



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrados

**FRACCION DE CASEÍNAS Y ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE
BOVINA:**

Categoría Animal, La memoria Metabólica Y El Biotipo Lechero

Virginia María Artegoitía Etcheverry

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2010**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrados

**FRACCION DE CASEÍNAS Y ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE
BOVINA:**

Categoría Animal, La memoria Metabólica Y El Biotipo Lechero.

Virginia María Artegoitia Etcheverry

Dra. Ana Meikle
Nombre
Director de Tesis

2010

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Daniel Cavestany; DVM, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

**Silvana Carro; DVM, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

**Darío Irigoyen; DVM, MS
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República–Uruguay**

2010

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

Mi tutor Ana Meikle, por enseñarme a crecer en el área científica, su interés por ayudarme en un área del conocimiento que no era su especialidad, sin embargo creyó en mis aptitudes y en la importancia de la temática. Por generar conexiones con otras áreas y profesiones otorgándome diferentes metodologías. Por su alto grado de criticismo, honestidad directa y clara. Por muchas discusiones, aunque difíciles fueron siempre para ayudarme a aprender y crecer tanto a nivel profesional como personal. Por transmitirme vocación por la ciencia, y darme herramientas para comenzar un camino como científica.

A Elena de Torres por ser la persona quien me introdujo en esta temática y me enseñó mis primeras experiencias en metodología científica.

A Jorge Bermúdez por construir un grupo de trabajo e interactuar con diferentes instituciones. Por generar oportunidades de trabajo en el área, que me permitieron dedicarle todo mi tiempo. Por escucharme, atender todas mis inquietudes y permitirme trabajar de forma independiente. Por su evaluación sobre la escritura de esta tesis.

A Laura Olazábal por introducirme en el mundo de la cromatografía y permitirme utilizar equipos de avanzada, enseñarme metodologías esenciales para esta tesis. Por su apoyo técnico sobre la realización y escritura de todo este trabajo.

Ha sido un privilegio poder trabajar bajo la tutela de este grupo heterogéneo, los cuales me ayudaron a crecer científicamente.

A Mariana Carriquiry, mi tutor no oficial, quién ha estado en todas mis etapas de la maestría y me ha ayudado a escribir mi primer paper. Por siempre atender y escuchar todas mis inquietudes. Por su gran criticismo positivo en todas las etapas. Por darme la oportunidad de continuar mi crecimiento primero en la Universidad de Minnesota y luego en la Universidad de Tennessee.

A Brian Crooker, por enseñarme nuevas metodologías sobre nutrición animal y técnicas de biología molecular en lechería. Por su estricta metodología científica, orden absoluto y paciencia infinita. Por su apoyo e incentivo inicial en la escritura del paper.

A Jorge Monza [por permitirme trabajar en Lab. de bioquímica y utilizar el HPLC.

A Juan Pablo Damián, por enseñarme la determinación de fracciones de caseínas, interpretación de datos y búsquedas bibliográficas. Por su incondicional apoyo y sus buenas sugerencias.

A Lourdes Adrien por su apoyo e invalorable aportes.

A Alejandra Torre, por permitirme trabajar en el LATU y brindarme todos los recursos necesarios para trabajar de forma plena. A todas mis compañeras del LATU que siempre fueron de apoyo incondicional y me ayudaron durante todo mi estadía en el laboratorio.

A Shirley Furtado y Gabriela Arias por permitirme y enseñarme a utilizar el Kjeldahl.

A Daniel Laborde por disponer su tiempo para esta investigación.

A todos los compañeros que trabajaron junto a mí en la EEMAC: Diego Mattiauda, Lourdes Adrien, Gianni Motta, Carolina Carballo y Martin Claramunt, María Marcela Farías Santos y Edgar Silva.

Al Laboratorio de técnicas nucleares: Andrea Fernández, Paula Pessina, Paula Nicolini, Gretel Rupprechter, Marlene Porto e Isabel Sartore que han compartido conmigo todas estas etapas, por el apoyo y los buenos momentos vividos.

Mi familia que siempre ha apoyado mi formación, búsqueda continua y desarrollo profesional.

INDICE

1) Resumen.....	v
2) Summary.....	vi
3) Introducción.....	1
4) Antecedentes.....	4
a) Composición de la leche.....	4
b) Síntesis y secreción de las proteínas y glóbulos grasos de la leche.....	7
c) Activación de la secreción láctea: lactogénesis.....	9
d) Período de transición.....	11
e) Calidad composicional de la leche: salud humana y aptitud humana.....	12
f) Evolución y perspectivas de la calidad de leche en Uruguay.....	14
g) Efecto de la categoría animal sobre la producción de proteínas y ácidos grasos.....	15
h) Efecto del balance energético y la nutrición sobre producción de proteínas y ácidos grasos.....	16
i) Efecto del biotipo lechero sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos.....	18
3) Caracterización del problema.....	19
4) Objetivos.....	21
5) Materiales y Métodos.....	22
a) Experimento 1: Efecto de las reservas corporales inducidas nutricionalmente durante el parto sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos en leche de vacas Holando primíparas y múltíparas.....	22
b) Experimento 2: Efecto del biotipo lechero sobre las fracciones de ácidos grasos.....	23
c) Determinación de las fracciones de caseína.....	24
d) Determinación del perfil de ácidos grasos.....	24
e) Análisis estadísticos.....	25
6) Resultados.....	26
Experimento 1: Efecto de las reservas corporales inducidas nutricionalmente durante el parto sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos en leche de vacas Holando primíparas y múltíparas.....	26
a) Producción y composición de leche.....	26
b) Determinación del nitrógeno por Kjeldahl.....	27
c) Fracciones de caseínas.....	28
d) Fracciones de ácidos grasos.....	29
Experimento 2: Efecto del biotipo lechero sobre las fracciones de ácidos grasos de la leche.....	34
7) Discusión.....	36
8) Conclusiones.....	40
9) Comentarios finales.....	40
10) Referencias bibliográficas.....	41
11) Anexo.....	51

INDICE DE CUADROS

I.	Fracción nitrogenada de la leche.....	5
II.	Promedio de ácidos grasos en la leche.....	6
III.	Componentes bioactivos de la leche que tienen acción específica mejoradora de la salud humana.....	14
IV.	Medias de producción de leche, composición y recuento de células somáticas (RCS) en SDL 2 y 8, en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.....	26
V.	Medias de caseína total, proteínas del suero, fracciones de caseínas de la leche en SDL 2 y 8 en vacas primíparas (L1) multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.....	27
VI.	Medias de la composición de los ácidos grasos (AG, mg/g del total de ácidos grasos) individuales en vacas primíparas (L1) y multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.....	30
VII.	Medias de la composición de los ácidos grasos en vacas primíparas (L1) y multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.....	31
VIII.	Ácidos grasos individuales promedio en leche de diferentes biotipos lecheros.....	34
IX.	Origen y saturación de los ácidos grasos en diferentes biotipos lecheros.....	35

INDICE DE FIGURAS

1) Composición porcentual de la leche bovina.....	4
2) Resumen de las vías de tránsito y secreción de caseínas y glóbulos grasos en las células epiteliales de la glándula mamaria durante la lactancia.....	7
3) Concentraciones en leche de caseínas totales (A), proteínas del suero (B) y β -caseínas (C) en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (A1, B1, C1) y vacas multíparas (A2, B2, C2) con bajo (gris) o alto (blanco) estado corporal -30 días de lactación.....	28
4) Origen de los ácidos grasos de la leche en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (1) y vacas multíparas (2) con bajo (gris) o alto (blanco) estado corporal a los -30 días de lactación.....	29
5) Ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (1) y vacas multíparas (2) con bajo (gris) o alto (blanco) estado corporal -30 días de lactación.....	32
6) Ácidos grasos <i>Trans</i> (A) y C18:2 ácido linolénico conjugado (CLA) (B) en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (1) y vacas multíparas (2) con bajo (gris) a alto (blanco) estado corporal a los -30 días de lactación.....	33

RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo evaluar el efecto de la nutrición preparto y el biotipo lechero sobre las fracciones de caseínas y/o ácidos grasos (AG) en leche bovina. Se realizó un primer experimento donde se indujo nutricionalmente reservas corporales (BCS) diferenciales a los 30 días preparto en vacas primíparas (L1) y multíparas (L2) con alto BCS (L1alto, n=13; L2alto, n=9) y bajo BCS (L1bajo, n=9; L2bajo, n=8), y se evaluó su efecto sobre las fracciones de caseínas y AG en leche en las semanas 2 y 8 de lactancia (SDL). Las vacas L2alto presentaron mayor proporción de caseínas y menor proporción de proteínas del suero que las vacas L2bajo en la SDL 2. En las vacas L2 se observó mayor concentración de caseínas totales y de κ -caseína y menor proporción de β -caseína que en las vacas L1. No hubo diferencias en la composición de caseínas entre la semanas 2 y 8. Sólo la fracción de κ -caseína fue afectada por BCS, ya que su concentración fue menor en las vacas L1alto respecto a las L1bajo. La proporción de AG *de novo* (4:0 a 15:1) y de AG de origen mixto (16:0 a 16:1) aumentó de la SDL 2 a la 8, mientras que los AG preformados ($\geq 17:0$) disminuyeron durante el mismo período. La leche de las vacas L2 presentó mayor concentración de AG saturados (SAT) y menor de monosaturados (MUFA) que la de las vacas L1. Las vacas de alto BCS presentaron mayores concentraciones de AG poliinsaturados (PUFA), ácido linoleico conjugado, n-6 y n-3. El segundo experimento investigó el efecto de diferentes biotipo lecheros: Holando Uruguayo (HU, n=8), y cruza de HU con Holando Neocelandez (HNZxHU, n=10), Jersey (JxHU, n=10) y Sueco roja (RBSxHU, n=12) sobre las fracciones de AG en la leche en 12 SDL en vacas L1. Las vacas HNZxHU y JxHU presentaron mayor proporción de SAT y menor proporción de MUFA, mientras que las vacas RBSxHU presentaron menor concentración de SAT y mayor proporción de MUFA, presentando el biotipo HU, concentraciones intermedias. Por otra parte, la concentración de grasas *trans* fue menor para el biotipo JxHU. En síntesis, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las fracciones de caseínas y AG en leche pueden ser modificadas por el manejo nutricional preparto, la categoría animal y la elección del biotipo lechero.

SUMMARY

This thesis had the objective to evaluate the effect of nutrition and biotype on milk casein or/and fatty acid fractions. The first experiment studied the effect of different body condition score (BCS) at 30 days before calving (-30 days) induced by a differential nutritional management on milk productive parameters, milk casein and fatty acid (FA) fractions at 2 and 8 week of lactation (WOL) in primiparous (L1) and multiparous (L2) with high BCS (L1high, n=13, L2high, n=9) and low BCS (L1low, n=9, L2low=8) Holstein cows under grazing conditions. The second study evaluated the effect of the milk biotype, Uruguayan Holstein (HU, n=8), and cross breeding of HU with New Zealand Holstein (HNZxHU, n=10), Jersey (JxHU, n=10) or Swedish Red (RBSxHU, n=12) on milk FA fractions on 12 SDL in primiparous cows. The milk yield was greater in L2 than in L1 cows and tended to decrease from WOL 2 to 8 only in L2low cows. Milk protein, fat and casein yields were greater in L2 than in L1 cows and decreased from WOL 2 to 8. Milk casein presented greater concentration in L2high cows and less whey than L2low and L1 cows at WOL 2. Milk κ -casein was greater and β -casein was less in L2 than in L1 cows. As lactation progressed, casein fraction composition was not altered. Only κ -casein fraction was affected by BCS, L1low presented greater concentration than L1high. The proportion of *de novo* (4:0 to 15:1) and mixed origin fatty acids (16:0 to 16:1) increased, whereas preformed fatty acids ($\geq 17:0$) decreased from WOL 2 to 8. Saturated (SAT) fatty acid (FA) tended to be greater and monosaturated (MUFA) were less in L2 than in L1 cows. High BCS cows presented more polyunsaturated (PUFA) FA, conjugated linoleic acid and n-6, n-3. The HNZxHU and JxHU cows presented greater proportion of the SAT and less proportion of MUFA, whereas the RBSxHU cows presented less concentration of SAT and greater proportion of MUFA, being intermediate this FA for biotype HU cows. Moreover, JxHU cows had less proportion of *trans* FA. The results of this thesis suggest that casein and fatty acid fractions in milk may be modified by a differential management during the precalving period (BCS at -30 days) in cows under grazing conditions; milk components are also affected by cow's development and cows biotype.

INTRODUCCION

En Uruguay, la producción de leche ha crecido constantemente en los últimos 25 años, a una tasa promedio anual del 5%, y es previsible un crecimiento anual promedio de 4,5% para la próxima década (FEPAL, 2001; OPYPA, 2007). Las exportaciones de productos lácteos totalizaron 64% en relación al volumen total disponible en 2009, fundamentalmente como productos básicos (*commodities*), leche en polvo, quesos y manteca (DIEA, 2009) y a su vez es el primer consumidor de leche fluida de América Latina (228 L/hab.). Estas condiciones son inmejorables para sentar las bases y generar las herramientas necesarias que permitan agregar valor desde la materia prima para la elaboración de productos básicos especializados para nuestros mercados compradores. Por otra parte, estas herramientas son condiciones necesarias para la competencia por los mercados externos en el futuro inmediato.

La leche bovina juega un papel importante en la nutrición humana y es un ingrediente que se consume globalmente en diferentes formas y con diferentes destinos. Uno de los enfoques centrales de la investigación en la industria láctea internacional se concentra en la valorización e innovación de productos por las propiedades de algunos componentes lácteos en la promoción de aspectos saludables y terapéuticos de la leche (Bauman et al. 2006), así como modificaciones tecnológicas y sensoriales de los productos lácteos, generando oportunidades bajo el concepto de “leche de diseño” (Sabikhi, 2004). El concepto de “leche de diseño” genera potencialidades para el cambio en la composición de la leche según las preferencias del consumidor de acuerdo a sus implicancias en la salud así como en su procesamiento (Sabikhi, 2004). Sin embargo, la investigación respecto a la composición de leche en Uruguay se ha limitado a la determinación y variación de proteína y grasa, y no a la maximización de los componentes nutraceuticos de forma natural, es decir, hoy, el agregado de alguno de estos elementos es netamente artificial a nivel industrial. Por ejemplo, actualmente la industria enriquece la leche con ácidos grasos omega 3 (n-3) a partir de aceite de pescado; en contraste con las políticas nacionales exportadoras que posicionan nuestro país de “Uruguay Natural” (decreto N° 328029). Resulta entonces prioritario que Uruguay genere su mensaje claro, sólido, inteligente y coherente acorde a esa imagen: desde maximizar la calidad de la leche de forma natural a la correcta aplicación de los elementos básicos de identificación visual de los productos. Es entonces relevante investigar cómo se afecta la calidad de leche.

Varios factores modifican la composición de la leche y/o el contenido de las fracciones nitrogenadas y lipídicas de la misma: etapa de lactación, paridad, genética, nutrición y enfermedad de la ubre (DePeters & Cant, 1992, Palmquist et al. 1993). Sin embargo, los dos factores más relevantes que pueden ser manipulados por el hombre y que afectan la composición de estas fracciones, son la alimentación y la genética.

La nutrición tiene efectos estáticos y dinámicos que pueden afectar de forma diferencial a pesar de estar integrados en la respuesta global. Los animales utilizados en diseños experimentales generalmente difieren en el grado de reservas corporales (memoria metabólica), nivel de energía/proteína y fuente de la dieta, inclusión de nutrientes específicos, además de otros factores experimentales como raza, edad, momentos en los

cuales se aplica tratamientos nutricionales respecto al período de transición y a la toma de observaciones. Lo anterior obviamente dificulta la comparación de resultados la obtención respecto de prácticas de manejo; esto es especialmente relevante en estudios sobre pastoreo controlado, debido a que la mayor parte de la información proviene de sistemas de producción de leche de estabulación.

Diferentes estudios demostraron una relación positiva entre el consumo de energía y el contenido de proteína en la leche (Sporndly, 1989; Coulon & Rémond, 1991). Ostersen et al. (1997) reportaron que vacas en condiciones de estabulación con buena condición corporal (BCS) al parto aumentaron el contenido nitrogenado de la leche, en las proteínas del suero durante los primeros 6 meses de lactancia, sugiriendo que el metabolismo graso y el *status* energético puede afectar la proporción de componentes nitrogenados de la leche. En el post parto temprano hay una modesta movilización de reservas proteicas (Bell, 1995), que tienen influencia en la síntesis proteica láctea durante el postparto temprano. Sin embargo, es evidente que el balance de nitrógeno (N) y la acumulación del tejido corporal es respuesta directa al aporte de proteína en la dieta de las vacas lecheras (Putnam y Varga, 1998).

La composición de ácidos grasos (AG) puede ser modificada especialmente por la alimentación (Palmquist et al. 1993) y esto podría proveer de un perfil más beneficioso para el humano. Como por ejemplo, el ácido linoleico conjugado (CLA), particularmente el *cis9-trans-11*, tiene diferentes propiedades como antioxidante, inhibición de la carcinogénesis y de la aterogénesis, mejora de la capacidad del sistema inmune, prevención de la obesidad, efectos antidiabéticos y mejoras en la mineralización ósea (Pariza et al. 2001). El aumento en la ingesta de la pastura fresca resulta en un aumento de 2 a 3 veces en el contenido CLA en la leche (Stanton et al. 1997; Kelly et al. 1998; Dhiman et al. 1999); y esto posiciona a nuestro sistema pastoril de producción de leche de forma ventajosa a nivel internacional. La reserva grasa también afecta el contenido de ácidos grasos (Bauman & Griinari, 2000; 2003; Molento et al. 2005): vacas en estabulación con baja BCS al parto presentaron menos AG de cadena larga e insaturados cuando se comparó con vacas con alta BCS (Stockdale et al. 2005). A pesar del interés que existe en modificar los componentes de la leche y reconocer los beneficios potenciales del consumo de pastura fresca (Stanton et al. 1997; Kelly et al. 1998; Dhiman et al. 1999), no se dispone de información suficiente sobre estudios del efecto del estado energético sobre el perfil de AG y caseínas en condiciones pastoriles.

El segundo factor, es decir, el efecto de la genética (biotipo lechero) sobre la composición de fracciones nitrogenadas y lipídicas ha sido escasamente estudiado. La diferencia entre razas en cuanto a la producción de fracciones de caseínas y AG puede tener una implicancia en el consumo de los productos lácteos. Se ha sugerido un consumo preferencial acorde al *status* de salud humano pudiendo elegir entre leches con menor contenido de ácidos grasos *trans* (C18:1; ej. Jersey; Carroll et al. 2006) o con mayor contenido de CLA (Holando) (White et al. 2001; Kelsey et al. 2003). No hemos encontrado otros estudios nacionales/internacionales respecto a fracciones de caseínas y AG. Respecto a la composición proteica y grasa, recientes estudios nacionales (Pereira

et al. 2010) indican diferencias relevantes en los porcentajes de proteína y grasa en vacas Holando Uruguayo y cruce Holando Neozelandesa, que se acompañaron con perfiles endócrinos distintos. En este estudio se demostró además, que aún considerando únicamente vacas multíparas, el desarrollo del animal en cada uno de los biotipos, se asocia a una partición diferencial de nutrientes.

Los objetivos de este trabajo abordaron el estudio del efecto de ambos factores (nutrición y genética) sobre las fracciones de caseínas y AG en leche bovina. Por un lado, el primer experimento tuvo como objetivos estudiar el efecto de las reservas corporales (BCS) inducidas mediante nutrición diferencial previas a los -30 días al parto, sobre las fracciones de caseínas y AG en leche en vacas Holando primíparas y multíparas en un sistema pastoril. El segundo experimento evaluó el efecto del tipo lechero - Holando Uruguayo (HU), y cruces de HU por Holando Neozelandés (HNZxHU), Jersey (JxHU) o Sueca Roja (RBSxHU) – sobre la fracción de AG en vacas primíparas.

ANTECEDENTES

La revisión bibliográfica se focaliza en la composición y síntesis de las proteínas y grasas de la leche y la activación de la secreción láctea, para luego detallar aspectos que hacen a la calidad de la leche desde el punto de vista tecnológico y de salud humana. Finalmente, se sintetiza la información acerca de los factores que afectan la calidad de leche estudiados en este trabajo: categoría animal, nutrición y biotipo lechero.

a) Composición de la leche

La leche es una mezcla compleja cuya composición refleja diferentes actividades de secreción y de transporte en la glándula mamaria y cuya anatomía funcional responde a los requisitos alimenticios del neonato (McManaman et al. 2003). Los componentes de la leche bovina son agua, lactosa, grasa, proteína, minerales y vitaminas en las fracciones aproximadas que se presentan en la Figura 1 (Walstra et al. 2006).

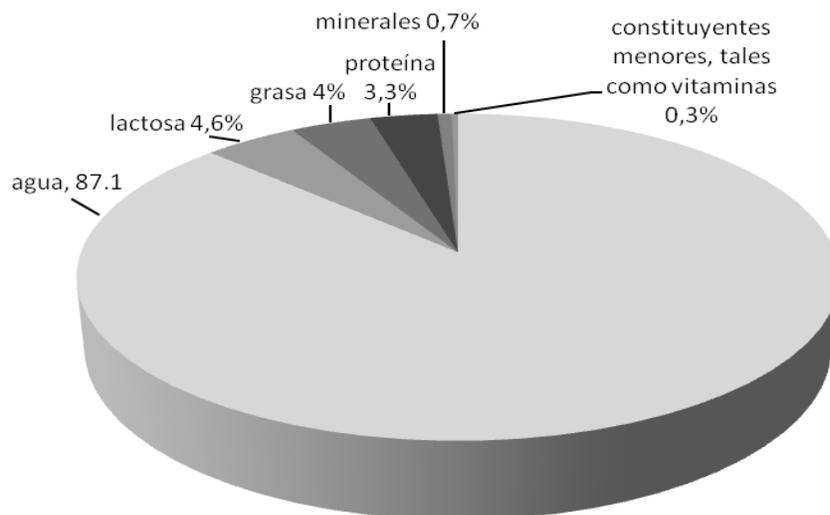


Figura 1. Composición porcentual aproximada de la leche bovina. Adaptado de Walstra et al. (2006).

La fracción nitrogenada de la leche está compuesta por dos grandes grupos: las proteínas verdaderas y el nitrógeno no proteico (Cuadro I). La proteína verdadera representa alrededor del 95% de la fracción nitrogenada. Es importante aclarar que en nuestro país, tanto los sistemas de calificación de la leche para el pago de la misma, como los resultados del control lechero, informan el valor de la fracción nitrogenada (proteínas + nitrógeno no proteico) como proteína total.

Cuadro I. Fracción nitrogenada de la leche.

	Promedio (g/kg)	Valor relativo (%)
FRACCIÓN NITROGENADA PROTEÍNA VERDADERA	32,0	100
A. Caseína	25,0	76,2
a. caseína- α 1	9	36
b. caseína- α 2	2,5	10
c. caseína- β	10	40
d. caseína- κ	3,2	14
B. Proteínas del suero	5,4	16,8

Adaptado de Alais (1985).

Las proteínas totales consisten 80% en caseínas, que se definen químicamente como las proteínas de la leche que precipitan a pH 4,6. El 20% restante son proteínas solubles en este pH y se refieren como proteínas del suero. Las moléculas individuales de caseínas se clasifican en los siguientes grandes grupos de acuerdo con su movilidad electroforética: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína (Cuadro I) y se caracterizan en general por tener un tamaño mediano (unos 200 aminoácidos, siendo algo menor la caseína κ). Todas las caseínas tienen variantes genéticas, producidas por sustitución de aminoácidos y en algunos casos por depleción (Farell et al. 2004).

Las caseínas interaccionan entre sí formando una dispersión coloidal que consiste en partículas esféricas llamadas micelas con un diámetro que suele variar entre 60 a 450 nm. Las micelas de caseína están formadas por un 92% de caseína y un 8% de sales (principalmente fosfato de calcio coloidal). A pesar de la abundante literatura científica sobre la posible estructura de una micela, no hay consenso sobre el tema. Se discute una gran cantidad de diferentes modelos fisicoquímicos de organización de las micelas (Farell et al. 2006). Este hecho tiene importantes implicaciones prácticas relacionadas con la formación de los geles de caseína, así como con la estabilidad de los productos lácteos durante su tratamiento térmico, concentración y almacenamiento. Por lo tanto, cambios en las concentraciones de β -caseína, que es la caseína más abundante de la leche implicada en la unión con el fosfato de calcio, van a repercutir en los niveles del calcio de la leche. Un contenido más alto de la κ -caseína en leche, mejora la estabilidad al calor y las características de la producción de queso (Sabikhi, 2004).

La grasa de la leche se compone de 97-98% triacilglicéridos (TG) (ésteres de glicerol y ácidos grasos), los porcentajes remanentes son esteroides esterificados y no esterificados de los fosfolípidos, y otros componentes asociados a la membrana globular de la grasa láctea. La grasa de la leche está compuesta por más de 400 AG, sin embargo, la mayor parte de éstos AG están presentes en cantidades muy pequeñas en la leche, sólo un 15 % del total se encuentra en una concentración de 1% o mayor concentración (Jensen et al. 1991): mirístico (C14:0) palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C:18:1cis) se reconocen generalmente como las fracciones de AG de mayor concentración en la grasa láctea bovina (Cuadro II).

De acuerdo a la longitud de cadena, los ácidos grasos se clasifican en ácidos grasos de cadena corta (4-12 átomos de carbono), los de cadena media (14-16 átomos de carbono) y los de cadena larga (18 a 22 átomos de carbono). Estos, a su vez, pueden ser saturados (SAT) o insaturados (INSAT) de acuerdo a la presencia de uno a 4 dobles enlaces (Chilliard et al. 2000). Moate et al. (2007) resumiendo 28 estudios en condiciones pastoriles y raciones completamente mezcladas (TMR) reportan que las concentraciones de AG promedio en leche implican aproximadamente el 60% de SAT, 30% monoinsaturados (MONO) y 5% polinsaturados (PUFA), y un cociente n-6/n-3 alrededor de 3,0. Aproximadamente 4% son AG *Trans*, en su mayoría pertenecientes a la fracción *Trans*-vaccénico (*trans*-C:18:1) (Moate et al. 2007).

Cuadro II. Promedio de ácidos grasos en la leche.

Ácidos grasos (mg/g)	Media	SEM
4:0	31,3	6,8
6:0	19,4	5,2
8:0	11,7	3,5
10:0	24,8	7,3
12:0	29,9	8,5
14:0	103,8	17,1
14:1	10,8	3,6
15:0	10,5	3,3
16:0	251,8	49,8
16:1	17,3	6,3
17:0	7,3	3,5
18:0	105,1	35,9
18:1 <i>cis</i>	205	53,5
18:1 <i>trans</i>	42,5	26,3
18:2 <i>cis</i> (n-6)	31,1	21,3
18:2 (CLA) ¹	10,3	6,6
18:3(n-3)	5,9	3,6
20:5 (EPA) ¹	1,0	1,1
22:6 (DHA) ¹	0,7	0,7
Saturados	588,3	168,9
Monoinsaturados	275,6	89,7
Polinsaturados	49	33,3

¹ CLA = ácido linolénico conjugado, EPA = ácido eicosapentanoico, DHA = ácido docosahexaenoico.
Adaptado de Moate et al. (2007).

b) Síntesis y secreción de las proteínas y glóbulos grasos de la leche

Las células secretoras de la glándula mamaria son células epiteliales agrupadas en forma de alvéolos conectados al tejido ductal. Estas células poseen características biosintéticas y secretorias especializadas, con capacidades altamente desarrolladas, incluyendo numerosas mitocondrias, una extensa red de retículo endoplásmico rugoso, y un aparato de Golgi bien desarrollado. Los componentes que se secretan, incluyendo los glóbulos grasos y vesículas de caseína se encuentran yuxtapuestos a la membrana apical de estas células. Las células epiteliales secretoras son rodeadas por una capa de células mioepiteliales, las cuáles se pueden contraer y expeler leche en los conductos en respuesta a la oxitocina. Los alvéolos están altamente vascularizados para asegurar un flujo constante de los precursores metabólicos necesarios para la síntesis y la secreción láctea (Farell et al. 2006).

