



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

Escuela Politécnica Superior de

Orihuela

Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías
Agrarias, Agroambientales y
Alimentarias



TESIS DOCTORAL

RAQUEL MUELAS DOMINGO

Efecto de la inclusión de ensilados de planta
y subproducto de alcachofa (*Cynara
scolymus L.*) y subproducto de brócoli
(*Brassica oleracea var. Italica*) en la ración
de cabras Murciano-Granadinas sobre las
características de leches fermentadas

Directora: ESTHER SENDRA NADAL

Co-director: JOSÉ RAMÓN DÍAZ SÁNCHEZ



2023



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE
Escuela Politécnica Superior de
Orihuela
Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías
Agrarias, Agroambientales y
Alimentarias



TESIS DOCTORAL

Efecto de la inclusión de ensilados de planta y subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y subproducto de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) en la ración de cabras Murciano-Granadinas sobre las características de leches fermentadas



TESIS DOCTORAL presentada por Raquel Muelas Domingo

Directora: Esther Sendra Nadal

Co-director: José Ramón Díaz Sánchez

2023

Dña. Esther Sendra Nadal, Dra. en Veterinaria y Catedrática de la Universidad Miguel Hernández de Elche y

D. José Ramón Díaz Sánchez, Dr. en Ingeniería Agrónoma y Catedrático de Universidad de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Efecto de la inclusión de ensilados de planta y subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y subproducto de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) en la ración de cabras Murciano-Granadinas sobre las características de leches fermentadas”** de la que es autora la licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, **Dña. Raquel Muelas Domingo**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Dña Esther Sendra Nadal** y la codirección del **Dr. D. José Ramón Díaz Sánchez** y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado.

Firmado:

Dra. Dña. Esther Sendra Nadal

Dr. D. José Ramón Díaz Sánchez

Dra. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Efecto de la inclusión de ensilados de planta y subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y subproducto de brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica) en la ración de cabras Murciano-Granadinas sobre las características de leches fermentadas”** de la que es autora la licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, **Dña. Raquel Muelas Domingo**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Dña. Esther Sendra Nadal** y la codirección del **Dr. D. José Ramón Díaz Sánchez**, actuando como tutora de la misma la **Dra. Dña María Estrella Sayas Barbera**. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado.

Dra. Dña. Juana Fernández López Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA

Esta Tesis Doctoral, titulada “Efecto de la inclusión de ensilados de planta y subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y subproducto de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) en la ración de cabras Murciano-Granadinas sobre las características de leches fermentadas”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

Publicación 1

Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters

Autores: R. Muelas, A. Martí de Olives, G. Romero, J.R. Díaz, M.E. Sayas-Barberá, E. Sendra

Revista	LWT - Food Science and Technology 98 (506-514)
doi	10.1016/j.lwt.2018.09.005
Editorial	ScienceDirect® Elsevier B.V.
ISSN	Print ISSN: 0023-6438 Online ISSN: 1096-1127
Categoría de JCR	Food Science and Technology
Cuartil	Q1
Rango	23/135
Factor de impacto (2018)	4,07
Fecha de publicación	6 de septiembre de 2018

Publicación 2

Quality and Functional Parameters of Fermented Milk Obtained from Goat Milk Fed with Broccoli and Artichoke Plant By-Products

Autores: Raquel Muelas, Gema Romero, José Ramón Díaz, Paula Monllor, Juana Fernández-López, Manuel Viuda-Martos, Marina Cano-Lamadrid y Esther Sendra

Revista	Foods, 11, 2601
doi	10.3390/foods11172601
Editorial	Multidisciplinary Digital Publishing Institute MDPI
ISSN	2304-8158
Categoría de JCR	Food Science and Technology
Cuartil	Q1
Rango	35/144
Factor de impacto (2018)	5,8
Fecha de publicación	27 de agosto de 2022

Otras publicaciones

Publicación 3. *En revista no indexada*

Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By Products Silages in the Diet of Dairy Goats

Autores: Raquel Muelas, Paula Monllor, Gema Romero, Estrella Sayas-Barberá,
Casilda Navarro, José Ramón Díaz y Esther Sendra

Revista	Foods, 6, 12
doi	10.3390/foods6120112
Editorial	Multidisciplinary Digital Publishing Institute MDPI
ISSN	2304-8158
Categoría de JCR	Food Science and Technology
Cuartil	No incluida en JCR en 2017, entró en 2018 en Q2
Rango	
Factor de impacto (2017)	1,568
Fecha de publicación	18 de diciembre de 2017



Agradecimientos

A mis directores de Tesis, la Dra. Esther Sendra Nadal y el Dr. José Ramón Díaz por el apoyo en todos los sentidos para la culminación de esta Tesis Doctoral, muy querida y deseada por todos.

JR, por fin he terminado el documento de Tesis, después de tanto tiempo. POR FINNNNN.

Esther, documento terminado. Parecía imposible.

A mis chicas Gema, M^a Luz y M^a José. "CHICAS HE TERMINADO".

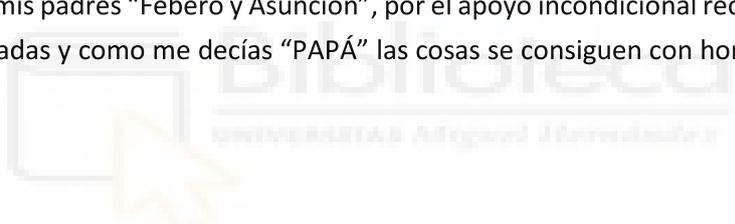
A mis compañeros de granja, Amparo, Alfonso y Elena, sin ellos una parte de la tesis sería imposible.

A Marina, Ana y Ángel por el granito de arena aportado en la tesis.

A Juana, Jose Ángel, Estrella, Casilda y Manolo por el apoyo en los últimos momentos.

Al resto de compañeros del Departamento de Tecnología Agroalimentaria: Emma, Mirian, Maria José, Maria, Alicia.....Esto es para todos pero la lista sería muy larga.....Gracias por los ánimos recibidos.

Y en especial a mis padres "Febero y Asunción", por el apoyo incondicional recibido en todas mis decisiones tomadas y como me decías "PAPÁ" las cosas se consiguen con honestidad, trabajo y constancia.



Esta tesis es para "TI PAPÁ".



Esta tesis ha sido posible gracias al apoyo de los proyectos de investigación GV/2015/033, de la Consellería d'Educació, Cultura i Esport. Direcció General d'Universitat, Estudis Superiors i Ciència de la Generalitat Valenciana y AGL2015-64518-R, del Ministerio de Economía y Competitividad.

Índice general

Listado de abreviaturas.....	1
Estructura de la tesis doctoral.....	4
Resumen.....	8
Abstract.....	10
1. Introducción	9
1.1 Producción de alcachofa y brócoli.....	9
1.1.1 Producción de alcachofa	9
1.1.2 Producción de brócoli.....	13
1.1.3 Subproductos de alcachofa y brócoli.	18
1.2. Subproductos agrícolas en la alimentación de rumiantes.	19
1.3. Uso de subproductos de cultivos leñosos	22
1.4. Subproductos de productos hortícolas	23
1.5. Subproductos de alcachofa y brócoli en alimentación de rumiantes.	24
1.6. La leche de cabra: producción y calidad.....	26
1.7. Leches fermentadas.....	32
2. Objetivos.....	35
3. Materiales y métodos.....	37
3.1. Antecedentes y organigrama del plan de investigación.....	37
3.2. Instalaciones	38
3.3. Diseño experimental.....	38
3.4. Recuperación de los cultivos liofilizados	42
3.5. Elaboración de leches fermentadas	43
3.6. Variables analizadas	43
3.6.1 Siembra y recuento total de bacterias ácido lácticas.....	43
3.6.2 Determinación del pH y acidez Dornic	44
3.6.3. Características tecnológicas de la leche.....	44
3.6.4. Determinación de color.....	45
3.6.5 Determinación de la composición química	45
3.6.6. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos	45
3.6.7. Perfil de ácidos grasos.....	46
3.6.8. Determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS y DPPH.....	46
3.6.9. Perfil de compuestos volátiles.....	47
3.6.10. Análisis sensorial en leche y leches fermentadas	47
3.6.11. Análisis estadísticos.....	48
4. Publicaciones.....	49
4.1. Publicación 1 (Publicado en revista no indexada)	49

4.2.	Publicación 2.....	63
4.3.	Publicación 3.....	92
5.	Resultados y discusión	122
5.1.	ARTÍCULO 1: Inclusión de ensilados de planta de alcachofa y subproducto de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas. Efecto en las propiedades tecnológicas de la leche.....	122
5.1.1	Composición química de la leche	122
5.1.2	Características tecnológicas de la leche	123
5.1.3	Color en la leche	124
5.1.4	Análisis sensorial de la leche y leche fermentada.....	124
5.2.	ARTÍCULO 2: Evaluación de bacterias ácido-lácticas para la fermentación de leche de cabra: parámetros de calidad.	125
5.2.1.	Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en las leches fermentadas	125
5.2.2.	Contenido de ácidos orgánicos y azúcares en las leches fermentadas.....	126
5.2.3.	Perfil de ácidos grasos en las leches fermentadas	127
5.2.4.	Perfil de compuestos volátiles.....	127
5.3.	ARTÍCULO 3: Calidad y parámetros funcionales de leches fermentadas elaboradas con leche de cabra alimentadas con ensilado de subproducto de brócoli y planta de alcachofa. .	131
5.3.1.	Viabilidad de los cultivos y pH en las leches fermentadas	132
5.3.2.	Composición química de la leche	133
5.3.3.	Composición química de las leches fermentadas	134
5.3.4.	Contenido de azúcares y ácido láctico en las leches fermentadas.	134
5.3.5.	Sinéresis y composición del suero.....	135
5.3.6.	Capacidad antioxidante y contenido total en compuestos fenólicos.	136
5.3.7.	Índices nutricionales/salud de ácidos grasos en la leche cruda.....	136
5.3.8.	Índices nutricionales/salud de ácidos grasos en leches fermentadas	137
5.3.9.	Perfil de compuestos volátiles en leches fermentadas	138
6.	Conclusiones.....	141
7.	Investigaciones futuras.....	143
8.	Referencias	145

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química, características nutritivas y procedencia de diversos subproductos frescos de uso en alimentación de rumiantes.....	21
Tabla 2. Condiciones óptimas y medios de cultivo para la reactivación e incubación de los cultivos iniciadores.....	41
Tabla 3. Perfil de compuestos volátiles y descriptores aromáticos en función de los distintos tipos de cultivos iniciadores.....	130



Índice de figuras

Figura 1. Planta de alcachofa.....	9
Figura 2. Producción de alcachofas por continentes y proporción (promedio 2010-2021).....	10
Figura 3. Producción de alcachofas por países y proporción (promedio 2010-2021).	10
Figura 4. Evolución de la producción y superficie cultivada de alcachofa en España.	11
Figura 5. Porcentaje de la producción de alcachofa que se destina a la industria transformadora.	11
Figura 6. Superficie y proporción de la superficie (promedio 2010-2020) de alcachofas por regiones.....	12
Figura 7. Producción y proporción de la producción (promedio 2010-2020) de alcachofas por regiones	12
Figura 8. Calendario de siembra, recolección y comercialización 2014-2016.....	13
Figura 9. Planta de brócoli cultivado.....	13
Figura 10. Producción de coliflor y brócoli por continentes y proporción (promedio 2010-2021)	14
Figura 11. Producción de coliflor y brócoli por países y proporción (promedio 2010-2021).	14
Figura 12. Evolución de la producción y superficie cultivada de coliflor y brócoli en España....	15
Figura 13. Producción y superficie cultivada de brócoli y coliflor en España en los últimos años y destino de la producción de brócoli (promedio 2010-2020).	16
Figura 14. Superficie y proporción de la superficie (promedio 2010-2020) de brócoli por regiones.....	16
Figura 15. Producción y proporción de la producción (promedio 2010-2020) de brócoli por regiones.....	17
Figura 16. Calendario de siembra, recolección y comercialización.	17
Figura 17. Distribución del censo de hembras caprinas en ordeño por Comunidades Autónomas.	26
Figura 18. Evolución del censo total de cabras en ordeño en España durante el período 2017-2021.....	27
Figura 19. Evolución en diferentes Comunidades Autónomas de cabras en ordeño durante el período 2017-2021.....	27
Figura 20. Porcentaje de producción de leche de cabra en distintos países de la Unión Europea.	28
Figura 21. Evolución de la producción de leche en España entre 2017 y 2021 y porcentaje de producción de leche de cabra por comunidades autónomas.....	28

Listado de abreviaturas

AG	Ácidos grasos	ML	Mitad de lactación
AGV	Ácidos grasos volátiles	MO	Materia orgánica
ALA	Ácido alfa-linolénico	MS	Materia seca
BAL	Bacterias ácido lácticas	MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
CD	Dieta control / Dieta convencional	OBCFA	Odd and Branched Chain Fatty Acids
CECT	Colección española de cultivos tipo	PA	Planta de alcachofa
CLA	Ácido linoléico conjugado	PA12	Dieta que incluye un 12,5 % de ensilado de PA
DI	Diámetro interno	PA25	Dieta que incluye un 25 % de ensilado de PA
EE	Extracto etéreo	PA40	Dieta que incluye un 40 % de ensilado de PA
FAD	Fibra ácido detergente	PB	Proteína bruta
FB	Fibra bruta	PE	Periodo preexperimental
FL	Final de lactación	PL	Principio de lactación
FND	Fibra neutro detergente	PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
HFA	Índice hipercolesterolémico	PV	Peso vivo
HH	Índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico	RCS	Recuento de células somáticas
HPI	Health-promoting index	SA	Subproducto de alcachofa
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	SA12	Dieta que incluye un 12,5 % de ensilado de SA
IA	Índice de aterogenicidad	SA25	Dieta que incluye un 25 % de ensilado de SA
ID	Índice desaturasa	SB	Subproducto de brócoli
IT	Índice de trombogenicidad	SB12	Dieta que incluye un 12,5 % de ensilado de SB
LA	Ácido linoleico	SB25	Dieta que incluye un 25 % de ensilado de SB
LAD	Lignina ácido detergente	SB40	Dieta que incluye un 40 % de ensilado de SB

SFA	Ácidos grasos saturados
SPME	Microextracción en fase sólida
ST	Sólidos totales
T2	2 días de almacenamiento en refrigeración
T30	30 días de almacenamiento en refrigeración
TPC	Contenido total de compuestos fenólicos
UFA	Ácidos grasos insaturados
UFC	Unidades formadoras de colonias



Estructura de la tesis doctoral

El contenido de esta memoria se ha redactado de acuerdo con la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche para defender esta Tesis Doctoral bajo la modalidad de tesis por compendio de publicaciones. Por ello, esta memoria se ha estructurado de acuerdo con los siguientes puntos:

- Resumen/Abstract: Descripción de los resultados y conclusiones más relevantes (en castellano e inglés).
- Introducción: Descripción de los sectores de la alcachofa y brócoli y la potencialidad de los subproductos hortícolas como fuente de nutrientes en la dieta de caprino lechero y posibles repercusiones en la calidad de la leche y leches fermentadas, en especial del ensilado de planta (PA) y subproducto de alcachofa (SA) y subproducto de brócoli (SB).
- Objetivos: Objetivo global y objetivos parciales de la investigación.
- Materiales y métodos: Breve descripción de la metodología empleada para la consecución de los objetivos.
- Publicaciones científicas: Se adjuntan los artículos originales publicados en la revista Foods, y la transcripción literal del artículo publicado en LWT - Food Science and Technology. La presentación sigue la cronología de realización de los experimentos: en primer lugar, se presenta un trabajo publicado en Foods en 2017 (sin JCR) y a continuación las publicaciones incluidas en JCR (LWT 2018 y Foods 2022).
- Resultados y discusión: Breve resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los artículos publicados.
- Conclusiones generales: Conclusiones de la Tesis Doctoral.
- Investigaciones futuras: Enumeración de futuras investigaciones que pueden desarrollarse a partir de los resultados obtenidos.
- Referencias bibliográficas: Se indican las referencias empleadas en las secciones complementarias a las publicaciones.





		<p>Resumen</p>
--	--	-----------------------

Abstract

Resumen

Las regiones geográficas productoras de hortalizas cuentan con una importante generación de subproductos hortícolas tanto a nivel de campo, como son los restos de cosecha, como a nivel agroindustrial (industrias procesadoras de productos frescos, congelados o conservas). En el caso de la producción de alcachofa y brócoli se calcula que la biomasa no útil para alimentación humana alcanza el 75 % de la biomasa total. Estos restos de cosecha e industria pueden suponer un problema medioambiental y económico por su acumulación, pero también poseen una composición nutricional valiosa para su uso en alimentación animal. En las regiones productoras es tradicional el uso estacional de los subproductos en fresco y en baja cantidad de los restos de cultivo para la alimentación del ganado. De este modo solo se puede aprovechar una escasa proporción de los subproductos generados pues debido a su alto contenido en humedad y su producción estacional son difíciles de conservar a largo plazo. Estudios recientes han desarrollado sistemas de ensilado que permiten conservar planta de alcachofa y subproducto de alcachofa y brócoli hasta 200 días en condiciones adecuadas para alimentar caprino lechero, contribuyendo de este modo a la reducción de residuos y a la economía circular.

El presente trabajo plantea la hipótesis principal de que la inclusión de ensilados de planta y subproducto de alcachofa y de subproducto de brócoli en dietas equilibradas para la alimentación de caprino lechero da lugar a leche que reúne las características adecuadas para su utilización para la elaboración de leches fermentadas.

Para conocer la idoneidad de la leche así obtenida para la elaboración de productos lácteos, se llevó a cabo un primer estudio con inclusión de ensilados de planta y de subproducto (brácteas) de alcachofa en la dieta de caprino lechero de raza Murciano-Granadina (inclusión de 0 %, 12,5 % y 25 % de materia seca). Se evaluaron las propiedades tecnológicas y sensoriales de la leche durante un estudio de cinco meses de duración. La composición de la leche, su color, estabilidad, propiedades de coagulación ácida y enzimática, y su aptitud a la fermentación no se vieron afectadas por estos niveles de inclusión. Se elaboraron yogures azucarados para comparar yogures de leche control, leche de 25 % planta y de 25 % brácteas. El estudio de consumidores dio como resultado que los panelistas no pudieron diferenciar estos tres tipos de yogures entre sí. De este modo se puso en evidencia que era posible incorporar en las dietas de caprino lechero hasta un 25 % de ensilado de planta de alcachofa o de brácteas (en materia seca) en dietas equilibradas (isoenergéticas e isoproteicas) sin afectar negativamente las propiedades tecnológicas ni sensoriales de la leche y yogures a la vez que permitía reducir los costes de la alimentación del ganado.

Este trabajo de tesis doctoral se llevó a cabo de forma paralela a la tesis doctoral de Paula Monllor (2021) en que se optimizaron procesos de ensilado de subproducto de brócoli y de planta de alcachofa, y además se evaluaron los efectos de estas mismas dietas en la salud animal y aspectos productivos. Tras ese primer experimento (12,5 y 25 % de inclusión), en el trabajo de Monllor se evaluaron, un experimento a corto plazo, inclusiones de 25 %, 40 % y 60 % de ensilado de subproducto de brócoli y de planta de alcachofa en la salud del animal y parámetros de producción y calidad de la leche de cabra Murciano-Granadina. Como resultado se seleccionó una inclusión del 40 % de ensilados de planta de alcachofa y subproducto de brócoli para un estudio a largo plazo durante una lactación completa. De forma paralela, en el presente trabajo de tesis se

estudió el efecto de estas dietas durante una lactación completa en la adecuación de la leche para elaborar leches fermentadas. La principal novedad de este estudio es estar realizado durante una lactación completa con una elevada inclusión de subproducto ensilado, y ser el primero en la bibliografía centrado en subproducto de brócoli y planta de alcachofa. Con esta finalidad se ensayaron dos cultivos lácticos iniciadores que se tomaron como modelo: un cultivo termófilo tradicional de yogur (YO-MIX™ 300) y un cultivo mesófilo, mezcla de cepas (MA400), que se utiliza ampliamente para la elaboración de queso, mantequilla y buttermilk por su elevada capacidad acidificante y aromatizante. Se elaboraron leches fermentadas con ambos cultivos y se analizaron el día 2 y 30 tras la elaboración. Para evaluar su idoneidad se determinaron parámetros microbiológicos, indicadores de la fermentación (pH, perfil de ácidos orgánicos y azúcares), capacidad antioxidante, estabilidad de los geles obtenidos (sinéresis y composición del suero liberado), perfil de compuestos volátiles, perfil de ácidos grasos totales y se calcularon sus índices de salud. La fermentación mejoró las propiedades antioxidantes en todas las dietas ($p < 0,05$), en especial con el uso de los cultivos mesófilos. La inclusión de los dos ensilados en dietas equilibradas dio lugar a leche de características adecuadas para su fermentación por cultivos de yogur y queso. Las principales diferencias derivadas del uso de ensilados fueron el perfil de ácidos grasos y el perfil de compuestos volátiles. La inclusión de brócoli ensilado mejoró las propiedades antioxidantes de la leche ($p < 0,05$). La inclusión de planta de alcachofa mejoró algunos índices de salud de los ácidos grasos ($p < 0,05$). En cambio, la inclusión de un 40 % de ensilado de brócoli no resultó beneficiosa para los índices de salud por su mayor contenido en ácidos grasos saturados. Sería necesario valorar si una menor inclusión de este ensilado permite obtener un perfil graso de calidad nutricional similar al control y siguiendo mejorando las propiedades antioxidantes. El perfil de compuestos volátiles, aunque cualitativamente igual, presentó ligeras diferencias cuantitativas.

Adicionalmente, en este trabajo de tesis y para determinar el posible interés de algunas bacterias lácticas como cultivos adjuntos en leche de cabra, se incluye un estudio de la capacidad fermentativa de nueve cepas de bacterias lácticas individuales. El comportamiento de los cultivos se evaluó en base a parámetros tecnológicos y de calidad en comparación con un cultivo mixto comercial. Se determinaron el perfil de volátiles, los descriptores de aroma y olor, la curva de acidificación, los recuentos microbianos, la estabilidad del gel, el perfil de ácidos orgánicos y azúcares, el perfil de ácidos grasos e índices de salud. La mayor parte de las cepas ensayadas alcanzaron recuentos superiores a 7 log ufc/g. No se vieron afectados por los cultivos ensayados los parámetros de sinéresis del gel evaluada por centrifugación (sinéresis media del 64 %), composición del suero liberado (medias: 0,32 % proteína, 0,24 % grasa, 2,39 % lactosa, 3,5 % materia seca) y el contenido en ácido linoleico conjugado (1,16 % del perfil total de ácidos grasos). Las principales diferencias entre los cultivos se vieron en el perfil de volátiles (principalmente ácidos y cetonas), descriptores del olor y metabolismo de los azúcares (glucosa, galactosa y ácido láctico). Este estudio permitirá seleccionar cultivos adecuados a los perfiles de volátiles que vayan a desarrollarse debido a la inclusión de diversos ensilados en las dietas de las cabras lecheras.

Planta de alcachofa y subproductos de alcachofa y brócoli ensilados pueden utilizarse en dietas equilibradas para caprino lechero como una estrategia de producción sostenible que contribuye a la economía circular y permite la obtención de productos lácteos fermentados de calidad.

Abstract

Regions producing horticultural products have a significant generation of horticultural by-products both at the field level, such as harvest remains, and at the agro-industrial level (processing industries of fresh, frozen or canned products). In the case of artichoke and broccoli production, the biomass not useful for human consumption reaches 75 % of the total biomass. These harvest and industry remains can pose environmental and economic problems due to their accumulation. However, they also have a valuable nutritional composition for use in animal feed. In such regions, it is traditional to use these harvest remains and fresh by-products to feed livestock. However, only a small proportion of the by-products generated can be used, since given their high moisture content and their seasonal production, they are difficult to preserve. Recent studies have developed silage systems that make it possible to preserve the artichoke plant and broccoli by-product for up to 200 days in adequate conditions to feed dairy goats, thus contributing to the reduction of waste and to the circular economy.

The main hypothesis of the present work is that the inclusion of broccoli by-product and artichoke plant and by-products silage in balanced diets for feeding dairy goats gives rise to milk that meets the appropriate characteristics for use in the production of fermented milks.

In order to determine the suitability of the milk thus obtained for the elaboration of dairy products, a first study was carried out with the inclusion of artichoke plant silage and bracts in the diet of Murciano-Granadina dairy goats (Inclusion of 0 %, 12,5 % and 25 % dry matter). The technological and sensory properties of the milk were evaluated during a five-month study. Milk composition, color, stability, acid and enzymatic coagulation properties, and fermentability were not affected by these inclusion levels. Sweetened yoghurts were made to compare control milk yoghurts, 25 % plant milk and 25 % bract milk. The consumer study resulted in the panelists not being able to differentiate these three types of yogurt from each other. In this way, it became evident that it was possible to incorporate up to 25 % of artichoke plant silage and bracts (in dry matter) into the diets of dairy goats in balanced diets (isoenergetic and isoproteic) without negatively affecting the technological or sensory properties whereas reducing feeding costs.

This doctoral thesis was carried out in parallel to that of Paula Monllor's (2021) in which broccoli by-product and artichoke plant silage processes were optimized, and the effects of these same diets on animal health and productive aspects were evaluated. After this first experiment (12,5 and 25 % inclusion), Monllor's work evaluated, in the short term, inclusions of 25 %, 40 % and 60 % of broccoli by-product silage, and artichoke plant in health, animal production and quality of Murciano-Granadina goat milk. As a result, an inclusion of 40 % of artichoke plant silages and broccoli by-product was selected for a long-term study during a complete lactation. In parallel, in the present thesis the effect of these diets during a complete lactation on the suitability of the milk to elaborate fermented milks was studied. The main novelty of this study is that it is a complete lactation study with a high inclusion of silage by-product, and it is the first in the literature focused on broccoli and artichoke plant by-product. For this purpose, two lactic starter cultures were tested, which were taken as a model: a traditional thermophilic yogurt culture (YO-MIX™ 300), and a mesophilic culture, a mixture of

strains (MA400) that is widely used for the production of cheese, butter and buttermilk given its high acidifying and flavoring capacity. Fermented milks were made with both cultures and were analyzed at day 2 and 30 after processing. To evaluate its suitability, microbiological parameters, fermentation indicators (pH, organic acid and sugar profile), antioxidant capacity, stability of the obtained gels (syneresis and composition of the released whey), volatile profile, total fatty acid profile were determined, and their health indices were calculated. Fermentation improved antioxidant properties in all diets ($p < 0.05$), especially with the use of mesophilic cultures. The inclusion of the two silages in balanced diets gave rise to milk with suitable characteristics for its fermentation by yogurt and cheese cultures. The main differences derived from the use of silages were the fatty acid profile and the volatile profile. The inclusion of broccoli silage improved the antioxidant properties of milk ($p < 0.05$). The inclusion of the artichoke plant improved some fatty acid health indices ($p < 0.05$). However, the inclusion of 40 % broccoli silage was not beneficial for the health indices due to milk having higher saturated fatty acid content. It would be necessary to assess a lower inclusion of this silage to obtain a fatty profile of nutritional quality similar to that of the control. The profile of volatile compounds, although qualitatively the same, presented slight quantitative differences.

Additionally, in this thesis and aiming to determine the possible interest of some lactic bacteria as adjunct cultures in goat milk, a study of the fermentative capacity of nine individual lactic bacteria strains are included. The behavior of the strains was evaluated based on technological and quality parameters in comparison with a commercial mixed culture. The volatile compound profile, aroma and odor descriptors, acidification curve, microbial counts, gel stability, organic acid and sugar profile, fatty acid profile, and health indices were determined. Most of the tested strains reached counts higher than 7 log cfu/g. The syneresis parameters of the gel evaluated by centrifugation (mean syneresis of 64 %), composition of the released whey (means: 0.32 % protein, 0.24 % fat, 2.39 % lactose, 3.5 % dry matter) and the content of conjugated linoleic acid (1.16 % of the total fatty acid profile) were not affected by the used strains. The main differences between cultures were seen in the volatile profile (mainly acids and ketones), odor descriptors, and sugar metabolism (glucose, galactose, and lactic acid). This study provides useful information for the selection of adjunct cultures for dairy goat milk products, and will allow the selection of cultures suitable for the volatile profiles that are going to develop due to the inclusion of various silages in the diets of dairy goats.

Silage artichoke plant and broccoli by-products can be used in balanced diets for dairy goats as a sustainable production strategy that contributes to the circular economy and allows obtaining quality fermented dairy products.



Introducción

1. Introducción

1.1. Producción de alcachofa y brócoli

1.1.1. Producción de alcachofa

La alcachofa (*Cynara scolymus* L.), también conocida como alcachofera, alcacil o alcaucil (Figura 1), entre otros nombres, es una planta de la familia *Asteraceae* (o *Compositae*), originaria del Mediterráneo oriental y cultivada desde la antigüedad como alimento (Baixauli et al., 2017a).

Es una planta herbácea y vivaz que, después de la formación de hojas grandes grisáceas en roseta, desarrolla un tallo largo y ramificado de hasta 1,5 m en cuyos extremos van formándose las inflorescencias, en capítulos con un gran número de flores. Estas cabezuelas cerradas y antes de florecer, formadas por un receptáculo carnoso (corazón) rodeado de brácteas coriáceas, constituyen la parte que se comercializa. Cuando florecen, las brácteas se endurecen mucho y ya no son comestibles.



Figura 1. Planta de alcachofa (*Cynara scolymus* L.).

(<https://lospilaresdelaagricultura.files.wordpress.com/2014/12/alcachofas-04.jpg>)

La producción mundial de alcachofas en los últimos años es de aproximadamente 1.500.000 t (Figura 2). Destaca su cultivo en Europa (por encima de 600.000 t anuales) y África (alrededor de las 400.000 t anuales), donde en promedio entre 2010 y 2021 se cosechó más del 45 % y alrededor del 30 %, respectivamente, de la producción mundial. El resto de la producción procede del continente americano (un 15 %) y de Asia (un 10 %).

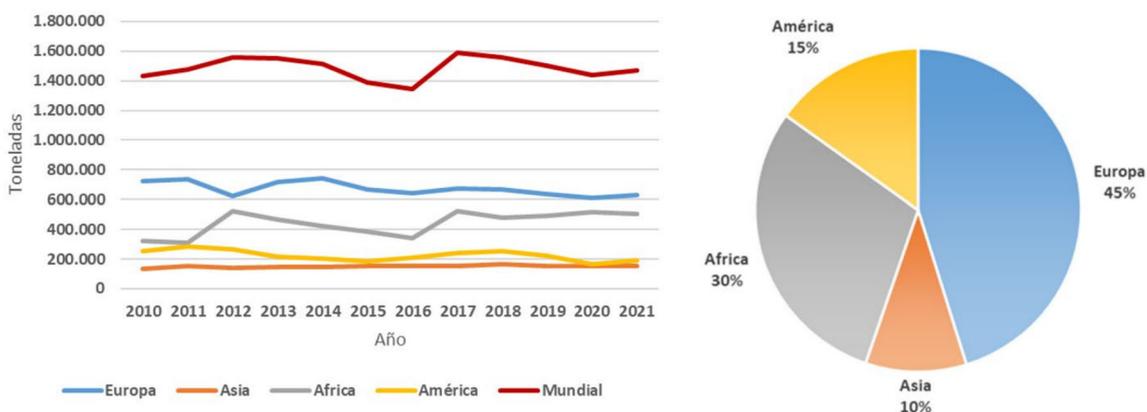


Figura 2. Evolución de la producción de alcachofa por continentes y promedio entre 2010-2021 (FAOSTAT, 2023).

La alcachofa ha sido y sigue siendo un cultivo tradicional en los países de la cuenca mediterránea (Figura 3). El principal país productor es Italia, con alrededor de 400.000 t, aunque se observa una tendencia a la baja en los últimos años. Le sigue Egipto con unas 300.000 t, que en los últimos años ha experimentado un gran crecimiento y ha superado a España, que ha pasado a ser el 3^{er} productor mundial con una producción estabilizada alrededor de las 200.000 t. A continuación, se encuentran Perú y Argelia con más de 100.000 t, y luego China y Marruecos. En conjunto, los 5 países señalados que bordean el Mediterráneo producen más del 70 % del total mundial de alcachofas.

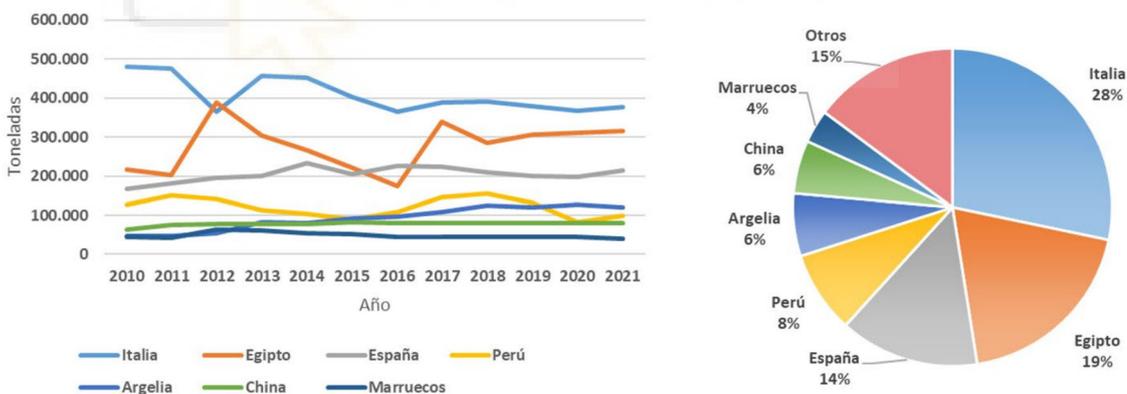


Figura 3. Evolución de la producción de alcachofa por países y promedio entre 2010-2021 (FAOSTAT, 2023).

En España la producción de alcachofa ha disminuido de forma progresiva y sostenida desde los 90 (en 1990 hubo un máximo de producción, superándose las 400.000 t) (Figura 4).

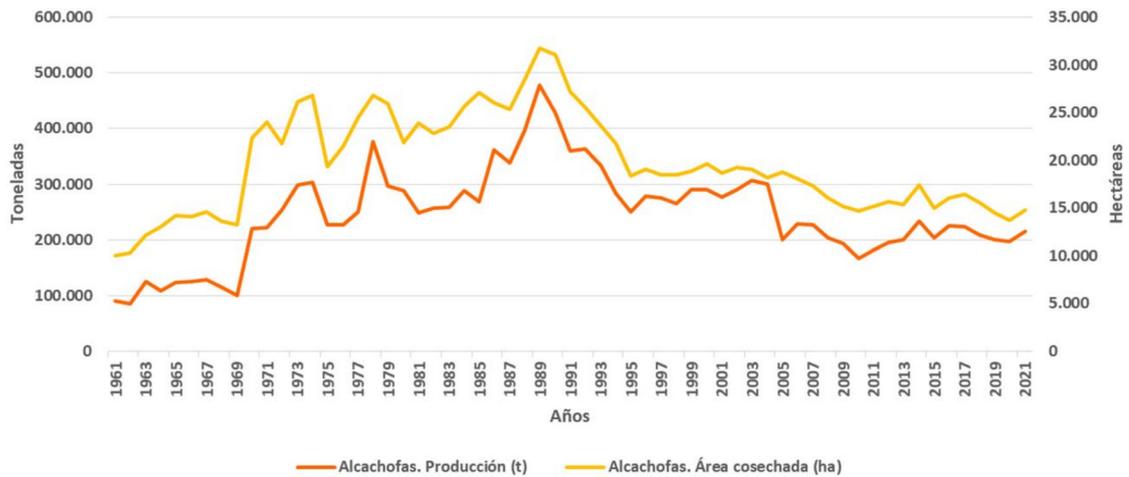


Figura 4. Evolución de la producción y superficie cultivada de alcachofa en España (FAOSTAT, 2023).

En los últimos años se han destinado de media a su cultivo unas 15.000 ha y se han obtenido unas 200.000 t (Figura 5). En promedio, un volumen importante de la producción (34 %) se dirige a la industria (conservas y congelados) y un 63 % a la venta para consumo en fresco.

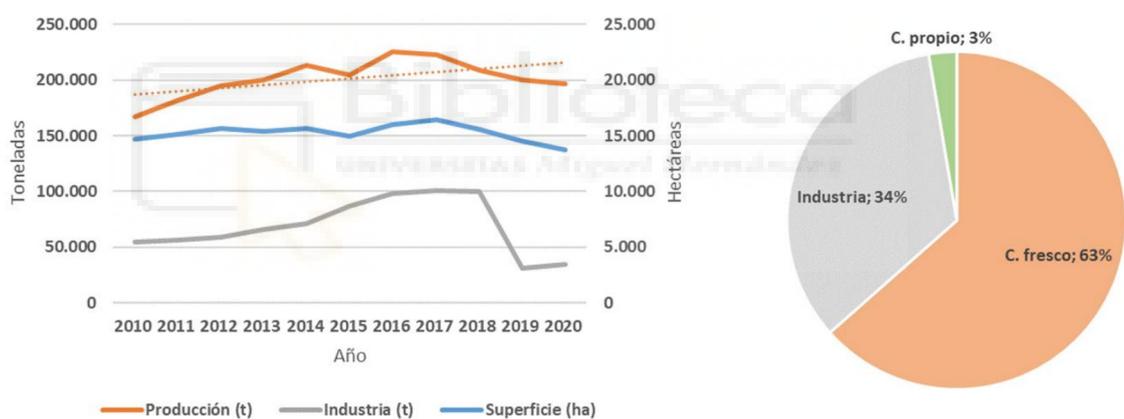


Figura 5. Porcentaje de la producción de alcachofa que se destina a la industria transformadora (MAPA, 2021a).

La Región de Murcia se sitúa en primer lugar, allí se destinan en promedio cerca de 7.000 ha y se obtienen unas 90.000 t, lo que supone el 45 y 44 %, respectivamente, de la superficie y producción nacional en los últimos años (Figuras 6 y 7). Le sigue la Comunidad Valenciana con 4.000 ha (26 %), y una producción de 60.000 t (28 %), de las cuales aproximadamente la mitad corresponden al cultivo en Alicante. Los 3 siguientes lugares los ocupan Andalucía (13 %), Navarra (7 %) y Cataluña (6 %) de la superficie y producción.

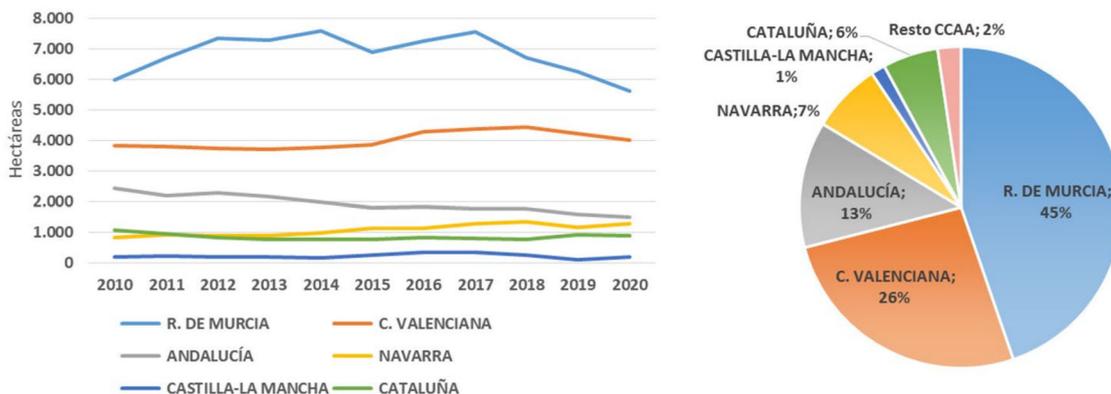


Figura 6. Evolución de la superficie total y promedio entre 2010-2020 de alcachofa por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021a).

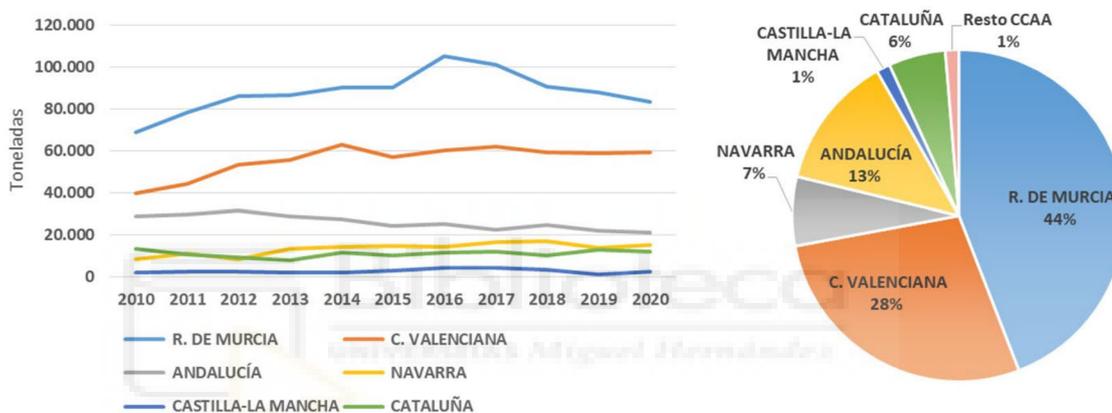


Figura 7. Evolución de la producción y promedio entre 2010-2020 de alcachofa por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021a).

El cultivo de alcachofa por tanto tiene especial importancia en el sureste español (Baixauli et al., 2017a). En Murcia y la Comunidad Valenciana se produce en conjunto el 72 % de las alcachofas españolas. Allí se encuentran por tanto la mayor extensión de campos de cultivo donde quedarán los restos de la cosecha y la mayor parte de industrias envasadoras en fresco y transformadoras. Es por tanto la zona de España de mayor generación de los subproductos de estas producciones hortícolas.

Un aspecto relevante de la producción de alcachofa es la estacionalidad de su ciclo productivo. La multiplicación de la planta suele hacerse por vía vegetativa, utilizando zuecas (esquejes obtenidos de la zona basal de alcachofas en reposo (junio y julio), que se trasplantan entre julio y septiembre (Figura 8), en surcos separados entre 0,8 y 1,6 m y distancia entre plantas de 0,8 a 0,6 m (unas 12.000 plantas/ha). Las plantaciones suelen mantenerse en producción durante 2 o 3 años en el campo. Se está introduciendo también el cultivo de variedades de multiplicación por semilla y con un ciclo anual. La recolección de los capítulos se suele realizar continuamente, dos o más pasadas semanales, para obtener una alcachofa de calidad. El período de recolección abarca desde septiembre hasta junio, siendo la producción

precoz, en otoño, la más cotizada. De este modo el subproducto de la cosecha está disponible a finales de invierno y principalmente en primavera.

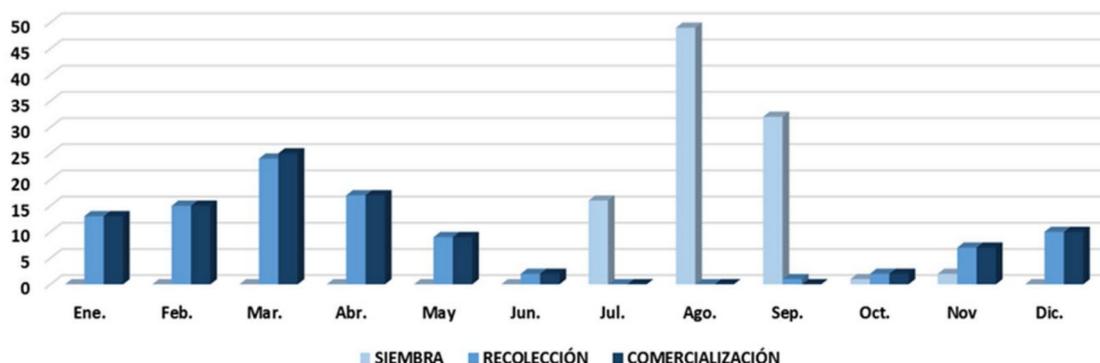


Figura 8. Calendario de siembra, recolección y comercialización 2014-2016 (MAPA, 2021a).

1.1.2. Producción de brócoli

El brócoli, bróculi o brécol (*Brassica oleracea* L. var. *Italica* Plenck) (Figura 9) es una planta de la familia *Brassicaceae* (o *Cruciferae*) muy parecida a la coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), con la que comparte historia y un patrimonio genético común (Baixauli et al., 2017b). Así, en muchas zonas el brócoli recibe el nombre de coliflor de invierno, mientras que a la coliflor se la denomina coliflor de verano. Ambas se cultivan por su inflorescencia terminal densa (pella), consistente en una gran masa globulosa de yemas florales hipertrofiadas, que en la coliflor es blanca y muy compacta, mientras que en el brócoli es verde, menos compacta y con las flores algo más desarrolladas (pella algo más abierta).

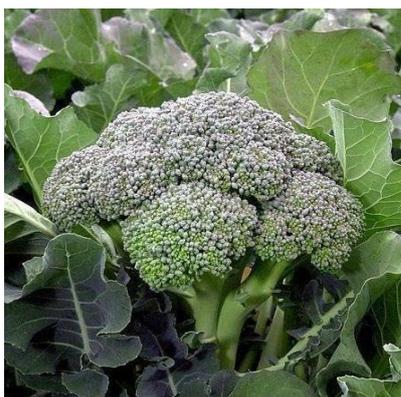


Figura 9. Planta de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica* Plenck).

(<https://s1.ppllstatics.com/hoy/www/pre2017/multimedia/noticias/201504/19/media/cortadas/GF04U4V1--490x578.jpg>).

Mundialmente, la coliflor y el brócoli tienen una gran importancia económica, superando la producción de ambas hortícolas los 25 millones de toneladas y con un crecimiento ligero y sostenido en los últimos años (Figura 10). Asia es, con ventaja, el principal productor, con más

de 20 millones de toneladas desde 2017 (alrededor del 80 % de la producción mundial). El segundo continente en importancia es Europa, donde se mantiene la producción alrededor del 10 % en los últimos años, y a continuación está América (9 %).

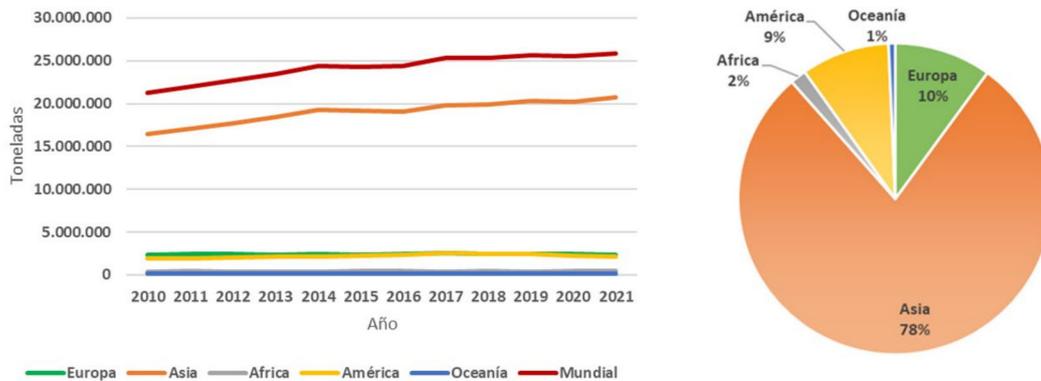


Figura 10. Evolución de la producción de coliflor y brócoli por continentes y promedio entre 2010-2021 (FAOSTAT, 2023).

En cuanto a países (Figura 11) los mayores productores son China e India, que en los últimos años se acercan a los 10 millones de toneladas cada uno, superando la suma de ambos el 70 % de la producción mundial. Les siguen de lejos los demás estando, en tercer lugar, Estados Unidos con una producción media de aproximadamente 1.200.000 t (5 %), que casi duplica la del cuarto productor mundial que es España con unas 700.000 t (2,6 %), a la que siguen de cerca México (2,3 %) e Italia (1,6 %).

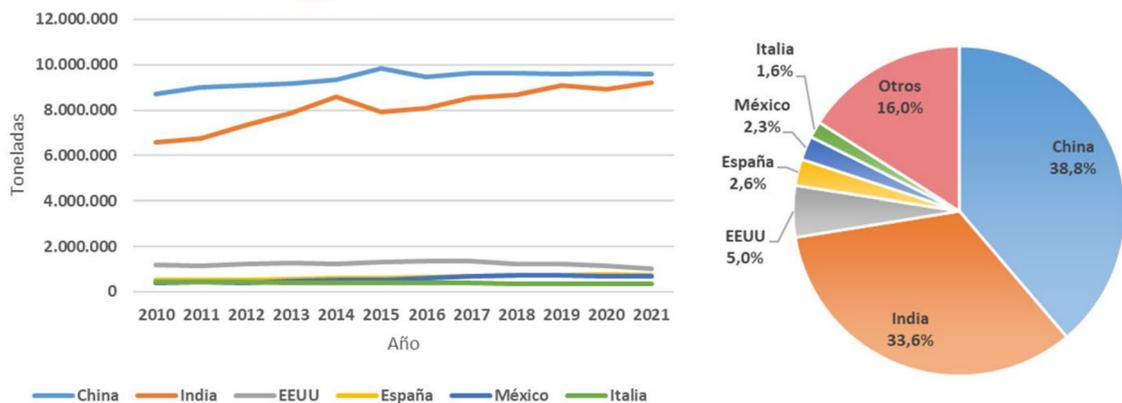


Figura 11. Evolución de la producción de coliflor y brócoli por países y promedio entre 2010-2021 (FAOSTAT, 2023).

España es el principal país productor de coliflor y brócoli en Europa. Se observa una producción creciente en el conjunto de ambas hortícolas, pasando desde las 200.000 toneladas de los años 70 del siglo pasado hasta más de 700.000 toneladas de los últimos años (Figura 12).

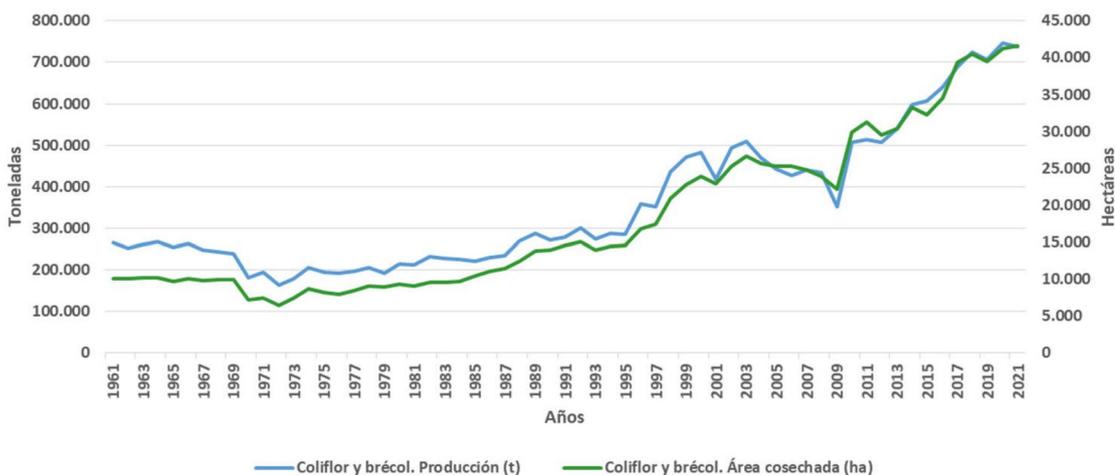


Figura 12. Evolución de la producción y superficie cultivada de coliflor y brócoli en España (FAOSTAT, 2023).

