleic acid (CLA) content in milk from confined Holstein cows during summer months in northwestern Mexico

Alfonso Martínez-Borraz<sup>a</sup>, Silvia Yolanda Moya-Camarena<sup>a</sup>, Humberto González-Ríos<sup>b</sup>, Jesús Hernández<sup>a</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>a</sup>

### RESUMEN

Estudios en animales experimentales señalan que el ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés), posee propiedades benéficas para la salud. Los productos derivados de rumiantes como carne y leche son la mayor fuente natural de CLA, y su contenido en leche puede ser influenciado por varios factores como la alimentación y el sistema de producción. Este trabajo evaluó el contenido de CLA en leche de vacas Holstein estabuladas en el municipio de Hermosillo, Sonora durante el verano, donde se registran temperaturas superiores a los 40 °C. Se obtuvieron muestras de leche de 120 vacas. El perfil de ácidos grasos y CLA en leche fueron determinados por cromatografía de gases. La producción promedio de leche fue  $15.8 \pm 0.5$  kg/día; con  $1.91 \pm 0.06$  % de grasa;  $4.30 \pm 0.2$  % de lactosa;  $3.34 \pm 0.03$  % de proteína, y de  $10.4 \pm 0.09$  % de sólidos totales. El contenido de ácidos grasos insaturados fue mayor ( $P < 0.05$ ) en agosto, respecto a los meses de junio y julio. La concentración promedio del isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA encontrada fue de 9.36 mg/g de grasa (junio  $10.78 \pm 0.41$ , julio  $8.50 \pm 0.37$  y agosto  $10.16 \pm 0.39$ ), considerada alta y equiparable a lo reportado en otros países con clima templado. La cantidad de CLA en leche puede ser atribuida a la dieta por la presencia del 58.8 % de alfalfa, rica en ácidos grasos precursores del CLA (linoleico y linolénico) durante el verano.

**PALABRAS CLAVE:** CLA, Leche de vaca, Temperatura ambiente.

### ABSTRACT

Experimental animal studies suggest that conjugated linoleic acid (CLA) has beneficial health properties. Ruminant-derived products such as meat and milk are the principal natural sources of CLA. Milk CLA content is influenced by several factors, including diet and production system. An evaluation was done of CLA content in milk from confined Holstein cows at a farm in Hermosillo municipality, Sonora State, Mexico, during the summer months, when daytime temperatures surpass 40 °C. Milk samples were collected from 120 cows. Quality parameters such as fat, lactose, protein and total solids percentages were measured using AOAC methods. The fatty acid and CLA profile was generated by gas chromatography. Average milk production was  $15.8 \pm 0.5$  kg/day, fat content was  $1.91 \pm 0.06$  %, lactose content was  $4.30 \pm 0.2$  %, protein content was  $3.34 \pm 0.03$  % and total solids content was  $10.4 \pm 0.09$  %. Unsaturated fatty acids content was higher ( $P < 0.05$ ) in August than during June and July. Average *cis*-9, *trans*-11 CLA concentration was 9.36 mg/g fat ( $10.78 \pm 0.41$  in June;  $8.50 \pm 0.37$  in July; and  $10.16 \pm 0.39$  in August), which is high compared to concentrations reported in countries with a temperate climate. The relatively high CLA content observed in the present study was probably caused by the 58.8 % alfalfa content in the summer diet, since this legume is rich in CLA fatty acids precursors (linoleic and linolenic acid).

**KEY WORDS:** Conjugated linoleic acid, Cows milk, High ambient temperature.

### INTRODUCCION

La leche de vaca tiene un alto valor nutricional debido a que su contenido de aminoácidos es cercano al

### INTRODUCTION

Cow's milk is highly nutritious because its amino acid profile is near the ideal requirements for

Recibido el 6 de octubre de 2009. Aceptado para su publicación el 7 de abril de 2010.

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición y Metabolismo, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Carretera a la Victoria Km. 0.6, Apdo. Postal No. 1735, 83000 Hermosillo, Sonora México. Teléfono + 52 662 2892400 Fax + 52 662 2800094; pinelli@ciad.mx. Correspondencia al quinto autor.

<sup>b</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, CIAD.

ideal requerido por los humanos. Es también fuente primaria de vitaminas incluyendo las B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, riboflavina, niacina, y minerales como zinc, fósforo y calcio<sup>(1-2)</sup>. Además la leche de vaca contiene del 2 al 5 % de lípidos con 70 % de ácidos grasos saturados y 30 % de insaturados<sup>(3)</sup>. Dentro de los ácidos grasos se encuentra el ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés), el cual ha despertado el interés de investigadores por sus propiedades potencialmente benéficas para una buena salud humana, como en la prevención de la aterosclerosis, el cáncer, reducción de la hipertensión arterial, mejorar la mineralización de huesos, la sensibilidad a insulina y la respuesta inmune<sup>(2,4-10)</sup>.

El acrónimo CLA es usado para referirse a una mezcla de isómeros geométricos y posicionales de ácido linoleico. Dos isómeros resaltan por su importancia biológica, el *cis*-9, *trans*-11, que típicamente representa del 80 al 90 % del total de CLA y el *trans*-10, *cis*-12 que está en concentraciones del 3 a 5 % en la leche de vaca<sup>(11-12)</sup>. Kramer *et al.*<sup>(13)</sup> propusieron usar el nombre "ácido ruménico" para diferenciar al isómero *cis*-9, *trans*-11 de los otros isómeros

Hasta hace pocos años se pensaba que el CLA sólo se producía por la biohidrogenación del ácido linoleico en el rumen, catalizada por la enzima linoleato isomerasa de la bacteria *Butirivibrio fibrisolvens*. Actualmente se sabe que el CLA presente en la grasa láctea tiene dos orígenes; una fracción procede de la biohidrogenación de ácido linoleico en el rumen y la otra se sintetiza de manera endógena en la glándula mamaria por acción de la enzima  $\Delta^9$  desaturasa. Ésta, sintetiza el CLA a partir de ácido vaccénico, el cual es otro intermediario de la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados como linoleico y linolénico en su ruta hacia su conversión en ácido esteárico en el rumen<sup>(2,4)</sup>.

La síntesis endógena determina la concentración de CLA en la leche, debido a que es en la glándula mamaria donde se sintetizan del 80 al 90 % del total de estos ácidos grasos<sup>(4,14)</sup>. En ciertas condiciones, tales como una tasa de flujo del rumen

humans. It is also a source of vitamins B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, riboflavin and niacin, as well as minerals such as zinc, phosphorous and calcium<sup>(1-2)</sup>. Milk contains from 2 to 5 % fats, with 70 % of these being saturated fatty acids and 30 % unsaturated<sup>(3)</sup>. Among these fatty acids is conjugated linoleic acid (CLA), which is of increasing research interest due to its potential health benefits in humans, including prevention of atherosclerosis and cancer, reduction of arterial hypertension, enhancement of bone mineralization, insulin sensitivity and immune response<sup>(2,4-10)</sup>.

The CLA acronym refers to a mixture of geometric and positional linoleic acid isomers. Two isomers that stand out for their biological importance are *cis*-9, *trans*-11, which accounts for 80 to 90 % of CLA in cows milk, and *trans*-10, *cis*-12, which occurs in 3 to 5 % concentrations<sup>(11-12)</sup>. Kramer *et al.*<sup>(13)</sup> proposed the name rumenic acid to differentiate *cis*-9, *trans*-11 from other isomers.