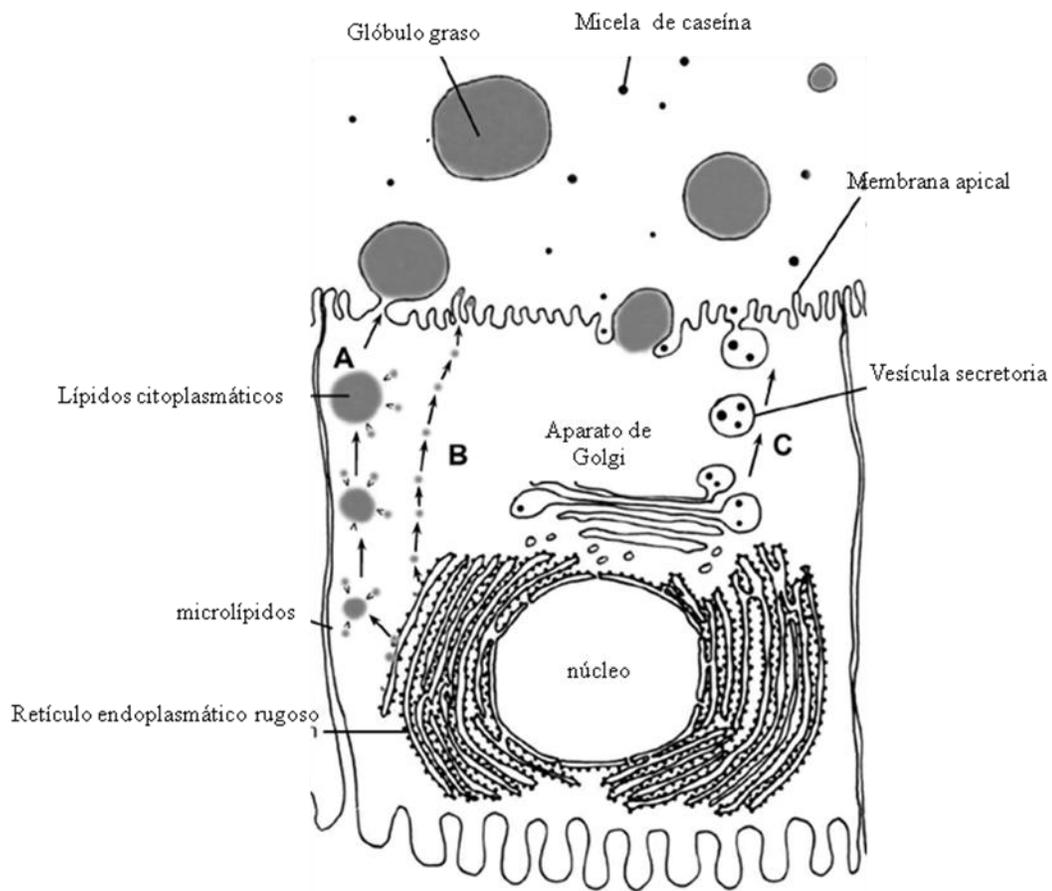


Figura 2. Resumen de las vías de tránsito y secreción de caseínas y glóbulos grasos en las células epiteliales de la glándula mamaria durante la lactancia. A= vía citoplasmática del glóbulo graso; B=microlípidos; C=vía secretoria de la caseína de la leche. Adaptado de Mather y Keenan (1998).

Las caseínas se sintetizan exclusivamente en la glándula mamaria y sus precursores primarios son los aminoácidos (AA) extraídos de la sangre, que provienen de la dieta, la síntesis microbiana ruminal o el catabolismo muscular (Bequette et al. 1998). Estos AA

se transportan activamente a las células epiteliales de la glándula mamaria y se ensamblan en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso altamente desarrollado (Farell et al. 2006). Hay dos tipos de transportadores específicos de AA: transportadores Na^+ dependiente los cuales requieren un gradiente de concentración positiva de Na^+ para dirigir el movimiento de AA a través de la membrana e incrementar la concentración de AA intracelular, y el segundo tipo es Na^+ independiente, el cual opera mediante diferencia de concentración de AA. Este último transportador presenta inhibición por competición, debido a que varios AA comparten el mismo transportador. La concentración total de AA en las células de la glándula mamaria depende: 1) número de células mamarias 2) número de transportadores presentes en cada célula 3) nivel de actividad de los transportadores (controlado por la concentración de Na^+) y 4) concentración intracelular y extracelular de AA individuales (Mass et al. 1997).

La síntesis proteica en la glándula mamaria comienza a partir de la regulación de la expresión génica que luego de transcribir la información genética se traduce en proteínas en el retículo endoplasmático rugoso, las mismas son transportadas a través del aparato de Golgi donde se fosforilan y se forma la micela para finalmente secretarse desde la membrana apical de la célula vía exocitosis (Figura 2) (Maas et al. 1997).

Los ácidos grasos (AG) de la leche se originan de 3 fuentes principales: síntesis *de novo* en la glándula mamaria, absorbidos desde el tracto gastrointestinal (directamente de la dieta, formado en el rumen por biohidrogenación o síntesis bacteriana) y del catabolismo de las reservas corporales (Chilliard et al. 2000; Stoop et al. 2009).

La célula mamaria sintetiza AG *de novo* a partir del acetato y de un cuerpo cetónico, el βOH -butirato, ambos aportados por la sangre y no a partir de la glucosa como en la mayoría de las especies monogástricas. El acetato y βOH -butirato derivados de la digestión de la fibra en el rumen son utilizados en el citoplasma de la célula epitelial mamaria, para sintetizar AG de cadena corta y media (C4:0 al C14:0) y porción del AG palmítico (C16:0), por parte de las enzimas Acetil CoA carboxilasa (ACC) y AG sintasa (FAS) (Bauman et al. 1970).

Los AG preformados representan los AG que se absorben de la digestión y se movilizan de las reservas grasas del cuerpo, éstos están representados por AG de cadena larga ($\geq\text{C17:0}$) y porción de AG palmítico (C16:0) (Dils, 1986). Los AG de la dieta se transportan como TG en VLDL, y la absorción mamaria depende de la acción de la lipasa lipoproteica que reside en la pared capilar de la célula. Los AG de cadena larga que se liberan de las reservas grasas de cuerpo se transportan como AG no esterificados (NEFA), y la absorción mamaria es proporcional a la concentración del plasma. Los NEFA representan en su mayoría C16:0 y C18:0 y *cis*-9 C18:1 y en menor concentración C14:0, *cis*-9 C16:1, C17:0 y *trans*-11 C18:1 (Chilliard et al. 1984). Los AG de cadena larga (con 16 o más átomos de carbono) son potentes inhibidores de la síntesis de AG en la células mamarias por efecto directo sobre las enzima ACC. Así, cuando los AG de cadena larga están disponibles ya sean de la dieta, o de la movilización de las grasas de cuerpo, hay una disminución del porcentaje de AG de

cadena-corta y cadena-media (C8:0 a C14:0 o C16:0) en la grasa láctea (Chilliard et al. 2000).

Las células secretorias mamarias completamente desarrolladas expresan un alta actividad de la enzima Δ -9 desaturasa, que convierte el ácido esteárico (C18:0) en ácido oleico (cis-9 C18:1), así como de ácido palmítico (C16:0) a ácido palmitoleico (C16:1) o ácido mirístico (C14) a ácido miristoleico (C14:1) (Chilliard et al. 2000). El 40% del ácido esteárico que es tomado por las células de la glándula es desaturado, lo que contribuye más de un 50 % de ácido oleico que es secretado en la grasa láctea (Enjalbert et al. 1998). Además, el ácido vaccénico (*trans*-11 C18: 1) formado en el rumen y absorbido en el intestino puede ser desaturado para formar el ácido ruménico, es decir cis-9 trans-11 C18:2. Éste es el isómero principal de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche de rumiantes (Griinari & Bauman, 1999).

Los triglicéridos de la grasa láctea se sintetizan en la superficie del citoplasma del retículo endoplásmico liso de células epiteliales mamarias (Figura 2). Los lípidos de la leche (triglicéridos) se sintetizan a partir de los ácidos grasos (*de novo* o preformados) y glicerol por la vía del glicerol fosfato (Bauman & Davis 1974). Una vez sintetizados, los TG se acumulan en pequeñas gotitas citoplasmáticas estabilizadas por una capa externa de fosfolípidos, que aumentan de tamaño en el curso de su migración hacia el polo apical de la célula. Allí las gotitas son secretadas a la luz del acino envueltas en fragmentos de membrana apical. Los glóbulos grasos de la leche se componen entonces de un núcleo de TG apolar rodeado por una o varias membranas lipoproteínas que permiten una emulsión fina y estable de los lípidos en la fase acuosa de la leche (Mather & Keenan, 1998).

c) Activación de la secreción láctea: lactogénesis

La lactogénesis es el inicio de la síntesis láctea, que ocurre al final de la preñez y primeros días postparto, que se divide en un proceso de diferenciación (etapa I) y otro activación (etapa II) basado en diferencias en la secreción láctea, expresión génica y propiedades funcionales y estructurales de las células alveolares (Neville et al. 2002). La etapa I comienza pocas semanas antes del parto y se caracteriza por diferenciación citológica y enzimática de células epiteliales alveolares. Hay síntesis creciente de ACC, FAS y aumentos en la absorción de los aminoácidos, de glucosa y substratos para la producción de leche (Rudolph et al. 2003). Durante el último tercio de preñez la glándula mamaria desarrolla la capacidad de síntesis la leche, pero la secreción láctea no ocurre hasta el momento próximo al parto.

En la etapa II comienza la secreción copiosa de todos los componentes de la leche en los días próximos al parto y se extiende algunos días postparto. Disminuye la progesterona y aumentan las concentraciones en sangre de prolactina y de glucocorticoides que estimulan la secreción láctea (Goff & Horst, 1997). En el parto, no sólo aumenta rápidamente el flujo sanguíneo, sino también las células mamarias tienen la capacidad de absorber cantidades crecientes de substratos metabólicos de la sangre. Por ejemplo, el ingreso de glucosa a la glándula mamaria, que es el mayor precursor de lactosa,

incrementa su capacidad por nueve, un día después del parto comparado con los días 7-9 preparto (Davis et al. 1979). Este rápido incremento de transporte es probablemente resultado del incremento de la actividad celular individual y no sólo por el aumento en el número de células mamarias en ese corto período de tiempo (Finucane et al. 2008). Por lo tanto, la etapa I de la lactogénesis se puede caracterizar por cambios químicos graduales y cambios morfológicos, y la etapa II es el resultado de la precisa regulación del *status* metabólico del animal para favorecer la gran demanda de substratos de la glándula mamaria.

Hay tres categorías de hormonas implicadas en la lactogénesis. Los niveles de las hormonas reproductivas, incluyendo estrógenos, progesterona, placenta lactogénica, prolactina y oxitocina, tienen acción directa en la glándula mamaria (Neville et al. 2002). Otro grupo de hormonas, son las hormonas metabólicas, responsables primarias de coordinar y adaptar las respuestas a los cambios metabólicos (Neville et al. 2002). A su vez, los glucocorticoides e insulina actualmente son reconocidas como hormonas que estimulan la síntesis de proteínas y grasas de la leche (Rosen et al. 1999; Coleman y Lee, 2004). Una tercera categoría de hormonas, recientemente reconocidas, son las hormonas mamarias, de las cuales hasta ahora se han identificado GH (Mol et al. 2000), prolactina (Clevenger & Plank, 1997), péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrp) (Lippuner et al. 1996) y leptina (Woodside et al. 2000).

La diferenciación de la glándula mamaria bajo el control hormonal corresponde a modificaciones de los perfiles de transcripción en la glándula, que resultan de cambios en los sistemas de genes expresados en la glándula mamaria. De éstos, los genes de la proteína de leche han sido bastante estudiados, pero la regulación de su expresión ha sido parcialmente descrita (Olliver-Bousquet & Devinoy, 2005). Los genes de la proteína de leche poseen regiones reguladoras que forman un sistema complejo de factores de transcripción, que son activados por las hormonas lactogénicas. Estas regiones son llamadas Composite Response Element o CoRE (Rosen et al. 1999) y son relativamente constantes entre diferentes especies. La combinación única de estos factores de transcripción en la glándula mamaria, va a determinar la expresión de los genes de las proteínas de la leche. Por ejemplo, Stat5, es la señal de transducción primaria y más estudiada (Yang et al. 2000). Implica la transcripción inducida por prolactina, GH e IGF-1 del gen de la β -caseína. La señalización implica la activación la Janus Kinasa 2 (Jak2) y su unión al receptor (Yang et al. 2000). Los genes que codifican las enzimas ACC, FAS, lipasa lipoproteica de la síntesis grasa han sido poco estudiados aún. La vía principal de regulación propuesto es la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides 1 (SREBP-1) (Harvatine & Bauman, 2006). Aunque se conoce que ésta es la principal vía de regulación de enzimas lipogénicas, aún no se conoce con claridad cómo se desencadenan directamente la vía de la SREBP (Harvatine & Bauman, 2006). Se ha propuesto la regulación hormonal, a través del estímulo de hormonas como la leptina, prolactina e insulina (Rudolph et al. 2003) o ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que podrían disminuir la expresión de los mRNAs para las enzimas lipogénicas reguladas por SREBP-1c, incluyendo la ACC y FAS (Coleman et al. 2004).

d) Período de transición

Las vacas lecheras experimentan grandes adaptaciones metabólicas entre las últimas semanas de la preñez y la lactancia temprana. Este mecanismo de regulación involucra la coordinación y orquestación de cambios en el metabolismo de los tejidos/órganos del cuerpo necesarios para apoyar la lactogénesis (Baumam & Currie, 1980). La etapa denominada de “transición a la lactancia” en la vaca lechera se encuentra comprendida dentro de las tres semanas previas al parto y tres semanas posteriores al mismo (Grummer, 1995). Durante este período las vacas experimentan altos requerimientos impuestos por la finalización de la gestación y el comienzo de la lactancia, junto a una disminución del consumo voluntario del 30 al 35% (con respecto al inicio del período seco). Esta diferencia entre los requerimientos y la capacidad de consumo de los animales, genera un balance energético negativo en la vaca en producción (Grummer, 1995).

Las demandas energéticas de la lactancia temprana en los ganados lecheros se cubren con una respuesta fisiológica coordinada que provoca la partición de los nutrientes para la producción de leche. Se asocia a la expresión de las hormonas metabólicas dominantes que causan cambios en la sensibilidad hormonal específica de los tejidos (Bell, 1995). Entre las hormonas implicadas, la GH asume un papel fundamental en el metabolismo lipídico y de los carbohidratos. Una amplia cantidad de tejidos son afectados por la GH en vacas en lactancia, pero los eventos que ocurren en el hígado, en el tejido adiposo y en el tejido muscular parecen ser los más importantes. En el tejido adiposo, la GH aumenta la lipólisis y las concentraciones NEFA en sangre (Drackley, 2000). En el hígado, el aumento en el GH estimula la gluconeogénesis que cumple el requisito para la síntesis mamaria de la lactosa (Bell, 1995). El estímulo en la gluconeogénesis causada por el GH implica un efecto directo sobre la vía gluconeogénica, así como también produce un efecto indirecto de la GH como antagonista de la acción de la insulina de forma tal que, la glucosa este dirigida a la glándula mamaria por la concentración baja de la insulina (Etherton & Bauman, 1998).

La relación entre los niveles sanguíneos de insulina y de GH es importante, debido a que cada hormona afecta la lactancia de manera opuesta. Las vacas de alta producción tienen altas concentraciones de GH, bajas concentraciones de glucosa y bajas concentraciones de insulina (Bauman, 1999). Las elevadas concentraciones de GH promueven la movilización del tejido adiposo y el aumento de las concentraciones en sangre de NEFA. Los NEFA pueden ser utilizados para la síntesis de grasa butirosa. Las bajas concentraciones de insulina redirigen a la glucosa hacia la glándula mamaria. Las vacas de menor producción tienen menores concentraciones de GH y mayores concentraciones de insulina (Bauman, 1999). Su capacidad de movilizar NEFA es menor y una mayor cantidad de glucosa es destinada a tejidos extra mamarios. Estas características son las que llevan a una menor producción láctea (Bauman, 1999).

e) Calidad composicional de la leche: salud humana y aptitud tecnológica

Calidad es “el conjunto de características de una entidad que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades establecidas e implícitas”. También podría decirse que es la “conformidad con los requisitos” y el “grado de excelencia” (ISO 8402, 1986). En la definición de “calidad”, interviene el factor “percepción” del hombre, y no obedece a una apreciación estrictamente tecnológica en la que el concepto queda bien descrito por parámetros numéricos.

Actualmente, el mercado internacional ha incrementado la demanda de alimentos de alta calidad en lo que refiere a nutrición y seguridad. Por lo tanto, se ha comenzado a generar desarrollo biotecnológico con el interés de manipular la composición de la leche con el objetivo de: 1) mejorar la manufactura y procesamiento de la leche y productos lácteos; 2) alterar el valor nutricional de la leche en confort de los regímenes dietarios; 3) utilizar la leche o los productos lácteos como un sistema de transporte de sustancias nutraceúticas que son conocidos por sus beneficios en la salud humana (Jenkins & McGuire, 2006).

El interés creciente sobre los aspectos saludables y terapéuticos de la leche (Bauman et al. 2006), así como modificaciones tecnológicas y sensoriales de los productos lácteos, genera oportunidades para la “leche de diseño”: mediante la modificación del perfil de ácidos grasos para incluir ácidos grasos más saludables, tales como CLA y Ω -grasas, perfiles mejorados de aminoácidos, más proteína, menos lactosa, y la ausencia de la β -lactoglobulina (β -LG) son algunas oportunidades para alterar la composición de la leche (Cuadro III). Como resultado se obtendrá mejores beneficios para la salud humana y aumento de la rentabilidad de los productos manufacturados (Sabikhi, 2004).

Las proteínas de la leche son precursores de muy diversos péptidos biológicamente activos (Moller et al. 2008). Entre ellos hay péptidos opioides (casoxinas, casomorfinas, exorfinas, y lactorfinas) que afectan a la motilidad intestinal, péptidos transportadores de minerales a través de la pared intestinal (caseinofosfopéptidos), péptidos inhibidores de la enzima angiotensina, péptidos antimicrobianos, antitrombóticos, etc. Entre ellos también se encuentran algunos con propiedades inmunoestimulantes. Así, se ha demostrado que péptidos procedentes de las β -caseína, que estimulan la proliferación de linfocitos en humanos y la actividad fagocitaria de los macrófagos (Meisel & Schlimme, 1990).

Estudios recientes han demostrado las ventajas significativas y específicas de los AG de la leche sobre la salud humana, contrario a la percepción pública generalmente negativa de ser un alimento que contiene alto contenido de grasas saturadas. El consumidor asocia a menudo la grasa saturada a riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. Sin embargo, los ácidos grasos saturados en grasa láctea varían en su estructura y muchos son neutrales o no tienen ningún efecto sobre el colesterol del plasma (Bauman, 2006). Estudios epidemiológicos no han encontrado ninguna asociación o una asociación beneficiosa leve entre consumo de leche y productos lácteos con variables de riesgo de aterosclerosis (Bauman, 2006). Además, ácidos grasos presentes en grasa láctea han

demostrado tener efectos beneficiosos (Cuadro III). El ácido linoleico conjugado (CLA) se compone por una serie de isómeros con beneficios potenciales sobre la salud humana: inhibición de la carcinogénesis y de la aterogénesis, antioxidantes, mejoradores de la capacidad del sistema inmune, prevención de la obesidad, efectos antidiabéticos y mejoras en la mineralización ósea (Bauman et al. 2001). La alimentación pastoril es favorable en la obtención de leches con mayor contenido de CLA respecto a sistemas de alimentación con raciones completamente mezcladas (TMR) (Schroeder et al. 2003). Esto sitúa al sistema productivo regional en base de pasturas en una posición ventajosa respecto a la producción de leche en otros países basada en estabulación. Esta área de investigación ha tenido un gran desarrollo en la última década, ya que es posible a través de la nutrición mejorar la calidad de la leche y tener un impacto natural sobre la salud humana. Sin embargo, no hemos encontrado ningún estudio realizado en nuestro país al respecto.

La proteína de la leche es el componente más valioso para la industria láctea internacional (Doepel et al. 2004) y nacional (Bertini, 2006). La proteína y la grasa en la leche influyen sobre las características del alimento, pero la capacidad de la leche de impartir características deseables al alimento es influenciado sobre todo por las características físicas funcionales de los componentes de proteína de leche (Mulvihill & Fox, 1994). La modificación de las fracciones de caseína permite la diferenciación de acuerdo a sus propiedades y otorga la capacidad de diseñar propiedades requeridas para usos específicos (Hui, 1993; Walstra, 1999). Las propiedades físicas más importantes o que van a influir los productos lácteos son: solubilidad, retención de agua, viscosidad, congelación, estabilidad al calor, cuajado, formación de espuma, y propiedades emulsificantes (Hui, 1993). Como por ejemplo, una mayor concentración de κ -caseína en la leche está relacionada con una mayor estabilidad al calor y mejora de las cualidades de las propiedades del queso; a su vez, mayor concentración de β -caseína está asociada a mayor concentración de calcio total en la leche (Sabikhi, 2004).

El otro sólido de gran valor y por lo tanto que la industria también paga por su contenido, es la la grasa de la leche. Cambios de la composición relativa de ácidos grasos de la leche provocan modificaciones tecnológicas y sensoriales en los productos lácteos, incluyendo aspectos tales como su características físicas (punto de fusión y dureza de la mantquilla, cristalización y del fraccionamiento de la grasa láctea). Mayor contenido de PUFA en la composición de la grasa láctea, ya sea en condiciones de TMR con suplementación con alto contenido de PUFA (Middaugh et al. 1988) o dieta pastoril (Fox & McSweeney, 1998), se asoció con una manteca más suave, con mejores características de procesamiento y de almacenaje que aquellas en condiciones TMR sin suplementación.

Cuadro III. Componentes bioactivos de la leche que tienen acción específica mejoradora de la salud humana.

Función específica	Componentes lácteos	
	Proteínas	Lípidos
Cáncer	Proteínas del suero	Ác. Linoleico conjugado
	Caseínas	Ác. Vaccénico
	Lactoferrina	Esfingolípido
	Lactoalbúmina	Ác. Butírico
	Péptidos	Ác. 13-metiltetradecanoico
Cardiovascular	Proteínas del suero	Ác. Linoleico conjugado
	Caseínas	Ác. Esteárico
		Ác. Graso $\Omega 3$
Hipertensión	Proteínas del suero	
Inmunidad	Proteínas del suero	Ác. Linoleico conjugado
	Proteínas de la membrana del glóbulo graso	
Hueso	Péptidos	Ác. Linoleico conjugado

Adaptado de Bauman et al. 2006.

f) Evolución y perspectivas de la calidad de leche en Uruguay

En el Uruguay, el sector lácteo es responsable del 10% del producto bruto agropecuario. La producción de leche *per cápita* es indudablemente la más alta de toda América, estando en el orden de los 438 L. hab/año. Las exportaciones de productos lácteos totalizaron 64 % en relación al volumen total disponible en 2009, fundamentalmente como productos básicos (leche en polvo, quesos), por lo que cobran relevancia el contenido de sólidos de la leche, consecuentemente la industria ha impuesto un sistema de pago de acuerdo a los mismos (DIEA, 2009).

El sistema de pago mediante control de la calidad en Uruguay comenzó en el año 1963 con la Reglamentación “Leche Calificada” que otorgaba 15% sobreprecio a aquellas empresas que cumplían condiciones de infraestructura edilicia (pisos y paredes lavables, ventilación, condiciones para el ordeñador, análisis del agua de la finca, carné de salud de los empleados) y sanidad del ganado (Antiaftosa, Carbunco, Cepa 19 a terneras, tuberculina anual y California Mastitis Test para determinar sanidad de ubres). En el año 1976 se incorporaron técnicas para evaluar la calidad higiénica de la leche otorgando una bonificación máxima del 10 % (de Torres et al. 2006). Las técnicas de Reductasa y Lactofiltro miden indirectamente la actividad de la enzima reductasa indicadora de actividad bacteriana. Estas pruebas se mantuvieron vigentes hasta 1997. A partir del año 1993 se iniciaron estudios para cambiar los parámetros para el pago de la leche por calidad. En el año 1995 el Poder Ejecutivo aprobó el decreto del Sistema Nacional de Calidad de Leche, que empezó a aplicarse en 1997. Dicho sistema establece dos mediciones básicas: recuento bacteriano, que es indicativo de actividad de microbiana en la leche y responde fundamentalmente al manejo de la higiene de instrumentos y

rutina de ordeño y recuento de células somáticas, que evalúa la presencia de células inflamatorias indicadora de enfermedades a nivel de la ubre (CEPAL, 1999).

En el Sistema Nacional de Calidad de la Leche actualmente vigente (última modificación año 1999) deja librado a la Industria la posibilidad de crear categorías superiores con bonificaciones extraordinarias. Actualmente, los parámetros que se establecen para el sistema de pago de la leche son los sólidos contenidos en esa leche, así como su calidad higiénica sanitaria, porque en este nuevo esquema el valor de la materia prima está muy fuertemente vinculado a su aptitud industrial y las exigencias del consumidor. El sistema vigente, aumenta un promedio de 2,5% el precio del litro de leche al incrementar un 10% su tenor graso, mientras que el aumento en el contenido de proteína en un 10% significó un aumento del 6%, lo cual ratifica la importancia otorgada a este último componente por la industria (Bertini, 2006). A su vez, la investigación nacional respecto a calidad de leche en Uruguay se ha limitado a los términos porcentuales de los grandes componentes de la leche (proteína y grasa), y no a la maximización de estos componentes nutracéuticos de forma natural, es decir, hoy, el agregado de alguno de estos elementos es netamente artificial a nivel industrial. Por ejemplo, actualmente la industria enriquece la leche con ácidos grasos n-3 a partir de aceite de pescado; en contraste con las políticas nacionales exportadoras que posicionan a nuestro país de “Uruguay Natural”(decreto N° 328029). Resulta prioritario que Uruguay como país, genere su mensaje claro, sólido, inteligente y coherente acorde a esa imagen: desde maximizar la calidad de la leche de forma natural a la correcta aplicación de los elementos básicos de identificación visual de los productos.

A nivel regional, en Argentina (INTA Balcarce) las investigaciones están constituyendo un criterio internacional de valorización de la leche para su exportación producida en sistemas pastoriles (Gagliostro et al. 2002; Schroeder et al. 2003). Sus resultados indican que las concentraciones de CLA en la leche producida, pueden ser amplificadas mediante una suplementación estratégica con girasol y con soja en el sistema pastoril (Gagliostro et al. 2002; Schroeder et al. 2003). A su vez, la Compañía Nestlé® en Chile está desarrollando una línea de establecimientos comerciales estandarizada con mayor contenido de CLA en la leche mediante alimentación diferencial en vacas lecheras en sistema pastoril (Avilez et al. 2009). A nivel nacional no se han encontrado aún estudios al respecto.

g) Efecto de la categoría animal sobre la producción de proteínas y ácidos grasos

La glándula mamaria es metabólicamente más activa en vacas multíparas que en vacas primíparas, especialmente en el inicio y en el pico de la lactancia (Knight & Wilde, 1993; Miller et al. 2006). Knight & Wilde (1993) reportaron mayor contenido de tejido secretor en vacas multíparas que en primíparas medido a través de imágenes de resonancia magnética. Miller et al. (2006) estudiaron valores sobre la expresión de genes relacionado con la actividad metabólica, identificando menores niveles de proteínas que codifican FAS en tejido mamario en vacas primíparas que en vacas multíparas. A su vez, Miller et al. (2006) reportaron menor contenido de DNA en la glándula mamaria en vacas primíparas, lo que refleja menor número de células epiteliales. Esto podría sugerir menor producción de proteína y grasa de la leche en vacas primíparas en la

lactancia temprana relacionadas, por lo menos, a una densidad más baja de células secretoras.