El cultivo del brócoli en España a nivel comercial es relativamente reciente, pues se realiza desde la década de 1970 y en las estadísticas del MAPA, hasta 2009, los datos aparecían conjuntamente con los de coliflor, igual que sigue ocurriendo en FAOSTAT.

Analizando los datos de brócoli por separado de los de coliflor (a partir de 2010) (Figura 12), en los últimos años se sigue apreciando una tendencia creciente y sostenida tanto en la superficie cultivada como en la producción obtenida (Figura 13), pasando de unas 23.000 ha y 356.000 t en 2010 a casi 32.000 ha y 528.000 t en 2020, mientras que la coliflor se mantiene más estable. En promedio, España ha destinado al cultivo del brócoli en los últimos años (Figura 13) una superficie de unas 27.000 ha, y obtenido una producción de unas 450.000 toneladas, lo que supone más del 75 % de la superficie y producción conjunta de coliflor y brócoli. Aunque variable según años, de media se destina a la industrialización, sobre todo para congelado, un 37 % de la producción.

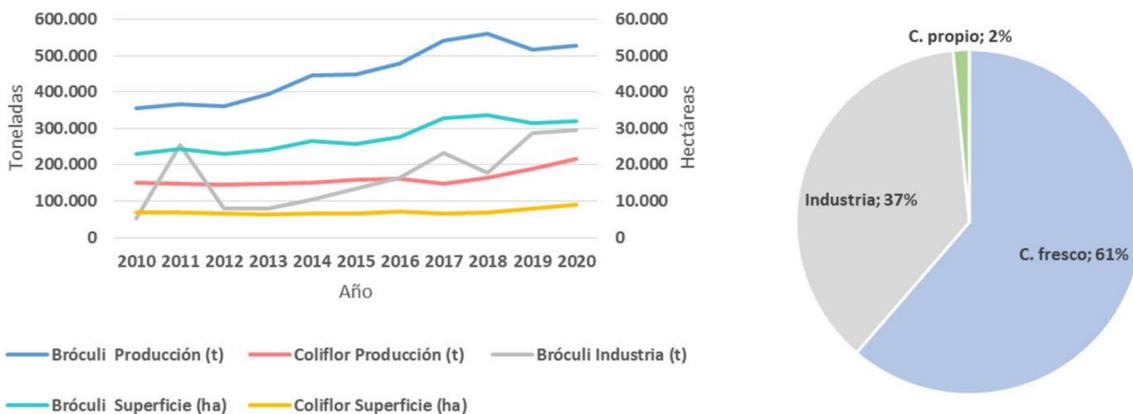


Figura 13. Evolución de la producción y superficie cultivada de brócoli y coliflor en España y promedio destino de la producción de brócoli entre 2010-2020 (MAPA, 2021a)

La principal zona productora es la Región de Murcia que superó las 12.000 ha cultivadas y casi alcanzó las 200.000 t obtenidas en 2020 (42 % de la superficie (S) y 43 % de la producción (P) en promedio), seguida de Navarra (18 % S y 14 % P), Extremadura (11 % S y 8 % P), y muy igualadas en superficie (8 %) la Comunidad Valenciana (11 % P), Andalucía (12 % P) y Castilla La Mancha (6% P) (Figuras 14 y 15). En la mayoría de las zonas se aprecia un ligero incremento del cultivo. Al igual que la alcachofa, Murcia y la Comunidad Valenciana son las dos comunidades con mayor producción de brócoli, (50 % de la superficie y 54 % de la producción).

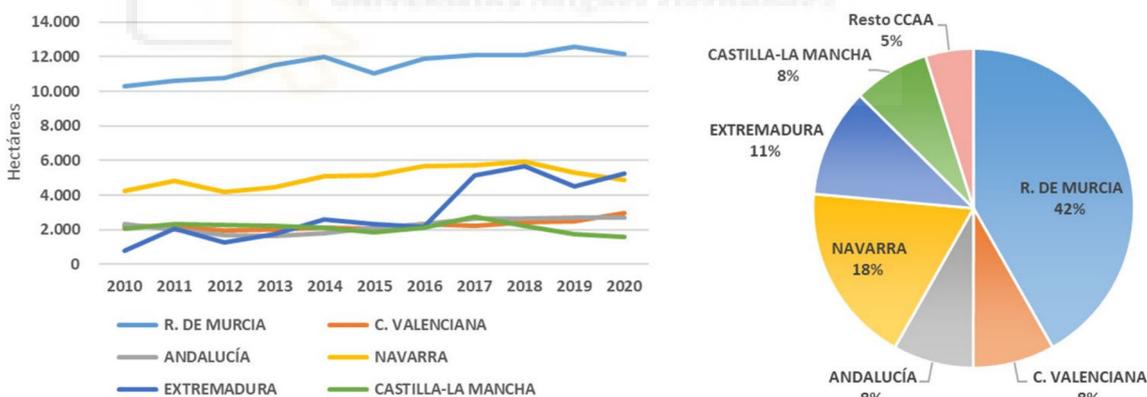


Figura 14. Evolución de la superficie y promedio entre 2010-2020 de brócoli por Comunidades Autónomas (MAPAa, 2021a).

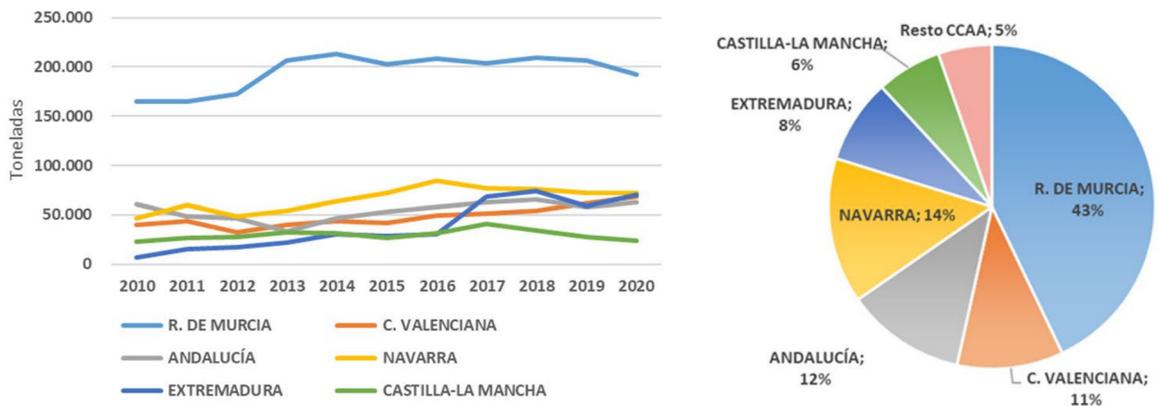


Figura 15. Evolución de la producción y promedio entre 2010-2020 de brócoli por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021a).

La demanda de brócoli ha llevado al desarrollo de cultivares que permiten la producción de este cultivo durante buena parte del año, aunque su pico de producción sigue siendo estacional. En el Sureste español la plantación del brócoli se suele realizar mediante plántulas con cepellón (Baixauli et al., 2017b), que suelen trasplantarse en líneas dobles sobre caballones o mesetas separados entre 0,7 y 1 m, oscilando las densidades medias de plantación entre 6 y 8 plantas/m². Se dispone de cultivares con distinta duración del ciclo (unos 4 meses para las de ciclo medio), que se trasplantan en diferentes fechas para conseguir una comercialización continuada casi todo el año (sobre todo desde octubre hasta julio) (Figura 16). La recolección suele ser manual y realizarse en varias pasadas para obtener las inflorescencias en su punto óptimo. Durante las épocas de producción es cuando se generan la mayor parte de subproductos de este cultivo.

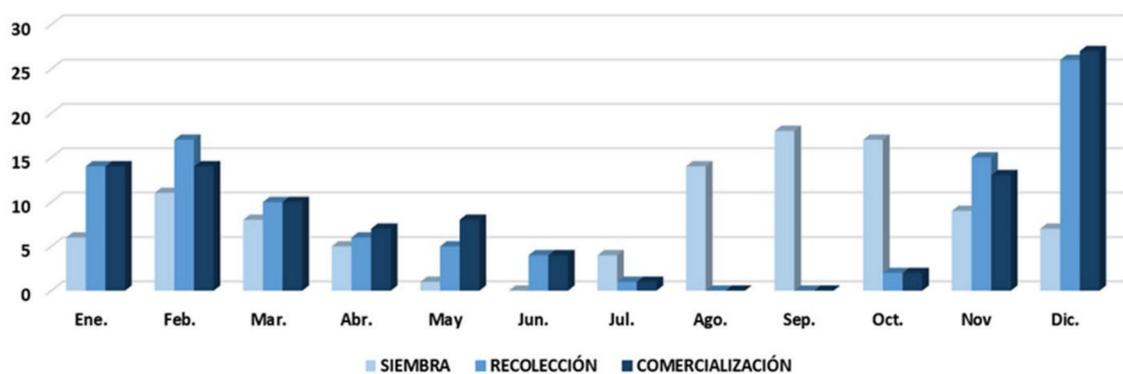


Figura 16. Calendario de siembra, recolección y comercialización de brócoli en España (MAPA, 2021a).

1.1.3. Subproductos de alcachofa y brócoli

La industria alimentaria está interesada en las inflorescencias de brócoli y en el botón floral de la alcachofa, que constituyen aproximadamente el 25 % de su biomasa total (Dominguez-Perles et al., 2010; Borsini et al., 2021), lo cual conlleva la generación de grandes volúmenes de subproductos y, en consecuencia, un impacto ambiental importante. Sin embargo, en el sur de España existe una larga tradición en la utilización de subproductos frescos del brócoli y la alcachofa para la alimentación de ovejas y cabras, aprovechando el gran valor nutritivo de estas hortalizas (MMA, 2006) y en cierta medida, contribuyendo a reducir su impacto ambiental (Dominguez-Perles et al., 2010). La ingesta de subproducto de alcachofa en ovino puede ser de alrededor de 70 g de materia seca (MS) por kg de peso vivo (FEDNA, 2016), cuenta con un contenido moderado de fibra neutro detergente (FND) de 400-600 g/kg y una concentración de proteína bruta (PB) media-alta de 160-200 g/kg (García-Rodríguez et al., 2019), además la fracción de nitrógeno soluble es muy baja, y la degradabilidad efectiva de la proteína es elevada, de un 84 % (FEDNA, 2016).

Respecto al brócoli, las inflorescencias y tallos del brócoli son ricos en azúcares y alto contenido en proteínas altamente degradables y con proporciones medias de fibra con bajos niveles de lignina, esto hace que aumente el valor nutritivo de este subproducto, siendo su degradabilidad ruminal in vitro similar a granos de cebada (Panwar et al., 2017). Además, presenta un contenido en calcio superior al de los alimentos tradicionales y es comparable su valor nutricional con los subproductos fibrosos utilizados de forma generalizada en la alimentación para rumiantes, como la pulpa de remolacha y de cítricos (INRA, 2007; De Evan et al., 2020).

El uso de estos subproductos frescos como alimento para animales presenta unas limitaciones: (1) no están disponibles durante todo el año; (2) por su composición no toda la cantidad de subproductos generados pueden utilizarse como alimento para animales; (3) las enormes cantidades de subproductos generados en un corto tiempo de cosecha o de transformación agroindustrial son altamente perecederos debido a su alto contenido de agua, y por ello presentan una vida útil corta y (4) la humedad de estos subproductos limita su almacenamiento y hace necesario que las empresas los gestionen rápidamente para evitar problemas medioambientales y costes adicionales. Por ello, es necesario desarrollar estrategias para preservar estas fuentes de nutrientes y permitir su disponibilidad por períodos más prolongados. Según estudios previos, estos subproductos tienen una buena aptitud para el ensilado que permite su conservación en el tiempo sin afectar a su composición nutricional.

En el caso de la alcachofa podemos diferenciar dos tipos de subproductos, aquellos procedentes de la industria (principalmente brácteas y tallos) y los restos de cosecha en campo (planta de alcachofa). A su vez, entre los subproductos industriales tenemos crudos y escaldados o cocidos, en función de la etapa del proceso en que se obtengan.

1.2. Subproductos agrícolas en la alimentación de rumiantes

Los subproductos de las industrias agrícolas y de procesamiento de alimentos representan un problema importante para su eliminación. Su uso en alimentación animal, además de reducir los problemas medioambientales y de costes para los agricultores e industria transformadora, también beneficia a los ganaderos por la reducción de costes en alimentación (Vasta et al., 2008). Con estas premisas se puede conseguir una mayor rentabilidad de la agricultura, industrias agroalimentarias y ganadería debido a la posible producción de alimentos de origen animal de alta calidad para humanos a partir de subproductos vegetales de escaso valor para alimentación humana (Elferink et al., 2008). Otro beneficio es que se evita la competencia por el alimento o el uso de la tierra entre ganadería y seres humanos, pues permite reducir la demanda de cereales y semillas oleaginosas en la alimentación animal, que también son consumidos por las personas (Schader et al., 2015). De este modo, se cumpliría con las actuales políticas de ecoinnovación, con el objetivo de una “economía de residuos cero” en la que los residuos se utilizan como materia prima para nuevos productos y aplicaciones, potenciando así la ecología industrial con el modelo “cradle to cradle”, que imita la naturaleza como modelo sostenible, y la economía circular (Mirabella et al., 2014).

En este apartado revisaremos el uso de subproductos agrícolas para la alimentación de rumiantes y los estudios realizados sobre su efecto en la calidad de la leche. Los subproductos incorporados en la alimentación para rumiantes pueden tener función como ingredientes energéticos, proteicos o con propiedades funcionales y formar parte de la dieta convencional o sustituir algunas materias primas convencionales en la elaboración de las raciones. Por ejemplo, los subproductos como la hoja de olivo o de alcachofa por ser ricos en fibra, podrían reemplazar a forrajes (Molina et al., 2008; Salman et al., 2014) y la pulpa de naranja o de remolacha azucarera, que pueden ser considerados por su composición como energéticos, podrían sustituir a los cereales de las raciones (Lashkari et al., 2013; Oltramari et al., 2016; Abo-Zeid et al., 2017).

La composición química de los subproductos agroindustriales es muy variable entre ellos pudiendo ser un inconveniente en el momento de formular la ración. Algunos se utilizan como ingrediente único de la ración o como complemento con otros ingredientes para conseguir dietas isoproteicas e isoenergéticas. Existen tablas con la composición química, contenido en ácidos grasos y macrominerales, valor energético, fracción de nitrógeno soluble, degradabilidad efectiva de la proteína y digestibilidad intestinal de la proteína que escapa de la degradación ruminal, publicadas por FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal) de subproductos húmedos con aplicación práctica en la alimentación en rumiantes (FEDNA, 2016). En la Tabla 1 pueden observarse de forma resumida algunos subproductos, su procedencia, composición química y las características nutritivas más relevantes publicadas por el FEDNA. Por otra parte, centrándose en los subproductos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, estudios recientes realizados por Monllor et al., 2020b analizaron la composición (g/100g MS) de ensilados de planta de alcachofa (PA) y subproducto de brócoli (SB). Con respecto al ensilado de PA la composición química fue: extracto etéreo (EE): 3,46 %; proteína bruta (PB): 7,81 %; Fibra neutro detergente (FND): 57,1 % y lignina ácido detergente (LAD): 10,8

% y para el ensilado de SB establecieron para: EE: 32,1 %; PB: 17,4 %; FND: 4,30 %; LAD: 63,4 %. También, Monllor et al. (2020b,c) con una inclusión de un 25 % y un 40 % de ensilado de PA y SB en la ración de cabras Murciano-Granadinas, la planta de alcachofa aumentó el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las dietas experimentales con respecto al subproducto de brócoli. Sin embargo, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en la ración fue superior con la incorporación de SB con respecto a PA. Es importante destacar que la mayor parte de los trabajos de investigación encontrados sobre la inclusión de subproductos agroindustriales en las dietas de rumiantes se centran principalmente en su efecto sobre el perfil de ácidos grasos de la leche con propiedades beneficiosas para la salud humana.



Tabla 1. Composición química, características nutritivas y procedencia de diversos subproductos frescos de uso en alimentación de rumiantes.

Subproducto	Procedencia	Composición química	Características nutritivas
Bagazo de cerveza (Cebadilla de cerveza)	Industria cervecera	PB: 24-26 % MS EE: 8 % MS FND: 53 % MS	* Elevado contenido proteico * Degradabilidad efectiva de la proteína baja * Subproducto rico en fibra muy poco efectiva (18%)
Pulpa de cítricos	Extracción de zumo de cítricos	PB: 8 % MS EE: 3 % MS FND: 26 % MS Carbohidratos solubles: 20 % MS Pectinas: 30 % MS	* Platiabilidad y digestibilidad elevada * Degradabilidad efectiva de la proteína 65% * Contenido en fibra poco efectiva (33%) * Valor energético similar de la cebada
Pulpa de manzana	Industria de fabricación de sidra y de zumo de manzana	PB: 7-8 % MS EE: 3 % MS FND: 50 % MS Elevado contenido en pectinas	* Subproducto de valor energético medio * Degradabilidad efectiva de la proteína del 65%
Subproductos de remolacha	Industria azucarera	PB: 7-10 % MS EE: 0,5-0,7 % MS FND: 44 % MS Pectinas: 20-30 % MS Rico en macro-microminerales, a excepción de P	* Digestibilidad elevada de la fibra (75%) * Fibra de baja efectividad (33%) * Degradabilidad efectiva de proteína 55% * Alto valor energético
Pulpa de tomate	Industria alimenticia (zumos, cremas, salsas)	PB: 18-19 % MS EE: 9 % MS FND: 58 % MS	* Fuente energética y proteica intermedia
Pastore	Ensilado grano de maíz inmaduro	PB: 7-8 % MS EE: 3-4 % MS Elevado contenido en linoleico y oleico FND: 10-15 % MS	* Alto contenido energético
Bagazo de soja (OKARA)	Producción del zumo de soja y del tofu	PB: 34 % MS EE: 9 % MS FND: 58 % MS	* Valor energético y proteico elevado * Proteína muy degradable y digestible
Bagazo de uva	Extracción del mosto en la obtención del vino	PB: 13-14 % MS EE: 3,5 % MS FND: 49 % MS	* Valor energético bajo por su nivel de lignificación * Valor proteico bajo. Baja degradabilidad y digestibilidad intestinal
Orrujo de oliva	Extracción de aceite de la aceituna	PB: 7-8 % MS EE: 10% MS. Elevado contenido en oleico FND: 55 % MS	* Valor energético bajo por su alto contenido en fibra y nivel de lignificación. * El contenido graso compensa su baja digestibilidad
Alcachofa	Industria conservera: Conjunto de brácteas trozos de tallos	PB: 12,00 % MS EE: 3,40 % MS FND: 50 % MS	* Digestibilidad de la MO un 75%. * Fracción de nitrógeno soluble baja. * Degradabilidad efectiva de la proteína un 84%.

Fuente: FEDNA 2016

1.3. Uso de subproductos de cultivos leñosos

Uno de los subproductos importantes por su volumen generado es la pulpa de cítricos, la cual, está formada por piel (60-65 %), partes el fruto (30-35 %) y semillas (0-10 %), además presenta una elevada digestibilidad de la materia orgánica (MO) con un 85 % y un valor energético similar al de la cebada: 2,67 Mcal EM/kg MS (FEDNA, 2016). Generalmente, tanto la pulpa de limón como la pulpa de naranja son bien aceptadas por los rumiantes, pero la pulpa y las cáscaras de los limones son algo más aceptables que las de naranja y pomelo (Bath et al., 1980). En este sentido, Todaro et al. (2017), tras incluir pulpa de limón fresco con una relación de 1 y 2 kg/día en la dieta de ovejas lecheras, observaron que su inclusión aumentó la ingesta y que la inclusión de 1 kg/día de pulpa de limón fresco podría reemplazar 200 g de concentrado en la dieta de las ovejas lecheras, además la inclusión de 2 kg/día aumentó el contenido de ácido vaccénico (C18:1 trans-11) y ruménico (C18:2 cis-9, trans-11-CLA) en la leche. Sin embargo, Williams et al. (2018), con una inclusión de un 13 % de pulpa de cítricos ensilados en la dieta de vacas Holstein, observaron que la ingestión disminuyó por la elevada humedad y el exceso de piel y albedo grueso del subproducto que redujo su palatabilidad. Con respecto a la composición de la leche la inclusión de pulpa de cítricos en pequeños rumiantes puede mejorar las características de la calidad de la leche y composición del queso mejorando sus características sensoriales con una mayor aceptación por parte del consumidor (Salvador et al., 2014). También incrementa el contenido de grasa (Liotta et al., 2019), el ácido vaccénico y ruménico o el contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante en quesos (Todaro et al., 2017).

Otros dos subproductos generados a gran escala en España son el bagazo de uva y el orujo de aceituna. Actualmente se cultivan 931.000 ha de viñedo para vinificación con la obtención de 45 millones de hectolitros. Con respecto al olivar la superficie actual es de 2.515.807 ha con una producción de 1.870.000 t de orujo sin desgrasar (MAPA, 2021). El bagazo de uva está formado por tallos, piel, pulpa, semillas y racimos, sin embargo, el orujo de aceituna está formado por pulpa, piel y hueso. Ambos subproductos presentan un elevado contenido en fibra dando lugar a un valor energético bajo. También presentan un valor proteico bajo debido a su nivel limitado y a la baja degradabilidad y digestibilidad intestinal (FEDNA, 2016). Como es habitual, la mayor parte de los trabajos de investigación encontrados sobre la inclusión de estos subproductos en las dietas de rumiantes se centran principalmente en su efecto sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. Chiofalo et al. (2004), con la inclusión de un 20 % de torta de aceituna en la alimentación de ovejas de aptitud lechera encontraron una mejora en las características dietético-nutricionales debido a un aumento de la relación ácidos grasos insaturados (UFA)/saturados (SFA) y por la disminución de los índices de aterogenicidad (IA) y trombogenicidad (IT). También Symeou et al., 2021 con la inclusión de un 10 y un 20 % de ensilado de orujo de aceituna como sustituto del forraje en dietas ovinas de raza Chios consiguió mejorar el contenido de ácidos grasos (AG) de la leche y, por lo tanto, los lípidos del queso Halloumi producido. Su inclusión incrementó linealmente la concentración en leche de AG insaturados totales hasta un 20 %, los AG monoinsaturados hasta 23 %, los AG poliinsaturados hasta 11 %, y el ácido ruménico hasta 61 %. Con ello se redujeron los índices de aterogenicidad

y trombogenicidad de la leche en un 31 % y 27 %, para la inclusión de un 10 y 20 % respectivamente, en comparación con el tratamiento control. Además, estas diferencias se trasladaron al perfil de lípidos del queso Halloumi que mostró, en promedio, un aumento de más del 25 % de AG insaturados, poliinsaturados y monoinsaturados, con un contenido de ácido oleico y ruménico particularmente mejorados. Estos cambios dieron como resultado una aterogenicidad reducida en un 29 % y un 45 % y una trombogenicidad en un 23 % y un 24 % del queso Halloumi elaborado con leche obtenida con las dietas con una inclusión de un 10 y 20 % de ensilado de orujo de aceituna respectivamente. Resultados similares fueron encontrados por Neofytou et al. (2021) con una inclusión en la dieta de vacas lecheras Holstein-Friesian de un 10 % de ensilado de orujo de aceituna, observando una disminución significativa de los AG de cadena media, en particular el palmítico, mientras que en los AG monoinsaturados hubo un incremento de C18:1 cis-9 y con respecto a los PUFA la concentración de C18:2 cis-9, trans-11-CLA presentó una tendencia a incrementarse. Calabrese et al. (2023) con suplementos de un 8 % orujo de aceituna en la dieta de vacas lecheras observaron también una mejora en la calidad en el queso Provola con respecto al contenido de polifenoles, PUFA y proteínas, al igual que Correddu et al. (2023), que con la inclusión de subproductos de aceituna en la alimentación de rumiantes observaron un aumento de la concentración de los ácidos oleico, vaccénico y ruménico en la leche.

Con respecto al uso de subproductos procedentes de la viticultura o de la industria vinícola, los datos disponibles son escasos para pequeños rumiantes, Molina et al. (2008), mediante su estudio de subproductos procedentes de la viticultura y la industria del vino, ponen de manifiesto que el uso de una combinación de los diferentes subproductos como brotes de vid, orujos de uva blanca, tinta, de Jerez y lías de vino y orujo de uva más lías pueden representar una valiosa fuente de energía y proteínas para la alimentación de los rumiantes. También en estudios realizados por Nudda et al. (2019), utilizando un 4,5 % de orujo de uva en la alimentación de ovejas, observaron un incremento de la producción de leche. Según una revisión bibliográfica realizada por Correddu et al. (2023), la inclusión de subproductos de uva en la dieta de vacas lecheras no evidenció ningún efecto negativo en la producción de leche ni en el contenido de grasa y proteína, si se incluía en concentraciones de ≤ 150 g/kg de materia seca (MS). Sin embargo, inclusiones mayores podrían conllevar efectos negativos por su alto contenido en lignina y taninos condensados, que son conocidos por su efecto antinutricional. Estos autores ponen de manifiesto que la inclusión de subproductos de la uva mejora la calidad nutricional de la grasa de la leche, con una reducción de SFA y un aumento de MUFA y PUFA, en particular de las concentraciones de ácido ruménico, ácido linoleico y ácido vaccénico.

1.4. Subproductos de productos hortícolas

Se han evaluado diversos subproductos hortícolas en la dieta de rumiantes. Romero-Huelva et al. (2012) estudiaron la inclusión de subproductos de tomate y pepino en la alimentación de cabras Murciano-Granadinas y pusieron de manifiesto que un reemplazo de un 35 % de concentrado con subproductos de tomate y pepino no comprometió la digestibilidad aparente

de los nutrientes, ni la producción y composición de la leche, observándose en la composición de la leche concentraciones más altas de linoleico, linolénico y PUFA totales con respecto a la dieta convencional. Arco-Pérez et al. (2017), evaluaron la incorporación de ensilados de tomate enriquecido con aceite de girasol (20 g/kg MS) en las dietas de cabras Murciano-Granadinas y encontraron un mayor contenido en ácido vaccénico, C20:2 y ácido linoleico conjugado (CLA) en la leche. La inclusión de torta de linaza extruida de 5 y 10 % en la dieta de cabras lecheras no influyó en la concentración de ácidos grasos de C6:0 a C12:0, disminuyendo las concentraciones de C14:0 y C16:0 y aumentando la cantidad de C18:1 trans-11 y C18:2 cis-9, trans-11-CLA conforme aumentó el porcentaje de inclusión de linaza extruida (Nudda et al., 2006). También, una dieta de heno de alfalfa peletizada con un 36 % de pulpa de remolacha seca en la alimentación de ovejas Comisanas dio lugar a un incremento en la concentración de ácidos grasos de cadena impar y ramificada (OBCFA) y de PUFA n-3 en la leche (Campioni et al., 2020).

En conclusión, todos estos trabajos de investigación ponen de manifiesto que el uso de subproductos agroindustriales puede representar una fuente de energía y proteínas para rumiantes y potencialmente permitir la obtención de productos lácteos con mayor valor añadido, más sostenibles, seguros y con menor impacto ambiental. Es fundamental evaluar nuevos subproductos o formas de presentación como fuentes de alimentación y aportar las bases científicas para su adecuada inclusión en dietas equilibradas. Adicionalmente, es esencial evaluar el efecto que los subproductos puedan tener en la calidad de la leche y sus productos transformados pues la mayor parte de la producción de leche, en ganado caprino se destina a la elaboración de quesos y leches fermentadas.

1.5. Subproductos de alcachofa y brócoli en alimentación de rumiantes.

En este apartado nos centramos en la literatura científica disponible sobre la inclusión de subproductos de alcachofa y brócoli en la dieta de pequeños rumiantes. Meneses et al. (2007) ensilaron microsilos de subproducto industrial de alcachofa, y observaron una buena aptitud para el ensilado, olor agradable y buenas características visuales con una estabilización después de 12 días de ensilado y un pH de 4,1 al final del proceso. Otros estudios han puesto de manifiesto que el ensilado de planta de alcachofa presenta un contenido entre un 1-3 % en carbohidratos superior al de los ensilados convencionales (Zhang et al., 2018) y en el caso de ensilado de brácteas de alcachofa dada la alta producción de ácidos grasos volátiles (AGV) generados durante la fermentación se considera que ésta sigue una vía heterofermentativa (Meneses et al., 2020). También Meneses et al. (2020) estudiaron el efecto del ensilado en subproductos de alcachofa cruda y brócoli hervido en prueba piloto en bolsas de plástico durante 24 días. La digestibilidad in vivo de la materia seca fue similar y alta en ambos ensilados, pero las digestibilidades de PB y FND fueron mayores en el ensilado de brócoli hervido. Zhuoyan et al. (2020) evaluaron el proceso de fermentación del ensilado en subproductos de la alcachofa (tallos y hojas) en el contenido de polifenoles y terpenos produciéndose un aumento de los mismos, considerando que el ensilado es una biotecnología potencial para la conservación a largo plazo de componentes bioactivos como polifenoles y terpenos en subproductos de

alcachofa. Monllor et al. (2020), caracterizaron el proceso de ensilado de 21 silos comerciales de pacas redondas (300 kg y 0,64 m³) de planta y brácteas de alcachofa y subproducto de brócoli. La estabilización de los ensilados se logró en el día 30 y la calidad del ensilado se mantuvo alta hasta al menos, el día 200, último día de control realizado. No hubo pérdidas importantes de MS a lo largo de ese tiempo, y se observaron algunas diferencias significativas en la composición nutricional, especialmente en proteína bruta y fracciones fibrosas, pero no fueron relevantes para la pérdida de nutrientes. Otros autores encuentran resultados similares a los mencionados anteriormente, manifestando también que es posible producir ensilados similares al ensilado de maíz a partir de subproductos de alcachofa verde/fresca tanto en términos de propiedades organolépticas como de contenido en nutrientes (Demirci et al., 2023). Es importante destacar que todos los estudios en que se evaluaron los residuos de productos fitosanitarios en los ensilados observaron que éstos estaban libres de residuos y para aquellas sustancias que consiguieron detectarse se obtuvieron siempre valores muy inferiores a los límites máximos de residuo establecidos por la Unión Europea.

Un factor clave para la idoneidad de estos ensilados como alimento es asegurarse de que su inclusión a largo plazo (a lo largo de una lactación completa de los animales) no tenga efectos negativos sobre la salud y el rendimiento del animal, ni sobre la composición del producto obtenido y características tecnológicas de los productos lácteos elaborados. Desde este punto de vista, recientemente se han llevado a cabo trabajos de investigación que pretenden establecer la inclusión óptima de ensilados de planta de alcachofa y subproductos vegetales de brócoli y alcachofa en dietas isoproteicas e isoenergéticas, formuladas para cabras de ordeño Murciano-Granadinas.

En este sentido, Monllor et al. (2020a) realizaron un primer estudio de inclusión de un 12,5 y 25 % de ensilados de planta y subproductos de brácteas de alcachofa en la ración de cabras Murciano-Granadinas durante un corto plazo de tiempo de cuatro meses donde no observaron diferencias marcadas en la producción y calidad de la leche ni en el estado sanitario de los animales y desde el punto de vista de calidad nutricional para la salud humana, observaron que la leche presentaba un perfil de lípidos y minerales ligeramente mejor en el ensilado de planta de alcachofa. Posteriormente, Monllor et al. (2020b) realizaron otro estudio para evaluar el efecto a corto plazo durante cuatro semanas de tres nuevos niveles de inclusión (25 %, 40 % y 60 %) de ensilados de PA y SB en dietas de cabras Murciano-Granadinas. La inclusión de un 60 % de ensilados de PA y SB ocasionaron una reducción de la producción de leche. La inclusión de PA en la dieta de los animales mejoró la calidad nutricional del perfil lipídico de la leche (menores índices de IA y IT) en comparación con SB debido a un menor contenido de ácidos grasos saturados (C12:0, C14:0 y C16:0) y una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido vaccénico y ácido ruménico, sin mostrar diferencias con el tratamiento de control. Este último estudio fue definitivo para diseñar Monllor et al. (2020c) un nuevo estudio con una inclusión del 40 % de ensilados de PA y SB a lo largo de la lactación en cabras lecheras Murciano-Granadinas. En éste, se corroboró que la calidad nutricional del perfil graso en leche de cabras alimentadas con PA, fue el más beneficioso por su menor relación n6/n3, en especial

al final de la lactación. En cuanto a la inclusión de SB, debido a su menor MS que el ensilado de PA, era necesario incluir un mayor volumen en la ración, lo que reducía la ingesta y en consecuencia provocaba una disminución en la producción de leche y una menor recuperación de las reservas corporales al final de la lactación, junto con unos peores índices de IA y IT.

Como conclusión de estos estudios, el ensilado de PA se considera una alternativa eficiente para el aprovechamiento de los restos de cultivo de la producción de alcachofa, permitiendo la obtención de un ingrediente de alto valor en las dietas de rumiantes y la producción de leche con potenciales beneficios para la salud humana. Sin embargo, respecto al ensilado de SB es conveniente estudiar la inclusión de una menor cantidad de este ingrediente en la ración, especialmente durante el pico de la lactación, o la presentación de SB de otras formas que estimulen su ingesta, con el fin de mantener el rendimiento animal y a su vez potenciar la economía circular.

1.6. La leche de cabra: producción y calidad.

España ocupa el segundo lugar de la Unión Europea (UE-27) en el censo de ganado caprino con 2.589.800 cabezas (MAPA, 2021b). El primer puesto lo ocupa Grecia con un total 2.806.800 cabezas. Otros países representativos son Rumania (1.616.600), Francia (1.387.800) e Italia (1.068.800). En España, el censo de hembras en ordeño de ganado caprino es de 1.219.835 número de animales (MAPA, 2021b). La distribución del censo de hembras caprinas en ordeño por Comunidades Autónomas es la siguiente: Andalucía representa un 39,6 % (482.855), Castilla-La Mancha un 15 % (181.705), Extremadura un 11,4 % (138.692), Canarias un 10,4 % (126.428), Murcia un 9,6 % (116.733), Castilla y León 6,5 % (79.083) y el resto de comunidades representan solamente un 7,7 % con respecto al total (Figura 17). En la Figura 18 puede observarse la evolución del censo total de cabras en ordeño entre los años 2017-2021. A lo largo de este período se observan fluctuaciones con un descenso entre el año 2020 y 2021 del 1,1 % (MAPA, 2021b).

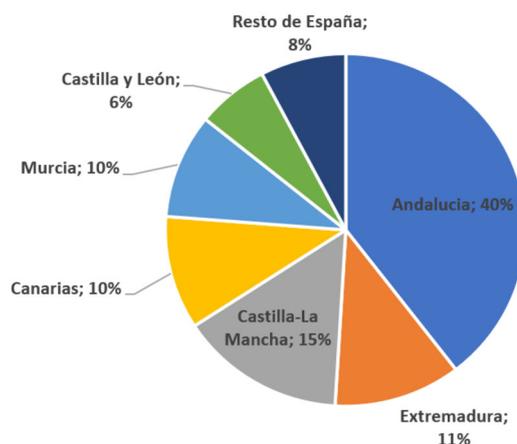


Figura 17. Distribución del censo de hembras caprinas en ordeño por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021b)



Figura 18. Evolución del censo total de cabras en ordeño en España durante el período 2017-2021 (MAPA, 2021b)

En la Figura 19 también puede observarse la evolución de cabras en ordeño en las diferentes Comunidades Autónomas en los últimos cinco años (2017-2021), observándose en todas ellas una mayor disminución de cabras en ordeño en 2021 con respecto 2017. Castilla-La Mancha presenta un mayor descenso (-43.614), seguida de Andalucía (-37.310), Canarias (-25.728), Extremadura (-13.377) y Murcia (-7.831). En Castilla y León se observa un aumento de 8.996 cabras en ordeño.

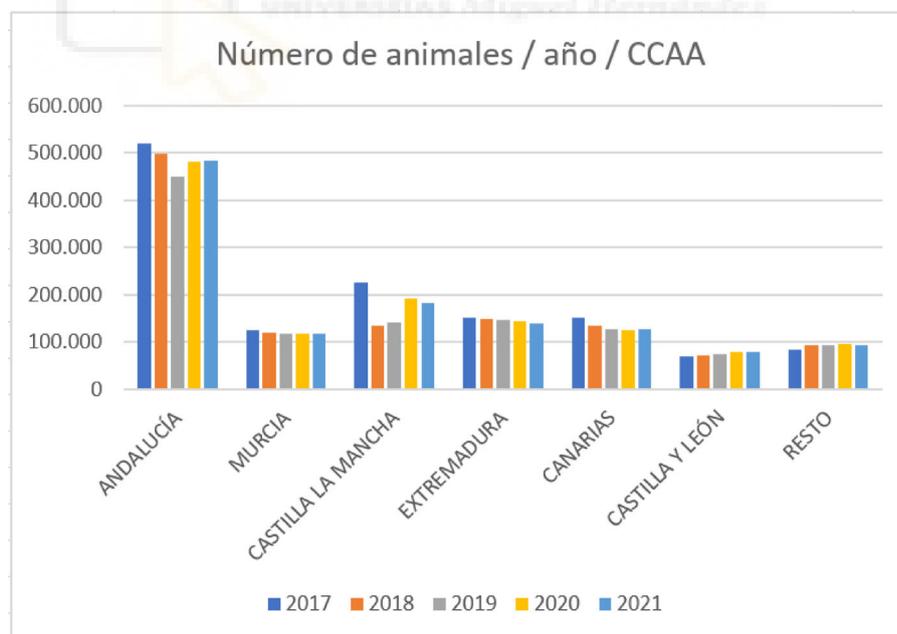


Figura 19. Evolución en diferentes Comunidades Autónomas de cabras en ordeño durante el período 2017-2021 (MAPA, 2021b)

La producción de leche de cabra en la UE-27 en el año 2021 fue de 1.780 miles de toneladas. Francia ocupa el primer puesto con un valor de 526.000 t, seguida de España con 504.000 t, Países Bajos con 383.000 t, Grecia con 164.000 t, Bélgica 71.000 t y el resto de países representan

un 8,2 % con respecto al total. En la Figura 20 puede observarse el porcentaje que representan cada uno de los países con la producción total.

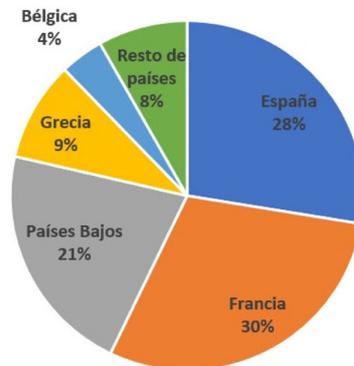


Figura 20. Porcentaje de producción de leche de cabra en distintos países de la Unión Europea (MAPA, 2021b)

En la Figura 21 puede observarse la evolución de la producción de leche de cabra expresada en miles de litros durante el período 2017-2021. Se observa una disminución de 20 miles de litros en 2021 con respecto al 2017, aunque la producción se mantiene prácticamente constante entre el año 2020 y 2021. Sin embargo, en la evolución de los precios promedios de la leche de cabra se ha producido un incremento entre el período 2017-2021, pasando de 7,0 euros/hgdo⁻¹ en 2017 a 9,3 euros/hgdo⁻¹ en 2021. La leche de cabra en 2021 respecto a 2020, sólo es responsable del 0,3 % de volumen y 0,5 % del valor con respecto a la producción total de leche en España, aunque experimenta una evolución positiva creciendo en volumen un 30,7 % y en valor un 30,1 % (MAPA 2021b). Con respecto a la producción de leche de cabra en las distintas Comunidades Autónomas, Andalucía (220.930 t) es la primera productora y representa más de un 46 % sobre la producción total en España, le siguen Castilla-La Mancha con 77.163 t. Canarias y Murcia con prácticamente la misma producción 50.875 t y 50.757 t, respectivamente, Extremadura con 40.893 t, Castilla y León con 29.878.

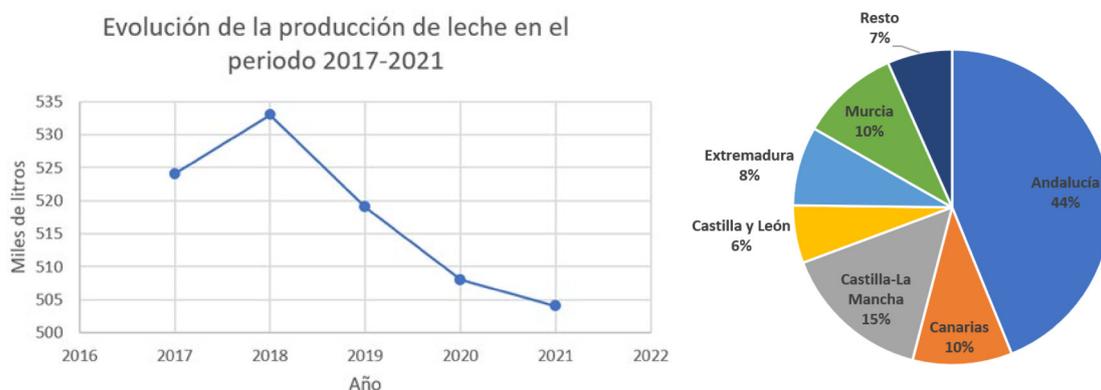


Figura 21. Evolución de la producción de leche en España entre 2017 y 2021 y porcentaje de producción de leche de cabra por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021b)

En España el consumo (ingesta per cápita) de leche líquida de cabra fue ligeramente superior en 2021 vs. 2020 siendo actualmente de 0,18 litros (MAPA 2021b). En realidad, el 90 % de la producción de leche de cabra se destina para la industria láctea, con un 64 % para la transformación en quesos y un 20 % para la elaboración de productos lácteos como leches fermentadas tipo yogur. El consumo per cápita de yogur en 2021 fue de 9,62 kg por persona y presentó una cuota del 40,2 % del volumen y en valor un 23,9 % dentro de derivados lácteos (MAPA 2021b), si bien estos valores incluyen yogures de todas las especies.

La composición promedio de la leche de cabra no difiere notablemente de la leche de vaca. Sin embargo, la leche de cabra posee características beneficiosas frente a la leche de vaca y que incluyen: mejor digestibilidad; glóbulos de grasa más pequeños en diámetro y mejor distribuidos en la emulsión de la leche; mayor contenido de zinc, hierro y magnesio; un menor contenido de α 1-caseína (menor alergenicidad); un mayor contenido de selenio y enzima glutatión peroxidasa confiriéndole mayores propiedades antioxidantes que la leche de vaca (Park et al. 2007; Vargas et al. 2008; Domagala et., 2009; Slařcanac et at., 2010; Küçükçetin et al., 2011; Biadala et al., 2018).

La leche de cabra contiene aproximadamente un 3,5 % de proteína siendo las principales: las caseínas (β -caseína, α 1-caseína, α 2-caseína, κ -caseína) que representan el 80 % de la proteína de la leche y proteínas de suero (albúmina sérica, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas (IgG, Ig, IgM), proteosas-peptonas, lactoferrina y lisozima) que representan el 20 % (Biadala et al., 2018; Nayik et al., 2022). La principal fracción de la caseína es la β -caseína con un 50-64 %, le sigue la α 2-caseína con un 25 % y la κ -caseína entre un 10-20 % con respecto al porcentaje de proteína (Biadala et al., 2018). Con respecto a la α 1-caseína, en la leche de cabra representa solo un 5 % y en algunas razas está completamente ausente, mientras que en la leche de vaca representan un 35 % del total de caseínas. Esta fracción de caseína es responsable de desencadenar reacciones alérgicas y esto hace que la leche de cabra pueda ser un buen sustituto de la leche de vaca para algunas alergias o intolerancias (Vargas et al. 2008; Biadala et al., 2018).

Con respecto a las proteínas del suero, la β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina representan el 80 % de las proteínas del suero. El contenido en β -lactoglobulina en la leche de cabra es menor (40 % sobre proteínas del suero) que en la leche de vaca (50 % sobre proteínas del suero), mientras que el porcentaje de α -lactoalbúmina es superior en la leche de cabra (40 %) con respecto a la leche de vaca (25 %) (Biadala et al., 2018). La β -lactoglobulina es una fuente de péptidos con propiedades bioactivas como antihipertensivas, antioxidantes y anticancerígenas, pudiendo ser además responsable de la unión de sustancias químicas como la vitamina A, cloruro de mercurio, ácidos grasos de cadena larga y también favorece la actividad de las enzimas lipolíticas y reduce la oxidación de las grasas en los productos lácteos. La α -lactoalbúmina también es buena fuente de aminoácidos esenciales como el triptófano y cisteína que son precursores de serotonina y glutatión. Además, se caracteriza por ser transportadora

de iones como el calcio, zinc, cobalto y magnesio (Parck 2009; Biadala et al., 2018; Nayik et al., 2022).

Con respecto a la fracción grasa en la leche de cabra se encuentra en emulsión en forma de glóbulos de grasa. El tamaño del glóbulo de grasa es más pequeño en la leche de cabra con un diámetro promedio de 2,76 μm (0,73 μm -8,58 μm) con respecto a la leche de vaca 3,51 μm (0,92 μm -15,75 μm) haciendo que la leche de cabra presente una mejor digestibilidad. Los triglicéridos constituyen un 98-99 % del glóbulo de grasa. El 1-2 % restante está constituida por: (1) fosfolípidos (0,2-1,0 %), (2) diglicéridos (0,3-1,6 %) (3) ácidos grasos libres (0,1-0,4 %), (4) cerebrosídeos (0,01-0,07 %), (5) esteroides (0,2-0,4 %) y (6) monoglicéridos (0,002-0,1 % (Parck et al., 2007; Parck et al., 2009; Biadala et al., 2018).

Uno de los aspectos más interesantes de la leche de cabra se refiere a la naturaleza de su grasa, una grasa rica en triglicéridos de cadena corta compuesta de 6-10 átomos de carbono, conocidos como caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) (Serhan et al., 2016) que representan aproximadamente un 15 % del contenido total de la grasa de la leche (Biadala et al., 2018). Estos ácidos grasos presentan valores superiores en la leche de cabra que en la leche de vaca: C6:0 (2,4 %-1,6 %); C8:0 (2,7 %-1,3 %); C10:0 (10,0 %-3,0 %), respectivamente (Parck et al., 2007). Esta característica proporciona a la leche de cabra el distintivo "aroma de cabra" debido al alto contenido en ácidos grasos libres (5,65 mg/dm^3) y, en parte, también al enzima lipoproteína lipasa, localizada en la superficie de los glóbulos grasos (46 %), en el suero de la leche (46 %) y en la superficie micelar de las caseínas (8 %), siendo la leche de cabra más propensa a la lipólisis y más susceptible a la lipólisis espontánea debido al enfriamiento de la leche (Biadala et al., 2018).

De igual forma la presencia de una mayor concentración de ácidos grasos de cadena impar y ramificada en la leche de cabra (OBCFA), debido a la lipólisis, considerados como ácidos grasos libres, durante la transformación de la leche en productos lácteos como leches fermentadas tipo yogur y quesos, confieren también un distintivo sabor a "cabra" al producto lácteo terminado (Watkins et al., 2021). Otros ácidos grasos de relevancia son los conocidos con las siglas CLA (ácido linoleico conjugado), un grupo de isómeros del ácido linoleico que presentan dobles enlaces conjugados en varias posiciones y conformaciones. Los dos isómeros de CLA biológicamente activos son el ácido ruménico que constituye más del 82 % de todos los isómeros de CLA detectados en los productos lácteos y el isómero 18:2 trans-10, cis-12, significativamente menor, oscila alrededor de un 20 % (Lu et al., 2016; Nayik et al., 2022). El ácido vaccénico es otro ácido graso que podemos encontrar en la leche de cabra, es un isómero de ácido oleico, con el doble enlace en la posición $\Delta 11$. Ambos ácidos grasos el ruménico y el vaccénico se consideran sustancias bioactivas y se han relacionado con acciones beneficiosas para la salud humana como son efectos anticancerígeno y antiaterogénico, entre otros (Parck, 2009; Biadala et al., 2018; Nayik et al., 2022). Ambos se sintetizan en el rumen por biohidrogenación a partir de los ácidos grasos poliinsaturados ingeridos en la dieta (Ferlay et al., 2017). La leche de cabra cuenta con un mayor contenido de ácido α -linolénico (ALA; C18:3n3) y por tanto con una relación ácidos grasos

omega 6/ácidos grasos omega 3 [n6/n3] más beneficiosa para la salud humana (Nudda et al., 2020).

Otro componente que forma parte de la composición de la leche es la lactosa (el azúcar de la leche). La proporción de lactosa en la leche de cabra es de 0,2-0,5 % menor que en la leche de vaca (Pandya et al., 2007) y contiene entre cuatro o cinco veces más oligosacáridos (250-300 mg/L) que la leche de vaca, además, presentan una estructura compleja y similar a los encontrados en la leche materna, por eso puede ser utilizada la leche de cabra como leche infantil para recién nacidos (Martínez-Férez et al., 2006). La lactosa se sintetiza en el aparato de Golgi de los galactocitos a partir de la glucosa procedente del torrente sanguíneo y se libera al lumen alveolar conjuntamente con las proteínas. Este disacárido favorece la absorción de calcio en el intestino delgado y facilita la conversión de iones de calcio en eritrocitos y mejora la absorción de magnesio, fósforo y otros elementos. Además, tiene un efecto positivo en la utilización de la vitamina D por parte del organismo y es una fuente natural de glucosa, que interviene en la síntesis de importantes relaciones estructurales del sistema nervioso (Biadala et al., 2018). Sin embargo, hay personas con intolerancia a la lactosa debido a una disminución en la actividad o la ausencia de la enzima β -galactosidasa. Por eso, se recomienda a estas personas consumir productos lácteos fermentados que contengan lactosa hidrolizada (hasta un 50 % de su contenido original) y β -galactosidasa activa producida por las bacterias ácido lácticas (Ziarno et al., 2005).

Los minerales de la leche afectan a las propiedades físicas de la leche, principalmente a la estabilidad proteica. Los principales minerales en la leche de cabra son calcio, fósforo, potasio y cloro, sin embargo, aunque es deficiente en hierro y cobre. Por otra parte, el contenido de magnesio (15-18 mg/100 g) y el alto contenido en selenio (0.013 mg/kg) y la enzima glutatión peroxidasa (57,3 mU/mL) le confieren importantes propiedades antioxidantes (Haenlein et al., 2006; Park et al., 2007). También, la leche de cabra se considera una buena fuente de retinol, vitaminas B, especialmente B1 y B2, vitamina C y niacina (Biadala et al., 2018).

La investigación en la mejora de la calidad nutricional de la leche se ha enfocado hacia estrategias de alimentación adecuadas para incrementar el contenido de los ácidos grasos con propiedades beneficiosas en la salud humana. Una de las estrategias, consiste en aumentar la cantidad de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, linolénico), la reducción de ácidos poliinsaturados n-6 a n-3 y el incremento de ácido vaccénico y ácido ruménico en la leche. Este objetivo puede conseguirse con un aumento en la proporción de forraje o mediante la inclusión en la alimentación de subproductos agroindustriales, como por ejemplo, orujo de uva, orujo de aceituna, levadura de cerveza, subproductos de granada, tomate, ensilados de planta de alcachofa y de subproductos de alcachofa y brócoli (Molina et al., 2008; Romero et al., 2017; Monllor et al., 2020a, b, c; Monllor et al., 2021; Neofytou et al., 2021; Calabrese et al., 2023; Correddu et al., 2023).

