

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**Máster Universitario en Tecnología y Calidad**  
**Agroalimentaria**



**FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LECHE DE CABRA  
Y LECHE FERMENTADA: EFECTO DE  
LA INCLUSIÓN EN LA DIETA DE  
CAPRINO LECHERO DE  
SUBPRODUCTOS ENSILADOS DE  
BRÓCOLI Y ALCACHOFA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Convocatoria Ordinaria 2 – 2019**

**AUTOR: María Romo Ibáñez**

**DIRECTOR/ES: Esther Sendra Nadal**  
**Raquel Muelas Domingo**



## MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

### VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER



CURSO 2018/2019

Director/es del trabajo
Esther Sendra Nadal Raquel Muelas Domingo

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LECHE DE CABRA Y LECHE FERMENTADA: EFECTO DE LA INCLUSIÓN EN LA DIETA DE CAPRINO LECHERO DE SUBPRODUCTOS ENSILADOS DE BRÓCOLI Y ALCACHOFA.
Alumno
María Romo Ibáñez

Orihuela, a 4 de Julio de 2019

 
Firma/s tutores trabajo



## MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

### REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Título:** Fenoles totales y capacidad antioxidante de leche de cabra y leche fermentada: efecto de la inclusión en la dieta de caprino lechero de subproductos ensilados de brócoli y alcachofa

**Title:** Total phenolic content and antioxidant capacity of goat milk and goat fermented milk: effect of broccoli and artichoke by-products inclusion on dairy goats' diet

**Modalidad (proyecto/experimental):** experimental

**Type (project/research):** research

**Autor/Author:** María Romo Ibáñez

**Director/es/Advisor:** Esther Sendra Nadal y Raquel Muelas Domingo

**Convocatoria:** Junio de 2019

**Month and year:** July of 2019

**Número de referencias bibliográficas/number of references:** 69

**Número de tablas/Number of tables:** 15

**Número de figuras/Number of figures:** 11

**Palabras clave:** compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, caprino de leche, leche, leche fermentada, YO-MIX™, MA400

**Key words:** phenolic compounds, antioxidant capacity, dairy goats, milk, fermented milk, YO-MIX™, MA400



## MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

**RESUMEN:** El brócoli y las alcachofas son productos ricos en compuestos fenólicos y poseen alta capacidad antioxidante. Ambos generan una gran cantidad de subproductos en su producción. Una aplicación posible de los subproductos del brócoli y alcachofa, es su uso en alimentación animal. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la inclusión de un 40% estos subproductos ensilados en la dieta (isoproteica e isoenergética) de ganado caprino de raza Murciano-Granadino sobre los compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante, el color y composición de la leche. Se han elaborado leches fermentadas con cultivos de yogur y queso con esta leche. Previo al experimento se han contrastado dos métodos de extracción de compuestos fenólicos para optimizar las condiciones de análisis. En las leches fermentadas se han determinado los mismos parámetros y además el pH y el recuento de bacterias lácticas. Se tomaron muestras de leche en un periodo pre-experimental con dieta común para todos los lotes de animales (Control 0), tras 5 semanas de dieta diferenciada (Control 1) y tras 10 semanas de dieta (Control 2). Se seleccionó el método de extracción con metanol acidificado. Los análisis de leche y leches fermentadas mostraron que la inclusión de hasta un 40% de subproductos de brócoli y alcachofa en la dieta durante 10 semanas no ocasionaron diferencias relevantes en la composición de la leche, su contenido en fenoles, capacidad antioxidante, aptitud a la fermentación y color. El contenido en fenoles de las dietas no ocasionó diferencias en el contenido en fenoles en leche ni leches fermentada.

**ABSTRACT:** Broccoli and artichoke products are rich in phenolic compounds, with high antioxidant capacity. When both of them are industrially processed, a great amount of by-products is generated. For reducing this environmental impact, these by-products can be used in animal feed. In this project the effect of the 40% inclusion of this by-products on Murciano-Granadino dairy goats is studied, as well as its influence on phenolic compounds, antioxidant capacity, colour and milk composition. Fermented milk have also been elaborated by using yoghurt and cheese cultures starters. For this, first of all two phenolic compounds extraction methods have been contrasted for optimizing the experimental conditions. In fermented milk, apart from the mentioned parameters, the pH and lactic acid bacteria counting have also been studied. Milk samples were taken from the pre-experimental period (Control 0), after 5 weeks of differentiated diet (Control 1) and after 10 weeks of differentiated diet (Control 2). The acidic-methanol method was selected. By the analyses of the mentioned parameters in milk and fermented milk, it is observed that the inclusion up to 40% of broccoli and artichoke by-products for 10 weeks does not cause relevant difference on them. The total phenolic compounds content on diets did not cause differences in milk and fermented milk.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	pág 5
1.1. Contexto actual.....	pág 5
1.2. Compuestos fenólicos.....	pág 6
1.3. Capacidad antioxidante.....	pág 8
2. Objetivos.....	pág 11
3. Materiales y Métodos.....	pág 12
3.1. Materias primas y reactivos utilizados.....	pág 12
3.2. Equipos utilizados.....	pág 15
3.3. Estudio comparativo de métodos de extracción para la determinación de compuestos fenólicos totales en leche y capacidad antioxidante.....	pág 15
3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales (método de Folin-Ciocalteu).....	pág 16
3.5. Determinación de la capacidad antioxidante total (TEAC).....	pág 17
3.6. Determinación del color.....	pág 18
3.7. Determinación de la composición y del pH.....	pág 18
3.8. Recuento microbiológico.....	pág 19
3.9. Análisis estadístico.....	pág 19
4. Resultados y discusión.....	pág 20
4.1. Estudio comparativo de métodos de extracción para la determinación de compuestos fenólicos totales en leche y capacidad antioxidante.....	pág 20
4.2. Leches y leches fermentadas obtenidas de leche procedente de 3 lotes de animales alimentados con dieta convencional en el período pre-experimental.....	pág 21
4.3. Leches y leches fermentadas obtenidas de leche procedente de animales con dietas diferenciadas (Lote 1: brócoli, Lote 2: planta de alcachofa y Lote 3: dieta convencional) durante 5 semanas.....	pág 26
4.4. Leches y leches fermentadas obtenidas de leche procedente de animales con dietas diferenciadas (Lote 1: brócoli, Lote 2: planta de alcachofa y Lote 3: dieta convencional) durante 10 semanas.....	pág 29
4. Conclusiones.....	pág 34
6. Referencias bibliográficas.....	pág 35

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Contexto actual

La Región de Murcia es una Comunidad Autónoma española en el sudeste de la península ibérica, con una población de 1.478.509 habitantes (Instituto Nacional de Estadística, 2017). Junto con la Comunidad Valenciana, se trata de una de las mayores productoras de frutas y hortalizas, debido a las condiciones climatológicas favorables que posee: clima mediterráneo seco, con inviernos suaves y veranos calurosos. Entre los cultivos mayoritarios, en 2018, se encuentra el de las hortalizas y flores, con una superficie de 59.519 hectáreas (ha), dentro del cual, los cultivos con mayor superficie serían el de la alcachofa, con 3.471 ha (frente a las 9.037 ha en España), el del melón, con 3.904 ha y el del brócoli, con 3.112 ha (frente a las 15.670 ha en España). Esta región es la mayor productora de alcachofa, con una producción anual de 101.036 toneladas, frente a las 223.150 toneladas en España totales. También lo es de brócoli, con una producción anual de 203.949 toneladas frente a las 541.448 toneladas en España (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España, 2017 y 2018). El cultivo de estos productos es estacional, y genera grandes cantidades de subproductos en períodos cortos de tiempo, entre el 60-65% de la alcachofa y el 75% del brócoli (D'Antuono., 2018). Estos subproductos, procedentes tanto de la agricultura como de las industrias transformadoras suponen un problema de sostenibilidad, tanto medioambiental como económico.

Los subproductos de la alcachofa se corresponderían con las brácteas externas (subproducto de la industria transformadora) y con los tallos (subproducto agrícola). La alcachofa ha mostrado ser una fuente rica de compuestos fenólicos bioactivos, como el ácido cafeico o flavonoides, inulina, fibra dietética y minerales (Lattanzio *et al.*, 2009; Pasqualone *et al.*, 2017). Debido a sus propiedades hepatoprotectoras, coleréticas, hipocolesterolémicas y antioxidantes (Curadi *et al.*, 2005) se considera un nutracéutico y se explora para la extracción de compuestos beneficiosos para la salud.

En el caso del brócoli, la parte destinada al consumo humano es la flor, mientras que los tallos y las hojas, correspondiéndoles un 70% del total de la planta, se descartan (Liu *et al.*, 2018). Tales subproductos han demostrado ser una fuente rica de nutrientes, glucorafanina, vitaminas ( $\beta$ -caroteno, vitaminas E, C y K) y minerales esenciales (manganeso y calcio), además de poseer un alto contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, con efectos beneficiosos para la salud, pudiendo ser utilizados como potenciales ingredientes o suplementos en la industria farmacéutica y nutracéutica (Shi *et al.*, 2019; Domínguez-Perles *et al.*, 2010). Se ha observado que en las hojas se concentra la mayor concentración del contenido de compuestos fenólicos totales y más alta actividad antioxidante para secuestrar radicales DPPH\* que en los tallos (Domínguez-Perles *et al.*, 2010).

Los subproductos frescos de la alcachofa y del brócoli se han utilizado tradicionalmente para alimentación de ganado caprino de leche en zonas de producción de alcachofa, beneficiándose de su gran valor nutricional. Por esta razón, es necesario evaluar la preservación de los subproductos de alcachofa y del brócoli como ensilados, en dietas animal equilibradas, reemplazando parte de la ración de dieta convencional (Muelas *et al.*, 2017). Esta técnica permite su preservación y la obtención de un beneficio económico, abaratando el coste de la ración de alimento de los animales y favoreciendo

la sostenibilidad de ambas actividades.

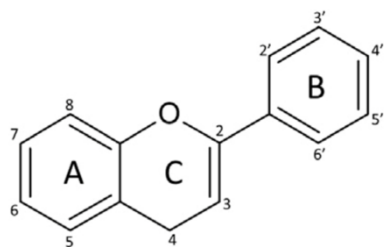
Una de las principales estrategias para el desarrollo en el sector lácteo de cabra es la diversificación de productos elaborados con leche de cabra y el desarrollo de productos lácteos con valor añadido (Pulina *et al.*, 2018). Los productos lácteos fermentados son percibidos positivamente por los consumidores, como alimentos sanos debido a su digestibilidad y a la incorporación de microorganismos vivos. El primer paso para el desarrollo de estos productos es conocer el efecto de las bacterias individuales en las propiedades de la leche fermentada para que las mejores cepas puedan ser seleccionadas en base a las propiedades tecnológicas y funcionales desarrolladas (Li *et al.*, 2017), que incluso cepas de la misma especie puede dotar al producto de características sensoriales distintas. Muelas *et al.* (2018) estudiaron el perfil volátil y la calidad de leches de cabra fermentadas con diferentes cepas bacterianas y otros parámetros de calidad de las leches fermentadas.

Diversos estudios en la literatura científica han reportado el uso de diferentes subproductos como alimento para rumiantes: tarta de oliva en alimentación de oveja (Chiofalo *et al.*, 2004), alimentación con linaza procedente de la extracción del aceite de la semilla de lino en ganado caprino (Nudda *et al.*, 2006); subproductos de mandioca en caprino lechero durante la lactación (Mouro *et al.*, 2002); pulpa de cítricos en dieta de ovejas de leche (Todaro *et al.*, 2017); cáscaras de semillas de soja en ovejas lecheras (Araujo *et al.*, 2008); hojas de *Moringa oleifera* en cabras lecheras (Kholif *et al.*, 2016); mezclas de diversos subproductos, como tomate, subproductos de la oliva o mezclas de tomate, pulpa de cítricos, granos de cebada y levaduras en cabras lecheras. En la mayoría de los casos solo se analiza el perfil lipídico y proteico, sin tener en cuenta la presencia de otro tipo de compuestos, como los compuestos fenólicos totales o la capacidad antioxidante. Muelas *et al.*, (2017) estudiaron el efecto de la inclusión de subproductos de la alcachofa en forma de ensilado en la alimentación de ganado caprino de leche sobre las propiedades tecnológicas y sensoriales de la leche, concluyendo que una sustitución de la dieta convencional de un 25% no mostraba cambios con respecto al control.

## 1.2. Compuestos fenólicos

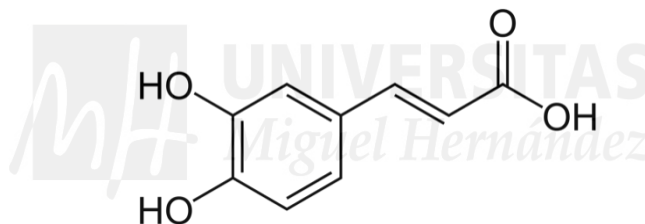
Estudiando su estructura química, los compuestos fenólicos forman una gran familia de moléculas orgánicas de muy variada y heterogénea estructura y reactividad, existiendo más de 8.000 compuestos fenólicos identificados (Shahidi y Naczki, 1995). Todos ellos poseen, como mínimo, un núcleo aromático con uno o varios grupos hidroxilo, y en base a la naturaleza y estructura del esqueleto carbonado, se pueden clasificar en flavonoides y no-flavonoides (De la Rosa *et al.*, 2019).

- Los **flavonoides** son los compuestos fenólicos más abundantes en frutas y vegetales. Contienen un esqueleto de fenil benzopirano: dos grupos fenilo (A y B; **Figura 1**) unidos a través de un anillo pirano heterocíclico (C; **Figura 1**). Se pueden dividir, de acuerdo con las diferencias en su anillo pirano, en: flavonoles, flavonas, isoflavinas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas y antocianinas. Dentro de cada subgrupo, las especies individuales difieren en los patrones de metilación e hidroxilación de los grupos fenilo (A y B) (De la Rosa *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Representación de la estructura de los flavonoides. Los grupos fenilo aparecen como A y B, y el grupo C se trata de un anillo pirano heterocíclico.

- Los **no-flavonoides** incluyen compuestos fenólicos de muy diversa estructura química, siendo la mayoría más pequeños y simples que los flavonoides y de bajo peso molecular. Dentro de los compuestos no-flavonoides, el grupo más importante en frutas y hortalizas es el de los ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos contienen un único grupo fenilo sustituido por un grupo carboxílico y uno o más grupos hidroxilo. Dentro de este grupo, en función de la longitud de la cadena que contiene el grupo carboxílico, podemos encontrar los siguientes subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico (**Figura 2**) y otros ácidos, como el ácido acético, el ácido propiónico (De la Rosa *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Representación de la estructura del ácido cafeico como ejemplo de ácido hidroxicinámico.

Los compuestos fenólicos son sintetizados por los organismos vegetales como metabolitos secundarios, con el fin de adaptarse a condiciones ambientales de estrés, tanto biótico como abiótico. Recientemente, han recibido especial atención a causa de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticoagulantes, que se han asociado con una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o cáncer (Porrás-Loaiza y López, 2009).

Entre los distintos métodos para cuantificar la cantidad total de estos compuestos, el más simple y ampliamente utilizado es el método Folin-Ciocalteu, que se basa en la capacidad de los compuestos presentes de intercambiar electrones. Para ello, se utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu, que consiste en una mezcla de color amarillo de sales hexavalentes de molibdeno y wolframio en un medio ácido, que, forma complejos con los compuestos fenólicos a través de sus grupos hidroxilo, originando una solución de color azul. El color se desarrolla completamente tras la adición de una sal alcalina como el carbonato de sodio. Tras un período de incubación, se determina la cantidad de compuestos fenólicos totales mediante espectrofotometría ultravioleta-visible,



generalmente a 750 nm (Miniati, 2007).