Until recently CLA was thought to be produced only via biohydrogenation of linoleic acid in the rumen, catalyzed by the linoleate isomerase enzyme of the bacteria *Butirivibrio fibrisolvens*. It is now known that CLA in milk fat has two sources, one fraction comes from biohydrogenation of linoleic acid in the rumen and another from endogenous synthesis in the mammary gland by the  $\Delta^9$ -desaturase enzyme. This enzyme synthesizes CLA from vaccenic acid, which is another intermediary in ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids, such as linoleic and linolenic acid, which are converted to stearic acid in the rumen<sup>(2,4)</sup>.

Endogenous synthesis determines milk CLA concentration because 80 to 90 % of CLA is synthesized in the mammary gland<sup>(4,14)</sup>. Under conditions such as increased rumen flow rate, vaccenic acid escape from the rumen can increase and affect final milk fat CLA concentration. A number of factors can alter the vaccenic acid proportion in the rumen: production system; feed type, animal breed and use of dietary additives<sup>(2,12)</sup>. Milk production, lactation stage and season are additional factors that have received less attention, or much of the research addressing them has been

umentada, se incrementa la porción de escape de ácido vaccénico del rumen y repercute en la concentración final de CLA en la grasa láctea. Existen varios factores que son capaces de alterar la porción de ácido vaccénico que se forma en el rumen, entre estos se pueden mencionar: el sistema de producción, el tipo de alimentación de las vacas, la raza y el uso de aditivos en la dieta<sup>(2,12)</sup>, el nivel de producción de leche, etapa de lactancia y época del año, siendo estos tres últimos factores los menos estudiados, o bien información obtenida en países como Inglaterra, Alemania, Holanda y en Estados Unidos, en donde los niveles de producción de leche, los sistemas producción, la alimentación y el clima son muy diferentes a los que se encuentran en México.

Por lo que en el presente estudio se evaluó el contenido de CLA en la leche de vacas Holstein estabuladas, en condiciones de producción comercial en un establo comercial del municipio de Hermosillo, Sonora durante el verano. Se cuantificó el contenido de ácidos grasos en leche de vacas Holstein incluyendo el isómero *cis*-9, *trans*-11-CLA y se evaluaron los parámetros generales de calidad de leche (producción de leche, porcentajes de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales) durante el verano, cuando la temperatura ambiente llega a alcanzar hasta 45 °C.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en un establo comercial ubicado en la Costa de Hermosillo, localizado a 28° 52' 57.75" N y 111° 18' 46.32" O, durante junio, julio y agosto en los cuales se registraron temperaturas superiores a los 40 °C. El promedio de humedad relativa fue de 50 % a lo largo del año y la precipitación promedio fue de 180 milímetros en el 2006. El establo cuenta con aproximadamente 570 vacas en producción de la raza Holstein. Se incluyeron en el estudio 120 vacas con un rango de pariciones de 1 a 6, y se excluyeron las vacas enfermas con mastitis, y vacas con más de 300 días de lactancia.

La dieta se formuló usando el Cornell-Penn-Miner Dairy model (Cuadro 1)<sup>(15)</sup>. La cantidad de muestra

done in countries such as England, Germany, the Netherlands and the United States, where milk production levels, production systems, feed and climate are quite different from those commonly found in Mexico.

The present study objective was to evaluate CLA content in milk from confined Holstein cows during summer months at a commercial dairy farm in Hermosillo municipality, Sonora, Mexico. Fatty acid content was quantified, including the *cis*-9, *trans*-11-CLA isomer, and general milk quality parameters (i.e. milk production, fat, protein, lactose and total solids percentages) evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

Study site was a commercial dairy farm in Hermosillo municipality, Sonora, Mexico, located on the coast (28° 52' 57.75" N; 111° 18' 46.32" W). The study period included the summer months of June, July and August, during which daytime temperatures are frequently above 40 °C. Average annual relative humidity (RH) in the region is 50% and average rainfall for 2006 was 180 mm. Of the 570 Holstein cows at the farm, 120 were included in the study, with range of parity was 1-6; animals with mastitis and those with more than 300 d lactation were excluded.

The diet was formulated using the Cornell-Penn-Miner Dairy model (Table 1)<sup>(15)</sup>. Daily milk samples of 100 ml were collected directly from each cow in the milking area, with 50 ml collected in the morning (0400) and 50 ml in the afternoon (1600). Samples were kept in cold storage until transported to the laboratory. The two 50 ml samples from the same day and animal were mixed, homogenized and separated into two 50 ml aliquots and then frozen at -20 °C until analysis. One fraction was used to measure general milk quality parameters (e.g. fat, protein, lactose and total solids percentages) and the other to identify and quantify fatty acids.

Following routine procedures at the sampled farm, milk production was measured on the last day of each month using a milk meter (Waikato MKV,

recolectada fue de 100 ml de leche por vaca, y se tomó directamente en la sala de ordeña, 50 ml durante la ordeña de la mañana (0400) y los 50 ml restantes en la segunda ordeña (1600). Las muestras se almacenaron en frío para su transporte hasta el laboratorio. Las muestras de ambas ordeñas se mezclaron, homogenizaron y se separaron en dos alícuotas de 50 ml que se congelaron a una temperatura de -20 °C hasta su análisis. Una de las fracciones se utilizó para medir los parámetros generales de calidad de la leche como son los porcentajes de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales. La otra fracción se utilizó en el proceso de identificación y cuantificación de ácidos grasos.

La producción de leche se midió usando un medidor de leche (Waikato MKV milk meter, Milking Systems, NZ), en el último día del mes, establecido como rutina en el establo. Además, se obtuvieron muestras de alimento y se registraron los días en leche de cada vaca. La composición química de la dieta fue analizada en el laboratorio Agro LAB México S A. de CV. (Gómez Palacio, México).

En el alimento los lípidos totales se extrajeron con cloroformo/metanol (2:1, vol/vol)<sup>(16)</sup>, mientras que en la leche se extrajeron con hexano/isopropanol (3:2 vol/vol) por gramo de grasa, seguido de 12 ml de sulfato de sodio<sup>(17,18)</sup>.

Los ácidos grasos metilados (FAME por sus siglas en inglés) se prepararon en base al método oficial AOAC<sup>(19)</sup>. Los FAME se indentificaron y cuantificaron por cromatografía de gases usando un cromatógrafo Varian Star 3400 CX (VARIAN Inc, Walnut Creek, CA), con una columna capilar DB-23 de 30 m x 0.25 m (J & W Scientific, Folsom, CA). Se utilizó helio como gas acarreador. La separación de los ácidos grasos se realizó con una serie de etapas de temperatura: la inicial fue de 50 °C y se mantuvo un minuto, después se incrementó a razón de 10 °C/min hasta llegar a 166 °C. Posteriormente un nuevo incremento de 1 °C/min hasta los 174 °C; luego de 2 °C/min hasta los 194 °C. La última etapa fue con incrementos de 3.5 °C/min hasta llegar a los 215 °C, una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo durante 6 min. El tiempo total de corrida fue de 42.6 min.