1.7. Leches fermentadas

Las leches fermentadas son alimentos percibidos positivamente por los consumidores como alimentos saludables debido a su digestibilidad e incorporación de microorganismos vivos. En la leche, la lactosa es la principal fuente de energía y carbono para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) que la transforman en ácido láctico, proporcionando a las leches fermentadas el sabor ácido característico (Cheng, 2010). La formación de productos debido al metabolismo de la lactosa en función de la especie de BAL puede ser debido a dos tipos principales de fermentación, conocidas como “homofermentación” y “heterofermentación”. Las vías homofermentativas generan principalmente ácido láctico mientras que en el metabolismo heterofermentativo, aunque el ácido láctico sigue siendo mayoritario, se forman también otros metabolitos, como etanol, dióxido de carbono o ácido acético (Cheng, 2010). Durante la fermentación las BAL realizan varias transformaciones bioquímicas en los componentes de la leche: como ya se ha comentado, (1) una glucólisis (degradación de los hidratos de carbono en ácido láctico y otros metabolitos); (2) proteólisis (hidrólisis de caseínas en péptidos y aminoácidos libres) y (3) lipólisis (degradación de la grasa en ácidos grasos libres). Estas reacciones metabólicas dan lugar también a compuestos aromáticos o precursores de aromas, principalmente como acetaldehído, etanol y diacetilo (McSweeney et al., 2000; Cheng, 2010).

Generalmente, para la elaboración comercial de leches fermentadas se utilizan cultivos mixtos comerciales constituidos por una mezcla de cultivos iniciadores termófilos, principalmente *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La principal propiedad del *S. thermophilus* para su aplicación en la elaboración de leches fermentadas es su capacidad para metabolizar rápidamente la lactosa y producir ácidos (Yu et al., 2020). Sus otras propiedades esenciales es su actividad ureasa, actividad proteolítica, producción importante de metabolitos como el acetaldehído y producción de exopolisacáridos que afectan fuertemente el sabor y la textura del producto final (Yamauchi et al., 2019; Markakiou et al., 2020). Con respecto, al *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se le atribuye un importante desarrollo de compuestos volátiles responsables del aroma y sabor de las leches fermentadas como la producción de ácido láctico. Actualmente sobre el *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se han llevado estudios donde ponen de manifiesto que cepas diferentes pueden actuar de modo distinto con respecto al tiempo de fermentación, velocidad de acidificación y producción de diferentes compuestos volátiles como el acetaldehído en las leches fermentadas (Liu et al., 2016; Dan et al., 2019).

La simbiosis entre ambos microorganismos mejora la tasa de crecimiento y el tamaño de cada población microbiana y la tasa de acidificación (Arioli et al., 2017; Dimitrellou et al., 2019; Markakiou et al., 2020; Yu et al., 2020). El *S. thermophilus*, gracias a los aminoácidos y péptidos producidos *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presenta un crecimiento rápido, mientras que este último se beneficia del ácido fórmico, fólico y pirúvico, así como de dióxido de carbono, glutatión y ácidos grasos de cadena larga producidos por *S. thermophilus* (Sieuwerts et al., 2008; Wang et

al., 2016). Así mismo, para la elaboración de quesos tiernos, semicurados y curados, así como mantequilla o buttermilk se utilizan principalmente cultivos iniciadores mesófilos. Algunos cultivos comunes son mezclas de *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), microorganismos mesófilos, caracterizados por buenas actividades acidificantes, formación de exopolisacáridos, capacidad proteolítica y producción de aromas debido a la formación de compuestos de sabor a diacetilo por el metabolismo del citrato de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, y también pueden incluir bacterias termófilas (*S. thermophilus*) para lograr una producción de ácido láctico aún más rápida durante la elaboración del queso (Grattepanche et al., 2005).

El yogur obtenido de la leche de cabra difiere en algunas propiedades fisicoquímicas, como la firmeza del coágulo, que tiende a ser suave y menos viscoso que el yogur obtenido de leche de vaca (Vargas et al., 2008). Estas diferencias observadas pueden ser debidas al contenido de caseínas y la estructura micelar de las mismas en la leche de cabra (Martín et al., 2009). Como se ha comentado anteriormente, la leche de cabra tiene un contenido de caseínas ligeramente menor que la leche de vaca, con una baja proporción o casi ausencia de α 1-caseína mientras que tiene un mayor grado de dispersión de la micela de caseína (Herrero et al., 2006). También, hay que tener en cuenta que los cambios en los equilibrios de proteínas y minerales de la leche también pueden alterar las propiedades del yogur (Cheng et al., 2002). Para mejorar las propiedades reológicas del coágulo, así como sus propiedades funcionales, pueden incorporarse cepas adjuntas con los cultivos mixtos iniciadores. El primer paso, es el conocimiento del efecto de bacterias individuales sobre las propiedades de las leches fermentadas para seleccionar las cepas en base a las mejores propiedades tecnológicas y funcionales desarrolladas (Li et al., 2017), ya que incluso las cepas de la misma especie pueden desarrollar notas sensoriales diferentes en los productos finales. Es importante tener en cuenta que un buen cultivo adjunto no debe afectar negativamente las características sensoriales y de calidad de los productos lácteos y proporcionar propiedades beneficiosas (Champagne et al., 2018).

El *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* generalmente se incorporan por sus actividades acidificantes y proteolíticas. La biovariedad *diacetylactis* de *L. lactis* subsp. *lactis* es muy aromatizante por la formación de diacetilo por metabolismo del citrato. También pueden incorporarse, cepas de *Lactococcus* sp., que producen exopolisacáridos que desempeñan un papel importante en la mejora de la textura y la reducción de la sinéresis (Duboc et al., 2001; Grattepanche et al., 2005). Recientemente, otros investigadores como Li et al. (2017) han utilizado diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* por sus excelentes propiedades de coagulación y proteolíticas junto a cultivos mixtos iniciadores (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y observaron cambios aparentes particularmente en la textura (adhesividad). Ru et al. (2016) ensayaron la incorporación de *Lactobacillus rhamnosus*, encontrando que se puede obtener yogur de leche de cabra de calidad con un 7 % de azúcar e inoculando un 3 % de cultivos en relación de 1:1:3 de *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, y *L. rhamnosus*. Observaron que en estas condiciones el contenido de ácidos grasos de cadena corta y cadena

media puede disminuir. *Lactobacillus casei* está comúnmente presente en productos lácteos crudos y fermentados, y se ha utilizado con éxito para el desarrollo de helados funcionales (Balthazar et al., 2018) y como potenciador del sabor en queso bajo en sodio (Silva et al., 2018). *Lactobacillus paracasei*, está estrechamente relacionado con *L. casei*. *Lactobacillus helveticus* también está comúnmente presente en los productos lácteos. *L. casei*, *L. paracasei* y *L. plantarum* se consideran probióticos potenciales según Hill et al. (2014). Estudios previos señalan que la leche de cabra es un vehículo adecuado para los probióticos (Ranadheera et al., 2018). Otra especie láctica de interés es *Lactobacillus reuteri*, es productor de ácido fólico y vitamina B12, así como reuterina, que tiene propiedades antimicrobianas (Jones et al., 2009). También *Lactobacillus curvatus*, es una bacteria heterofermentativa facultativa comúnmente presente como BAL no iniciadora en quesos. Algunas cepas de *L. curvatus* pueden producir cambios microbianos intestinales asociados con la reducción de la obesidad (Park et al., 2013).

Otra estrategia para mejorar las propiedades reológicas del coágulo, así como sus propiedades funcionales, es la incorporación de ingredientes y extractos, en muchos casos vegetales, que se añaden directamente a la leche en determinadas concentraciones para posteriormente proceder a la elaboración de leches fermentadas. Algunos ejemplos son los estudios realizados por Inglingstad et al., 2014; Arco et al., 2017; Cano-Lamadrid et al., 2017; Wang et al., 2018; Samah et al., 2020 y Calabrese et al., 2023.

En los últimos años, la investigación en la mejora de la calidad nutricional de la leche se ha enfocado hacia estrategias de alimentación adecuadas para incrementar el contenido de los ácidos grasos con propiedades beneficiosas en la salud humana. Resulta por tanto coherente que todos los estudios sobre la inclusión de subproductos en la dieta de cabras lecheras se hayan enfocado a determinar el perfil lipídico. No obstante, es necesario determinar también las propiedades de la leche obtenida para su transformación y la calidad de los productos obtenidos. Hasta el momento no se disponía de trabajos de investigación donde se hubiera utilizado para la elaboración de leches fermentadas leche de cabras alimentadas con ensilados de subproductos vegetales a lo largo de la lactación. Por tanto, resultaba necesario realizar estos estudios para evaluar posibles cambios en sus propiedades funcionales, y lo que es más importante probar su adecuación tecnológica para la transformación de la leche en productos lácteos fermentados.



Objetivos

2. Objetivos

El objetivo principal de la Tesis Doctoral consiste en evaluar el efecto de la inclusión de ensilados de restos de cultivo de alcachofa, de subproductos de la industria de transformación de alcachofa y del brócoli en la calidad de las leches fermentadas obtenidas. Indirectamente, con este objetivo principal, se persigue contribuir a un mejor aprovechamiento de los restos del cultivo de la alcachofa, los subproductos generados en la industria de transformación de la alcachofa y del brócoli, abaratar los costes de la alimentación animal y contribuir a una economía circular.

Para conseguir dicho objetivo principal, se han realizado los siguientes estudios de investigación:

1. En el primer estudio se evaluó el efecto de la incorporación de ensilados de planta de alcachofa y subproducto de la industria de transformación de la alcachofa en la dieta de cabras lecheras (0 %, 12,5 % y 25 % de inclusión) sobre las propiedades tecnológicas y sensoriales de la leche fermentada.
2. El segundo estudio proporciona nueva información sobre la leche de cabra fermentada mediante el cribado de nueve cepas seleccionadas de bacterias lácticas (BAL) utilizadas como cultivos iniciadores únicos y un iniciador mixto para la fermentación de leche de cabra en función de su: (1) tasa de acidificación, (2) recuentos microbianos, (3) estabilidad del gel, (4) perfil de ácidos grasos, (5) metabolitos de fermentación: ácidos orgánicos, azúcares y perfiles volátiles y (6) olor.
3. En el tercer estudio el objetivo consistió en evaluar cómo afectaba a lo largo de la lactación la inclusión de un 40 % de ensilados de subproducto de brócoli y planta de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas, en la idoneidad de la leche producida para la elaboración de leches fermentadas por dos cultivos iniciadores mixtos comerciales de yogur (YO-MIX™ 300: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y queso (MA400: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus*).





Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

Este apartado incluye de forma resumida la información del organigrama del plan de investigación, instalaciones, metodología y técnicas analíticas aplicadas en el desarrollo de la tesis. De forma más extendida puede observarse en los artículos publicados incluidos en dicho documento.

3.1. Antecedentes y organigrama del plan de investigación

Esta tesis se ha desarrollado dentro del Proyecto de Investigación “Aprovechamiento del subproducto y plantas de brócoli y plantas de alcachofa en granjas de caprino lechero y su efecto en la producción y calidad funcional de leche y lácteos fermentados” concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad en el año 2015 (AGL2015-64518-R).

Para entender el desarrollo de esta Tesis se pasa en primer lugar a describir cronológicamente una serie de pasos previos llevados a cabo. Paralelamente a esta tesis doctoral y desde un punto de vista de Producción Animal se ha desarrollado una primera Tesis titulada “Valorización del Subproducto de Brócoli (*Brassica oleracea*, var. Italica) y del subproducto y la planta de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) para alimentación de cabras Murciano-Granadinas” (Monllor 2021). Uno de los objetivos principales en el desarrollo de ambas tesis fue establecer la inclusión óptima de estos subproductos en la ración de los animales a lo largo de la lactación y estudiar el efecto sobre el estado sanitario de los animales, producción, calidad nutritiva y funcional de la leche. Es importante destacar que ambas tesis están totalmente interrelacionadas en los diferentes ensayos previos al establecimiento de la inclusión óptima y su aplicación en la alimentación en las cabras a lo largo de la lactación y establecer cómo afecta a las características de la leche para la elaboración de leches fermentadas.

El primer estudio de investigación relacionado con la tesis fue el desarrollado por Monllor et al. (2020) para establecer la aptitud de estos subproductos en forma de ensilado y su posible aplicación. Este estudio ha puesto de manifiesto que estos subproductos pueden ser utilizados en la alimentación de cabras Murciano-Granadinas a lo largo de la lactación porque se mantienen estables sin afectar su composición nutricional hasta al menos el día 200 (último día de control) desde el ensilado (Monllor et al., 2020).

Una vez establecida la calidad de estos subproductos ensilados y la posible utilización, el segundo estudio para el desarrollo de la tesis fue establecer el porcentaje óptimo de la inclusión en la dieta de los animales. En primer lugar, se realizó un estudio a corto plazo con inclusión de un 12,5 y 25 % de ensilados de planta de alcachofa y subproducto de brócoli durante el período octubre-diciembre año 2015 y diciembre 2015-febrero 2016, respectivamente. Con estas inclusiones no se observaron cambios relevantes en la composición de la leche ni efectos negativos en el rendimiento productivo de los animales (Monllor et al., 2020a). Es en este punto donde se incluye el primer experimento de la presente tesis en que se estudiaron las propiedades tecnológicas de la leche así obtenida (Muelas et al., 2017).

A partir de estas conclusiones (Monllor et al., 2020b) realizaron un experimento también a corto plazo durante junio-julio del año 2016 con tres niveles de inclusión en la dieta con un 25 %, 40 % y 60 % de ensilados de subproductos de brócoli (*Brassica oleracea*, var. Italica) y planta de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). En este estudio se determinó que un 40 % de inclusión sería el recomendado sin efectos negativos sobre el estado metabólico de los animales, producción y composición de la leche.

En paralelo a dicho estudio, y como segundo experimento de la presente tesis se realizó un cribado de nueve cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas para la evaluación del desempeño y criterio de selección de los cultivos para posteriormente la elaboración de las leches fermentadas realizadas en esta Tesis doctoral (Muelas et al., 2018).

Con todas estas conclusiones se diseñó un experimento con la inclusión de un 40 % de ensilados de subproducto de brócoli y planta de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas a lo largo de una lactación completa y su posible efecto sobre la composición, características físico-químicas y propiedades funcionales en la leche y leches fermentadas y que constituye el tercer experimento de esta Tesis (Muelas et al., 2022).

3.2. Instalaciones

La Tesis Doctoral se ha desarrollado en parte en la Granja Docente y de Investigación de Pequeños Rumiantes con cabras Murciano-Granadinas ubicada en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Las instalaciones de la granja cumplen con el reglamento (CE) 853/2004, Anexo III, Sección IX, CAPT.1 y también cumplen con los criterios de Ecocondicionalidad y Bienestar Animal establecidos por la Generalitat Valenciana. Las cabras se ordeñaban una vez al día en la sala de ordeño tipo Casse con una máquina de ordeño en línea baja (Gea-Farm Technologies®, Bönen, Germany) constituida por 12 juegos de ordeño Top Flow (Gea-Farm Technologies®, Bönen, Germany). La leche una vez recogida en la unidad final de la máquina de ordeño se bombeaba a dos tanques de refrigeración de 600 y 800 L de capacidad situados en la sala de lechería y separada de la sala de ordeño. Los tanques de frío cumplen con las normas UNE-EN 13732-2003 donde se almacena la leche de dos ordeños diarios. La recogida de la leche por el camión cisterna es cada 48 horas con una temperatura de almacenamiento de la leche entre 2-4 °C.

3.3. Diseño experimental

La presente tesis consta de 3 artículos de investigación. A continuación, se describe el diseño experimental de cada uno de ellos.

ARTÍCULO 1: Inclusión de ensilados de planta de alcachofa y subproducto de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas. Efecto en las propiedades tecnológicas de la leche. ("Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By-Products Silages in the Diet of Dairy Goats").

Para este estudio se seleccionaron 69 cabras Murciano-Granadinas ($44,7 \pm 6,8$ kg de peso corporal), multíparas y en el tercer mes de lactación. Se distribuyeron en tres lotes homogéneos ($n = 23$ cabras por tratamiento) en función del número de lactación, producción de leche y estado sanitario de la glándula mamaria.

Al principio del experimento, cada lote estaba alojado en cubículos diferentes e independientes y se alimentaron con una dieta tradicional a base de heno de alfalfa, paja de cebada, avena y una mezcla de granos durante un período preexperimental (3 semanas). Se realizaron dos experimentos, correspondientes a dos niveles de inclusión de ensilados objeto de estudio, en las dietas de los animales. Para el Experimento 1 se utilizaron tres dietas durante 9 semanas: una dieta control (DC) sin adición de ensilado de subproducto de alcachofa y ensilado de planta de alcachofa; una segunda dieta que incorporaba un 12,5 % de ensilado de subproducto de alcachofa en la dieta convencional (SA12) y una tercera dieta con una inclusión de un 12,5 % de ensilado de planta de alcachofa (PA12). La adaptación de los animales a las nuevas raciones fue un período de 2 semanas.

Al primer experimento siguió un aumento del contenido de subproductos en la dieta (25 %) que se mantuvo durante 9 semanas. Así, en el Experimento 2 se utilizaron tres dietas: una dieta control sin adición de ensilado de subproducto de alcachofa (DC); una dieta que incorporaba un 25 % de ensilado de subproducto de alcachofa (SA25); y una dieta que incorporaba un 25 % de ensilado de planta de alcachofa (PA25). En este caso, se realizó un período de adaptación a las nuevas dietas de los animales de 4 semanas. Los ingredientes y la composición química en base seca de las dietas fueron descritas por Monllor et al. (2020a). En todo momento las dietas formuladas fueron isoenergéticas e isoproteicas.

Para realizar las determinaciones analíticas, se tomaron semanalmente muestras de dos litros de leche del tanque de refrigeración de forma independiente de cada uno de los lotes en estudio. Los lotes se ordeñaban de forma separada. Se realizaron determinaciones de composición química, propiedades tecnológicas (aptitud a la coagulación ácida y enzimática, estabilidad al alcohol), determinación del color y aptitud a la fermentación. Para el análisis sensorial, durante ambos experimentos, a intervalos de 15 días, se recogieron las muestras de leche de cabra y se pasteurizaron a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos y después se refrigeraron para seguir evaluando la presencia de sabores extraños. Además, para realizar un panel sensorial de consumidores, se prepararon yogures con la leche de animales alimentados con un 25 % de inclusión de ensilados.

ARTÍCULO 2: Evaluación y estudio de parámetros de calidad de bacterias ácido lácticas (BAL) individuales para la fermentación de leche de cabra (“Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameter”).

En este artículo de investigación se realizó un cribado de nueve cepas seleccionadas de bacterias ácidas lácticas (BAL) como cultivos iniciadores puros y se ensayó un cultivo mixto comercial de referencia: (MA400: Danisco; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis*

subsp. cremoris, *Lactococcus lactis* subsp. lactis biovar diacetyllactis, *Streptococcus thermophilus*), para la fermentación de la leche de cabra dado que es utilizado ampliamente como cultivo homofermentador para la elaboración de quesos de cabra y mantequilla por su capacidad aromática. Los cultivos puros utilizados fueron: *Lactobacillus casei* CECT 475, *Lactobacillus curvatus* CECT 5786, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus CECT 4005, *Lactobacillus helveticus* CECT 541, *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei CECT 277, *Lactobacillus plantarum* CECT 5785, *Lactobacillus reuteri* CECT 925, *Lactobacillus sakei* subs. carnosus CECT 5964 y *Lactococcus lactis* subsp. lactis CECT 4042, (Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Burjassot, España). Las condiciones para la reactivación e incubación de cada cultivo fueron las establecidas por la CECT (Tabla 2).

Para preparar las leches fermentadas se tomó leche de tanque refrigerada de animales con dieta convencional sin subproductos (control) y se realizaron seis réplicas de cada tratamiento de fermentación. Se analizaron los siguientes parámetros en leches fermentadas: mejor capacidad de acidificación, recuentos microbianos, estabilidad del gel, perfil de ácidos grasos, metabolitos de fermentación (ácidos orgánicos, azúcares y perfil de volátiles). Cada parámetro se evaluó en cuatro réplicas asignadas al azar. También se realizó la evaluación sensorial, sobre dos réplicas. Del conjunto de las 9 cepas se observó que dos de ellas *L. paracasei* subsp. paracasei CECT 277 y *L. lactis* subsp. lactis CECT 4042 presentaron un comportamiento en la fermentación similar al cultivo mixto.



Tabla 2. Condiciones óptimas y medios de cultivo para la reactivación e incubación de los cultivos puros y cultivo mixto comercial de referencia (CECT, 2018).

Código CECT	Nombre	Temperatura de incubación °C	Tiempo de incubación (horas)	Requisitos de respiración	Medio de cultivo
CECT 475	<i>Lactobacillus casei</i>	37	24	Aerobiosis	MRS
CECT 5786	<i>Lactobacillus curvatus</i>	30	24	Aerobiosis	MRS
CECT 4005	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus	37	24	Microaerofilia	MRS
CECT 541	<i>Lactobacillus helveticus</i>	37	24	Jarra de anaerobiosis	MRS
CECT 277	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei	30	24	Aerobiosis	MRS
CECT 5785	<i>Lactobacillus plantarum</i>	30	24	Aerobiosis	MRS
CECT 925	<i>Lactobacillus reuteri</i>	37	24	Aerobiosis	MRS
CECT 5964	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. carnosus	37	24	Aerobiosis	MRS
CECT 4042	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. lactis	30	24	Jarra de anaerobiosis	M17
Cultivo comercial mixto de referencia	MA400: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. lactis, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. lactis biovar diacetylactis, <i>Streptococcus thermophilus</i>	30	24	Aerobiosis	M17

Fuente: Tabla elaborada a partir de datos recopilados de la CECT

ARTÍCULO 3: Parámetros funcionales y de calidad de la leche fermentada obtenida a partir de leche de cabras alimentadas con subproductos vegetales de brócoli y planta de alcachofa (“Quality and Functional Parameters of Fermented Milk Obtained from Goat Milk Fed with Broccoli and Artichoke Plant By-Products”).

El criterio de selección y división de los animales para el desarrollo de este artículo, así como los tratamientos con respecto a las dietas experimentales, formulación, ingredientes y composición química de las mismas fueron las establecidas según el trabajo publicado por Monllor et al. (2020c). Los experimentos se realizaron durante una lactación completa.

Se utilizaron un total de 72 cabras Murciano-Granadinas, las cuales se encontraban al inicio de la lactación (cuarta semana de lactación) y se dividieron en tres lotes homogéneos (n = 24 cabras) en cuanto a peso corporal, producción de leche y recuento de células somáticas (RCS). Los lotes fueron separados en cubículos independientes. El lote 1 (control) considerado con las

siglas DC alimentado con una dieta convencional de la región de Murcia a base de heno de alfalfa y mezcla de granos; el lote 2 (SB40) era alimentado con una dieta que incluía un 40 % de ensilado de subproducto de brócoli y el lote 3 (PA40) con una dieta que incluía un 40 % de ensilado de planta de alcachofa. Los animales tuvieron un período de adaptación a la nueva dieta de tres semanas.

Se realizaron cuatro producciones de leches fermentadas. La primera elaboración fue la considerada Pre-experimental (PE), en la cual la leche procedía de cabras en su cuarta semana de lactación y la alimentación de los tres lotes de animales (DC1; DC2; DC3) fue con la dieta control. La segunda producción (PL) se realizó en la semana doce de lactación, en la cual los animales llevaban 8 semanas con las dietas diferenciadas. La segunda y tercera elaboración se realizaron en la 17 (ML) y 22 (FL) semanas de lactación, respectivamente. Las siglas utilizadas para diferenciar los grupos a partir de la segunda producción fueron: DC (dieta control); SB40 (dieta con un 40 % de ensilado de subproducto de brócoli) y PA40 (dieta con un 40 % de ensilado de planta de alcachofa). Las siglas para las elaboraciones corresponden con PE: preexperimental, PL: principio de lactación, ML: Mitad de lactación y FL: Final de lactación.

La leche para cada una de las producciones procedía del ordeño de dos días consecutivos la cual se separaba en distintos tanques de refrigeración para cada uno de los lotes de cabras ordeñadas. Para cada una de las elaboraciones se recogieron de cada tanque de refrigeración cuatro litros de leche (3 lotes * 4 L (2 L para cada cultivo) * 2 días = 24 L) y se realizaron 20 réplicas de leches fermentadas tipo yogur (20 réplicas * 3 lotes de animales = 60 réplicas).

Para la fermentación de la leche se utilizaron dos cultivos iniciadores mixtos comerciales: un cultivo mixto comercial YO-MIX™ 300 (Danisco, Spain) de naturaleza termófila y recomendado para la elaboración fermentadas de leches y constituido por los microorganismos *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y el cultivo mixto comercial MA400 de naturaleza principalmente mesófila e indicado para la elaboración de quesos tiernos, semicurados y mantequilla. La mezcla de microorganismos que lo constituyen son: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus*. El total de leches fermentadas elaboradas fueron: 60 réplicas * 2 cultivos = 120. Las leches fermentadas se evaluaron por duplicado a los 2 y 30 días de almacenamiento en refrigeración para determinar el número de microorganismos viables, pH, composición, sinéresis, volátiles, contenido en polifenoles y actividad antioxidante. El resto de las réplicas se congelaron a -20 °C para posteriormente determinar azúcares, ácidos orgánicos y ácidos grasos totales.

3.4. Recuperación de los cultivos liofilizados

Las cepas puras de bacterias lácticas fueron adquiridas a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con presentación en ampollas donde se siguieron las recomendaciones establecidas por CECT (www.uv.es/cect). Una vez recibidas en el laboratorio se almacenaron a 18 °C protegidas de la luz. Para la recuperación, resuspensión del liófilo y siembra en primer lugar se procedió a la apertura de la ampolla, para ello se realizó un calentamiento sobre la punta

estrecha de la misma y a continuación se dejó caer 1-4 gotas de agua destilada estéril para su resquebrajado. Seguidamente se procedió a la resuspensión añadiendo con una pipeta pasteur estéril 0,3 mL de medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo (Tabla 2). En condiciones de esterilidad se dejó la suspensión durante 30 minutos para su rehidratación completa. Pasado ese tiempo, parte de la suspensión se inoculó en un tubo de ensayo con 5 mL de medio de cultivo óptimo para el crecimiento de cada uno de los microorganismos con la temperatura y tiempo de incubación óptimos para su crecimiento (Tabla 2). Pasado el tiempo de 24 horas se observó cierta turbidez en el medio de cultivo inoculado, lo cual indicaba el crecimiento de la cepa microbiana (primer subcultivo). Se realizó un segundo subcultivo inoculando 0,4 mL del primer subcultivo a otros tubos de ensayo con 5 mL de medio de cultivo incubando de nuevo a la temperatura y tiempo de incubación óptimo para el crecimiento. Pasadas otras 24 horas este subcultivo se utilizó para la elaboración de las leches fermentadas.

La presentación comercial los cultivos comerciales mixtos de yogur YO-MIX™ 300 (Danisco, Spain) y queso MA400 (Danisco, Spain) fue en sobres de 10 DCU y en forma liofilizada. Su reactivación se realizó colocando el contenido del sobre en 20 mL de agua de peptona durante 30 minutos. Esas suspensiones se utilizaron directamente para la inoculación de la leche que se incubó posteriormente a las temperaturas recomendadas (43 °C para cultivo de yogur) y 30 °C para cultivo de queso

3.5. Elaboración de leches fermentadas

La leche se tomaba del tanque de refrigeración de la granja una vez ordeñados los lotes de forma independiente y de dos días de ordeño consecutivos. A continuación, se pasteurizó a 80 °C durante 30 minutos y se enfrió rápidamente hasta una temperatura de 43 °C para el cultivo YO-MIX™ 300, 30 °C para MA400 y 30 °C o 37 °C en función de la cepa pura utilizada en el artículo 2 (Tabla 2). Una vez alcanzada las temperaturas citadas, se distribuyó en condiciones asépticas 80 mL de leche homogeneizada en frascos estériles de 100 mL. En cada uno de ellos, se inoculó 1 mL de suspensión de cultivo y se incubó en las condiciones óptimas para cada uno de los cultivos especificadas en la Tabla 2. El pH se determinó justo antes de la incubación y a partir de las 4 horas de incubación en intervalos de tiempo de dos horas hasta alcanzar un pH alrededor de 4,8. Posteriormente, las leches fermentadas se almacenaron a 4 °C durante un tiempo de 2 y 30 días.

3.6. Variables analizadas

3.6.1. Siembra y recuento total de bacterias ácido lácticas

Se utilizaron los medios de cultivos de Man Rogosa Sharp MRS agar para la siembra de los microorganismos del género *Lactobacillus* y bajo las condiciones de incubación referidos en la Tabla 2 y el medio M17 agar para *Streptococcus* y *Lactococcus*. Los resultados se expresaron como log en base 10 de las unidades formadoras de colonias (ufc/mL).

3.6.2. Determinación del pH y acidez Dornic

Para la determinación del pH se utilizó un pHmetro (pH-Meter GLP 21, Crison Instruments, S.A., Spain) con compensación automática de temperatura Pt 1000 (C.A.T) y previamente calibrado con tampones técnicos DIN 19267: pH: 7 y 4. Para la medida en la leche y suero se utilizó el electrodo tipo 5014 (Crison Instruments, S.A., Spain) y para las leches fermentadas el 5011 (Crison Instruments, S.A., Spain). Los análisis se realizaron directamente en la muestra a temperatura ambiente y por duplicado. La acidez de la leche se expresó en acidez Dornic (°D). Su determinación se basa en una valoración ácido-base utilizando NaOH de concentración 0,111N (N/9) empleando como indicador una solución alcohólica de fenolftaleína al 1%. Se calcula en función de la equivalencia: 0,1 mL de NaOH N/9 gastados en la valoración corresponden a 1 °D.

3.6.3. Características tecnológicas de la leche

La estabilidad del alcohol en la leche está relacionada con la estabilidad de las proteínas de la leche al tratamiento térmico y generalmente se define como la concentración más alta de la solución de etanol agregado a la leche que no produce la deshidratación de algunos coloides hidrófilos produciéndose una floculación en la leche (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Se utilizó la metodología según Huppertz et al. (2004). Se colocaron 2 mL de leche en una placa Petri de 60 mm y a continuación se añadieron 2 mL de la solución de etanol de concentración entre un rango de 40 % hasta 50 % con intervalos de 0,5 % preparadas en el momento del análisis. Se mezclaban durante unos segundos y se observaba visualmente hasta encontrar la concentración de la solución de etanol agregado que provocaba la coagulación de la leche. Los resultados se expresaron como la máxima concentración de la solución de etanol que no producía coagulación (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Se realizaron dos determinaciones para cada concentración de etanol y para cada muestra.

En el primer experimento se evaluó la capacidad de acidificación de la leche por cultivos iniciadores. Se utilizó como referencia leche de vaca descremada (leche control) reconstituida para verificar el correcto funcionamiento de los cultivos comerciales (MA400-Danisco; *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus*) en condiciones estándar y para cada día de muestreo.

Se estudió la aptitud a la coagulación ácida y enzimática, así como la estabilidad de los geles obtenidos mediante evaluación de la sinéresis. La capacidad de retención del suero en la leche, se determinó cuantificando el volumen de suero extraído mediante la centrifugación después de realizar una coagulación enzimática (renina: Cuajo de ternera líquido 1:15.000, AC quimosina > 90 % y AC pepsina < 10 %) y ácida (mezcla de renina+ Glucono-Delta-lactona) en la leche. La estabilidad del gel se evaluó visualmente después de la incubación (signos de sinéresis, formación de gas, floculación) y se determinó cuantificando el volumen de suero extraído de la cuajada después de la centrifugación (Morgan et al., 2003).

3.6.4. Determinación de color

El color de la leche cruda se midió usando un Espectrofotómetro CR700d (Konica Minolta, Inc., Osaka Japan), usando modo SCI, observador de 10° e iluminante D65. Durante las mediciones, se utilizó un portamuestras CM-A514 (Konica Minolta, Japón) y una celda rectangular hecha de vidrio óptico para transmisión de alta precisión (Celda de eliminación rectangular CM-A132 50 × 38, camino óptico de 20 mm, Minolta, Osaka, Japón). Las muestras de leche se homogeneizaron durante 30 segundos en un Vortex y se colocaron en la celda para la determinación del color. Se estudiaron las coordenadas de color CIELAB (L*: luminosidad; a*: rojo; b*: amarillo), croma (C*) y tonalidad (H*). También se obtuvieron datos de reflectancia entre 360 nm y 740 nm en cada una de las muestras.

3.6.5. Determinación de la composición química

La composición química se analizó mediante el espectrofotómetro Milko-Scan FT-120 (Foss Electric, Hillerød, Denmark) basado en la técnica de infrarrojo que incorpora un interferómetro FTIR (Fourier Transform Infrared) y además cumple con las normas de la AOAC (Association of Analytical Chemists) y IDF (International Dairy Federation). El software del equipo contiene diferentes módulos con calibraciones para las determinaciones de forma precisa en los componentes de la leche (Improved Milk Calibration, Foss Electric, 1999), leches fermentadas (Application Note N° 94, P/N 492264, Foss Electric, 1999) y suero (pH Independent Whey Calibration, Application Note N° 91, P/N 491928, Foss Electric, 1999). La determinación se realizó directamente sobre la muestra a excepción de las leches fermentadas que debido a su viscosidad se diluyeron 1/3 con zero-liquid (Cero S-6060, Hillerød, Denmark). Los análisis se realizaron por duplicado y las muestras fueron previamente calentadas a 40 °C.

3.6.6. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos

En el análisis individual de azúcares y ácidos orgánicos se utilizaron conjuntamente las metodologías descritas por Trigueros et al. (2012) y Mortera et al. (2018) con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de muestra, se adicionaron 10 mL de agua ultrapura y se homogeneizaron con un ultraturrax durante 1 minuto aproximadamente a 13.500 rpm. Seguidamente se centrifugaron a 11.000 rpm durante 20 minutos y con una temperatura de 4 °C. En ambos casos, previamente al análisis cromatográfico, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 micras (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Hewlett-Packard HP-1100, Woldbronn, Alemania), trabajando con gradiente isocrático, flujo de 0,5 mL/min y una fase móvil de agua ultrapura acidificada con ácido fosfórico al 0,1 %. La columna utilizada fue una Supelcogel C-610H, 30 cm * 7,8 mm (Supelco Park, Bellefonte, PA, USA). Los azúcares fueron detectados con un detector de índice de refracción y los ácidos orgánicos por un diodo array (DAD) a una longitud de onda de 210 nm. La cuantificación se realizó mediante rectas de calibrado con patrones estándar para cada uno de los azúcares y ácidos orgánicos (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los análisis se realizaron por duplicado.

3.6.7. Perfil de ácidos grasos

En la cuantificación del perfil de ácidos grasos se utilizaron dos metodologías diferentes. En primer lugar, para la extracción de la grasa se utilizó el mismo procedimiento (Romeu-Nadal et al., 2004) con algunas modificaciones en todos los estudios. Para el proceso de derivatización en el artículo 2 se utilizó una doble transesterificación directa primero usando un catalizador básico metóxido de sodio 0,5 M y en segundo lugar un catalizador ácido BF₃ al 14 % en metanol (Trigueros et al., 2015). Sin embargo, en el artículo 3 la transesterificación directa se realizó solo con un catalizador básico de metóxido de sodio 0,5 M (Nudda et al., 2005).

Los ácidos grasos metilados fueron separados por un cromatógrafo de gases GC-17A (Shimadzu, Kioto, Japón) con un detector de ionización de llama (FID) y con una columna capilar column DB-23 de 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies Santa Clara, CA, EEUU) en el artículo 2 y una CP Sil 88 de 100 m, 0,25 mm de DI y 0,20 µm de tamaño de partícula (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU) en el artículo 3. Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención con un mix estándar de referencia (FAME MIX 37 component, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). Las condiciones cromatográficas aplicadas fueron las descritas Trigueros et al. (2015) y por Nudda et al. (2005) para los artículos 2 y 3 respectivamente. Los análisis se realizaron por duplicado y para la cuantificación se utilizaron los patrones internos ésteres metílicos pentanoico (C5:0) y tridecanoico (C13:0). Los índices nutricionales para la evaluación de los ácidos grasos se calcularon con las fórmulas descritas por Lock et al. (2003); Batista et al. (2017); Andreu et al. (2019) y Chen et al. (2020).

3.6.8. Determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS y DPPH

Previamente a la determinación del contenido total en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de las muestras se realizó un tratamiento previo a la muestra para la desnaturalización y eliminación de las proteínas con una solución de metanol acidificado con ácido HCL 1 N con una relación de 85:15 durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de centrifugación y filtración con filtros de nylon de 0,45 micras (Li et al., 2009). A partir de los extractos obtenidos para la determinación de compuestos fenólicos totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu según el protocolo descrito por Kim et al. (2003), utilizando como reactivo Folin-Ciocalteu 2N (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania) y realizando la lectura a 750 nm mediante un espectrofotómetro (T80 UV/VIS de PG Instruments), para la cuantificación se realizó una recta de calibrado con concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 mM de ácido gálico y los resultados se expresaron mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/L de muestra. La capacidad antioxidante se determinó mediante los métodos basados en el secuestro de los radicales libres ABTS y DPPH (Apak et al., 2016). El método ABTS se basó en el descrito por Re et al. (1999) con una disolución de ABTS (Ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico; Sigma-Aldrich, Spain) 7 mM ajustándose con etanol al 80 % a un valor de absorbancia de $0,7 \pm 0,005$ a 734 nm. Para el método DPPH se utilizaron los métodos descritos por Brand-Williams et al. (1995) y Re et al. (1999). Para esta determinación la disolución de DPPH (2,2-Difenil-1-

picrilhidrazil; Sigma-Aldrich, Spain) 0,6 mM se ajustó en el momento de uso con etanol al 80 % hasta alcanzar una absorbancia de $0,68 \pm 0,005$ a 515 nm. En ambos casos la actividad antioxidante se expresó como % de inhibición (% inhibición = $(1-AC) / AB * 100$; donde: AC es la absorbancia de la muestra y AB la absorbancia del blanco.) 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 %. Los resultados fueron expresados en mM de TROLOX/L de muestra.

3.6.9. Perfil de compuestos volátiles

Para la determinación del perfil de volátiles y su cuantificación se realizó una microextracción en fase sólida (SPME) de volátiles (Tunick, landola y Van Hekken, 2013). En el segundo estudio se utilizó una fibra DBV(Divinylbenzene)/CAR(Carboxen)/PDMS (Polydimethylsiloxane) que se expuso durante 50 minutos a 40 °C a la muestra de leche. Posteriormente, la fibra se desorbió en el puerto de inyección del cromatógrafo CG17A acoplado a un GCMS-QP5050 (Shimadzu, Kioto, Japón) durante 3 min a 250 °C. La columna utilizada para la separación de volátiles fue una RXi-1301 Sil MS (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno (DI), 1 µm de tamaño de partícula). La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante un espectrómetro de masas. En el tercer estudio se realizó el mismo proceso con un muestreador automático AOC 6000 Plus acoplado a un cromatógrafo GC2023 y detector de espectrometría TQ8040 NX de Shimadzu Scientific Instruments. La columna utilizada en este caso fue una SBL-5 MS, también de Teknokroma.

En ambos casos el gas portador utilizado fue Helio (0,8 mL/min) y el programa cromatográfico de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial 40 °C durante 2 min, gradiente de temperatura de 10 °C/min hasta 200 °C y manteniendo 200 °C durante 10 minutos. La identificación de los picos se realizó comparando los tiempos de retención de los compuestos estándar y los espectros de la biblioteca de Wiley.

3.6.10. Análisis sensorial en leche y leches fermentadas

Todas las pruebas sensoriales se realizaron en la sala de catas del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la UMH. En el primer artículo, para evaluar la posible presencia de off-flavors en la leche cruda participaron cinco miembros del Departamento de Tecnología Agroalimentaria, consumidores habituales de leche de cabra. Para la prueba triangular con las leches fermentadas azucaradas elaboradas, se contó con un panel de 60 consumidores que realizaron pruebas triangulares para evaluar su capacidad de discriminación entre tratamientos. Se consideró el número mínimo de juicios correctos para establecer la significancia de los resultados según Stone et al. (1993).

En el análisis sensorial del segundo artículo para la evaluación de los atributos sensoriales de olor y aroma en las leches fermentadas se realizó un Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) ensayado previamente en otros estudios para productos lácteos (Janiaski et al., 2016). El panel sensorial utilizado estuvo compuesto por 9 panelistas altamente calificados (5 mujeres y 4 hombres) con edades entre 24 y 61 años y previamente entrenados siguiendo la norma ISO

8586:2012. La sesión de orientación preliminar (30 min) consistió en la evaluación del producto por parte del panel sensorial, quien discutió sobre las características de olor y aroma. Después de la sesión de orientación, todos los miembros del panel acordaron describir el perfil de olor sensorial de cada leche fermentada mediante 4 o 5 descriptores. Esta información se utilizó para establecer relaciones con los descriptores clave de los compuestos volátiles.

3.6.11. Análisis estadísticos.

Todos los datos fueron registrados en hojas Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.) y posteriormente procesados estadísticamente. En el artículo de investigación 1 los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, EE. UU.). En este artículo se utilizó el procedimiento ANOVA de una vía (factor: cultivo) y cada experimento fue evaluado de forma independiente y se estudiaron dos efectos fijos, a saber, dieta (CD; SA; PA) y experimento (Experimento 1 y Experimento 2). En el artículo 2 los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS 24.0 (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, EE. UU.). Se utilizó un ANOVA ONE-WAY con el factor cultivo indicador. Se utilizó el test de Tukey para la comparación entre medias (95 % de nivel de confianza).

Para el artículo de investigación 3 se utilizó el paquete estadístico SAS 9.4, 2012 (SAS, Cary, NC, EEUU) y se utilizó el modelo general Proc.GLM estudiando el efecto de la dieta; tiempo de almacenamiento de las leches fermentadas y la interacción dieta * tiempo para las variables reflejadas en el artículo publicado. En todos los casos se utilizó para la comparación de medias la prueba de Tukey (nivel de confianza del 95 %). Se estudiaron separadamente los efectos de cada cultivo (YO-MIX™ 300 y MA400) en cada una de las cuatro producciones (PE: Pre-experimental; PL: Principio de lactación; ML: Mitad de lactación; FL: Final de lactación), para las tres dietas estudiadas (CD: control; SB: subproducto de brócoli ensilado; PA: planta de alcachofa ensilada) y para los tiempos de almacenamiento en refrigeración de las leches fermentadas (2 y 30 días). Las variables dependientes analizadas fueron recuentos microbianos, pH, grasa, proteína, sólidos totales, lactosa, glucosa, galactosa, ácidos grasos e índices, ácido láctico, sinéresis y composición del suero en grasa, proteína, lactosa y sólidos totales. En cambio, para las variables polifenoles totales y capacidad antioxidante (ABTS and DPPH), solo se analizaron las producciones PL y FL. Para el perfil de volátiles se analizaron las producciones PE y FL. El proc model GLM utilizado siguió la siguiente ecuación:

$$Y = \mu + DIET_i + TIME_j + DIET_i \times TIME_j + e_{ijk}$$

Y = variable dependiente; μ : media; $DIET_i$: efecto de la dieta ($n = 3$: control, brócoli y planta de alcachofa); $TIME_j$: tiempo de almacenamiento de la leche fermentada ($n = 2$: días 2 y 30); $DIET_i \times TIME_j$: interacción dieta y tiempo; y, e_{ijk} : error residual.

Para agrupar los tratamiento en función de las familias de volátiles se realizó un análisis de componentes principales (Principal component analysis, PCA regression map), utilizando XLSTAT Premium 2016 (Addingsoft, Barcelona).



Publicaciones

4. Publicaciones

4.1. Publicación 1 (Publicado en revista no indexada)

Publicación 1 (Artículo original)

Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By Products Silages in the Diet of Dairy Goats

Raquel Muelas, Paula Monllor, Gema Romero, Estrella Sayas-Barberá, Casilda Navarro, José Ramón Díaz y Esther Sendra

Foods, 6, 12

doi: 10.3390/foods6120112





Article

Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By-Products Silages in the Diet of Dairy Goats

Raquel Muelas, Paula Monllor , Gema Romero, Estrella Sayas-Barberá, Casilda Navarro, José Ramón Díaz and Esther Sendra * 

AgroFood Technology Department, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. Beniel km 3,2, 03312 Orihuela, Spain; raquel.muelas@umh.es (R.M.); pmonllor@umh.es (P.M.); gemaromero@umh.es (G.R.); estrella.sayas@umh.es (E.S.-B.); casilda.navarro@umh.es (C.N.); jr.diaz@umh.es (J.R.D.)

* Correspondence: esther.sendra@umh.es; Tel.: +34-96674-9735

Received: 30 October 2017; Accepted: 12 December 2017; Published: 18 December 2017

Abstract: Traditional farming practices include the use of local agricultural by-products in the diet of ruminants. Artichoke harvesting and transformation yield high amounts of by-products that, if properly used, may reduce farming costs and the environmental impact of farming. The present study tests the inclusion of silages from artichoke by-products (plant and outer bracts) in the diet of dairy goats (0%, 12.5% and 25% inclusion) on the technological and sensory properties of milk during a five-month study. Milk composition, color, stability, coagulation and fermentation properties remained unaffected by diet changes. Panelists were not able to differentiate among yogurts obtained from those milks by discriminant triangular sensory tests. Silages of artichoke by-products can be included in isoproteic and isoenergetic diets for dairy goats, up to a 25% (feed dry matter), without negatively affecting milk technological and sensory properties whereas reducing feeding costs.

Keywords: milk quality; milk technology; by-products; artichoke; goat

1. Introduction

By-products from agricultural and food processing industries represent a major disposal problem. The moisture of these by-products is a limitation for their storage and companies must manage them quickly to avoid environmental problems, which imply an important additional cost. Such by-products are also promising sources of valuable compounds. They may be used because of their technological or nutritional properties in animal feeding. One possibility to overcome the short shelf life of these by-products would be their incorporation in silage, which may allow preserving them and obtaining an economic benefit, while reducing the price of the ration and favoring the sustainability of both activities. From the environmental point of view, the reduction of wastes and residues, and the enhanced use of local resources as feed may also reduce the carbon footprint of both horticultural and farming practices and strengthen the local economy.

The cultivation of artichoke is concentrated in the countries bordering the Mediterranean basin. The main European, as well as world, producers are Italy and Spain, with Spain occupying the second position in the world, with a production of 234,091 tons in an approximate area of 15,002 hectares [1]. Within Spain, this crop is particularly important in the autonomous communities of the Mediterranean coast, especially in Murcia, with more than 40% of the national production [2]. More than 40% of artichoke production goes for fresh consumption, while 60% to its industrialization. Its production is seasonal and during its processing huge amounts of by-products are generated, as from 60 to 65% of the artichoke, between outer bracts and stems, is not used.

Foods **2017**, *6*, 112; doi:10.3390/foods6120112

www.mdpi.com/journal/foods

One main use of such by-products has been animal feed, taking advantage of its large nutritive value [3]. Fresh artichoke by-products have been traditionally used for feeding goats in artichoke-producing areas. However, artichoke production is seasonal, leading to two main constraints: (1) they are not available during the entire year, and; (2) not all generated by-products can be used as animal feed. The huge amounts of by-products generated in a short harvest time are highly perishable due to their high water content. For these reasons, it is necessary to evaluate preserved artichoke by-products (plant: post-harvest by-product and outer bracts: artichoke processing by-product), as silages, in balanced diets for dairy goats to replace part of the usual ration and measure their possible impact on the technological properties of the obtained milk.

Several studies in the scientific literature report the use of different agricultural by-products as feed for ruminants. However, most of them mainly focus on their effect of the fatty acid profile of milk. Some relevant studies are on the following: olive cake inclusion on ewe feeding [4]; linseed meal from flaxseed oil extraction on goat feeding [5]; cassava by-products on lactating dairy goats [6]; citrus pulp in diets of dairy animals [7]; soybean hulls on dairy ewes [8]; *Moringa oleifera* leaf on dairy goats [9]; and mixtures of different by-products, such as tomato and olive by-products [10] or mixture of tomato fruits, citrus pulp, brewer’s grain and yeast [11,12] on dairy goats. Only few studies report the effect of diets including agro-industry by-products on milk composition and technological quality [9,12–14], and most of them report successful the incorporation of by-products as feed. It is essential to evaluate new by-products or presentation forms as feed sources and provide the scientific basis for their proper inclusion on balanced diets. No previous studies have been found on the effect of the inclusion of artichoke by-products, in silage form, in dairy goats’ diets on the technological properties of milk. The objective of the present study was to test the effect of artichoke silage incorporation (plant and outer bracts) in the diet of dairy goats (0%, 12.5% and 25% inclusion) on the technological and sensory properties of milk.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Dietary Treatments

Sixty-nine Murciano-Granadina goats (44.7 ± 6.8 kg of body weight), multiparous and in the third month of lactation were selected from the experimental farm of Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Universidad Miguel Hernandez de Elche, Alicante, Spain). They were chosen by number of lactation, milk yield and health status of the mammary gland and distributed in three homogeneous groups (n = 23 goats per treatment). At the beginning of the experiment, all goats were housed individually in stalls, and fed with a traditional ration (Control diet: alfalfa hay, barley straw oat and a mix of grains) during a pre-experimental period. These three groups of animals were kept constant during all the study (from October 2015 until February 2016), meaning that individuals in each group were the same for both experiments run, as detailed in the timeline in Table 1.

Table 1. Timeline. First row indicates the week since by-products were included in the diet: grey zone defines adaptation periods without milk sampling, white zones defines weeks when samplings were conducted.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Experiment 1									Experiment 2								

After having the animals grouped, the inclusion of by-products (plant and outer bracts) in the diet began, leaving a 15-day period of adaptation to the new feed before the first sampling. All the diets were designed in order to be isoenergetic and isoproteic. During the adaptation period and Experiment 1, diets were formulated in order to cover nutrient requirements of goats weighing 50 kg, with a production level of 2.5 kg/day and 6% fat content. Thus, 2.2 kg of dry matter were offered to each goat every day; although they were not fed ad libitum there were always leftovers.