Dado que los compuestos fenólicos están presentes, sobre todo, en muestras de origen vegetal, la mayoría de la literatura muestra ensayos sobre la determinación de estos compuestos en frutas y hortalizas. En menor medida, también hay estudios sobre la determinación de compuestos fenólicos en productos lácteos: leche, suero y queso de cabra (Chávez-Servín *et al.*, 2018), queso fresco de cabra (Hilario *et al.*, 2009), yogures fortificados con extracto de uva (Karaaslan *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2018), leche humana (Li *et al.*, 2009), queso curado bajo en grasas (Rashidinejad *et al.*, 2013), queso cheddar suplementado con aceite de chía (Ullah *et al.*, 2018), leche y yogur suplementados con ginseng rojo (Park *et al.*, 2018), yogur fortificado con granada (Trigueros *et al.*, 2014), entre otros. Todos los estudios anteriores tienen en común la previa eliminación de las proteínas de la muestra. Este proceso es necesario, ya que se ha observado que los compuestos fenólicos pueden interactuar con las proteínas y unirse a ellas, de forma reversible e irreversible. Las proteínas mayoritarias de la leche son las caseínas que, al ser ricas en prolina presentan una gran afinidad de unión por los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos (Yuksel *et al.*, 2010). Esta unión de los compuestos fenólicos a las proteínas de la leche ha mostrado reducir su biodisponibilidad y funcionalidad y su capacidad antioxidante (Jöbstl *et al.*, 2006; Yuksel *et al.*, 2010).

### 1.3. Capacidad antioxidante

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos presentan una mayor capacidad antioxidante que la vitamina C, E y los carotenoides (Rice-Evans *et al.*, 1997). Su mecanismo antioxidante radica en su capacidad de donar un hidrógeno o electrón y de su capacidad de deslocalizar los electrones desapareados de la estructura aromática y proteger a moléculas del organismo contra la oxidación. El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número y de la organización de los grupos hidroxilo (Rice-Evans *et al.*, 1996). En el caso de los ácidos fenólicos, el grupo hidroxilo más libre del anillo es el que presenta mayor actividad antioxidante (Villaño *et al.*, 2005). En el caso de los flavonoides, la capacidad antioxidante depende del número y de la localización de los grupos hidroxilo del grupo aromático, siendo la contribución del grupo 3-OH muy significativa (Heijnen *et al.*, 2001; Villaño *et al.*, 2005). Sin embargo, la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos *in vitro* no se puede extrapolar a sus actividades *in vivo*, ya que otros factores entran en juego, como la absorción intestinal, el tamaño y accesibilidad de las moléculas o la degradación por la flora intestinal (Déprez *et al.*, 2000).

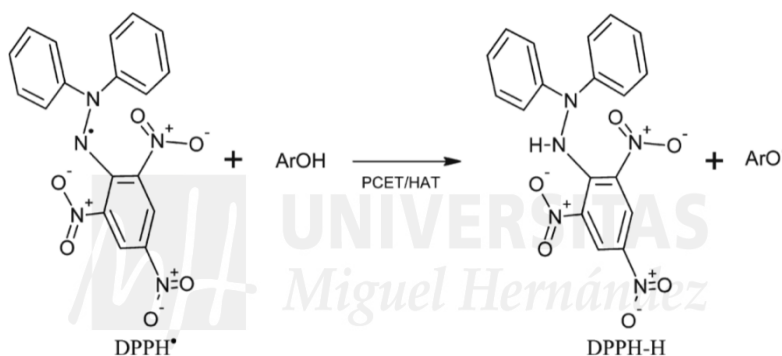
El estrés oxidativo es un estado fisiológico en el que las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS o RNS) superan las defensas antioxidantes del organismo, originando modificaciones oxidativas de las macromoléculas biológicas (por ejemplo, lípidos, proteínas, ADN), daños tisulares y aceleración de la muerte celular, dando lugar a diversas patologías. Hasta la fecha, existen diversos test *in vitro* para el ensayo químico en la determinación de la capacidad antioxidante en una muestra homogénea. Estos métodos, se pueden clasificar en métodos de transferencia electrónica y métodos de transferencia del átomo de hidrógeno, existiendo algunos en los que el mecanismo es mixto. Los ensayos mixtos se basan generalmente en el secuestro o *scavenging* de un radical estable cromógeno. Los ensayos más utilizados para medir la capacidad

antioxidante de una muestra, son los basados en el secuestro de los radicales libres estables  $ABTS^{*+}$  Y  $DPPH^*$  (Apak *et al.*, 2016).

### 1.3.1. Ensayo de secuestro (*scavenging*) del radical $DPPH^*$ .

El radical cromógeno estable  $DPPH^*$  se propuso por primera vez para cuantificar la actividad antioxidante por Blois (1958). Posteriormente, Brand-Williams *et al.* (1995) introdujeron un método de medida que sería usado como referencia. El ensayo  $DPPH$  es de bajo coste y simple y, por tanto, es ampliamente utilizado en los laboratorios. Este método, sin embargo, ha sido criticado por falta de estandarización en la preparación de las muestras, de los protocolos analíticos y de las condiciones de reacción (Prior *et al.*, 2005).

Los cristales de  $DPPH$  se disuelven en etanol o metanol generalmente, obteniendo una absorbancia inicial de 0,680 a 515 nm. Al mezclarlo con la muestra rica en antioxidantes, el color púrpura original se transforma en amarillo durante la reducción de  $DPPH^*$  a  $DPPH_2$  mediante la abstracción de un átomo de H del antioxidante, como se observa en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Reacción del radical  $DPPH^*$  con el compuesto antioxidante ( $ArOH$ .)

Esta reacción es de *pseudo* primer orden, que puede seguirse midiendo el descenso de absorbancia con el tiempo (Brand-Williams *et al.*, 1995). En la reacción ocurre una primera fase muy rápida, seguida de una más lenta, lo cuál puede estar debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta.

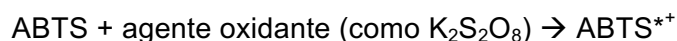
El  $DPPH^*$  es un radical de nitrógeno de larga vida, mientras que la mayoría de los antioxidantes actúan frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que es difícil modelar la actividad antioxidante *in vivo* con el ensayo  $DPPH$  (Mishra *et al.*, 2012).

### 1.3.2. Ensayo de secuestro (*scavenging*) del radical $ABTS^{*+}$ .

El uso de  $ABTS^{*+}$  para la detección del secuestro de radicales fue introducido por primera vez por Koleva *et al.* (2001). Se trata de un método simple y rápido, que funciona a un amplio rango de pH. El  $ABTS^{*+}$  es soluble en disolventes acuosos y orgánicos, permitiendo determinar compuestos antioxidantes hidrófilos e hidrofóbicos (Apak *et al.*, 2013).

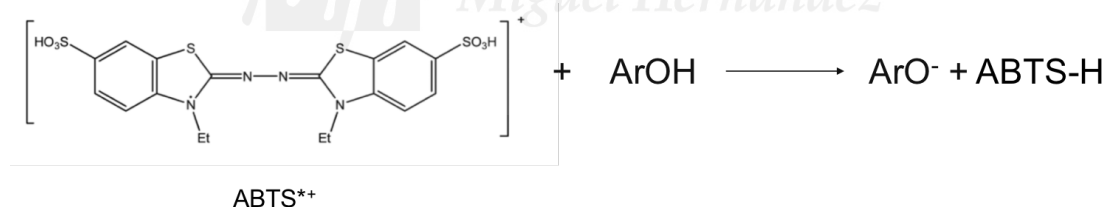
Inicialmente, se ha de formar el radical  $ABTS^{*+}$  (**Figura 4**). Para ello, Miller y Rice-

Evans (1993 y 1997) se basaron en la activación de la metamioglobina con  $H_2O_2$ /peroxidasa para producir el radical ferril mioglobina, que oxidaba el ABTS al radical azul-verdoso  $ABTS^{*+}$ . En este ensayo, los antioxidantes se adicionaban previamente al  $H_2O_2$ , mostrando un retraso en la formación del radical como indicador de actividad antioxidante. Sin embargo, este proceso fue criticado, ya que los antioxidantes de reacción rápida podrían contribuir también en la reducción del radical ferril mioglobina, causando una sobreestimación de la capacidad antioxidante. El ensayo se optimizó generando primero el radical  $ABTS^{*+}$  mediante un agente oxidante diferente (persulfato potásico,  $K_2S_2O_8$  o dióxido de manganeso,  $MnO_2$ ) y, posteriormente, adicionando los compuestos antioxidantes a medir (Apak *et al.*, 2016). Se utiliza frecuentemente la oxidación del persulfato para altos rendimientos de formación de  $ABTS^{*+}$ .



**Figura 4.** Reacción de formación del radical  $ABTS^{*+}$  con el agente oxidante.

La reacción con el agente antioxidante se basa en la reducción del radical libre  $ABTS^{*+}$ , mediante la cesión de un hidrógeno de acuerdo con la ecuación de la **Figura 5**. El radical  $ABTS^{*+}$  presenta máxima absorción a longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm, según Miller *et al.* (1993, 1994 y 1996). La longitud de onda de 734 nm se encuentra fuera del rango de posibles interferencias, por lo que es la más adecuada. Como los antioxidantes causan un descenso de la absorbancia, la solución inicial de  $ABTS^{*+}$  deberá tener una absorbancia inicial de 0,700 (Re *et al.*, 1999). La decoloración de la solución se puede cuantificar utilizando trolox como referencia (Pellegrini *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Reacción del radical  $ABTS^{*+}$  con el compuesto antioxidante (ArOH.)

Los compuestos fenólicos (TPC) son abundantes en plantas, por lo que la mayor parte de los métodos desarrollados se han utilizado para analizar muestras vegetales. El presente Trabajo de Fin de Máster pretende estudiar los métodos disponibles en la literatura para leche y productos lácteos elaborados con leche de cabra, para aplicarlos a leche obtenida de animales alimentados con subproductos de alcachofa y brócoli. En estudios previos sobre estos subproductos se han determinado diferencias en el contenido de fenoles totales en las dietas formuladas con estos subproductos, es por tanto necesario determinar si esta ingestión de fenoles diferenciada ocasiona diferencias en el contenido fenólico y capacidad antioxidante de la leche y leches fermentadas derivadas. En leche y leches fermentadas, a lo largo de su almacenamiento en frío, se evalúan contenido en fenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ABTS), composición, recuento microbiológico y pH a lo largo del almacenamiento en frío de las leches fermentadas.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el estudio de los efectos de la incorporación de subproductos de alcachofa y brócoli en la alimentación de ganado caprino sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en leche, así como en las leches fermentadas elaboradas.

### 2.1. Objetivos específicos

1. Evaluar métodos de la literatura científica para la determinación de fenoles totales en leche para determinar el método más adecuado en leche de cabra Murciano-Granadina.

2. Estudiar cómo afecta la incorporación de subproductos ensilados de brócoli y planta de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas en leche, y en leche fermentada por dos cultivos comerciales mixtos de yogur y queso (YO-MIX™ y MA400): composición, pH, viabilidad de los microorganismos, contenido total en polifenoles, capacidad antioxidante y color.



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materias primas y reactivos utilizados

#### 3.1.1. Reactivos

**Metanol:** (99.9%, calidad HPLC, JT Baker, USA): A partir de este metanol se preparó una disolución de metanol al 30% acidificado con ácido HCl 1N en proporción 85:15. Dicha disolución se conservó en refrigeración.

**Ácido clorhídrico 1N (HCl):** Para ello, se disolvieron 83,12 mL de HCl (pureza 37%, PanReac AppliChem, Spain) en un volumen de agua ultrapura hasta alcanzar 1 L de disolución.

**2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, Spain)** Se preparó una disolución de DPPH a 600  $\mu$ M en etanol al 80%. Para ello, se disolvieron 0,01182 g de DPPH en 50 mL de etanol (calidad UV, IR, HPLC, PanReac AppliChem, Spain) al 80%. Se mantuvo dicha disolución en agitación durante toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente y, posteriormente, se almacenó en condiciones de congelación.

**Ácido 2,2'-A zino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Sigma-Aldrich, Spain).** Se utilizó para preparar una disolución de ABTS 7 mM en  $K_2S_2O_8$  (calidad analítica, Sigma-Aldrich, Spain) 2,45 mM. Para ello se disolvieron 0,0331 g de  $K_2S_2O_8$  en 50 mL de agua ultrapura y, a continuación, se disolvieron 0,1920 g de ABTS en la disolución anterior. Se mantuvo la nueva disolución en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se preservó en condiciones de congelación.

**Ácido monohidrato 3,4,5-Trihidroxibenzoico (Ácido gálico monohidrato, calidad ACS > 98% obtenido de Sigma-Aldrich).** Utilizado para realizar la curva de calibración para la determinación del contenido total de fenoles.

**Ácido  $\pm$ 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox, Sigma-Aldrich, Spain).** Se utilizó para realizar la curva de calibración para la capacidad antioxidante.

**Otros reactivos:** Agua ultrapura, (milliQ Academic de Millipore); Acetonitrilo (calidad HPLC, Honeywell de Riedel-de-Haën, Alemania); Reactivo Carrez I (AppliChem Panreac, Spain); Reactivo Carrez II (AppliChem Panreac, Spain); Reactivo del fenol de Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania). Carbonato de sodio anhidro (grado farmacéutico, PanReac AppliChem, Alemania).

#### 3.1.2 Materias primas

##### 3.1.2.1. Leche para desarrollo del método de extracción

**Leche cruda de cabra.** Procedente de la granja docente e investigación de cabras Murciano-Granadinas de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO-UMH). Se recogieron del tanque de refrigeración 6 L de leche de dos ordeños consecutivos. Una vez recogida la leche, en el laboratorio le leche se dividió en dos alícuotas de tres litros, una de las cuáles se pasteurizó a 80°C durante 30 minutos y la otra no sufrió ningún

tratamiento. A continuación, ambas alícuotas se separaron en cantidades de 30 mL en botes de 60 mL y se almacenaron a -80°C, para su posterior liofilización, además de congelar también leche líquida para posteriormente estudiar diferentes ensayos comparativos del método de extracción para la determinación de los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante en leche.