Cuadro1. Ingredientes y composición química de las raciones<sup>1</sup>

Table 1. Feed ingredients and chemical composition<sup>1</sup>

Ingredients	kg/day	% DB
<i>Concentrate</i>	8.80	41.13
- Corn meal	5.46	25.49
- 47% Protein soy	1.20	5.59
- Soya 70	0.62	2.91
- Vitamins & minerals	0.48	2.08
- Fats mixture <sup>2</sup>	0.40	1.85
- Cane molasses	0.66	3.07
Alfalfa	12.6	58.87
F:C <sup>3</sup>		59:41
<i>Chemical composition</i>		
Crude protein		18.12
Neutral detergent fiber		27.76
Acid detergent fiber		21.22
Ether extract		5.10
Calcium		0.85
Phosphorous		0.46
LNE <sup>4</sup> (Mcal/kg DM)		1.72
<i>Dietary fatty acids<sup>5</sup></i>		
		%
Lauric C12:0		0.78
Myristic C14:0		0.77
Palmitic C16:0		20.04
Stearic C18:0		5.70
Oleic C18:1 <i>cis</i> -9		26.15
Linoleic C18:2		37.21
Linolenic C18:3		9.35

<sup>1</sup> Values calculated in dry base (DB).

<sup>2</sup> Animal and vegetal source fats.

<sup>3</sup> Forage:concentrate ratio.

<sup>4</sup> Lactation net energy in megacalories per kilogram dry matter.

<sup>5</sup> Dietary fatty acids were calculated as a percentage of methylated fatty acids.

Milking Systems, NZ), and the number of days in milk per cow recorded. Feed samples were taken and feed chemical composition analyzed by Agro Lab México S A. de CV. (Gómez Palacio, Durango, Mexico).

Milk composition (fats, protein, lactose and total solids) was analyzed with infrared spectrophotometry.

La identificación del perfil de ácidos grasos se realizó mediante el uso de estándares externos (FAME Mix C4-C24, Supelco) mientras que para los isómeros de CLA *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 se utilizaron estándares individuales de la marca Matreya con 98 % de pureza (Matreya, Inc., PA). La composición de la leche (grasa, proteína, lactosa y sólidos totales) fueron cuantificados por espectrometría infrarroja (Milkoscan Minor FT120).

El índice de desaturación se calculó de acuerdo a lo reportado para cuatro pares de ácidos grasos que representan los productos y sustratos de la  $\Delta^9$ -desaturasa<sup>(20)</sup>. Esos pares de ácidos grasos fueron *cis*-9 14:1/14:0, *cis*-9 16:1/16:0, *cis*-9 18:1/18:0, y *cis*-9, *trans*-11 CLA/*trans*-11 18:1. El índice de desaturación se define como: [producto de  $\Delta^9$ -desaturasa]/[producto de la  $\Delta^9$ -desaturasa + sustrato de  $\Delta^9$ -desaturasa]<sup>(20)</sup>.

Los datos del perfil de ácidos grasos y CLA, se analizaron mediante un análisis de varianza por medio del procedimiento PROC MIXED del programa SAS<sup>(21)</sup>. El modelo incluyó como efectos fijos a: mes de muestreo, y como efectos aleatorios a la producción de leche y a los días en leche con efecto lineal y cuadrático, y como error residual al animal. Se estimaron significancias a un nivel de probabilidad en el error de 0.05. El modelo se describe a continuación:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_j + C_k + D_l + E_m + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde  $Y_{ijklm}$  es la variable de respuesta (contenido de ácidos grasos),  $B_j$  mes,  $C_k$  día en leche,  $D_l$  días en leche cuadrática,  $E_m$  producción de leche, y  $\varepsilon_{ijklm}$  error residual. La comparación de medias se hizo por el procedimiento LSMEANS/PDIFF de SAS<sup>(21)</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el verano de 2006 (junio-agosto) la temperatura promedio mínima en la Costa de Hermosillo fue de 25 °C, con temperaturas máximas superiores a 40 °C durante varias horas del día. La humedad relativa promedio fue de 40, 55 y 60 % para los meses de junio, julio y agosto, respectivamente.

Total lipids in the feed were extracted with chloroform/methanol (2:1, vol/vol)<sup>(16)</sup>, while in the milk they were extracted with hexane/isopropanol (3:2 vol/vol per gram fat) followed by 12 ml sodium sulphate<sup>(17,18)</sup>.

Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared using the official AOAC method<sup>(19)</sup>. They were identified and quantified by gas chromatography with a Varian Star 3400 CX chromatographer (Varian Inc., Walnut Creek, CA) fitted with a 30 m x 0.25 m DB-23 capillary column (J & W Scientific, Folsom, CA) and using helium as carrier gas. Separation of fatty acids was done using a 42.6 min total run time with a series of temperature stages: initial phase 50 °C for 1 min; 10 °C/min increases up to 166 °C; 1 °C/min increases up to 174 °C; 2 °C/min increases up to 194 °C; 3.5 °C/min increases up to 215 °C; 215 °C for 6 min. A fatty acid profile was generated using external standards (FAME Mix C4-C24, Supelco), while 98% pure individual standards (Matreya, Inc., PA) were used to identify the CLA isomers *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12.

The desaturase index was calculated based on four fatty acid pairs representing  $\Delta^9$ -desaturase products and substrates<sup>(20)</sup>: *cis*-9 14:1/14:0; *cis*-9 16:1/16:0; *cis*-9 18:1/18:0; and *cis*-9, *trans*-11 CLA/*trans*-11 18:1. This index is defined as [ $\Delta^9$ -desaturase product]/[ $\Delta^9$ -desaturase product +  $\Delta^9$ -desaturase substrate]<sup>(20)</sup>.

Fatty acid and CLA profile data were analyzed using a variance analysis with the PROC MIXED tool of the SAS statistics package<sup>(21)</sup>. Significances were estimated using a 0.05 error probability level. The model included the fixed effect of sampling month; the random effects of milk production and days in milk with a linear and quadratic effect; and a residual error of animal. The model equation is:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_j + C_k + D_l + E_m + \varepsilon_{ijklm}$$

Where  $Y_{ijklm}$  is the response variable (fatty acid content);  $B_j$  is month;  $C_k$  is days in milk;  $D_l$  is days in milk quadratic;  $E_m$  is milk production; and  $\varepsilon_{ijklm}$  is the residual error. Comparison of means

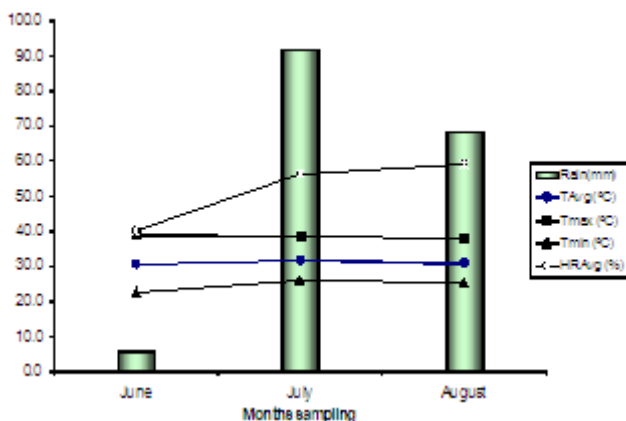
Las variaciones en la humedad relativa se debieron a la presencia de lluvia principalmente en los meses de julio y agosto con 92 y 68 milímetros respectivamente (Figura 1). El verano de 2006 fue particularmente lluvioso con 166.2 milímetros, debido a que la precipitación pluvial histórica promedio para verano fue de 68 milímetros entre los años 2000 y 2005 registrados en la misma estación meteorológica. Es importante señalar que en este estudio las vacas estuvieron expuestas a todos los elementos meteorológicos como son: la radiación solar, lluvia y viento, los cuales pueden tener efectos negativos o positivos en la conducta y nivel de producción de las vacas, dependiendo de su intensidad y duración.