Two experiments were run, corresponding to two inclusion levels of the artichoke by-products in the diets. For Experiment 1, three diets were used during seven weeks: a control diet (CD) without the addition of artichoke by-products in silage; a diet incorporating 12.5% artichoke bracts (ABD-1) in silage; and a diet incorporating 12.5% artichoke plant (APD-1) in silage. The first experiment was followed by a sudden increase in the content of by-products in the diet (25%) that was kept for nine weeks. A four-week period of adaptation feeding 25% by-products was left before the first milk sampling for the second experiment. So, in Experiment 2, three diets were used: a control diet without the addition of artichoke by-products in silage; a diet incorporating 25% artichoke bracts (ABD-2) in silage; and a diet incorporating 25% artichoke plant (APD-2) in silage. All samplings for the second experiments took place within the last five weeks of the experiment. Diets were well accepted by animals, leaving a small quantity of refuse food every day. Intake of dry matter was similar in all groups, both in Experiment 1 and 2. Intake values during Experiment 1 were 2.17, 2.08 and 2.12 for control diet in experiment 1 (CD-1), artichoke bracts diet in experiment 1 (ABD-1) and artichoke plant diet in experiment 1 (APD-1), respectively. During Experiment 2, diets were designed for a lower level of production, so goats were offered less amount of food (1.95 kg of dry matter (DM)/day). Thus, the intake level was also reduced during this period, being 1.91 for control diet in experiment 2 (CD-2), 1.84 for artichoke bracts diet in experiment 2 (ABD-2) and 1.86 for artichoke plant diet in experiment 2 (APD-2). Silages were manufactured by Aprovertia SL, by a process actually under application of Industrial Property Rights protection; it consists of microsilages of 300 kg aged for more than 30 days. The chemical composition and energy of the diets (CD-1, ABD-1, APD-1, CD-2, ABD-2 and APD-2) of both experiments is provided in Table 2.

Table 2. Chemical composition (% of DM) of diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in the Experiment 1 (12.5% inclusion) and Experiment 2 (25% inclusion).

Items (% in Dry Material)	Diets					
	Experiment 1			Experiment 2		
	CD-1	ABD-1	APD-1	CD-2	ABD-2	APD-2
Dry matter	89.36	59.96	70.64	89.36	45.18	59.22
Crude protein	16.01	16.02	16.02	16.01	16.01	16.00
Crude Fibre	19.62	19.15	18.67	19.62	19.22	17.83
Neutral detergent fibre	37.83	38.52	38.07	37.83	39.81	38.32
Acid detergent fibre	24.32	24.84	24.26	24.32	25.97	24.22
Acid detergent lignine	5.65	4.32	4.24	5.65	3.30	2.93
Ash	7.24	7.08	7.70	7.24	7.38	8.42
Ether extract	4.65	4.85	5.05	4.65	4.89	5.32
MFU (MFU/kg DM)	0.92	0.94	0.92	0.92	0.95	0.91

DM: dry matter; CD-1: control diet in experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in experiment 1; CD-2: control diet in experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in experiment 2.

2.2. Milk Sampling

Milk samples were taken weekly from the tank from each diet group (Table 1). Goats were milked at 9:00 a.m. with a low-line milking machine (Gea-Farm Technologies®, Bönen, Germany), and two-liter samples were taken from each tank weekly to run all determinations. The milk samples were refrigerated at 4 °C and they were immediately analyzed for chemical composition, technological characteristics (milk ethanol stability, whey drainage ability and acidification ability) and color. For sensory analysis they were previously pasteurized. During the second experiment 6 L of milk from each diet group were collected to prepare yogurts to be used for sensory evaluation.

2.3. Chemical Composition

Milk composition was analyzed using near infrared spectrophotometry (FOSS 120T Milko-Scan; Foss Electric, Hillerød, Denmark); fat, protein, casein, whey protein, lactose, total solids and ash were determined.

2.4. Technological Characteristics

Milk ethanol stability (MES) is usually defined as the highest concentration of added aqueous ethanol which does not cause milk coagulation [15]. It is related to the stability of milk proteins to the heat treatment. Mixtures of equal volume of milk samples and freshly made aqueous ethanol solutions (from 40% at 50%, at 0.5 intervals) were placed in a petri dish and were observed for signals of coagulation. Mixtures (milk:ethanol) were made with different concentrations of ethanol until the concentration of added aqueous ethanol which does not cause coagulation of milk was found. The ethanol stability was expressed as % ethanol. The higher the value the better the stability. Two replicate determinations for each ethanol concentration were carried out for each sample.

Whey drainage ability was determined by quantifying the volume of whey removed from curd after centrifugation [16]. To properly evaluate drainage ability, rennet coagulated curds and acid coagulated curds have to be evaluated. Rennet coagulation (enzymatic draining) at pH 6.3 and direct acidification (acid draining) at 4.5 were attained. For both tests, goat milk samples (20 g) adjusted to pH 6.3, by adding 10% lactic acid were placed in centrifugal tubes. For rennet coagulation, 60 μ L of renin (Liquid calf rennet 1:15.000, AC chymosin > 90% and AC pepsin < 10%, Laboratorios Arroyo, Santander, Spain) was added to samples, followed by incubation during 1 h at 30 °C. For direct acidification, 2 μ L of renin and 0.2 g of glucono delta lactone (GDL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) were added, followed by incubation for 20 h at 22 °C. After both incubation times the curds were formed, the tubes were centrifuged at 2800 \times g for 30 min at 20 °C. The whey released from each tube was weighed (g). Whey drainage ability (% whey drained) was expressed as the mass ratio of whey/milk. Whey composition (fat, crude protein and total solid) was determined using near infrared spectrophotometry (FOSS 120T Milko-Scan; Foss Electric, Hillerød, Denmark). Two replicate determinations were carried for each sample.

Acidification ability was evaluated using lyophilized ferments (MA 400 by Danisco; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*) under standard conditions [16]. Aliquots of goat milk (100 mL) were inoculated with 3.6 mL of the pre-activated starter culture and incubated at 30 °C. A sample of reconstituted skimmed cow's milk (10% low-heat milk powder) was also inoculated and incubated in order to verify the viability of lactic starters. Dornic acidity and pH were measured at the beginning of the acidification (A0h), 5 h (A5h) and 24 h (A24h) after inoculation. Dornic acidity was determined by titration with commercial Dornic sodium hydroxide, and pH by using a pHmeter (Crison Instruments S.A., Alella, Spain).

2.5. Milk Color Determination

Milk color was measured using a Spectrophotometer CR700d (Konica Minolta, Inc., Osaka Japan), using SCI mode, 10° observer and illuminant D65. During measurements a sample holder CM-A514 (Konica Minolta, Japan) and a rectangular cell made of optical glass for high-precision transmittance (CM-A132 Rectangular Disposal Cell 50 \times 38, optical path 20 mm, Minolta, Osaka, Japan) were used.

The milk samples were homogenized for 30 s on a Vortex and placed in the cell for color determination. The CIELAB color coordinates (L^* : lightness; a^* : redness; b^* : yellowness), chroma (C^*) and hue (H^*) were studied. Reflectance data over 360 nm to 740 nm were also obtained each milk samples.

2.6. Sensory Analyses

During both experiments, at 15-day intervals, goat milk samples were pasteurized at 80 °C for 30 min and refrigerated to be further evaluated for the presence of off-flavors. Five members of the department, who are frequent consumers of goat milk, evaluated the milk. In addition, in order to conduct a consumer sensory panel, goat milk yogurts were prepared. To 6 L of milk from each group of the second experiment were added 6% sucrose, and the blend was further pasteurized as previously described. Milk was cooled to 45 °C and inoculated with a commercial starter culture for yogurt (MY800 by Danisco, composed of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*); inoculated milk was distributed in sterile caps (40 mL each) and incubated at 43 °C until pH 4.6 was reached. After 48 h under refrigeration, a consumer sensory panel (60 panelists) run triangular tests to compare the three types of yogurts (three sets of comparisons each: CD-2 vs. ABD-2, CD-2 vs. APD-2, and ABD-2 vs. APD-2, served in balanced order to consumers). All sensory test were run in the Sensory Laboratory of the Agro-Food Technology Department which fulfills ISO requirements for sensory evaluation. A minimum numbers of correct judgments to establish significance at various probability levels were considered to decide on the significance of the results [17].

2.7. Statistical Analysis

The data were analyzed using SPSS 21 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). Each experiment was independently evaluated. Two fixed effects were studied, namely, diet (CD, ABD and APD) and experiment (Experiment 1 and Experiment 2: initially sampling time within each experiment was considered, and afterwards removed as sampling time did not affect the studied parameters). The Tukey test was used for the multiple comparisons of means. Differences are considerate significant at $p > 0.05$.

3. Results and Discussion

Experiments were consecutively run, as previously explained, and so the stage of lactation moved on with sampling weeks. In order avoid the effect of lactation to interfere with diet effect, two strategies were followed: (1) there was always a control diet group, and; (2) results from samplings within the same experiment and diet were statistically analyzed. As a result, no significant differences were detected among the properties of milk from all samplings of the same experiment. The lactation evolution within each experiment did not affect milk composition and properties, and so results are presented and analyzed separately for each experiment, considering only diet effect.

3.1. Chemical Composition

Table 3 shows the chemical composition of milk from experiments 1 and 2. In the first experiment, the incorporation of artichoke by-products in the diet, independently of whether it was outer bracts or plant, did not modify milk composition. In the Experiment 2, differences were found for crude protein, casein and ash, which were lower when outer bracts were used in feed. However, they may not be considered relevant given the tiny differences (under 0.1 units).

Increasing fiber content in feed is known to enhance fat synthesis [18], and in the present study crude fiber in APD-2 was slightly lower than that of other diets (Table 2). As well, although no significant differences have been reported for fat content (Table 3), the average fat content for APD-2 milk is the lowest reported in the study. Higher inclusions of by-products need to be evaluated in further studies in order to assess if artichoke plant affects milk fat content. The results obtained in the present study reveal that the inclusion of up to 25% artichoke by-products on dairy goat diets does not relevantly affect milk composition, although it slightly modified crude protein, casein and ash, however, we consider those changes irrelevant due to the reduced differences and absence of impact on milk technological properties.

Uneven results have been reported in the scientific literature for the effect of the inclusion of several agricultural by-products on milk composition. The inclusion of artichoke silages up to a 30% in the ewe’s diet did not affect milk composition [19]. Regarding the use of silages from citrus by-products, also in ewe’s diets an increase in fat and non-fat solids has been reported [20]. Studies including by-products, not as silages, in the diet of goats, like [12] tomato fruits, citrus pulp, brewer’s grain and yeast, reported differences in milk composition and found higher contents of protein, casein and total solids than that of milk from goats fed conventional diet. Romero-Huelva et al. [11] included tomato and cucumber by-products on dairy goats diet and only reported changes on lactose content ($p < 0.05$). Studies with the inclusion of soybeans and linseed in Anglo-Nubia diets [21] reported no changes on milk fat, dry matter and lactose. The increased presence of tannins in goats’ diets tended to increase protein content, however, high tannin contents reduced fat content in milk, whereas lactose and total solids were not affected by tannins inclusion [22]. When rosemary was supplemented in goats’ diets a decrease in dry matter and lactose was reported, whereas fat and protein contents were unaffected [23]. In terms of other species, when olive cake is introduced on ewes’ diet [4], protein and casein contents were smaller than in control milk; the authors explained that fact as due to a dilution effect linked to the higher milk yield on olive cake fed ewes [4]. Most of this studies report slight or none compositional changes, also depending on the percentage of diet replacement by by-products, if few compositional changes are observed, also few changes in technological properties are to be expected, however, information on technological properties is still needed in order to properly assess the suitability of the by-products on dairy goat diets.

Table 3. Milk composition (g/100 mL) of Murciano-Granadina goats fed on diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in Experiment 1 (12.5% include) and Experiment 2 (25% include).

Experiment 1 (12.5% Inclusion)				
Diet				
Compound	CD-1	ABD-1	APD-1	Effect (<i>p</i>)
Fat	5.78 ± 0.60	5.90 ± 0.53	5.85 ± 0.57	NS
Crude protein	3.98 ± 0.24	3.83 ± 0.21	3.90 ± 0.22	NS
Casein	3.45 ± 0.21	3.34 ± 0.80	3.39 ± 0.19	NS
Whey protein	0.53 ± 0.04	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.04	NS
Lactose	4.21 ± 0.04	4.24 ± 0.05	4.20 ± 0.04	NS
Total solid	14.77 ± 0.87	14.72 ± 0.74	14.75 ± 0.79	NS
Ash	0.46 ± 0.07	0.42 ± 0.07	0.46 ± 0.07	NS
Experiment 2 (25% Inclusion)				
Diet				
Compound	CD-2	ABD-2	APD-2	Effect (<i>p</i>)
Fat	5.61 ± 0.55	5.81 ± 0.61	5.43 ± 0.59	NS
Crude protein	4.01 ± 0.06 ^b	3.79 ± 0.06 ^a	3.91 ± 0.05 ^{a,b}	**
Casein	3.50 ± 0.06 ^b	3.33 ± 0.06 ^a	3.39 ± 0.05 ^{a,b}	**
Whey protein	0.52 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.51 ± 0.03	NS
Lactose	4.31 ± 0.06	4.33 ± 0.04	4.29 ± 0.06	NS
Total solid	14.76 ± 0.47	14.69 ± 0.59	14.40 ± 0.55	NS
Ash	0.47 ± 0.01 ^b	0.44 ± 0.01 ^a	0.44 ± 0.02 ^a	*

NS = not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Treatment means of the ANOVA test (values are the mean value of all samplings from the same experiment). ^{a,b} Different letters in the same line indicate significant statistical differences between diets. CD-1: control diet in Experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in Experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in Experiment 1; CD-2: control diet in Experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in Experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in Experiment 2.

3.2. Technological Characteristics

Milk ethanol stability. As can be seen in Table 4, no significant differences were observed among milk types for alcohol stability, and for all samplings goats' milk stand ethanol concentrations over 45% without signs of coagulation, so proving a good stability of milk during both experiments.

Table 4. pH and Dornic acidity (°D) at 0, 5 and 24 h of incubation (acidification capacity test) and alcohol test of the milk from Murciano-Granadina goats fed on diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in the Experiment 1 (12.5% inclusion) and Experiment 2 (25% inclusion).

Experiment 1 (12.5% Inclusion)					
		Diets			Effect (p)
		CD-1	ABD-1	APD-1	
A0h	pH	6.77 ± 0.15	6.78 ± 0.15	6.81 ± 0.14	NS
	°D	14.88 ± 1.03	14.81 ± 0.65	14.31 ± 1.36	NS
A5h	pH	5.85 ± 0.40	5.82 ± 0.37	5.65 ± 0.39	NS
	°D	39.50 ± 10.26	39.06 ± 9.15	38.25 ± 8.53	NS
A24h	pH	4.17 ± 0.12	4.19 ± 0.13	4.19 ± 0.14	NS
	°D	97.88 ± 4.33	100.44 ± 3.32	99.69 ± 3.51	NS
ALCOHOL TEST		47.13 ± 1.53	47.63 ± 0.88	48.00 ± 1.69	NS
Experiment 2 (25% Inclusion)					
		Diets			Effect (p)
		CD-2	ABD-2	APD-2	
A0h	pH	6.83 ± 0.11	6.70 ± 0.31	6.67 ± 0.29	NS
	°D	15.75 ± 0.61	15.67 ± 0.41	15.17 ± 0.93	NS
A5h	pH	5.51 ± 0.78	5.47 ± 0.94	5.48 ± 0.80	NS
	°D	36.72 ± 13.32	36.82 ± 13.38	37.72 ± 12.22	NS
A24h	pH	4.21 ± 0.06	4.18 ± 0.04	4.19 ± 0.05	NS
	°D	91.75 ± 7.17	96.17 ± 2.11	98.08 ± 2.44	NS
ALCOHOL TEST		46.33 ± 1.03	46.67 ± 1.37	47.00 ± 1.79	NS

CD-1: control diet in Experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in Experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in Experiment 1; CD-2: control diet in Experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in Experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in Experiment 2. NS = not significant.

According to Raynal-Lujtovac et al. [15], goat milk tends to destabilize at an ethanol concentration of 45%, whereas cow's milk stands up to 70% ethanol, and they explain such difference as being due to the different micellar structure of goats and cow's milk, as well as to the highest ionic calcium in goats milk as compared to cow's milk. The tested inclusion of artichoke by-product silages did not affect milk ethanol stability.

Acidification capacity. As explained in materials and methods section, reconstituted skimmed cow's milk was used to check the proper function of commercial cultures each sampling day. Starter cultures performed as expected from culture technical sheet at all sampling days. In Table 4 pH and acidity at 0, 5 and 24 h of incubation are reported and lactic cultures performed in goat milk, as well as they did in control cow's milk. No significant differences could be attributed to diet, and so the inclusion of up to 25% silages of artichoke by products did not affect milk acidification ability: it had no effect on the growth of lactic acid bacteria on milk. It can be assumed that milk microbial ecology was not affected by the evaluated diets.

Although other factors may produce effects, it has been reported that protein content may enhance acidification capacity by increasing buffering capacity [16]; no differences in protein content were observed in the present study, nor differences on acidification capacity either.

Whey drainage ability. Results from acid gels wheying off are presented in Table 5, and those from enzymatic gels are in Table 6. The percentage of whey released, as well as whey composition, are presented (dry matter, crude protein and fat). Regarding acid gels, no differences on either released whey or whey composition could be linked to the presence of by-products in goat diets.

If experiments 1 and 2 are compared, during Experiment 2 there was a trend showing that the released whey had higher contents of fat and protein, which is consistent with late lactation milk having less stability [24]. Released whey from goat milk gels in the present study was lower than that observed by Morgan et al. [16], which may be linked to differences in fat and protein content on milk from both studies, being highest in the present study, thereby leading to lower whey release.

Table 5. Whey drainage ability (%) of milk and whey composition (fat, crude protein and total solid) for direct acidification from Murciano-Granadina goats fed on diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in Experiment 1 (12.5% inclusion) and Experiment 2 (25% inclusion).

Experiment 1 (12.5% Inclusion)				
	Diets			Effect (p)
	CD-1	ABD-1	APD-1	
Whey drainage ability (%)	64.51 ± 3.23	65.23 ± 4.41	65.69 ± 2.92	NS
Fat (g/100 mL)	0.56 ± 0.14	0.56 ± 0.16	0.63 ± 0.20	NS
Crude protein (g/100 mL)	1.00 ± 0.06	1.02 ± 0.05	1.08 ± 0.05	NS
Total solid (g/100 mL)	8.27 ± 0.31	8.31 ± 0.42	8.41 ± 0.29	NS
Experiment 2 (25% Inclusion)				
	Diets			Effect (p)
	CD-2	ABD-2	APD-2	
Whey drainage ability (%)	63.69 ± 5.97	65.29 ± 7.27	68.29 ± 3.14	NS
Fat (g/100 mL)	0.52 ± 0.21	0.50 ± 0.20	0.50 ± 0.20	NS
Crude protein (g/100 mL)	1.19 ± 0.46	1.28 ± 0.49	1.22 ± 0.32	NS
Total solid (g/100 mL)	8.64 ± 0.49	8.67 ± 0.42	8.52 ± 0.31	NS

CD-1: control diet in Experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in Experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in Experiment 1; CD-2: control diet in Experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in Experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in Experiment 2. NS = not significant.

Table 6. Whey drainage ability (%) of milk and whey composition (fat, crude protein and total solid) for rennet coagulated gels from Murciano-Granadina goats fed on diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in Experiment 1 (12.5% inclusion) and Experiment 2 (25% inclusion).

Experiment 1 (12.5% Inclusion)				
	Diets			Effect (p)
	CD-1	ABD-1	APD-1	
Whey drainage ability (%)	64.32 ± 6.15	58.64 ± 6.17	59.86 ± 7.98	NS
Fat (g/100 mL)	0.19 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.18 ± 0.07	NS
Crude protein (g/100 mL)	0.91 ± 0.01	0.99 ± 0.04	0.99 ± 0.02	NS
Total solid (g/100 mL)	7.25 ± 0.08	7.22 ± 0.02	7.25 ± 0.10	NS
Experiment 2 (25% Inclusion)				
	Diets			Effect (p)
	CD-1	ABD-2	APD-2	
Whey drainage ability (%)	57.96 ± 5.66	55.48 ± 9.80	60.52 ± 4.28	NS
Fat (g/100 mL)	0.14 ± 0.01	0.29 ± 0.14	0.23 ± 0.02	NS
Crude protein (g/100 mL)	0.95 ± 0.06	0.98 ± 0.06	1.02 ± 0.07	NS
Total solid (g/100 mL)	7.26 ± 0.09	7.43 ± 0.17	7.34 ± 0.08	NS

CD-1: control diet in Experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in Experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in Experiment 1; CD-2: control diet in Experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in Experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in Experiment 2. NS = not significant.

Regarding the stability of rennet coagulated gels, no differences were attributable neither to diet nor to lactation stage. All diet groups released similar amounts of whey, and whey composition was similar for all groups. These results are consistent with those obtained for milk composition, as rennet

coagulum properties are mainly dependent on protein, fat and mineral composition, which were similar for all diet groups [16,24,25]. Previous studies comparing grazing to fed with concentrates in dairy goats reported that such diet systems did not lead to significant differences in rennet coagulation aptitude [26]. Other factors may affect rennet coagulation ability; however, it should be taken into consideration that other effects such as pH, temperature and handling were kept constant in the present study.

3.3. Milk Color

Results of color parameters for experiment 1 and 2 are presented in Table 7. The inclusion of outer bracts and plant artichoke silages up to 12.5% inclusion in the diet of dairy goats did not affect milk color, while differences were observed for color parameters in the inclusion of 25%. In Experiment 2 (25% inclusion) L^* increased, whereas b^* and C^* decreased in diets with artichoke, and these differences were small and could be due to pigments released during silage or to the small differences found in milk composition as the reduced crude protein and casein for the same experiment. Although these color differences may not be of practical value, since they less than 0.5 units, they were not visually perceptible.

Table 7. Color properties (CIELAB) of milk from Murciano-Granadina goats fed on diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in Experiment 1 (12.5% inclusion) and Experiment 2 (25% inclusion).

Experiment 1 (12.5% Inclusion)				
	Diets			
	CD-1	ABD-1	APD-1	Effect (<i>p</i>)
L^*	87.90 ± 0.49	87.56 ± 0.89	87.57 ± 0.81	NS
a^*	−1.04 ± 0.14	−1.05 ± 0.14	−1.04 ± 0.16	NS
b^*	4.89 ± 0.48	4.79 ± 0.72	4.91 ± 0.57	NS
C^*	5.00 ± 0.50	4.91 ± 0.72	5.03 ± 0.58	NS
H^*	102.04 ± 1.16	102.50 ± 1.29	101.95 ± 1.34	NS
Experiment 2 (25% Inclusion)				
	Diets			
	CD-2	ABD-2	APD-2	Effect (<i>p</i>)
L^*	85.68 ± 1.09 ^a	87.32 ± 1.00 ^b	87.20 ± 1.08 ^b	*
a^*	−1.40 ± 0.12	−1.18 ± 0.10	−1.17 ± 0.17	NS
b^*	6.10 ± 0.14 ^b	5.63 ± 0.29 ^a	5.68 ± 0.26 ^a	*
C^*	6.25 ± 0.53 ^b	5.75 ± 0.29 ^a	5.80 ± 0.25 ^a	*
H^*	102.90 ± 1.3	101.8 ± 0.81	101.7 ± 1.83	NS

CD-1: control diet in Experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in Experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in Experiment 1; CD-2: control diet in Experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in Experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in Experiment 2; NS = not significant; * $p < 0.05$; ^{a,b} Different letters in the same line indicate significant statistical differences between diets ($p < 0.05$).

Milk color depends on factors as the dispersion state of milk fat [27] and milk's natural pigment concentration from carotenoids, proteins and riboflavin [28]. The dispersion state of milk fat has an important impact in physicochemical properties of cheese and butter [27]. L^* depends on milk physical structure (dispersion of casein micelle and fat globules) that affect the diffusion of incident light (higher values of lightness are due to higher diffusion) [29]. Milk composition (fat, protein, Ca, P, etc.), technological treatments and measurement conditions affect the physical structure, and thus the L^* value. In this study, the slightly lower protein and casein content in ABD-2 and APD-2 could be affecting the diffusion of light, increasing the L^* .

Coordinates a^* and b^* depend on natural pigment concentration of goat milk. Main pigments in milk are riboflavin (green compound), β -carotene (yellow coloration), and lutein, to a lesser extent [29].

Goats and sheep milk present a white color, because all of the β -carotene content is converted into retinol [27], and they are devoid of that pigment. The differences between diets in b^* and C^* could be due to small differences in natural pigments. The yellow coordinate (b^*) and color saturation (C^*) decreased in ABD-2 and APD-2, independently of whether the by-products were in the form of bracts or plant; they were higher in CD-2 group, therefore pointing to a replacement of ingredients from conventional feed that may have led to this reduction, however, it should be kept in mind that such differences are imperceptible to human eye, and so irrelevant from the organoleptic point of view.

Figure 1 presents the reflectancies (360–740 nm) of milk from diets containing artichoke by-products (plant and outer bracts) with a 12.5% inclusion (Experiment 1) and 25% inclusion (Experiment 2). For both experiments the milk of goats fed with artichoke bracts (ABD-1 and ABD-2) showed higher values at all studied wavelengths. Several authors reported that using the 450–510 nm range from the analysis of milk, it is possible to explain 47–69% of the variability of milk β -carotenes, [29]. Differences observed in the present study are small, however, more studies are needed to find new relationships between the color of milk and its pigments, and the inclusion of higher amounts of silages from artichoke by-products.

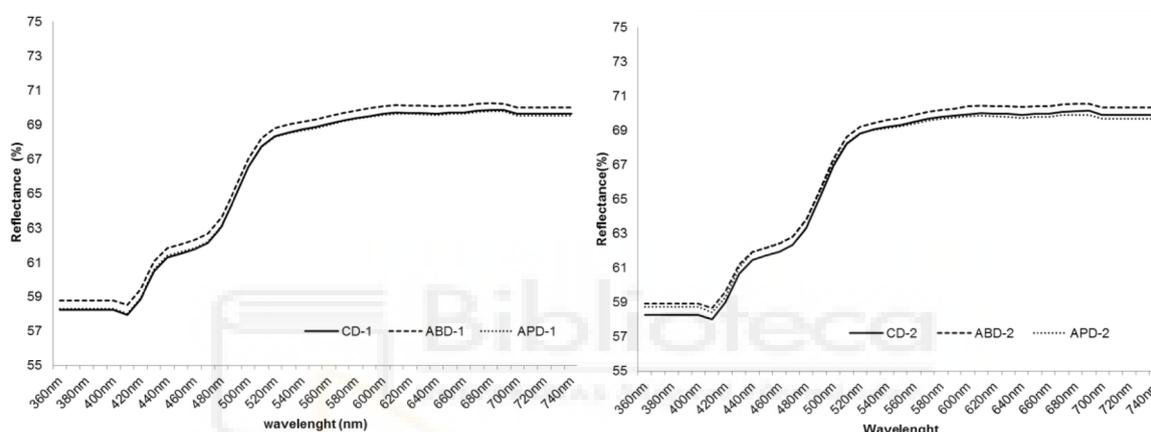


Figure 1. Reflectancies (360–740 nm) of milk from Murciano-Granadina goats fed on diets containing or not containing artichoke by-products (plant and outer bracts) in Experiment 1 (12.5% inclusion) and Experiment 2 (25% inclusion). CD-1: control diet in Experiment 1; ABD-1: artichoke bracts diet in Experiment 1; APD-1: artichoke plant diet in Experiment 1; CD-2: control diet in Experiment 2; ABD-2: artichoke bracts diet in Experiment 2; APD-2: artichoke plant diet in Experiment 2.

3.4. Milk Sensory Analyses

The sensory analysis of milk did not reveal the presence of off-flavors on any type of milk, and panelists were not able to identify milk sensory characteristics unique or related to any of the evaluated diets. Triangular tests were run by consumers; these are discriminant tests aiming to prove whether consumers were able to detect differences among sweetened yogurts prepared with milk from CD-2, ABD-2 and APD-2. As a result, only in 35% of the total number of triangular test consumers were able to provide correct judgements, and so, the minimum numbers of correct judgments needed to establish significance at 95–99% probability level (45–49) were not reached [17]. In detail: 34% of correct judgements were obtained when CD-2 vs. ABD-2 yogurts were compared; 30% when CD-2 vs. APD-2 yogurts were compared, and; 39% of correct judgements when ABD-2 were compared versus APD-2 yogurts. Such results point to a random selection of the different sample; consumers also commented how difficult was to discriminate among samples. In a similar trend, studies including up to 20% banana silages in goats diet lead to cheeses without flavor defects that kept sensory attributes similar to those of control cheeses [30]. The inclusion of buriti fruit oil in goats’ diet up to 4.5% dry matter did not modify milk sensory properties [31], and neither the inclusion of five cacti varieties [32]. Milk obtained

from goats fed with up to 25% of silages of artichoke by-products did not develop off-flavors, and yielded yogurts of similar sensory properties that consumers were not able to discriminate.

4. Conclusions

Silages from artichoke by-products (plant and outer bracts) can be successfully included in dairy goat balanced diets up to a 25% replacement of conventional ingredients without leading to relevant changes on milk composition, nor changes on technological properties of milk. The fact that changes in overall milk composition are irrelevant is the main factor preserving milk technological properties. It is of special relevance to point that there were no changes in the sensory properties of milk and yogurt obtained from those milks due to the inclusion of artichoke by-product silages. Further studies are needed to explore higher inclusion of preserved artichoke by products, as well as other horticultural by products in order to provide the scientific basis for their incorporation in balanced diets overcoming their seasonality, reducing feeding costs and enhancing farming sustainability.

Acknowledgments: Financed with a Project from Conselleria de Educació de la Generalitat Valenciana GV/2015/033. Author Monllor was financed by a pre-doctoral grant from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte FPU14/06058.

Author Contributions: Raquel Muelas and Paula Monllor were in charge of farm experiments and diet analysis, Raquel Muelas and Casilda Navarro of laboratory work and sensory analysis, Gema Romero and José Ramón Díaz designed and managed the experiment, Estrella Sayas-Barberá was in charge of data analysis, Raquel Muelas prepared Tables and Figures. Esther Sendra wrote the manuscript, which was revised by all authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. FAO. Faostat. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed on 27 October 2017).
2. MAPAMA. *Producciones Agrícolas*; Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente: Madrid, Spain, 2017.
3. MMA. *Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del Sector de los Transformados Vegetales*; Ministerio de Medio Ambiente, Gobierno de España: Madrid, Spain, 2006.
4. Chiofalo, B.; Liotta, L.; Zumbo, A.; Chiofalo, V. Administration of olive cake for ewe feeding: Effect on milk yield and composition. *Small Rumin. Res.* **2004**, *55*, 169–176. [[CrossRef](#)]
5. Nudda, A.; Battacone, G.; Usai, M.G.; Fancellu, S.; Pulina, G. Supplementation with extruded linseed cake affects concentrations of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in goat milk. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 277–282. [[CrossRef](#)]
6. 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. 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.* **2002**, *31*, 475–483. [[CrossRef](#)]
7. Todaro, M.; Alabiso, M.; Scatassa, M.L.; Di Grigoli, A.; Mazza, F.; Maniaci, G.; Bonanno, A. 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.* **2017**, *225*, 213–223. [[CrossRef](#)]
8. Araujo, R.C.; Pires, A.V.; Susin, I.; Mendes, C.Q.; Rodrigues, G.H.; Packer, I.U.; Eastridge, M.L. Milk yield, milk composition, eating behavior, and lamb performance of ewes fed diets containing soybean hulls replacing coastcross (cynodon species) hay12. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86*, 3511–3521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kholif, A.E.; Morsy, T.A.; Gouda, G.A.; Anele, U.Y.; Galyean, M.L. Effect of feeding diets with processed moringa oleifera meal as protein source in lactating anglo-nubian goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *217*, 45–55. [[CrossRef](#)]
10. Arco-Pérez, A.; Ramos-Morales, E.; Yáñez-Ruiz, D.R.; Abecia, L.; Martín-García, A.I. Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2017**, *232*, 57–70. [[CrossRef](#)]

11. Romero-Huelva, M.; Ramos-Morales, E.; Molina-Alcaide, E. Nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial abundances, and milk yield and composition in dairy goats fed diets including tomato and cucumber waste fruits. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 6015–6026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Romero-Huelva, M.; Ramírez-Fenosa, M.A.; Planelles-González, R.; García-Casado, P.; Molina-Alcaide, E. Can by-products replace conventional ingredients in concentrate of dairy goat diet? *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 4500–4512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vasta, V.; Nudda, A.; Cannas, A.; Lanza, M.; Priolo, A. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *147*, 223–246. [[CrossRef](#)]
14. Molina-Alcaide, E.; Moumen, A.; Martín-García, A.I. By-products from viticulture and the wine industry: Potential as sources of nutrients for ruminants. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 597–604. [[CrossRef](#)]
15. Raynal-Ljutovac, K.; Park, Y.W.; Gaucheron, F.; Bouhallab, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 207–220. [[CrossRef](#)]
16. Morgan, F.; Massouras, T.; Barbosa, M.; Roseiro, L.; Ravasco, F.; Kandarakis, I.; Bonnin, V.; Fistakoris, M.; Anifantakis, E.; Jaubert, G.; et al. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in greece, portugal and france. *Small Rumin. Res.* **2003**, *47*, 39–49. [[CrossRef](#)]
17. Stone, H. *Sensory Evaluation Practices*/Herbert Stone, Joel L. Sidel; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1993.
18. Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Rouel, J.; Lamberet, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 1751–1770. [[CrossRef](#)]
19. Jaramillo, D.P.; Buffa, M.N.; Rodríguez, M.; Pérez-Baena, I.; Guamis, B.; Trujillo, A.J. Effect of the inclusion of artichoke silage in the ration of lactating ewes on the properties of milk and cheese characteristics during ripening. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1412–1419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Volanis, M.; Zoiopoulos, P.; Panagou, E.; Tzerakis, C. Utilization of an ensiled citrus pulp mixture in the feeding of lactating dairy ewes. *Small Rumin. Res.* **2006**, *64*, 190–195. [[CrossRef](#)]
21. Kholif, A.E.; Morsy, T.A.; Abd El Tawab, A.M.; Anele, U.Y.; Galyean, M.L. Effect of supplementing diets of anglo-nubian goats with soybean and flaxseed oils on lactational performance. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 6163–6170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Abo-Donia, F.M.; Yang, L.Y.; Hristov, A.N.; Wang, M.; Tang, S.X.; Zhou, C.S.; Han, X.F.; Kang, J.H.; Tan, Z.L.; He, Z.X. Effects of tannins on the fatty acid profiles of rumen fluids and milk from lactating goats fed a total mixed ration containing rapeseed oil. *Livest. Sci.* **2017**, *204*, 16–24. [[CrossRef](#)]
23. Boutoia, K.; Ferrandini, E.; Rovira, S.; García, V.; López, M.B. Effect of feeding goats with rosemary (*rosmarinus officinalis* spp.) by-product on milk and cheese properties. *Small Rumin. Res.* **2013**, *112*, 147–153. [[CrossRef](#)]
24. Jõudu, I.; Henno, M.; Kaart, T.; Püssa, T.; Kärt, O. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 964–967. [[CrossRef](#)]
25. Ketto, I.A.; Knutsen, T.M.; Øyaas, J.; Heringstad, B.; Ådnøy, T.; Devold, T.G.; Skeie, S.B. Effects of milk protein polymorphism and composition, casein micelle size and salt distribution on the milk coagulation properties in norwegian red cattle. *Int. Dairy J.* **2017**, *70*, 55–64. [[CrossRef](#)]
26. Inglingstad, R.A.; Steinshamn, H.; Dagnachew, B.S.; Valenti, B.; Criscione, A.; Rukke, E.O.; Devold, T.G.; Skeie, S.B.; Vegarud, G.E. Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 3800–3814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Barłowska, J.; Sz wajkowska, M.; Litwińczuk, Z.; Król, J. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 291–302. [[CrossRef](#)]
28. Solah, V.A.; Staines, V.; Honda, S.; Limley, H.A. Measurement of milk color and composition: Effect of dietary intervention on western australian holstein-friesian cow's milk quality. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S560–S566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nozière, P.; Graulet, B.; Lucas, A.; Martin, B.; Grolier, P.; Doreau, M. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *131*, 418–450. [[CrossRef](#)]
30. Rincón, A.A.; García-Fraga, J.M.; Álvarez, S.; Pino, V.; Fresno, M.R.; Ayala, J.H.; Afonso, A.M. Effect of the inclusion of banana silage in the diet of goats on physicochemical and sensory characteristics of cheeses at different ripening times. *Small Rumin. Res.* **2017**, *149*, 52–61. [[CrossRef](#)]

31. Morais, J.S.; Bezerra, L.R.; Silva, A.M.A.; Araújo, M.J.; Oliveira, R.L.; Edvan, R.L.; Torreão, J.N.C.; Lanna, D.P.D. Production, composition, fatty acid profile and sensory analysis of goat milk in goats fed buriti oil. *J. Anim. Sci.* **2017**, *95*, 395–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Catunda, K.L.M.; de Aguiar, E.M.; de Góes Neto, P.E.; da Silva, J.G.M.; Moreira, J.A.; do Nascimento Rangel, A.H.; de Lima Júnior, D.M. Gross composition, fatty acid profile and sensory characteristics of saanen goat milk fed with cacti varieties. *Trop. Anim. Health Prod.* **2016**, *48*, 1253–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



4.2. Publicación 2

Publicación 2 (Transcripción literal)

Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters

R. Muelas, A. Martí de Olives, G. Romero, J.R. Díaz, M.E. Sayas-Barberá, E. Sendra

LWT-Food Science and Technology 9 (506-514)

doi: 10.1016/j.lwt.2018.09.005



Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: quality parameters

Muelas, R. Martí de Olives, A., Romero, G., Díaz, J.R., Sayas, M.E., Sendra*, E.

Departamento Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Carretera de Beniel, km 3.2, Orihuela 03312, Spain.

*Corresponding author: Tel.: 966749735; fax: 966749677 E-mail address: esther.sendra@umh.es

ABBREVIATIONS USED

LAB: lactic acid bacteria, FM: fermented milk; HPLC: high performance liquid chromatography, CECT Spanish Culture Type Collection, SPME: Solid Phase Micro Extraction, CLA Conjugated Linoleic Acid

1 **ABSTRACT**

2 Nine lactic acid bacteria (LAB) were evaluated as single cultures for goat milk
 3 fermentation with the aim to assess their suitability as adjunct cultures. Performance
 4 of the cultures was assessed based on technological and product quality parameters
 5 and their comparison with a commercial mixed culture. Volatile compounds profile,
 6 odor descriptors, acidification rate, microbial counts, gel stability, organic acid and
 7 sugar profiles, conjugated linoleic acid (CLA) content, were determined. Most LAB
 8 reached counts over 7-log cfu/g, gel stability assessed by centrifugation (average:
 9 64% loss) and whey composition (average: 0.32% protein, 0.24% fat, 4.4% lactose,
 10 3.5% dry matter) and CLA content (1.16% of total fatty acids) were not affected by
 11 the assayed cultures. Main differences among fermented milks relied on volatiles
 12 (mainly acids and ketones), odor descriptors and sugar metabolism (glucose,
 13 galactose and lactic acid). The present study provides useful information for the
 14 selection of cultures for goat milk products.

15

16

17

18 **Keywords:** goat milk, lactic acid bacteria, volatiles, metabolites.

19 **1. INTRODUCTION**

20

21 Goat milk is increasingly getting attention for new product development during
22 the last years due to the uniqueness of goat milk (Clark & Mora García, 2017).
23 Besides, dairy goats are mainly located in low income countries as well as
24 some European countries, and always linked to local breeds and traditional
25 products. One of the main strategies for the development of the dairy goat
26 sector is the diversification of goat milk products and the development of
27 value added dairy products (Pulina, Milán, Lavín, Theodoridis, Morin, Capote,
28 et al., 2018). Fermented dairy foods are positively perceived by consumers as
29 healthy foods due to their digestibility and incorporation of live microorganisms. The
30 first step on product development is the knowledge of the effect of individual bacteria
31 on the properties of the fermented milk (FM) so the strains could be selected based
32 on the best technological and functional properties developed (Li et al., 2017), as
33 even strains from the same species may develop unique sensory notes in the end
34 products.

35 When defining quality indicators of a starter culture several parameters can be
36 selected, in the present study attention will be focused on the volatile profile and
37 quality of the FMs. Acidification rate is a presumptive indicator of culture viability.
38 High cell growth and acidification rate also reduce fermentation time and enhance
39 strain viability by preventing the growth of undesirable or competitor microorganisms
40 (Marklinder & Lönner, 1992). LAB counts should be at least over 10^7 colony forming
41 units (cfu) per gram in order to fulfill common standards on microbial viability in FMs
42 (Gomes & Malcata, 1999). An important parameter when evaluating a microbial food
43 process is the identification and quantification of metabolic end-products; such as
44 organic acids, sugars and volatile compounds.

45 Gel stability can be visually perceived and also assessed by water retention
46 ability after centrifugation. The composition of the whey removed by centrifugation
47 (fat and protein losses) may provide information on gel quality. Fatty acids profile of
48 milk has been reported to be affected by fermentation (Trigueros, Barber, & Sendra,
49 2015), with some strains reported to increase CLA content in milk. Volatile profile
50 and sensory properties of milks fermented by single cultures are not always related
51 to the volatiles and sensory properties developed when the strain is used in
52 combination with others in a mixed culture (Dan et al., 2017), it maybe modified
53 when the balance between species is modified. However, the effect of each individual
54 strain on the volatile profile of FMs provides a deeper knowledge on their flavor
55 development abilities.

56 A good adjunct culture should not negatively affect sensory and quality
57 attributes of the dairy products, and provide beneficial properties (Champagne,
58 Gomes da Cruz, & Daga, 2018). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and
59 *Lactococcus lactis* are among the most widely used LAB in the food industry,
60 especially in starter cultures for the dairy industry, mixed with other LAB.
61 *Lactobacillus casei* is commonly present in raw and fermented dairy products, and it
62 has been successfully used for the development of functional ice-cream
63 (Balthazar, Silva, Esmerino, Rocha, Moraes, Carmo, et al., 2018) and as a
64 flavor enhancer in low sodium cheese (Silva, Balthazar, Esmerino, Neto,
65 Rocha, Moraes, et al., 2018). *Lactobacillus paracasei*, is closely related to *L. casei*.
66 *Lactobacillus helveticus* is also commonly present in dairy products. *Lactobacillus*
67 *plantarum* is largely used in the food industry (meat, dairy, vegetable) and has the
68 ability to produce antimicrobial compounds (Cebeci & Gürakan, 2003). *L. casei*, *L.*
69 *paracasei* and *L. plantarum* are considered potential probiotics according to (Hill et
70 al., 2014). Goat milk has been reported as a suitable carrier for probiotics

71 (Ranadheera, Naumovski, & Ajlouni, 2018). *Lactobacillus reuteri* produces folate and
 72 B12 vitamin, as well as reuterin, which has antimicrobial properties (Jones &
 73 Versalovic, 2009). *Lactobacillus sakei* is frequently used for meat fermentation and
 74 plays a role in preserving fresh meats due to its ability to produce antimicrobial
 75 peptides (bacteriocins). It is not commonly used for dairy products but it was
 76 considered of interest as it is in the same group as *Lactobacillus curvatus*, which is a
 77 facultative heterofermentative bacterium commonly present as non-starter LAB in
 78 cheeses. Some strains of *L. curvatus* have been reported to be able to produce gut
 79 microbial changes associated with obesity reduction (Park et al., 2013). A commercial
 80 mixed starter culture commonly used in the dairy industry was taken as a reference
 81 culture.

82 The present work aims to provide new information on fermented goat milk by
 83 screening nine selected strains of LAB used as single starter cultures, and a mixed
 84 starter for goat milk fermentation based on their: (i) acidification rate, (ii) microbial
 85 counts, (iii) gel stability, (iv) fatty acid profile, (v) fermentation metabolites: organic
 86 acids, sugars and volatile profiles and (vi) odor.

87

88 **2. MATERIALS AND METHODS**

89

90 **2.1. FERMENTED MILK MANUFACTURE**

91 Bulk tank milk from the experimental Murciano-Granadina dairy goats farm of
 92 the Miguel Hernández University was used for the study. Four liters of milk were
 93 taken each sampling day. Six independent replicates were run. Milk was pasteurized
 94 at 80 °C for 30 min and aseptically distributed into 80 mL sterile flasks for inoculation.
 95 Starter cultures were: *Lactobacillus casei* CECT 475, *Lactobacillus curvatus* CECT
 96 5786, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CECT 4005, *Lactobacillus helveticus*
 97 CECT 541, *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* CECT 277, *Lactobacillus plantarum*

98 CECT 5785, *Lactobacillus reuteri* CECT 925, *Lactobacillus sakei* subs. *carneus* CECT
99 5964, and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4042, (Colección Española de
100 Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Burjasot, España). The commercial
101 mixed culture MA400 (Danisco; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis*
102 subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus*
103 *thermophilus*) was tested as a reference mixed culture for fermentation performance
104 on goats milk and quality characteristics (Morgan et al., 2003). To obtain FM samples
105 1 mL aliquots of starter culture were added to 80 mL pasteurized milk and the
106 inoculated mixes were incubated at the optimal conditions for each culture as defined
107 by CECT. pH was determined just before incubation and at time intervals until pH
108 around 4.8 was reached. Afterwards, FMs were stored at 4 °C during 24 h before
109 analysis. Most parameters were evaluated on four randomly assigned replicates,
110 whereas sensory evaluation was run on two replicates.

111

112 2.2. MILK COMPOSITION

113 Milk composition was analyzed using Fourier Transform Infrared
114 Spectrophotometry (FT120 Milko-Scan; Foss Electric, Hillerød, Denmark) with a
115 commercial calibration from Foss Electric validated according to ISO 21543:2006
116 (ISO, 2006). The milk samples were previously heated to 40 °C.

117

118 2.3. FERMENTED MILKS ANALYSIS

119 Organic acids and sugars of FM samples were analyzed by High-Performance
120 Liquid Chromatography (HPLC) (Trigueros, Sayas-Barberá, Pérez-Álvarez, & Sendra,
121 2012).

122 MRS agar was used for the count of all lactobacilli which were incubated
123 following indications for optimal growth of each microorganism as defined by CECT.

124 Strains of *L. curvatus*, *L. paracasei* and *L. plantarum* were incubated at 30 °C under
125 aerobic conditions; *L. casei*, *L. reuteri* and *L. sakei* were incubated at 37 °C under
126 aerobic conditions; *L. bulgaricus* and *L. helveticus* were incubated at 37 °C in candle
127 jars; *L. lactis* (candle jar) and MA400 (aerobic conditions) were counted on M17 Agar
128 (pH=7.2±0.2) at 30 °C incubated for 48 hours (CECT, 2018).

129 Gel stability was visually assessed after incubation (signs of syneresis, gas
130 formation, flocculation), and determined by quantifying the volume of whey removed
131 from curd after centrifugation (Morgan, et al., 2003). Whey composition was
132 determined using the FT120 Milko-Scan calibrated for whey analysis using a pH-
133 independent calibration by Foss Electric (ISO, 2006). Two replicate determinations
134 were carried for each batch.

135 Milk fat was extracted (Romeu-Nadal, Morera-Pons, Castellote, & López-
136 Sabater, 2004), and afterwards methylated (Trigueros & Sendra, 2015). Methyl
137 esters were separated on a Shimadzu GC17A gas chromatography unit coupled with
138 a flame ionization detector and a DB-23 capillary column (30 m length, 0.25 mm
139 internal diameter, 0.25 µm film thickness) J&W Scientific, Agilent Technologies. The
140 flow rate of the carrier gas (Helium) was 1.1 mL/min and 35 mL/min at the make-up
141 point, the injector temperature was 240 °C and the detector 260 °C. The injection
142 volume was 0.8 µL (split ratio 1:20). The temperature program was as follows: initial
143 temperature 100 °C held for 1 minute, temperature gradient of 3 °C/min until 220
144 °C, followed by a gradient of 5 °C/min until 245 °C and keeping 245 °C during 1 min.
145 Identification of methylated fatty acids (FAME) peaks was performed by comparing
146 the retention times of the FAME standards. Results were expressed semi-
147 quantitatively as a percentage of the total fatty acid profile. Health-related indexes
148 of fat have been calculated: Atherogenic Index (AI) and Thrombogenic Index (TI)
149 were calculated (Batista et al., 2017) and Desaturase Index (DI) was calculated
150 according to (Lock & Garnsworthy, 2003).

151 Solid Phase Micro Extraction (SPME) of volatiles was run (Tunick, Iandola, &
152 Van Hekken, 2013 2013). Afterwards, the fiber was desorbed in the injector port of
153 the chromatography unit (Shimadzu CG17A coupled to a GCMS-QP5050) during 3
154 min. at 250 °C. The column used for volatiles separation was a Rxi-1301 Sil MS (30
155 m length, 0.25 mm internal diameter, 1- μ m thickness), the mass spectrometer
156 detector of the GC served for the identification of volatile compounds. The carrier gas
157 was Helium (0.8mL/min) and the temperature program was as follows: initial
158 temperature 40 °C during 2 min., temperature gradient of 10 °C/min until 200 °C
159 and keeping 200 °C during 10 min. Identification of peaks was performed by
160 comparing the retention times of the standards compounds and by Wiley library
161 spectra.

162 A Quantitative Descriptive Analysis (QDA), which use has been previously
163 reported in dairy foods (Janiaski, Pimentel, Cruz, & Prudencio, 2016), was run for
164 attributes for odor and aroma. The sensory panel used in this study included 9 highly
165 panellists (5 females and 4 males) with ages between 24 and 61 years old, previously
166 trained following the ISO 8586:2012. The preliminary orientation session (30 min)
167 consisted in product evaluation by the sensory panel, who discussed about odor and
168 aroma characteristics. After the orientation session, all members of the panel agreed
169 in describing the sensory odor profile of each FM by 4 to 5 descriptors. This
170 information was used to establish relationships with the key descriptors of the volatile
171 compounds. Samples were randomly presented to panellists together with a
172 questionnaire. The main objective of the sensory analysis by the expert panel was
173 to establish the presence of off-flavors limiting the potential application of the strains
174 and specific notes of interests for the development of fermented dairy products.

175 2.4. STATISTICAL ANALYSIS

176 Statistical analysis and comparison among means were carried out using the
 177 statistical package SPSS 24.0 (IBM SPSS Statist cs, Chicago, IL, USA). One -way
 178 ANOVA test was used (factor: culture). Tukey test was used for means comparison
 179 (95% confidence level).

180

181 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

182 3.1. PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS

183 Overall milk composition was as follows: 4.70 ± 0.16 % fat, 3.63 ± 0.06 %
 184 protein, 4.90 ± 0.03 % lactose, and 15 ± 0.22 % solids content in milk. Acidification
 185 rate varied depending on the strain, the commercial mixed culture achieved final pH
 186 within 7 hours as expected from the technical note, for all other strains it took
 187 between 12 to 27 hours to reach a pH near 4.8. *L. reuteri* and *L. plantarum* showed
 188 the lowest acidification rates in goat milk (27 hours), followed by *L. casei*, *L. paracasei*
 189 and *L. curvatus* that needed 24 hours. Single cultured FM were expected to have long
 190 fermentation times, even the same strain when single shows lower acidification rates
 191 than when in mixed cultures (Pinto, Clemente, & De Abreu, 2009). Fermentation
 192 times and final pH of the assayed strains were similar to those previously reported
 193 on cow milk (Cano-Lamadrid, Trigueros, Wojdyło, Carbonell-Barrachina, & Sendra,
 194 2017).

195 The highest microbial counts were observed in *L. paracasei*, followed by *L.*
 196 *lactis*, MA-400 and *L. curvatus* FMs (**Table 1**). Microbial counts in all FM were over
 197 10^7 cfu/g except those of *L. bulgaricus*, which are significantly lower than the others
 198 ($p < 0.001$). Counts of this strain on skimmed cows' milk have been reported to be
 199 over 7 log-units (Cano-Lamadrid et al., 2017), so goat milk was less favorable to *L.*
 200 *bulgaricus* than cow's. Reported counts of *L. helveticus* were higher on cow milk (1
 201 log unit increase) as compared to goat milk. All other single cultures showed the
 202 same behavior in goat as the previously reported in cow milk.