Por otro lado, las vacas multíparas tienen mayores reservas corporales (Drackley et al. 2003) y una mayor capacidad de consumo (Ingvarsen, 1994; Maekawa et al. 2002) que conducen a una mayor disponibilidad de sustratos para la síntesis de proteínas y grasas de la leche, en contraste con las vacas primíparas que continúan su propio crecimiento en la primera lactancia.

Respecto a la importancia de la paridad sobre las fracciones de caseínas, Kroeker et al. (1985) observaron que vacas multíparas presentaron mayores concentraciones de α -caseína y menores concentraciones de β -caseína que en vacas primíparas, sin encontrar diferencias en κ -caseína. A su vez, Ng-Kwai-Hang et al. (1987) encontraron únicamente que la fracción de β -caseína disminuía con la paridad.

Con respecto al efecto de la paridad sobre AG, se ha reportado únicamente el estudio de Kelsey et al. (2003) sobre fracciones de ácidos grasos en leche, hallando efecto de la paridad sobre el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) pero no encontraron diferencias en CLA.

h) Efecto del balance energético y la nutrición sobre producción de proteínas y ácidos grasos

La nutrición ofrece los medios más eficaces para alterar rápidamente la composición de leche. Casi todos los componentes de la leche pueden modificarse con la nutrición; sin embargo, el potencial de cambio varía según el componente. Generalmente la grasa total y la composición de ácidos grasos de la grasa láctea son los más favorables al cambio, mientras que la lactosa es menos favorable y la proteína es intermedia (Jenkins & McGuire, 2006). Los cambios en la composición de leche no son siempre obvios. Por ejemplo, la concentración de la proteína total puede seguir siendo constante pero pueden ocurrir cambios significativos en el cociente de la caseína/proteína del suero. Esto ha sido reportado en estudios (Jenkins & McGuire, 2006) donde se ha suplementado con diferentes tipos y niveles de grasa, evidenciando aumentos en las proteínas del suero y disminución de caseínas totales a igual producción de proteína total en vacas suplementadas y no suplementadas. Esto sugiere, que al aumentar los AG en la sangre por la suplementación con grasa, disminuye la liberación de GH, lo cual reduce la extracción de AA por parte de la glándula mamaria.

De igual forma, cambios sustanciales pueden ocurrir en la composición de ácidos grasos de la grasa láctea sin alteraciones en su contenido total de la grasa láctea. A modo de ejemplo se ha observado aumento en el contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) ácido docosahexaenoico (DHA) en vacas suplementadas con grasas de *bypass* (Carriquiry et al. 2009).

Generalmente aumentando la energía de la dieta, fundamentalmente aumentando la relación concentrado/forraje, aumenta el contenido proteínico de la leche (DePeters &

Cant, 1992). El carbohidrato dietético fácilmente fermentable ha estado asociado a mayor contenido proteínico de leche. Se han realizado una serie de experimentos (Griinari et al. 1997; Bequette et al. 2001) que evalúan la fermentación del almidón y la producción del propionato en el rumen y los efectos de las concentraciones de insulina sobre el contenido proteínico de la leche, mediante el método de clamp-hiperinsulinémico. La infusión abomasal combinada, de insulina y AA o caseína produjo aumentos sustanciales (10%) en el contenido de proteína en la leche, pero no observaron cambios la relación caseína/proteínas del suero. Estos resultados pueden explicar cómo los cambios en la relación forraje/concentrado regulan la producción de la proteína de leche, ya que el carbohidrato rápidamente fermentable produce gran proporción de propionato y de proteína microbiana. Por otro lado, se han realizado infusiones del glucagón, una hormona gluconeogénica y antagonista de la insulina, produciendo disminución de la proteína de leche (Hippen et al. 1999). El mecanismo potencial es que el glucagón promueve la gluconeogénesis del hígado a partir de AA de la sangre, limitando la disponibilidad AA gluconeogénicos para la síntesis de la proteína de leche (Bobe et al. 2003). A su vez, las infusiones del glucagón alteraron la composición de la proteína de leche, obteniendo mayores concentraciones de κ -caseína (Bobe et al. 2008). La inhabilidad de la vaca postparturienta de consumir la suficiente proteína para cumplir requisitos mamarios, incluyendo una demanda significativa para la gluconeogénesis hepática, hace necesario la movilización de la proteína del tejido durante las primeras 2 semanas de la lactancia. Mucha de esta proteína movilizada deriva de los tejidos periféricos, especialmente músculo esquelético y, en un grado inferior la piel (Bell, 1995).

Las medidas de condición corporal han resultado ser un buen estimativo de los balances energéticos de la vaca lechera durante el pre y post-parto (Roche et al. 2009). En el estudio realizado en nuestro país (Krall & Bonnacerrere, 1997), observaron que por cada unidad de incremento en la condición corporal al parto, el porcentaje de proteína en leche aumentó 0,12%. A su vez, Ostersen et al. (1997) no observaron efecto del BCS al parto sobre las fracciones de caseínas en dieta TMR. No hemos encontrado otros trabajos que hayan relacionado la nutrición con las fracciones de caseínas.

El contenido de grasa aumenta linealmente con el aumento de BCS (0.1 kg grasa, por 0,5 unidad de BCS al parto (Roche et al. 2007). Esto refleja probablemente la disponibilidad creciente de NEFA de la mayor movilización de grasa corporal, en la lactancia temprana (Roche et al. 2007). Más del 40 % de la grasa butirosa de la leche producida en los primeros días de lactancia es sintetizada a partir de las reservas grasas movilizadas (Bell, 1995). Teniendo en cuenta que la composición del tejido adiposo va a estar influenciado por las condiciones alimenticias (Chilliard et al. 2000), se ha encontrado en vacas de carne a nivel nacional (Realini et al. 2003) e internacional (Noci et al. 2005) que vacas alimentadas en condiciones pastoriles tuvieron mayores concentraciones de MUFA y PUFA en el tejido adiposo.

Mayores condiciones corporales al parto (Agenas et al. 2003) inducidas un mes antes del parto redujeron la concentración de SAT y ácido palmítico (C16) e incrementaron la proporción de ácido oleico (C18:1) cuando las vacas pastorearon una pastura anual

(Stockdale et al. 2005). A nivel nacional no se han reportado aún estudios sobre el efecto de la BCS sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos en vacas lecheras en condiciones pastoriles.

i) Efecto del biotipo lechero sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos

El efecto de la genética sobre la composición de fracciones lipídicas y nitrogenadas - especialmente producción diferencial de caseínas - ha sido escasamente estudiado. La diferencia entre razas en cuanto a la producción de fracciones de ácidos grasos y caseínas puede tener una implicancia en el consumo de los productos lácteos con enfoques en salud: pudiendo elegir entre leches con menos contenido de ácidos grasos *trans* (C18:1; ej. Jersey; Carroll et al. 2006) o con mayor contenido de CLA (Holando) (White et al. 2001; Kelsey et al. 2003). Recientemente en nuestro país, el ingreso del biotipo Holando neozelandés u otros biotipos, ha incrementado debido otras cualidades como eficiencia de alimentación, pero hay escasos trabajos relacionados con la calidad composicional de la leche.

De acuerdo al contenido de caseínas totales en leche se ha reportado menor contenido en vacas Holando y mayor contenido en vacas Jersey (DePeters & Cant, 1992) en sistemas de confinamiento. Por el contrario, en similar sistema productivo al estudio previo, Carroll et al. (2006) no encontraron diferencias en el contenido total de caseínas entre biotipos Holando, Jersey y Pardo Suizo. Sin embargo, no hemos encontrado aún reportes asociados a fracciones de caseínas.

Referente a las fracciones de AG, Stull & Brown (1964) encontraron pequeñas diferencias entre Holando, Guernesey y Jerseys: las vacas Holando presentaron menores concentraciones de C10:0 y C12 y mayores de C16:1 y C18. White et al. (2001), Kelsey et al. (2003) encontraron, que las vacas Holando produjeron concentraciones más altas de CLA que las vacas Jersey y Pardo Suiza sin haber interacciones entre sistemas de producción confinamiento vs pastoreo (White et al. 2001). Esto está de acuerdo con Capps et al. (1999), Beaulieu & Palmquist (1995), Kelsey et al. (2003), y Carroll et al. (2006) en condiciones con TMR, reportando que las vacas Jersey obtuvieron mayor proporción de AG de cadena corta y AG de cadena media vs. Holando que tuvo mayor proporción de AG de cadena larga. A su vez, Carroll et al. (2006) identificó menor proporción de AG *Trans* en vacas Jersey que en vacas Holando.

La genética de la vaca lechera en nuestro país proviene fundamentalmente de Estados Unidos y Canadá (INML, 2009), países con sistemas estabulados, sin caminatas, dietas con TMR, y criterios de pago de la leche diferentes al sistema uruguayo. Sin duda la producción del ganado lechero uruguayo ha mejorado, tanto en volumen de producción individual como – aunque en menor grado – por sólidos (DIEA, 2009). La tendencia de las industrias de mejorar la eficiencia del proceso industrial tiene, en la composición de la materia prima nacional, un factor relevante y en tal sentido los estímulos al productor se asocian a dicha condición. De hecho, la proteína que en los últimos años se ha constituido en una parte importante del pago al productor, presenta una tendencia positiva y en alza en producción, sin embargo el nivel de grasas ha tenido un

comportamiento inverso ya que la tendencia es de progresivo descenso productivo (DIEA, 2009).

En la actualidad se reconoce, no obstante, la importancia de las denominadas “interacciones genético ambientales” en producción de leche (Veerkamp et al. 1994; Fulkerson et al. 2001; Kolver et al. 2002; Kennedy et al. 2003), eficiencia de la alimentación (Wang et al. 1992), BCS (Roche et al. 2006), y fertilidad (Kolver et al. 2002), ya que inciden directamente en la rentabilidad de la empresa. Básicamente estos estudios comparan líneas seleccionadas por alta productividad con otras en que su mejoramiento ha incorporado otros aspectos funcionales, cuando ambas son sometidas a diferentes niveles de alimentación. Es así que, por lo general, en sistema pastoril el ganado Holando Americano experimenta limitaciones para cubrir sus requerimientos, lo que disminuye los sólidos totales (Macdonald et al. 2008). En este sentido, a nivel nacional Pereira et al. (2010) si bien encontraron diferencias en la composición de la leche en vacas Holando Americano y cruce Holando Neozelandesa, no encontraron diferencias en la producción de sólidos totales. Por otro lado, encontraron mayor eficiencia en la producción de sólidos de leche por peso metabólico en las vacas cruce Holando Neozelandesa fundamentalmente debido al menor peso vivo de éstas.

En resumen, la información respecto a la manipulación genética de la calidad de leche en términos de fracciones de caseínas y AG es escasa a nivel internacional y prácticamente nula en nuestro país.

CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente los parámetros que se establecen para el sistema de pago de la leche en nuestro país son los sólidos contenidos en la leche, así como su calidad higiénica sanitaria, ya que el valor de la materia prima está muy fuertemente vinculado a su aptitud industrial. A su vez, la leche no es considerada solamente un alimento nutritivo sino también un alimento funcional por poseer acción preventiva y terapéutica frente a enfermedades del ser humano. La composición de las caseínas y AG puede ser mejorada a través de la nutrición y genética en un sentido altamente favorable para la salud humana, lo que tendría a su vez un alto impacto sobre el valor agregado y la diferenciación de la leche y de sus derivados. No existen en Uruguay antecedentes al respecto y este aspecto merece ser explorado en condiciones de alimentación pastoril ya que ésta de por sí ha sido considerada benéfica en los mercados mundiales.

Existen numerosos reportes que relacionan el efecto de la nutrición animal sobre las fracciones saludables de la leche (DePeters & Cant, 1992; Palmquist et al. 1993; Bauman et al. 2006): sin embargo, hay escasos trabajos que relacionan las reservas corporales (BCS) con calidad de leche (en términos de fracciones nitrogenadas y lipídicas; Ostensen et al. 1997; Stockdale et al. 2005). La mayor parte de estos reportes clasifican los animales al parto o al momento del inicio de la transición, por lo que las fracciones de caseínas y ácidos grasos pueden ser afectadas por capacidades inherentes del animal (capacidad de consumo y/o de enfrentar el estrés metabólico del periparto). Por lo tanto, la hipótesis del trabajo fue que el BCS al inicio del período de transición inducido nutricionalmente afecta el perfil de caseínas y AG y ésta respuesta estaría

asociada al medio endócrino/metabólico del animal. Este trabajo se llevó adelante en vacas primíparas y multíparas, debido al grado diferencial de desarrollo mamario y corporal de estas categorías y de la capacidad de enfrentar el período de transición de las mismas (Meikle et al. 2004)

Por otro lado, hay poca o nula información referente a la genética animal sobre fracciones de AG (White et al. 2001; Kelsey et al. 2003 Carroll et al. 2006) y sobre fracciones de caseínas respectivamente. Actualmente en Uruguay se están introduciendo diferentes biotipos lecheros, especialmente de origen Neozelandés, por considerarse más eficientes que el biotipo Holando Americano; y ninguna información ha sido encontrada aún sobre los parámetros mencionados.

Por los motivos expuestos, mediante esta investigación se quiere determinar cómo repercute el balance energético - específicamente el grado de reservas corporales al mes preparto - de vacas primíparas y multíparas sobre los parámetros de calidad de mayor importancia tanto para la industria como para nuestros potenciales consumidores. A su vez, se busca comparar el comportamiento productivo (fracciones de caseínas y fracciones de AG) de diferentes biotipos lecheros en el mismo sistema pastoril. Estos experimentos pueden contribuir a mejorar el manejo nutricional de la vaca seca y a la elección del biotipo lechero para maximizar la calidad de la leche en términos de fracciones de caseínas y AG en la leche.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Contribuir al conocimiento de como la calidad de leche bovina – en términos de fracciones caseínas y ácidos grasos – son afectadas por la paridad, los tratamientos nutricionales durante el período parto y diferentes biotipos lecheros en condiciones pastoriles.

Objetivos específicos:

Determinar las fracciones de caseína y ácidos grasos de la leche:

- En vacas primíparas y multíparas con diferentes grados de reservas corporales al mes parto inducidos por tratamientos nutricionales diferenciales.
- Relacionar el perfil nitrogenado y lipídico de la leche obtenido con el ambiente endócrino metabólico de los animales.
- En vacas primíparas con diferentes biotipos lecheros: Holando Uruguayo (HU), y cruza F1 de HU con Holando Neozelandés (HNZxHU), Jersey (JxHU) y Rojo Sueca RBSxHU asignadas a igual plano nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1: Efecto de las reservas corporales inducidas nutricionalmente durante el parto sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos en leche de vacas Holando primíparas y multíparas

Se seleccionaron vacas Holando primíparas (L1, n = 30) y multíparas (L2, 2 hasta 5 lactaciones; n = 32) con un promedio de producción de leche de 4,800 hasta 6,000 kg a los 305 días de lactancia. El trabajo de campo se llevó a cabo en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”, Facultad de Agronomía, departamento de Paysandú, entre el período del 15 de diciembre de 2006 al 7 de junio de 2007. Esta investigación fue aprobada por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Udelar.

Las vacas se agruparon en bloques según peso vivo y fecha probable de parto, buscando la mayor homogeneidad dentro de los mismos, 100 días antes del parto. Luego, los animales de cada bloque fueron asignados en forma aleatoria a los diferentes grupos. Las vacas debieron perder, mantener o ganar BCS, para lograr los objetivos de tratamientos correspondientes, por lo que diferentes planes de nutrición fueron ofrecidos con aproximadamente 7, 14 o 20 kgMS/vaca/día composición química estimada: 12,7% proteína cruda (PC), 56,7% fibra detergente neutra (FDN), 24,3% fibra ácido detergente (FDA) y 1,25 Mcal/kgMS Energía Neta de Lactación (EN_L) de una pradera establecida de aprox. 3 años con una disponibilidad promedio de 1200 Kg MS/ha.

El estado corporal (BCS) fue evaluado cada 15 días y los animales fueron re-asignados en orden de alcanzar el BCS deseado a los -30 días. Para las evaluaciones de BCS, se utilizó la escala de 1-5 (1= flaca, 5=gorda), de las cartillas de Elanco®, según Edmonson et al. (1989). Sólo los animales que respondieron al tratamiento fueron considerados en el estudio y fueron definidos previamente por Adrienet al. (2010) como: vacas L1 y L2 con alto BCS (L1alto, n=13, L2alto, n=9) tuvieron que ganar 0,5 puntos de BCS, vacas L1 con bajo BCS (L1bajo, n=9) que perdieron 0.5 puntos de BCS, y vacas L2 con bajo BCS que mantuvieron BCS (L2bajo=8) al menos en dos subsecuentes observaciones desde -100 hasta -30 días. A los -30 días, los BCS difirieron entre los tratamientos: 3,4±0.05 vs. 2,9±0.07 para L1alto y bajo, respectivamente y 3,4±0,07 vs 2,9±0,07 para L2alto y bajo, respectivamente.

Desde -30 días al parto, las vacas L1 y L2 fueron manejadas aparte y recibieron una dieta que incluyó heno de Moha *ad libitum* y 4,2 y 5,1 kgMS/vaca/día de ensilaje de maíz de plata entera y 3,7 y 4,6 kgMS/vaca/día de concentrado comercial en vacas L1 y L2, respectivamente, ofrecido una vez al día. Esta dieta tuvo una composición química de 9,5% PC, 54,2% FDN, 30,8% FDA y 1,33 Mcal/kgMS de EN_L, para ambos grupos. Desde el parto hasta los 60 días, las vacas L1 y L2 pastorearon dos veces por día en grupos separados, una pastura de segundo año, mezcla de *Festuca arundinacea*, *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus*, con una asignación diaria de forraje de 30

kgMS/vaca, las cuales fueron asignadas por franjas semanales. La composición promedio de la pastura en todo el período fue 25% MS, 14,2% PC, 49,0% FDN, and 24,5% FDA. Las vacas también fueron suplementadas individualmente con 3,1 kgMS de ensilaje de maíz de planta entera (31,1% MS, 6,9% PC, 65,0% FDN, and 33% FDA) y 3,7 kgMS de concentrado comercial (89% MS, 18,1% PC, 19,2% FDN y 12% FDA) suministrado luego del ordeño de la mañana. A su vez, las vacas recibieron 1,3 kgMS del mismo concentrado comercial en la sala de ordeño durante cada ordeño (AM y PM). La evolución del BCS, parámetros productivos y reproductivos, junto con perfiles endócrinos y metabólicos ya han sido publicados previamente (Adrien et al., 2010).

Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día (5:00 AM y 3:00 PM) y las producciones de cada ordeño fueron registrados. Las muestras para la composición de leche fueron obtenidas a partir de cuatro ordeños por semana de cada vaca y almacenadas en botellas que contenían conservante (Lactopol®, Rodolfo Benzo, Uruguay). Las muestras fueron llevadas al laboratorio y almacenadas inmediatamente en un baño maría de 37° C por 10 minutos para su homogeneizado, y una alícuota representativa se analizó posteriormente para la grasa, la proteína, y la lactosa por espectrofotometría infrarroja (Bentley Instruments, Chaska, EEUU) y para el recuento de células somáticas se usó Fossomatic (Foss electric, Hillerød, Dinamarca). Durante las semanas de la lactancia (SDL) 2 y 8, se tomaron muestras de leche para la determinación de fracción de ácidos grasos y caseínas. Las muestras fueron almacenadas en -20° C sin conservante analizando luego, la composición individual de AG. Las muestras para las determinaciones de la caseína fueron desnatadas por centrifugación (4.000 RPM en 5° C por 20 minutos). Un volumen de 100 µl de leche desnatada fue mezclado con 900 µl de buffer y almacenado en -20° C. El buffer de la muestra (pH=7,5) consistió de 17,5 Mm 1,3-bis [tris (hydroxymethyl)- methylamino] conteniendo propano 7 M urea y de 0,5% de 2-mercaptoetanol (Visser et al. 1991).

Experimento 2: Efecto del biotipo lechero sobre las fracciones de ácidos grasos

El experimento se realizó en un predio comercial del departamento de Flores, Uruguay, entre el 12 de Mayo y 26 de Agosto del 2009. Para determinar las fracciones de AG de la leche se seleccionaron 40 vacas primíparas HU (n=8), HNZxHU (n=10), JXHxHU (n=10), RBSxHU (n=12) de edad promedio (23±1 mes) y se bloquearon por fecha de parto y BCS (30 días antes del parto). El peso vivo y BCS preparto promedio fueron para el HU 439±37 kg; 3,47±0,30, para el HNZxHU 468±34 kg; 3,68±0,3 para el JXHxHU 452±24 kg; 3,64±0,26 y para el RBSxHU 484±43; 3,71±0,36 respectivamente. Las vacas HU fueron la progenie al azar de 3 toros Holando de origen estadounidense y vacas promedio del rodeo HU. Las vacas cruza fueron la progenie de 4 toros HNZ, 4 toros Jersey, 3 toros RBS asignados de modo aleatorio a vacas del mismo rodeo que las HU.

Las vacas desde el preparto (60 días preparto) hasta el postparto (105 días postparto) tuvieron el mismo manejo y asignación nutricional. La dieta preparto consistió en: 6 kgMS/vaca/día de ensilaje de sorgo planta entera, 1 kgMS/vaca/día de sorgo grano húmedo, 2 kgMS/vaca/día de expeller de girasol, 0,1 kg MS/vaca/día de urea y 0,3 kg

MS/vaca/día de una sal comercial preparto. Durante el posparto se manejaron mediante un sistema de pastoreo rotativo de franja diaria, asignando en promedio 12,72 kgMS/vaca/día de una pastura de raigrás (*Lolium perenne*) con disponibilidad promedio de 1679,3 kgMS/ha y una asignación de 13,08 kg/vaca/día de MS de un pastoreo de alfalfa (*Medicago Sativa*) por día con disponibilidad promedio de 1232,9 kgMS/ha. Fueron suplementadas con concentrado de sorgo y trigo de grano húmedo 2,15kgMS/vaca/día. El concentrado, se ofreció en comederos colectivos, luego del ordeño de la tarde.

Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día (6:00 AM y 4:00 PM) y las producciones de cada ordeño fueron registradas. Durante la semana 12 de lactancia (87 ± 18 días) se tomaron muestras para determinar la composición láctea y fracciones de AG. Las muestras para la composición de leche fueron de dos ordeños (AM y PM) de igual fecha de cada vaca y se determinaron posteriormente la concentración grasa, proteína, y lactosa por espectrofotometría infrarroja (Bentley Instruments, Chaska, EEUU) y para el recuento de células somáticas se usó Fossomatic (Foss electric, Hillerød, Dinamarca). Las muestras para AG fueron almacenadas en -20° C sin conservante analizado la composición individual del AG.

Determinación de las fracciones de caseína

El contenido de la proteína total y del suero de la leche fue analizado por el método de Kjeldahl (AOAC, 1980). La proteína total y del suero, fueron obtenidas de la leche desnatada por la precipitación isoelectrica en pH 4,6 por la adición de ácido clorhídrico de 1 M. Una modificación del método propuesto por Visser et al. (1991) fue utilizado para separar las proteínas principales de la leche (α -s1, α -s2, β , κ -caseínas) en una misma corrida (Damián et al. 2008). Las fracciones fueron determinadas por RP-HPLC con una columna del WP ODS del ápice (7 μ m, 4.6×250 milímetros, cromatografía Ltd., Mid Glamorgan, Reino Unido de Jones) mantenidas a 46° C. Las muestras fueron enjuagadas con un gradiente de acetonitrilo en 0,1% (vol./vol.) ácido trifluoracético. Dos solventes fueron utilizados para la fase móvil: A - acetonitrilo-agua- ácido trifluoracético (100-900-1 vol.) y B - la misma mezcla con las proporciones 900-100-0.7 (vol.). Las proteínas fueron enjuagadas con una serie de gradientes lineares: desde 28,7 a 42,5% del solvente B en el solvente A en 15min, 42,5 a 48,8% al solvente B durante 15 minutos, 48,8 a 28,7% del solvente B durante 15, finalizando con 28,7% del solvente B para recalibrar la columna durante 15 minutos. El flujo fue de 1 mL/min y los picos fueron detectados por absorbancia-UV a 214 nanómetros. La cuantificación de las fracciones de la caseína fue hecha por la medida del área máxima para cada fracción como proporción del área máxima de la caseína entera. La concentración de las fracciones de caseínas fueron expresadas como porcentaje relativo de la caseína total (Trujillo et al. 2000).

Determinación del perfil de ácidos grasos

La grasa láctea fue extraída según Folch (1957) (los solventes de extracción son: Metanol y Cloroformo) y luego se realizó una metilación de los ácidos grasos según el

procedimiento del descrito por IUPAC 2.301 (Mossoba et al. 1996). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados utilizando un cromatógrafo gaseoso (Agilent Technologies 6890, Palo Alto, CA, USA) conectado a un espectrómetro de masa (Agilent Technologies 5973) con ionización por impacto electrónico. Se usó una columna capilar SP 2560 (100 m × 0.25 mm i.d. con 0.2- μ m espesor del film; Supelco Inc., Bellefonte, PA). Los valores de temperatura del horno del cromatógrafo gaseoso, los valores de presión y el flujo del gas helio, así como las temperaturas de la fuente de ionización y del cuadrupolo del espectrómetro de masa y el rango de masas fueron descritos previamente. (Moore et al. 2004, 2005). Se identificaron cada uno de los ácidos grasos por su tiempo de retención y el espectro de masa característico. Se cuantificó el porcentaje de cada uno por normalización de las áreas de cada ácido graso, obteniéndose el porcentaje másico de cada uno.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.).

Experimento 1. Los datos de producción y composición de leche, y de las fracciones de caseínas y AG en leche fueron analizados en un diseño de bloques al azar usando medidas repetidas, mediante el procedimiento MIXED, con la SDL; como efecto repetido y la estructura de covarianza autoregresiva de primer orden. El modelo incluyó los efectos del BCS a los -30 días anidado en la paridad, la SDL, y sus interacciones como efectos fijos y el bloque como efecto aleatorio. El procedimiento de Kenward-Rogers fue utilizado para ajustar el grado del denominador de libertad.

Experimento 2. Los datos de las fracciones de AG se analizaron en un diseño de bloques al azar usando el procedimiento MIXED, con un modelo que incluyó biotipo lechero como efecto fijo y bloque como efecto aleatorio usando el procedimiento MIXED. El procedimiento de Kenward-Rogers fue utilizado para ajustar el grado del denominador de libertad.

Para describir las asociaciones entre las diferentes variables se utilizaron las correlaciones de Pearson (procedimiento CORR, SAS).

Las pruebas de Tukey-Kramer fueron conducidas para la separación de las medias. Los medias se reportaron como medida de los mínimos cuadrados con sus respectivos errores estándar y fueron considerados diferentes cuando $P \leq 0.05$ y las tendencias fueron identificados cuando $0.05 < P \leq 0.10$.

RESULTADOS

Experimento 1: Efecto de las reservas corporales inducidas nutricionalmente durante el parto sobre las fracciones de caseínas y ácidos grasos en leche de vacas Holando primíparas y multíparas

Producción y composición de leche

La producción de leche fue mayor en las vacas L2 que en las vacas L1 (29,17 vs. 23,88 ± 0,49 kg/día; $P < 0,01$), y no fueron afectados por la BCS a los -30 días anidado a la paridad (Cuadro IV). Sin embargo, hubo una interacción del BCS a los -30 días anidado a la paridad con la SDL ($P < 0,01$); la producción de leche tendió ($P = 0,09$) a disminuir desde la SDL 2 a la 8 solamente en vacas de L2bajo.

La producción de proteína y grasa de la leche fue mayor en las vacas L2 que en las L1 (0,94 vs. 0,75 ± 0,02 kg/día y 1,08 vs. 0,88 ± 0,04 kg/día; $P < 0,01$, respectivamente; Cuadro IV), y disminuyó entre la SDL 2 a 8 (0,89 vs. 0,81 ± 0,02 kg/día y 1,05 vs. 0,90 ± 0,03 kg/día; $P < 0,01$, respectivamente). Además, la producción de grasa láctea presentó una interacción del BCS a los -30 días anidado a la paridad con la SDL ($P = 0,09$), indicando que disminuyó la grasa entre la SDL 2 a 8 solo en vacas de L2bajo. La producción de proteína no fue afectada por el BCS a los -30 días anidado a la paridad.