### 3.1.2.2. Leche y leches fermentadas experimentales

**Muestras de leche para la elaboración de leche fermentada (ver Figura 6).** Se obtuvo leche de las cabras de la granja EPSO-UMH que formaban parte de un experimento dedicado a determinar el efecto de la inclusión de subproductos ensilados de brócoli y alcachofa en la dieta de caprino lechero. Se dispusieron 3 lotes homogéneos (edad, número y estado de lactación y producción) de 25 cabras cada uno. Durante una etapa pre-experimental de un mes de duración los tres lotes se alimentaron con la misma dieta para evaluar si el efecto del grupo de animales afectaba a los parámetros en estudio. Transcurrido el mes, se instauraron dietas diferenciadas: inclusión de 40% de subproducto de brócoli ensilado (Lote 1, n=25 cabras), 40% planta de alcachofa ensilada (Lote 2, n=25 cabras) y dieta convencional (Lote 3, n=25 cabras). Todas las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas, su formulación y características se presenta en la **Tabla 1.**

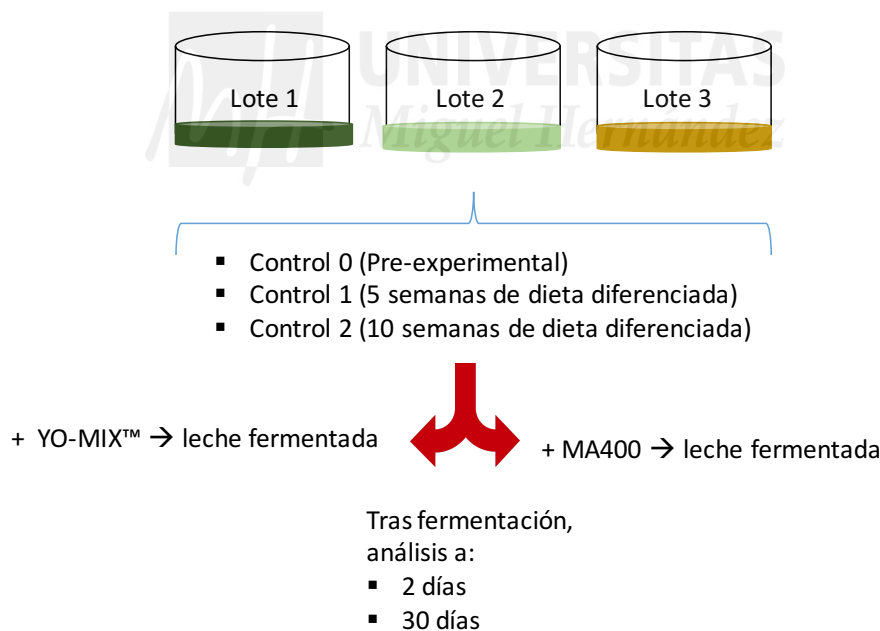
**Tabla 1.** Ingredientes (g/100 g de MS) y composición química (MS en g/Kg de MF, y el resto de parámetros en g/Kg de MS) de las dietas experimentales

<b>Ingredientes (g/100 g MS)</b>	<b>T</b>	<b>SB</b>	<b>PA</b>
Heno de alfalfa	37,6	12,2	-
Mix granos	59,2	21,5	52,6
Avena	3,2	26,2	-
Soja 44%	-	-	6,8
Silo	-	40,0	40,0
Premix vitaminas/minerales	-	-	0,6
<b>Composición química</b>	<b>T</b>	<b>SB</b>	<b>PA</b>
MS	878	333	475
MO	929	902	890
EE	53,1	57,1	52,0
PB	160	164	160
FND	378	354	381
FAD	241	237	254
LAD	56,5	47,6	49,3
TPC	3,65	4,93	3,28

T: dieta testigo; SB: dieta que incluye 40% de ensilado de subproducto de brócoli; PA: dieta que incluye 40% de ensilado de planta de alcachofa dietas calculadas para una producción lechera de 2,5 kg/día; MS: materia seca; MO: materia orgánica; EE: extracto etéreo; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente; TPC: compuestos fenólicos totales.

En leche se analizó composición, color, fenoles totales y capacidad antioxidante. Para la elaboración de las leches fermentadas, se tomaron muestras de leche a diferentes tiempos: Control 0 (Pre-experimental, todos los lotes alimentados con la dieta convencional); Control 1 (tras 5 semanas en dietas diferenciadas), y Control 2 (tras 10 semanas en dietas diferenciadas). Se utilizaron los cultivos comerciales de yogur YO-MIX™ 300 Danisco (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*); y de queso MA400 Danisco (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*). Para la inoculación de los cultivos, se siguieron las indicaciones del fabricante. La leche se pasteurizó a Baño María a 80°C durante 30 minutos y seguidamente se enfrió con hielo hasta la temperatura de incubación de cada cultivo. En el caso de YO-MIX™, la leche se inoculó a 45°C y se llevó a incubación a 43°C (tiempo=0 días). En el caso de MA400, se inoculó a 32°C y se incubó a 30°C (tiempo=0 días), en ambos casos se incubó hasta pH 4,6.

La leche fermentada con YO-MIX™ alcanzó un pH de 4,6 en aproximadamente 5 horas, la de MA400 en 18 horas. Las leches fermentadas se mantuvieron en condiciones de refrigeración durante 30 días y los muestreos se realizaron a los 2 días (tiempo=2 días) y 30 días (tiempo=30 días) de almacenamiento. El día de muestreo se determinó la composición, pH y recuentos. Además, se congelaron a -20°C muestras cuadruplicadas para los posteriores análisis (color, fenoles y capacidad antioxidante).



**Figura 6.** Esquema del proceso de preparación de las muestras de leche fermentada.



### 3.2. Equipos utilizados

**Espectrofotómetro** T80 UV/VIS de PG Instruments Ltd se utilizó para cuantificar los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante mediante espectrofotometría.

**Centrífuga** (5804R de Eppendorf); **Filtros de Nylon** 0,45  $\mu$ M (Filter-Lab®, Barcelona) y **Jeringuillas** de 5 mL. (Nipro Syringe, China): Se utilizaron para obtener los extractos libres de impurezas para posteriormente su cuantificación del contenido total en polifenole y capacidad antioxidante por ultravioleta-visible UV.

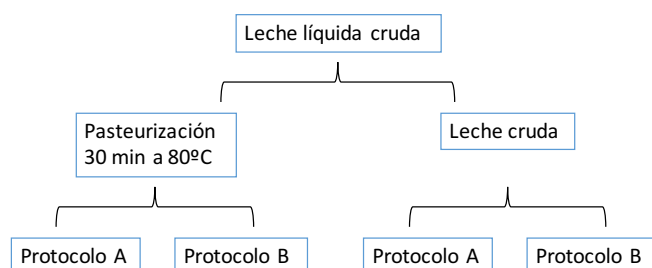
**Baño** de calor con movimiento orbital (Unitronic 320 OrR); **Balanza** analítica (Sartorius, modelo B120S-\*F1), liofilizador (Telstar CRYODOS) y pHmetro (Crison 21 allele Benelane, Spain). Se utilizaron para la preparación de las muestras, reactivos y medida de pH.

**Espectrofotómetro CR700d** (Konica Minolta, Inc., Osaka Japón), usando un modo SCI, observador a 10° e iluminador D65. Se utilizó para la determinación del color de las muestras.

**Espectrofotómetro de infrarrojos con transformador de Fourier** (FT120 Milko-Scan; Foss Electric, Hillerød, Denmark) con una calibración comercial de Foss Electric validada de acuerdo a ISO 21543:2006 (ISO, 2006). Se utilizó para el análisis de la composición química de las muestras.

### 3.3. Estudio comparativo de métodos de extracción para la determinación de compuestos fenólicos totales en leche y capacidad antioxidante

Para este objetivo, se siguió el esquema representado en la **Figura 7**, en el que se estudió el efecto de la pasteurización y la eficacia de dos protocolos para la obtención del extracto de las muestras para la determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante. Los protocolos A y B aparecen descritos en la **Tabla 2**. En ambos protocolos se estudiaron diferentes tiempos de extracción: toda la noche a 4°C (b) o 1 hora a 30°C en agitación (a).



**Figura 7. Esquema representativo del procedimiento de obtención de los extractos.**



**Tabla 2.** Procedimientos estudiados para la obtención de los extractos de las muestras para la determinación del contenido en compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

Protocolo A <sup>[1]</sup>	Protocolo B <sup>[2]</sup>
1. 8 mL de leche líquida	1. Liofilización de las muestras durante 72 horas.
2. Adición de 10 mL de metanol-agua (50-50) y agitación con vórtex 1 minuto	2. Pesado de 3 g de muestra y adición de 20 mL de metanol-ácido (85-15)
3. Adición de 500 µL de Carrez I y agitación con vórtex 1 minutos	3. Incubación
4. Adición de 500 µL de Carrez II y agitación con vórtex 1 minutos	a. 1 hora a 30°C a 300 rpm <sup>[3]</sup>
5. Adición de 5 mL de Acetonitrilo y agitación con vórtex 1 minutos	b. Toda la noche a 4°C <sup>[4]</sup>
6. Adición de 1 mL de metanol-agua y agitación con vórtex 1 minuto	4. Centrifugación 15 minutos a 5°C a 7,800 xg
7. Incubación	5. Recuperación del sobrenadante
a. 1 hora a 30°C a 300 rpm <sup>[3]</sup>	6. Filtrado del sobrenadante con filtros Nylon 0,45 µM → extractos
b. Toda la noche a 4°C <sup>[4]</sup>	7. Análisis de los extractos
8. Centrifugación 15 minutos a 5°C a 7,800 xg	
9. Recuperación del sobrenadante	
10. Filtrado del sobrenadante con filtros Nylon 0,45 µM → extractos	
11. Análisis de los extractos	

[1] El protocolo A fue desarrollado por Velázquez-Vázquez *et al.* (2015).

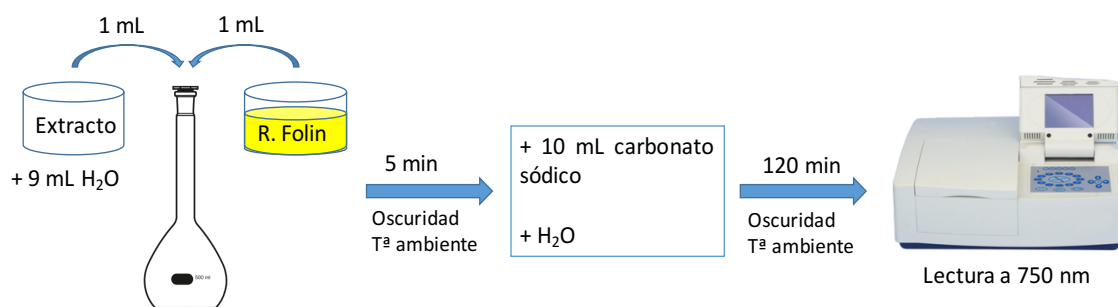
[2] El protocolo B por Li *et al.* (2009).

[3] Condiciones de incubación de la muestra descritas por Li *et al.* (2009).

[4] Condiciones de incubación de la muestra obtenidas de Trigueros *et al.* (2014).

### 3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales (Método de Folin-Ciocalteu)

A partir de los extractos de las muestras (leche pasteurizada y leche cruda), utilizando el Método A y B de extracción y con los procedimientos de incubación de las muestras reflejados en la **Tabla 2**, se determinó el contenido en compuestos fenólicos totales de las mismas. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Kim *et al.* (2003). Se mezcló 1 mL de extracto con 9 mL de agua ultrapura en un matraz de vidrio de 25 mL. Posteriormente, se adicionó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasados los 5 minutos, se añadieron 10 mL de carbonato de sodio al 7,5% y se enrasó el matraz con agua ultrapura hasta alcanzar los 25 mL. A continuación, se incubaron las muestras, en oscuridad y a temperatura ambiente, durante 120 minutos. Se realizó la lectura a 750 nm mediante espectrofotometría (ver **Figura 8**). Para obtener la recta de calibración se utilizó el mismo procedimiento que la muestra, preparando 5 concentraciones crecientes de ácido gálico (50, 100, 150, 200 y 250 mg/L). Los resultados se expresaron mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/L de muestra.



**Figura 8.** Representación del procedimiento para la determinación de los compuestos fenólicos totales.

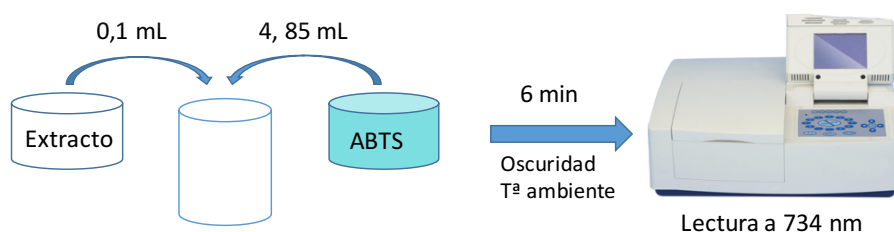
### 3.5. Determinación de capacidad antioxidante total (TEAC)

La capacidad antioxidante de las muestras se determinó mediante dos métodos: el método ABTS y el método DPPH.

#### 3.5.1 Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método ABTS

La capacidad antioxidante mediante el método ABTS se determinó en base al método descrito por Re *et al.* (1998). La disolución de ABTS 7 mM preparada en  $K_2S_2O_8$  2,45 mM se ajustó en el momento de uso con etanol al 80% hasta alcanzar una absorbancia de  $0,7 \pm 0,005$  a 734 nm.

Una vez ajustada la solución de ABTS, se añadió 0,1 mL de extracto de las muestras en un tubo de vidrio de 25 mL junto con 4,85 mL de ABTS. Se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se leyó la absorbancia de las muestras a 734 nm. El procedimiento aparece representado en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS.

La actividad antioxidante se expresa como % de inhibición de acuerdo a la fórmula mostrada en la **Figura 10**, con respecto a la curva de calibración obtenida a partir de 5 concentraciones crecientes de TROLOX, 0,15, 0,30, 0,5, 0,75 y 1 mM en etanol al 80%. Expresados los resultados también en mM de TROLOX/L de muestra.

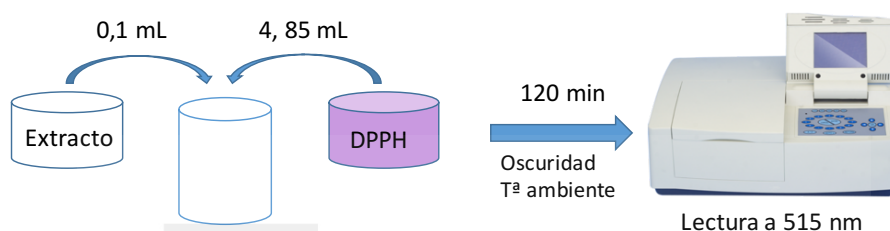
$$\% \text{ inhibición} = \frac{1 - A_C}{A_B} \cdot 100$$

**Figura 10.** Ecuación utilizada para el cálculo del porcentaje de inhibición.  $A_C$  es la absorbancia de la muestra, y  $A_B$  la absorbancia del blanco.

### 3.5.2 Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método DPPH

La capacidad antioxidante mediante el método DPPH se determinó en base al método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). La disolución de DPPH 0,6 mM en etanol al 80% se ajustó, en el momento de uso, con etanol al 80% hasta alcanzar una absorbancia de  $0,68 \pm 0,005$  a 515 nm.

Una vez ajustada la solución de DPPH, se añadió 0,1 mL de extracto de las muestras en un tubo de vidrio de 25 mL junto con 4,85 mL de DPPH. Se incubó durante 120 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y se leyó la absorbancia de las muestras a 515 nm. El procedimiento aparece representado en la **Figura 11**. La actividad antioxidante se expresa como % de inhibición de acuerdo a la fórmula mostrada en la **Figura 10**, con respecto a la curva de calibración obtenida a partir de 5 concentraciones crecientes de TROLOX, 0,15, 0,30, 0,5, 0,75 y 1 mM en etanol al 80%. Expresados los resultados también en mM de TROLOX/L de muestra.



**Figura 11.** Procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH.

### 3.6. Determinación del color

El color de las muestras se midió utilizando un Espectrofotómetro CR700d (Konica Minolta, Inc., Osaka Japón), usando un modo SCI, observador a  $10^\circ$  e iluminador D65. Durante las medidas se usaron un soporte de muestra CM-A514 (Konica Minolta, Japón) y una célula rectangular de vidrio diseñada para transmitancia de alta precisión (CM-A132, 50 X 38, paso óptico de 20 mm, Minolta, Osaka, Japón). Las muestras se colocaron en la célula para la determinación del color. Se estudiaron las coordenadas del color CIELAB ( $L^*$ : luminosidad;  $a^*$ : rojo;  $b^*$ : amarillo).