*Nivel de producción*

La producción de leche fue variable (de 13.4 a 18.7 L/vaca/d), con un promedio de 15.8 L (Cuadro 2), lo que coincide con otros trabajos realizados en el sur de Estados Unidos, donde reportan que la producción de leche en verano es baja comparada con la producida en invierno<sup>(22)</sup>, asociada con las altas temperaturas ambientales, las cuales normalmente rebasan los 40 °C en algunas horas del día, provocando estrés calórico en las vacas<sup>(23)</sup>.

Figura 1. Temperaturas promedio (TP), máxima (Tmax), mínima (Tmin), humedad relativa (HR) y lluvia acumulada en verano

Figure 1. Average (TA), maximum (Tmax) and minimum (Tmin) temperatures, relative humidity (RH) and cumulative rainfall during study period



was done using the LSMEANS/PDIFF tool in the SAS package<sup>(21)</sup>.

**RESULTS AND DISCUSSION**

During summer 2006 (June-August), average minimum temperature in the study area was 25 °C while daytime temperatures were above 40 °C for a number of hours. Relative humidity (RH) was 40 % in June, 55 % in July and 60 % in August. Variations in RH were caused by rain during July (92 mm) and August (68 mm)(Figure 1). Rainfall during summer 2006 was an unusually high 166.2 mm, over double the 68 mm average for 2000 to 2005 recorded at the same meteorological station. The cows were exposed to solar radiation, rain and wind during the study period, which, depending on their intensity and duration, can have either negative or positive effects on milk production and behavior in cows.

*Production level*

Milk yield was variable (13.4 to 18.7 L/cow/d), with a 15.8 L average (Table 2). This agrees with production reports from the southern United States which indicate that summer production is lower than winter production<sup>(22)</sup>, largely due to heat stress from high temperatures (> 40 °C)<sup>(23)</sup>.

Milk yield depends to a great degree on diet quality and composition, as well as feed intake. Nonetheless, temperatures higher than 25 °C cause a reduction in feed intake and a consequent, indirect decrease

Cuadro 2. Producción y composición de leche de vaca en los meses de verano

Table 2. Cow milk yield and composition during study period

Component	June	July	August	Average
Milk, kg/day	18.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	15.3 ± 0.8 <sup>bc</sup>	13.4 ± 0.7 <sup>c</sup>	15.8 ± 0.5
Fat, %	1.95 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.91 ± 0.06
Protein, %	3.13 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.36 ± 0.06 <sup>ab</sup>	3.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.03
Lactose, %	4.35 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.27 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.30 ± 0.02
Total solids, %	10.3 ± 0.16 <sup>b</sup>	10.5 ± 0.18 <sup>b</sup>	10.5 ± 0.16 <sup>b</sup>	10.4 ± 0.09

<sup>abc</sup> Different letter superscripts in the same row indicate significant difference (P<0.05).

La producción de leche depende en gran medida de la calidad y composición de la dieta, así como de la cantidad de alimento consumido; sin embargo, temperaturas superiores a los 25 °C causan disminución del consumo de alimento e indirectamente en la producción de leche<sup>(1,24)</sup>. El aumento en la temperatura ambiental en combinación con dietas altas en fibra detergente neutra (> 35 %) reducen el consumo de alimento y la producción de leche<sup>(25)</sup>. En el presente trabajo la temperatura promedio mínima durante la estación de verano fue de aproximadamente 25 °C, por lo que es posible asociarla con la baja producción de leche principalmente en los meses de julio y agosto.

En la Figura 2 se aprecia el comportamiento de los índices THI (Índice temperatura-humedad), en los cuales es evidente que las vacas sufren de estrés calórico en grado medio y alto durante el día y un estrés calórico ligero durante la noche. También es posible apreciar que durante el mes de agosto se obtuvieron los mayores índices y coincide con el menor promedio de producción de leche. Se ha reportado que la producción de leche disminuye 0.2 kg por cada unidad de incremento en THI, cuando éste excede 72<sup>(23)</sup>. Sin embargo, otros autores mencionan que la producción de leche disminuye 0.38 kg por cada grado Celsius que aumente la temperatura ambiente por arriba de los 18 °C<sup>(26)</sup>.

*Porcentaje de grasa en leche*

En el Cuadro 2 se observa que los porcentajes promedio de grasa durante la época estudiada son inferiores al 2 %, existiendo una amplia variabilidad (1.0 a 4.96 %), encontrados en este estudio, dentro del mismo mes. De manera similar, se reportó que el porcentaje de grasa en leche varió en un rango de 1.9 a 5.7 % para la raza Pardo Suizo y de 2 a 6.1 % para la raza Holstein, aun consumiendo la misma dieta<sup>(20)</sup>.

Los porcentajes de grasa en leche durante los meses de verano se encuentran por debajo del valor mínimo (2.6%), considerado por la SAGARPA<sup>(27)</sup>; esta variabilidad podría explicarse en parte por las altas temperaturas ambientales presentes en los meses

in milk yield<sup>(1,24)</sup>. Higher temperatures in combination with high neutral detergent fiber diets (> 35 %) can also reduce feed intake and lower milk yield<sup>(25)</sup>. Given that the minimum temperature during the study period was 25 °C, it can very possibly be associated with the observed low milk yield, particularly notable during July and August.

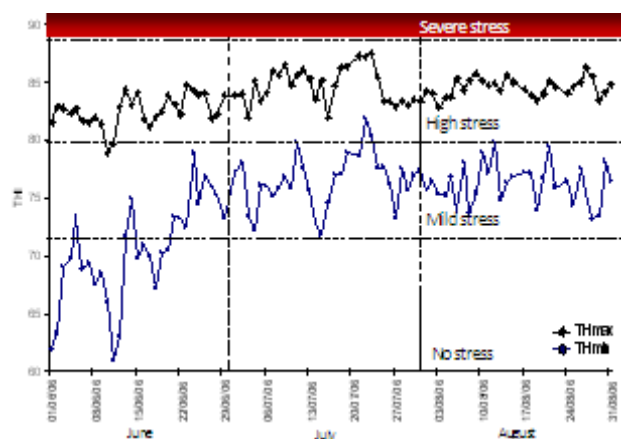
Further supporting this hypothesis is that the temperature-humidity index (THI) values during the study period showed that the cows suffered moderate to severe stress during the day and low heat stress at night (Figure 2). Indeed, the highest THI values were recorded in August, the month with the lowest average milk yield. When THI values exceed 72, milk yield decreases 0.2 kg for every unit of increase<sup>(23)</sup>. However, other authors report that milk yield decreases 0.38 kg for every Celsius degree increase above 18 °C<sup>(26)</sup>.

*Fat percentage*

Average milk fat percentage during the study period was < 2 %, although values varied widely (1.0 to 4.96 %) within the same month (Table 2). Milk fat percentage varies normally; for instance, in one

Figura 2. Comportamiento de los índices de temperatura-humedad (TH) máximos y mínimos en verano y su relación con el grado de estrés calórico en vacas

Figure 2. Maximum (THmax) and minimum (THmin) temperature-humidity index values and its relation to heat stress in dairy cows during study period



de verano ( $> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), las cuales provocan disminución en el consumo de alimento e implícitamente de la producción de leche y sus componentes<sup>(1)</sup>.