Cuadro IV. Medias de producción de leche, composición y recuento de células somáticas (RCS) en SDL 2 y 8, en vacas primíparas (L1) y vacas multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.

	Tratamiento ¹				SEM	P	P ²			
	L1bajo	L1alto	L2bajo	L2alto			BCS (P)	SDL	P* (SDL)	BCS(P)* (SDL)
Leche										
kg/día	23,7	24,00	29,39	28,95	0,49	<0,01	0,91	0,28	0,64	<0,01
Proteína										
kg	0,74	0,76	0,95	0,94	0,03	<0,01	0,78	<0,01	0,30	0,42
%	3,13	3,14	3,20	3,05	0,05	0,89	0,26	<0,01	0,44	0,65
Grasa										
kg	0,81 ^a	0,95 ^{ab}	1,06 ^b	1,09 ^b	0,05	<0,01	0,21	<0,01	0,05	0,03
%	3,46 ^x	3,88 ^y	3,63 ^{xy}	3,48 ^x	0,11	0,29	0,04	<0,01	0,41	0,09
RSC	1,73	1,57	1,85	2,08	1,25	0,02	0,35	0,86	0,63	0,76

^{ab} Promedios dentro de una misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$).

^{xy} Promedios dentro de una misma fila difieren significativamente ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹ Los datos representan las medias de las mínimas cuadráticas para los tratamientos derivados de una combinación 2 x 2 de la paridad, alto y bajo BCS a los -30 días de lactancia.

El porcentaje de la grasa láctea fue menor ($P < 0,05$) en L1bajo que en las vacas de L2bajo, sin embargo no se encontraron diferencias en vacas con alto BCS (Cuadro IV). Todos los grupos disminuyeron ($P < 0,05$) la concentración grasa entre SDL 2 a 8, excepto en las vacas L2alto.

El recuento de células somáticas de la leche fue mayor ($P = 0,02$) en vacas L2 que en las vacas L1 (93325 vs. 44668 ± 17782 células/mL).

Determinación del nitrógeno por Kjeldahl

El contenido total de la caseína representó $76,3 \pm 1,2$ % de la proteína total de la leche. Las vacas L2 presentaron mayores concentraciones de caseína ($797,44$ vs. $772,40 \pm 6,06$ g N/kg) y menos concentraciones de las seroproteínas lácteas ($202,56$ vs. $227,60 \pm 6,06$ g N/kg) que las vacas L1 ($P = 0,02$; Cuadro V).

Cuadro V. Medias de caseína total, proteínas del suero, fracciones de caseínas de la leche en SDL 2 y 8 en vacas primíparas (L1) multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.

Variable	Tratamiento ¹					P	P ²			
	L1bajo	L1alto	L2bajo	L2alto	SEM		BCS (P)	SDL	P * SDL	BCS (P)* SDL
Fracciones del Nitrógeno g N/kg total N										
Caseína	777,20	767,60	780,23	814,65	10,9	0,02	0,33	0,03	0,57	0,10
Proteínas del suero	222,80	232,40	219,77	185,35	6,06	0,02	0,35	0,03	0,57	0,10
Caseínas g/kg										
αs-1-caseína	368,85	393,54	395,68	398,00	14,9	0,24	0,71	0,61	0,27	0,62
αs-2-caseína	109,66	70,03	84,42	77,04	9,54	0,30	0,20	0,70	0,62	0,90
β-caseína	428,72	462,56	427,59	432,27	6,96	0,04	0,13	0,77	0,07	0,94
κ-caseína	97,44 ^a	69,53 ^b	94,47 ^a	89,95 ^{ab}	3,91	0,02	0,03	0,67	0,96	0,15

¹ Los datos representan las medias de las mínimas cuadráticas para los tratamientos derivados de una combinación 2 x 2 de la paridad, alto y bajo BCS a los -30 días de lactancia

² P = paridad, BCS = estado corporal, SDL = semana de lactación.

^{ab} Promedios dentro de una misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$).

El contenido de caseína y de proteínas del suero fue afectado por la SDL ($P = 0,03$, Cuadro V). El contenido de la caseína disminuyó entre la SDL 2 y 8 ($794,65$ vs. $775,20 \pm 6,06$ g N/kg), mientras que el contenido de las del suero aumentó ($205,35$ vs. $224,80 \pm 6,06$ g N/kg) para las vacas L1 y L2. La interacción BCS -30 días anidado a la paridad y la SDL presentó una tendencia ($P = 0,10$) en la concentración de la caseína y seroproteínas de la leche: mientras que la caseína disminuyó, la concentración de suero

aumentó, entre la SDL 2 a 8 solamente en vacas de L1alto. Las vacas L2alto presentaron más caseína y menor concentración de seroproteínas que el resto de los grupos de vacas en SDL 2 ($P<0,05$, Figura 3 A, B).

Fracciones de caseínas

La leche de las vacas L2 presentaron menor proporción de β -caseína (429,93 vs. 445,64 \pm 3,96 g/kg; $P=0,04$) y mayor proporción de κ -caseína (92,21 vs. 83,49 \pm 2,37 g/kg; $P=0,02$) que las vacas L1 (Cuadro V). No hubo efecto de la SDL sobre las fracciones de caseínas, pero las concentraciones de β -caseína tendieron ($P=0,07$) a ser mayores en vacas L1 que L2 en la SDL 8, debido principalmente a mayor concentración ($P<0,05$) en vacas L1alto que en L2 en SDL 8 (Figura 3C). Las fracciones de κ -caseína fueron afectadas por el BCS a los -30 días anidado a la paridad, las vacas L1alto tuvieron menor proporción de esta fracción que las vacas L1bajo y L2bajo ($P=0,03$, Cuadro V).

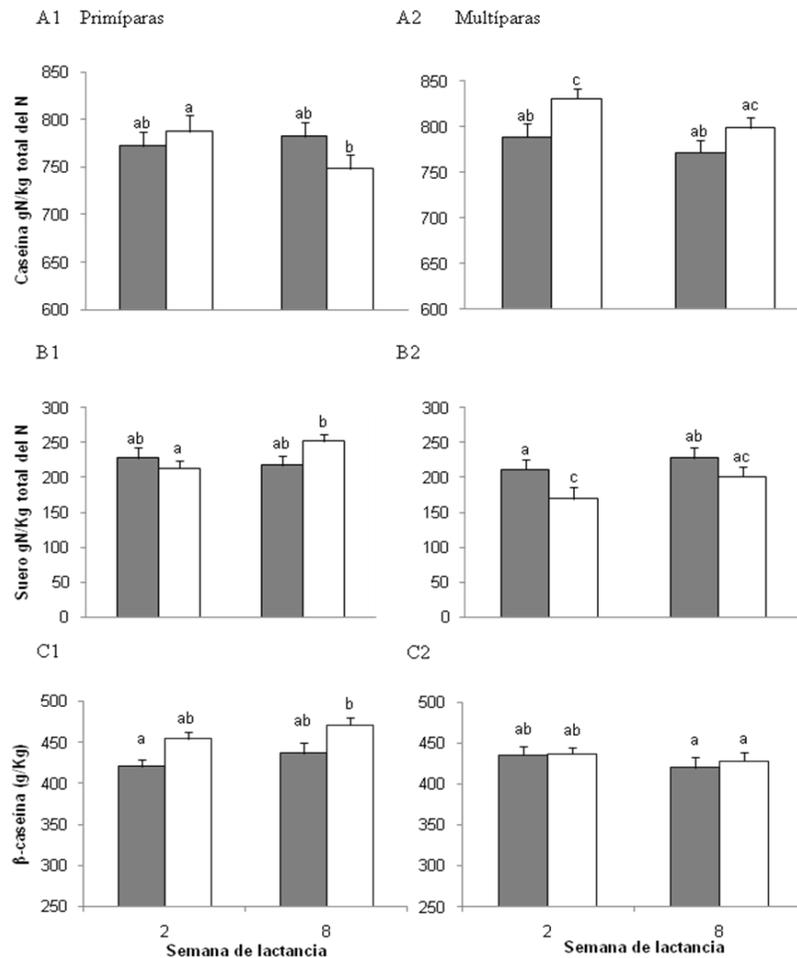


Figura 3 Concentraciones en leche de caseínas totales (A), proteínas del suero (B) y β -caseínas (C) en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (A1, B1, C1) y vacas múltiparas (A2, B2, C2) con bajo (gris) o alto (blanco) estado corporal -30 días de lactación. Las letras en las barras indican diferencias del análisis Tukey por la interacción del EC a los -30 días con la paridad y SDL; a, b, c: $P<0,05$.

Fracciones de ácidos grasos

La proporción de AG de origen *de novo* (C4 a C15:1) y AG de origen mixto (C16 a C16:1, 95% representado por el ácido palmítico, C16) aumentó desde la SDL 2 a la 8 (168,69 vs. 226,42 ± 10,26 mg/g, y 291,3 vs. 324,18 ± 6,87 mg/g, respectivamente; $P < 0,01$; Figura 4).

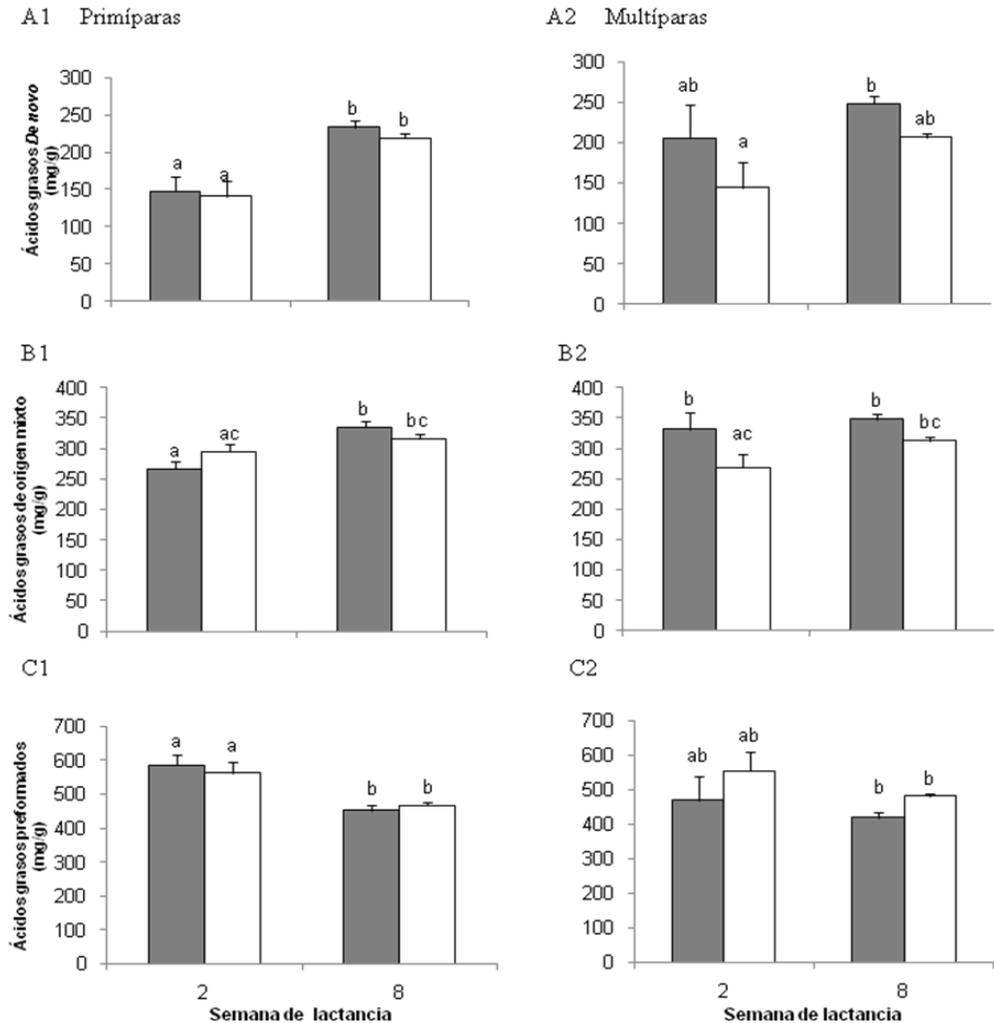


Figura 4. Origen de los ácidos grasos de la leche en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (1) y vacas multíparas (2) con bajo (gris) o alto (blanco) estado corporal a los -30 días de lactación. El origen de los ácidos grasos fueron calculados como A) *de novo* (C4 al C15:1), B) origen mixto (C16 + C16:1), y C) preformados (\geq C17). Las letras en las barras indican diferencias del análisis Tukey por la interacción del EC a los -30 días con la paridad y SDL; a, b, c: $P < 0,05$.

Por el contrario, AG preformados (\geq C17, 51% representado por el ácido oleico C18:1, 27% representado por el ácido esteárico C18) disminuyeron desde SDL 2 a 8 (543,43 vs. 454,24 \pm 16,25 mg/g; $P < 0,01$; Figura 4). Los AG *de novo*, así como, el ácido palmítico (C16), aumentaron con SDL (Cuadro VI). La disminución observada de AG preformados en SDL 8 fue principalmente debida a cambios en la concentración del ácido esteárico (C18).

Cuadro VI. Medias de la composición de los ácidos grasos (AG, mg/g del total de ácidos grasos) individuales en vacas primíparas (L1) y multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.

AG	Tratamiento ¹				SEM	P				
	L1bajo	L1alto	L2bajo	L2alto		P	BCS (P)	SDL	P * SDL	BCS(P)* SDL
4:0	6,91	5,20	6,05	5,42	0,77	0,64	0,62	0,12	0,15	0,85
6:0	7,89	7,27	8,85	6,69	0,80	0,79	0,32	<0,01	0,58	0,21
8:0	7,01	6,52	7,47	8,91	1,13	0,21	0,76	<0,01	0,56	0,94
10:0	17,72	18,67	22,27	17,68	2,56	0,44	0,59	<0,01	0,28	0,87
12:0	24,67	22,77	30,30	24,04	4,0	0,32	0,35	<0,01	0,25	0,87
13:0	1,28	1,30	1,54	1,38	0,18	0,33	0,88	<0,01	0,46	0,71
14:0	98,30	94,41	120,30	108,43	8,54	0,12	0,46	<0,01	0,18	0,92
14:1	4,91	5,81	8,07	6,41	0,95	0,06	0,51	<0,01	0,06	0,93
15:0	16,74 ^{ab}	17,72 ^{ab}	19,08 ^a	16,23 ^b	0,72	0,61	0,05	0,06	0,16	0,55
16:0	285,66	291,47	312,36	282,22	10,86	0,29	0,22	<0,01	0,39	0,48
16:1	12,80 ^{ab}	16,10 ^{ab}	16,55 ^a	8,43 ^b	1,22	0,13	<0,01	0,52	0,50	0,07
17:0	18,18	23,03	17,84	24,60	2,59	0,93	0,24	<0,01	0,56	0,92
18:0	147,19	115,77	142,11	134,32	13,94	0,62	0,26	<0,01	0,25	0,72
18:1 ^{cis}	272,65	273,68	198,15	254,60	15,87	0,02	0,17	0,12	0,13	0,45
18:1 ^{trans}	39,09	46,84	39,66	46,48	8,77	0,99	0,74	0,48	0,05	0,09
18:2 ^{cis} (n-6)	17,38	20,02	18,04	22,62	1,50	0,26	0,16	0,30	0,39	0,25
18:2 (CLA) ³	8,52 ^{ab}	10,24 ^b	6,17 ^a	10,30 ^b	0,70	0,15	0,02	0,81	0,26	0,06
18:3(n-3)	2,93 ^a	4,56 ^b	2,47 ^a	5,02 ^b	0,24	0,99	<0,01	0,13	0,75	0,03
18:3(n-6)	0,78	0,59	0,28	0,79	0,35	0,66	0,66	0,11	0,16	0,86
20:5 (EPA) ³	0,10	0,01	0,02	0,06	0,04	0,86	0,37	0,79	0,58	0,93
22:6 (DHA) ³	0,04	0,09	0,02	0,01	0,04	0,93	0,48	0,20	0,14	0,59
Otros ⁴	10,18	18,77	24,91	13,40	8,54	0,50	0,52	0,71	0,66	0,83

¹Los datos representan las medias de las mínimas cuadráticas para los tratamientos derivados de una combinación 2 x 2 de la paridad, alto y bajo BCS a los -30 días de lactancia; CLA = ácido linolénico conjugado, EPA = ácido eicosapentaenoico, DHA = ácido docosahexaenoico; Otros=11+12:1+13+15:1+17:1+18:2+19+19:1+20+20: 1+20:2+20:3n6+20:3n3+20: 4n6+ 20:4n3+21 +22+22:1cis+C22:4+22:5+24^{abc}. Promedios dentro de una misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$).

Los AG de origen mixto tendieron a estar afectados por el BCS a los -30 días anidado a la paridad: las vacas L2bajo tuvieron mayores concentraciones que las vacas L2alto ($P=0,10$, Cuadro VII) y esto fue asociado con mayor concentraciones de C16:1 en vacas L2bajo comparado con vacas L2alto ($P < 0,01$; Cuadro VI).

La grasa de la leche de las vacas L2 tendió ($P=0,06$) a tener concentraciones mayores de SAT y menores concentraciones ($P=0,04$) de MUFA que las vacas L1 ($663,53$ vs. $621,48 \pm 13,4$ mg/g y $295,85$ vs. $340,1 \pm 12,4$ mg/g, respectivamente), por lo tanto el cociente saturado/insaturado (SAT/UNSAT) fue mayor ($P =0,03$) en vacas L2 que en vacas L1 ($2,38$ vs. $1,7 \pm 0,22$ mg/g; Cuadro VII).

A su vez, hubo una interacción entre la paridad y SDL en la proporción de SAT y de MUFA únicamente en las vacas L1, los SAT aumentaron ($P=0,04$) y los MUFA disminuyeron ($P=0,03$) de la SDL 2 a la 8 (Cuadro VII), y esto determinó un aumento del cociente SAT/UNSAT de la SDL 2 a 8 ($1,45$ vs. $1,97 \pm 0,32$; $P =0,03$, respectivamente).

Cuadro VII. Medias de la composición de los ácidos grasos en vacas primíparas (L1) y multíparas (L2) con bajo y alto estado corporal (BCS) a los -30 días de lactancia.

Variable	Tratamiento ¹				SEM	P	P ²				
	L1bajo	L1alto	L2bajo	L2alto			BCS (P)	SDL	P* SDL	BCS (P)* SDL	
Origen de los ácidos grasos mg/g											
De novo (4:0 al 15:1)	187,86	182,38	225,84	194,14	17,09	0,14	0,58	<0,01	0,21	0,98	
Origen mixto (16:0 + 16:1)	298,54 ^{xy}	307,52 ^{xy}	334,03 ^y	290,87 ^x	10,46	0,35	0,10	<0,01	0,42	0,30	
Preformados (> 17:0)	518,79	514,72	444,39	517,44	25,35	0,16	0,31	<0,01	0,26	0,75	
Saturación de los ácidos grasos mg/g											
Saturados	635,30	607,66	697,78	629,28	20,62	0,06	0,16	0,13	0,04	0,55	
Monoinsaturados	329,25	350,95	267,84	323,86	19,00	0,04	0,22	0,18	0,03	0,68	
Polinsaturados	35,19 ^a	41,76 ^b	32,30 ^a	45,67 ^b	2,60	0,84	0,02	0,68	0,84	0,11	
Saturados/Insaturados	1,79	1,61	2,87	1,89	0,26	0,03	0,11	0,32	0,03	0,46	
n-3	3,16 ^a	4,58 ^b	2,77 ^a	5,26 ^b	0,28	0,70	<0,01	0,13	0,93	0,04	
n-6	19,09 ^y	21,99 ^{xy}	19,01 ^y	25,40 ^x	1,69	0,31	0,10	0,54	0,71	0,19	
n-6/n-3	5,51	4,95	5,97	5,46	0,67	0,42	0,71	0,16	0,53	0,89	
trans	44,23	52,59	45,75	52,06	8,96	0,95	0,74	0,51	0,07	0,08	
14:1/14:0	0,05	0,06	0,07	0,06	0,01	0,20	0,45	0,26	0,07	0,98	
16:1/16:0	0,05 ^x	0,06 ^x	0,05 ^x	0,03 ^y	0,01	0,20	0,07	0,13	0,34	0,24	
18:1/18:0	1,70	2,88	1,93	2,10	0,44	0,49	0,21	0,35	0,36	0,58	

^{ab} Promedios dentro de una misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$).

^{xy} Promedios dentro de una misma fila difieren significativamente ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹ Los datos representan las medias de las mínimas cuadráticas para los tratamientos derivados de una combinación 2 x 2 de la paridad, alto y bajo BCS a los -30 días de lactancia.

Aunque la paridad y la SDL no afectaron las concentraciones de PUFA en la grasa de la leche, los PUFA fueron mayores en vacas de alta BCS, pero este efecto fue evidente en la SDL 2 para las vacas L2 y en la SDL 8 para las vacas L1 (Figura 5C).

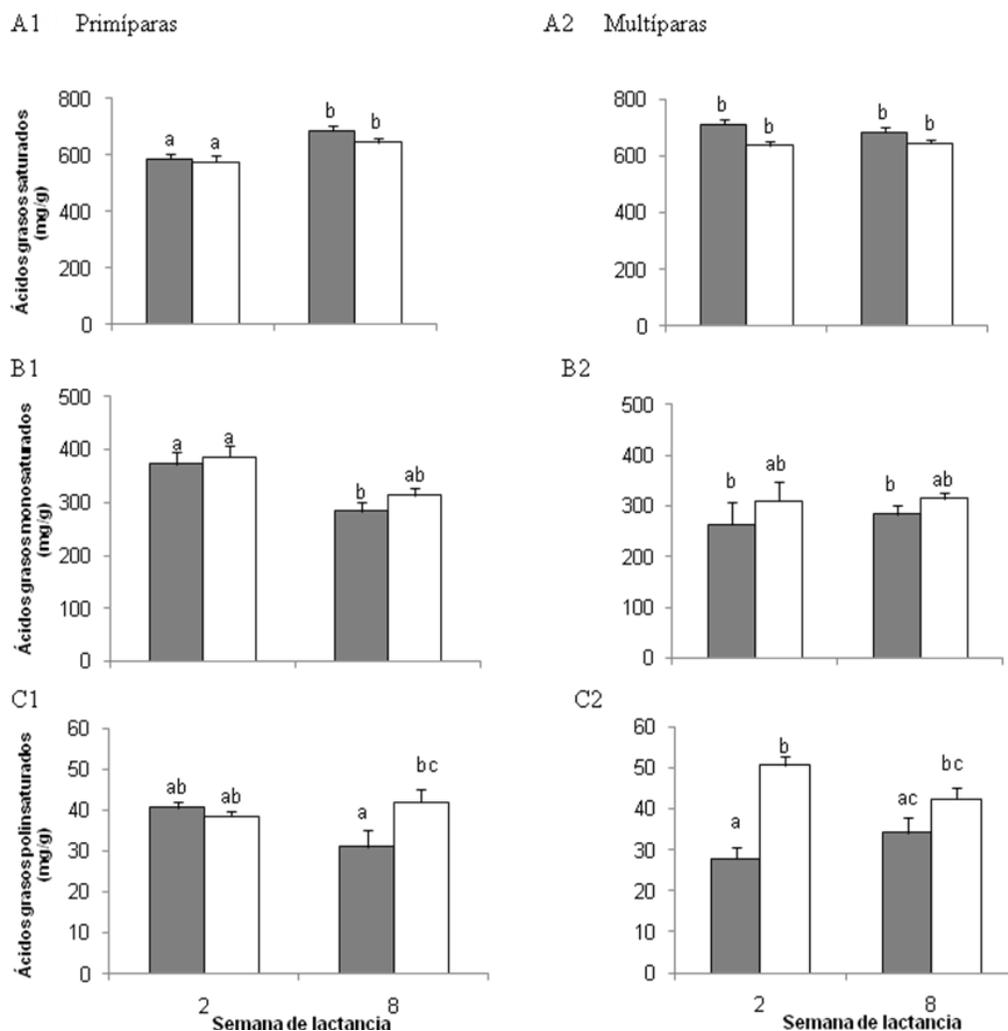


Figura 5. Ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (1) y vacas múltiparas (2) con bajo (gris) o alto (blanco) estado corporal -30 días de lactación. Las letras en las barras indican diferencias del análisis Tukey por la interacción del EC a los -30 días con la paridad y SDL; a, b, c: $P < 0.05$

Los cambios en las concentraciones de PUFA fueron asociados a cambios en AG n-3, especialmente en el ácido linolénico, que fue mayor ($P < 0,01$) en vacas de alta BCS (Cuadros VI y VII). Aunque no hubieron diferencias en ácido linoleico entre grupos de vacas, n-6 FA tendió ($P = 0,10$) a ser afectado por el BCS a los -30 días anidado a la paridad, ya que las vacas L2alto tuvieron mayores concentraciones ($P < 0,05$) de AG n-6 que en vacas L2bajo (Cuadro VII).

Los AG *Trans* de la leche tendieron a aumentar de la SDL 2 a la 8 únicamente en vacas L2alto ($P=0,07$; Figura 6A2). Esto determinó que la proporción de AG *Trans* de leche tendiera a tener mayor proporción en vacas L2alto que en vacas de baja BCS en la SDL 8 ($P=0,08$; Figura 6A). También, el CLA tuvo mayor concentración en vacas de alta BCS ($P=0,02$; Cuadro VI), a su vez, hubo una tendencia ($P=0,06$) en la interacción entre BCS a los -30 días anidado a la paridad y la SDL, donde las vacas L1bajo disminuyeron la concentración de CLA desde la SDL 2 a 8, determinando que L1alto tuviera una mayor proporción de CLA que las vacas de L1bajo (Figura 6B1). Además, L2bajo tuvo menor concentración de CLA que las vacas L2alto en SDL 2 (Figura 6B2).

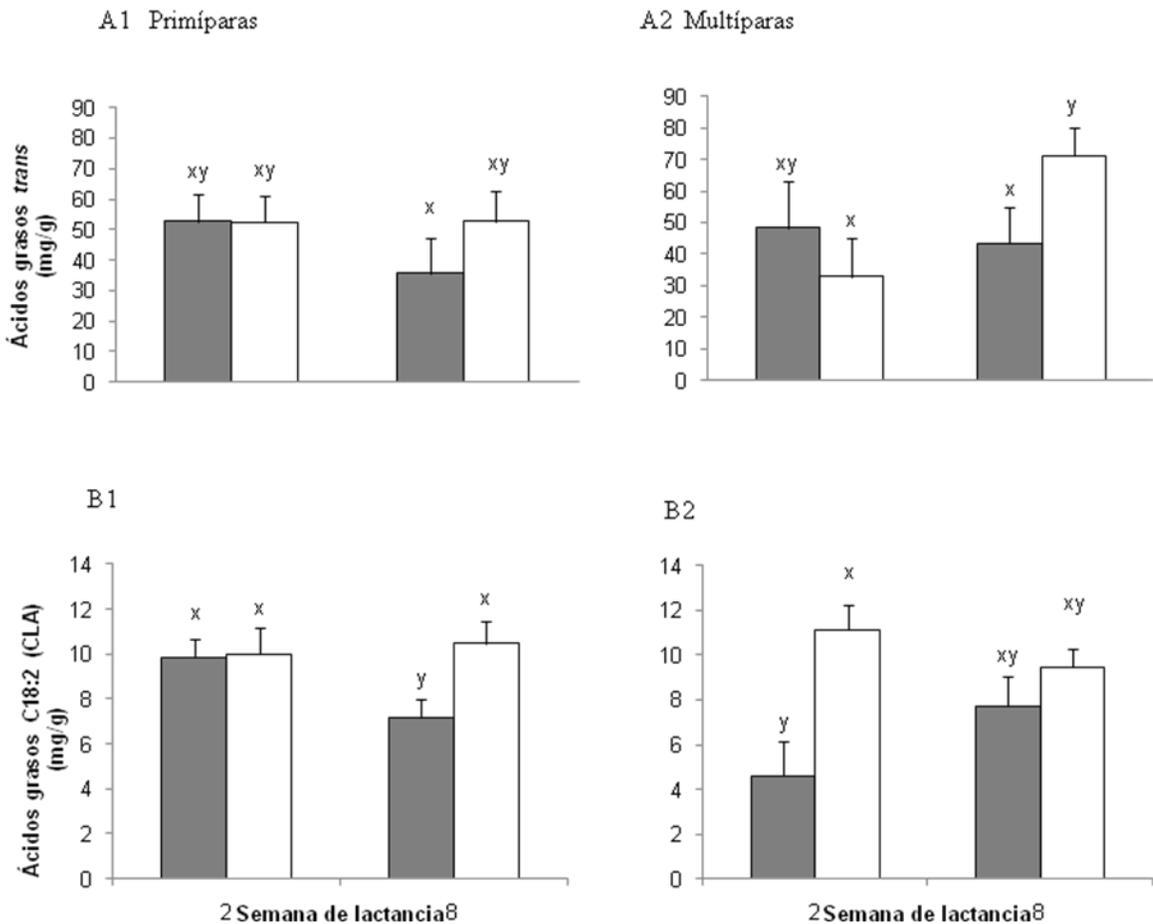


Figura 6. Ácidos grasos *Trans* (A) y C18:2 ácido linoléico conjugado (CLA) (B) en la semana de lactación 2 y 8 en vacas primíparas (1) y vacas multíparas (2) con bajo (gris) a alto (blanco) estado corporal a los -30 días de lactación. Las letras en las barras indican diferencias del análisis Tukey por la interacción del EC a los -30 días con la paridad y SDL; x, y: $0.5 < P \leq 0.10$.