203 Regarding gel visual appearance: *L. curvatus* FM was flocculated and evidenced
204 gas formation, to a lesser extend the same happened for *L. plantarum*, in both cases
205 it is related to their heterofermentative nature. Milks fermented by *L. sakei*, *L.*
206 *bulgaricus* and *L. casei* showed evident signs of syneresis but no gas nor flocculation.
207 Gels obtained with MA400, *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. reuteri* and *Lc. lactis* had
208 set-yogurt appearance with no evident signs of syneresis. Wheying off percentage
209 showed few significant ($P < 0.05$) differences (**Table 2**), only between *L. helveticus*
210 (highest water retention) and *L. sakei* (lowest water retention) FMs, so being *L. sakei*
211 FM the least stable gel. Regarding whey composition, no significant differences were
212 observed for fat, lactose and dry matter losses in the whey, whereas protein losses
213 in the whey were slightly reduced by the use of the reference mixed culture MA400
214 (**Table 2**) .

215 3.2. ORGANIC ACIDS AND SUGARS

216 **Table 3** presents organic acids and sugars concentrations in the FMs. Such
217 compounds contribute to the taste of FMs: sugars providing sweetness and acids
218 providing acidity (from mild acidity to pungent vinegar taste depending on the
219 balance between lactic and acetic acids). Lactose decreased from 4.9% in milk till
220 values between 1.9 to 3.09% in the FMs. Lowest residual lactose was observed for *L*
221 *bulgaricus* FM, although only significantly lower than those of *L. casei* and *L.*
222 *paracasei*. Regarding glucose, only traces were detected in milk fermented by the
223 mixed culture MA400 and four other cultures, whereas values from 0.21 to 0.35%
224 were observed for *L. helveticus*, *L. curvatus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum* and *L. reuteri*
225 pointing to a lower metabolic activity in such FMs. Regarding galactose levels, the
226 highest concentration was reported for *L. bulgaricus*, as expected, given that this
227 specie of lactobacilli is not able to metabolize galactose. *L. helveticus* and *L.*
228 *plantarum* also presented relevant amounts of galactose, although they are able to
229 catabolize galactose. *Lc. lactis* also accumulated galactose as not all strains of this

230 lactococci are able to metabolize it (Hickey, Hillier, & Jago, 1986) and its sugar
231 metabolism is highly dependent on oxygen availability. FM with just traces or reduced
232 amounts of residual monosaccharides point to a higher metabolic rate of the cultures.
233 Lactic acid content observed in FMs is consistent with observed the pH values (Tables
234 2 and 3). Ethanol and acetic acid were not present in all FM samples. Acetic was
235 mainly present in trace or really low amounts (<0.02%), whereas ethanol was
236 present only in *L. paracasei*, *L. reuteri*, *Lc. lactis* and MA400 FMs in similar amounts,
237 and in *L. plantarum* FM, although in a lower amount.

238 *L. reuteri* is a heterofermentative bacterium that produces carbon dioxide,
239 ethanol, acetate and lactic acid from glucose, so compared with homofermentative
240 LAB the expected lactic acid production is lower as confirmed by the present results.
241 *L. plantarum* is a facultative heterofermentative bacterium, able to use a variety of
242 carbon sources and metabolize proteins. *L. casei* is a homofermentative bacterium,
243 so lactic acid is the main metabolite from lactose, which is consistent with observation
244 in **Table 3** (no ethanol and few acetic acid content). Overall, sugar profile is highly
245 species specific and acidification rate and sugar metabolism provide information on
246 the future behavior of the strain. When a species accumulates galactose, if used in
247 cheese it may lead to undesirable flavor development. When formulating mixed
248 starters, such galactose accumulators need to be avoided or combined with galactose
249 fermenting strains in the culture (Hickey, Hillier, & Jago, 1986).

250 3.3. TOTAL FATTY ACIDS PROFILE

251 The profile of total fatty acids was not affected by the tested LAB, a summary
252 of the results is presented in **Table 4**. In the present study, neither the evaluated
253 single strains nor the mixed culture enhanced the level of CLA, nor modified health-
254 related indexes compared to milk values. Other authors also reported several LAB
255 not able to enhance CLA levels in FMs (Manzo et al., 2015). Several health-related
256 indexes have been calculated, ATI and TI are similar to that reported by (Ulbricht &

257 Southgate, 1991) in milk, butter and cheese who were the first to define both ATI
 258 and TI indexes as being correlated with atherogenicity and thrombogenicity
 259 respectively. Observed ATI are about 2-3 points lower than those reported in bovine
 260 milk (Batista, et al., 2017, Nantapo, Muchenje, & Hugo, 2014), mainly related to the
 261 high percentage of unsaturated fatty acids in goats' milk. However, TI is much higher
 262 than the reported by Batista et al. (2017), given the larger content in myristic acid
 263 (C14:0) in goat milk, about 7.5%, compared to cows, milk. DI has been correlated
 264 to Δ^9 desaturase activity, indicator of the ability to create a double bond in the 9th
 265 position of the fatty acid and it is mainly related to enzymatic activity in the mammary
 266 gland (Nantapo, Muchenje, & Hugo, 2014), in the present study the strains tested
 267 did not caused changes in the calculated health-related indexes (ATI, TI, DI,
 268 palmitoleic/palmitic and oleic/estearic) of goat milkfat.

269 3.4. VOLATILES AND ODOR CHARACTERISTICS

270 Major volatile compounds detected in raw goat's milk were 2-propanone, ethyl
 271 acetate, 2-heptanone and octanoic acid. Other compounds detected but in much
 272 lower amounts were hexanoic acid, 2-nonanone, nonanal, 2-pentanone, 2-butanone,
 273 and the lowest levels of volatiles were for dimethyl-sulphide, valeric acids and ethyl
 274 octanoate. Scarce data is available on the volatile compounds of fresh dairy products
 275 due to the low concentration of volatiles, and data on goat FMs is even scarcer (Cais-
 276 Sokolińska et al., 2015). No data is available in the scientific literature regarding the
 277 volatile profile developed by the present cultures on goat milk. Regarding FMs,
 278 volatile profiles and concentrations are presented in **Table 5**, as well as descriptors
 279 of the detected compounds reported in the scientific literature (Cheng, 2010;
 280 Sfakianakis & Tzia, 2017). A large number of volatile compounds form the overall
 281 flavor of FMs, major groups are usually alcohols, aldehydes, ketones, esters,
 282 hydrocarbons and organic acids. Ketones contribute to the perception of sweet,
 283 buttery and creamy flavors in fermented dairy products, whereas acids contribute to

284 acidic notes (acetic and lactic) or goaty and cheesy (butanoic, hexanoic and
 285 octanoic), alcohols mainly provide alcoholic and floral-fruity notes (**Table 5**).
 286 Reported volatile compounds in fresh FMs are mainly limited to those coming from
 287 the milk and by-products from glycolysis (Imhof & Bosset, 1994). Most compounds
 288 detected were common to all analyzed FM, however relative amounts were quite
 289 different depending on the culture used.

290 FM flavor is a critical factor for quality evaluation and consumer acceptability,
 291 so not only volatile profile but also sensory perceptions are essential to describe
 292 culture performance. **Table 6** includes the descriptors agreed by the evaluators for
 293 the odor of each FM. Evaluated FM had mild odor intensity, even plain, so samples
 294 were warmed for the evaluation. Such mild intensities are in agreement with the low
 295 volatiles concentrations detected (**Table 5**). Descriptors provided by the sensory
 296 panel are in agreement with the compounds detected in milk samples, although not
 297 always major compounds are the sole responsible of the main odor, pointing to clear
 298 interactions among volatile compounds to build unique sensations, like the reported
 299 synergy among methyl ketones and volatile fatty acids (Siek et al., 1969). As can be
 300 seen in Table 6, most individual cultures yielded notes that if high intensity will be
 301 reached, non-desirable odor profiles will be developed. It should be taken into
 302 account that those same species, when used in mixed cultures yield different volatile
 303 profiles (Dan et al., 2017), as an example *Lc. lactis* is also present in the mixed
 304 MA400 culture and developed a 'cooked' odor that was not present in MA400 FM.

305 According to de Bok et al. (2011) it is possible to obtain volatile compounds
 306 fingerprints from single or mixed starter cultures given the differences in microbial
 307 metabolism for each species and their interactions. As an example, the authors
 308 reported that the single culture of *L. bulgaricus* in cow milk is characterized by higher
 309 levels of 2-propanone and 2-heptanone and lower levels of diacetyl as compared with
 310 other cultures, in agreement with the present (**Table 5**) and other studies (Pinto,

311 Clemente, & De Abreu, 2009). Also ethanol and acetoin are among the main volatiles
 312 in cow milk fermented by *L. bulgaricus* (Imhof & Bosset, 1994).

313 Main volatiles in *L. casei* fermented cow milks include ethanol, acetoin and acetic
 314 acid among the main volatiles (Imhof & Bosset, 1994), which is in coincidence with
 315 results in **Table 5** on goat milk. However, the strain used in the present study on
 316 goat milk developed high contents of propionic, isovaleric, hexanoic, butyric,
 317 isobutyric and octanoic acids. Propionic acid was solely developed in *L. casei* FM. The
 318 observed volatile profile fits the descriptors used by the expert sensory panel as
 319 vinegar and cheesy (**Table 6**). In future studies, when applying these strains to
 320 fermented goat milk products, it should be essential to run consumer studies to
 321 determine optimal culture dosage (Dantas, Jesus, Silva, Almada, Esmerino, Cappato,
 322 et al., 2016) and most valued attributes for consumers on the dairy foods (Janiaski,
 323 Pimentel, Cruz, & Prudencio, 2016). *L. casei* FM showed a unique volatile pattern,
 324 and acids accounted for the major group followed by ketones and total alcohols. For
 325 the other cultures, ketones prevailed in all FM, with an equilibrium among acids and
 326 ketones for *L. sakei* FM. *L. curvatus* FM followed the same pattern of MA400 FM:
 327 ketones, followed by equal amounts of acids, alcohols and hydrocarbons, and just
 328 reduced contents of aldehydes and others, however volatile content was much lower.
 329 Its odor notes included putrid and animal like. *L. helveticus* FM showed a similar
 330 pattern but with reduced proportion of alcohols and enhanced hydrocarbons and
 331 developed acidic and cheesy notes.

332 *Lc. lactis* has been reported to develop ethanol, diacetyl, acetoin, acetaldehyde
 333 and propanone among major volatiles (Imhof & Bosset, 1994) in cow FM. In Table 5
 334 it can be seen that acetoin and diacetyl were the major compounds in goat FM, and
 335 the combination of volatiles were responsible for providing a sweet, cooked and lactic
 336 odor (**Table 6**).

337 *L. paracasei* has been reported to enhance diacetyl formation when included in
338 bovine milk yogurt (Aunbjerg et al., 2015) and to provide antifungal protection. In
339 bovine cheese both diacetyl and 2-propanone were enhanced (Pogačić et al., 2015).
340 In the present study main volatile detected was acetic acid and diacetyl was also
341 among major volatiles, the FM showed acid and animal like odors.

342 Acetoin was the major volatile in *L. sakei* FM, showing the highest content of,
343 not only acetoin, but of total volatile content, and providing sweet, sour and sweaty
344 odor notes. This is consistent with *L. sakei* reported to enhance acetoin in bovine milk
345 cheese (Pogačić, et al., 2015)

346 *L. plantarum* provides unique acidic tastes to fermented cow milk depending on
347 the balance between volatile acetic acid and lactic acid (Quatravaux, Remize,
348 Bryckaert, Colavizza, & Guzzo, 2006), which is dependent on the access to oxygen.
349 *L. plantarum* strains have been previously evaluated as yogurt adjunct cultures on
350 bovine milk, and although the choice of the specific strain affects the quality of the
351 FM, some compounds are characteristics of their presence such as 2,3-pentanedione,
352 acetaldehyde and acetate (Li, et al., 2017; Wang et al., 2017). However, for the
353 present strain acetoin was the prevailing volatile accounting for 60% of the total
354 volatile content of the FM.

355 *L. reuteri* FM had acetoin as major volatile compound followed by acetic acid
356 and developed sweaty rancid notes, this species has been reported to be used for
357 cheese making to develop bio-preservation properties (Gómez-Torres, Ávila,
358 Delgado, & Garde, 2016), and although volatile profile of cheese suffered changes,
359 sensory analysis showed only slight modifications: enhanced cheesy notes and
360 reduced milk, yogurt notes.

361 In order to summarize the results of the present study, and assuming the risk
362 of excessive simplification, **Table 7** has been prepared scoring only parameters that

363 showed relevant differences among FMs. The high acidification rate, good visual gel
364 stability, high microbial counts, high lactic acid content, non-accumulation of
365 monosaccharides, and odor descriptors of MA400 FM have been taken as reference
366 values. Under such frame, *Lc. lactis*, *L. paracasei* and *L. helveticus* proved to be the
367 strains providing faster acidification, higher microbial counts and fermentation
368 abilities on goats' milk, so pointing to the three most interesting species for further
369 studies and applications for the development and innovation on goat milk products.
370 However, also other tested strains maybe of interest to develop unique odor/volatile
371 profiles. It needs to be taken into account that many consumers are not used to goat
372 milk products and their odor characteristics and given the valuable nutritional and
373 potential interest as probiotic carriers several authors (Costa et al., 2014) have
374 suggested strategies to educate consumers to improve the acceptance of fermented
375 goat milk.

376

377 **4. CONCLUSIONS**

378 The present results may support the dairy industry providing valuable data for
379 new product development. The knowledge of the performance of single strains for
380 the fermentation of goat milk may point to potential uses of the strains in goat milk
381 products either alone or in combination with other LAB as adjunct cultures. The
382 present FMs should not be taken as end products but as an evaluation of the
383 performance of cultures.

384 All tested LAB reach counts over 10^7 cfu·g⁻¹ on goat milk, except *L. bulgaricus*.
385 Main differences among the FM rely on acidification rate, gel visual stability, sugar
386 profile, volatile profile and odor descriptors. Gel stability as assessed by draining off.
387 CLA content and overall fatty acid profile are not modified by these LAB. *L. helveticus*,
388 *L. paracasei* and *Lc. lactis* are the strains with the closest performance to that of a

389 mixed commercial culture, although all tested LAB maybe of interest depending on
 390 the required characteristics of the final product.

391 Further studies may deal with the application of such strains for the
 392 development of goat milk products and the study of their consumer acceptance as
 393 well as other health related parameters such as the potential development of
 394 bioactive peptides and *in vitro* digestion studies.

395

396 **Acknowledgements** The authors would like to acknowledge Desiré González
 397 Verdú and Almudena Martínez Perales for the laboratory assistance.

398 Funding: This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y
 399 Competitividad [grant AGL2015-64518-R].

400

401



402 **5. REFERENCES**

- 403 Aunsbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., Skov,
 404 T., & Knøchel, S. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus*
 405 *paracasei* in defined medium and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*,
 406 *194*, 46-53.
- 407 Balthazar, C. F., Silva, H. L. A., Esmerino, E. A., Rocha, R. S., Moraes, J., Carmo, M. A. V., Azevedo,
 408 L., Camps, I., K.D Abud, Y., Sant'Anna, C., Franco, R. M., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices,
 409 R. S. L., Escher, G. B., Granato, D., Senaka Ranadheera, C., Nazarro, F., & Cruz, A. G.
 410 (2018). The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food*
 411 *Chemistry*, *246*, 464-472.
- 412 Batista, A. L. D., Silva, R., Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Nascimento, K. O., Schmiele, M.,
 413 Esmerino, E. A., Balthazar, C. F., Silva, H. L. A., Moraes, J., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q.,
 414 Raices, R. S. L., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2017). Developing a synbiotic fermented milk
 415 using probiotic bacteria and organic green banana flour. *Journal of Functional Foods*, *38*,
 416 242-250.
- 417 Cais-Sokolińska, D., Wójtowski, J., Pikul, J., Danków, R., Majcher, M., Teichert, J., & Bagnicka, E.
 418 (2015). Formation of volatile compounds in kefir made of goat and sheep milk with high
 419 polyunsaturated fatty acid content. *Journal of Dairy Science*, *98*(10), 6692-6705.
- 420 Cano-Lamadrid, M., Trigueros, L., Wojdyło, A., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Sendra, E. (2017).
 421 Anthocyanins decay in pomegranate enriched fermented milks as a function of bacterial
 422 strain and processing conditions. *LWT*, *80*, 193-199.
- 423 Cebeci, A., & Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum*
 424 strains. *Food Microbiology*, *20*(5), 511-518.
- 425 CECT. (2018). Colección Española de Cultivos Tipo. In, vol. 2018 (pp. Official National Culture
 426 Type Colection): Universidad de Valencia.
- 427 Champagne, C. P., Gomes da Cruz, A., & Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality
 428 of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, *22*, 160-166.
- 429 Cheng, H. (2010). Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Critical Reviews in Food*
 430 *Science and Nutrition*, *50*(10), 938-950.
- 431 Clark, S., & Mora García, M. B. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research.
 432 *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10026-10044.
- 433 Costa, M. P., Balthazar, C. F., Franco, R. M., Marsico, E. T., Cruz, A. G., & Conte, C. A., Jr. (2014).
 434 Changes on expected taste perception of probiotic and conventional yogurts made from
 435 goat milk after rapidly repeated exposure. *J Dairy Sci*, *97*(5), 2610-2618.
- 436 Dan, T., Wang, D., Jin, R. L., Zhang, H. P., Zhou, T. T., & Sun, T. S. (2017). Characterization of
 437 volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods
 438 coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, *100*(4),
 439 2488-2500.
- 440 Dantas, A. B., Jesus, V. F., Silva, R., Almada, C. N., Esmerino, E. A., Cappato, L. P., Silva, M. C.,
 441 Raices, R. S. L., Cavalcanti, R. N., Carvalho, C. C., Sant'Ana, A. S., Bolini, H. M. A., Freitas,
 442 M. Q., & Cruz, A. G. (2016). Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with
 443 *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Dairy Science*, *99*(1), 18-30.

- 444 de Bok, F. A. M., Janssen, P. W. M., Bayjanov, J. R., Sieuwerts, S., Lommen, A., van Hylckama
 445 Vlieg, J. E. T., & Molenaar, D. (2011). Volatile compound fingerprinting of mixed-culture
 446 fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6233-6239.
- 447 Gomes, A. M. P., & Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*:
 448 biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as
 449 probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4), 139-157.
- 450 Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D., & Garde, S. (2016). Effect of reuterin-producing
 451 *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of
 452 semi-hard ewe milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 103-110.
- 453 Hickey, M. W., Hillier, A. J., & Jago, G. R. (1986). Transport and Metabolism of Lactose, Glucose,
 454 and Galactose in Homofermentative Lactobacilli. *Applied and Environmental*
 455 *Microbiology*, 51(4), 825-831.
- 456 Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B.,
 457 Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific
 458 Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and
 459 appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506.
 460
- 461 Imhof, R., & Bosset, J. O. (1994). Relationships between micro-organisms and formation of
 462 aroma compounds in fermented dairy products. *Zeitschrift für Lebensmittel-*
 463 *Untersuchung und Forschung*, 198(4), 267-276.
- 464 ISO. (2006). ISO 21453:2006. Milk Products: Guidelines for the application of Near Infrared
 465 Spectrometry. International Standard Organization.
- 466 ISO. (2012). ISO 8586:2012 Sensory analysis -- General guidelines for the selection, training and
 467 monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. *International*
 468 *Organization for Standardization*.
- 469 Janiaski, D. R., Pimentel, T. C., Cruz, A. G., & Prudencio, S. H. (2016). Strawberry-flavored yogurts
 470 and whey beverages: What is the sensory profile of the ideal product? *Journal of Dairy*
 471 *Science*, 99(7), 5273-5283.
- 472 Jones, S. E., & Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial
 473 and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9(1), 35.
- 474 Li, C., Song, J., Kwok, L. Y., Wang, J., Dong, Y., Yu, H., Hou, Q., Zhang, H., & Chen, Y. (2017).
 475 Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent
 476 changes during postfermentation storage. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2512-2525.
- 477 Lock, A. L., & Garnsworthy, P. C. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and
 478 $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, 79(1), 47-59.
- 479 Manzo, N., Pizzolongo, F., Montefusco, I., Aponte, M., Blaiotta, G., & Romano, R. (2015). The
 480 effects of probiotics and prebiotics on the fatty acid profile and conjugated linoleic acid
 481 content of fermented cow milk. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*,
 482 66(3), 254-259.
- 483 Marklinder, I., & Lönner, C. (1992). Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*,
 484 of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. *Food*
 485 *Microbiology*, 9(3), 197-205.
- 486 Morgan, F., Massouras, T., Barbosa, M., Roseiro, L., Ravasco, F., Kandarakis, I., Bonnin, V.,
 487 Fistakoridis, M., Anifantakis, E., Jaubert, G., & Raynal-Ljutovac, K. (2003). Characteristics

- 488 of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and
489 France. *Small Ruminant Research*, 47(1), 39-49.
- 490 Nantapo, C. T., Muchenje, V., & Hugo, A. (2014). Atherogenicity index and health-related fatty
491 acids in different stages of lactation from Friesian, Jersey and FriesianxJersey cross cow
492 milk under a pasture-based dairy system. *Food Chem*, 146, 127-133.
- 493 Park, D.-Y., Ahn, Y.-T., Park, S.-H., Huh, C.-S., Yoo, S.-R., Yu, R., Sung, M.-K., McGregor, R. A., &
494 Choi, M.-S. (2013). Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus*
495 *plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes
496 and Reduction in Obesity. *PLoS ONE*, 8(3), e59470.
- 497 Pinto, S. M., Clemente, M. D. G., & De Abreu, L. R. (2009). Behaviour of volatile compounds
498 during the shelf life of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 62(2), 215-
499 223.
- 500 Pogačić, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A. L., Valence, F., & Thierry, A.
501 (2015). A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their
502 ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology*, 46, 145-153.
- 503 Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D. L.,
504 Francesconi, A. H. D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm
505 structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*,
506 101(8), 6715-6729.
- 507 Quatravaux, S., Remize, F., Bryckaert, E., Colavizza, D., & Guzzo, J. (2006). Examination of
508 *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of
509 aeration parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 903-912.
- 510 Ranadheera, C. S., Naumovski, N., & Ajlouni, S. (2018). Non-bovine milk products as emerging
511 probiotic carriers: recent developments and innovations. *Current Opinion in Food*
512 *Science*, 22, 109-114.
- 513 Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2004). Comparison
514 of two methods for the extraction of fat from human milk. *Analytica Chimica Acta*,
515 513(2), 457-461.
- 516 Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2017). Flavour profiling by gas chromatography–mass spectrometry
517 and sensory analysis of yoghurt derived from ultrasonicated and homogenised milk.
518 *International Dairy Journal*, 75, 120-128.
- 519 Siek, T. J., Albin, I. A., Sather, L. A., & Lindsay, R. C. (1969). Taste Thresholds of Butter Volatiles
520 in Deodorized Butteroil Medium. *Journal of Food Science*, 34(3), 265-265.
- 521 Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Neto, R. P. C., Rocha, R. S., Moraes, J., Cavalcanti,
522 R. N., Franco, R. M., Tavares, M. I. B., Santos, J. S., Granato, D., Costa, R. G. B., Freitas,
523 M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Senaka Ranadheera, C., Nazzaro, F., Mortazavian, A.
524 M., & Cruz, A. G. (2018). Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor
525 enhancers on probiotic Prato cheese: A study covering manufacturing, ripening and
526 storage time. *Food Chemistry*, 248, 192-200.
- 527 Trigueros, L., & Sendra, E. (2015). Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) content in
528 fermented milks as assessed by direct methylation. *LWT - Food Science and Technology*,
529 60(1), 315-319.

- 530 Trigueros, L., Barber, X., & Sendra, E. (2015). Conjugated linoleic acid content in fermented goat
531 milk as affected by the starter culture and the presence of free linoleic acid.
532 *International Journal of Dairy Technology*, 68(2), 198-206.
- 533 Trigueros, L., Sayas-Barberá, E., Pérez-Álvarez, J. A., & Sendra, E. (2012). Use of date (*Phoenix*
534 *dactylifera* L.) blanching water for reconstituting milk powder: Yogurt manufacture.
535 *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 506-514.
- 536 Tunick, M., landola, S., & Van Hekken, D. (2013). Comparison of SPME Methods for Determining
537 Volatile Compounds in Milk, Cheese, and Whey Powder. *Foods*, 2(4), 534.
- 538 Ulbricht, T. L., & Southgate, D. A. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*,
539 338(8773), 985-992.
- 540



Table 1. Means (\pm SD) of bacterial counts of fermented goat milk at 24 h refrigerated storage as a function of the microbial culture (n=16).

Cultures	Bact.count (Log ₁₀ cfu/g)
<i>Lactobacillus casei</i> CECT 475	8.54 \pm 0.4 ^{bcd}
<i>Lactobacillus curvatus</i> CECT 5786	9.11 \pm 0.25 ^{cd}
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CECT 4005	5.60 \pm 0.47 ^a
<i>Lactobacillus helveticus</i> CECT 541	7.77 \pm 0.77 ^b
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> CECT 277	9.56 \pm 0.22 ^d
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 5785	8.74 \pm 0.20 ^{bcd}
<i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925	8.19 \pm 1.48 ^{bc}
<i>Lactobacillus sakei subsp. carnosus</i> CECT 5964	8.99 \pm 0.58 ^{cd}
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CECT 4042	9.47 \pm 0.35 ^d
MA-400 ¹	9.42 \pm 0.32 ^d
SL ²	***

¹*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*

²Significance level: *** $P < 0.001$

^{a,b,c,d}Means within a column with different superscript letters present significant differences ($p < 0.05$)

CECT: Spanish Collection of Type Cultures

Table 2. Overall composition (g/100mL) of whey, pH and percentage of whey released by centrifugation from fermented goat milk as a function of microbial culture (n=16).

Cultures	pH	Fat	Crude protein	Lactose	Total solids	Draining (%)
<i>L. casei</i> CECT 475	4.59±0.36 ^{ab} c	0.27±0.09 a	0.61±0.27 ^{bc}	2.65±0.26 a	3.91±0.31 a	67.88±5.74 ^a b
<i>L. curvatus</i> CECT 5786	4.33±0.27 ^{ab}	0.29±0.06 a	0.28±0.05 ^a b	2.30±0.04 a	3.51±0.03 a	62.67±4.06 ^a b
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CECT 4005	4.24±0.14 ^a	0.22±0.10 a	0.33±0.05 ^{bc}	2.32±0.07 a	3.51±0.16 a	66.75±1.69 ^a b
<i>L. helveticus</i> CECT 541	4.20±0.12 ^a	0.23±0.08 a	0.31±0.01 ^b	2.26±0.04 a	3.42±0.03 a	60.90±2.49 ^a
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i> CECT 277	4.35±0.06 ^{ab}	0.25±0.19 a	0.49±0.36 ^{bc}	2.43±0.25 a	3.64±0.41 a	64.82±2.66 ^a b
<i>L. plantarum</i> CECT 5785	4.79±0.18 ^{bc}	0.21±0.01 a	0.51±0.33 ^{bc}	2.49±0.22 a	3.71±0.25 a	63.83±2.95 ^a b
<i>L. reuteri</i> CECT 925	4.95±0.36 ^c	0.19±0.06 a	0.36±0.03 ^{bc}	2.42±0.06 a	3.58±0.16 a	66.18±1.84 ^a b
<i>L. sakei subsp. carnosus</i> CECT 5964	4.21±0.18 ^a	0.28±0.15 a	0.39±0.02 ^{bc}	2.32±0.10 a	3.51±0.05 a	69.71±0.39 ^b
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> CECT 4042	4.10±0.03 ^a	0.19±0.01 a	0.31±0.01 ^b	2.35±0.01 a	3.47±0.04 a	64.82±2.59 ^a b
MA-400 ¹	4.49±0.08 ^{ab} c	0.28±0.09 a	0.25±0.02 ^a	2.35±0.06 a	3.62±0.15 a	67.80±1.11 ^a b
SL ²	**	ns	*	ns	ns	*

¹*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*

²Significance level: ***P* < 0.01; **P* < 0.05; ns not significant. ^{abc}Means within a column with different superscript letters present significant differences

Means within a column with different letters significantly differ.

L.: *Lactobacillus*; Lc.: *Lactococcus*

CECT: Spanish Collection of Type Cultures

Table 3. Means (± SD) of sugars and organic acids in fermented goat milk (g/100g) as a function of the microbial culture (N=16).

Microorganism	Lactose	Glucose	Galactose	Ethanol	Lactic acid	Acetic acid
<i>Lactobacillus casei</i> CECT 475	3.03±0.43 ^{bc}	tr	0.11±0.0 ^a	tr	0.49±0.13 ^a	0.01±0.01 ^a
<i>Lactobacillus curvatus</i> CECT 5786	2.43±0.22 ^{abc}	0.25±0.07 ^{ab}	0.14±0.07 ^{ab}	tr	0.62±0.12 ^{ab}	tr
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CECT 4005	1.90±0.36 ^a	0.23±0.05 ^{ab}	0.52±0.16 ^c	tr	0.73±0.18 ^{ab}	tr
<i>Lactobacillus helveticus</i> CECT 541	2.08±0.46 ^{ab}	0.35±0.20 ^b	0.36±0.15 ^{bc}	tr	0.65±0.07 ^{ab}	0.01±0.01 ^a
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> CECT 277	3.09±0.64 ^c	tr	tr	0.58±0.08 ^a	0.60±0.15 ^{ab}	0.01±0.01 ^a
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 5785	2.51±0.12 ^{abc}	0.21±0.04 ^a	0.27±0.11 ^{ab} c	0.28±0.21 ^a	0.42±0.18 ^a	0.02±0.00 ^a
<i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925	2.40±0.21 ^{abc}	0.21±0.07 ^a	0.18±0.07 ^{ab}	0.56±0.14 ^a	0.44±0.13 ^a	0.01±0.01 ^a
<i>Lactobacillus sakei subsp. carnosus</i> CECT 5964	2.75±0.63 ^{abc}	tr	0.04±0.00 ^a	tr	0.85±0.08 ^b	0.01±0.01 ^a
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> CECT 4042	2.37±0.34 ^{abc}	tr	0.32±0.23 ^{ab}	0.54±0.27 ^a	0.70±0.10 ^{ab}	0.01±0.01 ^a
MA-400 ¹	2.40±0.15 ^{abc}	tr	0.04±0.02 ^a	0.52±0.17 ^a	0.59±0.07 ^{ab}	tr
SL ²	*	**	**	*	*	*

¹*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*

²Significance level: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns not significant. ^{abc}Means within a column with different superscript letters present significant differences

CECT: Spanish Collection of Type Cultures

tr: trace

Table 4. Means (\pm SD) of Saturated, Monounsaturated, Polyunsaturated fatty acids (SFA, MUFA, PUFA), total Conjugated Linoleic Acid (CLA) and health-related indexes: Atherogenicity Index (ATI), Thrombogenicity Index (TI), Desaturase Index (DI) and other ratios among fatty acids of goat milk and fermented goat milk (percentage of total fatty acids over total fatty acids) (n=16) as a function of the starter culture.

Index	MILK	CECT 475 ¹	CECT 5786 ²	CECT 4005 ³	CECT 541 ⁴	CECT 277 ⁵	CECT 5785 ⁶	CECT 925 ⁷	CECT 5964 ⁸	CECT 4042 ⁹	CECT MA-400 ¹⁰	SL ¹
SFA	59.56 \pm 0.77 ^a	60.43 \pm 0.25 ^a	59.90 \pm 0.09 ^a	60.36 \pm 0.02 ^a	60.22 \pm 0.31 ^a	59.82 \pm 0.53 ^a	60.11 \pm 0.01 ^a	60.18 \pm 0.27 ^a	60.55 \pm 0.29 ^a	59.62 \pm 0.50 ^a	60.03 \pm 0.22 ^a	ns
MUFA	31.08 \pm 0.37 ^a	31.74 \pm 0.02 ^a	32.02 \pm 0.09 ^a	31.63 \pm 0.17 ^a	31.95 \pm 0.23 ^a	32.37 \pm 0.33 ^a	32.03 \pm 0.21 ^a	31.76 \pm 0.34 ^a	31.69 \pm 0.21 ^a	32.23 \pm 0.52 ^a	32.19 \pm 0.15 ^a	ns
PUFA	5.14 \pm 0.58 ^a	5.58 \pm 0.09 ^a	5.72 \pm 0.04 ^a	5.59 \pm 0.01 ^a	5.64 \pm 0.04 ^a	5.71 \pm 0.19 ^a	5.59 \pm 0.04 ^a	5.62 \pm 0.08 ^a	5.56 \pm 0.07 ^a	5.61 \pm 0.38 ^a	5.34 \pm 0.22 ^a	ns
PUFAn-6	3.69 \pm 0.06 ^a	3.74 \pm 0.04 ^a	3.87 \pm 0.04 ^a	3.75 \pm 0.01 ^a	3.86 \pm 0.06 ^a	3.92 \pm 0.17 ^a	3.77 \pm 0.01 ^a	3.80 \pm 0.08 ^a	3.75 \pm 0.02 ^a	4.05 \pm 0.22 ^a	3.72 \pm 0.01 ^a	ns
PUFAn-3	0.22 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.03 ^a	0.23 \pm 0.00 ^a	0.22 \pm 0.00 ^a	0.22 \pm 0.00 ^a	0.23 \pm 0.02 ^a	0.23 \pm 0.00 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	0.22 \pm 0.00 ^a	0.23 \pm 0.01 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	ns
CLA	1.12 \pm 0.07 ^a	1.16 \pm 0.01 ^a	1.15 \pm 0.01 ^a	1.19 \pm 0.00 ^a	1.16 \pm 0.01 ^a	1.15 \pm 0.01 ^a	1.17 \pm 0.01 ^a	1.18 \pm 0.01 ^a	1.18 \pm 0.01 ^a	1.16 \pm 0.05 ^a	1.16 \pm 0.01 ^a	ns
PUFA/SFA	0.09 \pm 0.01 ^a	0.09 \pm 0.00 ^a	0.10 \pm 0.00 ^a	0.09 \pm 0.00 ^a	0.09 \pm 0.00 ^a	0.10 \pm 0.00 ^a	0.09 \pm 0.21 ^a	0.09 \pm 0.00 ^a	0.09 \pm 0.00 ^a	0.09 \pm 0.01 ^a	0.09 \pm 0.00 ^a	ns
PUFA(n-6/n-3)	16.81 \pm 0.59 ^a	15.72 \pm 1.70 ^a	17.06 \pm 0.10 ^a	17.20 \pm 0.13 ^a	17.30 \pm 0.36 ^a	17.31 \pm 0.58 ^a	16.72 \pm 0.33 ^a	17.10 \pm 0.38 ^a	17.39 \pm 0.09 ^a	17.73 \pm 0.53 ^a	16.62 \pm 0.89 ^a	ns
ATI	1.60 \pm 0.02 ^a	1.62 \pm 0.01 ^a	1.58 \pm 0.00 ^a	1.63 \pm 0.01 ^a	1.61 \pm 0.02 ^a	1.57 \pm 0.04 ^a	1.60 \pm 0.01 ^a	1.62 \pm 0.02 ^a	1.62 \pm 0.00 ^a	1.56 \pm 0.05 ^a	1.60 \pm 0.01 ^a	ns
TI	2.36 \pm 0.03 ^a	2.38 \pm 0.02 ^a	2.35 \pm 0.02 ^a	2.39 \pm 0.00 ^a	2.36 \pm 0.01 ^a	2.33 \pm 0.06 ^a	2.34 \pm 0.00 ^a	2.37 \pm 0.04 ^a	2.39 \pm 0.00 ^a	2.30 \pm 0.06 ^a	2.36 \pm 0.02 ^a	ns
DI	0.02 \pm 0.00 ^a	ns										
Palmitoleic/palmiti ^c	0.04 \pm 0.00 ^a	0.03 \pm 0.00 ^a	0.04 \pm 0.00 ^a	0.03 \pm 0.00 ^a	0.04 \pm 0.00 ^a	0.04 \pm 0.00 ^a	ns					
Oleic/estearic	2.19 \pm 0.02 ^a	2.14 \pm 0.02 ^a	2.16 \pm 0.02 ^a	2.13 \pm 0.00 ^a	2.19 \pm 0.00 ^a	2.21 \pm 0.03 ^a	2.21 \pm 0.01 ^a	2.17 \pm 0.03 ^a	2.14 \pm 0.02 ^a	2.25 \pm 0.06 ^a	2.19 \pm 0.03 ^a	ns

¹*Lactobacillus casei* CECT 475; ²*Lactobacillus curvatus* CECT 5786; ³*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005; ⁴*Lactobacillus helveticus* CECT 541; ⁵*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CECT 277; ⁶*Lactobacillus plantarum* CECT 5785; ⁷*Lactobacillus reuteri* CECT 925; ⁸*Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus* CECT 5964; ⁹*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CECT 4042; ¹⁰*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*

¹¹Significance level: ns not significant ($p > 0.05$)

CECT: Spanish Collection of Type Cultures

ATI = (C12:0 + 4 x C14:0 + C16:0)/[Σ MUFA + Σ PUFA (n-6) and (n-3)]; TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[0.5 x Σ MUFA + 0.5 x Σ PUFA (n-6) + 3 x Σ PUFA (n-3) + (n-3)/(n-6)]; DI = C14:1/C14:0

Table 5. Volatile compounds isolated in fermented goat milk by different cultures: Retention time, literature descriptors and average concentration (nL/L) (n=8).

Volatile Organic Compound	Ret. time	Aromatic descriptor*	<i>L.</i>									
			<i>L. casei</i> CECT 475	<i>L. curvatus</i> CECT 5786	<i>delbrueckii</i> <i>subsp.</i> <i>bulgaricus</i> CECT 4005	<i>L. helveticus</i> CECT 541	<i>L. paracasei</i> <i>subsp.</i> <i>paracasei</i> CECT 277	<i>L. plantarum</i> CECT 5785	<i>L. reuteri</i> CECT 925	<i>L. sakei</i> <i>subsp.</i> <i>carnosus</i> CECT 5964	<i>L. lactis</i> <i>subsp.</i> <i>Lactis</i> CECT 4042	MA-400 ¹
Ethanol	3.012	Mild, ether	24.6±3.4 ^e	56.7±7.2 ^d	3.81±0.95 ^a	1.43±0.32 ^a	114±17 ^a	96.8±27.0 ^e	31.1±2.5 ^c	7.28±1.2 ^b	40.2±0.6 ^{ad}	133±14 ^e
2-Propanone	3.446	Sweet, fruity	40.0±9.0 ^e	36.0±4.8 ^a	41.4±4.1 ^a	39.3±4.8 ^a	46.5±7.7 ^a	35.8±6.7 ^a	61.4±5.0 ^b	59.1±3.4 ^b	68.8±0.3 ^b	72.1±1.3 ^b
DMS	3.539	Sulfurous	7.52±0.98 ^b	nd	6.12±1.18 ^b	nd	2.42±0.02 ^b	3.19±0.71 ^a	2.91±0.49 ^a	4.50±0.56 ^{ab}	nd	7.48±0.09 ^b
Diacetyl	5.584	Buttery, creamy, vanilla	37.7±6.5 ^e	13.6±10.3 ^a	25.8±11.3 ^b	80.6±2.58 ^e	72.6±25.9 ^e	2.91±0.71 ^a	52.1±10.9 ^d	67.8±10.4 ^c	57.2±0.50 ^{de}	17.2±1.6 ^a
2-Butanone	5.772	Varnish-like, sweet, fruity	4.71±0.61 ^b	1.98±0.44 ^a	3.58±0.20 ^{ab}	2.72±0.24 ^b	2.93±0.51 ^a	2.12±0.11 ^a	5.06±0.58 ^b	2.81±0.45 ^a	5.41±0.78 ^b	2.58±0.28 ^a
Acetic acid	7.388	Vinegar, pungent, acidic	1.49±18 ^a	46.9±6.4 ^b	27.3±3.7 ^a	52.6±6.0 ^b	1.41±21 ^d	113±8 ^d	183±13 ^e	658±46 ^f	69.4±1.7 ^d	117±23 ^d
2-Pentanone	8.976	Fruity, acetone	1.74±0.17 ^a	9.19±0.63 ^c	3.34±0.25 ^a	4.63±0.38 ^b	5.63±0.51 ^b	3.95±0.26 ^b	2.66±0.35 ^a	5.82±0.45 ^b	6.70±0.81 ^b	6.36±0.34 ^b
2-Butanone, 3,3-dimethyl-	9.322	Sweet, butterscotch	nd	68.1±7.3 ^a	76.6±11.0 ^a	1.65±18 ^e	1.48±0.13 ^b	0.32±0.3 ^a	10.68±1.33 ^e	4.22±0.4 ^b	4.36±0.37 ^b	3.76±0.01 ^b
Acetoin	10.959	Buttery	108±16 ^b	nd	158±24 ^c	184±24 ^c	90.3±14 ^b	608±61 ^e	339±13 ^d	684±620 ^e	113±8 ^b	138±34 ^c
Iso amyl alcohol	11.498	Fruit, banana	1.25±0.03 ^b	nd	nd	nd	nd	1.78±0.2 ^b	0.55±0.1 ^b	1.20±0.1 ^b	nd	nd
Octane	13.219	Fruit, banana	6.27±0.46 ^a	44.1±3.3 ^c	60.3±7.6 ^c	179±16 ^e	14.3±2.0 ^b	76.3±9.0 ^{ad}	59.1±1.3 ^c	175±17.1 ^e	46.8±5.7 ^c	99.9±9.5 ^d
Isobutyric acid	13.963	Sweet, mild, rotten apple	22.3±3.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pentan-3-ol	15.005	Sweet, mild, rotten apple	2.22±0.40 ^b	0.50±0.07 ^a	13.9±1.2 ^d	30.8±4.6 ^e	0.46±0.03 ^a	5.68±0.12 ^c	4.08±0.8 ^c	0.96±0.09 ^a	4.15±0.30 ^e	2.21±0.28 ^b
Butanoic acid	15.277	Sweaty,cheesy	26.8±4.3 ^f	0.59±0.2 ^a	1.15±0.15 ^b	1.32±0.21 ^b	4.51±0.49 ^d	3.21±0.41 ^c	5.09±0.69 ^d	7.00±0.97 ^e	2.06±0.58 ^b	9.07±1.02 ^e
2-butanol	15.385	Alcoholic	26.3±2.6 ^f	0.47±0.13 ^a	13.3±1.3 ^c	29.8±4.4 ^e	0.74±0.04 ^a	6.98±0.53 ^d	2.79±0.71 ^c	12.8±0.5 ^f	3.60±0.22 ^e	1.18±0.13 ^b
Isovaleric acid	17.791	Rotten fruit, mild, sweaty, rancid, fecal, putrid, flowery	368±4.21 ^d	0.14±0.10 ^a	0.55±0.14 ^a	20.9±2.3 ^c	0.77±0.26 ^a	22.9±4.7 ^c	12.7±0.8 ^b	16.6±1.23 ^b	0.13±0.30 ^b	nd
Propionic acid	18.250	Vinegar, pungent, sour milk	11.3±1.31 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-heptanone	18.311	Sweet, blue cheese, spicy	8.28±1.68 ^a	7.43±0.86 ^c	15.6±1.6 ^b	27.4±3.5 ^e	14.5±2.9 ^b	22.9±1.4 ^c	13.9±1.3 ^b	26.1±2.5 ^c	20.2±1.5 ^c	25.6±1.7 ^c
Heptanal	18.700	Green, sweet	nd	0.75±0.02 ^{ab}	0.13±0.03 ^a	0.30±0.01 ^a	0.04±0.1 ^a	1.06±0.21 ^{ab}	0.83±0.05 ^{ab}	6.81±0.44 ^c	nd	2.08±0.69 ^b
Alpha-PINENE	18.942	pine	nd	0.42±0.12 ^a	1.53±0.28 ^b	2.24±0.27 ^c	0.92±0.27 ^{ab}	1.47±0.13 ^b	0.42±0.04 ^a	2.37±0.30 ^c	1.58±0.18 ^b	1.58±0.34 ^b
Heptane	22.166	pine	nd	0.39±0.4 ^a	0.38±0.09 ^a	nd	0.63±0.08 ^b	1.16±0.14 ^b	0.50±0.3 ^a	nd	0.62±0.08 ^a	2.04±0.2 ^c
Hexanoic acid	24.016	Goat like, fatty, sweat	81.9±13.1 ^e	1.88±0.13 ^a	17.4±1.9 ^b	65.5±4.04 ^d	14.8±1.35 ^b	26.1±1.9 ^c	21.3±2.1 ^c	19.1±1.7 ^{bc}	18.1±2.17 ^{bc}	15.9±0.14 ^b
Undecane, 4,7-dimethyl	26.087	Sweet, floral, citrus, grass-like	25.7±2.6 ^{bc}	6.68±0.66 ^c	22.8±1.4 ^b	30.7±3.2 ^c	10.3±1.4 ^a	8.55±0.83 ^a	23.4±2.6 ^b	36.8±0.4 ^c	18.3±2.6 ^c	26.1±2.3 ^{bc}
Nonanal	27.903	Sweet, floral, citrus, grass-like	0.40±0.02 ^a	1.44±0.16 ^b	1.62±0.13 ^b	1.05±0.11 ^b	1.14±0.07 ^b	2.41±0.16 ^c	2.99±0.34 ^c	4.38±0.60 ^d	1.11±0.37 ^b	2.84±0.27 ^c
Octanoic acid	31.974	Wax, soap, goat, musty, rancid, fruity	10.6±0.2 ^e	0.70±0.05 ^a	1.33±0.09 ^b	4.55±0.37 ^d	2.98±0.33 ^c	5.73±0.35 ^d	6.22±0.6 ^d	7.06±0.5 ^{de}	1.88±0.38 ^b	2.78±0.09 ^f
Tridecane	34.093	Wax, soap, goat, musty, rancid, fruity	1.31±0.13 ^a	2.40±0.07 ^b	8.72±1.18 ^e	4.20±0.78 ^c	4.25±0.55 ^c	7.83±0.44 ^{de}	6.48±0.59 ^d	4.29±0.67 ^c	2.50±0.21 ^b	2.39±0.47 ^b
Total alcohols			54.4 ^e	57.6 ^c	31.1 ^b	62.0 ^c	116 ^d	111 ^d	38.5 ^b	21.1 ^a	49 ^b	137 ^d
Total aldehydes			0.40 ^b	2.19 ^b	1.75 ^b	1.35 ^b	1.18 ^b	3.47 ^c	3.81 ^c	11.2 ^b	1.11 ^b	4.93 ^c
Total hydrocarbons			32.0 ^a	51.1 ^b	83.6 ^c	210 ^e	25.2 ^a	86.1 ^c	83.0 ^c	212 ^e	65.8 ^d	128 ^d
Total acids			671 ^e	50.3 ^a	47.7 ^a	145 ^c	164 ^c	172 ^c	228 ^d	708 ^e	91.6 ^b	146 ^c
Total ketones			208 ^b	129 ^a	324 ^c	505 ^d	234 ^b	756 ^e	484 ^d	850 ^e	275 ^b	266 ^b
Others			8.82 ^b	2.82 ^a	16.4 ^d	6.44 ^b	7.59 ^b	12.5 ^d	9.81 ^{bc}	11.2 ^c	4.08 ^a	11.4 ^c

¹Lactococcus lactis subsp. lactis, Lactococcus lactis subsp. cremoris, Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacepialactis, Streptococcus thermophilus

L.: Lactobacillus; *L.c.*: Lactococcus; nd not detected; DMS dimethyl sulphide. Means within a row with different superscript letters represent significant differences ($p<0.05$)

*Cheng, (2010) and Sfakianakis & Tzia (2017).

Table 6. Main sensory descriptors of fermented goats milk odor as a function of the microbial culture (first descriptor being the strongest).

Culture	Descriptors
<i>Lactobacillus casei</i> CECT 475	Vinegar, lactic acid, blue cheese, cheesy
<i>Lactobacillus curvatus</i> CECT 5786	Putrid, cream, sweet, animal-like, lactic acid
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CECT 4005	Lactic acid, sour milk, cheese
<i>Lactobacillus helveticus</i> CECT 541	Lactic acid, sour milk, cheese, vinegar
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CECT 277	Sulfurous, lactic acid, unclean, vinegar, animal-like
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 5785	Sulfurous, sweet, animal-like, grass
<i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925	Sweaty, rancid, cream, unclean
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i> CECT 5964	Sweet, sour milk, sweaty, lactic acid
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 4042	Sweet, cooked, broth, lactic acid
MA-400 ¹	Buttery, sweet, lactic acid, sour milk

¹*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*

CECT: Spanish Collection of Type Cultures



Table 7. Summary of technological and quality characteristics of fermented goat milk by different cultures.

	<i>L. casei</i> CECT 475	<i>L. curvatus</i> CECT 5786	<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> CECT 4005	<i>L. helveticus</i> CECT 541	<i>L. paracasei</i> <i>subsp. paracasei</i> CECT 277	<i>L. plantarum</i> CECT 5785	<i>L. reuteri</i> CECT 925	<i>L. sakei</i> <i>subsp. carnosus</i> CECT 5964	<i>Lc. lactis</i> <i>subsp. Lactis</i> CECT 4042	MA- 400 ¹
Acidification rate	-	-	+	+	-	--	--	+	+	++
Gel stability	-	--	-	+	+	--	+	-	+	+
Microbial counts	+	+	-	+	++	+	+	+	++	++
Lactic acid content	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Sugar metabolism	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Volatile and odor descriptors	+	--	+	+	-	--	-	-	+	+
Σ positive traits	3	2	3	5	5	1	2	4	6	8

¹*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*

L.: *Lactobacillus*; *Lc.*: *Lactococcus*. Sugar metabolism + indicates non accumulation of monosaccharides, Volatile and odor descriptors + indicates similarity to MA400

4.3. Publicación 3

Publicación 3 (Artículo original)

**Quality and Functional Parameters of Fermented Milk
Obtained from Goat Milk Fed with Broccoli and Artichoke
Plant By-Products**

*Raquel Muelas, Gema Romero, José Ramón Díaz, Paula Monllor, Juana
Fernández-López, Manuel Viuda-Martos, Marina Cano-Lamadrid y Esther Sendra*

Foods, 11, 2601

doi: 10.3390/foods11172601



Article

Quality and Functional Parameters of Fermented Milk Obtained from Goat Milk Fed with Broccoli and Artichoke Plant By-Products

Raquel Muelas, Gema Romero , José Ramón Díaz, Paula Monllor , Juana Fernández-López , Manuel Viuda-Martos , Marina Cano-Lamadrid  and Esther Sendra * 

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, Carretera de Beniel, 03312 Alicante, Spain

* Correspondence: esther.sendra@umh.es

Abstract: Large amount of vegetal by-products are generated during production and processing steps. Introducing silage from vegetable by-products into dairy goat feed would be of great interest from the point of view of reducing costs and supporting the circular economy. The aim of this research was to study the effect of 40% inclusion of silage broccoli by-products and artichoke plant by-products in the diet of Murciano-Granadina goats throughout the lactation to establish milk suitability for fermented milks production. The novelty of this study is the use of milk from goats fed for a long term with a high inclusion of silages from artichoke plant and broccoli by-products, being the first one on broccoli inclusion. Two starter cultures thermophilic (YO-MIXTM300), and, mesophilic (MA400) were used and fermented milks were analyzed at two storage times after fermentation. Fermentation enhances antioxidant properties of fermented milks from all diets ($p < 0.05$), especially when mesophilic starter cultures are used. The main findings are that long term inclusion of 40% silage from broccoli and artichoke plant by-products in balanced diets of dairy goats yields milk suitable for fermentation by yogurt and cheese cultures, the inclusion of broccoli silage enhances antioxidant properties ($p < 0.05$), and, the inclusion of plant artichoke enhances fatty acids health indexes ($p < 0.05$).