### 3.7. Determinación de la composición y del pH

La composición de las muestras (porcentaje de grasa, proteína y sólidos totales) se analizó usando un espectrofotómetro de infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FT120 Milko-Scan; Foss Electric, Hillerød, Denmark) con una calibración comercial de Foss Electric validada de acuerdo a ISO 21543:2006 (ISO, 2006). Las muestras se calentaron previamente a  $40^\circ\text{C}$ . El pH se determinó con un pHmetro Crison 21GLP (Alella, Barcelona).

### 3.8. Recuento microbiológico

Se utilizaron dos medios de cultivo MRS (recuento de lactobacilos) y M17 (recuento de

lactococcus y estreptococos) agar para el recuento microbiológico de las leches fermentadas. Las condiciones de incubación utilizadas fueron las indicadas por Muelas *et al.* (2018). Los yogures obtenidos con YO-MIX™ se incubaron a 37°C durante 48 horas en Agar MRS para el crecimiento de latobacilos y bajo condiciones de microaerofilia. En M17 se sembraron para el crecimiento de streptococos bajo condiciones aeróbicas a una temperatura de 30°C durante 48 horas. Las leches fermentadas con MA400, se contaron en Agar M17 (pH = 7.2 ± 0.2) con una temperatura de incubación de 30°C durante 48 horas, en condiciones aeróbicas.

### 3.9. Modelos matemáticos y análisis de los datos

Los datos obtenidos de todos los análisis fueron introducidos en una hoja excell (Excell 2016, Microsoft Corporation, California, USA) y después transformados a datos SAS (SAS 9.4, SAS Institute Inc., 2012, Cary, NC) para su posterior análisis estadístico. Para estudiar el efecto los microorganismos estudiados (YO-MIX™ y MA400) en la leche procedente de las 3 dietas alimenticias aportadas a los animales (testigo, planta de alcachofa y brócoli) en los parámetros de composición (grasa, proteínas y sólidos totales), compuestos fenólicos (TPC), propiedades antioxidantes (DPPH y ABTS) y color (a\*, b\* y L\*), teniendo en cuenta cada uno de las elaboraciones (periodo preexperimental y experimental: controles 1 y 2) se empleó un modelo lineal general (Proc. GLM, SAS 9.4) utilizando el siguiente modelo:

$$Y = \mu + \text{LOTE/DIETA}_i + \text{MICRO}_j + \text{DIAS}_k + \text{REP}_i(\text{DIAS}_k) +$$

$$\text{LOTE/DIETA}_i * \text{MICRO}_j + \text{DIAS}_k * \text{MICRO}_j + \text{LOTE/DIETA}_i * \text{MICRO}_j * \text{DIAS}_k + e_{ijk}$$

Y= variable dependiente

μ: media

**LOTE/DIETA<sub>i</sub>**: efecto del lote en el periodo preexperimental (1, 2 y 3; todos los lotes tenían la misma dieta) /efecto de la dieta en los 2 controles experimentales (n=3; testigo, planta de alcachofa y brócoli)

**MICRO<sub>j</sub>**: Microorganismo ensayado (A400 y Yomix)

**DIAS<sub>k</sub>**: días de fermentación, adición de microorganismos (0, 2 y 30 días)

**REP<sub>k</sub>(DIAS<sub>j</sub>)**: repeticiones de analisis de cada variable dentro de cada elaboración

Parámetros de composición: n=2

Compuestos fenólicos: n=2

Capacidad antioxidantes: n=2

Variables de color: n=5

Longitudes de onda: n=5

**LOTE/DIETA<sub>i</sub> \* MICRO<sub>j</sub>**: interacción de la lote/dieta por el microorganismo

**DIAS<sub>k</sub> \* MICRO<sub>j</sub>**: interacción del día de fermentación por el microorganismo

**LOTE/DIETA<sub>i</sub> \* MICRO<sub>j</sub> \* DIAS<sub>k</sub>**: interacción de la lote/dieta por el microorganismo y por el día de fermentación

**e<sub>ijk</sub>**: error residual

Para estudiar la correlación entre los parámetros a\* y b\* de color, los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante se utilizó el coeficiente de Pearson del **PROC CORR** del paquete estadístico SAS. En el periodo experimental el análisis se realizó considerando la dieta, el microorganismo y el día de fermentación. En el periodo preexperimental, como todos los animales consumían la misma dieta, se consideró el microorganismo y el día de fermentación.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Estudio comparativo de métodos de extracción para la determinación de compuestos fenólicos totales en leche y capacidad antioxidante

La leche es una matriz compleja por su elevado contenido en proteínas y grasas, siendo muy importante su eliminación para la correcta detección de los compuestos fenólicos totales y la determinación de la capacidad antioxidante. Para ello, se utilizan generalmente compuestos químicos como el acetonitrilo, Carrez I y II (Velázquez-Vázquez *et al.* 2015) o bien un disolvente extractante acidificado (Li *et al.* 2009), generalmente con ácido clorhídrico, seguido de procedimientos físicos, como la centrifugación y filtración (filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  o 0.22  $\mu\text{m}$ ) para obtener un extracto nítido para su correcta cuantificación. Con respecto al disolvente extractante utilizado, el más común es el metanol debido a su mayor polaridad, lo que contribuye a una mayor extracción de compuestos fenólicos con respecto a otros disolventes como el etanol o acetona (Velázquez-Vázquez *et al.* 2015).

**Tabla 3.** Estudio de la repetibilidad en los métodos de extracción en muestras de leche para la determinación del contenido total en fenoles (mg de EAG/L de muestra) y capacidad antioxidante.

	Muestras de leche (n=25)	Tiempo/temperatura de incubación	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/L)	Coefficiente de variación ( $C_v$ ) (%)
Método A <sup>[1]</sup>	Cruda	1h/30°C <sup>[3]</sup>	68,93 $\pm$ 16,43	23,84
		Noche (12 h)/4°C <sup>[4]</sup>	69,05 $\pm$ 21,14	30,62
	Pasteurizada	1 h/30°C <sup>[3]</sup>	49,38 $\pm$ 7,86	15,93
		Noche (12 h)/4°C <sup>[4]</sup>	46,59 $\pm$ 10,25	21,99
Método B <sup>[2]</sup>	Cruda	1 h/30°C <sup>[3]</sup>	53,92 $\pm$ 6,90	12,79
		Noche (12 h)/4°C <sup>[4]</sup>	48,67 $\pm$ 4,46	9,19
	Pasteurizada	1 h/30°C <sup>[3]</sup>	45,68 $\pm$ 6,02	13,18
		Noche (12 h)/4°C <sup>[34]</sup>	35,41 $\pm$ 4,09	11,55

[1] El protocolo A fue desarrollado por Velázquez-Vázquez *et al.* (2015).

[2] El protocolo B por Li *et al.* (2009).

[3] Condiciones de incubación de la muestra descritas por Li *et al.* (2009).

[4] Condiciones de incubación de la muestra obtenidas de Trigueros *et al.* (2014).

En la **Tabla 3** se muestran los valores medios, en mg de EAG/L de muestra, de compuestos fenólicos totales cuantificados en leche líquida, tanto cruda como pasteurizada, utilizando dos métodos diferentes de extracción (Método A y B), junto con su respectivo coeficiente de variación. Tanto para la leche cruda como para la leche pasteurizada, se detectó mayor cantidad de compuestos fenólicos totales al utilizar el método A (acetonitrilo), aunque sin diferencias relevantes con los obtenidos mediante el método B (metanol acidificado) de Li *et al.* (2009). En la literatura científica los valores habitualmente reportados para compuestos fenólicos totales en leche de cabra se sitúan

entre 60 y 100 mg de EAG/L, y son, por tanto, similares a los obtenidos con ambos métodos (Velázquez-Vázquez *et al.* 2015; Chávez-Servín *et al.*, 2018). Es necesario indicar que el tratamiento de pasteurización ocasionó un descenso de entre el 15,28 y el 32,46% en la cuantificación de compuestos fenólicos totales, lo que apunta a una degradación parcial de compuestos fenólicos causada por la aplicación de calor (80°C) (Volf *et al.*, 2014). También se estudiaron dos condiciones de incubación de las muestras para la extracción (1 hora a 30°C y toda la noche (12 h) a 4°C), no mostrando diferencias relevantes en cuanto a cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos, por lo que, por razones técnicas se decidió incubar las muestras durante 1 hora a 30°C. De este modo, se logró evitar ciertas dificultades técnicas que surgieron durante la incubación a 4°C durante toda la noche, como son: tiempos elevados de duración del experimento o el aumento de turbidez de las muestras por el efecto de la baja temperatura.

Si bien ambos métodos (A y B) permitieron obtener niveles de fenoles totales similares a los reportados en la literatura científica, se seleccionó trabajar en adelante con el Método B, debido al bajo coeficiente de variación de las repeticiones y a la menor complejidad del método, con incubación de 1 hora a 30°C, debido al ahorro de tiempo.

## 4.2. Leches y leches fermentadas obtenidas de leche procedente de 3 lotes de animales alimentados con dieta convencional en el período pre-experimental

El principal objetivo de realizar este estudio comparativo entre leche procedente de lotes homogéneos de animales, sometidos a la misma dieta, fue determinar si los grupos de individuos daban lugar a diferencias *per se* y poder así diferenciarlas de las posibles diferencias causadas por las dietas a ensayar.

### 4.2.1. Parámetros del color ( $a^*$ , $b^*$ y $L^*$ ) en leche y leches fermentadas en periodo pre-experimental

En la **Tabla 4** se observa la evolución de los valores de los parámetros del color ( $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ ) en leche y leche fermentada obtenida con dos tipos de cultivos mixtos de yogur y queso, respectivamente (YO-MIX™: *a* y MA400: *b*) elaboradas con leche de ganado caprino de tres lotes de animales alimentados con la misma dieta convencional.

Los valores obtenidos en los parámetros de color no se asemejan a los reportados por otros autores en leche de cabra Murciano-Granadina (Capellas *et al.*, 2001:  $L^*$  cercana a 90,  $b^*$  cercana a 8 y  $a^*$  cercana a -0,81; Vargas *et al.*, 2008:  $L^*$  cercana a 90 y Costa *et al.*, 2015:  $L^*$  cercana a 89,  $a^*$  cercana a 0,69 y  $b^*$  a 7,5.), obteniendo en nuestro caso valores cercanos a 77 para la  $L^*$ , a 5 para la  $b^*$  y a -2 para la  $a^*$ . El resto de autores encuentra valores similares entre sí, pudiendo deberse a diferente alimentación (sin datos disponibles en esos estudios) respecto a nuestros animales, o bien a otros motivos, por lo que fue necesario seguir analizando los datos. Se procedió a calcular los índices  $\Delta E$  según Capellas *et al.*, (2001) para evaluar las diferencias de color de leche y leche fermentada entre diferentes lotes. Para su cálculo se incluyeron las tres coordenadas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). Se consideró que un  $\Delta E$  inferior a 1 no era perceptible al ojo humano, y, por tanto, carecía de relevancia (Capellas *et al.*, 2001). Los valores de  $\Delta E$



oscilaron entre 0,5 y 3, siendo las diferencias menores las detectadas al comparar las leches fermentadas de diferentes lotes entre sí y las mayores al comparar la leche sin fermentar. El  $\Delta E$  alcanzó valores de 3 para las muestras de leche y tras la fermentación las diferencias fueron menores de 1. Este hecho, unido a la observación, durante la manipulación de las muestras, de ligeros signos de desestabilización, nos llevan a considerar que las condiciones de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  no fueron adecuadas para la posterior determinación del color de la leche, siendo los problemas menores en el caso de las leches fermentadas. Esto implica que los resultados de color obtenidos deben tomarse con cautela y centrarse en las diferencias coherentes a lo largo de todo el estudio como es el efecto de la fermentación y del almacenamiento.

**Tabla 4.** Valores medios y su desviación estándar de las variables del color ( $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ ) de las muestras de leche y leches fermentadas del control 0 (pre-experimental), en tres lotes de animales diferentes alimentados con dieta convencional para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b) a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a		YO-MIX™									NS a	NS b	NS L
Días		0			2			30					
Variable	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$				
Lote 1	$-1.71 \pm 0.01^{aA}$	$5.47 \pm 0.08^{aA}$	$77.57 \pm 1.02^{aA}$	$-1.98 \pm 0.02^{aB}$	$5.32 \pm 0.10^{aB}$	$82.52 \pm 0.55^{aB}$	$-1.9 \pm 0.02^{aC}$	$5.88 \pm 0.17^{aC}$	$81.94 \pm 0.29^{aB}$	**	***	***	
Lote 2	$-2.17 \pm 0.01^{bA}$	$5.26 \pm 0.06^{bA}$	$77.97 \pm 0.98^{aA}$	$-1.78 \pm 0.01^{bB}$	$5.07 \pm 0.02^{bB}$	$83.03 \pm 0.56^{aB}$	$-1.76 \pm 0.01^{bC}$	$6.07 \pm 0.08^{bC}$	$83.69 \pm 0.16^{bB}$	**	***	***	
Lote 3	$-2.21 \pm 0.01^{cA}$	$4.14 \pm 0.19^{cA}$	$75.34 \pm 0.75^{bA}$	$-1.92 \pm 0.01^{cB}$	$5.77 \pm 0.03^{cB}$	$82.87 \pm 0.11^{bB}$	$-1.77 \pm 0.02^{cC}$	$5.88 \pm 0.12^{cC}$	$82.83 \pm 0.05^{cB}$	***	**	***	
NS	***	***	***	***	***	NS	***	***	*				
b		MA400									NS a	NS b	NS L
Días		0			2			30					
Variable	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$				
Lote 1	$-1.7 \pm 0.01^{aA}$	$5.47 \pm 0.08^{aA}$	$77.57 \pm 1.02^{aA}$	$-1.95 \pm 0.02^{aB}$	$4.29 \pm 0.13^{aB}$	$80.51 \pm 0.34^{aB}$	$-1.73 \pm 0.04^{aC}$	$5.28 \pm 0.09^{aC}$	$82.80 \pm 0.69^{aC}$	*	***	***	
Lote 2	$-2.17 \pm 0.01^{bA}$	$5.26 \pm 0.06^{bA}$	$77.97 \pm 0.98^{aA}$	$-1.77 \pm 0.02^{bB}$	$4.76 \pm 0.09^{bA}$	$82.38 \pm 0.35^{bB}$	$-1.67 \pm 0.02^{bC}$	$5.32 \pm 0.04^{bB}$	$83.23 \pm 0.92^{aC}$	***	***	*	
Lote 3	$-2.21 \pm 0.01^{cA}$	$4.14 \pm 0.19^{cA}$	$75.34 \pm 0.75^{bA}$	$-1.86 \pm 0.04^{cB}$	$4.17 \pm 0.18^{cA}$	$81.04 \pm 0.97^{aB}$	$-1.60 \pm 0.01^{cC}$	$5.25 \pm 0.05^{bB}$	$83.69 \pm 0.03^{aC}$	***	***	***	
NS	***	***	***	***	*	**	***	NS	NS				

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Tras la fermentación (2 días) se produjo un aumento de  $L^*$  (entre 4,95 y 7,53 unidades) para el cultivo de yogur YO-MIX™, con respecto a la leche, y luego se mantuvo estable hasta los 30 días de almacenamiento. En el caso del cultivo de queso MA400, el comportamiento fue similar con la salvedad de que la  $L^*$  aumentó ligeramente tras 30 días de almacenamiento (entre 0,85 y 2,85 unidades). Este proceso pudo deberse a que MA400, al tratarse de un cultivo para queso, no es tan acidificante como el YO-MIX™, concordando con los resultados descritos por García-Pérez *et al.* (2005), en los que, el valor de  $L^*$  estaba relacionado con la acidez. De la misma forma, se observó un aumento de los valores de  $b^*$  a los 30 días con respecto a los 0 días, para ambos cultivos comerciales (1,74 unidades como máximo). Esto pudo deberse a que durante la fermentación y almacenamiento se podrían haber liberado compuestos pigmentados capaces de hacer el producto más amarillo, coincidiendo con Needs *et al.* (2000), que observaron que la refrigeración del yogur a  $4^{\circ}\text{C}$  producía cambios en los valores del color, aumentando los valores de  $b^*$  especialmente. Sin embargo, a pesar de que tales diferencias fueron detectadas con el espectrocolorímetro, posiblemente serían inapreciables al ojo humano (García-Pérez *et al.*, 2005), visto también su  $\Delta E$  inferior a 1. En todos los casos, los parámetros  $b^*$  (más amarillo) y  $L^*$  (más blanco) aumentaron a causa de la fermentación, mientras que el valor de  $a^*$  tendió a mantenerse constante. Las tendencias en los parámetros de color fueron iguales en todos los lotes de animales.