El cociente 14:1/14:0 tuvo una tendencia a incrementar desde la SDL 2 a la 8 solamente en vacas L1 ($0,05$ vs. $0,07 \pm 0,01$ mg/g; $P=0,07$, Cuadro VII). El cociente 16:1/16 tendió a reducirse en L2alto que en vacas L2bajo y L1 ($P=0,07$, Cuadro VII).

Experimento 2: Efecto del biotipo lechero sobre las fracciones de ácidos grasos de la leche

La producción de leche del grupo HU ($17,5 \pm 0,37$ kg/día) fue superior ($P < 0,05$) a las RBSxHU y JxHU ($16,0 \pm 0,36$ kg/día y $15,1 \pm 0,35$ kg/día, respectivamente) mientras que no difirió del grupo HNZxHU ($17,0 \pm 0,36$ kg/día). El contenido de grasa en leche fue mayor ($P < 0,01$) para las vacas JxHU ($0,70 \pm 0,01$ kg/día) que para las HU ($0,61 \pm 0,01$ kg/día) HNZxHU ($0,65 \pm 0,01$ kg/día) y RBSxHU ($0,61 \pm 0,01$ kg/día). A su vez, el porcentaje de grasa fue máxima ($P < 0,01$) en las vacas JxHU ($4,70 \pm 0,07$ %) menor en las vacas HU ($3,53 \pm 0,07$ %), e intermedias para HNZxHU y RBSxHU ($3,84 \pm 0,08$ y $3,88 \pm 0,08$ %). El contenido de proteína (kg) en la leche no se presentó diferencias entre grupos, pero el porcentaje de proteína fue mayor ($P < 0,01$) en las vacas JxHU ($3,86 \pm 0,03$ %) que en las HU ($3,37 \pm 0,04$ %), HNZxHU ($3,46 \pm 0,04$ %), RBSxHU ($3,57 \pm 0,04$ %).

Las concentraciones de AG de *de novo* y preformados en la grasa de leche no difirieron entre biotipos, sin embargo las concentraciones de C10:0 y C12:0 (27,3% de los AG *de novo* totales) fueron o tendieron a ser mayores para las JxHU que para las HU, siendo intermedias en las vacas HNZxHU y RBSxHU ($P < 0,09$; Cuadro VIII). La concentración de AG de origen mixto en la grasa de la leche fueron máximos en JxHU, mínimos en RBSxHU e intermedios en HU y HNZxHU ($P = 0,09$; Cuadro IX). Estas diferencias en la proporción de AG de origen mixto, reflejan la diferencia en la concentración de C16:0 (95,8% AG de origen mixto) ($P = 0,06$; Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Ácidos grasos individuales promedio en leche de diferentes biotipos lecheros

Ácidos grasos (mg/g)	HU	HNZxHU	JxHU	RBSxHU	SEM	P
4:0	6,12	5,53	5,05	3,66	0,92	0,23
6:0	6,92	5,62	6,44	4,80	0,74	0,21
8:0	6,25	6,66	6,64	5,85	0,50	0,59
10:0	18,21 ^x	21,35 ^{xy}	22,18 ^y	19,25 ^{xy}	1,17	0,09
12:0	24,09 ^a	29,69 ^{ab}	31,29 ^b	28,05 ^{ab}	1,39	0,01
14:0	102,33	105,39	106,25	108,51	2,84	0,53
14:1	6,09	5,78	5,61	6,65	0,50	0,45
16:0	302,79 ^{ab}	314,27 ^{ab}	326,25 ^a	293,30 ^b	8,86	0,06
16:1	15,01	12,76	12,97	13,05	1,38	0,67
18:0	125,39	126,92	122,35	110,77	8,53	0,52
18:1 ^{cis}	212,69 ^{ab}	191,24 ^a	197,45 ^{ab}	222,12 ^b	7,40	0,02
18:1 ^{trans}	64,30 ^{ab}	66,46 ^{ab}	58,09 ^a	72,44 ^b	3,29	0,03
18:2 ^{cis} (n-6)	14,76	15,02	13,15	16,26	1,13	0,26
18:2 (CLA) ¹	16,35	15,83	15,28	16,91	0,74	0,42
18:3 (n-3)	7,23	7,21	5,66	5,98	0,56	0,12
18:3 (n-6)	0,61	0,53	0,60	0,50	0,08	0,74
20:5 (EPA) ¹	0,51	0,38	0,54	0,36	0,11	0,49
22:6 (DHA) ¹	0,33	0,30	0,22	0,30	0,08	0,81
Otros	47,21	48,03	46,46	49,73	1,96	0,63

¹CLA = ácido linoléico conjugado, EPA = ácido eicosapentanoico, DHA = ácido docosahexaenoico.

⁴ Otros = 11:0 + 12:1 + 13:0 + 15:1 + 17:0 + 19:0 + 20:0 + 20:1 + 20:2 + 20:3 + 22:0 + 23:0 + 24:0.

^{a,b} Promedios dentro de la misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$),

^{x,y} Promedios dentro de la misma fila difieren significativamente ($P < 0,1$)

Las vacas JxHU y HNZxHU tuvieron mayor concentración de SAT y menor concentración de MUFA en la grasa de la leche que las vacas RBSxHU ($P < 0,01$; Cuadro IX) mientras que las concentraciones de PUFA tendieron ($P < 0,09$) a ser menores en JxHU que en los otros biotipos. Estas diferencias determinaron que la relación de SAT/INSAT en la grasa de la leche fuera mínimo en las RBSxHU, intermedio en las HU y máxima en HNZxHU y JxHU ($P < 0,01$; Cuadro IX). En particular, las concentraciones de C18:1 *cis* y *trans* variaron entre biotipos ($P < 0,03$), siendo máximas para RBSxHU (Cuadro VIII).

Las concentraciones de AG n-3 y n-6 y de C18:3 y C18:2 (95,3 y 94,2% de los n-3 y n-6, respectivamente), así como la relación n-3/n-6 en la grasa de leche, no difirieron entre biotipos (Cuadro VIII y IX).

La concentración de AG *trans* en la grasa de leche fueron máximas en RBSxHU, intermedias en HU y HNZxHU y mínimas en JxHU ($P < 0,05$; Cuadro IX), no detectándose diferencias en las concentraciones de CLA o de los índices 14:1/14:0 y 16:1/16:0 entre biotipos. Sin embargo, el cociente C18:1/C18:0 fue mayor en RBSxHU que en JxHU y HNZxHU ($P < 0,04$; Cuadro IX).

Cuadro IX. Origen y saturación de los ácidos grasos en diferentes biotipos lecheros

Variable	HU	HNZxHU	JxHU	RBSxHU	SEM	P
Origen de los ácidos grasos, mg/g						
<i>De novo</i> (4:0 to 15:1)	194,09	206,75	208,08	203,26	6,79	0,52
Origen mixto (16:0 + 16:1)	317,75 ^{xy}	327,01 ^{xy}	339,17 ^x	306,35 ^y	9,32	0,09
Preformados ($\geq 17:0$)	483,46	464,55	452,31	486,54	12,47	0,18
Saturación de los ácidos grasos mg/g						
Saturados	635,69 ^{ab}	660,92 ^a	671,01 ^a	619,80 ^b	9,85	<0,01
Monosaturados	301,71 ^{ab}	279,58 ^a	277,15 ^a	318,65 ^b	7,83	<0,01
Poliinsaturados	57,90 ^y	57,81 ^y	51,40 ^x	57,69 ^y	2,15	0,09
Saturados/Insaturados	1,77 ^{ab}	1,98 ^a	2,05 ^a	1,67 ^b	0,07	<0,01
n-3	8,82	8,66	7,20	7,48	0,68	0,26
n-6	33,46	34,08	29,69	34,15	1,77	0,22
n-3n-6	4,077	3,98	4,46	5,68	0,81	0,67
<i>Trans</i>	81,35 ^{ab}	84,07 ^{ab}	73,12 ^a	88,28 ^b	3,94	0,05
14:1/14:0	0,06	0,05	0,05	0,06	0,00	0,48
16:1/16:0	0,05	0,04	0,04	0,04	0,00	0,39
18:1/18:0	1,71 ^{ab}	1,52 ^a	1,67 ^a	2,41 ^b	0,23	0,04

^{a,b} Promedios dentro de la misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$)

^{x,y} Promedios dentro de la misma fila difieren significativamente ($P < 0,1$)

DISCUSIÓN

Este estudio demostró que las reservas corporales inducidas nutricionalmente al inicio del período de transición afectaron la calidad de la leche, en términos de fracciones de caseínas y AG. Además, los resultados diferenciales encontrados acorde a la categoría animal sugieren una partición diferencial de nutrientes que podría depender - al menos parcialmente - del desarrollo animal. Por otro lado se observó un efecto relevante del biotipo animal sobre las fracciones de AG.

El contenido de la caseína total en la leche en este estudio fue mayor en la SDL 2, similar a lo reportado por Ng-Kwai-Hang et al. (1982), que observaron mayor contenido de caseína en leche durante los primeros 10 días de lactancia. En cambio, Ostensen et al. (1997) reportaron que las concentraciones de caseína alcanzaron su máximo a mediados de lactancia. Además, en nuestro estudio no encontramos cambios en fracciones de la caseína entre SDL 2 y 8, en cambio Ostensen et al. (1997) y Kroeker et al. (1985), reportaron que proporciones de α -caseína y β -caseína disminuyeron y aumentaron, respectivamente, a lo largo de la lactancia. Se encontraron estudios contradictorios respecto a las proporciones de κ -caseína a lo largo de la lactancia: disminución (Ostensen et al. 1997) o ningún cambio (Kroeker et al. 1985). Las diferencias en concentraciones de caseína de la leche durante la lactancia se podrían atribuir a cambios en el número de células secretorias ya el que el pico de las mismas ocurre en la lactancia temprana (14 días, Capucco et al. 2001), la actividad de las células mamarias (transporte dependiente del Na^+), la concentración extra/intracelular de AA, y la expresión de genes de caseína que es regulada por vías hormonales (Mass et al. 1997).

Las concentraciones de caseína en la leche fueron mayores en vacas L2 que en vacas L1; esto podría estar originado por un mayor contenido celular y una mayor diferenciación celular en la glándula mamaria en las vacas L2 (Miller et al. 2006). Además, las vacas L2 presentan mayor consumo de materia seca que las vacas L1 (Ingvarlsen, 1994; Maekawa et al. 2002) lo cual podría dar lugar a mayores concentraciones de péptidos y AA de circulación, y por lo tanto de fuentes para la síntesis de la caseína en la lactancia temprana (Bequette et al. 1998; Chibisa et al. 2008). En ese sentido, las vacas L2 presentaron mayor contenido de proteína total y colesterol en plasma que las vacas L1 (Adrien et al. 2010), lo que podría asociarse a un mayor consumo. Por otra parte, las concentraciones reducidas de insulina en plasma encontradas en las vacas L2 (Adrien et al. 2010), podrían haber promovido el aumento de proteólisis en esta categoría (Bell et al. 2000). De acuerdo con nuestros resultados, varios investigadores (Kroeker et al. 1985; Ng-Kwai-Hang et al. 1987; Jōudu et al. 2008) han encontrado que el porcentaje de la κ -caseína aumentó, mientras que el porcentaje de β -caseína disminuyó en vacas multíparas. Auld et al. (1996) reportaron que la β -caseína está asociada negativamente a altos recuentos de células somáticas (RCS), como sucedió en el presente experimento. La inflamación de la glándula mamaria (mayor RCS) aumenta la cantidad de proteasas endógenas que se filtran de la sangre a la leche, especialmente la plasmina (Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988). Se ha reportado (Auld et al. 1996) que la β -caseína es especialmente susceptible a la acción de la plasmina, y esta podría ser la explicación de nuestros hallazgos. No hubo diferencias en otras fracciones de caseína según la paridad en nuestro estudio, por el contrario, Kroeker et al. (1985) y Ng-Kwai-Hang et al. (1987) encontraron mayores concentraciones de α -caseína en vacas multíparas. Los

estudios contradictorios respecto a los efectos de los factores fisiológicos (SDL y paridad) sobre las fracciones de caseína, pueden deberse a diferentes prácticas de alimentación (TMR vs. pastoreo) y/o a las técnicas analíticas utilizadas en cada estudio (electroforesis vs. HPLC).

La κ -caseína fue la única fracción de la caseína afectada por el BCS en -30 días, siendo mayor en vacas L1bajo que en vacas L1alto. Bobe et al. (2007) realizaron una infusión intravenosa de glucagón en vacas Holando con alimentación restringida en la lactancia temprana, encontrando que la κ -caseína fue la única fracción que aumentó, sugiriendo que la κ -caseína glicosilada está controlada -al menos en parte- de forma independiente de otras fracciones proteicas. La expresión de los genes de la caseína (α s1-, α s2-, κ - y β -caseínas) es el resultado de una regulación hormonal compleja a nivel transcripcional y post-transcripcional (Martin & Grosclaude, 1993); así la insulina estimula la expresión de los genes de la caseína (Menzies et al. 2009). De hecho, mayores concentraciones de la insulina fueron encontradas en vacas de L1bajo al final del tratamiento alimenticio comparadas con las vacas L1alto (Adrien et al. 2010), lo que pudo haber estimulado la expresión del gen de la κ -caseína.

El origen de los ácidos grasos (*de novo*, origen mixto, preformado) fue afectado por SDL puesto que la mayor concentración de AG preformado fue encontrada en SDL 2, consistente con otros autores (Stanton et al. 1997; Kelsey et al. 2003; Kay et al. 2005). Cuando los AG de cadena larga están disponibles desde la dieta, o provienen de la movilización grasa del cuerpo, hay una disminución del porcentaje de AG *de novo* y origen mixto en la grasa láctea (Chilliard et al. 2000). Se ha demostrado que los AG de cadena larga (con C16 o más átomos de carbono) son potentes inhibidores de la síntesis mamaria de AG, con un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de ACC (Barber et al. 1997). De hecho, las mayores concentraciones de AG preformados en SDL 2, son consistentes con las mayores concentraciones de NEFA encontradas en la lactancia temprana en el mismo experimento (Adrien et al. 2010).

Aunque no se observó ningún efecto de la paridad sobre los diferentes orígenes de los AG; se encontraron mayores concentraciones de SAT en las vacas L2 en la SDL 2, lo cual podría explicarse por mayor proporción de síntesis *de novo* SAT. De hecho, Miller et al. (2006) reportaron mayor contenido de DNA y abundancia de proteína FAS mamarias en las vacas L2 durante la lactancia temprana, pero no en lactancia media o tardía. Mayores concentraciones de MUFA en la leche de vacas L1 fueron principalmente debido a un mayor contenido del ácido oleico (C18:1) en estas vacas. Esto podría asociarse a una mayor movilización de grasas corporales, puesto que se ha reportado que las vacas L1 tienen menor consumo de materia seca que las vacas L2 a temprana SDL (Ingvarsen, 1994; Maekawa et al. 2002). A excepción de Kelsey et al. (2003), no hemos encontrado ningún otro estudio publicado que hubiera examinado el efecto de la paridad sobre los AG de la leche. Mientras que Kelsey et al. (2003) demostraron efectos en el perfil individual de AG de la leche, tal como C14 y C16, en vacas Holando L1 y L2 y las vacas del Pardo Suizo alimentadas TMR, nosotros no encontramos otras diferencias según paridad en las vacas de Holando bajo condiciones de pastoreo.

No se encontraron efectos del BCS sobre los AG *de novo* y preformado. Sin embargo, la leche de las vacas L2bajo tendieron a presentar mayor concentración de AG de origen mixto que las de las vacas L2alto, debido principalmente a una mayor

proporción del ácido palmitoleico (C16:1). Hay dos fuentes del ácido palmitoleico (C16:1) en leche, sintetizado *de novo* por la actividad de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa sobre el ácido palmítico (C16) en la glándula mamaria o preformado proveniente de la sangre (Wiking et al. 2004). Aunque otros estudios encontraron menor concentración de SAT y mayor MUFA en la grasa láctea en vacas de alto BCS al parto (Pedron et al. 1993) o un mes antes del parto (Stockdale et al. 2005), en este trabajo no encontramos efecto del BCS -30 días sobre proporciones de SAT o MUFA en la leche. Sin embargo, las concentraciones de PUFA en grasa láctea fueron mayores en vacas de alto BCS. Según Chilliard et al. (2000), los PUFA no son sintetizados por el tejido del rumiante, por lo tanto su concentración en leche depende en primer lugar del contenido de PUFA en la dieta y en segundo lugar de la cantidad de PUFA que se escape de la biohidrogenación del rumen. El pastoreo es una dieta con elevado contenido de PUFA (50-75%) así como de ácido α -linolénico (Dewhurst et al. 2006). La presencia de forraje en la dieta de rumiantes se ha asociado a una salida mayor de PUFA en el rumen, debido a que una alta tasa de pasaje supera la capacidad ruminal de hidrogenación (Dewhurst et al. 2006). Por lo tanto, el mayor consumo de materia seca en vacas de alto BCS podría explicar en parte mayor contenido de PUFA en la grasa láctea.

La concentración de CLA en la leche fue mayor en las vacas con alto BCS. El ácido vaccénico (*trans*-11 C18:1) es la fuente predominante de *cis*-9 *trans*-11 CLA endógeno sintetizado en la glándula mamaria por la acción de $\Delta 9$ -desaturasa, y una pequeña cantidad de CLA se origina de la biohidrogenación de los ácidos grasos no saturados por las bacterias del rumen. El mayor contenido de ácido linolénico (C18:3) en las vacas de alto BCS en nuestro estudio, probablemente puede resultar de mayor consumo de pasturas de alta calidad (40 a 80 g/100g AG; Dewhurst et al. 2001) aumentando la producción en el rumen de *trans*-11 C18:1 (ácido vaccénico). Grandes cantidades de *trans*-11 C18:1 son absorbidos en intestino delgado y su desaturación subsiguiente a CLA por la enzima $\Delta 9$ -desaturasa en la glándula mamaria (Griinari & Bauman, 1999), podría explicar el mayor contenido de CLA en la leche, reportada en las vacas con mayor BCS de este experimento. El ácido vaccénico que representó el 88% de los AG *trans* tendió a aumentar desde SDL 2 a la 8 solamente en vacas L2alto. Las vacas L2alto presentaron mejor *status* energético en la SDL 8 que se evidenció por aumentos en la concentración de proteínas y colesterol plasmático (Adrien et al. 2010) probablemente debido a una recuperación más rápida del consumo en la lactancia temprana. Además, n-6 y n-3 fueron mayores en vacas L2alto, probablemente debido a un mayor producto de sus precursores (C18:2 y C18:3) en la pastura fresca (Moghadasian, 2008). EPA y DHA se presentan en concentraciones muy pequeñas o nulas en dietas pastoriles; por lo tanto, están típicamente presentes en cantidades muy bajas en los productos del rumiante (<0.1% del total de AG) (Lock & Bauman, 2004).

En el experimento 2 se evaluaron diferentes biotipos lecheros sobre la calidad de leche. Se observó que existen diferencias en el perfil de AG de la leche entre los biotipos, lo que sugiere que la elección de un biotipo va a determinar –parcialmente– el grado de saturación y grasas *trans* en la grasa total de la leche. Pocos estudios existen sobre este tema y se focalizan básicamente en comparar diferencias entre vacas Holando vs. Jersey u Holando Americano vs. Holando Neozelandés.

Las vacas primíparas HU produjeron mayor kg de leche que las vacas RBSxHU y JxHU. De forma similar, otros estudios (Kolver et al. 2002; Roche et al. 2006) reportaron una mayor producción de leche de vacas Holando Americanas. Sin embargo, hubo mayor producción de grasa (kg) en la leche de JxHU, encontrando que este biotipo presentó aproximadamente 1% más de grasa que el resto de los biotipos. Esto está asociado a la expresión de los objetivos de selección de la genética Jersey para sólidos en leche (Bailey et al. 2005; Teodoro & Madalena, 2005; Vanraden & Sanders, 2003). Se debe considerar que en las vacas cruza la heterosis pudo afectar la composición de la leche, ya que este efecto produce una mejora en el desempeño de la progenie de la crusa sobre el promedio esperado de las razas progenitoras (Ahlborn-Breier & Hohenboken, 1991). Tanto el RBSxHU como HNZxHU presentaron mayor porcentaje de grasa láctea que las HU, de forma consistente con estudios realizados previamente (Wales et al. 2009; Pereira et al. 2010). Esto no se evidenció en kg de grasa ya que estos biotipos produjeron menos leche. El patrón de porcentaje de proteína fue similar al de porcentaje de grasa, no evidenciándose diferencias en kg de proteína en ningún biotipo.

No se encontraron diferencias en el origen de los AG de la leche acorde a los biotipos. Sin embargo, Palmquist et al. (1993), White et al. (2001), Carroll et al. (2006) encontraron en condiciones TMR, mayor concentración de AG *de novo* en las vacas Jersey que en vacas Holando a mitad y final de lactancia principalmente dado por C10 y C12, al igual que lo encontrado en estas fracciones en este estudio. También se ha reportado mayor concentración de AG *de novo* en vacas Holando Neozelandés en comparación con vacas Holando Americano en condiciones pastoriles a los dos meses posparto (Wales et al. 2009), sugiriendo que la menor producción de grasa en las vacas Holando Americano, se debe a la disminución de la síntesis de AG *de novo*.

Las vacas JxHU presentaron en la grasa láctea mayor concentración de SAT en comparación con las vacas RBSxHU, principalmente en nuestro estudio dado por el aumento diferencial de C16:0. No hemos encontrado estudios que comparen estos dos biotipos, pero sí la bibliografía es consistente en señalar que las vacas Jersey tienen mayor proporción de SAT en la leche (Beaulieu & Palmquist, 1995; White et al. 2001; Carroll et al. 2006). La selección por porcentaje de grasa en la leche tiene una correlación positiva con la proporción de C16:0 y una correlación negativa para C18:0 (Karijord et al. 1982; Stoop et al. 2008). Por otro lado, la leche de las vacas HNZxHU presentó mayor proporción de SAT y menor proporción de MUFA en relación con las vacas RBSxHU. El estudio de Wales et al. (2009) comparativo entre Holando Neozelandés y Holando Americano en condiciones pastoriles, encontraron mayor contenido de SAT en la Holando Neozelandesa, sugiriendo diferencias genéticas en la síntesis *de novo* de los AG de la leche. Basado en estos resultados, la mayor producción de contenido total la grasa de la leche probablemente esté asociado a menor contenido de grasas insaturadas. Por lo tanto, esta composición grasa posiblemente tendrá mayor grado de dureza en la producción de manteca y menor interés desde el punto de vista de la salud humana (Grummer, 1991; Hu et al. 1999).

En el presente estudio los diferentes biotipos no afectaron la concentración de CLA en la leche, a diferencia de reportes que afirman mayor contenido de CLA de vacas Holando en comparación con vacas Jersey (White et al. 2001, Kelsey et al. 2003),

sugiriendo que las vacas Holando producen más *trans*-C18:1 en el rumen y presentan mayor actividad de la Δ -9 desaturasa en la glándula mamaria. Soyeurt et al. (2008) obtuvieron una correlación negativa entre el porcentaje grasa y la actividad de la Δ -9 desaturasa en las vacas Jersey, obteniendo como resultado menor concentración de MUFA y una menor concentración de CLA en la leche de las vacas Jersey en comparación con la de vacas Holando. Sin embargo, en nuestro trabajo las vacas JxHU presentaron en la grasa láctea menor concentración de *trans* y cociente C18:1/C18:0 que las de vacas RBSxHU, reflejando una biohidrogenación ruminal más extensa en las vacas JxHU. Otros estudios en la leche de vacas Jersey reportaron menor concentración de *trans*-C18:1 (Morales et al. 2000; Carroll et al. 2006) que reportaron menor relación de C18:1/C18:0 en vacas Jersey en relación con vacas Holando.

CONCLUSIONES

El manejo nutricional preparto que provocó diferentes grados de reserva corporal al inicio del período de transición, afectó las fracciones de la leche: vacas (L1 y L2) con alto BCS aumentaron las proporciones de PUFA, CLA y n-3 en el contenido de la leche, mientras que el contenido de κ -caseínas fue menor en las primíparas de alto BCS.

La categoría animal afectó el perfil de caseínas y AG en leche: las vacas multíparas presentaron mayor producción de caseína total, κ -caseína y menor proporción β -caseína que las vacas primíparas. A su vez, la materia grasa de la leche de las vacas primíparas presentó mayor proporción de MUFA y menor proporción de SAT en la grasa de la leche.

El efecto del biotipo lechero en sistemas pastoriles afectó el perfil de AG en leche: la de vacas HNZxHU y JxHU presentó mayor proporción de SAT y menor proporción de MUFA, mientras que las vacas RBSxHU presentaron menor concentración de SAT y mayor proporción de MUFA, siendo intermedias para el biotipo HU. A su vez, las grasas *trans* fueron menores para el biotipo JxHU.