Keywords: thermophilic; yogurt; mesophilic; cheese; culture; revalorization; circular economy; health index; volatiles



Citation: Muelas, R.; Romero, G.; Díaz, J.R.; Monllor, P.; Fernández-López, J.; Viuda-Martos, M.; Cano-Lamadrid, M.; Sendra, E. Quality and Functional Parameters of Fermented Milk Obtained from Goat Milk Fed with Broccoli and Artichoke Plant By-Products. *Foods* **2022**, *11*, 2601. <https://doi.org/10.3390/foods11172601>

Academic Editor: Agostino Sevi

Received: 18 July 2022

Accepted: 21 August 2022

Published: 27 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Broccoli (*Brassica oleracea italica*) and artichoke (*Cynara scolymus*) are highly relevant horticultural crops in Southern Spain (517,767 t and 199,944 t, production respectively in 2019), representing around 80% of the national production [1]. Both vegetables are either destined for the processing industries or for fresh consumption. The food industry is interested in the inflorescences of broccoli and in the flower bud of artichoke, being approximately 25% of its total biomass [2,3], so generating large volumes of by-products and, consequently, having a significant environmental impact. However, in Southern Spain, there is a long tradition of using by-products from broccoli and artichoke to feed sheep and goats, which, to some extent, contributes to reduce their environmental impact [3]. One drawback of using these fresh by-products as animal feed is their short shelf life due to their high moisture content. It is necessary to develop strategies to preserve these sources of nutrients and allow their availability for longer periods. According to previous studies, these by-products have a good suitability for silaging that would allow their preservation over time without affecting their nutritional composition [4–6]. A key factor for their suitability as feed is to make sure that a long term inclusion of such silages in the diet (throughout a full lactation) does not have negative effects on the health and performance of the animal, nor on the composition of the obtained milk and technological characteristics of processed dairy products. From this point of view, research work has recently been carried

out to establish the optimal inclusion of broccoli and artichoke plant by-product silage on isoproteic and isoenergetic diets, formulated for milking Murciano-Granadina goats. Some information on their effect on milk production, composition, functional properties and technological characteristics in milk has been already reported [5–9]. The use of silages from vegetable by-products in the diet of dairy goats would be of great interest for reducing feeding costs and supporting the circular economy. Goat milk production in Spain in 2019 was 475,630 t, representing 45% of the total produced by the European Mediterranean countries [1]. Ninety percent of the milk is transformed by the dairy industry; 64% into cheese and 20% for the production of dairy products such as fermented milks. The consumption of fermented milks in Spain in 2020 was around 600 million kg (15.03 L per capita in 2020) [10].

Goat milk is characterized by having a higher nutritional value and health properties than cow's milk as a result of its greater digestibility, mineral bioavailability, protein and fatty acids profile which have been associated with immunological and antibacterial properties [11,12]. However, due to its characteristic goaty flavor, mainly provided by short-chain fatty acids: caproic acid (C6:0), caprylic acid (C8:0) and capric acid (C10:0), some consumers find goat milk unacceptable [11]. This goaty flavor can be mitigated with the fermentation process due to the development of flavors provided by a complex mixture of aromatic compounds [13] formed through the metabolic pathways of lactic acid bacteria (LAB). Lactose fermentation, fat lipolysis and proteolysis are responsible for the release of organic acids, free fatty acids (FFA) that can be metabolized to secondary alcohols and fatty acid lactones, and free amino acids and precursors of other aromatic compounds [14–18]. Such flavor complexity is able to mask to some extent the goaty flavor [19] and so to improve the acceptability of goat milk products.

Commonly, in-doors raised dairy goats are fed conventional feed based on concentrates, and the obtained milk is used for yogurt and fermented milks making. There is a clear tendency to enhance the functional properties of fermented dairy foods, one example is the enrichment of fermented milks by directly adding plant extracts to improve their functional properties [20–23].

Commercial lyophilized yogurt cultures are mixtures of thermophilic starter cultures, mainly *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. These microorganisms cooperate with each other: exchanging metabolites, improving the growth rate, the size of each microbial population and the acidification rate [24–27]. Likewise, for the production of soft, semi-cured and cured cheeses, as well as butter or buttermilk mainly mesophilic cultures are used. Some common cultures are mixtures made of *Lactococcus* (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* and *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*), mesophilic microorganisms, characterized by good acidifying activities, formation of exopolysaccharides, proteolytic capacity and aroma production due to the formation of diacetyl flavor compounds by the citrate metabolism of *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, and also may include thermophilic bacteria (*Streptococcus thermophilus*) to achieve even faster lactic acid production during cheese making [28].

The present work was run in parallel to that by other authors [7,8,29] which were focused on animal health and welfare, milk yield, quality and composition. The present study focuses on the obtained dairy products: fermented milks. The aim of the present research is to study the effect of 40% inclusion of broccoli and artichoke by-products in the diet of Murciano-Granadina goats throughout the lactation (preexperimental, early lactation, middle lactation and late lactation) to establish milk suitability for fermented milks production. Two starter cultures (YO-MIX™ 300 and MA400) were used and fermented milks were analyzed at two storage times after fermentation. Viability of microorganisms, pH, syneresis, chemical composition, antioxidant activity, nutritional/health fatty acid indexes and volatile profile in fermented milks were determined. It is important to highlight that previous research about quality and technological properties of fermented milk from short term inclusion and low percentage of inclusion in the diet of artichoke by-products

(up to 25%) was published by Muelas et al. (2017) [6]. The present is the first study using milk from goats fed for a long term (5 months) with a high (40%) inclusion of silages from artichoke plant and fresh broccoli by-products, being the first one on broccoli inclusion.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Facilities and Dietary Treatments

The present study has been carried out in the teaching and research farm with Murciano-Granadina goats located at the Orihuela Higher Polytechnic School at the Miguel Hernández University of Elche. Goat selection criteria (average body weight: 44.6 ± 7.81 kg; average milk yield: 2.43 ± 0.21 kg/day; average somatic cell count: 5.14 ± 0.55 Log cells/mL), division of the animals and housing were those established as previously published [8]. A total of 72 multiparous goats were selected, classified into three homogeneous groups and housed in three independent in-door yards, with access to outdoor patios (size calculated to provide at least $2.30 \text{ m}^2/\text{animal}$). The dimensions of the in-doors yards were calculated based on free access to the feeders ($35 \text{ cm}/\text{goat}$) and at least $1.50 \text{ m}^2/\text{goats}$ for the free movement of the animals. This study was approved by the Ethical Committee of Experimentation of the Miguel Hernández University (code UMH.DTA.GRM.01.15). At the beginning of the experiment, all goat groups were fed a conventional diet (group 1: CD1; group 2: CD2 and group 3: CD3) based on $2.5 \text{ kg}/\text{animal}/\text{day}$ of a single ration of alfalfa hay and a mixture of grains and pellets and straw ad libitum. This first period lasted 4 weeks and was considered as the pre-experimental period (PE). From that period on, the inclusion of differentiated diets began. The three groups characterized by the administered feeding were: group 1 with control diet (CD), which represents the conventional diet; group 2 (BD) with the inclusion of 40% broccoli by-product silage in the diet, and, group 3 (APD) with the inclusion of 40% artichoke plant by-product silage in the diet. In all cases, the diets were formulated in an iso-energetic and iso-proteic form with an average of 38.77, 163.33 and $370.33 \text{ g}/\text{Kg dm}$ (Dry Matter) for ether extract, crude protein and neutral detergent fibre respectively. The daily intake, formulation and nutritional parameters analyzed for each of the diets are reflected in the research article previously published [8].

2.2. Milking Sampling

Each group (CD; BD; APD) of goats ($n = 24$) were milked separately once a day in a Casse-type milking parlor with a low-line milking machine ($2 \times 12 \times 12$, Gea-Farm Technologies®, Bönen, Germany) and the milk was stored independently in three refrigeration tanks (Gea Farm Technologies Iberica SL, Germany) at temperature between $4\text{--}6 \text{ }^\circ\text{C}$. At each sampling time, 4 L of each tank were collected (bottled in 1 Liter Pyrex® bottles) on two consecutive days: ($3 \text{ tanks} \times 4 \text{ L}$ (2 L for each tested culture) $\times 2 \text{ days} = 24 \text{ L}$). Milk samplings took place at week 4th (PE: pre-experimental), 12th (EL: early lactation), 17th (ML: Middle Lactation) and 22nd (LL: Late Lactation).

2.3. Starter Cultures

Two commercial mixed starter cultures (freeze-dried power) were used: the thermophilic yogurt starter culture YO-MIX™ 300 (Danisco, Spain; *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) and the mesophilic cheese/butter starter culture MA400 (Danisco, Spain; *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis biovar diacetylactis*, and, *Streptococcus thermophilus*). Lyophilized cultures were suspended in sterile peptone solution and after allowing some minutes for rehydration the suspended cultures were inoculated to tempered milk according to manufacturer's indications dosage.

2.4. Fermented Milks (FMs) Manufacturing

Elaborations were performed at lactation weeks 4th (PE), week 12th (EL), week 17th (ML) and week 22th (LL). Milk (in 1 L Pyrex® bottles) was pasteurized at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min

and cooled in an ice-water bath until it reached a temperature of approximately 43 °C for the inoculation of thermophilic yogurt cultures and 30 °C for mesophilic cheese cultures. Milk was aseptically distributed in 100 mL sterile polypropylene bottles, inoculated with the starter culture and incubated under the optimal conditions for each of the cultures specified by the technical data sheet (43 °C for YO-MIX™ and 30 °C for MA400). The pH was determined just before the inoculation of the starter culture and monitored until reaching an approximate pH of 4.8, and then, FMs were stored at 4 °C to subsequently carry out the corresponding analysis. Fermented milks were evaluated at 2 (T2) and 30 (T30) days of refrigerated storage to determine the number of viable microorganisms, pH, composition, syneresis, polyphenol content, and antioxidant activity. Samples of FMs were frozen at −20 °C to determine sugars, lactic acid, volatile compounds and fatty acids profile. The total number of fermented milk batches was 48 (4 lactation period × 2 repetitions × 3 goat group × 2 cultures = 48 batches).

2.5. Raw Milk and Fermented Milk Analysis

2.5.1. Determination of Culture Viability and pH

For microbiological counts of fermented milks serial dilutions were prepared in sterile peptone water and de Man Rososa Sharpe (MRS) and M17 agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were used for enumeration of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus* spp./*Lactococcus* spp. respectively. Milks fermented with YO-MIX™300 were analyzed for lactobacilli in MRS (incubated under microaerophilic conditions at 37 °C for 48 h) and streptococci in M17 (aerobic conditions at 37 °C for 24 h). Milk cultured with MA400 was analyzed for streptococci/lactococci counts on M17 under the same conditions.

pH was determined at 25 °C using a pH Basic 20 instrument (Crison, Barcelona, Spain). Three replicates were run for pH and microbial counts.

2.5.2. Milk, Fermented Milk and Whey Compositional Analysis

The chemical composition (fat, protein, lactose and total solids) of milk was determined by means of a near-infrared spectrophotometer (FOSS, Milko-Scan FT120; Foss Electric, Hillerød, Denmark) using the base calibration of the equipment (Foss Electric validated according to ISO 21543:2006 (ISO, 2006)). The equipment software contains different modules with calibrations for precise determinations of milk components (Improved Milk Calibration, Foss Electric, 1999), fermented milks (Application Note N° 94, P/N 492264, Foss Electric, 1999) and whey (pH Independent Whey Calibration, Application Note No. 91, P/N 491928, Foss Electric, 1999). The determination in raw milk was made directly on the sample. Fermented milk samples, in order to reduce their viscosity were diluted 1/3 with zero-liquid (Cero S-6060, Hillerød, Denmark) before analysis. Whey samples were obtained by centrifuging the curd using the methodology previously described [6,30] that allowed syneresis determination and whey separation for its compositional analysis. Syneresis (% drained whey) was expressed as whey/milk ratio mass [14]. Analysis were performed in duplicate in samples warmed at 40 °C.

2.5.3. Sugar Profile and Lactic Acid

The individual analysis of sugars and lactic acid in raw milk took 5 mL of milk and the methodology previously described was used [31]. However, in fermented milks, the methodology described by Pablo Mortera et al., 2018 [32] was used with some modifications, 5 g of sample were weighed and 10 mL of ultrapure water were added. In both cases, the sample was homogenized for approximately 1 min and centrifuged at 11,000 rpm for 20 min at a temperature of 4 °C. In both cases, prior to chromatographic analysis, the supernatant was filtered through a 0.45 micron nylon filter (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and injected into a high performance liquid chromatograph Hewlett-Packard HP-1100, Woldbronn, Germany). Chromatographic analysis was performed in isocratic gradient with a flow of 0.5 mL/min and a mobile phase consisting of ultrapure water acidified with 0.1% phosphoric acid. The column used was a Supelcogel C-610H, 30 cm × 7.8 mm (Supelco

Park, Bellefonte, PA, USA). Sugars were detected with a refractive index detector and lactic acid with a diode array (DAD) at a wavelength of 210 nm. The quantification was carried out using external calibration curves prepared with pure standards of sugars and lactic acid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Analysis were performed in duplicate.

2.5.4. Total Phenol Content (TPC), and Antioxidant Activity

The determination of the TPC content was carried out using the Folin-Ciocalteu method previously described [33]. For quantification, 5 concentrations of gallic acid (50, 100, 150, 200 and 250 mM) were prepared and the results were expressed in mg gallic acid equivalents (mg GAE/L). For the determination of the antioxidant capacity, the ABTS and DPPH assays were performed ([34,35], respectively). Antioxidant activity was expressed as mM Trolox/mL as calculated from a Trolox calibration curve (0.15, 0.30, 0.5, 0.75 and 1 mM).

2.5.5. Health Indexes from Fatty Acids Profile

Regarding the analysis of the fatty acid profile for its subsequent calculation of the healthy indexes, the extraction method described by Romeu-Nadal et al. (2004) with some modifications was followed [36]. Fatty acid methylation was performed according to Nudda et al. (2005) [37], also with some modifications. Fatty acid methyl esters (FAMES) were separated using a chromatograph with FID detector (GC-17A Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a capillary column (CP Sil 88 100 m × 0.25 mm, 0.20 µm particle size, Agilent, Santa Clara, CA, USA). The injector and detector temperatures were 240 °C and 250 °C, respectively. The programmed temperature was 45 °C for two minutes, increasing to 165 °C in a range of 8 °C/min, maintained at 165 °C for 35 min, increasing to 210 °C in a range of 5.5 °C/min. The fatty acids were individually identified by comparison with the relative retention times of a standard mix of external standards (37FAME mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA). The nutritional/healthy indexes from fatty acids profile were calculated following the formulas compiled previously [16,38]. The nutritional/healthy indexes were: PUFA/SFA (Polyunsaturated Fatty Acids/Saturated fatty acids, Equation (1)), MUFA/SFA (Monounsaturated Fatty Acid/Saturated fatty acids, Equation (2)), n6/n3 (omega 6/omega (3), Equation (3)), LA/ALA (Linoleic Acid/α-Linolenic acid, Equation (4)), Oleic acid/Stearic acid (Equation (5)), ΣCLA/Vaccenic acid (Equation (6)), IA (Atherogenicity index, Equation (7)), IT (thrombogenicity index, Equation (8)), HFA (hypercholesterolemic index, Equation (9)), HH (Hypocholesterolemic/Hypercholesterolemic ratio, Equation (10)), HPI (Health promoting index, Equation (11)), DI14 (Desaturation index of C14:0, Equation (12)), DI16 (Desaturation index of C16:0, Equation (13)), and DI18 (Desaturation index of C18:0, Equation (14)).

$$\Sigma\text{PUFA}/\Sigma\text{SFA} \quad (1)$$

$$\Sigma\text{MUFA}/\Sigma\text{SFA} \quad (2)$$

$$(\text{C18:2n-6} + \text{C18:3n-6} + \text{C20:2n-6} + \text{C20:3n-6} + \text{C20:4n-6})/(\text{C18:3n-3}) \quad (3)$$

$$\text{C18:2n6}/\text{C18:3n3} \quad (4)$$

$$\text{C18:1}/\text{C18:0} \quad (5)$$

$$\text{CLAc9t11} + \text{CLAt9c11} + \text{CLAt12,14}/\text{C18:1t11} \quad (6)$$

$$[\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}]/\Sigma\text{UFA}; \text{UFA: Undaturated Fatty acids (MUFA + PUFA)} \quad (7)$$

$$(\text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0})/[(0.5 \times \Sigma\text{MUFA}) + (0.5 \times \Sigma\text{n-6 PUFA}) + (3 \times \Sigma\text{n-3 PUFA}) + (\text{n-3}/\text{n-6})] \quad (8)$$

$$\Sigma\text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0} \quad (9)$$

$$(\text{cis-C18:1} + \Sigma\text{PUFA})/(\text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0}) \quad (10)$$

$$\Sigma \text{UFA}/[\text{C12 : 0} + (4 \times \text{C14 : 0}) + \text{C16 : 0}] \quad (11)$$

$$\text{C14 : 1cis}/\text{C14 : 0} \quad (12)$$

$$\Sigma \text{C16 : 1t4; C16 : 1t5; C16 : 1t9; C16 : 1t10; C16 : 1t11; C16 : 1c7; C16 : 1c9; C16 : 1c10; C16 : 1c11}/\text{C16 : 0} \quad (13)$$

$$\Sigma \text{C18 : 1t4; C18 : 1t5; C18 : 1t6,8; C18 : 1t9; C18 : 1t10; C18 : 1t11; C18 : 1t12; C18 : 1t13,14; C18 : 1t16; C18 : 1c9; C18 : 1c11; C18 : 1c12; C18 : 1c13; C18 : 1c16}/\text{C18 : 0} \quad (14)$$

2.5.6. Volatile Compounds

Fermented milks from the pre-experimental period (all groups in conventional diet) and from late lactation (different diets) were analyzed for volatile profile. To determine the volatile profile and its quantification, headspace solid phase microextraction (HSPME) of volatiles was performed [39] using a SPME 50/30 mm DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane) fiber (Supelco). The fiber was mounted in an automatic injection port AOC 6000 Plus Auto Sampler (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA). Five grams of fermented milk and one gram of salt were introduced in each vial. The sample was tempered at 40 °C during 5 min. Afterwards the sample was exposed to the fiber for 50 min under stirring. After equilibration the fiber was desorbed for 3 min at the injection port of a chromatograph Shimadzu GC2030 coupled with a Shimadzu TQ8040 NX mass spectrometer detector (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA) with a SLB-5 MS column (Teknokroma, Barcelona, Spain) (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness). The parameters of the detector were: (i) mass range 35–400 m/z, (ii) scan speed 5000 amu/s, (iii) event time of 0.200 s, and (iv) electronic impact of 70 eV. Helium was used as a carrier gas, with a split ratio of 1:10, a purge flow of 6 mL min⁻¹, and a total column flow of 0.8 mL min⁻¹. The temperature of the detector was 300 °C, and the temperature of the injector was 220 °C. Chromatographic conditions were initial temperature 40 °C for 2 min, temperature gradient of 10 °C/min up to 200 °C and maintaining 200 °C for 10 min. minutes. Peak identification was performed by comparing the retention times of the standard compounds and the Wiley library spectra.

2.6. Statistical Analysis

A general linear model (Proc. GLM, SAS 9.4, 2012) was used to study separately each of the studied cultures (YO-MIXTM 300 and MA400) and each of the four lactation stages (PE: Pre-experimental; EL: early lactation; ML: Mid-lactation; LL: Late lactation), the effect of the 3 diets tested (CD: control diet; BD: broccoli by-product; APD: artichoke plant by-product) and the refrigerated storage time of fermented milk (2 and 30 days) on the variables analyzed (microbial count, pH, fat, protein, total solids, lactose, glucose, galactose, fatty acids, lactic acid, syneresis, and, whey fat, protein, lactose and total solids). However, for the variables total polyphenol content and antioxidant capacity (ABTS and DPPH), only EL and LL productions were analyzed. For volatile profile only PE and LL were analyzed. The proc model GLM used was the following (Equation (15)):

$$Y = \mu + \text{DIET}_i + \text{TIME}_j + \text{DIET}_i \times \text{TIME}_j + e_{ijk} \quad (15)$$

Y = dependent variable; μ : mean; DIET_i : effect of diet ($n = 3$: control, broccoli by-product, and artichoke plant by-product); TIME_j : storage time of fermented milk ($n = 2$: 2 and 30 days); $\text{DIET}_i \times \text{TIME}_j$: interaction of diet and time; and, e_{ijk} : residual error.

Principal component analysis (PCA regression map) was conducted to project the samples depending on the different chemical families of identified volatile compounds using XLSTAT Premium 2016 (Addingsoft, Barcelona, Spain).

3. Results and Discussion

3.1. Viability of Microbial Load and pH

The survival of microorganisms during processing and storage in fermented milk is highly important [40]. As can be seen in Figure 1, the type of diet, storage time and lactation stage did not significantly affect the number of viable microorganisms of all milk fermented by YO-MIX™ 300 starter culture. The sum of the number of viable cells of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* was $>10^7$ CFU/mL (colony forming units CFU) and the ratio 2:1 (*S. thermophilus*: *L. bulgaricus*) was maintained during refrigerated storage, being the established requirement for yogurt fermented milk by CODEX ALIMENTARIUS [25,40–42]. The symbiosis between these microorganisms has been extensively studied, the proto-cooperation. Markakiou et al. (2020) [26] explained the sum of the acid production in a mixed culture is greater than in a single culture. *Streptococcus thermophilus* produce several components (formic acid, pyruvic acid, carbon dioxide, long chain fatty acids, among others) which stimulate the growth of *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, which is highly proteolytic. This causes a pH reduction due to the transformation of lactose into lactic acid, and then, the denaturation of milk proteins and the release of aminoacids that are essential for the growth of *Streptococcus*. According to Liu et al. (2016) [13] the fermentation time decreases when symbiotic cultures are used. Previously, Dimitrellou et al. (2019) [25] found differences in the bacterial count of *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* in fermented goat milk, increasing the viability of *S. thermophilus* even under low temperature conditions and after 28 days of storage, while the viability of *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* decreased. In our study, a general reduction of viable cells was detected with the advance of the lactation stage; counts on FMs at PE and EL productions (three diets) were higher than those on FM from LL stage.

As to FMs by MA400 starter culture, a general decrease in the number of viable cells was observed due to the storage time from T2 to T30 of refrigeration ($p < 0.05$) for the three studied diets and at the four lactation stages (PE; EL; ML and LL). Considering lactation stage and diet, although some significant differences were detected they were considered irrelevant as they were minor in quantitative terms. No scientific studies on fermented milks by MA400 culture were found in the scientific literature as it is especially used for the manufacture of cheese, and also butter and buttermilk. The decrease in viability during storage cannot be directly attributed to any of the microorganisms that are part of this starter culture, but it could be potentially linked to *Lactococcus lactis*. *L. lactis* has been used together with other microorganisms in cheese making and it has been observed after six days of storage at 6 °C, that the decrease in the number of viable cells was due to *L. Lactis* reduction (from 2.3×10^9 CFU/g to 1.7×10^9 CFU/g) [43]. This decrease was attributed to the fact that while LAB grows, lactate is increasing which causes a reduction in pH, inhibiting the growth of *L. lactis* [44]

One of the key parameters in FMs production is pH decrease in milk; it is the direct consequence of the activity of the inoculated microorganisms. Fast acidification ensures food safety and pH is used as an indicator of the end point of fermentation. No significant differences were found among diets and lactation stage (Figure 2). FMs by YO-MIX™ 300 (range 4.6 and 4.18) had higher pH values than FMs by MA400 (range 4.36 and 4.02). A slight decrease of pH was noticed between T2 and T30 for both cultures. These results agree to what was previously found by other authors, were no significant variations of pH during storage for FMs was noticed. It is observed that the slight reduction of pH, especially FMs by YO-MIX™ 300 and an increase in acidity could be explained by the improvement of microbial growth and the peptidase activity of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, which is greatly favoured in goat milk [41,45]. Moreover, the urease activity of *S. thermophilus* present a significant correlation with the use of lactose and the production of lactic acid [24,27].

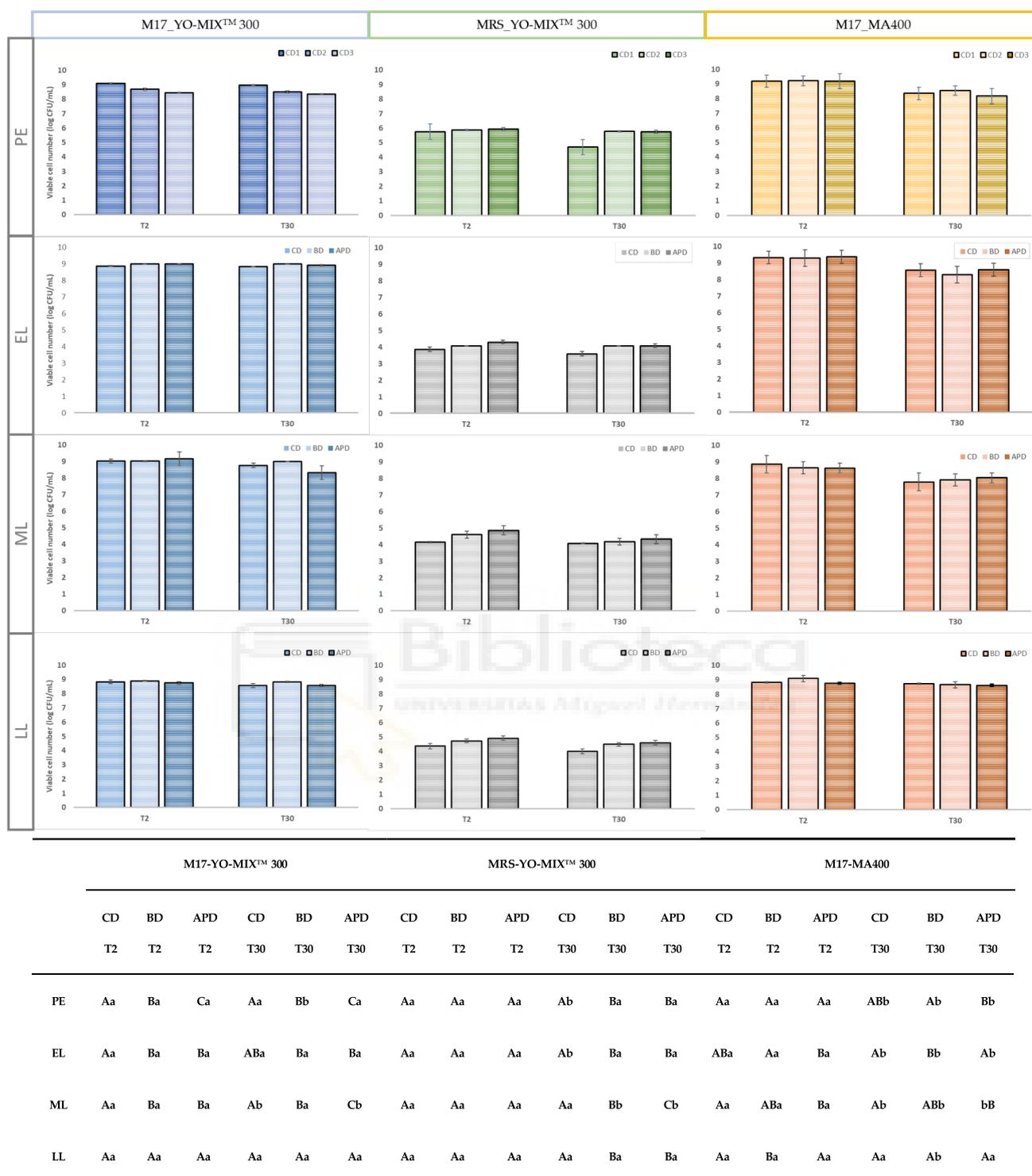


Figure 1. Lactic acid bacteria (viable cell number, log CFU/mL) of lactobacilli starter culture (YO-MIX™ 300 in MRS agar) and lactococci and streptococci (YO-MIX™ 300 and MA400 in M17 agar) in fermented milk with a storage time under refrigeration (T2 and T30). PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1 Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

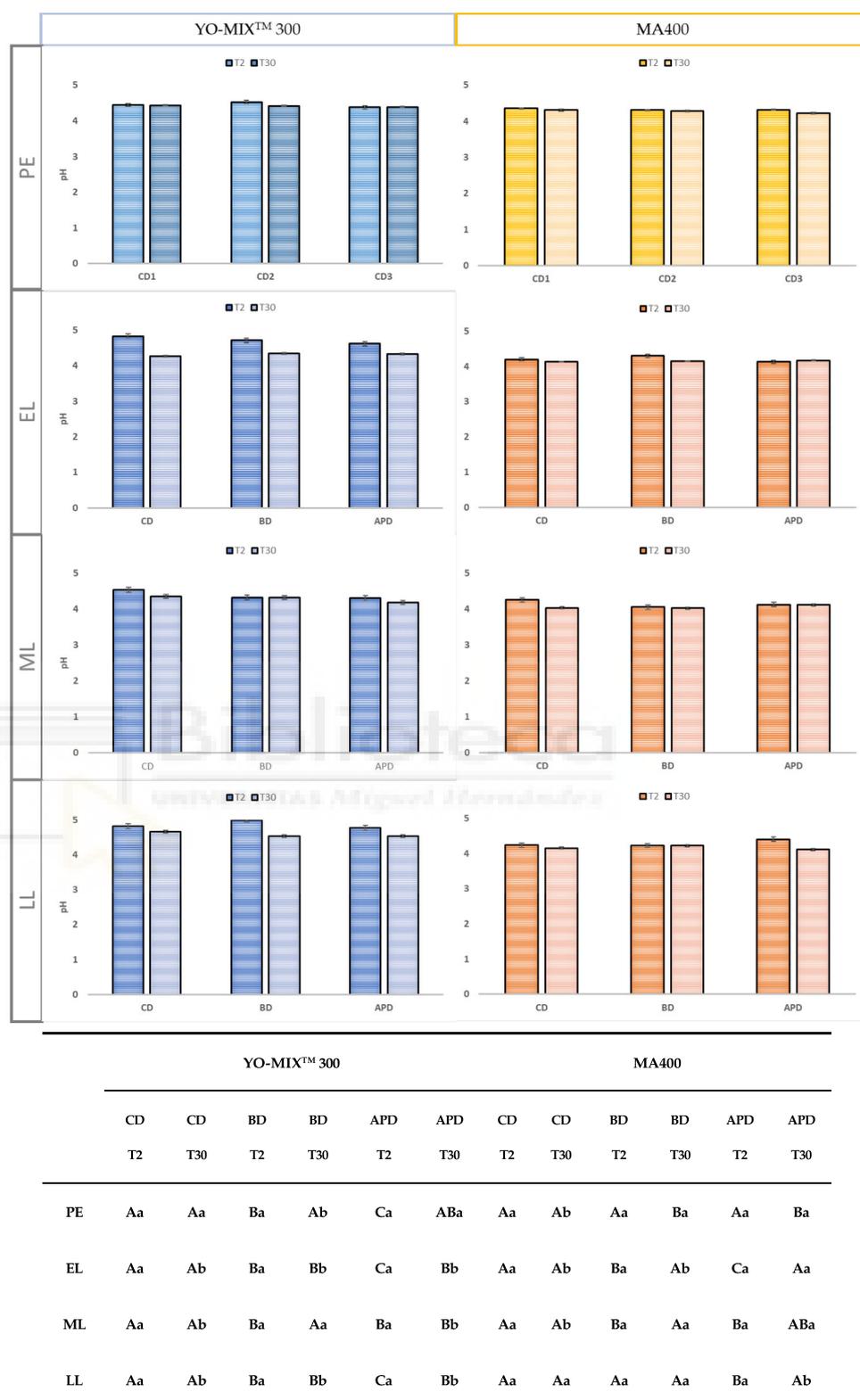


Figure 2. pH value of fermented milk during refrigerated 2 and 30 days at 4 °C using a thermophilic starter culture (YO-MIX™ 300) and mesophilic starter culture (MA400). PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

3.2. Composition of Milk and Fermented Milk

Composition of raw bulk tank milk is shown in Table 1. Regarding fat content, a 10% increase was observed at the EL stage sampling as compared to PE sampling for diets BD (5.30% vs. 4.80%) and APD (5.07% vs. 4.56%), the increase was only slight for group on CD diet (4.91% vs. 4.73%). Fat content increased till the end of lactation reaching values of 5.39% in CD and 5.61% in BD. However, fat content in APD remained constant throughout the experiment. BD diet yielded the milk with the highest fat content throughout the study. Protein content was slightly lower in BD and APD with respect to CD at EL and ML stages (0.1 units $p < 0.05$). An increase in protein was observed at the end of lactation (LL) for all diets, reaching contents of 3.62%, 3.56% and 3.42% for CD, BD and APD, respectively. Protein content was always higher in milk from the CD diet. A parallel study conducted by Monllor et al. [8] with an inclusion of 40% broccoli and artichoke plant by-products throughout lactation, observed similar results with an increase of 0.5% in absolute terms of fat in milk from of diets with broccoli silage and a higher protein content for milk from a conventional diet. They also observed an increase in fat and protein throughout lactation. Other parallel studies [6–8,29] but with a short-term inclusion showed that 40% broccoli silage by-products and 40% and 12.5% artichoke plant silage also increased the percentage of fat with respect to the conventional diet. However, the percentage of protein was hardly modified by the differentiated diets.

Table 1. Principal components (fat, protein, lactose and total solids) content (g/100 mL) in raw milk used for the different productions of fermented milk.

Production	Diet	Fat	Protein	Lactose	Total Solids
PE	CD1	4.73 ± 0.02 A	3.37 ± 0.01 A	4.73 ± 0.02 A	13.33 ± 0.01 A
	CD2	4.80 ± 0.02 B	3.35 ± 0.01 A	4.73 ± 0.02 A	13.31 ± 0.01 B
	CD3	4.56 ± 0.02 C	3.34 ± 0.01 A	4.74 ± 0.03 A	13.10 ± 0.01 C
	Anova	**	NS	NS	**
EL	CD	5.12 ± 0.02 A	3.34 ± 0.02 A	4.57 ± 0.01 A	13.50 ± 0.10 A
	BD	5.30 ± 0.02 B	3.21 ± 0.02 B	4.59 ± 0.01 A	14.00 ± 0.10 B
	APD	5.07 ± 0.02 C	3.26 ± 0.02 B	4.58 ± 0.01 A	13.27 ± 0.10 C
	Anova	*	*	NS	*
ML	CD	5.15 ± 0.02 A	3.41 ± 0.01 A	4.47 ± 0.11 A	14.33 ± 0.02 A
	BD	5.56 ± 0.02 B	3.29 ± 0.01 B	4.52 ± 0.11 A	14.50 ± 0.02 B
	APD	5.04 ± 0.02 C	3.28 ± 0.01 B	4.47 ± 0.11 A	13.94 ± 0.02 C
	Anova	***	*	NS	*
LL	CD	5.39 ± 0.05 A	3.62 ± 0.02 A	4.35 ± 0.03 AB	13.90 ± 0.05 A
	BD	5.61 ± 0.05 B	3.56 ± 0.02 A	4.39 ± 0.03 A	14.18 ± 0.05 B
	APD	5.10 ± 0.05 C	3.42 ± 0.02 B	4.29 ± 0.03 B	13.21 ± 0.05 C
	Anova	*	**	*	***

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

The average macrocomposition of the milk fermented by YOMIX™ 300 starter culture is presented in Table 2. As to fat percentage, an increase throughout lactation was detected, being more pronounced in fermented milks from BD diet with an interval of 4.46–5.50% between PE and LL production, with an increase ($p < 0.05$) of 1.04 percentage units. Fermented milk derived from CD also showed the same tendency but slightly less pronounced with an increase of 0.52 percentage units between PE and LL production, followed by fermented milks made from APD (an increase of 0.43 percentage units). As to protein percentage, a similar trend was observed, increasing throughout lactation being LL production significantly higher than PE in all batches (0.38, 0.32 and 0.19 percentage units for CD, APD and BD, respectively). This increase was also observed ML stage in the CD batch. The tendency above described for protein content in milk with the same proportion

in the goat diet (40% of by-product) was maintained when milk is fermented by YO-MIX™ 300: CD (3.75%) presented higher values than APD (3.67%), followed by BD (3.54%).

Regarding the composition of milk fermented by MA400 starter culture (Table 3) the same tendency was observed, increasing fat and protein content during lactation. A fat percentage increase ($p < 0.05$) of 0.24 percentage units was observed in the BD diet (5.63%) compared to the APD (5.41%) and CD (5.39%) diets between PE and LL. These differences were also found in milk from goat fed with the incorporation of 40% of by-product. Milk from animals fed broccoli by-product silage had a higher average fat content compared to the conventional diet and with artichoke plant by-product silage [6,8,29]. Nevertheless, when milk was fermented by MA400 no differences in protein percentage were found between APD and BD (3.45%).

Fermented milks macrocomposition (from both starter cultures) were not affected by the studied storage time. In some cases, significant differences were detected but these results presented no clear trend, being the differences between T2 and T30 very small (in percentage units). Average macrocomposition of the fermented milks with the different starter cultures and in the different productions and diets did not quantitatively differ much. Consequently, when evaluating gel stability (syneresis and whey composition) the behavior was similar, as will be discussed later.

Tables 4 and 5 show the sugars (lactose, glucose and galactose) and lactic acid present in the FMs. These components contribute to the characteristic taste of this type of product. Lactose content in raw milk ranged from 4.75 to 4.29%, and was reduced by fermentation with YO-MIX™ 300 and MA400 to values up to 1.78 and 1.70%, and 1.72 and 1.56% after T2 and T30 during refrigerated storage, respectively. Significant differences were observed between T2 and T30 of storage in some elaborations ($p < 0.05$) but with no clear trend, and could be considered caused by the elaboration process. It can be said that the highest content of lactose was observed in PE and EL FMs and the lowest content in LL FMs. In previous studies [46] the residual lactose was 1.90% in FMs by *L. bulgaricus*, which is one of the YOMIX™ 300 microorganisms in the present study. Data from Muelas et al., 2018 [46] agree with the observation that only traces of glucose were detected in EL in T2 with MA400 culture, but it was observed that glucose values increased (0.24 and 0.34% for T2 and T30 of refrigeration, respectively) in later lactations (EL and ML) and T30 of storage. A decrease of glucose in FMs at the end of lactation was noticed.

It is noteworthy that the highest values of galactose were reached in YO-MIX™ 300 FMs, and regarding lactation stage PE had the highest values which were reduced throughout lactation. As to MA400 fermented milk, a slight increase of galactose values was observed during lactation, however residual levels of glucose and galactose were both in similar range and not clearly influenced by the factors under study storage time and feeding [46]. Although statistically differences were detected ($p < 0.05$), these may not be considered relevant.

The lactic acid content was not affected by storage time, whereas due to the diet quantitatively slight differences ($p < 0.05$) were detected but with no clear trend. Lactic acid content was consistent with pH values. YO-MIX™ 300 FMs had less lactic acid and higher pH than those from MA400. Muelas et al., 2018 [46] reported a lactic acid content of 0.59% in FMs with MA400, similar to the present study in PE. It can be seen that it increases to higher than 0.70% from week 12 of lactation and it is maintained until the end of the experiment with slight variations. It was also observed that lactic acid content was higher in fermented milk from broccoli by-product feeding, which was also the one with the highest dry matter content.

Table 2. Main components (fat, protein and total solids) content (g/100 g) in fermented milk manufactured and stored for 2 and 30 days with milk from Murciana-Granadinas goats fed differentiated diets, using a thermophilic (YO-MIX™ 300) starter culture.

Production/Diet	Fat			Protein			Total Solids			
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	
PE	CD1	4.77 ± 0.02 Aa	4.86 ± 0.02 Ab	*	3.37 ± 0.01 Aa	3.35 ± 0.01 Aa	NS	13.16 ± 0.01 Aa	13.26 ± 0.01 Ab	***
	CD2	4.66 ± 0.02 Ba	4.74 ± 0.02 Bb	*	3.34 ± 0.01 Aa	3.35 ± 0.01 Aa	NS	13.09 ± 0.01 Ba	13.05 ± 0.01 Ba	NS
	CD3	4.35 ± 0.02 Ca	4.37 ± 0.02 Ca	NS	3.35 ± 0.01 Aa	3.35 ± 0.01 Aa	NS	12.73 ± 0.01 Ca	12.72 ± 0.01 Ca	NS
Anova	**	**	NS	NS	NS	NS	**	***	***	
EL	CD	4.96 ± 0.13 Aa	5.03 ± 0.13 Aa	NS	3.34 ± 0.02 Aba	3.35 ± 0.02 Aa	NS	13.96 ± 0.10 Aa	13.26 ± 0.10 Ab	**
	BD	5.17 ± 0.13 Aa	5.19 ± 0.13 Ba	NS	3.35 ± 0.02 Aa	3.24 ± 0.02 Bb	*	14.10 ± 0.10 Aa	14.24 ± 0.10 Ba	NS
	APD	4.79 ± 0.13 Aa	4.42 ± 0.13 Ca	NS	3.24 ± 0.02 Ba	3.26 ± 0.02 ABa	NS	13.30 ± 0.10 Ba	13.47 ± 0.10 Aa	NS
Anova	Ns	*	NS	*	*	NS	**	***	NS	
ML	CD	5.13 ± 0.01 Aa	5.15 ± 0.01 Aa	NS	3.48 ± 0.01 Aa	3.44 ± 0.01 Aa	NS	14.12 ± 0.02 Aa	14.15 ± 0.02 Aa	NS
	BD	5.54 ± 0.01 Ba	5.51 ± 0.01 Ba	NS	3.33 ± 0.01 Ba	3.44 ± 0.01 Ab	**	14.46 ± 0.02 Ba	14.55 ± 0.02 Bb	*
	APD	4.98 ± 0.01 Ca	5.03 ± 0.01 Ca	NS	3.29 ± 0.01 Ba	3.25 ± 0.01 Ba	NS	13.77 ± 0.02 Ca	13.79 ± 0.02 Ca	NS
Anova	***	**	NS	***	**	NS	***	***	NS	
LL	CD	5.29 ± 0.05 Aa	4.99 ± 0.05 Ab	**	3.75 ± 0.24 Aba	3.54 ± 0.24 Aa	NS	14.35 ± 0.05 Aa	14.14 ± 0.05 Ab	*
	BD	5.50 ± 0.05 Ba	5.23 ± 0.05 Bb	**	3.54 ± 0.24 Aa	3.34 ± 0.24 Aa	NS	14.46 ± 0.05 Aa	14.16 ± 0.05 Ab	*
	APD	4.78 ± 0.05 Ca	4.82 ± 0.05 Aa	NS	3.67 ± 0.24 Aa	3.45 ± 0.24 Aa	NS	13.47 ± 0.05 Ba	13.35 ± 0.05 Ba	NS
Anova	*	*	NS	NS	NS	NS	***	***	NS	

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

Table 3. Main components (fat, protein and total solids) content (g/100 g) in fermented milk manufactured and stored for 2 and 30 days with milk from Murciana-Granadinas goats fed differentiated diets, using a mesophilic (MA400) starter culture.

Production/Diet	Fat			Protein			Total Solids			
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	
PE	CD1	4.75 ± 0.02 Aa	4.86 ± 0.02 Ab	**	3.38 ± 0.02 Aa	3.36 ± 0.02 Aa	NS	12.75 ± 0.08 Aa	13.16 ± 0.08 Ab	**
	CD2	5.03 ± 0.02 Ba	4.97 ± 0.02 Ba	NS	3.36 ± 0.02 Aa	3.36 ± 0.02 Aa	NS	12.96 ± 0.08 Aa	13.33 ± 0.08 Ab	*
	CD3	4.85 ± 0.02 Ca	4.96 ± 0.02 Bb	**	3.35 ± 0.02 Aa	3.35 ± 0.02 Aa	NS	12.75 ± 0.08 Aa	13.33 ± 0.08 Ab	**
Anova	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Table 3. *Cont.*

Production/Diet	Fat			Protein			Total Solids		
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova
EL	CD	4.93 ± 0.02 Aa	4.95 ± 0.02 Aa	NS	3.36 ± 0.02 Aa	3.51 ± 0.02 Ab	13.43 ± 0.02 Aa	13.89 ± 0.02 Ab	***
	BD	5.54 ± 0.02 Ba	5.64 ± 0.02 Bb	***	3.14 ± 0.02 Ba	3.25 ± 0.02 Bb	13.85 ± 0.02 Ba	14.34 ± 0.02 Bb	***
	APD	4.92 ± 0.02 Aa	4.93 ± 0.02 Aa	NS	3.26 ± 0.02 Ca	3.35 ± 0.02 Cb	13.23 ± 0.02 Ca	13.47 ± 0.02 Cb	***
Anova	**	*		**	*		***	***	
ML	CD	5.16 ± 0.02 Aa	5.44 ± 0.02 Ab	***	3.50 ± 0.02 Aa	3.43 ± 0.02 Ab	14.16 ± 0.02 Aa	13.94 ± 0.02 Ab	***
	BD	5.47 ± 0.02 Ba	5.75 ± 0.02 Bb	***	3.34 ± 0.02 Ba	3.25 ± 0.02 Bb	14.34 ± 0.02 Ba	14.02 ± 0.02 Bb	***
	APD	4.92 ± 0.02 Ca	5.22 ± 0.02 Cb	***	3.30 ± 0.02 Ba	3.26 ± 0.02 Ba	13.75 ± 0.02 Ca	13.90 ± 0.02 Cb	***
Anova	***	***		***	***		**	***	
LL	CD	5.39 ± 0.05 Aa	5.55 ± 0.05 Aa	NS	3.55 ± 0.02 Aa	3.62 ± 0.02 Aa	13.39 ± 0.17 Aa	13.64 ± 0.17 Aa	NS
	BD	5.63 ± 0.05 Ba	5.89 ± 0.05 Bb	**	3.45 ± 0.02 Ba	3.55 ± 0.02 Ab	14.63 ± 0.17 Ba	14.55 ± 0.17 Bb	NS
	APD	5.41 ± 0.05 Aa	5.13 ± 0.05 Cb	**	3.43 ± 0.02 Ba	3.36 ± 0.02 Bb	13.09 ± 0.17 Aa	12.85 ± 0.17 Ca	NS
Anova	*	**		*	***	***	*	NS	

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

Table 4. Sugars and lactic acid content in fermented milk manufactured and stored for 2 and 30 days with milk from Murciana-Granadinas goats fed differentiated diets, using a thermophilic (YO-MIX™ 300) starter culture.

Production/Diet	Lactose			Glucose			Galactose			Lactic Acid			
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	
PE	CD1	1.98 ± 0.02 Aa	2.01 ± 0.02 Aa	NS	0.39 ± 0.004 Aa	0.38 ± 0.004 Aa	NS	0.43 ± 0.006 Aa	0.45 ± 0.006 Ab	*	0.61 ± 0.005 Aa	0.62 ± 0.005 Aa	NS
	CD2	2.02 ± 0.02 Aa	2.02 ± 0.02 Aa	NS	0.39 ± 0.004 Aa	0.39 ± 0.004 Aa	NS	0.42 ± 0.006 Aa	0.42 ± 0.006 Ba	NS	0.57 ± 0.005 Ba	0.60 ± 0.005 Bb	NS
	CD3	2.00 ± 0.02 Aa	2.01 ± 0.02 Aa	NS	0.38 ± 0.004 Aa	0.39 ± 0.004 Aa	NS	0.42 ± 0.006 Aa	0.43 ± 0.006 Ba	NS	0.58 ± 0.005 Ba	0.59 ± 0.005 Ba	NS
Anova	NS	NS		NS	NS		NS	*		**	*	NS	
EL	CD	1.93 ± 0.03 Aa	2.01 ± 0.03 Aa	NS	0.39 ± 0.004 Aa	0.38 ± 0.004 Aa	NS	0.43 ± 0.05 Aa	0.42 ± 0.05 Aa	NS	0.57 ± 0.01 Aa	0.55 ± 0.01 Aa	NS
	BD	1.97 ± 0.03 Aa	1.88 ± 0.03 Ba	NS	0.39 ± 0.004 Ba	0.40 ± 0.004 Ba	NS	0.43 ± 0.05 Aa	0.42 ± 0.05 Ba	NS	0.61 ± 0.01 Aa	0.59 ± 0.01 Aa	NS
	APD	1.87 ± 0.03 ABa	2.09 ± 0.03 Aa	NS	0.38 ± 0.004 Ba	0.37 ± 0.004 Aa	NS	0.41 ± 0.05 Aa	0.40 ± 0.05 Aa	NS	0.60 ± 0.01 Aa	0.59 ± 0.01 Aa	NS
Anova	*	*		**	***		NS	*		NS	NS	NS	
ML	CD	1.89 ± 0.11 Aa	1.88 ± 0.11 Aa	NS	0.41 ± 0.01 Aa	0.39 ± 0.01 Aa	NS	0.49 ± 0.02 Aa	0.47 ± 0.02 Aa	NS	0.62 ± 0.01 Aa	0.62 ± 0.01 Aa	NS
	BD	1.96 ± 0.11 Aa	2.17 ± 0.11 Aa	NS	0.41 ± 0.01 Aa	0.38 ± 0.01 Aa	NS	0.44 ± 0.02 Aa	0.47 ± 0.02 Aa	NS	0.60 ± 0.01 Aa	0.62 ± 0.01 Aa	NS
	APD	1.88 ± 0.11 Aa	2.05 ± 0.11 Aa	NS	0.41 ± 0.01 Aa	0.34 ± 0.01 Ab	*	0.49 ± 0.02 Aa	0.50 ± 0.02 Aa	NS	0.61 ± 0.01 Aa	0.65 ± 0.01 Aa	NS
Anova	NS	NS		NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Table 4. Cont.

Production/Diet	Lactose			Glucose			Galactose			Lactic Acid			
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	
LL	CD	1.87 ± 0.02 Aa	1.72 ± 0.02 Ab	**	0.36 ± 0.05 Aa	0.36 ± 0.05 Aa	NS	0.40 ± 0.007 Aa	0.45 ± 0.007 Ab	**	0.50 ± 0.01 Aa	0.59 ± 0.01 Ab	**
	BD	1.93 ± 0.02 Aa	1.87 ± 0.02 Ba	NS	0.35 ± 0.05 Aa	0.35 ± 0.05 Aa	NS	0.38 ± 0.007 Aa	0.43 ± 0.007 Ab	**	0.52 ± 0.01 Aa	0.59 ± 0.01 Ab	***
	APD	1.78 ± 0.02 Ba	1.70 ± 0.02 Aa	NS	0.34 ± 0.05 Aa	0.35 ± 0.05 Aa	NS	0.39 ± 0.007 Aa	0.42 ± 0.007 Bb	*	0.50 ± 0.01 Aa	0.55 ± 0.01 Bb	**
Anova	*	**	NS	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	*	

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

Table 5. Sugars and lactic acid content in fermented milk manufactured and stored for 2 and 30 days with milk from Murciana-Granadinas goats fed differentiated diets, using a mesophilic (MA400) starter culture.