#### 4.2.2. Composición (%): proteínas (PT), grasa (G) y sólidos totales (ST) en leche y leches fermentadas en el periodo pre-experimental

En la **Tabla 5** se observa la evolución de los valores de los parámetros de la composición (grasa, proteínas y sólidos totales) en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes alimentados con dieta convencional.

**Tabla 5.** Valores medios y su desviación estándar de las variables de la composición (G: grasa, PT: proteínas y ST: sólidos totales expresados en porcentaje de composición de la leche) de las muestras de leche y leches fermentadas del control 0 (pre-experimental), en tres lotes de animales diferentes alimentados con dieta convencional para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a											NS G	NS PT	NS ST
YO-MIX™													
Días	0			2			30						
Variable	G	PT	ST	G	PT	ST	G	PT	ST				
Lote 1	4.79 ± 0.07 <sup>aA</sup>	3.34 ± 0.02 <sup>aA</sup>	13.96 ± 0.01 <sup>aA</sup>	4.72 ± 0.02 <sup>aB</sup>	3.34 ± 0.03 <sup>aA</sup>	13.07 ± 0.02 <sup>aB</sup>	4.54 ± 0.02 <sup>aC</sup>	3.33 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.05 ± 0.01 <sup>aB</sup>	*	NS	***	
Lote 2	4.46 ± 0.02 <sup>bA</sup>	3.34 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.55 ± 0.02 <sup>bA</sup>	4.37 ± 0.01 <sup>bB</sup>	3.33 ± 0.01 <sup>aA</sup>	12.74 ± 0.02 <sup>bB</sup>	4.18 ± 0.03 <sup>bC</sup>	3.37 ± 0.01 <sup>aA</sup>	12.74 ± 0.03 <sup>bB</sup>	**	NS	***	
Lote 3	4.69 ± 0.01 <sup>cA</sup>	3.37 ± 0.02 <sup>aA</sup>	13.84 ± 0.02 <sup>cA</sup>	4.86 ± 0.01 <sup>cB</sup>	3.34 ± 0.03 <sup>aA</sup>	13.18 ± 0.02 <sup>cB</sup>	4.67 ± 0.01 <sup>cA</sup>	3.44 ± 0.02 <sup>bB</sup>	13.27 ± 0.02 <sup>cC</sup>	***	**	***	
NS	**	NS	***	***	NS	***	***	**	***				

b											NS G	NS PT	NS ST
MA400													
Días	0			2			30						
Variable	G	PT	ST	G	PT	ST	G	PT	ST				
Lote 1	4.79 ± 0.06 <sup>aA</sup>	3.34 ± 0.02 <sup>aA</sup>	13.96 ± 0.01 <sup>aA</sup>	5.00 ± 0.03 <sup>aB</sup>	3.35 ± 0.10 <sup>abA</sup>	13.01 ± 0.04 <sup>aB</sup>	4.98 ± 0.01 <sup>aB</sup>	3.36 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.33 ± 0.01 <sup>aC</sup>	***	NS	***	
Lote 2	4.46 ± 0.02 <sup>bA</sup>	3.34 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.55 ± 0.02 <sup>bA</sup>	4.87 ± 0.01 <sup>bB</sup>	3.33 ± 0.01 <sup>aA</sup>	12.77 ± 0.01 <sup>bB</sup>	4.96 ± 0.03 <sup>aB</sup>	3.37 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.34 ± 0.02 <sup>aC</sup>	***	NS	***	
Lote 3	4.69 ± 0.01 <sup>cA</sup>	3.37 ± 0.02 <sup>aA</sup>	13.84 ± 0.02 <sup>cA</sup>	4.79 ± 0.01 <sup>cB</sup>	3.38 ± 0.01 <sup>bA</sup>	12.74 ± 0.02 <sup>bB</sup>	4.86 ± 0.01 <sup>bC</sup>	3.43 ± 0.03 <sup>bB</sup>	13.17 ± 0.01 <sup>bC</sup>	*	*	***	
NS	**	NS	***	*	*	***	**	*	***				

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

En todos los casos, los tres parámetros se mantuvieron dentro del rango considerado como normal en la composición de la leche de cabra (Amiot *et al.*, 1991; Muelas *et al.*, 2017): valores medios de grasa: 4,4 (mínimo 2,4 y máximo 7,8); proteínas: 3,7 (mínimo 2,9 y máximo 5,6) ST: 13,8 (12 y 22,6). Las ligeras variaciones observadas entre los valores (de menos de 0,5 unidades para la grasa, 0,1 para proteínas y 0,95 para los sólidos totales) a lo largo del tiempo se encontraron dentro de los valores medios descritos por la bibliografía, por lo que las diferencias se podrían considerar irrelevantes. El mismo fenómeno se produjo entre los distintos lotes de animales, todos presentaron valores típicos de composición de leche de cabra. Si bien se detectaron diferencias significativas en contenido grasa y sólidos totales entre los lotes, estas diferencias fueron pequeñas desde el punto de vista cuantitativo (0,3 unidades).

#### 4.2.3. Compuestos fenólicos (TPC), y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en leche y leches fermentadas en periodo pre-experimental

En la **Tabla 6** se muestran los valores medios de la cantidad de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes alimentados con dieta convencional.



**Tabla 6.** Valores medios y su desviación estándar de las variables de los compuestos fenólicos totales (TPC) (mg EAG/L de muestra) y la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) (mM de TROLOX/L de muestra) las muestras de leche y leches fermentadas del control 0 (pre-experimental), en tres lotes de animales diferentes alimentados con dieta convencional para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a	YO-MIX™									NS TPC	NS DPPH	NS ABTS
	Días	0			2			30				
Variable	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS			
Lote 1	41.77 ± 1.61 <sup>1aA</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>1aA</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>1aA</sup>	84.15 ± 15.69 <sup>2aB</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>2aB</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>2aA</sup>	71.66 ± 0.18 <sup>3cC</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>3aA</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	*	**	NS
Lote 2	36.57 ± 3.39 <sup>2aA</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>2aA</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>2aA</sup>	85.24 ± 14.33 <sup>2aB</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>2aB</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>2aA</sup>	66.70 ± 0.55 <sup>3cC</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	***	*	NS
Lote 3	43.96 ± 4.21 <sup>2aA</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>2aA</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>2aA</sup>	82.65 ± 4.95 <sup>2aB</sup>	0.52 ± 0.18 <sup>2aA</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>2aA</sup>	67.96 ± 0.81 <sup>3cC</sup>	0.42 ± 0.07 <sup>3aB</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	**	NS	NS
NS	NS	*	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS			
b	MA400									NS TPC	NS DPPH	NS ABTS
	Días	0			2			30				
Variable	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS			
Lote 1	41.77 ± 1.61 <sup>1aA</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>1aA</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>1aA</sup>	99.95 ± 1.47 <sup>2bB</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>2aB</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>2aA</sup>	86.73 ± 1.27 <sup>3cC</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	**	*	NS
Lote 2	36.57 ± 3.39 <sup>2aA</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>2aA</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>2aA</sup>	96.24 ± 1.14 <sup>2aB</sup>	0.62 ± 0.05 <sup>2aB</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>2aB</sup>	85.10 ± 0.60 <sup>3cC</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>3aA</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>3aB</sup>	*	*	*
Lote 3	43.96 ± 4.21 <sup>2aA</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>2aA</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>2aA</sup>	106.88 ± 0.95 <sup>2bB</sup>	0.63 ± 0.14 <sup>2aA</sup>	0.27 ± 0.06 <sup>2aB</sup>	88.02 ± 0.49 <sup>3cC</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>3aA</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>3aB</sup>	***	*	*
NS	NS	*	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS			

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Entre lotes de animales no se observaron diferencias significativas en el contenido en compuestos fenólicos totales (TPC). En todos los casos, los TPC aumentaron con la fermentación, a día 0 (leche) a los 2 días. Dicho aumento fue superior para el cultivo MA400 (aumento de entre 58,18 y 62,92 unidades) que para el cultivo YO-MIX™ (aumento de entre 38,69 y 48,67). Para ambos cultivos, los compuestos fenólicos totales disminuyeron con el almacenamiento (de 11,14 a 18,56 unidades). No es razonable deducir que hay un aumento real de compuestos fenólicos, sino que durante la fermentación se podrían estar produciendo otro tipo de compuestos que interactúen también con el reactivo de Folin-Ciocalteu utilizado para la cuantificación de los TPC. Castro-Alves y Cordenunsi (2015) afirmaron que el método Folin-Ciocalteu, pese a que sea el más usado mundialmente para la detección de TPC por su simplicidad, bajo coste y alta reproducibilidad, se basa en la capacidad reductora de los compuestos fenólicos de la muestra, pudiendo estar presentes otros compuestos no fenólicos con capacidad reductora (como ácido ascórbico, azúcares o pigmentos) que también interactúen con el reactivo, dando lugar a una sobreestimación de la cantidad de TPC en la muestra. Durante la fermentación de la leche se genera un ambiente reductor, dado que algunas cepas ocasionan depleción de oxígeno (Lourens-Hatting y Viljoen, 2001) que favorecería que una mayor cantidad de compuestos reaccionaran con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En el caso de la actividad antioxidante, se produjo un aumento (de hasta 0,35 unidades) al cuantificarla por el método DPPH durante la fermentación, disminuyendo (hasta 0,26 unidades) durante el almacenamiento. En el caso del ABTS, los valores no mostraron ninguna variación relevante durante la fermentación y el almacenamiento, manteniéndose constantes durante todo el proceso.

#### 4.2.4. pH y recuento microbiológico en leche y leche fermentada en período pre-experimental

En la **Tabla 7** se muestran los valores medios de las medidas de pH y del recuento microbiológico en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes alimentados con dieta convencional.

**Tabla 7.** Valores medios y su desviación estándar de las medidas de pH y de los recuentos microbiológicos (M17 y MRS), en log<sub>10</sub> cfu/g, de las muestras de leches fermentadas del control 0 (pre-experimental), en tres lotes de animales diferentes alimentados con dieta convencional para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a		YO-MIX™						NS M17	NS MRS	NS pH
Días		2			30					
Variable		M17	MRS	pH	M17	MRS	pH			
Lote 1		8.69 ± 0.05 <sup>aA</sup>	5.87 ± 0.12 <sup>aA</sup>	4.54 ± 0.02 <sup>aA</sup>	8.52 ± 0.07 <sup>aB</sup>	5.77 ± 0.10 <sup>aA</sup>	4.42 ± 0.03 <sup>aB</sup>	*	NS	**
Lote 2		8.43 ± 0.02 <sup>aA</sup>	5.95 ± 0.49 <sup>aA</sup>	4.39 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.34 ± 0.03 <sup>aA</sup>	5.75 ± 0.21 <sup>aA</sup>	4.39 ± 0.01 <sup>aA</sup>	NS	NS	NS
Lote 3		9.08 ± 0.03 <sup>aA</sup>	5.75 ± 0.21 <sup>aA</sup>	4.46 ± 0.02 <sup>aA</sup>	8.98 ± 0.02 <sup>aA</sup>	4.70 ± 0.01 <sup>aB</sup>	4.45 ± 0.01 <sup>aA</sup>	NS	*	NS
NS		**	NS	*	*	*	NS			

b		MA400				NS M17	NS pH
Días		2		30			
Variable		M17	pH	M17	pH		
Lote 1		9.22 ± 0.04 <sup>aA</sup>	4.29 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.55 ± 0.05 <sup>aB</sup>	4.32 ± 0.06 <sup>aA</sup>	***	NS
Lote 2		9.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	4.23 ± 0.03 <sup>aA</sup>	8.17 ± 0.18 <sup>aB</sup>	4.31 ± 0.01 <sup>aB</sup>	***	*
Lote 3		9.19 ± 0.01 <sup>aA</sup>	4.22 ± 0.06 <sup>aA</sup>	8.36 ± 0.15 <sup>aB</sup>	4.46 ± 0.01 <sup>aB</sup>	***	***
NS		NS	*	*	***		

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los recuentos de bacterias lácticas, y la acidez desarrollada pueden afectar al color y como ya se ha comentado, al ambiente reductor de la leche fermentada. Los recuentos observados en la tabla fueron similares a los observados por Muelas *et al.* (2018) para MA400 también en leche de cabra, que se trata de un cultivo mixto de cepas de *Lactococcus* y por tanto se realizaron los recuentos en M17. Respecto al cultivo de yogur YO-MIX™, no se ha encontrado en la literatura el uso del mismo cultivo comercial en trabajos con leche de cabra, pero los resultados coinciden con las especificaciones del fabricante, y son similares a los de Muelas *et al.* (2018) y Yadav *et al.* (2018) para recuentos en M17 (estimación de *Streptococcus thermophilus*) en yogures y menores para los recuentos en agar MRS (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*). A la vista de los resultados de la **Tabla 7**, el lote de animales no dio lugar a diferencias de pH ni de crecimiento de bacterias lácticas. El recuento de YO-MIX™ en M17 disminuyó con el tiempo de almacenamiento, pero no de forma relevante (máximo de 0,17 unidades), al igual que el de MA400 (máximo 1,03 unidades). Dicha disminución podría ser debida al efecto del envejecimiento del cultivo durante el almacenamiento en refrigeración. Lo mismo ocurre en la comparación entre distintos lotes, las diferencias entre los valores fueron irrelevantes (máximo de 0,65 unidades). En el caso del recuento en MRS para el YO-MIX™ no se encontraron diferencias significativas.

El pH no mostró diferencias relevantes con el tiempo, mostrándose invariable en el caso del YO-MIX™ y aumentando ligeramente en el caso del MA400, al tratarse de una

mezcla de cepas con menor capacidad acidificante cuya finalidad es participar en los procesos de maduración del queso. Los lotes de animales dieron lugar a leche con la misma aptitud a la fermentación.

### 4.3. Leches y leches fermentadas obtenidas de leche procedente de animales con dietas diferenciadas (Lote 1: brócoli, Lote 2: planta de alcachofa y Lote 3: dieta convencional) durante 5 semanas

En este punto es necesario recordar que los lotes estaban constituidos por los mismos individuos a lo largo de todo el estudio. En este primer control llevaban 5 semanas bajo dietas diferentes: 1) con 40% de subproducto de brócoli, 2) con 40% de subproducto de alcachofa y 3) en la misma dieta convencional. Nuestro objetivo fue ver si el mantenimiento de 5 semanas en estas dietas ocasiona diferencias en los parámetros estudiados.