COMENTARIOS FINALES

De acuerdo a los antecedentes planteados, la leche de mejor calidad desde el punto de vista de la salud humana se presentó en la leche de las vacas con alto BCS, debido a que aumentaron las concentración de PUFA y n-3, así como el CLA, que tiene efectos anticancerígenos, antiobesidad, moduladores del sistema inmune y cardioprotector. Además, desde el punto de vista industrial, menor saturación de las grasas mejora las propiedades de importancia para la manufactura y almacenamiento de productos lácteos. La categoría animal afectó los componentes saludables de la leche, mientras que las vacas L2 presentaron mejor composición desde el punto de vista industrial (mayor contenido de caseína total y κ -caseína), las vacas L1 presentaron mayor proporción de MUFA saludables para la salud humana. A su vez, en las diferencias observadas de acuerdo al biotipo lechero se destacan las vacas JxHU con menor grasas *Trans*, y las vacas RBSxHU con menor concentración de SAT, por lo que ambos biotipos lecheros son de gran interés desde el punto de vista de la salud humana. Estos resultados sugieren que los índices apropiados de

selección pueden también ser desarrollados, para transmitir de generación en generación la mejora de la composición de la leche, fundamentalmente menor contenido de *trans* y SAT en beneficio del consumidor. Por lo tanto, existen oportunidades para la “leche de diseño” a nivel nacional, por lo que futuras investigaciones serán necesarias para generar nuevos productos acorde con las exigencias del consumidor y necesidades de la industria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Adrien M.L. (2010). Regulación nutricional del estado corporal al inicio del período de transición en vacas lecheras al inicio del período de transición en vacas lecheras en condiciones de pastoreo: Efectos Sobre Producción De Leche, Reinicio De La Ciclicidad Ovárica Posparto y Parámetros Metabólicos. Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Udelar.
- 2) Agenas S., Burstedt E., Holtenius K. (2003) Effects of Feeding Intensity During the Dry Period. 1. Feed Intake, Body Weight, and Milk Production J. Dairy Sci. 86: 870-882.
- 3) Ahlborn-Breier G., Hohenboken W.D. (1991). Additive and non-additive genetic effects on milk production in dairy cattle: evidence for major individual heterosis. J. Dairy Sci. 74:592.
- 4) Alais C. (1985) Ciencia de la leche. Editorial Reverté, S.A. Barcelona.
- 5) AOAC. (1980). Official Methods of Analysis (13th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- 6) Auldust M.J., Coats S., Sutherland J.B., Mayes J.J., McDowell H.G. (1996). Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition, and the yield and quality of cheddar cheese. J. Dairy Res. 63: 269-280.
- 7) Avilez J.P., Vilches CI, Alonso M.W. (2009). Determinación de los niveles de ácido linoleico conjugado (ALC) en alimentos lácteos en Chile. Rev. Chil. Nutr. 36:143-150.
- 8) Bailey K.W., Jones C.M., Heinrichs, A.J. (2005). Economic return to Holstein and Jersey herds under multiple component pricing. J. Dairy Sci. 88: 2269-2280.
- 9) Barber M.C., Clegg R. A., Travers M.T., Vernon R.G. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. Biochem. Biophys. Acta 1347:101–126.
- 10) Bauman D.E. (1999). Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. Domestic Animal Endocrinology 17:101-116.
- 11) Bauman D.E., Griinari J.M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. Annu. Rev. Nutr. 23:203–227.
- 12) Bauman D.E., Brown R.E., Davis C.L. (1970). Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow Arch. Biochem. Biophys. 140: 237-244.
- 13) Bauman D.E., Corl B.A., Baumgard, Griinari J.M. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy L. H. cow. Pages 221–250 in Recent Advances in Animal Nutrition. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- 14) Bauman D.E., Currie W.B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms including homeostasis and homeorhesis. J. Dairy Sci. 63:1514-1529.

- 15) Bauman D.E., Griinari J.M. 2000. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low milk fat syndrome. in *Biology of the Mammary Gland*. Mol, J.A. and R.A. Clegg, eds. Pp. 209-216. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- 16) 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.
- 17) Bauman DE, Davis C.L. (1974). Biosynthesis of milk fat. In *Lactation: A Comprehensive Treatise*, ed. BL Larson, VR Smith, Vol. 2, pp. 31–75. New York: Academic
- 18) Beaulieu A.D, Palmquist D.L. (1995). Differential effects of high fat diets on fatty acid composition in milk of Jersey and Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 78: 1336–1344
- 19) Bell A.W. (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73:2804-2819.
- 20) Bell A.W., Burhans W.S., Overton T.R. (2000). Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proc. Nutr. Soc.* 59:119–126.
- 21) Bequette B. J., Kyle C.E., Crompton L.A., Buchan V., Hanigan H.D. (2001). Insulin regulates milk production and mammary gland and hind-leg amino acid fluxes and blood flow in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 84:241–255.
- 22) Bequette B.J., Backwell F.R.C., Crompton L.A. (1998). Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *J. Dairy Sci.* 81:2540–2559.
- 23) Bertini A. (2006). Relevamiento y análisis de los sistemas de pago de la leche en Uruguay. Tesis/Monografía de grado, Facultad de Agronomía, Udelar.
- 24) Bobe G., Ametaj B.N., Young J.W., Beitz D.C. (2003). Potential treatment of fatty liver with 14-day subcutaneous injections of glucagon. *J. Dairy Sci.* 86:3138–3147.
- 25) Bobe G., Lindberg G.L. , Freeman A.E., Beitz D.C. (2007). Short Communication: Composition of Milk Protein and Milk Fatty Acids Is Stable for Cows Differing in Genetic Merit for Milk Production. *Journal of Dairy Science* Vol. 90:3955-3960.
- 26) Bobe G., Minick Bormann J.A., Lindberg G.L., Freeman A.E., Beitz D.C. (2008). Estimates of genetic variation of milk fatty acids in US Holstein cows. *J Dairy Sci.* 91: 1209–1213.
- 27) Capps V.A., DePeters E.J., Taylor S.J., Perez-Monti H., Wyckoff J.A., Rosenberg M. (1999). Effect of breed of dairy cattle and dietary fat on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 82 (Suppl. 1):45. (Abstr.).
- 28) Capuco A.V., Wood D.L., Baldwin R., Mcleod K., Paape M. J. (2001). Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187.
- 29) Carriquiry M., Weber W.J., Dahlen C.R., Lamb G.C., Baumgard L.H., Crooker B.A. (2009). Fatty acid composition of milk from multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dairy Sci.* 92:4865–4875.
- 30) Carroll S.M., Depeters E.J., Taylor S.J., Rosenberg M., Perez-Monti H., Capps V.A. (2006) Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. *Anim Feed Sci Technol.* 131: 451-73.

- 31) CEPAL Comisión Económica para América Latina y el Caribe.(1998). *Cluster Lácteo en Uruguay*. Proyecto sobre Estrategia de desarrollo de *clusters* en torno a recursos naturales: su crecimiento e implicancias distributivas y medio ambientales. Disponible online.
- 32) Chibisa G.E., Gozho G.N., Van Kessel A.G., Olkowski A.A., Mutsvangwa T. (2008). Effects of peripartum propylene glycol supplementation on nitrogen metabolism, body composition, and gene expression for the major protein degradation pathways in skeletal muscle in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3512-3527.
- 33) Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.*49:181–205.
- 34) Chilliard Y., Robelin J., Rémond B. (1984). In vivo estimation of body lipid mobilization and reconstitution in dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 236–237.
- 35) Clevenger C.V., Plank T.L. (1997). Prolactin as an autocrine/ paracrine factor in breast tissue. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2:59–68.
- 36) Coleman R.A., Lee D.P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.* 43:134-176.
- 37) Coulon J.B., Rémond B. (1991). Variation in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply to the dairy cow: a review. *Livest. Prod. Sci.* 29:31.
- 38) Damián J.P., Sacchi I., Reginensi S., De Lima D., Bermúdez J. (2008). Cheese yield, casein fractions and major components of milk of Saanen and Anglo-Nubian dairy goats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(6):1564-1569.
- 39) Davis A.J., Fleet I.R., Goode J.A., Hamon M.H., Walker F.M., Peaker M. (1979). Changes in mammary function at the onset of lactation in the goat: correlation with hormonal changes. *J. Physiol.* 288:33–44.
- 40) De Torres E., Giannechinii E.R., Artegoitia V., Bouman M., Bianco R. (2007). Métodos de laboratorio y de campo para la evaluación de la calidad de leche, Curso Internacional a Distancia sobre Mastitis y calidad de leche en el marco de la Plataforma de Educación a Distancia Uruguay agroalimentario al mundo. Organizado por el Instituto Iberoamericano de Cooperación Agropecuaria (IICA) del 29 de octubre al 21 de diciembre. Modulo 2: p1-24.
- 41) DePeters E. J., Cant J. P. (1992). Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.* 75:2043–2070.
- 42) Dewhurst R. J., Scollan N.D., Youell S. J., Tweed J. K. S., Humphreys M. (2001). Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass Forage Sci.* 56:68–74.
- 43) Dewhurst R.J., Shingfield K.J., Lee M.R.F., Scollan N.D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:168–206.
- 44) Dhiman T. R., Anand G.R., Satter L.D., Pariza M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* 82:2146–2156.
- 45) DIEA. Estadísticas del sector lácteo: La producción lechera en el Uruguay. Año 2007. (2009). Serie de trabajos especiales N° 282. 1:43.
- 46) Dils R. R. (1986). Comparative aspects of milk fat synthesis. *J. Dairy Sci.* 69:904.

- 47) Doepel L., Pacheco D., Kennelly J. J., Hanigan M. D., Lopez I. F., Lapierre H. (2004). Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. *J. Dairy Sci.* 87:1279–1297.
- 48) Drackley J. K., Cicela T.M., LaCount D.W. (2003). Responses of primiparous and multiparous Holstein cows to additional energy from fat or concentrate during summer. *J. Dairy Sci.* 86:1306-1314.
- 49) Drackley J.K. (2000). Lipid metabolism. En D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Farm animal metabolism and nutrition*. Wallingford: CAB International, p. 97-119.
- 50) Enjalbert F., Nicot M.C., Bayourthe C., Moncoulon R. (1998). Duodenal Infusions of Palmitic, Stearic or Oleic Acids Differently Affect Mammary Gland Metabolism of Fatty Acids in Lactating Dairy Cows. *J. Nutr.* 128(9):1525-32.
- 51) Etherton T.D., Bauman D.E. (1998). Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews.* 78 745–761.
- 52) Farrell Jr. H. M., Malin E. L., Brown E. M., Qi P.X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 11: 135-147.
- 53) Farrell Jr. H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87:1641–74.
- 54) FEPALE Federación Panamericana de la leche. La producción de leche en Uruguay. (2001). *Revista del Plan agropecuario* 103 p23-25
- 55) Finucane K.A., McFadden T.B., Bond J.P., Kennelly J.J., Zhao F.Q. (2008). Onset of lactation in the bovine mammary gland: gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Funct. Integr. Genomics* 8(3):251–264.
- 56) Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- 57) Fox P.F., Mcswweeney P.L.H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Chapman & Hall, London.
- 58) Fulkerson W.J., Wilkins J., Dobos R.C., Hough G.M., Goddard M.E., Davidson T. (2001). Reproductive performance in Holstein- Friesian cows in relation to genetic merit and level of feeding when grazing pasture. *J. Anim. Sci.* 73:397–406.
- 59) Gagliostro G.A., Vidaurreta L.I., Schroeder G.F., Rodriguez A. y Gatti P. (2002). Incrementando los valores basales de ácido linoleico conjugado (CLA) en la grasa butirosa de vacas lecheras en condiciones de pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, 22 (Suplem. 1), 59-60.
- 60) Goff J.P., Horst R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci.* 80:1260-1268.
- 61) Griinari J.M., Bauman D.E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Page 180 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. Yurawecz, M. Mossoba, J. Kramer, M. Pariza, and G. Nelson, eds. AOCS Press, Champaign, IL.
- 62) Griinari J.M., McGuire M.A., Dwyer D.A., Bauman D.E., Palmquist D.L. (1997). Role of insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1076–1084.
- 63) Grummer R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73:2820-2833.

- 64) Grummer, R. (1991). Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74:3244–3257.
- 65) Harvatine K., Bauman D.E. (2006). SREBP1 and Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14) Are Involved in the Regulation of Bovine Mammary Lipid Synthesis during Diet-Induced Milk Fat Depression and Treatment with CLA. *J. Nutr.* 136:2468–2474.
- 66) Hippen A. R., She P., Young J.W., Beitz D.C., Lindberg G.L, Richardson., L.F., Tucker R.W. (1999). Metabolic responses of dairy cattle to various dosages of glucagon. *J. Dairy Sci.* 82:1128– 1138.
- 67) Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Asheria A., Colditz G.A., Speizer F.E. (1999). Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 1001–1008.
- 68) Hui Y.H. (1993). *Dairy Science and Technology Handbook*, volumes 1, 2 and 3, VCH Publishers, New York.
- 69) Ingvarsten K.L.(1994). Models of voluntary food intake in cattle. *Livestock Production Science.* 39: 19-38.
- 70) INML (2009). Evaluación genética nacional. Raza Holando. Disponible en www.inml.org.uy.
- 71) ISO International Organization for Standardization 8402. <http://www.iso.org>
- 72) Jenkins T.C., McGuire M.A. (2006). Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *J. Dairy Sci.* 89:1302–1310
- 73) Jensen R.G., Ferris, A.M. Lammi-Keefe, C.J. (1991). The composition of milk Fat. *J. Dairy Sci.* 74: 3228-3243.
- 74) Jöudu I., Henno M., Kaart T., Püssa T., Kärt O. (2008).The effect of milk proteins contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal.* Vol. 18. P. 967-970.
- 75) Karijord Ø., Standal N., Syrstad O. (1982). Sources of variation in composition of milk fat. *Z Tierzüchtg Züchtgsbiol* 99: 81–93.
- 76) Kay J. K., Weber W. J., Moore C. E., Bauman D. E., Hansen L. B., Chester-Jones H., Crooker B. A., Baumgard L. H. (2005). Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 88:3886–3893.
- 77) Kelly M. L., Kolver E. S., Bauman D. E., Van Amburgh M. E., Muller L. D. (1998). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1630–1636.
- 78) Kelsey J.A., Corl B.A., Collier R.J., Bauman D.E. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588–2597.
- 79) Kennedy J., Dillon P., Delaby L., Faverdin P., Stakelum G., Rath M. (2003). Effect of genetic merit and concentrate supplementation on grass intake and milk production with Holstein-Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:610–621.
- 80) Knight C.H., Wilde C.J. (1993). Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livest. Prod. Sci.* 35:3–19.
- 81) Kolver, E. S., Roche J. R., De Veth M. J., Thorne P. L., Napper A. R. (2002). Total mixed rations versus pasture diets: Evidence of a genotype × diet interaction in dairy cow performance. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 62:246–251.
- 82) Krall, E., Bonnacarrere, L.M. (1997). Relación entre el estado corporal y la producción de leche y su composición. *Revista Cangué (EEMAC)*. N°11. pp: 2-6.

- 83) Kroeker E.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J. E. (1985). Effects of Environmental Factors and Milk Protein Polymorphism on Composition of Casein Fraction in Bovine Milk. *J. Dairy Sci.* 68:1752-1757.
- 84) Laevens H., Deluyker, H., Schukken, Y.H., de Meulemeester, L., Vandermeersch, R., de Muelenaere, E. and de Kruif, A. (1997). Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3219- 3226.
- 85) Lippuner K., Zehnder H.J., Casez J.P., Takkinen R., Jaeger P. (1996). PTH-related protein is released into the mother's bloodstream during lactation: Evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism. *J. Bone Miner. Res.* 11:1394–1399.
- 86) Lock A. L., Bauman D.E. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206.
- 87) Maas J.A., France J., McBride B.W. (1997). Model of milk protein synthesis. A mechanistic model of milk protein synthesis in the lactating bovine mammary gland. *Journal of Theoretical Biology* 187: 363-378.
- 88) MacDonald J.W., Penno J.A., Lancaster J.A.S., Roche J.R. (2008), Effect of stocking rate on pasture production, milk production, and reproduction of dairy cows in pasture-based systems. *J. Dairy Sci.* 91: 2151-2163.
- 89) Maekawa M., Beauchemin K.A., Christensen, D.A. (2002). Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 1165–1175.
- 90) Martin P., Grosclaude F. (1993). Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livest. Prod. Sci.* 35:95.
- 91) Mather I.H., Keenan T.W. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *JAMA* 3: 259–273,
- 92) McManaman J.L., Zabaronick W., Schaack J., Orlicky D.J. (2003). Lipid droplet targeting domains of adipophilin, *J. Lipid Res.* 44: 668–673.
- 93) Meikle A., Kulcsar M., Chilliard Y., Febel H., Delavaud C., Cavestany D. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction.* 127: 727–37.
- 94) Meisel H., Schlimme E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology.* 1: 42-43.
- 95) Menzies K.K., Lefevre C., Macmillan K.L., Nicholas K.R. (2009). Insulin regulates milk protein synthesis at multiple levels in the bovinemammary gland. *Funct Integr Genomics.* 9:197–217.
- 96) Middaugh R.P., Bear R.J., Casper D.P., Schingoethe D.J., Seas, S.W. (1988). Characteristics of milk and butter from cows fed sunflower seeds. *J. Dairy Sci.* 71: 3179–3187.
- 97) Miller N., Delbecchi L., Petitclerc D., Wagner G. F., Talbot B. G., Lacasse P. (2006). Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *J. Dairy Sci.* 89(12):4669-4677.
- 98) Moate P.J., Chalupa W., Boston R.C., Lean I.J. (2007). Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, vol. 90, p. 4730-4739.
- 99) Moghadasian M.H. (2008). Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 48: 402–410. Mol J.A., Lantinga-van Leeuwen I., van Garderen E., Rijnberk A. (2000).

- Progesterin-induced mammary growth hormone (GH) production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:71–76.
- 100) Molento C. F., Block M. E., Cue R. I., Lacasse P., Petitclerc D. (2005). Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin (rbST) and their interaction on DMI and milk fat production in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 97:173–182. Moller N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition.* 47: 171–182. Moore C. E., Kay J. K., VanBaale M. J., Collier R. J., Baumgard L. H. (2005). Effect of conjugated linoleic acid on heatstressed Brown Swiss and Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 88:1732–1740.
 - 101) Moore C.E., Hafliger H.C., Mendivil O.B., Sanders S.R., Bauman D.E., Baumgard L. H. (2004). Increasing amounts of conjugated linoleic acid (CLA) progressively reduce milk fat synthesis immediately postpartum. *J. Dairy Sci.* 87:1886–1895.
 - 102) Morales M. Sol, Palmquist D. L., Weiss W. P. (2000). Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soybeans or tallow. *J. Dairy Sci.* 83:2112–2119.
 - 103) Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., McDonald R.E., Flickinger B.D., Perkins E.G. (1996). Analysis of Cyclic Fatty Acid Monomer 2-Alkenyl-4,4-dimethyloxazoline Derivatives by Gas Chromatography–Matrix Isolation–Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3193–3196.
 - 104) Mulvihill D.M., Fox P.F. (1994). Developments in the production of milk proteins. In *New and Developing Sources of Food Proteins*, Hudson, B.J.F., ed., Chapman and Hall, London, pp 1±30.
 - 105) Neville M.C., McFadden T.B., Forsyth I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7:49–66.
 - 106) Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., Monardes H. G. (1982). Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 65:1993.
 - 107) Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., Monardes, H. G. (1987). Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.* 70: 563–570.
 - 108) Noci F., French P., Monahan F.J., Moloney A.P. (2005). The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of pastured heifers: Influence of the duration of grazing. *J. Animal Sci.* 83: 1167-1178.
 - 109) Ollivier-Bousquet M.E., Devinoy. (2005). Physiology of lactation: Old questions, new approaches. *Livest. Prod. Sci.* 98:163–173
 - 110) OPYPA. Oficina de programación y planeamiento agropecuario Lechería: situación y perspectivas. (2007). *Anuario 2007*:123-129
 - 111) Ostensen S., Foldager J., Hermansen J.E. (1997). Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk *Journal of Dairy Research* 64 207±219.
 - 112) Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D. M. (1993). ADSA foundation symposium: Milk fat synthesis and modification. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753.

- 113) Pariza M.W., Park Y., Cook M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res.* 40 (4): 283–98.
- 114) Pedron O., Cheli F., Senatore E., Baroli D. and Rizzi R. (1993). Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76,2528–2535.
- 115) Pereira I., Laborde D., Lopez-Villalobos N., Ruprechter G., Carriquiry M., Meikle A. (2010). Productive and reproductive performance of Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein Friesian cows in a predominantly pasture-based system. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 70: 306-310.
- 116) Politis I., Ng-Kwai-Hang, F. (1988). Effects of somatic cells count and milk composition on the coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 71: 1740.
- 117) Putnam D.E., Varga G.A.(1998). Protein density and its influence on metabolite concentration and nitrogen retention by Holstein cows in late gestation. *J. Dairy Sci.* 81, 1608–1618.
- 118) Realini C.E., Duckett, S.K., Brito G. W., Dalla Rizza M., De Mattos D. (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science.* 66: 567–577.
- 119) Roche J. R., Berry D. P., Kolver E. S. 2006. Holstein-Friesian strain and feed effects on milk production, body weight, and body condition score profiles in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3532–3543.
- 120) Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J., Berry D.P. (2009) Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* Vol. 92, No.12, pp. 5769-5801.
- 121) Roche J.R., Lee J.M., Macdonald K.A., Berry D.P. (2007). Relationships Among Body Condition Score, Body Weight, and Milk Production Variables in Pasture-Based Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:3802–3815.
- 122) Rosen J.M., Wyszomierski, S.L., Hadsell, D. (1999). Regulation of milk protein gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 407– 436.
- 123) Rudolph M.C., McManaman J.L., Hunter L., Phang T., Neville M.C. (2003). Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 287–307.
- 124) Sabikhi L. (2004). Designer milk: an imminent milestone in dairy biotechnology. *Curr. Sci.* 87: 1530–1535.
- 125) SAS Institute. (2003). *SAS/STAT User's Guide, Version 8.0.* SAS Institute, Cary, NC.
- 126) Schroeder G. F., Delahoy J. E., Vidaurreta I., Bargo F., Gagliostro G. A., Muller L. D. (2003). Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. *J. Dairy Sci.* 86: 3237-3248.
- 127) Soyeurt H., Dehareng F., Mayeres P., Bertozzi C., Gengler N. (2008). Variation of delta9-desaturase activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91:3211-3224.
- 128) Spornly E. (1989). Effects of diet on milk composition and yield of dairy cows with special emphasis on milk protein content. *Swed. J. Agric. Res.* 19:99–108.

- 129) Stanton C., Lawless F., Kjellmer G., Harrington D., Devery R., Connolly J. F., Murphy J. (1997). Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62:1083–1086.
- 130) Stockdale C.R., Doyle P.T., Wijesundera C., Williams R.P.W (2005) Effects of body condition at calving and peri-parturient nutrition on the composition of milk fat produced by grazing dairy cows.. *Australian Journal of Dairy Technology.* 60, 3; ProQuest Agriculture Journals pg. 244.
- 131) Stoop W. M., Van Arendonk J.A.M., Heck J.M.L., Van Valenberg H.J.F., Bovenhuis H. (2008). Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein Friesians. *J. Dairy Sci.* 91:385–394.
- 132) Stoop W.M., Bovenhuis H., Heck J.M.L., van Arendonk J.A.M. (2009). Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows *J. Dairy Sci.* 92: 1469-1478.
- 133) Stull J.W., Brown W.H., (1964). Fatty acid composition of milk. II. Some differences in common dairy breeds. *J. Dairy Sci.* 47: 1412.
- 134) Teodoro R.L., Madalena F.E. (2005).Evaluation of crosses of Holstein, Jersey or Brown Swiss sires x Holstein-Friesian/Gir dams. 3. Lifetime performance and economic evaluation. *Genetics and Molecular Research.* 4(1):84-93.
- 135) Trujillo A.J., Casals I., Guamis B. (2000). Analysis of major caprine milk proteins by Reverse- Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, *J. Dairy Sci.* 83 11–19.
- 136) VanRaden P.M., Sanders A.H. (2003). Economic merit of crossbred and purebred US dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:1036-1044.
- 137) Veerkamp R. F., Simm G., Oldham J. D. (1994). Effects of interaction between genotype and feeding system on milk production feed intake, efficiency and body tissue mobilization in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 39:229–241.
- 138) Visser S., Slangen Ch. J., Rollema H. S. (1991). Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 548:361–370.
- 139) Wales W.J. (2009). Effects of strain of Holstein-Friesian and concentrate supplementation on the fatty acid composition of milk fat of dairy cows grazing pasture in early lactation. *J. Dairy Sci.* 92: p. 247-255.
- 140) Walstra P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* 9: 189±192.
- 141) Walstra P., Wouters, J.T.M. & Geurts, T.J. (2006). *Dairy Science and Technology.* Taylor & Francis. New York. 782pp .
- 142) Wang S., Roy G. L., Lee A. J., McAllister A. J., Batra T. R., Lin C. Y., Vesely J. A., Wauthy J. M., Winter K. A. (1992). Genetic line concentrate level interactions for milk production and feed efficiency in dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 72:227–236.
- 143) White S. L., Bertrand J.A., Wade M.R., Washburn S.P., Green J.T., Jenkins T.C. (2001). Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture of a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 84:2295–2301.
- 144) Wiking L., Stagsted J., Bjorck L., Nielsen J.H. (2004). Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. *Int. Dairy J.* 14: 909-13.

- 145) Woodside B., Abizaid A., Walker C. (2000). Changes in leptin levels during lactation: Implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Horm. Behav.* 37:353–365.
- 146) Yang J., Kennelly J. J., Baracos V. E. (2000). The activity of transcription factor stat5 responds to prolactin, growth hormone and IGF-I in rat and bovine mammary explant culture. *J. Anim. Sci.* 78:3114–3125.

ANEXO: TRABAJO ENVIADO A REVISTA ARBITRADA

MILK CASEIN AND FATTY ACID FRACTION ARE AFFECTED BY PARITY AND NUTRITIONAL REGULATION OF BODY CONDITION SCORE AT THE INITIATION OF THE TRANSITION PERIOD IN DAIRY COWS UNDER GRAZING CONDITIONS. V. Artegoitia*^{†1}, A. Meikle[†], J.P. Damián[‡], L. Olazabal[‡], M.L. Adrien*, D.A. Mattiauda*, J. Bermudez*, B. Crooker[§], M. Carriquiry*.

*Agronomy School, Montevideo 12900.

[†] Veterinary School, Montevideo 11600.

Universidad de la República Oriental del Uruguay

[‡]Technologic Laboratory of Uruguay, Montevideo 11500.

[§]Department of Animal Science, University of Minnesota, St.Paul 55108.

¹Correspondence: Virginia Maria Artegoitia Etcheverry
Veterinary School
University of Uruguay
Alberto Lasplaces 1620
Montevideo 11600
Uruguay
Fax: +598 026223106
Phone: +598 026223106
Email: varte@adinet.com.uy

ABSTRACT

The effect of different body condition score (BCS) at 30 days before calving (-30 days) induced by a differential nutritional management from -100 days until -30 days was determinate on milk productive parameters, milk casein and fatty acid fractions at 2 and 8 week of lactation (WOL) in primiparous (L1, n=30) and multiparous (L2, n=32) Holstein cows under grazing conditions. Cows had similar body condition score (BCS) at -100 days and after nutritional management differ in low and high (0.5 point, scale 1 to 5). Milk yield was greater in L2 than L1 cows and tended to decrease from WOL 2 to 8 only in L2low cows. Milk protein, fat and casein yields were greater in L2 than L1 cows and decreased from WOL 2 to 8. Milk casein presented greater concentration in L2high cows and less whey than L2low and L1 cows at WOL 2. Milk κ -casein was greater and β -casein was less in L2 than L1 cows. As lactation progressed, casein fraction composition was not altered. Only κ -casein fraction was affected by BCS, L1low presented greater concentration than L1high. The proportion of *de novo* (4:0 to 15:1) and mixed origin fatty acids (16:0 to 16:1) increased, whereas preformed fatty acids ($\geq 17:0$) decreased from WOL 2 to 8. Saturated fatty acid (FA) tended to be greater and monosaturated FA were less in L2 than L1 cows. High BCS cows presented more polyunsaturated FA, conjugated linoleic acid and n-6, n-3. Casein and fatty acid fractions in milk may be modified by a differential management during the precalving period (BCS at -30 days) in cows under grazing conditions; milk components are also affected by cow's development

Key words: energy tissue reserves, nutraceutical milk profile.

INTRODUCTION

Milk composition of protein and fatty acid fractions has recently gained interest from manufacturers and consumers, because it influences nutritional, physical, and flavor properties of dairy product and consumer acceptance (Bobe, 2007). In order to respond to market forces and human health recommendations that demand certain milk properties and components, like conjugated linoleic acid (CLA), a better understanding of milk biosynthesis is needed (Lock and Shingfield, 2004; Bauman, 2006).