Los valores bajos en los porcentajes de grasa durante el verano también pueden estar relacionados con la disminución en la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) en el rumen. El acético y el butírico son las unidades de construcción de los ácidos grasos de cadena corta que se encuentran en leche, los cuales representan alrededor de 50 % del total de ácidos grasos en leche. La falta de fibra en la dieta o un bajo consumo de alimento pueden provocar una disminución en la formación de acetato y butirato, provocando disminución en el porcentaje de grasa en leche<sup>(28)</sup>.

#### *Porcentaje de proteína en leche*

El porcentaje promedio de proteína fue 3.34 %. En junio se produjo el porcentaje más bajo (3.13 %), aunque no hay diferencia con julio, 3.36 % pero estos meses tuvieron porcentajes menores ( $P < 0.05$ ) con respecto al mes de agosto que fue de 3.53 %. Algunos autores estudiaron el efecto del estrés calórico sobre la producción y composición de la leche y concluyeron que las vacas con estrés calórico disminuyen su producción de leche y el porcentaje de proteína<sup>(29)</sup>. Esta conclusión concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. En el caso del porcentaje de proteína, se cubre satisfactoriamente en todos los meses el valor mínimo (2.4 %) para leche de vaca estipulado por SAGARPA<sup>(27)</sup>.

#### *Porcentaje de lactosa en leche*

El porcentaje de lactosa en verano fue en promedio de 4.30 %, y no hubo variaciones significativas en sus porcentajes entre los meses estudiados. Alduist *et al.*<sup>(30)</sup> reportan que existen variaciones en la concentración de lactosa en leche, siendo menor en los meses de invierno, comparada con el verano.

#### *Porcentaje de sólidos totales en leche*

El porcentaje de sólidos totales, engloba los porcentajes de grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales y proteínas del suero. Durante los meses

study milk from Swiss Brown cows had a fat percentage ranging from 1.9 to 5.7 % whereas that from Holstein cows varied from 2 to 6.1 %, even when fed the same diet<sup>(20)</sup>. The average observed in the present study was below the minimum (2.6 %) required by the SAGARPA<sup>(27)</sup>. As mentioned above, this is probably due to the high temperatures during the study period leading to a reduction in feed intake and a consequent decrease in milk yield and milk components<sup>(1)</sup>.

Low milk fat percentages during the summer months can also be associated with a decrease in ruminal production of volatile fatty acids (i.e. acetic, propionic and butyric acids). Acetic and butyric acids are the building units for the short-chain fatty acids in milk, which account for about 50 % of total fatty acids in milk. Lack of fiber in the diet or low feed intake can cause a decrease in acetate and butyrate, leading to lower milk fat percentage<sup>(28)</sup>.

#### *Protein percentage*

Average protein content during the study period was 3.34 %, with equally ( $P > 0.05$ ) low levels in June (3.13 %) and July (3.36 %), and a high ( $P < 0.05$ ) level in August (3.53 %). This agrees with reported reductions in milk yield and protein content in cows suffering heat stress<sup>(29)</sup>. Even though the observed levels were low, they still met the minimum level (2.4 %) required by the SAGARPA<sup>(27)</sup>.

#### *Lactose percentage*

Average lactose percentage was 4.3 % with no differences between months. Alduist *et al.*<sup>(30)</sup> reported that variations do occur in lactose concentration with lower levels in the winter than in the summer.

#### *Total solids percentage*

The total solids percentage include fat, protein, lactose, vitamin, mineral and whey protein percentages. Average total solids during the study period was 10.4 %, slightly lower than the 10.6 % proposed by the SAGARPA<sup>(27)</sup>. Despite high



estudiados la cantidad de sólidos totales fue de 10.4 % ligeramente inferior al porcentaje propuesto por SAGARPA<sup>(27)</sup>, que es de 10.6 % como parámetro mínimo. A pesar de la alta variabilidad en la concentración de sólidos totales, así como en sus componentes (porcentajes de grasa, lactosa y proteína) cuantificados en este trabajo, son similares a los reportados por otros autores en diferentes sistemas de producción y alimentación<sup>(31,32)</sup>.

*Perfil de ácidos grasos y CLA*

Los niveles de significancia para cada uno de los ácidos grasos de la leche de acuerdo a los términos del modelo estadístico ajustado son presentados en el Cuadro 3. Se observa que en la mayoría de los ácidos grasos de cadena corta y media e insaturados de cadena larga, incluyendo el *cis-9, trans-11* CLA se ven afectados significativamente ( $P < 0.05$ ) por el mes. Se observó un incremento ( $P < 0.05$ ) lineal y cuadrático de la concentración de los ácidos grasos C4:0, C6:0 y C18:3 por efecto de los días en leche. El nivel de producción de leche sólo afectó a *trans-11* C18:1 y C18:2, lo que indica que los días en leche y la producción de leche son factores que no alteran la mayoría de los ácidos grasos en leche incluyendo *cis-9, trans-11*CLA. Respecto a la sumatoria de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados el mes tuvo efecto significativo ( $P < 0.05$ ). Sin embargo la sumatoria de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados no fue afectada por los días en leche en forma lineal o cuadrática, ni por el nivel de producción de leche. Mientras que en la sumatoria de los ácidos grasos poliinsaturados fue afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por la producción en leche.

La composición de ácidos grasos promedio en la leche, y el error estándar por mes se presenta en el Cuadro 4. Se observa que en el mes agosto los ácidos grasos *trans-11*C18:1, *cis-9*C18:1, C18:2 se incrementaron ( $P < 0.05$ ) y contrariamente los de cadena corta C6:0, C8:0, disminuyeron ( $P < 0.05$ ) respecto al mes de julio. Respecto a las sumatoria de los ácidos grasos saturados, fue mayor en los meses de junio y julio, mientras que los la sumatoria de los ácidos grasos monoinsaturados y

variability in total solids and its components (fat, lactose, protein) as quantified in the present study, the observed levels were similar to those reported for different production and feed systems<sup>(31,32)</sup>.

*CLA and fatty acids profile*

It was observed that month was the factor that significantly ( $P < 0.05$ ) affected the content of most of the short- and medium-chain fatty acids, as well as long-chain unsaturated fatty acids such as *cis-9, trans-11* CLA (Table 3). Linear and quadratic increases ( $P < 0.05$ ) in C4:0, C6:0 and C18:3 fatty acids were observed in response to days in milk.

Cuadro 3. Nivel de significancia del modelo ajustado para perfil de ácidos grasos de la leche en el verano

Table 3. Significance of factors of the adjusted model on individual milk fatty acids

Fatty acids	Adjusted model terms			
	Month	DM	DM2	MY
C4:0	**	**	**	NS
C6:0	**	*	*	NS
C8:0	**	NS	NS	NS
C10:0	**	NS	NS	NS
C12:0	**	NS	NS	NS
C14:0	**	NS	NS	NS
C14:1	NS	NS	NS	NS
C15:0	NS	NS	NS	NS
C16:0	NS	NS	NS	NS
C16:1	NS	NS	NS	NS
C17:0	*	NS	NS	NS
C18:0	NS	NS	NS	NS
C18:1, <i>trans-11</i>	**	NS	NS	**
C18:1, <i>cis-9</i>	**	NS	NS	NS
C18:2 <sup>2</sup>	**	NS	NS	*
C18:3 <sup>3</sup>	NS	*	*	NS
c9, t11 CLA <sup>4</sup>	**	NS	NS	NS
C20:0	NS	NS	NS	NS
Others	NS	NS	NS	NS
Σ Saturated	**	NS	NS	NS
Σ Monounsaturated	**	NS	NS	NS
Σ Polyunsaturated	**	NS	NS	*

D= days in milk; DM2= quadratic effect of days in milk; MY= Milk yield.