#### 4.3.1. Parámetros del color (a\*, b\* y L\*) en leche y leches fermentadas tras 5 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 8** se observa la evolución de los valores de los parámetros del color (a\*, b\* y L\*) en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes distintos alimentados con diferentes dietas (Lote 1: brócoli, Lote 2: planta de alcachofa y Lote 3: dieta convencional). En todos los casos, los parámetros b\* y L\* a\* mostraron la misma tendencia que en el Control 0, mostrando que las ligeras diferencias que pudimos encontrar entre lotes no se pueden asociar al cambio de alimentación. Por tanto, no se observaron diferencias relevantes en los parámetros del color de la leche y de leches fermentadas tras 5 semanas de inclusión de subproductos de brócoli y alcachofa en la dieta de las cabras lecheras.

**Tabla 8.** Valores medios y su desviación estándar de las variables del color (a\*, b\* y L\*) de las muestras de leche y leches fermentadas del control 1 (5 semanas en dietas diferenciadas), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b) a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

Días	MA400									NS a	NS b	NS L
	0			2			30					
	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*			
Lote 1	-1.45 ± 0.02 <sup>2aA</sup>	5.89 ± 0.09 <sup>2aA</sup>	80.34 ± 0.67 <sup>2aA</sup>	-1.50 ± 0.01 <sup>2aA</sup>	6.44 ± 0.08 <sup>2aB</sup>	85.93 ± 0.64 <sup>2aB</sup>	-1.45 ± 0.03 <sup>2aB</sup>	6.70 ± 0.13 <sup>2aC</sup>	84.94 ± 1.13 <sup>2aC</sup>	*	***	*
Lote 2	-1.34 ± 0.07 <sup>2bA</sup>	4.77 ± 0.10 <sup>2bA</sup>	77.53 ± 1.05 <sup>2bA</sup>	-1.58 ± 0.02 <sup>2bB</sup>	5.34 ± 0.01 <sup>2bB</sup>	85.19 ± 0.65 <sup>2aB</sup>	-1.59 ± 0.03 <sup>2bB</sup>	5.56 ± 0.10 <sup>2bC</sup>	82.54 ± 0.92 <sup>2bC</sup>	***	***	***
Lote 3	-1.44 ± 0.03 <sup>2aA</sup>	5.32 ± 0.03 <sup>2cA</sup>	78.73 ± 0.20 <sup>2cA</sup>	-1.76 ± 0.01 <sup>2cB</sup>	5.63 ± 0.01 <sup>2cB</sup>	83.81 ± 0.67 <sup>2bB</sup>	-1.62 ± 0.04 <sup>2bC</sup>	5.78 ± 0.05 <sup>2cC</sup>	83.41 ± 1.05 <sup>2bB</sup>	***	***	***
	***	***	*	**	***	*	***	***	**			
Días	YO-MIX™									NS a	NS b	NS L
	0			2			30					
	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*			
Lote 1	-1.45 ± 0.02 <sup>2aA</sup>	5.89 ± 0.09 <sup>2aA</sup>	80.34 ± 0.67 <sup>2aA</sup>	-1.63 ± 0.11 <sup>2aB</sup>	7.24 ± 0.06 <sup>2aB</sup>	85.15 ± 0.39 <sup>2aB</sup>	-1.55 ± 0.02 <sup>2aC</sup>	7.43 ± 0.04 <sup>2aC</sup>	85.46 ± 0.25 <sup>2aB</sup>	**	***	***
Lote 2	-1.34 ± 0.07 <sup>2bA</sup>	4.77 ± 0.10 <sup>2bA</sup>	77.53 ± 1.05 <sup>2bA</sup>	-1.45 ± 0.03 <sup>2bB</sup>	5.88 ± 0.09 <sup>2bB</sup>	86.04 ± 0.98 <sup>2bB</sup>	-1.49 ± 0.01 <sup>2bC</sup>	5.96 ± 0.02 <sup>2bC</sup>	84.95 ± 0.45 <sup>2cC</sup>	*	***	*
Lote 3	-1.44 ± 0.03 <sup>2aA</sup>	5.32 ± 0.03 <sup>2cA</sup>	78.73 ± 0.20 <sup>2cA</sup>	-1.67 ± 0.02 <sup>2aB</sup>	5.97 ± 0.02 <sup>2cB</sup>	84.36 ± 0.69 <sup>2aB</sup>	-1.65 ± 0.04 <sup>2cB</sup>	6.34 ± 0.05 <sup>2cC</sup>	83.81 ± 0.66 <sup>2bB</sup>	***	***	***
NS	***	***	**	***	*	***	*	***	*			

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### 4.3.2. Composición (%): proteínas (PT), grasa (G) y sólidos totales (ST) en leche y leches fermentadas tras 5 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 9** se observa la evolución de los valores de los parámetros de la composición (grasa, proteínas y sólidos totales) en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino sometido a dietas diferenciadas durante 5 semanas. En todos los casos, los tres parámetros se mantuvieron dentro del rango considerado como normal en la composición de la leche de cabra (Amiot *et al.*, 1991; Muelas *et al.*, 2017), al igual que ocurrió en el Control 0. Si bien se detectaron diferencias significativas en contenido graso y sólidos totales entre los lotes, estas diferencias fueron pequeñas desde el punto de vista cuantitativo (0,3 unidades). Por tanto, no se encontraron diferencias relevantes en la composición de la leche y de leches fermentadas tras 5 semanas de inclusión de un 40% de subproductos ensilados.

**Tabla 9.** Valores medios y su desviación estándar de las variables de la composición (G: grasa, PT: proteínas y ST: sólidos totales en porcentaje de composición de la leche) de las muestras de leche y leches fermentadas del control 1 (5 semanas dietas diferenciadas), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a	YO-MIX™									NS G	NS PT	NS ST
	0			2			30					
Días												
Variable	G	PT	ST	G	PT	ST	G	PT	ST			
Lote 1	5.38 ± 0.23 <sup>aA</sup>	3.23 ± 0.04 <sup>aA</sup>	14.24 ± 0.21 <sup>aA</sup>	5.20 ± 0.02 <sup>aB</sup>	3.16 ± 0.03 <sup>aB</sup>	13.19 ± 0.01 <sup>aB</sup>	6.09 ± 0.01 <sup>aC</sup>	3.24 ± 0.02 <sup>aA</sup>	14.24 ± 0.02 <sup>aA</sup>	*	**	***
Lote 2	4.90 ± 0.01 <sup>bA</sup>	3.23 ± 0.04 <sup>aA</sup>	14.24 ± 0.21 <sup>aA</sup>	4.44 ± 0.02 <sup>bB</sup>	3.23 ± 0.04 <sup>bA</sup>	12.44 ± 0.02 <sup>bB</sup>	5.46 ± 0.02 <sup>bC</sup>	3.27 ± 0.02 <sup>aB</sup>	13.50 ± 0.03 <sup>bC</sup>	***	*	***
Lote 3	4.95 ± 0.02 <sup>bA</sup>	3.31 ± 0.00 <sup>bA</sup>	13.88 ± 0.02 <sup>bA</sup>	4.73 ± 0.04 <sup>cB</sup>	3.23 ± 0.04 <sup>bB</sup>	12.69 ± 0.01 <sup>cB</sup>	5.05 ± 0.02 <sup>cA</sup>	3.36 ± 0.01 <sup>bC</sup>	13.27 ± 0.02 <sup>cC</sup>	*	*	***
NS	***	***	***	**	**	**	***	***	**			

b	MA400									NS G	NS PT	NS ST
	0			2			30					
Días												
Variable	G	PT	ST	G	PT	ST	G	PT	ST			
Lote 1	5.38 ± 0.23 <sup>aA</sup>	3.23 ± 0.04 <sup>aA</sup>	14.24 ± 0.21 <sup>aA</sup>	5.61 ± 0.01 <sup>aB</sup>	3.12 ± 0.00 <sup>aB</sup>	13.90 ± 0.06 <sup>aB</sup>	6.31 ± 0.02 <sup>aC</sup>	3.27 ± 0.01 <sup>aC</sup>	14.31 ± 0.02 <sup>aA</sup>	**	*	***
Lote 2	4.90 ± 0.01 <sup>bA</sup>	3.23 ± 0.04 <sup>aA</sup>	14.24 ± 0.21 <sup>aA</sup>	5.37 ± 0.02 <sup>bB</sup>	3.25 ± 0.01 <sup>bA</sup>	13.22 ± 0.21 <sup>bB</sup>	5.55 ± 0.01 <sup>bC</sup>	3.31 ± 0.01 <sup>bB</sup>	13.46 ± 0.02 <sup>bC</sup>	*	**	*
Lote 3	4.95 ± 0.02 <sup>bA</sup>	3.31 ± 0.00 <sup>bA</sup>	13.88 ± 0.02 <sup>cA</sup>	5.45 ± 0.01 <sup>abB</sup>	3.36 ± 0.02 <sup>cB</sup>	13.41 ± 0.01 <sup>cB</sup>	5.61 ± 0.11 <sup>bB</sup>	3.50 ± 0.03 <sup>cC</sup>	13.88 ± 0.03 <sup>cA</sup>	***	*	***
NS	***	***	***	**	***	*	***	*	***			

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### 4.3.3. Compuestos fenólicos (TPC), y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en leche y leches fermentadas tras 5 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 10** se muestran los valores medios de la cantidad de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes alimentados con inclusión de subproductos ensilados y dieta convencional.

**Tabla 10.** Valores medios y su desviación estándar de las variables de los compuestos fenólicos totales (TPC) (mg EAG/L de muestra) y la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) (mM de TROLOX/L de muestra) las muestras de leche y leches fermentadas del control 1 (5 semanas de dietas diferenciadas), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

Días	YO-MIX™									NS TPC	NS DPPH	NS ABTS
	0			2			30					
	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS			
Lote 1	50.79 ± 0.23 <sup>aA</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>aA</sup>	84.29 ± 9.35 <sup>bB</sup>	0.28 ± 0.12 <sup>bB</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>aA</sup>	87.65 ± 0.89 <sup>bB</sup>	0.39 ± 0.08 <sup>aA</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>aA</sup>	***	*	NS
Lote 2	45.11 ± 1.47 <sup>aA</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>aA</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>aA</sup>	73.88 ± 0.86 <sup>bB</sup>	0.51 ± 0.04 <sup>bA</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>bB</sup>	76.92 ± 2.15 <sup>bB</sup>	0.42 ± 0.02 <sup>aA</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>bA</sup>	***	NS	*
Lote 3	49.41 ± 0.08 <sup>aA</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>bA</sup>	67.68 ± 7.00 <sup>bB</sup>	0.53 ± 0.02 <sup>bA</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>aA</sup>	67.86 ± 8.43 <sup>bB</sup>	0.36 ± 0.05 <sup>bB</sup>	0.21 ± 0.07 <sup>aA</sup>	***	**	NS
NS	NS	NS	*	*	***	NS	*	NS	NS			

Días	MA400									NS TPC	NS DPPH	NS ABTS
	0			2			30					
	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS			
Lote 1	50.79 ± 0.23 <sup>aA</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>aA</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>aA</sup>	99.17 ± 2.99 <sup>bB</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>aA</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>aA</sup>	98.99 ± 5.27 <sup>bB</sup>	0.39 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>aA</sup>	***	NS	NS
Lote 2	45.11 ± 1.47 <sup>aA</sup>	0.47 ± 0.07 <sup>aA</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>aA</sup>	85.74 ± 1.32 <sup>bB</sup>	0.48 ± 0.05 <sup>aA</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>bB</sup>	81.14 ± 4.43 <sup>bB</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>bB</sup>	***	NS	*
Lote 3	49.41 ± 0.08 <sup>aA</sup>	0.51 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>bA</sup>	89.23 ± 2.25 <sup>bB</sup>	0.49 ± 0.09 <sup>aA</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>aA</sup>	84.53 ± 2.48 <sup>bB</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>bA</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>aA</sup>	***	NS	NS
NS	NS	NS	*	*	NS	NS	**	*	NS			

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

La dieta suministrada a las cabras durante 5 semanas no ocasionó diferencias en el contenido en fenoles totales ni capacidad antioxidante medida con DPPH. Como se ha podido ver en la **Tabla 1**, la dieta con brócoli fue la que tenía un mayor contenido en TPC y, por tanto, el lote 1 el que potencialmente podría contener mayor cantidad de TPC y mayor capacidad antioxidante, pero comprobamos por los resultados que no ha tenido efecto alguno en estos parámetros. Al igual que en el periodo pre-experimental, los compuestos fenólicos totales (TPC) aumentaron con la fermentación, posiblemente por otro tipo de compuestos que interactúan también con el reactivo de Folin-Ciocalteu utilizado para la cuantificación de los TPC (Castro-Alves y Cordenunsi, 2015). Dicho aumento fue superior para el cultivo MA400 (aumento de entre 48,38 y 39,82 unidades) que para el cultivo YO-MIX™ (aumento de entre 18,27 y 33,50). Para ambos cultivos, los compuestos fenólicos totales no presentaron diferencias significativas con el almacenamiento. En el caso de la capacidad antioxidante, tanto DPPH como ABTS, los valores no mostraron ninguna variación relevante durante la fermentación y el almacenamiento, manteniéndose constantes durante todo el proceso.

En todos los casos, los parámetros TPC, DPPH y ABTS mostraron la misma tendencia que en el Control 0, mostrando que las ligeras diferencias que podemos encontrar entre lotes no se pueden asociar al cambio de alimentación. Por tanto, no se encontraron diferencias relevantes en los TPC ni en la actividad antioxidante de la leche y de leches fermentadas tras 5 semanas con inclusión de subproductos ensilados de brócoli y alcachofa.

#### 4.3.4. pH y recuentos microbiológicos en leches fermentadas tras 5 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 11** se muestran los valores medios de las medidas de pH y del recuento microbiológico en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes sometido a dietas diferenciadas durante 5 semanas. Para ambos parámetros se siguió la misma tendencia vista en el Control 0, indicando que las diferencias observadas entre lotes y días no fueron resultado del efecto del cambio de alimentación, al menos, tras las 5 primeras semanas. El recuento de YO-MIX™, tanto en M17 como en MRS, se mantuvo invariable con el tiempo, sin mostrar diferencias entre lotes. El recuento de MA400 presentó una disminución (máximo 1 unidad), sin presentar diferencias significativas entre lotes. Dicha disminución podría ser debida al efecto del almacenamiento y de la refrigeración. El pH no mostró diferencias relevantes con el tiempo, disminuyendo hasta 0,57 unidades en el caso del YO-MIX™ y manteniéndose constante en el caso del MA400, al tratarse de una mezcla de cepas con menor capacidad acidificante.