Milk protein consist 80% of casein that comprises proteins from four genes: α 1-, α 2-, κ - and β -caseins (Farell et. al., 2004). In early lactation, energy and nitrogen (N) intake are often less than adequate to support the high rates of milk protein output (Bequette et. al., 1998). In these circumstances, depletion of skeletal muscle protein is important to supplement dietary and microbial protein amino acid (AA) to maintain an adequate supply of AA to the mammary gland and carbon for gluconeogenesis in the liver (Black et. al., 1990). The prevailing endocrine profile of the periparturient cow, includes major reductions in plasma levels of insulin and insulin-like growth factor-I, that together with insulin resistance in peripheral tissues, must permissively facilitate, if not actively promote, net mobilization of AA from these tissues (Bell et. al., 2000). In the dairy cow, mobilization of tissue protein is able of supplying 90 to 430 g of AA/day (Bequette et. al., 1998). Scarce studies have analyzed the effect of the body reserves (body condition score, BCS) on milk protein profile. Ostersen et. al. (1997) did not found any effect of BCS at calving on α 1-, α 2-, κ - and β -caseins concentrations. In this study, cows were classified according to BCS at calving, e.g., BCS was not induced. Moreover, the AA supply may differ between parities as primiparous cows would have needs of AA for growth occurring simultaneously with the demands of lactation, as described previously (Rémond et. al., 1991), as well as lower feed intake capacity (Ingvarsen, 1994; Maekawa et. al., 2002).

Milk fatty acids (FA) are originated from 3 major sources: synthesized *de novo* in the mammary gland, absorbed from gastrointestinal tract (directly from the diet or formed in the rumen by biohydrogenation or bacterial synthesis), and released from body fat stores (Stoop et. al., 2009). At the onset of lactation, cows are in negative energy balance, that causes mobilization of adipose FA and incorporation of these long chain FA into milk fat (Palmquist et. al., 1993; Kelsey et. al., 2003; Kay et. al., 2005). Therefore, high uptake of long-chain FA inhibits *de novo* synthesis of short-chain FA by mammary tissue (Palmquist et. al., 1993). The changes in milk FA composition over lactation reflect shifts in the uptake and/or synthesis activity have been related to changes in cow energy status (Van Knegsel et. al., 2005; Stoop et. al., 2009), and could differ between parities (Kelsey et al., 2003). Few studies (Pedron et. al., 1993; Agenas et. al, 2003; and Stockdale et. al., 2005) have evaluated the effects of BCS on milk FA composition. Milk of high BCS at calving cows, has been reported to present increased content of long chain and unsaturated FA, and reduced contents of short and medium FA on confined (Pedron et. al., 1993; Agenas et. al., 2003) and grazing systems (Stockdale et. al., 2005). Physiological factors, like parity, have received little attention; Kelsey et. al. (2003) reported changes according to parity in the greatest component of milk FA, like C14 and C18, but no effect in CLA.

The objective of this study was to evaluate the effect of nutritionally regulated differential BCS at one month before the expected calving date on milk casein and FA fractions in primiparous and multiparous Holstein cows under grazing conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animal experimentation was approved by the Animal Experimentation Committee of the Universidad de la República Oriental del Uruguay.

Experimental design

Primiparous (L1, n =30) and multiparous (L2, 2 to 5 lactations; n =32) healthy Holstein cows with an average milk yield of 4,800 and 6,000 kg at 305 days-in-milk were selected from the herd of the experimental dairy farm of the Agronomy School (Paysandú, Uruguay).

Cows were randomly blocked according to body weight and expected calving date, and assigned to different nutritional treatments to induce different BCS relative to calving (-30 days). Since the assignment of cows to treatments from -100 to -30 days was random, cows had to lose, maintain or gain BCS, thus, different planes of nutrition were offered with approximately 7, 14 or 20 kg/day of DM [estimated chemical composition: 12.7% crude protein (CP), 56.7% neutral detergent fibre (NDF), 24.3% acid detergent fibre (ADF) and 1.25 Mcal/kgDM of net energy of lactation (NEL)] of a long-term established pasture with a maximal herbage mass of 1200 kgDM/ha. Body condition score was evaluated every 15 days and animals were re-assigned in order to achieve the desired BCS -30 days. Only animals that responded to nutritional treatments were considered in the study and this was defined as described previously by Adrien et. al. (2010), follows: L1 and L2 cows with high BCS (L1high, n=13, L2high, n=9) had to gain 0.5 points of BCS, L1 cows with low BCS (L1low, n=9) had to lose 0.5 points of BCS, and L2 cows with low BCS had to maintain BCS (L2low=8) at least in two subsequent observations from -100 to -30 days. At -30 days there were differences in BCS among treatments: 3.4 ± 0.05 vs. 2.9 ± 0.07 for L1high and low, respectively and 3.4 ± 0.07 vs. 2.8 ± 0.07 for L2high and low, respectively.

From -30 days to calving, L1 and L2 cows were managed apart and received a diet that included Moha hay *ad libitum* and 4.2 and 5.1 kgDM/cow/day of whole-plant corn silage and 3.7 and 4.6 kgDM/cow/day of commercial concentrate for L1 and L2, respectively, offered once a day. This resulted in an estimated chemical composition of 9.5% CP, 54.2% NDF, 30.8% ADF and 1.33 Mcal/kgDM of NE_L, for both groups. From calving to 60 days, L1 and L2 cows grazed separately by group a second year pasture, mixture of *Festuca arundinacea*, *Trifolium repens*, and *Lotus corniculatus*, with a forage allowance of 30 kg DM/cow in weekly plots allocated twice per day. Pasture average composition for the whole period was on average 25% DM, 14.2% CP, 49.0% NDF, and 24.5% ADF. Cows were also supplemented individually with 3.1 kgDM of whole-plant corn silage (31.1% DM, 6.9% CP, 65.0% NDF, and 33.0% ADF) and 3.7 kgDM of a commercial concentrate (89% DM, 18.1% CP, 19.2% NDF and 12% ADF) after the morning milking. In addition, cows received 1.3 kgDM of the same commercial concentrate in the parlor during each milking (AM and PM).

The evolution of BCS, productive and reproductive parameters and endocrine and metabolic profiles have been published previously (Adrien et. al., 2010).

Data Collection and Sample Analyses

Cows were milked twice a day (5:00 AM and 3:00 PM) and yields at each milking were recorded. Samples for milk composition were obtained from four milking per week from each cow and were stored in bottles containing preservative (Lactopol®, Rodolfo Benzo, Uruguay). Samples were taken to the laboratory and immediately placed in a 37° C water bath for 10 min, homogenised and a representative aliquot subsequently analysed for fat, protein, and lactose by

midinfrared spectrophotometry (Milko-Scan, Foss Electric, Hillerød, Denmark) and for SCC by using a Fossomatic (Foss Electric, Hillerød, Denmark)

During the weeks of lactation (WOL) 2 and 8, milk samples were obtained for fatty acid and casein fraction determination. Samples were stored at -20° C without preservative and analysed for individual FA composition. Samples for casein determinations were skimmed by centrifugation (4000 rpm at 5° C for 20 minutes). A 100 µl volume of skim milk was mixed with 900 µl of sample buffer and stored at -20° C. The sample buffer (pH=7.5) consisted of 17.5 Mm 1,3-bis [tris (hydroxymethyl)- methylamino] propane containing 7 M urea and 0.5% of 2-mercaptoethanol.

Casein fraction determination

Total protein and whey content of milk were analysed by the Kjeldahl method (AOAC, 1980). Whey protein was obtained from skim milk by isoelectric precipitation at pH 4.6 by the addition of 1 M HCL.

A modification of the method proposed by Visser et al. (1991) was used to separate the major proteins of cow milk (κ , α s-1, α s-2 and β - caseins) in a single run. The fractions were determined by RP-HPLC with an Apex WP ODS column (7 µm, 4.6 × 250 mm, Jones Chromatography Ltd., Mid-Glamorgan, UK) maintained at 46°C, in according to Damián et al. (2008). Samples were eluted with a gradient of acetonitril in 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid. Two solvents were used for the mobile phase as follows: A - acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (100-900-1 vol) and B - the same mixture with the proportions (900-100-0.7 vol). Proteins were eluted with a series of linear gradients: from 28.7 to 42.5% of solvent B in solvent A for 15 min, 42.5 to 48.8% solvent B for 15 min, 48.8 to 28.7% solvent B for 15 min, finishing with 28.7% of solvent B for 15 min in order to column reequilibration. Flow rate was 1 mL/min and the eluted peaks were detected by UV-absorbance at 214 nm. Quantification of the casein fractions was made by measurement of the peak area for each fraction as a proportion of the whole casein peak area (Trujillo et al., 2000).

Fatty Acid fraction determination

Milk fat was extracted according to Folch (1957) and fatty acid methyl esters were prepared by the transmethylation procedure described by IUPAC 2.301 (Mossoba et al., 1996). Fatty acid methyl esters were quantified using a gas chromatograph (Agilent Technologies 6890, Palto Alto, CA, USA) connected to a mass spectrometer (Agilent Technologies 5973) equipped with a flame-ionization detector and a CP 2560 fused silica SP 2560 capillary column (100 m × 0.25 mm i.d. with 0.2-µm film thickness; Supelco Inc., Bellefonte, PA). Gas chromatograph column oven, gas variables, and fatty acid peak identification were as previously described (Moore et al., 2004, 2005).

Statistical analysis

Effects of parity, BCS, and WOL on milk yield and composition, and milk casein and FA profiles, were analyzed on a randomized block design by repeated measures (mixed procedure; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). With WOL as the repeated effect and first-order autoregressive as the covariance structure. The model included the effects of parity BCS at -30 days nested within parity, WOL, and their interactions as fixed effects and block and cow as random effects. The Kenward-Rogers procedure was used to adjust the denominator degree of freedom. Pearson correlations were performed to examine means associations between variables

(Corr procedure, SAS). Tukey-Kramer tests were conducted for mean separation. Means are reported as least squares means with their respective pooled standard errors and were considered to differ when $P \leq 0.05$ and trends were identified when $0.05 < P \leq 0.10$.

RESULTS

Milk yield and composition

Milk yield was greater in L2 than L1 cows (29.17 vs. 23.88 ± 0.49 kg/d; $P < 0.01$), and was not affected by BCS at -30 days within parity or WOL (Table 1). However, there was an interaction of BCS at -30 days within parity with WOL ($P < 0.01$) as milk yield tended ($P = 0.09$) to decrease from WOL 2 to 8 only in L2low cows.

Milk protein and milk fat yields were greater ($P < 0.01$) in L2 than L1 cows (0.94 vs. 0.75 ± 0.02 kg/d and 1.08 vs. 0.88 ± 0.04 kg/d for milk protein and fat, respectively; Table 1), and decreased ($P < 0.01$) from WOL 2 to 8 (0.89 vs. 0.81 ± 0.02 kg/d and 1.05 vs. 0.90 ± 0.03 kg/d for milk protein and fat, respectively). In addition, there was an interaction of BCS at -30 days within parity with WOL ($P = 0.03$) on milk fat yield as milk fat decreased from WOL 2 to 8 only in L2low cows.

Milk fat percentage was less ($P < 0.05$) in L1low than in L2low cows while no differences were observed between parities in high BCS cows (Table 1). All groups decreased ($P < 0.05$) fat concentrations from WOL 2 to 8, except for L2high. Milk somatic cell count were greater ($P = 0.02$) in L2 than L1 ($93,325$ vs. $44,668 \pm 17,782$ cell/ml).

Nitrogen determination by Kjeldahl

Total casein content represented 76.3 ± 1.2 % of total milk protein. L2 presented more casein (797.44 vs. 772.40 ± 6.05 g N/kg; $P = 0.02$) and less whey (202.56 vs. 227.60 ± 6.05 g N/kg) concentrations than L1 cows (Table 2).

Casein and whey contents were affected by WOL ($P = 0.03$, Table 2): while casein content decreased (794.65 vs. 775.20 ± 6.06 g N/kg), whey content increased (205.35 vs. 224.80 ± 6.06 g N/kg) from WOL 2 to 8. There was a trend ($P = 0.10$) for an interaction between BCS -30 days within parity and WOL on casein and whey protein concentrations in milk: casein decreased and whey proteins increased ($P = 0.03$) from WOL 2 to 8 only in L1high cows. L2 high cows presented more casein and less whey than the others groups at WOL 2 (Figure 1 A, B).

Casein fractions

L2 cows presented less β -casein proportion (429.93 vs. 445.64 ± 3.96 g/kg; $P = 0.04$) and greater milk κ -casein (92.21 vs. 83.49 ± 2.50 g/kg; $P = 0.02$) than L1 cows (Table 2).

As lactation progressed, casein fraction composition was not altered (Table 2), but there was a trend ($P = 0.07$) for an interaction of parity with WOL on β -casein, that was greater in L1 than L2 cows at WOL 8, due primary for a greater concentration ($P < 0.05$) in L1high than L2 cows at WOL 8 (Figure 1C). The κ -casein fraction was affected ($P = 0.03$) by BCS at -30 days within parity as L1high had a reduced proportion of this fraction than L1low and L2low cows (Table 2).

Fatty acid Fractions

The proportion of *de novo* (C4:0 to C15:1) and mixed origin fatty acids (C16:0 to C16:1, 95% represented by palmitic acid, C16:0) increased from WOL 2 to 8 (168.69 vs. 226.42 ± 10.26 mg/g and 291.3 vs. 324.18 ± 6.87 mg/g, respectively; $P < 0.01$; Figure 2). In contrast, preformed fatty acids (\geq C17:0, 51% represented by oleic acid (C18:1), 27% represented by stearic acid,

C18:0) decreased (543.43 vs. 454.24 ± 16.25 mg/g; $P < 0.01$) at the same observations (Figure 2). All individual *de novo* FA -except butyric acid, C4:0- as well as palmitic acid increased with WOL (Table 4). Whereas, the decrease observed at WOL 8 in preformed FA was mainly due to changes in stearic acid.

Mixed origin fatty acids tended ($P = 0.10$) to be affected by BCS at -30 days within parity: L2low had greater concentrations than L2high cows (Table 3) and this was associated to the increased C16:1 concentrations in L2low compared to L2high cows ($P < 0.01$, Table 4).

On average, saturated (SAT) FA tended to be greater ($P = 0.06$) and monosaturated (MUFA) FA were less ($P = 0.04$) in L2 than L1 cows (663.53 vs. 621.48 ± 13.40 mg/g and 295.85 vs. 340.10 ± 12.40 mg/g, respectively), which determined a saturated/unsaturated ratio (SAT/UNSAT) greater ($P = 0.03$) in L2 than L1 cows (2.38 vs. 1.70 ± 0.22 mg/g; Table 3). However, there was an interaction between parity and WOL on the proportion of SAT and MUFA, SAT increased ($P = 0.04$) and MUFA decreased ($P = 0.03$) from WOL 2 to 8 (Figure 3) only in L1 cows which determined an increased ($P = 0.03$) SAT/UNSAT (1.45 vs. 1.97 ± 0.32 respectively), as lactation progressed.

Although parity and WOL did not affect milk polyunsaturated FA (PUFA) concentrations, PUFA were greater in high BCS cows, but this effect was evident at WOL 2 for L2 cows and at WOL 8 for L1 cows (Figure 3C). Changes on PUFA concentrations were associated with changes on n-3 FA, especially on linolenic acid, that were greater ($P < 0.01$) in both, L1 and L2, high BCS cows (Tables 3, 4). Although there were no differences in linoleic acid among cow groups, n-6 FA tended ($P = 0.10$) to be affected by BCS at -30 days within parity as L2high tended to present greater concentrations than L2low cows (Table 3).

Trans milk FA tended ($P = 0.07$) to increase from WOL 2 to 8 only in L2high cows (Figure 4A2). This determinate that the proportion of *trans* FA in milk tended to be greater ($P = 0.08$) in L2high than in low BCS cows at WOL 8 (Figure 4A). As well, CLA concentrations was greater ($P = 0.02$) in high BCS cows (Table 4) but there was a trend ($P = 0.06$) for an interaction between BCS at -30 days within parity and WOL, CLA concentrations decreased CLA from WOL 2 to 8 only L1low, which determined that the proportion of CLA tended to be greater L1high than L1low cows at WOL 8 (Figure 4B1). In addition, L2low had a reduced concentration of CLA than L2high at WOL 2 (Figure 4B2).

The ratio 14:1/14:0 tended ($P = 0.07$) to increase from WOL 2 to 8 only in L1 cows (0.05 vs. 0.07 ± 0.01 mg/g, Table 3). The ratio 16:1/16 tended ($P = 0.07$) to be reduced in L2high than L2low and L1 cows (Table 3).

DISCUSSION

This study demonstrated that the induced BCS at -30 days at calving, parity, and WOL affected not only milk production but also total casein and its fractions, as well as, fatty acid fractions in dairy cows under grazing conditions. These results suggest that different energy intake or a differential partitioning of nutrients among tissues during the early postpartum period could depend – at least partially - on animal development (L1 vs L2 cows) which in turn interacts with the nutrition management during the pre-partum period.

Effects of parity and BCS at -30 days on milk yield and composition at WOL 2 and 8, are in agreement with Adrien et. al. (2010) when the data of this experiment was analyzed in weekly basis during the first 8 WOL.

Milk casein content was greater at WOL 2 in our study, in agreement with a previous report (Ng-Kwai-Hang et. al., 1982) that found greater milk casein content during the first 10 days-in-milk. In contrast, Ostersen et. al. (1996) found that casein reached its maximum at mid lactation. While, we did not found changes in casein fractions between WOL 2 and 8, Ostersen et. al. (1996) and Kroeker et. al. (1985) reported decreased/increased proportions of α s-casein/ β -casein, respectively, along lactation. Contradictory studies were found on κ -casein: decreased proportions (Ostersen et. al. 1996) or no changes (Kroeker et. al., 1985) were reported. Differences in milk casein concentrations during lactation could be attributed to changes in the number of secretory cells, which peak occurs in early lactation (14 d) (Capucco et. al., 2001), activity of mammary cells (Na-dependent transport), extra/intracellular AA concentration, and casein gene expression that is regulated by hormonal pathways (Mass et. al., 1997).

Milk casein concentrations were greater in L2 than L1 cows; this could be due to greater cell content and cellular differentiation in the mammary gland of L2 cows (Miller et. al., 2006). In addition, multiparous cows presented greater DMI than primiparous cows (Ingvarlsen, 1994; Maekawa et. al., 2002) which could result in greater circulating peptides and AA, sources for casein synthesis in early lactation cows (Bequette et al., 1998; Chibisa et. al., 2008). Moreover, the reduced plasma insulin concentrations found in L2 cows (Adrien et. al., 2010), could have promoted an enhanced proteolysis in this category (Bell et. al., 2000). In agreement with our results, several researchers (Kroeker et. al. , 1985; Ng-Kwai-Hang et. al., 1987; Jōudu et. al. , 2008) have found that β -casein percentage decreased while κ -casein percentage increased in multiparous cow. Auld et. al. (1996) reported that β -casein is most susceptible to breakdown for plasmin activity associated with high somatic cell count. Indeed, L2 cows presented greater somatic cell count, as was reported by others (Laevens et. al., 1997; Sederevicius et. al., 2006). No others fractions differ according to parity in our study, in disagreement with Kroeker et. al. (1985) and Ng-Kwai-Hang et. al. (1987) that found increased α s-casein in multiparous cows. Contradictory results regarding the effect of physiological factors (WOL and parity) on casein fractions, may be due to unknown feeding practices (TMR vs. grazing) and/or determination analyses (electrophoresis vs. HPLC).

The κ -casein was the only casein fraction affected by BCS at -30 days, being greater in L1low than L1high cows. Bobe et. al. (2007) reported that glucagon infusion into fed- restricted Holstein cows in early lactation, increased only κ -caseins fractions, and suggested that glycosylated κ -casein is controlled at least partly independently from other milk protein fractions. The casein gene expression (α s1-, α s2-, κ - and β -caseins), is the result of a complex hormonal regulation at both transcriptional and post-transcriptional levels (Martin and Grosclaude, 1993); insulin stimulates casein gene expression (Menziez et. al., 2008). Indeed, greater insulin concentrations were found in L1low cows at the end of the nutritional treatment when compared to L1 high cows (Adrien et. al., 2010), which may have stimulated κ -casein gene expression.

Fatty acid origin (*de novo*, mixed origin, preformed) was clearly affected by WOL since greater concentration of preformed FA were found at WOL 2 , which is consistent with previous reports (Stanton et. al., 1997; Kelsey et. al., 2003; Kay et. al., 2005). When long-chain FA are available either from the diet, or from body fat mobilization, there is a decrease in the percentage of *de novo* and mixed origin FA in milk fat (Chilliard et. al., 2000). It has been shown that long-chain

FA (with C16 or more carbon atoms) are potent inhibitors of mammary FA synthesis, through a direct inhibitory effect on acetyl CoA activity (Barber et. al., 1997). Indeed, the greater concentrations of preformed FA at WOL 2, are consistent with the greater NEFA concentrations found at early lactation in the same experiment (Adrien et. al., 2010).

Although no effect of parity was observed in FA origin, it did affect SAT; greater concentrations of SAT were found in L2 cows at WOL 2 which could be explained by a greater proportion of *de novo* SAT (data not shown). Indeed, Miller et. al. (2006) reported greater mammary DNA concentration and abundance of FAS protein in L2 cows during early lactation, but not at mid/late lactation. Greater concentrations of MUFA in L1 cows were mainly due to the greater content of oleic acid (C18:1) in these cows. This could be associated with a greater body fat mobilization, since it has been reported that L1 cows have less DMI than L2 cows on early WOL (Ingvarsen, 1994; Maekawa et. al., 2002). Except for Kelsey et. al. (2003), we have not found any other published study that had systematically examined the effect of parity on milk FA. While Kelsey et. al. (2003) demonstrated effects in milk individual FA profile, such as C:14 and C:16, in L1 and L2 Holstein and Brown Swiss cows fed TMR, we did not find differences according to parity in Holstein cows under grazing conditions.

Effects of BCS in milk FA *de novo* and preformed were not found. However, L2low cows tended to present greater mixed origin FA than L2high cows, mostly due to a greater proportion of palmitoleic acid (C16:1). There are two sources of palmitoleic acid (C16:1) in milk, mainly synthesized *de novo* through $\Delta 9$ -desaturase activity from palmitic acid (C:16) in the mammary gland or from blood stream (Wiking et. al., 2004).

Although, other studies reported less SAT and greater MUFA in milk fat of cows with high BCS at calving (Pedron et. al., 1993) or one month before calving (Stockdale et. al., 2005), we did not find an effect of BCS at -30 days on SAT or MUFA in milk FA proportions. However, concentrations of PUFA in milk fat were greater in high BCS cows. According to Chilliard et. al. (2000), PUFA are not synthesized by ruminant tissue, therefore their concentration in milk depends firstly on the PUFA content of the diet and secondly on the amount of PUFA that escape ruminal biohydrogenation. Grassing diets contain a high proportion of PUFA (50–75%) of total fatty acids as α -linolenic acid (Dewhurst et. al., 2006). The presence of forage in the diet of ruminants has been associated with an increased rumen PUFA outflow which is likely due to a faster rate of passage that limits forage PUFA hydrogenation (Dewhurst et. al., 2006). We suggest that increased DMI could explain in part the increased PUFA in milk fat of high BCS cows.

The milk CLA concentration was greater in cows with high BCS. Vaccenic acid (*trans*-11 C18:1) is the predominant source of endogenously synthesized *cis*-9, *trans*-11 CLA in the mammary gland through the action of mammary $\Delta 9$ -desaturase, and small amount of the CLA originates from biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. The increased linolenic acid (C18:3) content of in high BCS cows in our study, could probably resulted from increased DMI of high quality pastures (40 to 80 g/100g FA; Dewhurst et al., 2001) that increased ruminal production of the *trans*-11 C18:1 (vaccenic acid). Large amounts of *trans*-11 C18:1 absorbed post-ruinally in grazing cows and its subsequent desaturation to CLA by the enzyme $\Delta 9$ - desaturase in mammary gland, could explain the greater CLA content in milk reported in cows with greater BCS (Griinari and Bauman, 1999). Vaccenic acid (represented 88

% of *trans* FA) tended to increase from WOL 2 to 8 only in L2high cows. The L2high cows presented better energy status at WOL 8 (Adrien et. al., 2010) probably due to a faster recovery of DMI in early lactation. Besides, n-6 and n-3 were greater in L2 high cows, which could be due to a greater intake of their precursors (C18:2 and C18:3) in fresh grass (Moghadasian, 2008). EPA and DHA are absent or at a minimal level on grazing dairy cow diets; consequently, they are typically present in very low amounts in ruminant products (<0.1% of total FA) (Lock and Bauman, 2004).

This study shows that casein and FA fractions in milk are affected by cow's development and may be modified by a differential nutritional management during the precalving period (BCS at -30 days) in cows under grazing conditions

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Technologic Laboratory of Uruguay (LATU) use of GC-MS equipment. Excellent animal care and courteous assistance throughout the study was provided by Veterinary team and the rest of the staff at the Agronomy University, Northern Research Experimental Station Mario Cassinoni, Paysandú. The present study received financial support from INIA Project No. 214, Uruguay.

REFERENCES

- Adrien M.L., D.A. Mattiauda, V. Artegoitia, M. Carriquiry, O. Bentancur, and A. Meikle, Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. 2010. *Animal Sci.* In press.
- Agenas, S., E. Burstedt, and K. Holtenius. Effects of Feeding Intensity During the Dry Period. 1. Feed Intake, Body Weight, and Milk Production *J. Dairy Sci.* 2003 86: 870-882
- AOAC. 1980. *Official Methods of Analysis* (13th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Auldust, M. J., S. Coats, J. B. Sutherland, J. J. Mayes, and H. G. McDowell, 1996. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition, and the yield and quality of cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 63: 269-280.
- Barber, M. C., R. A. Clegg, M. T. Travers, and R. G. Vernon. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 1347:101–126.
- Bauman D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock 2006. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243.
- Bell, A. W., W. S. Burhans, and T. R. Overton. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proc. Nutr. Soc.* 59:119–126.
- Bequette, B. J., F. R. C. Backwell, and L. A. Crompton. 1998. Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *J. Dairy Sci.* 81:2540–2559.
- Black, A. L., R. S. Anand, M. L. Bruss, C. A. Brown, and J. A. Nakagari. 1990. Partitioning of amino acids in lactating cows: oxidation to carbon dioxide. *J. Nutr.* 120:700.
- Bobé G., G. L. Lindberg, A. E. Freeman, and D. C. Beitz 2007. Short Communication: Composition of Milk Protein and Milk Fatty Acids Is Stable for Cows Differing in

- Genetic Merit for Milk Production. *Journal of Dairy Science* Vol. 90:3955-3960.
- Capuco, A. V., D. L. Wood, R. Baldwin, K. Mcleod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187.
- Chibisa, G. E., G. N. Gozho, A. G. Van Kessel, A. A. Olkowski, and T. Mutsvangwa, 2008. Effects of peripartum propylene glycol supplementation on nitrogen metabolism, body composition, and gene expression for the major protein degradation pathways in skeletal muscle in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3512-3527.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, R. M. Mansbridge, and M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.*49:181–205.
- Damián, J. P., Sacchi, I., Reginensi, S., De Lima, D., and Bermúdez, J. 2008. Cheese yield, casein fractions and major components of milk of Saanen and Anglo-Nubian dairy goats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(6):1564-1569.
- Dewhurst R.J., K.J. Shingfield, M.R.F. Lee and N.D. Scollan, Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed Sci Technol.* 2006; 131:168–206.
- Dewhurst, R. J., N. D. Scollan, S. J. Youell, J. K. S. Tweed, and M. Humphreys. 2001. Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass Forage Sci.* 56:68–74.
- Farrell Jr HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK. Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J Dairy Sci* 2004;87:1641–74.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Griinari, J. M., and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Page 180 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. Yurawecz, M. Mossoba, J. Kramer, M. Pariza, and G. Nelson, eds. AOCS Press, Champaign, IL.
- Ingvartsen, K.L. 1994. Models of voluntary food intake in cattle. *Livestock Production Science.* 39: 19-38.
- Jõudu I., Henno M., Kaart T., Püssa T., Kärt O. The effect of milk proteins contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal.* 2008. Vol. 18. P. 967-970.
- Kay, J. K., Weber W. J., Moore C. E., Bauman D. E., Hansen L. B., Chester-Jones H., Crooker B. A., and Baumgard L. H. 2005. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 88:3886–3893.
- Kelsey, J. A., Corl B. A., Collier R. J., and Bauman D. E.. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588–2597.
- Kroeker E. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., and Moxley J. E. Effects of Environmental Factors and Milk Protein Polymorphism on Composition of Casein Fraction in Bovine Milk. 1985 *J Dairy Sci* 68:1752-1757.
- Laevens, H., Deluyker, H., Schukken, Y.H., de Meulemeester, L., Vandermeersch, R., de Muelenaere, E. and de Kruif, A. 1997. Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3219- 3226.
- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance

- fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206.
- Lock, A.L., and Shingfield, K.J. 2004. Optimising Milk Composition, in *UK Dairying: Using Science to Meet Consumers' Needs* (Kebreab, E., Mills, J., and Beever, D.E, eds.), pp. 107–188, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.
- Maas, J.A.; France, J.; McBride, B.W. 1997. Model of milk protein synthesis. A mechanistic model of milk protein synthesis in the lactating bovine mammary gland. *Journal of Theoretical Biology* 187: 363-378.
- Maekawa, M., Beauchemin, K.A., Christensen, D.A., 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 1165–1175.
- Martin, P., and F. Grosclaude. 1993. Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livest. Prod. Sci.* 35:95.
- Menzies KK, Lefevre C, Macmillan KL, Nicholas KR. Insulin regulates milk protein synthesis at multiple levels in the bovinemammary gland. *Funct Integr Genomics.* 2009;9:197–217.
- Miller, N., L. Delbecchi, D. Petitclerc, G. F. Wagner, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2006. Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *J. Dairy Sci.* 89(12):4669-4677.
- Moghadasian MH 2008. Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 402–410.
- Moore, C. E., Hafliger H. C., Mendivil O. B., Sanders S. R., Bauman D. E., and Baumgard L. H. 2004. Increasing amounts of conjugated linoleic acid (CLA) progressively reduce milk fat synthesis immediately postpartum. *J. Dairy Sci.* 87:1886–1895.
- Moore, C. E., Kay J. K., VanBaale M. J., Collier R. J., and Baumgard L. H.. 2005. Effect of conjugated linoleic acid on heatstressed Brown Swiss and Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 88:1732–1740.
- Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., McDonald, R.E., Flickinger, B.D., and Perkins, E.G. (1996) Analysis of Cyclic Fatty Acid Monomer 2-Alkenyl-4,4-dimethyloxazoline Derivatives by Gas Chromatography–Matrix Isolation–Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 44, 3193–3196.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., & Monardes, H. G. (1987). Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *Journal of Dairy Science*, 70, 563–570.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, and H. G. Monardes. 1982. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 65:1993.
- Ostensen S., Foldager J. and Hermansen J.E. (1997). Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk *Journal of Dairy Research* 64 207±219.
- Palmquist, D. L., Beaulieu A. D., and Barbano D. M.. 1993. ADSA foundation symposium: Milk fat synthesis and modification. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* *J. Dairy Sci.* 76:1753.
- Pedron O, Cheli F., Senatore E., Baroli D. and Rizzi R. 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76,2528–2535.
- Rémond B, Cisse M, Ollier A & Chilliard Y 1991 Slow release somatotropin in dairy heifers and cows fed two levels of energy concentrate. *Journal of Dairy Science* 74 1370–1381.
- SAS Institute. 2003. *SAS/STAT User's Guide, Version 8.0.* SAS Institute, Cary, NC.