<sup>2</sup> Linoleic acid.

<sup>3</sup> Linolenic acid.

<sup>4</sup> *cis-9, trans-11*- Conjugated linoleic acid.

\*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ ; NS = not significant.

poliinsaturados fueron mayores en agosto comparado con junio y julio.

#### *Ácido linoleico conjugado (CLA)*

El contenido promedio del isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA fue de 9.81 mg/g de grasa en leche durante el verano. Sin embargo se puede observar en el Cuadro 4 que en julio fue significativamente menor (8.50 mg/g de grasa) respecto a junio y agosto. El isómero *trans*-10, *cis*-12 no fue detectado en la leche obtenida durante el periodo muestreado.

Son pocos los trabajos publicados en los que se toma como uno de los factores principales la variación estacional. Así, Lock y Garnsworthy<sup>(12)</sup>, y Thorsdottir *et al*<sup>(33)</sup>, encontraron valores CLA durante el verano de 13.3 y 6.8 mg/g de grasa respectivamente, en un sistema de producción de pastoreo y en donde las temperaturas de verano están por debajo de las que ocurren en la Costa de Hermosillo, Sonora. A pesar de ello, los valores que se encontraron en este estudio están dentro de la escala reportada por estos autores, (aunque en este trabajo, las vacas se mantuvieron en confinamiento todo el verano).

La dieta de verano incluyó un 58.8 % de alfalfa, influyendo en el contenido de ácidos grasos precursores de CLA por su alto contenido de ácidos linoleico y linolénico. El aumento en la cantidad de forrajes apetecibles son ajustes que se realizan normalmente para estimular el consumo de alimento en verano, que se ve disminuido por estrés calórico. Es por ello que el uso de un forraje apetecible como la alfalfa, asegura el consumo mínimo de fibra en verano y evita la presencia de problemas metabólicos. Los forrajes estimulan la rumia y masticación. Este proceso produce saliva que ayuda a mantener el pH ruminal con tendencia hacia la neutralidad, favoreciendo indirectamente la actividad de la bacteria *Butirivibrio fibrisolvens* responsable de la formación del CLA en el rumen. Además otros factores como frecuencia de alimentación, ingredientes y tamaño de partícula de los mismos, pueden promover una mayor tasa de pasaje del ácido vaccénico hacia la glándula mamaria, contribuyendo en la concentración de CLA en la grasa láctea<sup>(34,35)</sup>.

Milk yield only affected *trans*-11 C18:1 and C18:2, meaning that days in milk and milk production did not modify the amount of most fatty acids in the milk, including *cis*-9, *trans*-11 CLA. Also month had an effect ( $P < 0.05$ ) on overall fatty acids content (i.e. saturated, monounsaturated and polyunsaturated). However, saturated and monounsaturated fats content was unaffected linearly or quadratically by days in milk or milk yield. Whereas, polyunsaturated fatty acids contents were affected ( $P < 0.05$ ) by milk yield.

Differences occurred in average fatty acids composition among months (Table 4). Compared to July, *trans*-11C18:1, *cis*-9C18:1 and C18:2 increased ( $P < 0.05$ ) in August, whereas the short-chain fatty acids C6:0 and C8:0 decreased ( $P < 0.05$ ). Saturated fatty acids content was highest in June and July, while monounsaturated and polyunsaturated fatty acids contents were higher in August.

#### *Conjugated linoleic acid (CLA)*

Average *cis*-9, *trans*-11 CLA was 9.81 mg/g milk fat during the study period, although the level of this isomer in July was lower ( $P < 0.05$ ) (8.50 mg/g fat) than in June and August. The isomer *trans*-10, *cis*-12 was not detected in the sampled milk during the sampling period.

Very few studies use seasonal variation as a principal factor. Lock and Garnsworthy<sup>(12)</sup> and Thorsdottir *et al*<sup>(33)</sup>, reported CLA values of 13.3 and 6.8 mg/g, respectively, during the summer in a grazing production system in which summer temperatures are lower than in the present study area. Despite this, the CLA values observed in the present study are within the range reported above even though the cows in the studied system were confined throughout the summer.

The summer diet provided the sampled cows included 58.8% alfalfa, which is rich in linoleic and linolenic acids, precursors of CLA. Increasing the amount of appetizing forage is a standard adjustment made to feed during the summer to stimulate feed intake and compensate for decreased of feed intake due to heat stress. Use of inputs such as alfalfa ensures a minimum fiber intake

La diferencia en la concentración de *cis*-9, *trans*-11 CLA en los meses de verano pudo deberse a una alteración de la dinámica ruminal propiciada por los componentes de la dieta o una variación en el consumo, ya que en julio presentaron mayor estrés calórico (Figura 2)<sup>(14)</sup>.

La concentración de CLA mostró una amplia escala de variación dentro de la misma estación del año, aún cuando las vacas recibieron la misma dieta.

during the summer and prevents metabolic problems. Forages also stimulate rumination and mastication, to produce saliva which helps to keep ruminal pH near neutral, and indirectly favors the activity of *Butirivibrio fibrisolvens*, the bacteria responsible for CLA formation in the rumen. Other factors such as feeding frequency, feed ingredients and particle size can promote a higher vaccenic acid passage rate to the mammary gland, further contributing to CLA concentration in milk fat<sup>(34,35)</sup>.

Cuadro 4. Media de cuadrados mínimos ± EE de la composición de ácidos grasos de la leche (mg /g grasa), por mes  
Table 4. Least square means ± standard error for milk fatty acids composition (mg /g fat) by month

Fatty acid	June	July	August
C4:0	1.36 ± 0.19 ab	0.77 ± 0.18 a	0.46 ± 0.18 a
C6:0	7.42 ± 0.47 b	7.33 ± 0.42 b	4.51 ± 0.44 a
C8:0	8.84 ± 0.34 b	9.39 ± 0.31 b	7.06 ± 0.33 a
C10:0	21.88 ± 0.81 b	24.08 ± 0.72 c	18.97± 0.80 a
C12:0	27.81 ± 0.95 a	30.38 ± 0.85 b	26.45± 0.93 a
C14:0	105.96 ± 1.58 b	103.01 ± 1.44 b	92.11 ± 1.50 a
C14:1	12.39 ± 0.53 a	11.67 ± 0.48 a	11.80 ± 0.50 a
C15:0	11.19 ± 0.37 a	11.82 ± 0.33 a	12.19 ± 0.35 a
C16:0	306.48 ± 6.96 a	299.98 ± 6.2 a	289.5 ± 7.0 a
C16:1	15.15 ± 0.88 a	15.37± 0.79 a	15.97 ± 0.87 a
C17:0	5.39 ± 0.20 ab	5.96 ± 0.18 b	5.19 ± 0.19 a
C18:0	103.53 ± 3.17 a	110.30 ± 2.87 a	102.88 ± 3.0 a
C18:1, <i>trans</i> -11	6.82 ± 0.44 a	6.64 ± 0.39 a	10.97 ± 0.41 b
C18:1, <i>cis</i> -9	279.20 ± 4.66 a	279.63 ± 4.22 a	306.96 ± 4.41 b
C18:2 <sup>1</sup>	37.39 ± 1.48 a	35.61 ± 1.34 a	45.11 ± 1.40 b
C18:3 <sup>2</sup>	4.60 ± 0.18 a	4.28 ± 0.16 a	4.23 ± 0.17 a
c9, t11-CLA <sup>3</sup>	10.78 ± 0.41 b	8.50 ± 0.37 a	10.16 ± 0.39 b
C20:0	0.716 ± 0.19 a	0.555 ± 0.17 a	1.03 ± 0.19 a
Others	31.25 ± 1.19 a	33.91 ± 1.08 a	33.62 ± 1.13 a
Σ SAT	601.71 ± 6.17 b	603.77 ± 5.60 b	560.45 ± 5.84 a
Σ MFA	310.97 ± 5.77 a	310.97 ± 5.21 a	342.91 ± 5.73 b
Σ PFA	52.78 ± 1.81 a	48.41 ± 1.64 a	59.50 ± 1.71 b

<sup>1</sup> Linoleic acid.