Production/Diet	Lactose			Glucose			Galactose			Lactic Acid			
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	
PE	CD1	2.34 ± 0.02 Aa	2.60 ± 0.02 Ab	***	0.30 ± 0.002 Aa	0.33 ± 0.002 Ab	***	0.30 ± 0.006 Aa	0.31 ± 0.006 Aa	NS	0.61 ± 0.003 Aa	0.61 ± 0.003 Aa	NS
	CD2	2.28 ± 0.02 Ba	2.31 ± 0.02 Ba	NS	0.31 ± 0.002 Aa	0.34 ± 0.002 Bb	***	0.28 ± 0.006 Aa	0.30 ± 0.006 Ba	NS	0.59 ± 0.003 Ba	0.61 ± 0.003 Ab	NS
	CD3	2.28 ± 0.02 Ba	2.31 ± 0.02 Ba	NS	0.31 ± 0.002 Aa	0.34 ± 0.002 Bb	***	0.32 ± 0.006 ABa	0.33 ± 0.006 Ba	NS	0.59 ± 0.003 Ba	0.60 ± 0.003 Aa	NS
Anova	*	***	NS	NS	**	***	*	***	***	NS	NS	NS	
EL	CD	2.14 ± 0.01 Aa	2.11 ± 0.01 Aa	NS	0.29 ± 0.001 Aa	0.28 ± 0.001 Aa	NS	0.28 ± 0.007 Aa	0.29 ± 0.007 Aa	NS	0.71 ± 0.006 Aa	0.75 ± 0.006 Ab	**
	BD	2.13 ± 0.01 Aa	2.09 ± 0.01 Ab	**	0.30 ± 0.001 Aa	0.29 ± 0.001 Bb	***	0.24 ± 0.007 Ba	0.25 ± 0.007 Ba	NS	0.75 ± 0.006 Ba	0.75 ± 0.006 Aa	NS
	APD	2.02 ± 0.01 Ba	2.05 ± 0.01 Bb	*	0.29 ± 0.001 Aa	0.27 ± 0.001 ABb	***	0.27 ± 0.007 Ca	0.27 ± 0.007 Ba	NS	0.72 ± 0.006 Aa	0.74 ± 0.006 Ab	***
Anova	***	*	ns	ns	***	***	*	***	***	*	*	ns	
ML	CD	1.85 ± 0.08 Aa	1.79 ± 0.08 Ab	***	0.30 ± 0.005 Aa	0.31 ± 0.005 Aa	NS	0.37 ± 0.009 Aa	0.39 ± 0.009 Aa	NS	0.61 ± 0.01 Aa	0.60 ± 0.01 Aa	NS
	BD	2.20 ± 0.08 Ba	1.78 ± 0.08 Ab	**	0.28 ± 0.005 Ba	0.32 ± 0.005 Ab	***	0.45 ± 0.009 Ba	0.39 ± 0.009 Ab	***	0.73 ± 0.01 Ba	0.67 ± 0.01 Bb	**
	APD	2.05 ± 0.08 ABa	1.80 ± 0.08 Aa	NS	0.29 ± 0.005 ABa	0.33 ± 0.005 ABb	***	0.40 ± 0.009 Ca	0.39 ± 0.009 Aa	NS	0.64 ± 0.01 Aa	0.62 ± 0.01 Aa	NS
Anova	*	NS	NS	*	*	***	*	NS	NS	***	***	*	
LL	CD	1.80 ± 0.05 Aa	1.87 ± 0.05 Aa	NS	0.31 ± 0.007 Aa	0.24 ± 0.007 Ab	***	0.41 ± 0.007 Aa	0.31 ± 0.007 Aa	NS	0.67 ± 0.01 Aa	0.76 ± 0.01 Ab	***
	BD	1.84 ± 0.05 Aa	1.58 ± 0.05 Bb	**	0.31 ± 0.007 Aa	0.25 ± 0.007 Ab	***	0.40 ± 0.007 Aa	0.38 ± 0.007 Ba	NS	0.68 ± 0.01 Aa	0.70 ± 0.01 Bb	***
	APD	1.72 ± 0.05 Aa	1.76 ± 0.05 Aa	NS	0.30 ± 0.007 Aa	0.23 ± 0.007 Ab	***	0.40 ± 0.007 Aa	0.41 ± 0.007 Ab	*	0.66 ± 0.01 Aa	0.73 ± 0.01 ABb	**
Anova	NS	*	NS	NS	NS	***	NS	**	NS	NS	NS	**	

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

3.3. Syneresis and Whey Composition

Syneresis in FMs is the separation of the liquid phase from the gel. According to Domagała (2009) [47] it can occur spontaneously or when the gel is mechanically disrupted during cutting, shaking or freezing, and is undesirable in firm and stirred fermented milk because it can negatively influence consumer acceptance of the food product. In previous studies, it has been observed that when the protein content and total solids are increased, an increase of whey retention capacity is observed, and then spontaneous syneresis process disappear, obtaining products with greater apparent viscosity and firmness [47,48]. Tables 6 and 7 show the percentage of syneresis and composition of the expelled whey. It is observed that the syneresis values are slightly higher in FMs with YO-MIX™ 300 compared to those obtained with MA400. Similar values (average 64%) were found in previous studies [46]. Other authors [48] compared the percentage of syneresis 14 days after fermentation in yogurts based on different types of milk, obtaining considerably higher values in goat milk (39%) compared to cow milk (25%) or sheep (17%). Martín-Diana et al. (2003) [41] explained that when goat milk is used for FMs, it is required the inclusion of a fortification to improve the coagulum characteristics because goat milk presents slightly lower casein content (α -s1-casein) than cow's milk. The content of α s1-casein in goat milk depends on the genetic polymorphisms, whereas goats with alleles A, B or C have contents of α s1-casein up to 25% of the total milk protein, goats with O or N alleles have no α s1-casein. The lower the content of α s1-casein the larger the casein micelles and the number of hydrated pores yielding a less dense gel structure than cow milk [49]. It is important to mention that no significant differences on syneresis were observed between storage times, as opposed to observations by Domagała, (2009) [47] who did appreciate a decrease due to storage. Other authors also reported increased percentage of syneresis with storage time in cow's milk yogurt [22]. In a previous study, whey composition was as follows: 0.32% protein, 0.24% fat, 4.4% lactose, and 3.5% of total solids [46] In the present study, lactose was much lower, presenting values <2.5%. It should be noted that the protein values were around 0.30% and decreased considerably in all fermented milks regardless of the feeding, at late lactation. It can be observed that FMs cultured with MA400 lost more fat with the whey than those cultured with YO-MIX™ 300.

Table 6. Synthesis and main components (g/100 mL) of the expelled whey from fermented milk refrigerated at 4 °C during 2 and 30 days using a thermophilic starter culture (YO-MIX™ 300).

Production/Diet	Synthesis			Fat			Protein			Lactose			Total Solids		
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova
CD1	66.20 ± 1.06	65.74 ± 1.06	NS	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	NS	2.28 ± 0.01	2.32 ± 0.01	NS	3.53 ± 0.01	3.52 ± 0.01	NS
	Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa	
PE	64.18 ± 1.06	63.13 ± 1.06	NS	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.01	NS	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	NS	2.32 ± 0.01	2.34 ± 0.01	NS	3.43 ± 0.01	3.42 ± 0.01	NS
	Aa	Ba		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Ba	Ba	
CD3	69.00 ± 1.06	62.49 ± 1.06	**	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	NS	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	NS	2.27 ± 0.01	2.27 ± 0.01	NS	3.44 ± 0.01	3.48 ± 0.01	*
	ABa	Ab		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	ABa		Ba	Cb	
Anova	*	*		NS	NS		NS	NS		NS	*		**	*	
CD	67.26 ± 1.45	65.00 ± 1.45	NS	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01	NS	2.24 ± 0.01	2.26 ± 0.01	NS	3.47 ± 0.02	3.54 ± 0.02	NS
	Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa	
EL	65.55 ± 1.45	66.93 ± 1.45	NS	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.01	NS	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	NS	2.06 ± 0.01	2.27 ± 0.01	***	3.17 ± 0.02	3.63 ± 0.02	***
	Ba	Aa		Aa	Ba		Aa	Aa		Ba	Ab		Ba	Bb	
APD	62.03 ± 1.45	63.23 ± 1.45	**	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01	NS	0.27 ± 0.01	0.33 ± 0.01	NS	2.16 ± 0.01	2.23 ± 0.01	*	3.11 ± 0.02	3.38 ± 0.02	***
	Ca	Ab		Aa	Ca		Aa	ABa		Ca	Ab		Ba	Cb	
Anova	*	NS		NS	*		NS	*		*			***	*	
CD	63.86 ± 1.81	65.82 ± 1.81	NS	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS	0.32 ± 0.01	0.29 ± 0.01	NS	2.25 ± 0.01	2.26 ± 0.01	NS	3.48 ± 0.01	3.74 ± 0.01	***
	Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Ab	
ML	67.34 ± 1.81	63.94 ± 1.81	NS	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	NS	2.22 ± 0.01	2.20 ± 0.01	NS	3.32 ± 0.01	3.38 ± 0.01	NS
	Ba	ABa		Aa	Aa		Ba	Ba		Aa	Ba		Ba	Ba	
APD	65.50 ± 1.81	67.42 ± 1.81	NS	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01	NS	0.29 ± 0.01	0.26 ± 0.01	NS	2.19 ± 0.01	2.13 ± 0.01	NS	3.42 ± 0.01	3.09 ± 0.01	***
	ABa	Ba		Aa	Ab		ABa	ABa		ABa	Ca		Aa	Cb	
Anova	*	*		NS	NS		*	*		*			**	***	
CD	68.40 ± 0.74	60.91 ± 0.74	NS	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01	NS	0.27 ± 0.01	0.25 ± 0.01	NS	2.24 ± 0.03	2.14 ± 0.03	*	3.32 ± 0.01	3.12 ± 0.01	***
	Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Ab		Aa	Ab	
LL	60.12 ± 0.74	65.90 ± 0.74	**	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	NS	2.24 ± 0.03	2.16 ± 0.03	NS	3.30 ± 0.01	3.07 ± 0.01	***
	Ba	Ab		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Bb	
APD	67.24 ± 0.74	69.69 ± 0.74	NS	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01	NS	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	NS	2.11 ± 0.03	2.05 ± 0.03	NS	3.06 ± 0.01	2.96 ± 0.01	**
	Aa	Ba		Aa	Aa		Aa	Aa		Ba	ABa		Ba	Cb	
Anova	***	*		NS	NS		NS	NS		*			***	*	

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

Table 7. Synthesis and main components (g/100 mL) of the expelled whey from fermented milk refrigerated at 4 °C during 2 and 30 days using a mesophilic starter culture MA400.

Production/Diet	Synthesis			Fat			Protein			Lactose			Total Solids		
	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova	T2	T30	Anova
CD1	63.39 ± 0.82	67.68 ± 0.82	*	0.77 ± 0.01	0.41 ± 0.01	***	0.26 ± 0.01	0.33 ± 0.01	*	2.35 ± 0.01	2.35 ± 0.01	NS	3.23 ± 0.02	3.46 ± 0.02	***
	Aa	Ab		Aa	Ab		Aa	Ab		Aa	Aa		Aa	Ab	
PE CD2	58.60 ± 0.82	67.97 ± 0.82	***	0.29 ± 0.01	0.45 ± 0.01	***	0.27 ± 0.01	0.33 ± 0.01	NS	2.28 ± 0.01	2.36 ± 0.01	*	3.33 ± 0.02	3.43 ± 0.02	***
	Ba	Ab		Ba	Ab		Aa	Aa		Ba	Ab		Ba	Bb	
CD3	68.80 ± 0.82	67.40 ± 0.82	NS	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.01	NS	0.29 ± 0.01	0.33 ± 0.01	NS	2.24 ± 0.01	2.30 ± 0.01	NS	3.56 ± 0.02	3.46 ± 0.02	NS
	Ca	Aa		Ca	Ba		Aa	Aa		Ba	ABa		Ca	Ca	
Anova	*	NS		*	***		NS	NS		*	*		***	**	
CD	66.62 ± 0.95	64.85 ± 0.95	NS	0.24 ± 0.01	0.47 ± 0.01	***	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	NS	2.16 ± 0.02	2.21 ± 0.02	NS	3.23 ± 0.02	3.46 ± 0.02	***
	Aa	Aa		Aa	Ab		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Ab	
EL BD	59.56 ± 0.95	62.81 ± 0.95	NS	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.01	*	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.01	NS	2.17 ± 0.02	2.23 ± 0.02	NS	3.33 ± 0.02	3.43 ± 0.02	*
	Ba	Aa		Ba	Bb		Aa	Ba		Aa	Aa		Ba	Ab	
APD	66.91 ± 0.95	66.89 ± 0.95	NS	0.58 ± 0.01	0.48 ± 0.01	**	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	NS	2.19 ± 0.02	2.21 ± 0.02	NS	3.56 ± 0.02	3.46 ± 0.02	*
	Aa	ABa		Ca	Ab		ABa	Aa		Aa	Aa		Ca	Ab	
Anova	**	*		**	**		*	*		NS	NS		*	NS	
CD	64.26 ± 2.37	56.89 ± 2.37	NS	0.36 ± 0.01	0.33 ± 0.01	NS	0.34 ± 0.01	0.29 ± 0.01	NS	2.15 ± 0.04	2.16 ± 0.04	NS	3.27 ± 0.01	3.22 ± 0.01	NS
	Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa	
ML BD	58.72 ± 2.37	52.49 ± 2.37	NS	0.71 ± 0.01	0.82 ± 0.01	***	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.01	NS	2.27 ± 0.04	2.37 ± 0.04	NS	3.74 ± 0.01	3.87 ± 0.01	**
	Aa	Aa		Ba	Bb		Aa	Ba		Aa	Ba		Ba	Bb	
APD	66.38 ± 2.37	67.16 ± 2.37	NS	0.49 ± 0.01	0.37 ± 0.01	***	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.01	NS	2.15 ± 0.04	2.10 ± 0.04	NS	3.39 ± 0.01	3.26 ± 0.01	**
	Aa	Ba		Ca	Ab		Ba	Ca		Aa	Aa		Ca	Ab	
Anova	NS	*		***	***		**	**		NS	*		**	***	
CD	58.83 ± 1.20	63.39 ± 1.20	*	0.21 ± 0.01	0.27 ± 0.01	*	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.02	NS	2.04 ± 0.02	2.04 ± 0.02	NS	3.02 ± 0.07	3.04 ± 0.07	NS
	Aa	Ab		Aa	Ab		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa	
LL BD	61.42 ± 1.20	60.64 ± 1.20	NS	0.36 ± 1.20	0.25 ± 0.01	**	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.02	NS	2.09 ± 0.02	2.08 ± 0.02	NS	3.19 ± 0.07	3.07 ± 0.07	NS
	Aa	Aa		Ba	Ab		Aa	Aa		Aa	Aa		Aa	Aa	
APD	59.48 ± 1.20	61.85 ± 1.20	NS	0.34 ± 1.20	0.45 ± 0.01	**	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	NS	1.92 ± 0.02	1.96 ± 0.02	NS	3.03 ± 0.07	3.25 ± 0.07	NS
	Aa	Aa		Ba	Bb		Aa	Aa		Ba	ABa		Aa	Aa	
Anova	NS	NS		**	***		NS	NS		*	*		NS	NS	

PE: Pre-experimental; EL: Early lactation; ML: Middle lactation; LL: Late lactation; CD1: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a column or row having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between days (T2 and T30) of the same type of diet in each of the rows (production); Capital letters refer to the differences between diets at each of the times for each of the rows (production).

3.4. Functionality of Fermented Milks

3.4.1. Antioxidant Capacity and Total Phenols

At late lactation, no significant differences in TPC of raw milk were observed due to the diet (Table 8). Compared with raw milk, there was a slight increase in TPC after fermentation with both thermophilic and mesophilic cultures. It is important to highlight that the lowest TPC values of FMs at the end of lactation were found in the batch where the diet was conventional, while the highest values were obtained when 40% broccoli by-product was incorporated. It would be interesting to observe in future studies if there is an increase of other bioactive compounds such as sulfur compounds (glucosinolates and/or isothiocyanates such as sulforaphane). No differences between storage times (T2 and T30) were observed in this study, so only results from day 30 are presented in Table 8. Degradation of phenolic compounds (specially anthocyanins) in fermented milk was noticed during fermentation and storage in previous studies [22,50], however, in the present study no differences were detected between days 2 and 30 of storage. Regarding antioxidant activity, DPPH values did not show significant differences between diets in both raw milk and fermented milk, except when mesophilic culture was used. As to ABTS assay, there is a significant increase in raw milk when incorporating 40% artichoke by-product into the diet but no significant differences were observed between the different diets in fermented milks. Although it would need more research, this change in the antioxidant capacity from raw to fermented milk could be caused by the differences of available soluble peptides, which provide great antioxidant capacity (mainly ABTS) in milk and fermented milk [51].

3.4.2. Fatty Acid Health/Nutritional Indexes

Fatty acid health/nutritional indexes of raw milk and fermented milk of late lactation stored 30 days (LL) are presented in Table 9. Late lactation sampling of 30 days stored FMs was the only sampling selected to be included in the table to avoid repetitive tables, and to represent the most extreme conditions (longest period under differentiated diets). At PE sampling milk from different batches did not differ, while differences due to diet were evident at EL, ML as well as the presented results of LL. No differences were detected between 2 and 30 days of refrigerated storage.

Chen and Liu, 2020 [16] recently reviewed health/nutritional indexes in different foods, including dairy foods. All values in Table 8 are within the ranges reported for dairy goat products in the scientific literature for those indexes. PUFA/SFA is a general index for the nutritional value of fats and ranges from 0.02–0.175 in dairy goat products. Indexes n6/n3 and LA/ALA are a quality index for baby foods given the relevance on n3 fatty acids and ranges in cow's milk are 2.46–3.44, no data was reported for goat milk. Atherogenicity index (IA) and thrombogenicity index (IT) in goat milk foods range 1.89–2.91 IA, 2.70–3.20 IT. Hypocholesterolemic/hypercholesterolemic index (HH) have no data reported in goat milk products, they range from 0.32 to 1.29 in other dairy foods. Health promoting index (HPI) is the inverse of IA and ranges from 0.37 to 0.68 in goat cheeses. The following are desaturase indexes that relate each unsaturated fatty acid to the previous saturated form \sum CLA/Vaccenic acid, DI14, DI16, and Oleic/estearic acid and DI18 which are closely related.

Table 8. Values of total phenols and antioxidant capacity in raw milk (RM) and fermented milk manufactured by late lactation milk and stored for 30 days with milk from Murciana-Granadinas goats fed with differentiated diets, using a thermophilic (YO-MIX™ 300) and mesophilic (MA400) starter cultures.

	YO-MIX™ 300												MA400											
	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD								
RM	LL	RM	LL	RM	LL	RM	LL	RM	LL	RM	LL	RM	LL	RM	LL	RM	LL							
TPC	NS	49.41 a	67.56 c	50.85 a	87.45 a	45.35 a	76.82 b	NS	**	49.41 a	84.52 b	50.45 a	98.75 a	45.68 a	81.20 ba									
DPPH	NS	0.26 a	0.36 a	0.24 a	0.38 a	0.33 a	0.44 a	NS	*	0.51 a	0.53 a	0.38 b	0.45 b	0.47 a	0.53 a									
ABTS	*	0.27 b	0.22 a	0.23 b	0.20 a	0.33 a	0.24 ba	*	NS	0.26 b	0.26 a	0.24 b	0.24 a	0.33 a	0.25 a									

RM: raw milk; LL: Late lactation; CD: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet; Least square means within a row having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. NS: not significant.

Table 9. Fatty Acids ratios and healthy indexes in raw milk and fermented milks manufactured by late lactation milk and stored for 30 days with milk from Murciana-Granadinas goats fed with differentiated diets, using a thermophilic (YO-MIX™ 300) and mesophilic (MA400) starter cultures.

	Raw Milk												FMs by YO-MIX™ 300												FMs by MA400											
	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD	Anova	CD	BD	APD												
PUFA/SFA	***	0.071 a	0.061 b	0.070 a	***	0.064 a	0.055 b	0.065 a	***	0.064 a	0.055 b	0.065 a	***	0.063 a	0.054 b	0.062 a																				
MUFA/SFA	**	0.41 a	0.38 b	0.39 b	*	0.41 a	0.38 b	0.40 a	*	0.41 a	0.38 b	0.40 a	**	0.40 a	0.37 b	0.39 ab																				
n6/n3	*	20.01 a	15.44 b	8.97 c	*	21.51 a	17.82 b	9.16 c	*	21.51 a	17.82 b	9.16 c	*	23.43 a	18.03 b	9.85 c																				
LA/ALA	*	18.42 a	14.19 b	8.07 c	*	20.36 a	16.59 b	8.45 c	*	20.36 a	16.59 b	8.45 c	*	22.13 a	17.02 b	9.07 c																				
Oleic acid/Stearic acid	***	1.57 b	1.79 b	2.25 a	***	1.58 b	1.76 b	2.27 a	***	1.58 b	1.76 b	2.27 a	***	1.67 b	1.90 b	2.37 a																				
ΣCLA/Vaccenic acid	**	0.52 c	0.68 b	0.82 a	**	0.49 b	0.56 ab	0.69 a	**	0.49 b	0.56 ab	0.69 a	***	0.48 b	0.68 ab	0.74 a																				
IA	***	1.90 b	2.20 a	2.18 a	**	2.01 b	2.27 a	2.21 a	**	2.01 b	2.27 a	2.21 a	***	2.05 b	2.31 a	2.26 a																				
IT	***	2.89 b	3.17 a	2.88 b	*	3.07 ab	3.32 a	2.96 b	*	3.07 ab	3.32 a	2.96 b	***	3.04 b	3.28 a	2.97 b																				
HFA	***	36.64 b	40.35 a	40.51 a	***	38.99 b	42.15 a	41.97 a	***	38.99 b	42.15 a	41.97 a	***	38.39 b	41.45 a	41.61 a																				
HH	***	0.71 a	0.62 b	0.64 b	***	0.69 a	0.61 b	0.63 ab	***	0.69 a	0.61 b	0.63 ab	**	0.69 a	0.68 a	0.63 b																				
HPI	***	0.52 a	0.45 b	0.45 b	***	0.49 a	0.43 b	0.45 b	***	0.49 a	0.43 b	0.45 b	***	0.48 a	0.43 b	0.44 b																				
DI14	**	0.019 b	0.021 ab	0.025 a	**	0.016 b	0.018 b	0.022 a	*	0.016 b	0.018 b	0.022 a	*	0.017 b	0.018 b	0.022 a																				
DI16	NS	0.049 a	0.045 a	0.053 a	NS	0.052 a	0.049 a	0.058 a	NS	0.052 a	0.049 a	0.058 a	NS	0.047 a	0.045 a	0.055 a																				
DI18	***	2.01 b	2.18 ab	2.70 a	***	1.95 b	2.10 ab	2.63 a	***	1.95 b	2.10 ab	2.63 a	**	2.00 b	2.18 b	2.72 a																				

CD: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet; Least square means within a row having different letters differ significantly. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. NS: not significant. PUFA/SFA (Polyunsaturated Fatty Acids/Saturated fatty acids, Equation (1)), MUFA/SFA (Monounsaturated Fatty Acid/Saturated fatty acids, Equation (2)), n6/n3 (omega 6/omega 3, Equation (3)), LA/ALA (Linoleic Acid/ α -Linolenic acid, Equation (4)), Oleic acid/Stearic acid (Equation (5)), ΣCLA/Vaccenic acid (Equation (6)), IA (Atherogenicity index, Equation (7)), IT (thrombogenicity index, Equation (8)), HFA (hypercholesterolemic index, Equation (9)), HH (Hypocholesterolemic/Hypercholesterolemic ratio, Equation (10)), HPI (Health promoting index, Equation (11)), DI14 (Desaturation index 14, Equation (12)), DI16 (Desaturation index 16, Equation (13)), and DI18 (Desaturation index 18, Equation (14)).

Milk fermentation by both cultures had little influence on the fatty acid profile and calculated indexes. Only n6/n3-LA/ALA together with hypercholesterolemic index (HFA) increased due to fermentation and all desaturase indexes decreased. Main modifications in health indexes are in fact due to the inclusion of silages from both broccoli and artichoke plant and they are discussed together.

The incorporation of broccoli (BD) and artichoke by-products (APD) in the diet modified the fatty acid profile of raw milk (RM), and consequently all the calculated fatty acid ratios/indexes in the RM were modified, except DI16. DI16 is a desaturation index (DI14, DI16 and DI18), being this related to the isomers of C16:1 and C16:0. Previous studies [7,8,29] indicated that silages from APD included in dairy goat balanced diets up to a 12.5% (12.5% APD) and 25% (25% APD) replacement of conventional ingredients showed similar MUFA/SFA and PUFA/SFA values to CD values [6,7,29]). Although n6/n3 and IA values (11.03 and 2.41, respectively) were higher in 12.5% APD than CD (8.94 and 2.39, respectively), TI was higher in CD (3.14) than APD (3.08) [7]. When 25% APD was included, IA and TI were similar to CD (Monllor et al., 2021). When 40% APD and BD were included in the goat diet for a short period, similar values of MUFA/SFA and PUFA/SFA were found in 40% APD and CD (mean values 0.40 and 0.07, respectively), followed by BD with lower values (0.37 and 0.05, respectively) [52]. The tendency observed in previous studies related to n6/n3 values when <40% APD was not in agreement with our study in which 40% APD was included. N6/n3 values were higher in CD (14.66) than BD (13.35), followed by APD (11.93) [7]. In the present study, slight reductions of MUFA/SFA, Hypocholesterolemic/Hypercholesterolemic ratio (HH), Σ CLA/Vaccenic acid, atherogenicity index (IA), and health promoting index (HPI) of RM were observed when 40% APD and 40% BD were added on the diet. Reductions of n6/n3, and LA/ALA were highly relevant. Although all observed values are within values previously reported in the scientific literature, it can be also said that when 40% BD and APD are included in the diet a slight increase of hypercholesterolemic index (HFA) of raw milk was observed. Thrombogenicity index (IT) was slightly increased as well, when 40% BD was included in the diet, while when 40% APD was added, no effect was observed. It is important to highlight the increase of oleic/estearic, DI14 and DI18 in both raw and fermented milk when 40% APD was included.

Table 9 shows that IA presented statistically higher values in FMs by MA400 than by YO-MIX™ 300. Σ CLA/Vaccenic acid was increased in raw milk when by-products were included in the diet, but this statistical changes disappear when milk was fermented. Previous studies detected a lower concentration of linoleic, vaccenic and rumenic acids in milks when broccoli by-product was used as feeding due to the lower proportion of linoleic and α -linolenic in broccoli stalks and leaves, precursors of aforementioned acids [8].

Taking the enrichment of formulation with by-products into account, although all observed values are in the common range for goat milk products, and better than those reported for cows' milk, it can be said that when 40% BD and APD, a slight increase of hypercholesterolemic index (HFA) of FMs by both YO-MIX™ 300 and MA400 cultures were observed due to the increase of total C12:00 + C14:00 + C16:00. Thrombogenicity index (IT) was significantly increased when 40% BD was included in the diet in FMs by both studied cultures, whereas when 40% APD was added, no effect was observed. An increment of IA was noted when feeding was fortified with 40% BD when FMs were obtained with YO-MIX™ 300 culture. Related to FMs by both cultures, MUFA/SFA, LA/ALA, and health-promoting index (HPI) decreased due to fermentation. In the case of PUFA/SFA the values were decreased when 40% BD was used, while no effect was detected when 40% APD was included during feeding. It is important to highlight the increase of oleic/estearic, DI14 and DI18 in fermented milk when 40% APD was incorporated into the diet. The mentioned health indexes (oleic/estearic, DI14 and DI18) were not affected when 40% BD was incorporated into the diet.

To summarize this section, it can be mentioned that the inclusion of broccoli and artichoke by-products slightly affected health/nutritional indexes, being values from arti-

choke diet similar to those of control diet or enhanced (increased oleic acid and desaturase indexes). All calculated indexes were within the ranges reported for goat's milk products and better than those of most cows' milk products. Depending on which kind of by-product was added during feeding, the effect was different. While the fortification of BD slightly increased IA and IT, the incorporation of APD did not modify the mentioned ones, and enhanced Σ CLA/Vaccenic acid and other desaturase indexes.

3.5. Volatile Profile of Fermented Milks

Main volatile compounds in fermented milks were analyzed in samples from PE (before introducing silages in the diet) and LL (after four months in different diets), results are presented in Table 10 as prevalence of each volatile compound (% of area). Fifty-one compounds were identified in milks fermented by the mesophilic culture MA400 being 11 aldehydes, 8 hydrocarbons, 8 terpenes, 7 ketones, 6 esters, 5 alcohols, 5 acids and 1 sulfur compound. Forty-five compounds were identified in milks fermented by the thermophilic culture YO-MIXTM300: 10 aldehydes, 7 hydrocarbons, 6 terpenes (some of them in the limit below 0.2 prevalence), 7 ketones, 6 esters, 4 alcohols, 4 acids and 1 sulfur compound. The prevalence of the chemical families is similar to the previously reported in other fermented goat milk products [19]. Most of the compounds were isolated in both type of fermented milks, although with different prevalence. Major compounds in milk cultured with both cultures were hexanal, 2-heptanone, heptanal, hexanoic acid, octanal, 2-ethylhexanol, benzyl alcohol, 2-nonanone, nonanal and nonanedienol.

Five of the identified compounds are considered key compounds in the flavor of fermented milks: acetoin, hexanal, 2-heptanone, 2-nonanone and nonanal [53]. Regarding the compounds mainly responsible for the goaty flavor, hexanoic acid was the most prevalent and showed a tendency to increase at late lactation and also in fermented milk from broccoli BD and artichoke plant silages APD fed groups. Hexanoic acid is also recognized as a major source of flavor in fermented milks [54]. Octanoic and decenoic acids had a lower prevalence and were not affected by lactation stage.

The prevalence of volatile compounds in fermented milks by mesophilic culture was modified due to lactation stage for the following compounds: hexanal, heptanal, dodecane and tridecane decreased at late lactation, whereas butanoic acid, 2-heptanone, 2-nonanone increased. Regarding the diet, it significantly modified the prevalence of several compounds. Butanoic acid, hexanoic acid, octanal and octanoic acid were more prevalent in those FMs from diets including silages (BD and ADP), whereas heptanal, benzyl alcohol, nonanal and methyl salicylate contents were lower than in CD. The inclusion of broccoli significantly ($p < 0.05$) increased 2-heptanone prevalence in fermented milk. In the case of the thermophilic culture, the lactation stage affected acetoin, hexanal, heptanal, octanal, nonadial and decanal that decreased, whereas 2-heptanone, hexanoic acid, ethyl-hexenol, benzyl alcohol, 2-nonanone, octanoic acid and decanal increased at late lactation. The diet caused significant differences on hexanal, nonanal and decanal that increased due to the inclusion of silages (BD and APD) and 2-heptanone and octanoic acid that decreased as compared to CD at late lactation. The inclusion of broccoli silage yielded milk with reduced prevalence of heptanal and cubebene. The inclusion of artichoke plant silage caused a decreased prevalence of 2-nonanone. Overall, aldehydes decreased at late lactation in both fermented milks regardless the diet. Aldehyde content in fermented milks is mainly dependent on the enzymatic activity of the substrate as they are produced from the degradation of milkfat or from the catabolism of aminoacids, and they are degraded by oxidation to carboxylic acids or by reduction to alcohols [55]. In milk cultured with MA400 the prevalence of acids increased when silages were included in the diet, so expecting those products as having higher goaty flavor, whereas in milk fermented with yogurt culture aldehydes prevalence increased when silages were included, so expecting green and fresh flavors. When handling the samples, authors perceived them all as having mild odor and no evident odor differences were detected among groups, in the future, sensory analysis would be of interest to evaluate flavor perception in detail.

Table 10. Prevalence of the most abundant volatiles (proportion of each individual peak area over total peak area, %) in fermented goat milk by different cultures.

	Volatile Organic Compound	Rt	Chemical Family	FMs by MA400 ¹				FMs by YO-MIX TM 300						
				Anova	PE	LL CD	LL BD	LL APD	Anova	PE	LL CD	LL BD	LL APD	
V1	Acetoin/2-Butanone, 3-hydroxy-	3.568	Ketone	**	1.7 a	0.0 b	0.1 b	0.0 b	0.0 b	**	1.7 a	0.0 b	0.0 b	0.0 b
V2	Butanoic acid/Butyric acid	4.049	Acid	**	0.5 c	1.7 b	3.6 a	4.6 a	1.5	NS	1.3	1.0	1.5	0.7
V3	Hexanal/Caproaldehyde	4.629	Aldehyde	**	6.3 a	1.3 c	5.7 a	4.8 b	10.2 b	***	20.7 a	4.3 c	10.2 b	10.2 b
V4	2-Heptanone/Methyl pentyl ketone	7.203	Ketone	**	0.2 b	1.0 b	3.9 a	0.8 b	2.6 b	**	0.2 c	4.6 a	2.6 b	1.2 bc
V5	Heptanal	7.697	Aldehyde	**	7.7 a	6.2 a	3.7 c	5.5 b	6.6 c	***	17.0 a	10.5 b	6.6 c	9.0 bc
V6	Dimethyl sulfone/DMSO2	8.203	Sulfur	NS	0.9	0.3	0.7	0.6	0.0 b	*	1.4 a	0.9 ab	0.0 b	0.0 b
V7	Benzaldehyde	10.333	Aldehyde	NS	0.4	0.4	0.3	0.2	0.0	NS	0.4	0.4	0.0	0.0
V8	Hexanoic acid/Caproic acid	11.179	Acid	***	3.8 b	2.8 b	19.4 a	18.0 a	9.0 b	**	2.2 c	8.4 b	9.0 b	11.2 a
V9	Octanal/Caprylaldehyde/Caprylic aldehyde	12.537	Aldehyde	**	2.9 a	1.0 b	3.4 a	3.1 a	6.3 b	**	9.6 a	3.3 c	6.3 b	4.0 c
V10	1-methyl-4-(1-methylethyl)-/p-Menthane, 1.4-epoxy	13.179	Hydrocarbon	NS	0.3	1.0	0.4	0.0	nd	NS	nd	nd	nd	nd
V11	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-/b-Cymene	13.702	Terpene	NS	0.5	0.3	0.5	0.6	nd	NS	nd	nd	nd	nd
V12	1-Hex nol-2-ethyl/2-Ethyl-1-hex nol	13.996	Alcohol	NS	6.2	6.1	6.2	4.4	10.6 a	**	4.5 b	9.2 a	10.6 a	7.4 ab
V13	Benzyl alcohol/a-Hydroxytoluene/Benzoyl alcohol	14.152	Alcohol	**	11.0 a	11.4 a	4.2 b	3.8 b	4.9	NS	2.6	4.8	4.9	5.1
V14	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	16.407	Ketone	NS	0.3	0.2	0.5	1.0	0.7	NS	0.5	0.6	0.7	1.0
V15	Octane, 1-ethoxy-/Ethyl octyl ether	16.725	Hydrocarbon	**	2.6 ab	4.2 a	1.4 b	1.7 b	nd	NS	nd	nd	nd	nd
V16	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-/Terpinolene	17.403	Terpene	NS	0.2	0.4	0.0	0.0	nd	NS	nd	nd	nd	nd
V17	2-Nonanone/Methyl heptyl ketone	17.767	Ketone	**	1.8 b	4.4 ab	6.2 a	4.2 ab	9.1 a	**	1.8 c	9.3 a	9.1 a	5.7 b
V18	Linalool/1.6-Octadien-3-ol, 3.7-dimethyl-/Nonanal	18.34	Terpene	NS	0.2	0.2	0.0	0.0	0.1	NS	0.0	0.1	0.1	0.0
V19	Octanoic acid, methyl ester/Caprylic acid methyl ester/Methyl caprylate	18.662	Aldehyde	*	13.8 a	14.7 a	11.5 b	11.1 b	17.7 a	*	12.7 b	12.5 b	17.7 a	16.9 a
V20	3-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-/1-Terpinenol	19.927	Terpene	NS	0.8	0.4	0.2	0.1	0.0	NS	0.2	0.1	0.1	0.2
V21	trans,cis-2,6-Nonadien-1-ol	20.685	Alcohol	NS	0.2	0.9	0.0	0.0	0.0	NS	0.0	0.1	0.0	0.0
V22	Benzoic acid/Benzenecarboxylic acid	22.243	Acid	**	7.2 ab	6.5 b	2.8 c	9.0 a	4.0 b	**	10.4 a	5.1 b	4.0 b	5.0 b
V23	Octanoic acid/Caprylic acid	22.093	Acid	**	1.6 b	0.0 c	0.3 c	3.3 a	nd	NS	nd	nd	nd	nd
V24		23.044	Acid	**	3.3 b	1.5 b	7.8 a	7.3 a	3.3 ab	*	0.9 c	5.6 a	3.3 ab	2.0 b

Table 10. Cont.

	Volatile Organic Compound	Rt	Chemical Family	FMs by MA400 ¹					FMs by YO-MIX™ 300					
				Anova	PE	LL CD	LL BD	LL APD	Anova	PE	LL CD	LL BD	LL APD	
V25	Butanedioic acid, diethyl ester/Succinic acid, diethyl ester	23.6	Ester	NS	0.2	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1
V26	Methyl salicylate/Benzoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester/Salicylic acid, methyl ester	24.172	Ester	*	2.0 a	1.8 a	0.2 b	0.2 b	0.2 b	0.4	0.3	0.3	0.5	0.5
V27	Octanoic acid, ethyl ester/Caprylic acid ethyl ester/Ethyl caprylate	24.795	Ester	NS	0.3	0.9	0.2	0.1	0.1	NS	0.3	0.0	0.3	0.3
V28	Dodecane	25.13	Hydrocarbon	**	4.5 a	2.4 b	0.6 c	0.8 c	0.8 c	NS	0.5	0.9	0.8	0.8
V29	Decanal/Capric aldehyde/Caprinic aldehyde	25.367	Aldehyde	NS	2.1	3.1	1.6	1.5	1.5	*	0.9 b	1.9 ab	2.5 a	2.5 a
V30	Cyclohexanol, 4-(1,1-dimethylethyl)-/4-t-Butylcyclohexanol	25.993	Alcohol	NS	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	NS	nd	nd	nd	nd
V31	Citronellol/6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, Benzaldehyde.	26.262	Terpene	*	0.2 b	1.6 a	0.2 b	0.3 b	0.3 b	NS	0.1	0.0	0.0	0.0
V32	4-(1-methylethyl)-/p-Cumic aldehyde/p-Isopropylbenzaldehyde	27.489	Aldehyde	NS	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	NS	nd	nd	nd	nd
V33	2-Decenal, (E)-	29.042	Aldehyde	NS	0.4	0.2	0.5	0.4	0.4	NS	1.2	0.2	0.7	0.6
V34	2-Propenal, 3-phenyl-/Cinnamaldehyde	29.454	Aldehyde	NS	2.3	4.5	3.5	2.5	2.5	NS	2.5	4.1	1.5	3.4
V35	Bornyl acetate/Bicyclo [2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, endo-	30.41	Terpene	NS	0.1	0.5	0.2	0.1	0.1	NS	0.1	0.2	nd	0.2
V36	2-Undecanone/Methyl nonyl ketone	31.122	Ketone	NS	0.5	0.9	0.5	0.6	0.6	NS	0.5	0.7	1.0	0.8
V47	Tridecane	31.812	Hydrocarbon	*	4.7 a	2.6 ab	1.0 b	1.2 b	1.2 b	NS	0.7	0.9	1.0	1.0
V38	1-Octanol.	32.881	Alcohol	NS	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	NS	0.1	0.2	0.1	0.4
V39	2-butyl-/5-(Hydroxymethyl)undecane	33.824	Hydrocarbon	NS	0.7	0.4	0.2	0.5	0.5	NS	0.4	0.2	0.1	0.2
V40	n-Decanoic acid/Capric acid/Caprinic acid	35.948	Acid	NS	0.7	0.2	0.7	0.7	0.7	*	0.0 b	1.1 a	0.0 b	0.0 b
V41	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester	36.069	Ester	NS	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	NS	0.1	0.1	0.1	0.0
V42	.alpha.-Cubebene	36.34	Terpene	*	1.7 b	4.9 a	2.5 ab	1.9 b	1.9 b	*	1.5 b	2.4 a	0.8 c	2.9 a
V43	Tetradecane	38.309	Hydrocarbon	NS	1.3	1.5	0.5	0.7	0.7	NS	0.4	0.8	0.6	0.8
V44	Dodecanal/Lauraldehyde	38.696	Aldehyde	NS	0.3	0.7	0.5	0.5	0.5	NS	0.2	0.6	0.7	0.8
V45	Caryophyllene	39.011	Terpene	NS	0.5	1.2	1.0	0.5	0.5	*	0.6 ab	0.8 ab	0.3 b	1.3 a

Table 10. Cont.

Volatile Organic Compound	Rt	Chemical Family	FMs by MA400 ¹					FMs by YO-MIX™ 300										
			Anova	PE	LL CD	LL BD	LL APD	Anova	PE	LL CD	LL BD	LL APD						
V46	2 H-Pyran-2-one.																	
	tetrahydro-6-pentyl-/δ-Amylvalerolactone	Ketone	NS	0.5	0.6	0.5	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.0					
V47	2-Tridecanone/Methyl undecyl ketone	Ketone	NS	0.2	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2	0.5	0.3	0.3	0.4					
V48	Pentadecane	Hydrocarbon	NS	0.7	1.1	0.3	0.3	0.1	0.1	0.9	0.4	0.3	0.3					
V49	Diethyl Phthalate/1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	Ester	NS	0.2	1.5	0.5	0.8	**	0.5 b	0.9 b	0.7 b	2.0 a						
V50	Tetradecanal/Myristaldehyde	Aldehyde	NS	0.1	0.2	0.3	0.2	NS	0.1	0.3	0.3	0.2						
V51	Heptadecane	Hydrocarbon	NS	0.3	0.5	0.4	0.2	NS	0.2	0.6	0.8	0.8						

¹ MA400 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Streptococcus thermophilus*; YO-MIX™ 300 *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; nd not detected; DMS dimethyl sulphide; PE: Pre-experimental; LL: Late lactation; CD: Control diet; BD: Broccoli by-products diet; APD: Artichoke plant by-products diet. Least square means within a row or row having different letters differ significantly. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. The lowercase letters refer to the differences between the average of PE and the fermented milk from CD, BD and APD at late lactation (LL CD, LL BD and LL APD, respectively).

For an easy visualization of the relationships among volatile compounds, a PCA was run, including only significantly different chemical families of volatile compounds. Figure 3 shows the two principal components which explained 71.71% of the samples variation. Milks fermented by YO-MIX™300 were closely located and positively correlated with aldehydes prevalence, whereas in milk fermented by MA400 the inclusion of silages positively correlate with the prevalence of acids and were clearly separated from CD and PE fermented milks.

Although diets are expected to greatly affect the aroma of milk, the fact that so little significant differences in volatiles could be linked to the different diets may be related to the previously reported observation that flavor complexity is highest when animals are fed a mixed ration including concentrates [56] as all diets included concentrates, besides, lactic acid culture is considered the main factor affecting the volatile profile of fermented milks [54].

From all the identified families of compounds terpenes have been proposed as indicators of the diet mainly when animals were grazing different pastures and their content may be five times higher when in pasture as compared to in-door feeding [57]. In fact, they have been proposed as indicators of mountain pasture milk [58], some others reported that even in semi-pasture combined with in-door feeding terpenes do not allow the differentiation with in-door feeding [59]. Regarding goat milk, it has been pointed out that terpenes may not be a good indicator of the diet [60]. In the present study the feeding system was in-doors and included silages. Fan et al. (2020) reported that terpenoid from artichoke were well preserved in silages preserved for 60 days, and main changes in their profile occurred during the first days of silage and were highly dependent on the microbiota in the silage [61]. In the present study silages had been stored for much longer times and no presence of the terpenoids reported in artichoke [61] were found in fermented milks. Terpenes may suffer further transformations, they may be directly transferred from the diet (on inhaled) to milk or may be further modified in the rumen (biohydrogenated and isomerized) [62]. Even during milk fermentation terpenes may undergo further modifications [57].

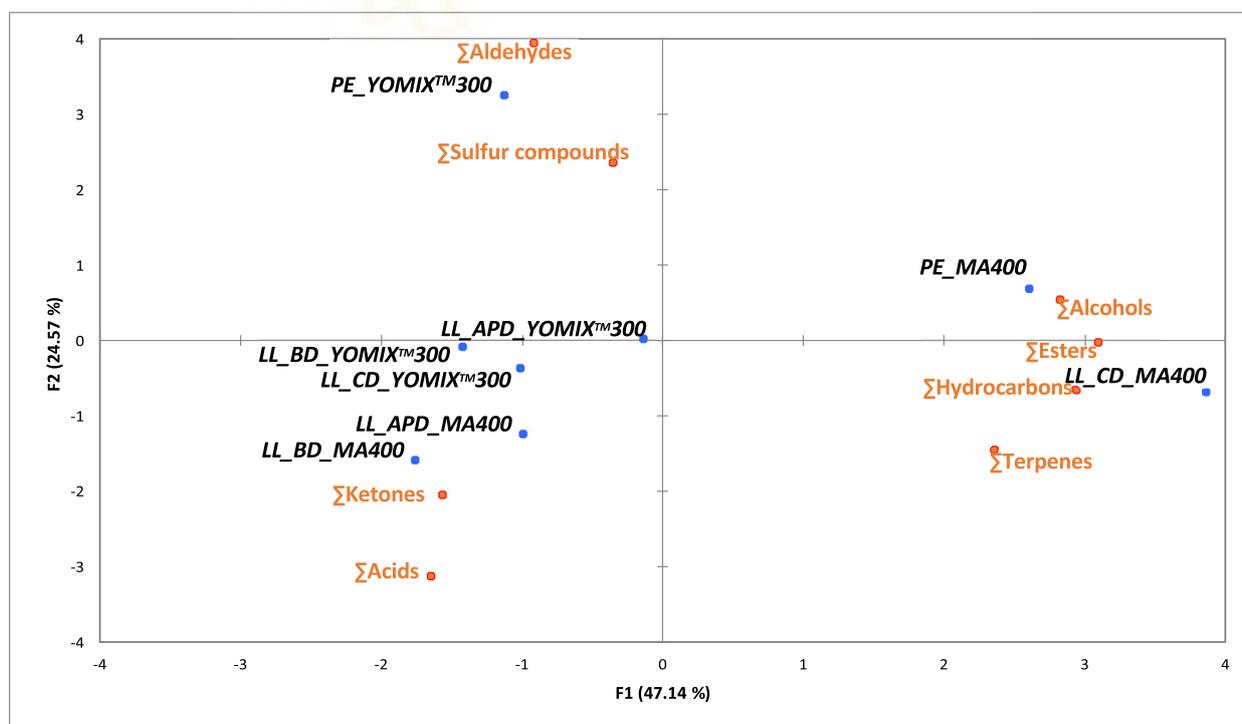


Figure 3. PCA scores plot showing the relationship among different chemical families of volatile compounds in fermented milks at pre-experimental stage (PE) and late lactation stage (LL_CD: conventional fed; LL_BD: broccoli fed; and, LL_APD: artichoke plant fed) by MA400 and YO-MIX™ 300.

4. Conclusions

Long term inclusion of 40% silage from broccoli and artichoke plant by-products in balanced diets of dairy goats yields milk suitable for yogurt and cheese fermentation. Broccoli inclusion enhances fat and solids content in milk and consequently in fermented milks, artichoke plant inclusion does not pose differences as compared to milk from conventional diets. Gel stability, lactic acid bacteria counts, fermentation performance (acidity and organic acids and sugars profile) are not affected by diets. The inclusion of broccoli silage enhances antioxidant properties of milk. Fermentation enhances antioxidant properties of fermented milks from all diets, especially when mesophilic cheese starter cultures are used. Artichoke plant silage inclusion does not modify antioxidant properties as compared to conventional diets. Health quality index of milk from conventional and silage fed dairy goats are within usual values reported for goat milk products, whereas artichoke plant inclusion improves health indexes due to enhanced unsaturated fatty acids profile. Volatile aldehydes in fermented milks decrease with the advance of lactation. The inclusion of both silages enhances hexanoic acid and aldehyde contents in yogurt cultured milk and enhances butanoic, hexanoic and octanoic acids as well as octanal in milk fermented by the mesophilic culture. Volatile terpenes do not allow to differentiate among the studied diets. Differences on the prevalence of volatiles point to moderate to low differences on the flavor of fermented milks, however further studies are needed including sensory analysis to provide a deeper inside on the effect of those diets on milk flavor. The inclusion of silages from broccoli and artichoke plant by-products in the diet of dairy goats represents a truly implementation of a sustainable farming practice in line with the present trends towards circular economy strategies. Further studies are needed to evaluate the incorporation of other byproducts in the long term on the diet of dairy ruminants and further check milk suitability for industrialization to contribute to the sustainability of farming.