- Sederevicius, A., J. Balsyte, K. Lukauskas, J. Kazlauskaite & G. A. Biziulevicius, 2006. An enzymatic cow immunity-targeted approach to reducing milk somatic cell count: 3. A comparative field trial. *Food and Agricultural Immunology*, **17**, 1–7.
- Stanton, C., F. Lawless, G. Kjellmer, D. Harrington, R. Devery, J. F. Connolly, and J. Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci* 62:1083–1086.
- Stockdale C.R.; Doyle P.T.; Wijesundera C.; Williams R.P.W.. Effects of body condition at calving and peri-parturient nutrition on the composition of milk fat produced by grazing dairy cows. 2005. *Australian Journal of Dairy Technology*; Oct 2005; 60, 3; ProQuest Agriculture Journals pg. 244.
- Stoop, W. M., Bovenhuis, H., Heck, J. M. L., van Arendonk, J. A. M. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows *J. Dairy Sci.* 2009 92: 1469-1478.
- Trujillo A.J., Casals I., Guamis B., Analysis of major caprine milk proteins by Reverse- Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, *J. Dairy Sci.* 83 (2000) 11–19
- Van Knegsel, A. T. M., H. van den Brand, J. Dijkstra, S. Tamminga, and B. Kemp. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle—Review. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:665–688.
- Visser, S., Ch. J. Slangen, and H. S. Rollema. 1991. Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 548:361–370.
- Wiking L, Stagsted J, Bjorck L, Nielsen JH. Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. *Int Dairy J* 2004; 14: 909_13.

Legends to the Figures

Figure 1. Milk casein (A), whey (B) and β -casein concentrations at week of lactation 2 and 8 in primiparous (A1, B1) and multiparous (A2, B2) with low (grey) or high (white) body condition score at -30 days of lactation. Data are least square means \pm pooled standard error. Letters in bars indicate Tukey-test differences for the interaction BCS at -30 days within parity and WOL; a, b, c: $P < 0.05$.

Figure 2. Milk fatty acid origin at week of lactation 2 to 8 in primiparous (1) and multiparous (2) with low (grey) or high (white) body condition score at -30 days of lactation. Origins were calculated as A) de novo (4:0 to 15:1), B) mixed-origin (16:0 + 16:1), and C) preformed (17:0) fatty acids. Data are least square means \pm pooled standard error. Letters in bars indicate Tukey-test differences for the interaction BCS at -30 days within parity and WOL; a, b, c: $P < 0.05$.

Figure 3. Saturated (A), monosaturated (B) and polysaturated (C) milk fatty acids at week of lactation 2 and 8 in primiparous (1) and multiparous (2) with low (grey) or high (white) body condition score at -30 days of lactation. Data are least square means \pm pooled standard error. Letters in bars indicate Tukey-test differences for the interaction BCS at -30 days within parity and WOL; a, b, c: $P < 0.05$.

Figure 4. Trans (A) and C18:2 conjugated linoleic acid (CLA) (B) milk fatty acids at week of lactation 2 and 8 in primiparous (1) and multiparous (2) with low (grey) or high (white) body condition score at -30 days of lactation. Data are least square means \pm pooled standard error. Letters in bars indicate Tukey-test differences for the interaction BCS at -30 days within parity and WOL; x, y: $0.5 < P \leq 0.10$.

Table 1. Means of milk yield and composition at 2 and 8 WOL in primiparous (L1) and multiparous (L2) Holstein cows with low and high body condition score (BCS) at -30 days lactation.

	Treatments ¹				SEM	P	P ²		
	L1low	L1high	L2low	L2high			BCS (P)	WOL	P*
Milk yield									
kg/d	23.75	24.00	29.39	28.95	0.49	<0.01	0.91	0.28	0.64
Protein									
kg	0.74	0.76	0.95	0.94	0.03	<0.01	0.78	<0.01	0.30
%	3.13	3.14	3.20	3.05	0.05	0.89	0.26	<0.01	0.44
Fat									
%	0.81 ^a	0.95 ^{ab}	1.06 ^b	1.09 ^b	0.05	<0.01	0.21	<0.01	0.05
kg	3.46 ^x	3.88 ^y	3.63 ^{xy}	3.48 ^x	0.11	0.29	0.04	<0.01	0.41
Milk SCC (linear score)	1.73	1.57	1.85	2.08	1.25	0.02	0.35	0.86	0.63

^{ab} Line by parity means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

^{xy} Line by parity means within a row with different superscripts differ ($0.05 < P \leq 0.10$).

¹ Data represent least squares means for treatments derived from a 2 x 2 combination of parity and high and low BCS at -30 days of lactation

² P = parity, BCS = body condition score, WOL = week of lactation.

Table 2. Means of milk nitrogen fractions and casein components at 2 and 8 WOL in primiparous (L1) and multiparous (L2) Holstein cows with low and high body condition score (BCS) at -30 days of lactation.

Variable	Treatments ¹				SEM	P	P ²			
	L1low	L1high	L2low	L2high			BCS (P)	WOL	P*	BCS (P)*
Nitrogen fractions g N/kg total N										
Casein	777.20	767.60	780.23	814.65	10.94	0.02	0.33	0.03	0.57	0.10
Whey protein	222.80	232.40	219.77	185.35	6.06	0.02	0.35	0.03	0.57	0.10
Caseins g/kg total Casein										
α s-1-casein	368.85	393.54	395.68	398.00	14.92	0.24	0.71	0.61	0.27	0.62
α s-2-casein	109.66	70.03	84.42	77.04	9.54	0.30	0.20	0.70	0.62	0.90
β -casein	428.72	462.56	427.59	432.27	6.96	0.04	0.13	0.77	0.07	0.94
κ -casein	97.44 ^a	69.53 ^b	94.47 ^a	89.95 ^{ab}	3.91	0.02	0.03	0.67	0.96	0.15

¹ Data represent least squares means for treatments derived from a 2 x 2 combination of parity and high and low BCS at -30 days of lactation

² P = parity, BCS = body condition score, WOL = week of lactation.

^{ab} Line by parity means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

Table 3. Means of milk fatty acid composition in primiparous (L1) and multiparous (L2) Holstein cows with low and high body condition score (BCS) at -30 days of lactation.

Variable	Treatments ¹				SEM	<i>P</i> ²				
	L1low	L1high	L2low	L2high		P	BCS (P)	WOL	P* WOL	BCS (P)* WOL
Fatty acid origin, mg/g of fatty acid										
<i>De novo</i> (4:0 to 15:1)	187.86	182.38	225.84	194.14	17.09	0.14	0.58	<0.01	0.21	0.98
Mixed origin (16:0 + 16:1)	298.54 ^{xy}	307.52 ^{xy}	334.03 ^y	290.87 ^x	10.46	0.35	0.10	<0.01	0.42	0.30
Preformed (> 17:0)	518.79	514.72	444.39	517.44	25.35	0.16	0.31	<0.01	0.26	0.75
Fatty acid saturation, mg/g fatty acid										
Saturated	635.30	607.66	697.78	629.28	20.62	0.06	0.16	0.13	0.04	0.55
Monounsaturated	329.25	350.95	267.84	323.86	19.00	0.04	0.22	0.18	0.03	0.68
Polyunsaturated	35.19 ^a	41.76 ^b	32.30 ^a	45.67 ^b	2.60	0.84	0.02	0.68	0.84	0.11
Saturated/Unsaturated	1.79	1.61	2.87	1.89	0.26	0.03	0.11	0.32	0.03	0.46
n-3	3.16 ^a	4.58 ^b	2.77 ^a	5.26 ^b	0.28	0.70	<0.01	0.13	0.93	0.04
n-6	19.09 ^y	21.99 ^{xy}	19.01 ^y	25.40 ^x	1.69	0.31	0.10	0.54	0.71	0.19
n-6/n-3	5.51	4.95	5.97	5.46	0.67	0.42	0.71	0.16	0.53	0.89
<i>trans</i>	44.23	52.59	45.75	52.06	8.96	0.95	0.74	0.51	0.07	0.08
14:1/14:0	0.05	0.06	0.07	0.06	0.01	0.20	0.45	0.26	0.07	0.98
16:1/16:0	0.05 ^x	0.06 ^x	0.05 ^x	0.03 ^y	0.01	0.20	0.07	0.13	0.34	0.24
18:1/18:0	1.70	2.88	1.93	2.10	0.44	0.49	0.21	0.35	0.36	0.58

^{ab} Line by parity means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

^{xy} Line by parity means within a row with different superscripts differ ($0.05 < P \leq 0.10$).

¹ Data represent least squares means for treatments derived from a 2 x 2 combination of parity and high and low BCS at -30 days of lactation

² P = parity, BCS = body condition score, WOL = week of lactation.

Table 4. Means of individual milk fatty acid composition in primiparous (L1) and multiparous (L2) Holstein cows with low and high body condition score (BCS) at -30 days of lactation.

Fatty Acid (mg/g total fatty acid)	Treatments ¹				SEM	P ²				
	L1low	L1high	L2low	L2high		P	BCS (P)	WOL	P * WOL	BCS(P)* WOL
4:0	6.91	5.20	6.05	5.42	0.77	0.64	0.62	0.12	0.15	0.85
6:0	7.89	7.27	8.85	6.69	0.80	0.79	0.32	<0.01	0.58	0.21
8:0	7.01	6.52	7.47	8.91	1.13	0.21	0.76	<0.01	0.56	0.94
10:0	17.72	18.67	22.27	17.68	2.56	0.44	0.59	<0.01	0.28	0.87
12:0	24.67	22.77	30.30	24.04	4.0	0.32	0.35	<0.01	0.25	0.87
13:0	1.28	1.30	1.54	1.38	0.18	0.33	0.88	<0.01	0.46	0.71
14:0	98.30	94.41	120.30	108.43	8.54	0.12	0.46	<0.01	0.18	0.92
14:1	4.91	5.81	8.07	6.41	0.95	0.06	0.51	<0.01	0.06	0.93
15:0	16.74 ^{ab}	17.72 ^{ab}	19.08 ^a	16.23 ^b	0.72	0.61	0.05	0.06	0.16	0.55
16:0	285.66	291.47	312.36	282.22	10.86	0.29	0.22	<0.01	0.39	0.48
16:1	12.80 ^{ab}	16.10 ^{ab}	16.55 ^a	8.43 ^b	1.22	0.13	<0.01	0.52	0.50	0.07
17:0	18.18	23.03	17.84	24.60	2.59	0.93	0.24	<0.01	0.56	0.92
18:0	147.19	115.77	142.11	134.32	13.94	0.62	0.26	<0.01	0.25	0.72
18:1 ^{cis}	272.65	273.68	198.15	254.60	15.87	0.02	0.17	0.12	0.13	0.45
18:1 ^{trans}	39.09	46.84	39.66	46.48	8.77	0.99	0.74	0.48	0.05	0.09
18:2 ^{cis} (n-6)	17.38	20.02	18.04	22.62	1.50	0.26	0.16	0.30	0.39	0.25
18:2 (CLA) ³	8.52 ^{ab}	10.24 ^b	6.17 ^a	10.30 ^b	0.70	0.15	0.02	0.81	0.26	0.06
18:3(n-3)	2.93 ^a	4.56 ^b	2.47 ^a	5.02 ^b	0.24	0.99	<0.01	0.13	0.75	0.03
18:3(n-6)	0.78	0.59	0.28	0.79	0.35	0.66	0.66	0.11	0.16	0.86
20:5 (EPA) ³	0.10	0.01	0.02	0.06	0.04	0.86	0.37	0.79	0.58	0.93
22:6 (DHA) ³	0.04	0.09	0.02	0.01	0.04	0.93	0.48	0.20	0.14	0.59
Others ⁴	10.18	18.77	24.91	13.40	8.54	0.50	0.52	0.71	0.66	0.83

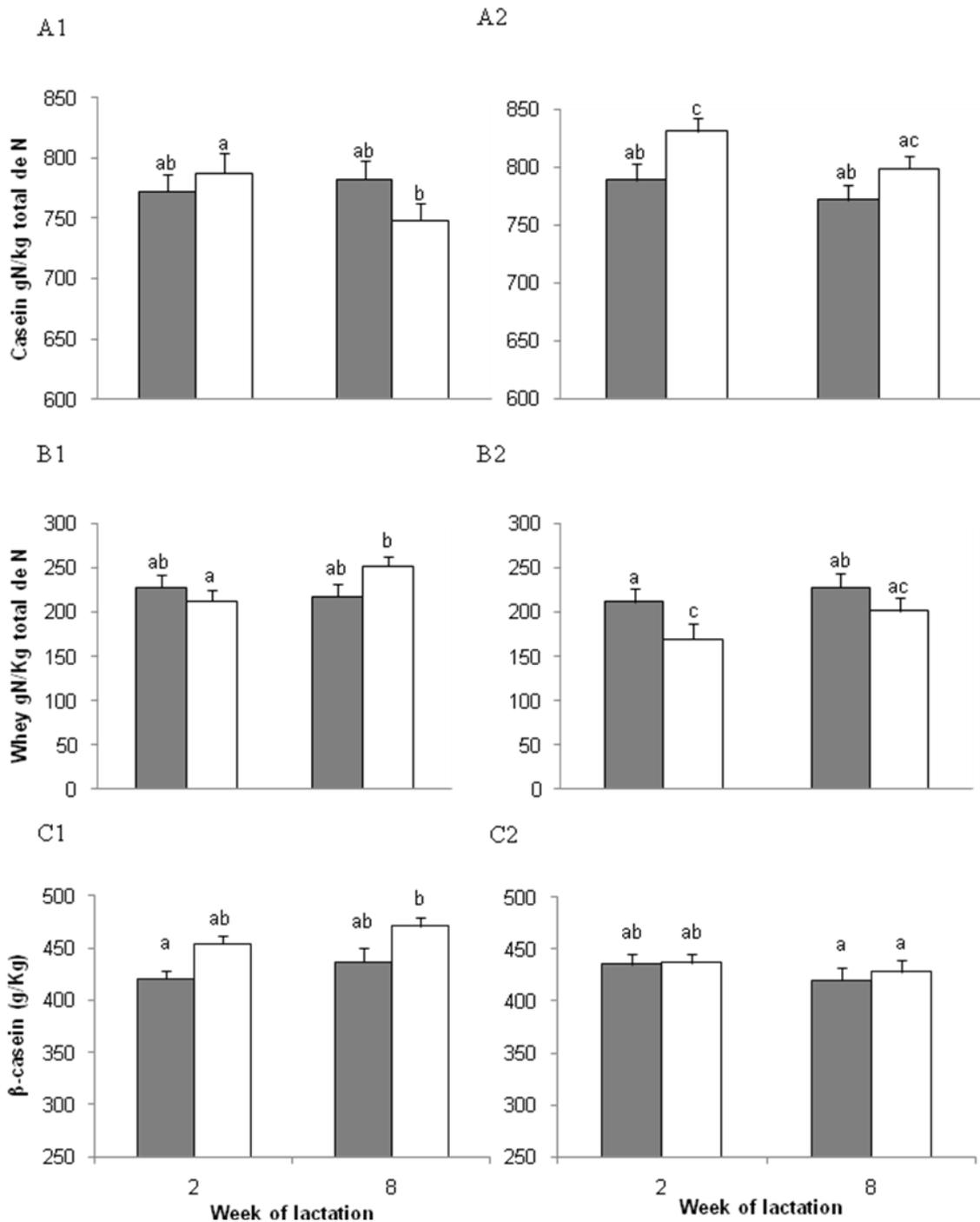
¹Data represent least squares means for treatments derived from a 2 x 2 combination of parity and high and low BCS at -30 days of lactation

²P = parity, BCS = body condition score, WOL = week of lactation.

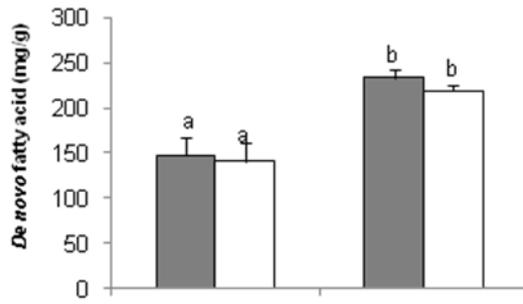
³CLA = conjugated linoleic acid, EPA = eicosapentaenoic acid, DHA = docosahexaenoic acid.

⁴Others=11+12:1+13+15:1+17:1+18:2+19+19:1+20+20:1+20:2+20:3n6+20:3n3+20:4n6+20:4n3+21+22+22:1cis+C22:4+22:5+24

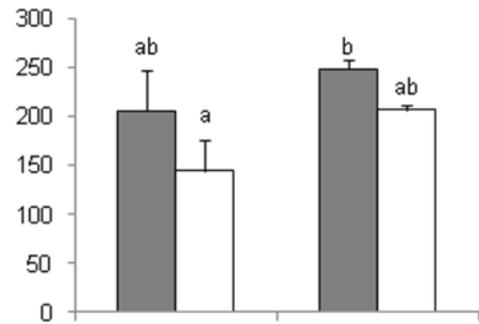
^{abc} Line by parity means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).



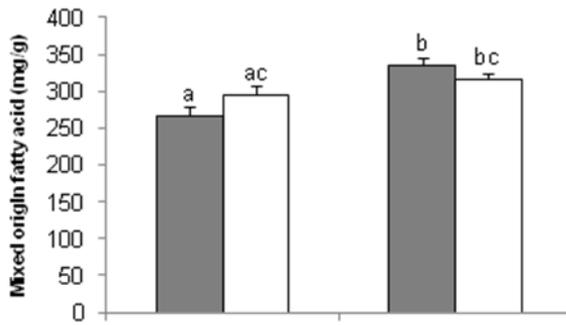
A1



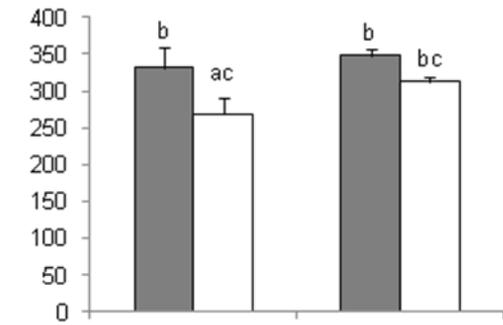
A2



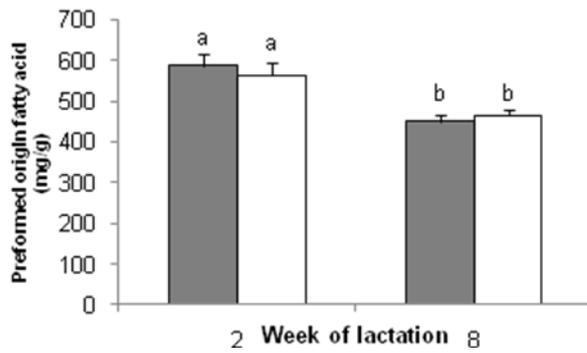
B1



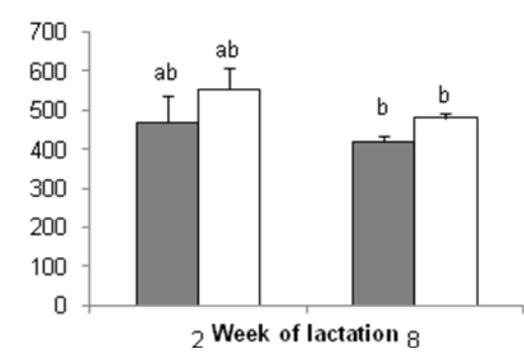
B2

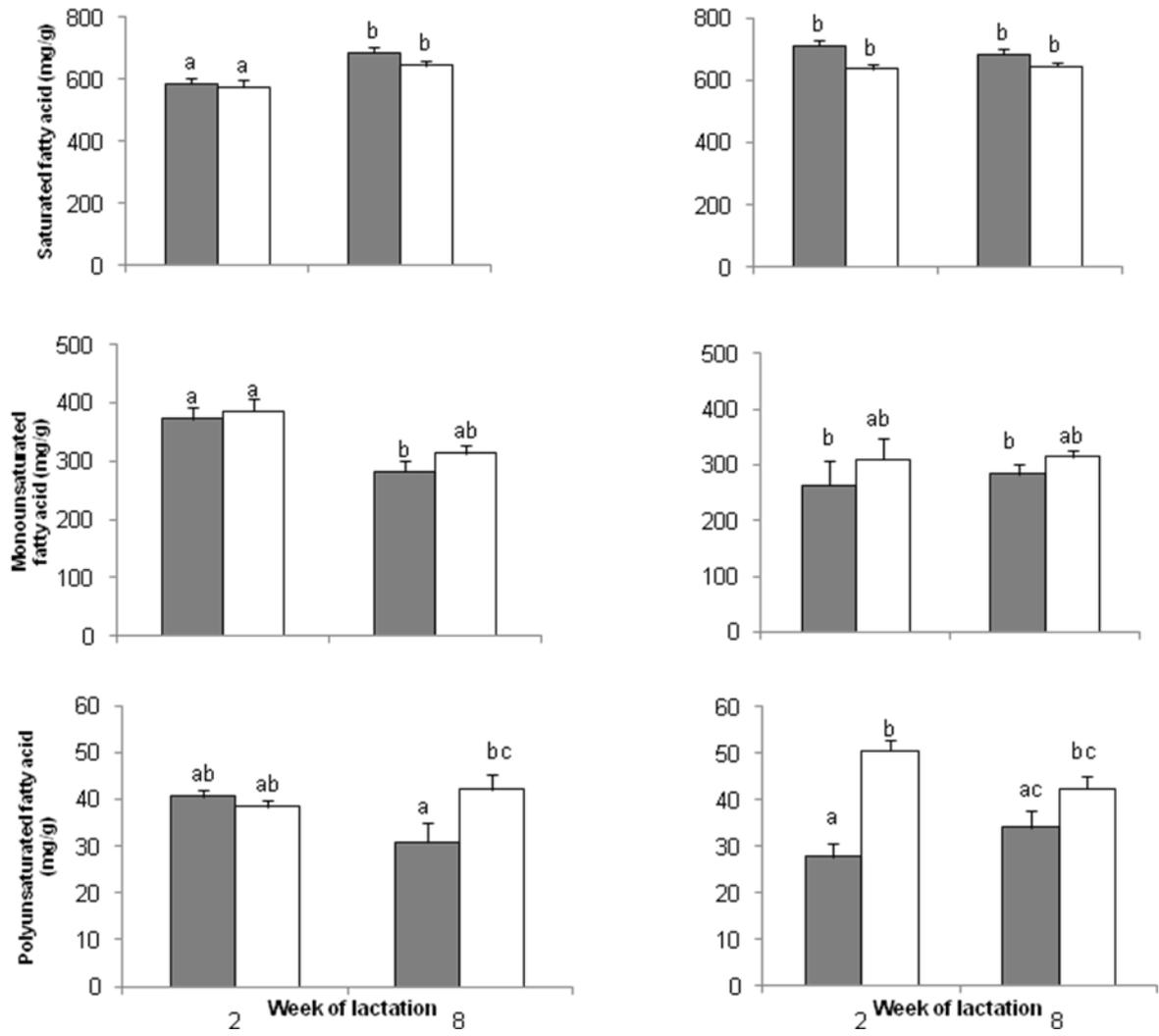


C1

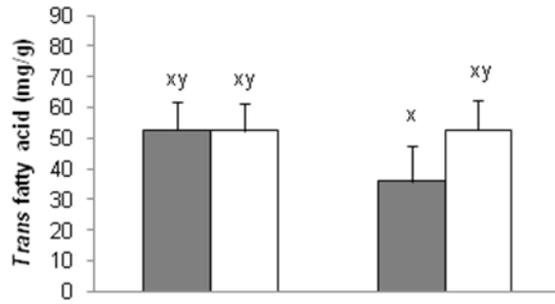


C2

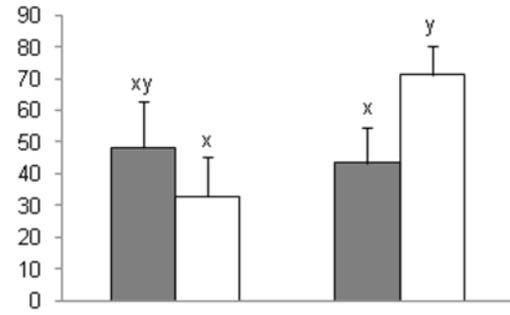




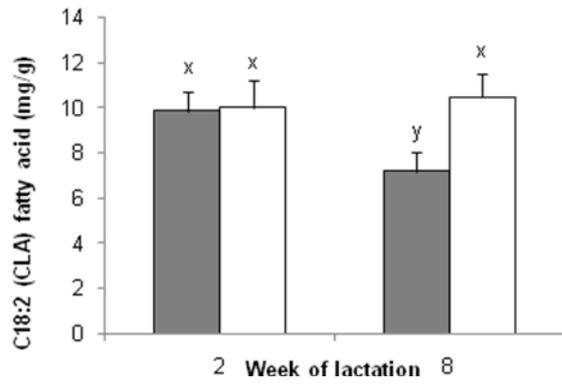
A1



A2



B1



B2