<sup>2</sup> Linolenic acid.

<sup>3</sup> *cis*-9, *trans*-11-CLA.

SAT= sum of saturated fatty acids; MFA= sum of monounsaturated fatty acids; PFA= sum of polyunsaturated fatty acids.

abc Different letter superscripts in the same row indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

Este comportamiento ha sido mencionado por varios autores<sup>(32,36,37)</sup>. La distribución de frecuencias para las concentraciones de CLA se presenta en la Figura 3. Durante los meses de verano, 88 de las 120 vacas produjeron leche con concentraciones de CLA entre 7.0 y 13.09 mg/g de grasa y sólo 15 vacas produjeron más de 13 mg de CLA/g de grasa.

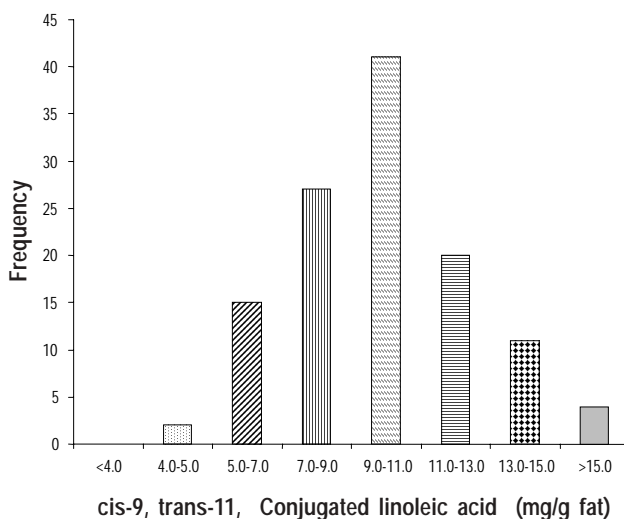
### Índice de desaturación

El índice de desaturación es usado como un estimador de la actividad de la enzima  $\Delta^9$ -desaturasa, la cual se encarga de mantener la fluidez de las membranas celulares<sup>(38)</sup>. Esta tarea la lleva a cabo introduciendo una doble ligadura entre los carbonos 9 y 10. La actividad de la enzima puede ser medida por la relación entre los productos y sustratos de ciertos ácidos grasos. Los cuatro productos principales de la enzima  $\Delta^9$ -desaturasa son C14:1, C16:1, C18:1 *cis*-9 y CLA, los cuales son producidos a partir de los ácidos grasos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1) y vaccénico (C18:1 *t*11), respectivamente<sup>(2)</sup>.

El mejor indicador de la actividad de la enzima  $\Delta^9$ -desaturasa está relacionada con C14:1:C14:0 debido a que todo el mirístico proviene de la síntesis

Figura 3. Distribución de frecuencias para el contenido de *cis*-9, *trans*-11 CLA en la leche de vaca.

Figure 3. Frequency distributions for *cis*-9, *trans*-11 CLA content in cows milk



Differences in *cis*-9, *trans*-11 CLA concentration during the summer months could have been in response to a modified ruminal dynamic caused by dietary components or intake variation. For example, higher heat stress during July could have affected intake and lowered CLA concentrations (Figure 2)<sup>(14)</sup>.

Despite the cows receiving the same diet, CLA concentrations varied widely during the three-month study period, a trend reported elsewhere<sup>(32,36,37)</sup>. Frequency distributions of the CLA concentrations showed that 88 of the 120 sampled cows produced milk with CLA concentrations within the range 7.0 and 13.09 mg/g fat, and only 15 produced milk with more than 13 mg/g fat.

### Desaturase index

The desaturase index is used as an estimator of  $\Delta^9$ -desaturase activity. This enzyme introduces a double bond between the 9 and 10 carbons, thus maintaining fluidity in cell membranes<sup>(38)</sup>. Measuring this activity can be done based on the ratio between the products and substrates of certain fatty acids. The four main products of  $\Delta^9$ -desaturase are C14:1 (from myristic acid, C14:0), C16:1 (from palmitic acid, C16:0), C18:1 *cis*-9 (from oleic acid, C18:1) and CLA (from vaccenic acid, C18:1 *t*11)<sup>(2)</sup>. The best indicator of  $\Delta^9$ -desaturase activity is related to C14:1:C14:0 because all myristic acid comes from *de novo* synthesis in the mammary gland and the only way to produce myristoleic acid is with myristic acid as substrate<sup>(12)</sup>.

Of these four fatty acids, oleic acid had higher ( $P < 0.05$ ) levels than the other three (Table 3). No changes in the activity of the remaining three fatty acids was observed in June and August, although the index values for myristoleic and palmitoleic acids were low compared to oleic acid and CLA. Values for the isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA during the study period were higher than previously reported values (0.15<sup>(39)</sup> to 0.29<sup>(20)</sup>). Desaturase index values often vary between studies due to differences in production system, diet and season.

*de novo* en la glándula mamaria y la única forma de obtener el miristoleico es teniendo al mirístico como sustrato<sup>(12)</sup>.

En el Cuadro 5, se presentan los índices de desaturación para los cuatro ácidos grasos mencionados, de los cuales el oleico fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ). En junio y agosto, no se observaron cambios en la actividad de los demás ácidos grasos; sin embargo, los índices de desaturación son bajos en los ácidos grasos miristoleico y palmitoleico, comparados con oleico y CLA. Con respecto al isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA. Los valores de los índices de desaturación en todos los meses de verano fueron mayores que los reportados en estudios previos (0.15<sup>(39)</sup> a 0.29<sup>(20)</sup>). La diferencia en los valores de índice de desaturación puede estar relacionada con el sistema de producción, tipo de dieta y época del año, es por ello que es muy variable entre un estudio y otro.

En este estudio, las concentraciones de CLA, así como de los ácidos grasos miristoleico y oleico en verano concuerdan con el índice de desaturación (actividad enzimática) significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) encontrados por otros autores<sup>(20,39)</sup>.

### CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La concentración del isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA en la leche de vaca, es afectada por el mes durante

The CLA, myristoleic and oleic acid index values observed in the present study during summer months coincide with higher ( $P < 0.05$ ) index values (i.e. enzymatic activity) reported elsewhere<sup>(20,39)</sup>.

### CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Concentration of the isomer *cis*-9, *trans*-11 CLA in cows milk is affected during the summer months in the study area. Although the sampled cows experienced heat stress due to high daytime temperatures ( $> 40$  °C), their milk contained high CLA concentrations comparable to those reported from more temperate climates. This can be attributed to a high percentage of alfalfa in the feed, which contains the CLA fatty acid precursor's linoleic and linolenic acids. The increased proportion of unsaturated fatty acids and CLA and the lower proportion of fat in the milk produced during summer months, in conjunction with current preferences for low-fat (particularly saturated fat) products, make it of high nutritional value to consumers.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the farm owners for allowing access to their stock; Francisco Vázquez-Ortiz†, Ericka Javier Sáenz, Amparo Nieblas and Ingrid Rebeca Esquerra Brauer for their technical support;

Cuadro 5. Actividad estimada de la enzima D<sup>9</sup>-desaturasa en los precursores del isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA

Table 5. Estimated D<sup>9</sup>-desaturase activity in *cis*-9, *trans*-11 CLA precursors by month

Desaturase index <sup>1</sup>	June	July	August
<i>cis</i> -9 14:1	0.10 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>cis</i> -9 16:1	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>cis</i> -9 18:1	0.724 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.712 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.742 ± 0.00 <sup>b</sup>
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.612 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.564 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.478 ± 0.01 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Calculated as the Δ<sup>9</sup>-desaturase product divided by the sum of the Δ<sup>9</sup>-desaturase product and substrate; for example, the desaturase index value for *cis*-9 16:1 would be (*cis*-9 16:1)/(*cis*-9 16:1 + 16:0) .

abc Different letter superscripts in the same row indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

± Standard error

el verano. A pesar del estrés calórico durante el verano, las vacas produjeron leche con concentraciones altas de CLA equiparable al reportado en países con temperaturas más bajas a la que presentaron en esta región del noroeste de México que fue mayor de 40 ° C, durante el verano. La concentración de CLA en leche puede ser atribuida a la dieta por la presencia de alfalfa, rica en ácidos grasos precursores del CLA (linoleico y linolénico). El aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados y CLA en la leche producida en verano, así como un bajo porcentaje de grasa en leche encontrados en este estudio, la hacen desde el punto de vista de salud humana, una leche con alto valor nutricional para el consumidor, debido a la actual tendencia al consumo de productos bajos en grasa y especialmente bajos en grasas saturadas.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los propietarios del establo donde se realizó este estudio, así mismo a los Q.B. Francisco Vázquez-Ortiz†, Q.B. Ericka Javier Sáenz, Q.B. Amparo Nieblas, y Q.B. Ingrid Rebeca Esquerria Brauer, por su apoyo técnico y al PhD. Arturo Madrid López por sus valiosos comentarios y asesoría.

## LITERATURA CITADA

1. NRC. National Research Council. Effect of environment on nutrient requirements of domestic animals. Washington, DC, USA: National Academy Press; 1981.
2. Bauman DE, Corl BA, Baumgard HH, Griinari JM. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Garnsworthy PC, Wisenab J editors. Recent Advances in Animal Nutrition. Nottingham, UK: Nottingham University Press; 2001;221-250.
3. Jensen RG. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. J Dairy Sci 2002;(5):295-350.
4. Khanal RC, Dhiman TR. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A Review. Pakistan J Nutr 2004;3(2):72-81.
5. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. Annu Rev Nutr 2002;(22):505-31.
6. Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, McGinley J, Thompson HJ, Barbano D, Bauman DE. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. J Nutr 1999;(129):2135-2142.

and Dr. Arturo Madrid López for his valuable comments and advice.

*End of english version*

- 
7. Parodi PW. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. J Nutr 1997;(127):1055-1060.
  8. Parodi PW. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. J Dairy Sci 1999;(82):1339-1349.
  9. Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Kwangok PN, Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat. Biochem Biophys Res Commun 1998;(244):678-682.
  10. Pariza MW. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. Am J Clin Nutr 2004;79 (suppl 1):132S-1136S.
  11. Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J Food Comp Anal 1992;(5):185-197.
  12. Lock AL, Garnsworthy PC. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ9-desaturase activity in dairy cows. Livest Prod Sci 2003;(79):47-59.
  13. Kramer JKG, Parodi PW, Jensen RG, Mossoba MM, Yurawecz MP, Adlof RO. Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. Lipids 1998;(33):835.
  14. Kay JK, Weber WJ, Moore CE, Bauman DE, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker BA, Baumgard LH. Effects of week of lactation and genetics selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. J Dairy Sci 2005;(88):3886-3893.
  15. Moate PJ, Chalupa W, Jenkins TC, Boston RC. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption on LCFA in dairy cows. Anim Feed Sci Technol 2004;(112):79-105.
  16. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957;(226):497-509.
  17. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Anal Biochem 1978;(90):420-426.
  18. Luna P, Juárez M, de la Fuente MA. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. J Dairy Sci 2005;(88):3377-3381.
  19. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1995.
  20. Kelsey JA, Corl BA, Collier RJ, Bauman DE. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) on milk fat dairy cows. J Dairy Sci 2003;(86):2588-2587.
  21. SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 9.2). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2001.
  22. Moore RB, Fuquay JW, Drapala WJ. Effects of late gestation heat stress on postpartum milk production and reproduction in dairy cattle. J Dairy Sci 1992;(75):1877-1882.

## ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN LECHE DE GANADO HOLSTEIN

23. West JW. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2003;(86):2131-2144.
24. Cummins KA. Effect of dietary acid detergent fiber on responses to high environmental temperature. *J Dairy Sci* 1992;(75):1465 - 1471.
25. West JW, Hill GM, Fernández JM, Mandebvu P, Mullinix BG. Effects of dietary fiber on intake, milk yield, and digestion by lactating dairy cows during cool or hot, humid weather. *J Dairy Sci* 1999;(82):2455-2465.
26. Barash H, Silanikove N, Shamay A, Ezra E. Interrelationships among ambient temperature, day length, and milk yield in dairy cows under a mediterranean climate. *J Dairy Sci* 2001;(84):2314-2320.
27. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería. Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de ganado bovino en México 1990-2000. México. 2000.
28. Zebeli Q, Tafaj M, Steingass H, Metzler B, Drochner W. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. *J Dairy Sci* 2006;(89):651-668.
29. Knapp DM, Grummer RR. Response of lactating dairy cows to fat supplementation during heat stress. *J Dairy Sci* 1991;(74):2573-2579.
30. Alduist MJ, Walsh BJ, Thomson NA. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in N Z *J Dairy Sci* 1998;(65):401-411.
31. Shingfield KJ, Reynolds CK, Lupoli B, Toivonen V, Yurawecz MP, Delmonte P, *et al.* Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Anim Sci* 2005;(80):225-238.
32. Bell JA, Griinari JM, Kennelly JJ. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J Dairy Sci* 2006;(89):733-748.
33. Thorsdottir I, Hill J, Ramel A. Seasonal variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from Nordic countries. *J Dairy Sci* 2004;(87):2800-2802.
34. Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by <sup>9</sup>-Desaturase. *J Dairy Sci* 2000;(130):2285-2291.
35. Kay JK, Mackle TR, Auldism MJ, Thomson NA, Bauman DE. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *J Dairy Sci* 2004;(87):369-378.
36. Donovan DC, Schingoethe DJ, Baer RJ, Ryali J, Hippen AR, Franklin ST. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2000;(83):2620-2628.
37. Lawless F, Stanton C, Escop PL, Devery R, Dillon P, Murphy JJ. Influence of breed on bovine milk cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid. *Livest Prod Sci* 1999;(62):43-49.
38. Perfield II JW, Bernal-Santos G, Overton TR, Bauman DE. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J Dairy Sci* 2002;(85):2609-2617.
39. Lock AL, Bauman DE, Garnsworthy PC. Effect of production variables on the cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content of cows' milk. *J Dairy Sci* 2005;(88):2714-2717.