**Tabla 11.** Valores medios y su desviación estándar de las medidas de pH y de los recuentos microbiológicos (M17 y MRS), en log<sub>10</sub> cfu/g, de las muestras de leche y leches fermentadas del control 1 (5 semanas de dieta diferenciada), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a	YO-MIX™						NS M17	NS MRS	NS pH
	2			30					
	M17	MRS	pH	M17	MRS	pH			
Lote 1	8.98 ± 0.04 <sup>aA</sup>	4.08 ± 0.07 <sup>aA</sup>	4.71 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.99 ± 0.03 <sup>aA</sup>	4.07 ± 0.10 <sup>aA</sup>	4.36 ± 0.04 <sup>aB</sup>	NS	NS	***
Lote 2	8.99 ± 0.00 <sup>aA</sup>	4.07 ± 0.07 <sup>aA</sup>	4.63 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.92 ± 0.06 <sup>aB</sup>	4.29 ± 0.13 <sup>aA</sup>	4.34 ± 0.02 <sup>aB</sup>	NS	NS	***
Lote 3	8.84 ± 0.01 <sup>bA</sup>	3.87 ± 0.19 <sup>aA</sup>	4.84 ± 0.01 <sup>cA</sup>	8.87 ± 0.08 <sup>bA</sup>	3.59 ± 0.01 <sup>bB</sup>	4.27 ± 0.01 <sup>bB</sup>	NS	*	***
NS	**	NS	***	*	**	**			

b	MA400				NS M17	NS pH
	2		30			
	M17	pH	M17	pH		
Lote 1	9.29 ± 0.02 <sup>aA</sup>	4.13 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.29 ± 0.03 <sup>aB</sup>	4.15 ± 0.01 <sup>aA</sup>	***	NS
Lote 2	9.38 ± 0.03 <sup>aA</sup>	4.13 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.59 ± 0.04 <sup>aB</sup>	4.17 ± 0.03 <sup>aB</sup>	***	*
Lote 3	9.35 ± 0.01 <sup>aA</sup>	4.14 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.58 ± 0.05 <sup>aB</sup>	4.13 ± 0.04 <sup>aA</sup>	***	NS
NS	NS	NS	***	NS		

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

#### 4.4. Leches y leches fermentadas obtenidas de leche procedente de animales con dietas diferenciadas (Lote 1: brócoli, Lote 2: planta de alcachofa y Lote 3: dieta convencional) durante 10 semanas.

En este segundo control las cabras llevaban 10 semanas bajo dietas diferentes: 1) con 40% de subproducto de brócoli, 2) con 40% de subproducto de alcachofa y 3) en la misma dieta convencional. Nuestro objetivo fue ver si el mantenimiento de 10 semanas en estas dietas ocasiona diferencias en los parámetros estudiados.



#### 4.4.1. Valores medios de los parámetros del color (a\*, b\* y L\*) de leche y leches fermentadas tras 10 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 12** se observa la evolución de los valores de los parámetros del color (a\*, b\* y L\*) en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes alimentados durante 10 semanas con diferentes dietas (Lote 1: brócoli, Lote 2: planta de alcachofa y Lote 3: dieta convencional). En todos los casos, los parámetros b\* (más amarillo) y L\* (más blanco) aumentaron a causa de la fermentación, hasta 1,05 unidades y hasta 6,56 unidades, respectivamente; pero se mantuvieron constantes durante el almacenamiento, mientras que el valor de a\* se mantuvo invariable en todos los lotes de animales y para ambos cultivos comerciales mixtos. Tales resultados mostraron la misma tendencia que los Controles 0 y 1, indicando que las ligeras diferencias que podemos encontrar entre lotes no se pueden asociar al cambio de alimentación. Por tanto, no se encontraron diferencias relevantes en los parámetros del color de la leche y de leches fermentadas tras 10 semanas con dietas diferenciadas.

**Tabla 12.** Valores medios y su desviación estándar de las variables del color (a\*, b\* y L\*) de las muestras de leche y leches fermentadas del control 2 (10 semanas de dietas diferenciadas), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b) a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

Días	YO-MIX™									NS a	NS b	NS L
	0			2			30					
	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*			
Lote 1	-1.39 ± 0.02 <sup>aA</sup>	5.45 ± 0.01 <sup>BA</sup>	83.38 ± 0.56 <sup>BA</sup>	-1.84 ± 0.02 <sup>AB</sup>	5.72 ± 0.13 <sup>BB</sup>	84.60 ± 0.36 <sup>BB</sup>	-1.82 ± 0.01 <sup>AB</sup>	5.47 ± 0.06 <sup>BA</sup>	84.94 ± 0.45 <sup>BB</sup>	***	***	***
Lote 2	-1.54 ± 0.01 <sup>BA</sup>	4.96 ± 0.06 <sup>BA</sup>	80.01 ± 0.72 <sup>BA</sup>	-1.37 ± 0.01 <sup>BB</sup>	5.41 ± 0.04 <sup>BB</sup>	86.57 ± 0.43 <sup>BB</sup>	-1.44 ± 0.01 <sup>BC</sup>	5.61 ± 0.01 <sup>BC</sup>	87.12 ± 0.37 <sup>BB</sup>	***	***	***
Lote 3	-1.57 ± 0.02 <sup>CA</sup>	5.79 ± 0.03 <sup>CA</sup>	80.51 ± 0.70 <sup>BA</sup>	-1.52 ± 0.01 <sup>CB</sup>	5.97 ± 0.06 <sup>CB</sup>	86.64 ± 0.53 <sup>BB</sup>	-1.59 ± 0.02 <sup>CC</sup>	5.86 ± 0.09 <sup>CB</sup>	86.41 ± 0.59 <sup>CB</sup>	**	*	***
NS	**	***	***	***	***	***	***	***	*			
Días	MA400									NS a	NS b	NS L
	0			2			30					
	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*			
Lote 1	-1.39 ± 0.02 <sup>aA</sup>	5.45 ± 0.01 <sup>BA</sup>	83.38 ± 0.56 <sup>BA</sup>	-1.40 ± 0.02 <sup>aA</sup>	6.50 ± 0.02 <sup>bB</sup>	87.22 ± 0.25 <sup>bB</sup>	-1.41 ± 0.03 <sup>aA</sup>	6.66 ± 0.02 <sup>bC</sup>	87.62 ± 0.45 <sup>bB</sup>	NS	***	***
Lote 2	-1.54 ± 0.01 <sup>BA</sup>	4.96 ± 0.06 <sup>BA</sup>	80.01 ± 0.72 <sup>BA</sup>	-1.50 ± 0.01 <sup>BB</sup>	5.36 ± 0.02 <sup>BB</sup>	85.90 ± 0.45 <sup>BB</sup>	-1.63 ± 0.01 <sup>BC</sup>	5.97 ± 0.05 <sup>BC</sup>	83.99 ± 0.40 <sup>BC</sup>	***	***	***
Lote 3	-1.57 ± 0.02 <sup>CA</sup>	5.79 ± 0.03 <sup>CA</sup>	80.51 ± 0.70 <sup>BA</sup>	-1.35 ± 0.02 <sup>CB</sup>	6.12 ± 0.39 <sup>BB</sup>	86.02 ± 0.23 <sup>BB</sup>	-1.34 ± 0.01 <sup>CB</sup>	6.12 ± 0.06 <sup>CB</sup>	87.18 ± 0.52 <sup>BC</sup>	***	***	***
NS	**	***	***	***	***	***	***	***	***			

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

#### 4.4.2. Valores medios de la composición (%): proteínas (PT), grasa (G) y sólidos totales (ST) de leche y leches fermentadas tras 10 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 13** se observa la evolución de los valores de los parámetros de la composición (grasa, proteínas y sólidos totales) en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino alimentados con tres subproductos ensilados durante 10 semanas. En todos los casos, los tres parámetros se mantuvieron dentro del rango considerado como normal en la composición de la leche de cabra (Amiot *et al.*, 1991; Muelas *et al.*, 2017), al igual que ocurrió en los Controles 0 y 1. Si bien se detectaron diferencias significativas en

contenido graso y sólidos totales entre los lotes, estas diferencias fueron pequeñas desde el punto de vista cuantitativo (0,3 unidades). Por tanto, no se encontraron diferencias relevantes en la composición de leches fermentadas obtenidas de leche tras 10 semanas con incorporación de subproductos ensilados.

**Tabla 13.** Valores medios y su desviación estándar de las variables de la composición (G: grasa, PT: proteínas y ST: sólidos totales expresados en porcentaje de composición de la leche) de las muestras de leche y leches fermentadas del control 2 (10 semanas de dietas diferenciadas), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y

a		YO-MIX™									NS G	NS PT	NS ST
Días	0			2			30						
Variable	G	PT	ST	G	PT	ST	G	PT	ST				
Lote 1	5.48 ± 0.01 <sup>aA</sup>	3.32 ± 0.01 <sup>aA</sup>	14.33 ± 0.03 <sup>aA</sup>	6.08 ± 0.04 <sup>bB</sup>	3.44 ± 0.03 <sup>bB</sup>	14.57 ± 0.01 <sup>aB</sup>	6.54 ± 0.01 <sup>aC</sup>	3.26 ± 0.02 <sup>aC</sup>	14.76 ± 0.03 <sup>aC</sup>	***	**	***	
Lote 2	4.94 ± 0.02 <sup>bA</sup>	3.29 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.74 ± 0.01 <sup>bA</sup>	6.06 ± 0.04 <sup>bB</sup>	3.42 ± 0.01 <sup>bB</sup>	14.64 ± 0.03 <sup>bB</sup>	6.39 ± 0.01 <sup>bC</sup>	3.26 ± 0.02 <sup>aA</sup>	14.88 ± 0.03 <sup>bC</sup>	***	***	***	
Lote 3	5.14 ± 0.03 <sup>cA</sup>	3.49 ± 0.01 <sup>bA</sup>	14.14 ± 0.02 <sup>cA</sup>	6.14 ± 0.03 <sup>bB</sup>	3.44 ± 0.01 <sup>aB</sup>	14.54 ± 0.03 <sup>aB</sup>	6.22 ± 0.04 <sup>cc</sup>	3.26 ± 0.03 <sup>aB</sup>	14.59 ± 0.01 <sup>cc</sup>	***	*	***	
NS	***	***	***	**	NS	*	***	NS	***				

b		MA400									NS G	NS PT	NS ST
Días	0			2			30						
Variable	G	PT	ST	G	PT	ST	G	PT	ST				
Lote 1	5.48 ± 0.01 <sup>aA</sup>	3.32 ± 0.01 <sup>aA</sup>	14.33 ± 0.03 <sup>aA</sup>	6.03 ± 0.01 <sup>aB</sup>	3.25 ± 0.01 <sup>aB</sup>	14.05 ± 0.04 <sup>aB</sup>	6.79 ± 0.01 <sup>aC</sup>	3.16 ± 0.02 <sup>aC</sup>	14.89 ± 0.01 <sup>aC</sup>	***	**	***	
Lote 2	4.94 ± 0.02 <sup>bA</sup>	3.29 ± 0.01 <sup>aA</sup>	13.74 ± 0.01 <sup>bA</sup>	5.24 ± 0.02 <sup>bB</sup>	3.26 ± 0.02 <sup>aA</sup>	12.79 ± 0.01 <sup>bB</sup>	5.99 ± 0.01 <sup>bC</sup>	3.21 ± 0.04 <sup>bB</sup>	13.93 ± 0.01 <sup>bC</sup>	***	*	***	
Lote 3	5.14 ± 0.03 <sup>cA</sup>	3.49 ± 0.01 <sup>bA</sup>	14.14 ± 0.02 <sup>cA</sup>	5.98 ± 0.03 <sup>cB</sup>	3.47 ± 0.01 <sup>bA</sup>	13.96 ± 0.01 <sup>cB</sup>	6.48 ± 0.04 <sup>cc</sup>	3.33 ± 0.01 <sup>cB</sup>	14.63 ± 0.01 <sup>bC</sup>	***	***	***	
NS	***	***	***	*	***	**	***	*	***				

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

#### 4.4.3. Valores medios de los compuestos fenólicos (TPC), y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en leche y leches fermentadas tras 10 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 14** se muestran los valores medios de la cantidad de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino de tres lotes diferentes alimentados 10 semanas con subproductos ensilados de brócoli y alcachofa.

**Tabla 14.** Valores medios y su desviación estándar de las variables de los compuestos fenólicos totales (TPC) (mg EAG/L de muestra) y la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) (mM de TROLOX/L de muestra) las muestras de leche y leches fermentadas del control 2 (10 semanas de alimentación diferenciada), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

a		YO-MIX™									NS TPC	NS DPPH	NS ABTS
Días	0			2			30						
Variable	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS				
Lote 1	50.83 ± 0.96 <sup>aA</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>aA</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>aA</sup>	64.15 ± 14.13 <sup>aA</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>aA</sup>	0.01 ± 0.05 <sup>aB</sup>	74.53 ± 5.43 <sup>aA</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>aA</sup>	0.02 ± 0.05 <sup>aB</sup>	NS	NS	***	
Lote 2	58.26 ± 2.13 <sup>aA</sup>	0.47 ± 0.08 <sup>aA</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>abA</sup>	79.50 ± 11.99 <sup>aA</sup>	0.51 ± 0.15 <sup>aA</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>bB</sup>	70.15 ± 8.79 <sup>aA</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>abA</sup>	0.09 ± 0.10 <sup>abB</sup>	NS	NS	***	
Lote 3	62.63 ± 6.68 <sup>aA</sup>	0.65 ± 0.08 <sup>aA</sup>	0.34 ± 0.08 <sup>bA</sup>	63.53 ± 12.68 <sup>aA</sup>	0.25 ± 0.32 <sup>aB</sup>	0.04 ± 0.04 <sup>abB</sup>	49.27 ± 15.48 <sup>aA</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>bB</sup>	0.01 ± 0.11 <sup>bC</sup>	NS	**	*	
NS	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	*	*				



Días	MA400									NS TPC	NS DPPH	NS ABTS
	0			2			30					
	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS	TPC	DPPH	ABTS			
Lote 1	50.83 ± 0.96 <sup>aA</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>aA</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>aA</sup>	61.12 ± 8.33 <sup>aB</sup>	0.35 ± 0.26 <sup>aA</sup>	0.04 ± 0.05 <sup>aB</sup>	88.51 ± 31.54 <sup>aB</sup>	0.54 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>aB</sup>	*	NS	***
Lote 2	58.26 ± 2.13 <sup>aA</sup>	0.47 ± 0.08 <sup>aA</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>aB</sup>	62.51 ± 8.62 <sup>aA</sup>	0.93 ± 0.09 <sup>bB</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>aB</sup>	73.33 ± 8.56 <sup>aA</sup>	0.85 ± 0.13 <sup>bB</sup>	0.10 ± 0.04 <sup>bB</sup>	NS	**	***
Lote 3	62.63 ± 6.68 <sup>aA</sup>	0.65 ± 0.08 <sup>aB</sup>	0.34 ± 0.08 <sup>aA</sup>	51.06 ± 2.81 <sup>aA</sup>	0.55 ± 0.21 <sup>aB</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>aB</sup>	66.72 ± 25.86 <sup>aA</sup>	0.86 ± 0.05 <sup>aA</sup>	0.07 ± 0.10 <sup>aB</sup>	NS	*	***
NS	NS	NS	*	NS	**	NS	NS	*	*			

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

No se encontraron diferencias significativas en los TPC ni en la actividad antioxidante de la leche y de leches fermentadas tras 10 semanas con inclusión de subproductos ensilados de brócoli y alcachofa. En todos los casos, los compuestos fenólicos totales (TPC) aumentaron con la fermentación y con el almacenamiento. Dicho aumento fue superior para el cultivo YO-MIX™ (aumento de entre 21,24 y 0,90 unidades) que para el cultivo YO-MIX™ (aumento de entre 4,25 y 10,29). Sin embargo, tales diferencias, al igual que las diferencias encontradas entre los distintos lotes mostraron no ser significativas, por lo que el aumento no se debió a la dieta, sino a que, al igual que en los Controles 0 y 1, durante la fermentación se podrían estar produciendo otro tipo de compuestos que interactúen también con el reactivo de Folin-Ciocalteu utilizado para la cuantificación de los TPC (Castro-Alves y Cordenunsi, 2015). En el caso de la capacidad antioxidante, tanto DPPH como ABTS, se evidenció un descenso general con la fermentación y el tiempo de almacenamiento. Esta modificación en la tendencia observada en los controles anteriores requiere más estudios que se llevarán a cabo en el futuro.

#### 4.4.4. pH y recuento microbiológico en leches fermentadas tras 10 semanas de dieta diferenciada

En la **Tabla 15** se muestran los valores medios de las medidas de pH y del recuento microbiológico en leche y leche fermentada con dos tipos de cultivos mixtos (YO-MIX™: a y MA400: b) de ganado caprino alimentado con ensilados de brócoli y alcachofa. Para ambos parámetros se siguió la misma tendencia vista en los Controles 0 y 1, indicando que las diferencias observadas entre lotes y días no fueron resultado del efecto del cambio de alimentación mantenidas durante 10 semanas.

**Tabla 15.** Valores medios y su desviación estándar de las medidas de pH y de los recuentos microbiológicos (M17 y MRS), en log<sub>10</sub> cfu/g, de las muestras de leche y leches fermentadas del control 2 (10 semanas con dieta diferenciada), según el tipo de alimentación (Lote 1: brócoli; Lote 2: planta de alcachofa; Lote 3: dieta convencional) para el cultivo mixto YO-MIX™ (a) y para cultivo con MA400 (b), a diferentes tiempos de fermentación (0, 2 y 30 días).

Días	YO-MIX™						NS M17	NS MRS	NS pH
	2			30					
	M17	MRS	pH	M17	MRS	pH			
Lote 1	9.02 ± 0.02 <sup>aA</sup>	4.18 ± 0.10 <sup>aA</sup>	4.33 ± 0.04 <sup>aA</sup>	9.01 ± 0.02 <sup>aA</sup>	4.60 ± 0.04 <sup>aB</sup>	4.32 ± 0.03 <sup>aA</sup>	NS	**	NS
Lote 2	9.19 ± 0.14 <sup>aA</sup>	4.33 ± 0.07 <sup>aA</sup>	4.43 ± 0.06 <sup>aA</sup>	8.34 ± 0.06 <sup>bB</sup>	4.86 ± 0.04 <sup>bB</sup>	4.19 ± 0.01 <sup>bB</sup>	***	**	***
Lote 3	9.03 ± 0.01 <sup>bA</sup>	4.16 ± 0.06 <sup>aA</sup>	4.53 ± 0.04 <sup>aA</sup>	8.78 ± 0.06 <sup>bB</sup>	4.09 ± 0.05 <sup>aA</sup>	4.36 ± 0.02 <sup>bB</sup>	**	NS	***
NS	*	NS	*	**	*	**			

<i>b</i>	MA400				NS M17	NS pH
Días	2		30			
Variable	M17	pH	M17	pH		
Lote 1	8.67 ± 0.01 <sup>aA</sup>	4.05 ± 0.04 <sup>aA</sup>	7.93 ± 0.01 <sup>abB</sup>	4.02 ± 0.03 <sup>aA</sup>	***	NS
Lote 2	8.64 ± 0.15 <sup>aA</sup>	4.12 ± 0.01 <sup>aA</sup>	8.04 ± 0.08 <sup>abB</sup>	4.11 ± 0.00 <sup>bA</sup>	***	NS
Lote 3	8.86 ± 0.06 <sup>bA</sup>	4.25 ± 0.06 <sup>bA</sup>	7.79 ± 0.09 <sup>abB</sup>	4.03 ± 0.01 <sup>abB</sup>	***	***
NS	*	*	*	*		

Los valores con un superíndice con letra mayúscula distinta presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Los valores con un superíndice con letra minúscula distinta en la misma columna presentan diferencias significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).



## 5. Conclusiones

Respecto al método para la determinación de fenoles en leche de cabra Murciano-Granadina:

- La extracción con metanol acidificado durante 1 hora a 30°C es un método rápido y de alta reproducibilidad para la determinación de fenoles totales en leche.

Tras el estudio de los parámetros evaluados en muestras de leche y leche fermentada de ganado caprino Murciano-Granadino alimentado con un 40% de inclusión de subproducto de brócoli y alcachofa hasta un total de 10 semanas podemos concluir que:

- La inclusión de hasta un 40% de subproductos de ensilado de brócoli y de planta de alcachofa mantenidas durante 10 semanas no ocasiona diferencias relevantes en la composición, en la aptitud de la leche a la fermentación, en el contenido en fenoles totales, ni en la capacidad antioxidante.
- A pesar de que la dieta con un 40% de subproductos de brócoli posee un contenido en fenoles totales de unos 5 g/Kg y es un 45% superior a las dietas convencional y con alcachofa, no hay un mayor contenido en fenoles en leche ni un aumento de la capacidad antioxidante a estos niveles de fenoles en dieta.
- Se observan pequeñas diferencias en el contenido graso entre lotes de animales (periodo pre-experimental) por lo que en un futuro sería conveniente introducir esta covariable para el análisis de datos.
- El proceso de fermentación de la leche de cabra modifica los parámetros de color aumentando los valores de L\* y b\* y produce un aumento de las sustancias reactivas con el reactivo de Folin-Ciocalteu de modo de aumenta el valor obtenido en la cuantificación de fenoles totales.
- A nivel práctico, para la determinación del color en muestras de leche de cabra no es conveniente conservar la leche a -20°C porque aumenta la variabilidad de las mediciones.

## 4. Referencias bibliográficas

- Amiot, J. (1991) Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia. España.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. y Çapanoglu (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 997-1027.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. y Çapanoglu (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT) and Lipid Peroxidation Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 1028-1045.
- Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity. *Pure Appl. Chem.* 85, 957-998.
- Araujo, R.C.; Pires, A.V.; Susin, I.; Mendes, C.Q.; Rodrigues, G.H.; Packer, I.U.; Eastridge, M.L. (2008). Milk yield, milk composition, eating behavior, and lamb performance of ewes fed diets containing soybean hulls replacing coastcross (cynodon species) hay12. *J. Anim. Sci.* 86, 3511-3521.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E. y B. Guamis, B. (2001). Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goats' milk cheese (*Mató*). *International Dairy Journal*. 11: 165-173.
- Castro-Alves, V.C. y Cordenunsi, B.R. (2015). Total Soluble Phenolic Compounds Quantification Is Not As Simple As It Seems. *Food. Anal. Methods*. 8:973-884.
- CECT (2018). Colección Española de Cultivos Tipo, Vol. 2018 Universidad de Valencia Official National Culture Type Collection.
- Cifras de población a 1 de julio de 2017 del instituto Nacional de Estadística.
- Chávez-Servín, J. L., Andrade-Montemayor, H. M., Vázquez, C. V., Barreyro, A. A., García-Gasca, T., Martínez, F. R. A., Ramírez, O. A. M. y de la Torre-Carbot, K. (2018). Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Research*, 160, 54-58.
- Chiofalo, B.; Liotta, L.; Zumbo, A.; Chiofalo, V. (2004). Administration of olive cake for ewe feeding: Effect on milk yield and composition. *Small Rumin. Res.* 55, 169-176.
- Costa, M. P., Frasco, B. S., Silva, A. C. O., Freitas, M. Q., Robson M. Franco, R. M. y Conte-Junior C. A. (2015). Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. 98: 5995-6003.
- Curadi, M., Picciarelli, P., Lorenzi, R., Graifenberg, A. y Ceccarelli, N. (2005). Antioxidant activity and phenolic compounds in the edible parts of early and late Italian artichoke (*Cynara scolymus* L.) varieties. *Italian Journal of Food Science*, 17, 33-44.

- D'Antuono, I., Carola, A., Sena, L. M., Linsalata, V., Cardinali, A., Logrieco, A. F., Colucci, M. G. y Apone, F. (2018). Artichoke Polyphenols Produce Skin Anti-Age Effects by Improving Endothelial Cell Integrity and Functionality. *Molecules*. 23, 11, 2729.
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., Emilio Alvarez-Parrilla, E. (2019). Chapter 12 - Phenolic Compounds, Editor(s): Elhadi M. Yahia. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Woodhead Publishing. 253-271.
- Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., and Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J. Nutr.*, 130:2733–2738.
- Domínguez-Perles, R., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., García-Viguera, C. and Moreno, D. A. (2010), Broccoli-Derived By-Products—A Promising Source of Bioactive Ingredients. *Journal of Food Science*, 75: C383-C392
- García-Pérez, F.J., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas, E., Pérez-Álvarez, J.A. y Sendra, E. (2005). Effect of Orange Fiber Addition on Yogurt Color During Fermentation and Color Storage. *Industrial Applications*.30 (6) 457-463.
- Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., Van Acker, F. A. A., Van Der Vijgh, W., and Bast, A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. in Vitro*, 15:3–6.
- Hilario, M. C., Puga, C. D., Ocaña, A. N. y Romo F. P. (2009). Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*. 77, 20-26.
- Jöbstl, E., Howse, J. R., Fairclough, J. P. A.; Williamson, M. P. (2006). Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 4077–4081.
- Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H. y Turkoglu H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT-Food Science and Technology*. 44, 1065-1072.
- Kholif, A.E.; Morsy, T.A.; Gouda, G.A.; Anele, U.Y.; Galyean, M.L. (2016) Effect of feeding diets with processed moringa oleifera meal as protein source in lactating anglo-nubian goats. *Anim. Feed Sci. Technol*. 217, 45–55.
- Kim, D., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. y Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51: 6509-6515
- Koleva, I. I.; Niederländer, H. A.; van Beek, T.A. (2001). Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal. Chem*. 73, 3373–3381.
- Lattanzio, V., A. Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*. 1(2): 132-144.
- Li, C., Song, J., Kwok, L. Y., Wang, J., Dong, Y., Yu, H., et al. (2017). Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage. *Journal of Dairy Science*. 100(4), 2512–2525.
- Li, W., Hosseinian, F. S., Tsopmo, A., Friel, J. K. y Trust Beta, T. (2009). Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Basic Nutritional Investigation*. 25, 105-114

- Liu, M., Zhang, L., Ser, S.L., Cumming, J.R., Ku, K.-M. (2018). Comparative phytonutrient analysis of broccoli by-products: The potentials for broccoli by-product utilization. *Molecules*. 23 (4), art. no. 900.
- Lourens-Hatting, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* 11, 1–17.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 234, 279–293.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Rep.* 2, 161–171.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>•+</sup> radical cation assay. *Free Radical Res.* 26, 195–199.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407–412.
- Miniati E. (2007). Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Annali dell'Instituto superiore di sanita.* 362-365.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España (2018). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos: [https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/boletin2018\\_tcm30-504212.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/boletin2018_tcm30-504212.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España (2017). Superficies y producciones de cultivos. Hortalizas de flor-alcachofa.: [https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07\\_6.31.2.pdf](https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07_6.31.2.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España (2017). Superficies y producciones de cultivos. Hortalizas de flor-brocoli: [https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07\\_6.32.3.pdf](https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07_6.32.3.pdf)
- Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH<sup>•</sup> assay: a critical review and results. *Food Chem.* 130, 1036–1043.
- Mouro, G.F.; Branco, A.F.; de Macedo, F.A.F.; Rigolon, L.P.; Maia, F.J.; Guimarães, K.C.; Damasceno, J.C.; dos Santos, G.T. (2002). Substituição do milho pela farinha de mandioca de varredura em dietas de cabras em lactação: Produção e composição do leite e digestibilidade dos nutrientes. *Rev. Bras. Zootec.* 31, 475–483
- Muelas, R., Martí de Olives, A., Romero, G., Díaz, J.R., Sayas-Barberá, M.E. y Sendra, E. (2018). Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters. *LWT- Food Science and Technology.* 98, 506-514.
- Muelas, R., Monllor, P., Romero, G., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Díaz, J. R. y Sendra, E. (2017). Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By-Products Silages in the Diet of Dairy Goats. *Foods.* 6, 112.

- Needs E, Capellas M, Bland P, Manoj P, McDougal D, Paul G (2000). Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yogurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. *J Dairy Res*; 67:329–348.
- Nudda, A.; Battacone, G.; Usai, M.G.; Fancellu, S.; Pulina, G. (2006). Supplementation with extruded linseed cake affects concentrations of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in goat milk. *Journal of Dairy Science*. 89, 277–282.
- Park, H., Lee, M., Kim, K., Park, E. and Paik, H. (2018). Antioxidant and antigenotoxic effect of dairy products supplemented with red ginseng extract. *International Journal of Dairy Science*. 101, 8702-8710.
- Pasqualone, A., Punzi, R., Trani, A., Summo, C., Paradiso, V. M., Caponio, F. and Gambacorta, G. (2017), Enrichment of fresh pasta with antioxidant extracts obtained from artichoke canning by-products by ultrasound-assisted technology and quality characterisation of the end product. *Int J Food Sci Technol*, 52: 2078-2087
- Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133, 2812–2819.
- Porras-Loaiza, A. P., López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 3. 1: 121-134.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.
- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., *et al.* (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*. 101(8), 6715–6729.
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D. y Everett D. W. (2013). Effects of catechin on the phenolic content and antioxidant properties of low-fat cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. 48, 2448-2455.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Papaganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 4:152–159.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20:933–956.
- Shahidi, F. Y Nacz, M. (1995). *Food Phenolics Sources, Chemistry, Effects, Applications*. *Tochnomic Publishing Co.* EEUU. 106 p.
- Shi, M., Hlaing, M. M., Ying, D., Ye, J., Sanguansri, L. and Augustin, M. A. (2019), New food ingredients from broccoli by-products: physical, chemical and technological properties. *Int J Food Sci Technol*, 54: 1423-1432.
- Todaro, M.; Alabiso, M.; Scatassa, M.L.; Di Grigoli, A.; Mazza, F.; Maniaci, G.; Bonanno, A. (2017). Effect of the inclusion of fresh lemon pulp in the diet of lactating ewes on the properties of milk and cheese. *Anim. Feed Sci. Technol.* 225, 213–223.

- Trigueros, L., Wojdylo, A. y Sendra, E. (2014). Antioxidant Activity and Protein–Polyphenol Interactions in a Pomegranate (*Punica granatum* L.) Yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Ullah R., Nadeem M., Imran M., Khan, I. T., Shahbaz, M., Mahmud, A. y Tayyab, M. (2018). Omega fatty acids, phenolic compounds, and lipolysis of cheddar cheese supplemented with chia (*Salvia hispanica* L.) oil. *Journal of Food Processing and Preservation*. 42:13566.
- Vargas, M., Cháfer, M., Albors, A., Chiralt, A. y González-Martínez, C. (2008). Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *International Dairy Journal*. 18: 1146-1152
- Velázquez-Vázquez, C., Villa-Rojas, M. G., Alvarez-Ramírez, C., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T., Ferriz-Martínez, R. A., García, O. P., Andrade-Montemayor, H. M., de la Torre-Carbot, K. (2015). Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chemistry*. 176, 480-486.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., and García-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta*, 538:391–398.
- Volf, I., Ioana, I., Neamțu, M. y Popa, V. (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*. 68
- Wojdylo, A., Nowicka, P., Bąbelewski, P. (2018). Phenolic and carotenoid profile of new goji cultivars and their anti-hyperglycemic, anti-aging and antioxidant properties. *Journal of Functional Foods*. 48, 632-642.
- Wojdylo, A., Samoticha, J., Nowicka, P., Chmielewska, J. (2018). Characterisation of (poly)phenolic constituents of two interspecific red hybrids of Rondo and Regent (*Vitis vinifera*) by LC–PDA–ESI-MS QToF. *Food chemistry*. 239, 94-101.
- Yadav, K., Bajaj, R. K., Mandal, S., Saha, P. y Mann, B. (2018). Evaluation of total phenol content and antioxidant properties of encapsulated grape seed extract in yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. 71, 96-104.
- Yuksel, Z., Avci, E., Erdem, Y. K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry*. 121, 450–456.