Author Contributions: Conceptualization, E.S., G.R. and J.R.D.; methodology, R.M., P.M., G.R., J.F.-L., M.V.-M.; validation, E.S. and J.R.D.; formal analysis, E.S.; investigation, R.M. and E.S.; resources, G.R.; data curation, R.M. and M.C.-L.; writing—original draft preparation, R.M. and M.C.-L.; writing—review and editing, E.S.; supervision, J.R.D.; project administration, G.R.; funding acquisition, G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Spanish Ministry of Economy, Industry and Competiveness and the European Regional Development Fund, grand number AGL2015-64518-R (MINECO/FEDER/UE). P.M. was funded by an FPU grant (Reference number: FPU14/06058) from the Spanish Ministry of Education. The equipment used for volatile analysis was purchased with Grant EQC2018-004170-P funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by ERDF A way of making Europe.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethical Committee of experimentation of Miguel Hernández University (protocol code UMH.DTA.GRM.01.15).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. MAPA Producción de Alimentos En España. Available online: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/mercados_agricolas_ganaderos.aspx (accessed on 17 July 2022).
2. Borsini, A.A.; Llavata, B.; Umaña, M.; Cárcel, J.A. Artichoke by Products as a Source of Antioxidant and Fiber: How It Can Be Affected by Drying Temperature. *Foods* **2021**, *10*, 459. [[CrossRef](#)]
3. Domínguez-Perles, R.; Martínez-Ballesta, M.C.; Carvajal, M.; García-Viguera, C.; Moreno, D.A. Broccoli-Derived By-Products-A Promising Source of Bioactive Ingredients. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, C383–C392. [[CrossRef](#)]
4. Meneses, M.; Megías, M.D.; Madrid, J.; Martínez-Teruel, A.; Hernández, F.; Oliva, J. Evaluation of the phytosanitary, fermentative and nutritive characteristics of the silage made from crude artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product feeding for ruminants. *Small Rumin. Res.* **2007**, *70*, 292–296. [[CrossRef](#)]

Foods 2022, 11, 2601

5. Monllor, P.; Sandoval-Castro, C.A.; Ayala-Burgos, A.J.; Roca, A.; Romero, G.; Díaz, J.R. Preference study of four alternative silage fodders from the Mediterranean region in Murciano-Granadina goats. *Small Rumin. Res.* **2020**, *192*, 106204. [[CrossRef](#)]
6. Muelas, R.; Monllor, P.; Romero, G.; Sayas-Barberá, E.; Navarro, C.; Díaz, J.R.; Sendra, E. Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By-Products Silages in the Diet of Dairy Goats. *Foods* **2017**, *6*, 112. [[CrossRef](#)]
7. Monllor, P.; Romero, G.; Sendra, E.; Atzori, A.S.; Díaz, J.R. Short-Term Effect of the Inclusion of Silage Artichoke By-Products in Diets of Dairy Goats on Milk Quality. *Animals* **2020**, *10*, 339. [[CrossRef](#)]
8. Monllor, P.; Muelas, R.; Roca, A.; Atzori, A.S.; Díaz, J.R.; Sendra, E.; Romero, G. Long-Term Feeding of Dairy Goats with Broccoli By-Product and Artichoke Plant Silages: Milk Yield, Quality and Composition. *Animals* **2020**, *10*, 1670. [[CrossRef](#)]
9. Monllor, P.; Romero, G.; Muelas, R.; Sandoval-Castro, C.A.; Sendra, E.; Díaz, J.R. Ensiling Process in Commercial Bales of Horticultural By-Products from Artichoke and Broccoli. *Animals* **2020**, *10*, 831. [[CrossRef](#)]
10. MAPA Informe Anual Del Consumo Alimentario 2021. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx> (accessed on 17 July 2022).
11. Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 88–113. [[CrossRef](#)]
12. Slac̃anac, V.; Božanić, R.; Hardi, J.; Szabó, J.R.; Luc̃an, M.; Krstanović, V. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int. J. Dairy Technol.* **2010**, *63*, 171–189. [[CrossRef](#)]
13. Liu, W.; Yu, J.; Sun, Z.; Song, Y.; Wang, X.; Wang, H.; Wuren, T.; Zha, M.; Menghe, B.; Heping, Z. Relationships between functional genes in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* isolates and phenotypic characteristics associated with fermentation time and flavor production in yogurt elucidated using multilocus sequence typing. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 89–103. [[CrossRef](#)]
14. Cheng, H. Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 938–950. [[CrossRef](#)]
15. Chen, C.; Zhao, S.; Hao, G.; Yu, H.; Tian, H.; Zhao, G. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, S316–S330. [[CrossRef](#)]
16. Chen, J.; Liu, H. Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5695. [[CrossRef](#)]
17. McSweeney, P.L.H.; Sousa, M.J.F. Biochemical Pathways for the Production of Flavour Compounds in Cheeses during Ripening: A Review. *Lait* **2000**, *80*, 293–324.
18. Bintsis, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 665–684. [[CrossRef](#)]
19. Huang, Z.; Huang, L.; Xing, G.; Xu, X.; Tu, C.; Dong, M. Effect of Co-Fermentation with Lactic Acid Bacteria and *K. marxianus* on Physicochemical and Sensory Properties of Goat Milk. *Foods* **2020**, *9*, 299. [[CrossRef](#)]
20. Chan, C.-L.; Gan, R.-Y.; Shah, N.P.; Corke, H. Enhancing antioxidant capacity of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with pomegranate peel extracts. *Food Biosci.* **2018**, *26*, 185–192. [[CrossRef](#)]
21. El-Shafei, S.M.S.; Sakr, S.S.; Abou-Soliman, N.H.I. The impact of supplementing goats' milk with quinoa extract on some properties of yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* **2019**, *73*, 126–133. [[CrossRef](#)]
22. Jiménez-Redondo, N.; Vargas, A.; Teruel-Andreu, C.; Lipan, L.; Muelas, R.; Hernández-García, F.; Sendra, E.; Cano-Lamadrid, M. Evaluation of cinnamon (*Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum verum*) enriched yoghurt during refrigerated storage. *LWT* **2022**, *159*, 113240. [[CrossRef](#)]
23. Trigueros, L.; Sendra, E. Fatty Acid and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content in Fermented Milks as Assessed by Direct Methylation. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *60*, 315–319. [[CrossRef](#)]
24. Arioli, S.; Scala, G.D.; Remagni, M.C.; Stuknyte, M.; Colombo, S.; Guglielmetti, S.; De Noni, I.; Ragg, E.M.; Mora, D. *Streptococcus thermophilus* Urease Activity Boosts *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus* Homolactic Fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.* **2017**, *247*, 55–64.
25. Dimitrellou, D.; Salamoura, C.; Kontogianni, A.; Katsipi, D.; Kandyli, P.; Zakyntinos, G.; Varzakas, T. Effect of Milk Type on the Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Probiotic Fermented Milk. *Microorganisms* **2019**, *7*, 274. [[CrossRef](#)]
26. Markakiou, S.; Gaspar, P.; Johansen, E.; Zeidan, A.A.; Neves, A.R. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *61*, 142–152. [[CrossRef](#)]
27. Yu, P.; Li, N.; Geng, M.; Liu, Z.; Liu, X.; Zhang, H.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. Short communication: Lactose utilization of *Streptococcus thermophilus* and correlations with β -galactosidase and urease. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 166–171. [[CrossRef](#)]
28. Grattepanche, F.; Lacroix, C.; Audet, P.; Lapointe, G. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 414–421. [[CrossRef](#)]
29. Monllor, P.; Muelas, R.; Roca, A.; Bueso-Ródenas, J.; Atzori, A.S.; Sendra, E.; Romero, G.; Díaz, J.R. Effect of the Short-Term Incorporation of Different Proportions of Ensiled Artichoke By-Product on Milk Parameters and Health Status of Dairy Goats. *Agronomy* **2021**, *11*, 1649. [[CrossRef](#)]
30. Morgan, F.; Massouras, T.; Barbosa, M.; Roseiro, L.; Ravasco, F.; Kandarakis, I.; Bonnin, V.; Fistakoris, M.; Anifantakis, E.; Jaubert, G.; et al. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Rumin. Res.* **2003**, *47*, 39–49. [[CrossRef](#)]
31. Trigueros, L.; Sayas-Barberá, E.; Pérez-Álvarez, J.A.; Sendra, E. Use of date (*Phoenix dactylifera* L.) blanching water for reconstituting milk powder: Yogurt manufacture. *Food Bioprod. Process.* **2012**, *90*, 506–514. [[CrossRef](#)]

Foods 2022, 11, 2601

32. Mortera, P.; Zuljan, F.A.; Magni, C.; Bortolato, S.A.; Alarcón, S.H. Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. *Talanta* **2018**, *178*, 15–23. [[CrossRef](#)]
33. Kim, D.-O.; Chun, O.K.; Kim, Y.J.; Moon, H.-Y.; Lee, C.Y. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6509–6515. [[CrossRef](#)]
34. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
35. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
36. Romeu-Nadal, M.; Castellote, A.I.; López-Sabater, M.C. Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 235–239. [[CrossRef](#)]
37. Nudda, A.; McGuire, M.A.; Battacone, G.; Pulina, G. Seasonal Variation in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid in Milk Fat of Sheep and its Transfer to Cheese and Ricotta. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 1311–1319. [[CrossRef](#)]
38. Andreu-Coll, L.; Cano-Lamadrid, M.; Sendra, E.; Carbonell-Barrachina, A.; Legua, P.; Hernández, F. Fatty acid profile of fruits (pulp and peel) and cladodes (young and old) of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] from six Spanish cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *84*, 103294. [[CrossRef](#)]
39. Tunick, M.H.; Iandola, S.K.; Van Hekken, D.L. Comparison of SPME Methods for Determining Volatile Compounds in Milk, Cheese, and Whey Powder. *Foods* **2013**, *2*, 534–543. [[CrossRef](#)]
40. *Codex Stan 243-2003*; CODEX Standard for Fermented Milks. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
41. Martín-Diana, A.B.; Janer, C.O.; Peláez, C.; Requena, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 827–833. [[CrossRef](#)]
42. Wang, T.; Xu, Z.; Lu, S.; Xin, M.; Kong, J. Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int. Dairy J.* **2016**, *61*, 22–28. [[CrossRef](#)]
43. Poudel, R.; Thunell, R.K.; Oberg, C.J.; Overbeck, S.; Lefevre, M.; Oberg, T.S.; McMahon, D.J. Comparison of growth and survival of single strains of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* during Cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 2069–2081. [[CrossRef](#)]
44. Sano, A.; Takatera, M.; Kawai, M.; Ichinose, R.; Yamasaki-Yashiki, S.; Katakura, Y. Suppression of lactate production by aerobic fed-batch cultures of *Lactococcus lactis*. *J. Biosci. Bioeng.* **2020**, *130*, 402–408. [[CrossRef](#)]
45. Varga, L.; Süle, J.; Nagy, P. Short communication: Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 2039–2044.
46. Muelas, R.; de Olives, A.M.; Romero, G.; Díaz, J.R.; Sayas-Barberá, M.E.; Sendra, E. Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters. *LWT* **2018**, *98*, 506–514. [[CrossRef](#)]
47. Domagała, J. Instrumental Texture, Syneresis and Microstructure of Yoghurts Prepared from Goat, Cow and Sheep Milk. *Int. J. Food Prop.* **2009**, *12*, 605–615. [[CrossRef](#)]
48. Medeiros, F.H.V.; Bettioli, W.; Souza, R.M.; Alves, E.; Pinto, Z.V.; Iost, R. Microorganisms, application timing and fractions as players of the milk-mediated powdery mildew management. *Crop Prot.* **2012**, *40*, 8–15. [[CrossRef](#)]
49. Prosser, C.G. Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula. *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 257–265. [[CrossRef](#)]
50. Cano-Lamadrid, M.; Trigueros, L.; Wojdyło, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Sendra, E. Anthocyanins Decay in Pomegranate Enriched Fermented Milks as a Function of Bacterial Strain and Processing Conditions. *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *80*, 193–199. [[CrossRef](#)]
51. Ahmed, A.S.; El-Bassiony, T.; Elmalt, L.M.; Ibrahim, H.R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Res. Int.* **2015**, *74*, 80–88. [[CrossRef](#)]
52. Monllor, P.; Romero, G.; Atzori, A.S.; Sandoval-Castro, C.A.; Ayala-Burgos, A.J.; Roca, A.; Sendra, E.; Díaz, J.R. Composition, Mineral and Fatty Acid Profiles of Milk from Goats Fed with Different Proportions of Broccoli and Artichoke Plant By-Products. *Foods* **2020**, *9*, 700. [[CrossRef](#)]
53. Dan, T.; Ren, W.; Liu, Y.; Tian, J.; Chen, H.; Li, T.; Liu, W. Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2183. [[CrossRef](#)]
54. Dan, T.; Wang, D.; Jin, R.L.; Zhang, H.P.; Zhou, T.T.; Sun, T.S. Characterization of Volatile Compounds in Fermented Milk Using Solid-Phase Microextraction Methods Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 2488–2500. [[CrossRef](#)]
55. Papaioannou, G.; Kosma, I.; Badeka, A.V.; Kontominas, M.G. Profile of Volatile Compounds in Dessert Yogurts Prepared from Cow and Goat Milk, Using Different Starter Cultures and Probiotics. *Foods* **2021**, *10*, 3153. [[CrossRef](#)]
56. Clarke, H.J.; Fitzpatrick, E.; Hennessy, D.; O'Sullivan, M.G.; Kerry, J.P.; Kilcawley, K.N. The Influence of Pasture and Non-pasture-Based Feeding Systems on the Aroma of Raw Bovine Milk. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 841454. [[CrossRef](#)]
57. Borge, G.I.A.; Sandberg, E.; Øyaas, J.; Abrahamsen, R.K. Variation of terpenes in milk and cultured cream from Norwegian alpine rangeland-fed and in-door fed cows. *Food Chem.* **2016**, *199*, 195–202. [[CrossRef](#)]
58. Cifuni, G.F.; Claps, S.; Signorelli, F.; Di Francia, A.; Di Napoli, M.A. Fatty acid and terpenoid profile: A signature of mountain milk. *Int. Dairy J.* **2021**, *127*, 105301. [[CrossRef](#)]

Foods **2022**, *11*, 2601

59. Valdivielso, I.; de Renobales, M.; Aldai, N.; Barron, L.J.R. Changes in terpenoid composition of milk and cheese from commercial sheep flocks associated with seasonal feeding regimens throughout lactation. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 96–105. [[CrossRef](#)]
60. Morand-Fehr, P.; Fedele, V.; Decandia, M.; Le Frileux, Y. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 20–34. [[CrossRef](#)]
61. Fan, Z.; Chen, K.; Ban, L.; Mao, Y.; Hou, C.; Li, J. Silage Fermentation: A Potential Biological Approach for the Long-Term Preservation and Recycling of Polyphenols and Terpenes in Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) By-Products. *Molecules* **2020**, *25*, 3302. [[CrossRef](#)]
62. Koczura, M.; Martin, B.; Musci, M.; Di Massimo, M.; Bouchon, M.; Turille, G.; Kreuzer, M.; Berard, J.; Coppa, M. Little Difference in Milk Fatty Acid and Terpene Composition Among Three Contrasting Dairy Breeds When Grazing a Biodiverse Mountain Pasture. *Front. Veter-Sci.* **2021**, *7*, 612504. [[CrossRef](#)]





5

Resultados y discusión

5. Resultados y discusión

5.1. ARTÍCULO 1: Inclusión de ensilados de planta de alcachofa y subproducto de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas. Efecto en las propiedades tecnológicas de la leche (“Milk Technological Properties as Affected by Including Artichoke By-Products Silages in the Diet of Dairy Goats”).

Este trabajo de investigación estudió el efecto de la inclusión de ensilados de planta de alcachofa (PA) y subproducto de alcachofa (SA) en la dieta de cabras lecheras Murciano-Granadinas sobre la composición, color, propiedades tecnológicas (estabilidad, propiedades de coagulación y fermentación) y sensoriales de la leche. Se realizaron dos experimentos en los que se probaron dos niveles de inclusión de los ensilados objeto de estudio en las dietas de los animales. Para el Experimento 1 se ensayaron tres dietas durante nueve semanas: dieta control (CD) sin adición de ensilados; dieta con incorporación de 12,5 % de ensilado de subproducto de alcachofa (SA12); y dieta con incorporación de un 12,5 % de ensilado de planta de alcachofa (PA12). Tras evaluar los resultados del primer experimento se aumentó el contenido de ensilados en la dieta (25 %) que se mantuvo durante nueve semanas. Entre ambos experimentos se dejó un período de adaptación de cuatro semanas. Así, en el Experimento 2 se utilizaron tres dietas: una dieta control (CD); una dieta que incorporaba 25 % de subproducto de alcachofa (SA25); y una dieta que incorporaba un 25 % de PA25. Durante los experimentos se muestreó leche cada 15 días

Dado que los experimentos se realizaron de forma consecutiva, los muestreos seguían el avance del estado de lactación. Para evitar que el estado de lactación interfiera con el efecto de la dieta, se siguieron dos estrategias: (1) siempre hubo un grupo de dieta de control, y; (2) se utilizó un diseño estadístico adecuado. El estado de lactación dentro de cada experimento no afectó a la composición y propiedades de la leche, por lo que los resultados son presentados y analizados por separado para cada experimento, considerando solo el efecto de la dieta.

5.1.1. Composición química de la leche

La incorporación de un 12,5 % de ensilados en la dieta, independientemente de si se trataba de SA o PA, no modificó la composición de la leche. La inclusión de un 25 % de ensilados ocasionó diferencias (menos de 0,1 unidades) con menor contenido de proteína bruta, caseínas y cenizas en la leche cuando se utilizó la dieta SA25. Diversos autores ponen de manifiesto que, el aumento del contenido de fibra en el alimento mejora la síntesis de grasa (Chilliard et al., 2003) y, en el presente estudio, la fibra bruta en PA25 fue ligeramente inferior con respecto a las otras dietas. Si bien no se encontraron diferencias significativas para el contenido de grasa, el contenido medio de grasa en la leche procedente de PA25 presentó el valor más bajo en todo el estudio. Estos resultados pusieron en evidencia que era necesario evaluar inclusiones más altas de subproductos, en especial del ensilado de planta de alcachofa, dado que los subproductos procedentes de la alcachofa parecían reducir el contenido en proteína, y estudiar los efectos en

el contenido de grasa en la leche. Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que la inclusión de hasta un 25 % de ensilados de subproductos de alcachofa y planta de alcachofa en las dietas de cabras lecheras no afecta de forma relevante la composición de la leche y aunque modifica ligeramente la proteína bruta, la caseína y las cenizas, sin embargo, estos cambios pueden considerarse irrelevantes debido a las reducidas diferencias y ausencia de impacto en las propiedades tecnológicas de la leche y en el precio pagado al ganadero por litro de leche.

5.1.2. Características tecnológicas de la leche

Una de las características tecnológicas estudiadas fue la estabilidad de la leche debido a la presencia de etanol. La estabilidad de la leche al etanol generalmente se define como la concentración más alta de etanol acuoso agregado que no provoca la coagulación de la leche (Raynal-Lujtovac et al., 2007) y está relacionado con la estabilidad de las proteínas de la leche para el tratamiento térmico. En este estudio no se observaron diferencias significativas en la estabilidad al alcohol (sin signos de coagulación) con una concentración de etanol del 45 % observada en todos los muestreos y entre los distintos tipos de leche, demostrando así una buena estabilidad de la leche con independencia de la dieta ensayada.

Este valor del 45 % es adecuado dado que autores como Raynal-Lujtovac et al. (2007) ponen de manifiesto que la leche de cabra tiende a desestabilizarse a una concentración de etanol superior al 45 %, mientras que la leche de vaca resiste hasta el 70 % de etanol, y explican que esa diferencia se debe a la diferente estructura micelar de la leche de cabra y de vaca, así como al calcio iónico más alto en la leche de cabra en comparación con la leche de vaca.

Con respecto a la capacidad de acidificación, no se observaron diferencias significativas debidas a la dieta, por lo que la inclusión de hasta un 25 % de ensilados de SA y PA no afectó a la capacidad de acidificación de la leche, ni tuvo efecto sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas en la leche. Se puede suponer que la ecología microbiana de la leche no se vió afectada por las dietas evaluadas dado que este ensayo se realizó en leche cruda.

En cuanto a la estabilidad de los geles ácidos y enzimáticos, no se observaron diferencias en el suero liberado ni en la composición del suero entre los diferentes ensilados incluidos en las dietas de las cabras. Si se comparan los experimentos 1 y 2, durante el Experimento 2 hubo una tendencia que mostró que el suero liberado tenía un mayor contenido de grasa y proteína, lo que es consistente porque la leche a medida que avanza la lactación tiene menos estabilidad (Jõudu et al., 2008), aunque no hubo diferencias entre dietas. El suero liberado de los geles de leche de cabra en el presente estudio fue menor que el observado por Morgan et al. (2003), lo cual puede estar relacionado con las diferencias en el contenido de grasa y proteína en la leche entre aquel y este estudio, siendo el más alto en el presente estudio, lo que lleva a una menor liberación de suero. Los resultados obtenidos con la coagulación enzimática son coherentes con los obtenidos para la composición de la leche ya que las propiedades de coagulación del cuajo

dependen principalmente de la composición de proteínas, grasas y minerales, que fueron similares para todas las dietas (Morgan et al., 2003; Jõudu et al., 2008; Ketto et al., 2017). Otros factores pueden afectar a la capacidad de coagulación enzimática; sin embargo, se debe tener en cuenta que otros efectos como el pH, la temperatura y la manipulación de las muestras se mantuvieron constantes en el presente estudio.

5.1.3. Color en la leche

La inclusión de ensilados de subproductos de alcachofa y planta de alcachofa hasta un 12,5 % en la dieta de cabras lecheras no afectó al color de la leche, sin embargo, se observaron diferencias para los parámetros de color con la inclusión del 25 %. En el Experimento 2 (25 % de inclusión) L^* aumentó, mientras que b^* y C^* disminuyeron. Estas diferencias fueron pequeñas y podrían deberse a los pigmentos liberados del ensilado o las pequeñas diferencias encontradas en la composición de la leche, como la reducción de la proteína bruta y caseína en ese experimento. Estas diferencias de color pueden ser irrelevantes pues no eran perceptibles visualmente.

El color de la leche depende de factores como el estado de dispersión de la grasa de la leche y la concentración de pigmentos naturales de la leche como carotenoides, proteínas y riboflavina (Solah et al., 2007; Barłowska et al., 2011). El parámetro L^* depende de la dispersión de la micela de caseína y de los glóbulos de grasa que afectan a la difusión de la luz incidente: valores más altos de luminosidad se deben a una mayor difusión (Nozière et al., 2006). En este estudio, el contenido de proteína y caseína ligeramente más bajo en SA25 y PA25 podría estar afectando la difusión de la luz, aumentando la L^* .

Las coordenadas a^* (coordenadas rojo/verde) y b^* (coordenadas amarillo/azul) dependen de la concentración de pigmento natural de la leche de cabra. Los principales pigmentos de la leche son la riboflavina (compuesto verde), el β -caroteno (coloración amarilla) y la luteína, en menor medida (Nozière et al., 2006). La leche de cabra y oveja presenta un color blanco, porque todo el contenido de β -caroteno se convierte en retinol (Barłowska et al., 2011) y carecen de ese pigmento. La coordenada amarilla (b^*) y la saturación de color (C^*) disminuyeron en SA25 y PA25 y fueron más altos en la CD, estas diferencias entre dietas podrían deberse a pequeñas diferencias en los pigmentos naturales. Estas diferencias pequeñas de color observadas pueden considerarse que no tienen un valor práctico porque tales diferencias son imperceptibles para el ojo humano y, por lo tanto, irrelevantes desde el punto de vista organoléptico.

5.1.4. Análisis sensorial de la leche y leche fermentada

El análisis sensorial de la leche por expertos no reveló la presencia de sabores extraños en ningún tipo de leche, y los panelistas no pudieron identificar características sensoriales de la leche únicas o relacionadas con ninguna de las dietas evaluadas. El estudio de consumidores se realizó con leches fermentadas azucaradas del último muestreo del Experimento 2, pues se esperaba obtener las máximas diferencias posibles debidas a la dieta (máxima concentración de

ensilado y tiempo de mantenimiento de la dieta). Los consumidores realizaron pruebas triangulares; se trata de pruebas discriminativas destinadas a comprobar si los consumidores eran capaces de detectar diferencias entre las leches fermentadas azucaradas elaboradas con leche de CD, SA25 y PA25. Como resultado, solo el 35 % del total de las pruebas realizadas por los consumidores fueron juicios correctos y, por lo tanto, no se alcanzó el mínimo de aciertos necesarios para establecer diferencias significativas en un nivel de probabilidad del 95–99 % (45–49) (Stone et al., 1993). En detalle: se obtuvo un 34 % de juicios correctos cuando se compararon yogures CD vs. SA25; 30 % cuando se compararon yogures CD vs. PA25, y 39 % de juicios correctos cuando se compararon yogures SA25 vs. PA25. Tales resultados apuntan a una selección aleatoria de la muestra diferente; los consumidores también comentaron lo difícil que resultaba discriminar entre muestras. En una tendencia similar, estudios de otros autores que incluyeron hasta un 20 % de ensilado de banana en la dieta de cabras observaron quesos sin defectos de sabor que mantienen atributos sensoriales similares a los de los quesos control (Rincón et al., 2017). La inclusión de aceite del fruto de *Mauritia flexuosa* en la dieta de las cabras hasta un 4,5 % de materia seca no modificó las propiedades sensoriales de la leche (Morais et al., 2017), ni tampoco la inclusión de cinco variedades de cactáceas (Catunda et al., 2016). Por tanto, se puede concluir que la leche obtenida de cabras alimentadas con hasta un 25 % de ensilados de subproductos de alcachofa y planta de alcachofa no desarrollará sabores desagradables y produjo leches fermentadas de propiedades sensoriales similares al control que los consumidores no pudieron discriminar.

5.2. ARTÍCULO 2: Evaluación de bacterias ácido-lácticas para la fermentación de leche de cabra: Parámetros de calidad (“Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameter”).

En este estudio se evaluaron nueve bacterias ácido lácticas (BAL) como cultivos puros para la fermentación de leche de cabra con el objetivo de evaluar su idoneidad como cultivos adjuntos. La actividad de los cultivos se evaluó con base en parámetros tecnológicos y de calidad del producto y su comparación con un cultivo mixto comercial de referencia (MA400-Danisco: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus*). Los nueve cultivos iniciadores utilizados fueron: *L. casei* CECT 475; *L. curvatus* CECT 5786; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005; *L. helveticus* CECT 541; *L. paracasei* subs. *paracasei* CECT 277; *L. plantarum* CECT 5785; *L. reuteri* CECT 925; *L. sakei* subs. *carnosus* CECT 5964; *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4042. Se determinó el perfil de compuestos volátiles, descriptores de olor, tasa de acidificación, recuento microbiano, estabilidad del gel, perfiles de ácidos orgánicos y azúcares y perfil de ácidos grasos. El presente estudio proporciona información útil para la selección de cultivos para productos lácteos de cabra.

5.2.1. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en las leches fermentadas

La tasa de acidificación fue diferente según la cepa. El cultivo mixto comercial alcanzó el pH final dentro de las 7 h como indicaba la nota técnica, pero el resto de cepas tardaron entre 12 y

27 h en alcanzar un pH cercano a 4,8. *L. reuteri* y *L. plantarum* mostraron las menores tasas de acidificación en leche de cabra (27 h), seguidas de *L. casei*, *L. paracasei* y *L. curvatus* que necesitaron 24 h. Se esperaba que la leche fermentada por cultivos puros tuviera largos tiempos de fermentación, pues una misma cepa muestra tasas de acidificación más bajas que cuando forma parte de cultivos mixtos (Pinto et al., 2009). Los tiempos de fermentación y el pH final de las cepas ensayadas fueron similares a los encontrados previamente en leche de vaca (Cano et al., 2017). Los recuentos microbianos más altos en las leches fermentadas se observaron en aquellas elaboradas con el cultivo iniciador *L. paracasei*, seguido de *L. lactis*, MA400 y *L. curvatus*. Los recuentos microbianos en todas las leches fermentadas fueron superiores a 10^7 ufc/g excepto en *L. bulgaricus*, que son significativamente inferiores a los demás ($p < 0,001$). En cuanto a la apariencia visual del gel, las leches fermentadas con *L. curvatus* flocularon y se evidenció formación de gas. En menor medida sucedió lo mismo con *L. plantarum* y ambos casos se relacionan por el carácter heterofermentativo de los cultivos. Las leches fermentadas con *L. sakei*, *L. bulgaricus* y *L. casei* mostraron signos evidentes de sinéresis pero no de formación de gas ni floculación. Los geles obtenidos con MA400, *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. reuteri* y *L. lactis* tenían apariencia de yogur firme sin signos evidentes de sinéresis. El porcentaje de sinéresis medida por centrifugación en las leches fermentadas mostró pocas diferencias significativas ($p < 0,05$), solo entre las elaboradas a partir de *L. helveticus* (retención de agua más alta) y *L. sakei* (retención de agua más baja) que además dió lugar al gel menos estable. Con respecto a la composición del suero liberado por centrifugación a partir de leches fermentadas, no se observaron diferencias significativas en el contenido en grasa, lactosa y materia seca en función del cultivo microbiano, mientras que el contenido en proteína bruta fue ligeramente inferior con el uso del cultivo mixto de referencia MA400. Esto implica que la estabilidad del gel es también mayor en el caso del cultivo mixto que por otro lado es un cultivo común para elaboración de queso, en cuyo caso la escasa pérdida de proteínas con el suero es altamente deseable.

5.2.2. Contenido de ácidos orgánicos y azúcares en las leches fermentadas.

Los ácidos orgánicos y azúcares en las leches fermentadas contribuyen al sabor de las mismas: los azúcares aportan dulzura y los ácidos acidez (desde una acidez leve hasta un sabor picante a vinagre, según el equilibrio entre los ácidos láctico y acético). La lactosa disminuyó desde 4,9 % en leche hasta valores entre 1,9 y 3,09 % en las leches fermentadas. La lactosa residual más baja se observó para las leches fermentadas elaboradas con el cultivo iniciador *L. bulgaricus* (1,9 %) y *L. helveticus* (2,08 %). El resto de las leches fermentadas presentaron valores de lactosa alrededor de 2,5 % a excepción de las elaboradas con *L. paracasei* y *L. casei* donde el porcentaje de lactosa fue de un 3 %. Con respecto a la glucosa, se detectaron trazas en la leche fermentada por el cultivo mixto MA400 y otros cuatro cultivos, mientras que se observaron valores de 0,21 a 0,35 % para *L. helveticus*, *L. curvatus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum* y *L. reuteri* presentando estos microorganismos una menor actividad metabólica. En cuanto al contenido de galactosa, la mayor concentración se encontró en las leches fermentadas elaboradas con *L. bulgaricus*, pues esta especie de lactobacilo no es capaz de metabolizar la galactosa. *L. helveticus*

y *L. plantarum* también presentaron cantidades relevantes de galactosa residual, aunque son capaces de catabolizar galactosa. *Lc. lactis* también acumuló galactosa ya que no todas las cepas de este lactococo son capaces de metabolizarla (Hickey et al., 1986) y su metabolismo del azúcar depende en gran medida de la disponibilidad de oxígeno.

Las leches fermentadas elaboradas con *L. casei*, *L. reuteri* y *L. plantarum* presentaron una menor concentración de ácido láctico (0,49 % vs. 0,44 % vs. 0,42 %). *L. casei* es una bacteria homofermentativa, por lo que el ácido láctico es el principal metabolito de la lactosa. *L. reuteri* es una bacteria heterofermentativa que produce carbono dióxido, etanol, acetato y ácido láctico a partir de glucosa, por lo que en comparación con las BAL homofermentativas, la producción esperada de ácido láctico es menor, como lo confirman los presentes resultados. *L. plantarum* es una bacteria heterofermentativa facultativa, capaz de utilizar una variedad de fuentes de carbono y metabolizar proteínas. El contenido de ácido acético en las leches fermentadas estuvo presente principalmente en trazas o cantidades muy bajas (< 0,02 %), mientras que la concentración de etanol estuvo presente sólo en las elaboradas con los cultivos iniciadores: *L. paracasei*, *L. reuteri*, *Lc. lactis* y MA400 en cantidades similares (0,55 %) y en *L. plantarum*, en menor cantidad (0,28 %). En general, el perfil de azúcar es muy específico de la especie y la tasa de acidificación y el metabolismo del azúcar proporciona información sobre el comportamiento futuro de la cepa. Al formular cultivos mixtos, es conveniente evitar la presencia de cepas acumuladoras de galactosa o combinarlas con cepas fermentadoras de galactosa (Hickey et al., 1986).

5.2.3. Perfil de ácidos grasos en las leches fermentadas

El perfil de ácidos grasos totales en las leches fermentadas no se vió afectado por la fermentación por cepas puras ni por el cultivo mixto comercial. En comparación con los valores de la leche, tampoco se observó una modificación de índices relacionados con la salud: contenido en CLA, como los índices aterogenicidad y trombogenicidad. Por otro lado, los IA observados son alrededor de 2 a 3 puntos inferiores a los encontrados en la leche bovina por Batista et al. (2017) y Nantapo et al. (2014), principalmente relacionados con el alto porcentaje de ácidos grasos insaturados en la leche de cabra. Sin embargo, el IT es muy superior al informado por Batista et al. (2017), dado el mayor contenido en ácido mirístico (C14:0) en la leche de cabra, que es un 7,5 %, mayor en comparación con la leche de vaca. De forma general, las cepas ensayadas no provocaron cambios en los índices relacionados con la salud calculados (IA, IT, ID, palmitoleico/palmítico y oleico/esteárico) de la grasa de la leche de cabra.

5.2.4. Perfil de compuestos volátiles

Hay pocos datos disponibles sobre los compuestos volátiles de los productos lácteos frescos debido a la baja concentración de volátiles, y son más escasos aún los datos sobre leches fermentadas de cabra (Cais-Sokolińska et al., 2015). Además, no hay datos disponibles en la literatura científica sobre el perfil volátil desarrollado por los presentes cultivos en la leche de

cabra. Con respecto a los principales compuestos volátiles detectados en la leche cruda de cabra fueron 2-propanona, acetato de etilo, 2-heptanona y ácido octanoico. Otros compuestos detectados, pero en cantidades mucho menores, fueron ácido hexanoico, 2-nonanona, nonanal, 2-pentanona, 2-butanona, y los niveles más bajos de volátiles fueron para sulfuro de dimetilo, ácido valérico y octanoato de etilo. Con el fin de facilitar la visión de los datos obtenidos en el perfil de volátiles en las leches fermentadas se presenta en la Tabla 3 la concentración (nL/L) de los compuestos volátiles aislados e identificados por los diferentes cultivos. Así como los principales descriptores sensoriales observados en el análisis sensorial en función del cultivo puro utilizado, siendo el primer descriptor el más fuerte.

Son muchos los compuestos volátiles que forman el aroma general de las leches fermentadas, soliendo ser los grupos principales alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, hidrocarburos y ácidos orgánicos. Las cetonas contribuyen a la percepción de sabores dulces, mantecosos y cremosos en los productos lácteos fermentados, mientras que los ácidos aportan notas ácidas (acéticas y lácticas) o a cabra y a queso (butanoico, hexanoico y octanoico) y los alcoholes aportan principalmente notas alcohólicas y florales-frutales. Generalmente, los compuestos volátiles en leches fermentadas proceden principalmente de la leche y los subproductos de la glucólisis (Imhof et al., 1994). La mayoría de los compuestos detectados fueron comunes a todas las leches fermentadas analizadas, sin embargo, las cantidades relativas difirieron según el cultivo utilizado.

El aroma de las leches fermentadas es un factor crítico para la percepción de la calidad y la aceptabilidad del consumidor, por lo que no solo el perfil volátil sino también las percepciones sensoriales son esenciales para describir el comportamiento de los cultivos iniciadores. Las leches fermentadas evaluadas tenían una intensidad de olor leve-moderada. Estas intensidades suaves están de acuerdo con las bajas concentraciones de volátiles detectadas. Los descriptores proporcionados por el panel sensorial concuerdan con los compuestos detectados en las muestras de leche, aunque no siempre los compuestos principales son los únicos responsables del olor principal. Esto apunta a interacciones claras entre los compuestos volátiles para generar sensaciones únicas, como la sinergia reportada entre las metilcetonas y ácidos grasos volátiles (Siek et al., 1969). La mayoría de los cultivos individuales en este estudio arrojaron notas de que, en caso de alcanzar altos niveles, podrían desarrollar perfiles de olores no deseables. Debe tenerse en cuenta que esas mismas cepas bacterianas, cuando se utilizan en cultivos mixtos producen diferentes compuestos volátiles (Dan et al., 2017), como ejemplo *Lc. lactis* también está presente en el cultivo mixto MA400 y desarrolló un olor a "cocido" que no estaba presente en las leches fermentadas por MA400.

Según De Bok et al. (2011) es posible obtener huellas dactilares con el perfil de compuestos volátiles para cultivos iniciadores puros o mixtos dadas las diferencias en el metabolismo microbiano de cada especie y sus interacciones. Como ejemplo, los autores comentaron que el cultivo puro de *L. bulgaricus* en leche de vaca se caracteriza por niveles más altos de 2-

propanona y 2-heptanona y niveles más bajos de diacetilo en comparación con otros cultivos. También el etanol y la acetoína se encuentran entre los principales volátiles en la leche de vaca fermentada por *L. bulgaricus* (Imhof et al., 1994).

Los principales volátiles en las leches de vaca fermentadas con *L. casei* incluyen etanol, acetoína y ácido acético (Imhof et al., 1994), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, la cepa utilizada en el presente estudio en leche de cabra desarrolló alto contenido en ácidos propiónico, isovalérico, hexanoico, butírico, isobutírico y octanoico. El ácido propiónico se desarrolló únicamente en leches fermentadas por *L. casei*. El perfil volátil observado se ajusta a los descriptores utilizados por el panel sensorial de expertos con notas a vinagre y queso.

En estudios futuros, cuando se apliquen estas cepas a productos de leche de cabra fermentada, debería ser fundamental realizar estudios de consumidores para ajustar las condiciones óptimas de cultivo tal y como indica Dantas et al., 2016 y los atributos más valorados para los consumidores sobre los productos lácteos (Janiaski et al., 2016). La leche fermentada por *L. casei* mostró un patrón volátil único, y los ácidos representaron el grupo principal, seguidos por las cetonas y los alcoholes totales. Para los demás cultivos, las cetonas prevalecieron, encontrándose un equilibrio entre ácidos y cetonas para *L. sakei*. Las leches fermentadas por *L. curvatus* siguieron el mismo patrón que las de MA400: cetonas, seguidas de cantidades iguales de ácidos, alcoholes e hidrocarburos, y reducidos contenidos de aldehídos, si bien, el contenido total en volátiles fue mucho menor. Sus notas de olor incluían pútrido y animal. *L. helveticus* mostró un patrón similar, pero con una proporción reducida de alcoholes, aumento de hidrocarburos, y desarrolló notas ácidas y a queso.

Lc. lactis produce etanol, diacetilo, acetoína, acetaldehído y propanona entre los principales volátiles (Imhof et al., 1994) en leches fermentadas de vaca. En este estudio, se observó que la acetoína y el diacetilo fueron los compuestos mayoritarios en las leches fermentadas con *Lc. lactis*, y la combinación de volátiles fue responsable de proporcionar un olor dulce, cocido y láctico. Según estudios *L. paracasei* aumenta la formación de diacetilo en yogur de leche de vaca (Aunsbjerg et al., 2015). En el presente estudio, el principal volátil detectado fue el ácido acético y el diacetilo también se encontraba entre los principales volátiles, y mostraron olores ácidos y animales. La acetoína fue el principal volátil en leches fermentadas por *L. sakei*, mostrando el mayor contenido, no sólo de acetoína, sino de volátiles totales, y aportando notas de olor dulce, ácido y a sudor. Esto es consistente con el hecho previamente observado en leche de vaca de que *L. sakei* aumenta la acetoína en el queso (Pogačić et al., 2015).

Tabla 3. Perfil de compuestos volátiles y descriptores aromáticos en función de los distintos tipos de cultivos iniciadores estudiados en el artículo 3.

Cultivo puro	Descriptores sensoriales	Componentes orgánicos mayoritarios (nL/L)
<i>L. casei</i>	Vinagre, ácido láctico, queso azul, queso	Etanol (24,6), 2-propanona (40), diacetilo (37,7), ácido acético (149), acetoina (108), ácido isobutírico (22,3), ácido butanoico (26,8), 2-butanol (26,3), ácido isovalérico (368), ácido hexanoico (81,9), undecano-4,7-dimetil (25,7)
<i>L. curvatus</i>	Pútrido, cremoso, dulce, animal, ácido láctico	Etanol (56,7), 2-propanona (36), ácido acético (46,9), acetoina (68,1), octano (44,1)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ácido láctico, leche agria, queso	2-propanona (41,4), diacetilo (25,8), ácido acético (27,3), 2-butanona-3,3-dimetil (76,6), acetoina (158), octano (60,3), undecano-4,7-dimetil (22,8)
<i>L. helveticus</i>	Ácido láctico, leche agria, queso, vinagre	2-propanona (39,3), diacetilo (80,6), ácido acético (52,6), 2-butanona-3,3-dimetil (165), acetoina (184), octano (179), pentan-3-ol (30,8), 2-butanol (29,8), ácido isovalérico (20,9), 2-heptanona (27,4), ácido hexanoico (65,5), undecano-4,7-dimetil (30,7)
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Sulfuroso, ácido láctico, sucio, vinagre, tipo animal	Etanol (114), 2-propanona (46,5), diacetilo (72,6), ácido acético (141), acetoina (90,3)
<i>L. plantarum</i>	Sulfuroso, dulce, tipo animal, hierba	Etanol (96,8), 2-propanona (35,8), diacetilo (82,4), ácido acético (113), acetoina (608), octano (76,3), ácido isovalérico (22,9), 2-heptanona (22,9), ácido hexanoico (26,1)
<i>L. reuteri</i>	Sudor, rancio, crema, sucio	Etanol (31,1), 2-propanona (61,4), diacetilo (52,1), ácido acético (183), acetoina (339), octano (59,1), undecano-4,7-dimetil (23,4)
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Dulce, leche agria, sudor, ácido láctico	2-propanona (59,1), diacetilo (67,8), ácido acético (658), acetoina (684), octano (175), 2-heptanona (26,1), undecano-4,7-diacetil (36,8)
<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dulce, cocido, caldo, ácido láctico	Etanol (40,2), 2-propanona (68,8), diacetilo (57,2), ácido acético (69,4), acetoina (113), octano (46,8), 2-heptanona (20,2)
MA400	Mantequilla, dulce, ácido láctico, leche agria	Etanol (133), 2-propanona (72,1), ácido acético (117), acetoina (138), octano (99,9), 2-heptanona (25,6)

L. plantarum proporciona sabores ácidos únicos a la leche de vaca fermentada dependiendo del equilibrio entre ácido acético volátil y ácido láctico (Quatravaux et al., 2006), que depende de la disponibilidad de oxígeno. Las cepas de *L. plantarum* han sido previamente evaluadas como cultivos adjuntos en yogur en leche de vaca, y aunque la elección de la cepa específica afecta la calidad de las leches fermentadas, algunos compuestos son característicos de su presencia como la 2,3-pentanodiona, el acetaldehído y el acetato (Li et al., 2017; Wang et al., 2017). Sin embargo, en la cepa utilizada en el presente estudio, la acetoína fue el volátil predominante y representaba el 60 % del contenido total de volátiles de estas leches fermentadas.

La leche fermentada por *L. reuteri* tenía acetoína como principal compuesto volátil seguido de ácido acético y desarrolló notas rancias y a sudor. Se ha informado que esta especie se usa en la elaboración de queso para desarrollar propiedades de bioconservación (Gómez-Torres et al., 2016), y aunque observaron que el perfil de compuestos volátiles del queso sufrió cambios, sensorialmente mostró sólo ligeras modificaciones: notas de queso mejoradas y notas de leche y yogur reducidas.

Los resultados obtenidos en este estudio, como son el comportamiento de estas cepas en la fermentación, la estabilidad de los geles formados y sus propiedades aromatizantes nos proporcionan la base para su futura aplicación en productos lácteos fermentados con características sensoriales diferenciadas.

5.3. ARTÍCULO 3: Calidad y parámetros funcionales de leches fermentadas elaboradas con leche de cabra alimentadas con ensilado de subproducto de brócoli y planta de alcachofa (“Quality and Functional Parameters of Fermented Milk Obtained from Goat Milk Fed with Broccoli and Artichoke Plant By-Products”).

En este trabajo de investigación se estudió el efecto de la inclusión del 40 % de ensilado de subproducto de brócoli y planta de alcachofa en la dieta de cabras Murciano-Granadinas durante toda la lactación para establecer la idoneidad de la leche para la producción de leches fermentadas. Se utilizaron dos cultivos mixtos comerciales, uno termófilo de yogur (YO-MIX™ 300) y otro mesófilo (MA400), cultivo ampliamente utilizado para una gran variedad de quesos blandos a duros, para mantequilla, buttermilk y otros productos lácteos fermentados debido a su capacidad aromatizante. Se realizaron cuatro producciones de leches fermentadas. La primera elaboración en el período preexperimental-PE (todos los lotes de animales consumían dieta convencional, DC); la segunda elaboración se realizó al principio de la lactación-PL dónde los animales llevaban 8 semanas con la dieta diferenciada (DC-dieta convencional; SB40-40 % de ensilado subproducto de brócoli; PA40-40 % de ensilado planta de alcachofa). La tercera y cuarta elaboración se realizaron a mitad de la lactación (ML, 13 semanas en dieta diferenciada) y final de la lactación (FL, 18 semanas en dieta diferenciada). Además, se analizaron las leches fermentadas en dos tiempos de almacenamiento en refrigeración tras la fermentación [2 días (T2) y 30 días (T30)]. Los resultados de las variables estudiadas se detallan a continuación.

5.3.1. Viabilidad de los cultivos y pH en las leches fermentadas

La supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento de leches fermentadas es un factor esencial de calidad (CODEX, 2022). Dieta y estado de lactación de los animales y tiempo de almacenamiento de las leches fermentadas, tiempo de almacenamiento no afectaron significativamente al recuento de microorganismos viables en leches fermentadas por el cultivo iniciador YO-MIX™ 300. La suma del número de células viables de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fue $>10^7$ ufc/mL y la relación 2:1 (*S. thermophilus*: *L. bulgaricus*) se mantuvo durante el almacenamiento refrigerado, siendo el requisito establecido para yogur de leche fermentada por el CODEX ALIMENTARIUS (Martín-Diana et al., 2003; Wang et al., 2016; Dimitrellou et al., 2019; CODEX, 2022).

La simbiosis entre estos microorganismos ha sido ampliamente estudiada, es decir la protooperación. Markakiou et al. (2020) explicaron que la suma de la producción de ácido en un cultivo mixto es mayor que en un cultivo puro. *S. thermophilus* libera compuestos (ácido fórmico, ácido pirúvico, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena larga, entre otros) que estimulan el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que tiene mayor actividad proteolítica. Esto provoca una reducción del pH debido a la transformación de la lactosa en ácido láctico, y luego, la desnaturalización de las proteínas de la leche por acercamiento a su punto isoeléctrico y la liberación de aminoácidos que son esenciales para el crecimiento de *Streptococcus*.

Según Liu et al. (2016), el tiempo de fermentación disminuye cuando se utilizan cultivos mixtos simbióticos. Previamente, Dimitrellou et al. (2019) encontraron diferencias en el recuento bacteriano de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en leche de cabra fermentada, con aumento de la viabilidad de *S. thermophilus* incluso en condiciones de bajas temperaturas y después de 28 días de almacenamiento, mientras que la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* disminuyó. En nuestro estudio se detectó una reducción general de células viables con el avance del estado de lactación; los recuentos en leches fermentadas en las producciones PE y PL fueron más altos que en la producción FL.

En cuanto a las leches fermentadas elaboradas con el cultivo mixto comercial MA400, se observó una disminución general en el número de células viables debido al tiempo de almacenamiento (de T2 a T30) en refrigeración ($p < 0,05$) para las tres dietas estudiadas y en las cuatro producciones (PE; PL; ML y FL). Aunque se detectaron diferencias significativas no se consideraron relevantes por ser escasas en términos cuantitativos. No se encontraron en la literatura científica estudios científicos sobre leches fermentadas por cultivo MA400 ya que se utiliza especialmente para la elaboración de queso, y también mantequilla y buttermilk.

La disminución de la viabilidad durante el almacenamiento no se puede atribuir directamente a ninguno de los microorganismos que forman parte de este cultivo iniciador, pero podría estar relacionado con *L. lactis*. Esta bacteria se ha utilizado junto con otros

microorganismos en la elaboración de queso y se ha observado, tras seis días de almacenamiento a 6 °C si una reducción en el número de células viables de *L. lactis* (de $2,3 \times 10^9$ CFU/g a $1,7 \times 10^9$ CFU/g) (Poudel et al., 2022). Esta disminución se atribuyó al hecho de que mientras las BAL crecen, el lactato aumenta, lo que provoca una reducción del pH e inhibe el crecimiento de *L. lactis* (Sano et al., 2022).

Uno de los parámetros clave en la producción de leches fermentadas es la disminución del pH en la leche; como consecuencia directa de la actividad de los microorganismos inoculados. La acidificación rápida garantiza la seguridad alimentaria y el pH se utiliza como indicador del punto final de la fermentación. Las leches fermentadas obtenidas con YO-MIX™ 300 tuvieron valores de pH (4,6 y 4,18) más altos que las elaboradas con MA400 (4,36 y 4,02). La ligera reducción de pH con YO-MIX™ 300 y el aumento de la acidez podría explicarse por la mejora del crecimiento microbiano y la actividad peptidasa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que son unas características favorecidas en la leche de cabra (Martin-Diana et al., 2003; Varga et al., 2014). Además, la actividad ureasa de *S. thermophilus* podría estar correlacionada con el uso de lactosa y la liberación de ácido láctico (Arioli et al., 2017; Yu et al., 2020). El tipo de dieta y el estado de lactación no afectaron significativamente a los valores de pH. Sin embargo, se observó una ligera disminución durante el tiempo de almacenamiento (T2 y T30), habitual en el almacenamiento de leches fermentadas.

5.3.2. Composición química de la leche

Con respecto a la composición de la leche, el contenido en grasa aumentó un 10 % en todos los lotes de dietas en el muestreo PL con respecto al período Pre-Experimental. A partir de este momento el contenido de grasa en la leche aumentó a lo largo de la lactación alcanzando valores de 5,39 % en DC y 5,61 % en SB40. El aumento fue más leve en el grupo de animales alimentados con DC (4,73 % vs. 5,39 %) en comparación con aquellos con dieta SB40 (4,80 % vs. 5,61 %). Sin embargo, el contenido de grasa en PA40 se mantuvo constante durante todo el experimento con valores alrededor de un 5,05 %. La dieta SB40 produjo la leche con el mayor contenido de grasa durante todo el estudio.

El contenido de proteína aumentó al final de la lactación en todas las dietas, alcanzando contenidos de 3,62 %, 3,56 % y 3,42 % para DC, SB40 y PA40, respectivamente. El contenido de proteína siempre fue mayor en la leche de la dieta DC.

Estudios paralelos realizados con una inclusión de un 40 % de ensilados de subproductos de brócoli y planta de alcachofa durante toda la lactación, observaron resultados similares con un aumento del 0,5 % en términos absolutos de grasa en la leche de las dietas con ensilado de SB40 y un mayor contenido de proteína para la leche con una dieta convencional. También con una inclusión a corto plazo mostraron que un 40 % de ensilado de SB y un 40 % y un 12,5 % de ensilado de planta de alcachofa también aumentaban el porcentaje de grasa con respecto a la

dieta convencional. Sin embargo, el porcentaje de proteína apenas fue modificado por las dietas diferenciadas (Monllor et., 2020a; Monllor et al., 2020c; Monllor et al., 2021).

5.3.3. Composición química de las leches fermentadas

En las leches fermentadas elaboradas con el cultivo mixto comercial YO-MIX™ 300, el porcentaje de grasa aumentó con el avance del estado de lactación, siendo más pronunciado en las leches fermentadas de la dieta SB40 con un intervalo de 4,46–5,50 % entre PE y FL. También mostraron la misma tendencia la leche fermentada derivada de DC con un aumento de 0,52 unidades porcentuales y la elaborada a partir de PA40 con un aumento de 0,43 unidades porcentuales. En cuanto al porcentaje de proteína, se observó una tendencia similar, aumentando a lo largo de la lactación, siendo la producción de FL significativamente superior a la de PE en todos los lotes (0,38, 0,32 y 0,19 unidades porcentuales para DC, PA40 y SB40, respectivamente). El porcentaje de proteína en la producción FL fue superior para DC (3,75 %) seguido de PA40 (3,67 %) y SB40 (3,54 %).

En cuanto a la composición de la leche fermentada por MA400 se observó la misma tendencia, aumentando el contenido de grasa y proteína durante la lactación. Se observó un aumento del porcentaje de grasa de 0,24 unidades porcentuales en la dieta SB40 (5,63 %) en comparación con las dietas PA40 (5,41 %) y DC (5,39 %) entre PE y FL. Con respecto a la proteína en la producción FL la proteína fue superior para DC (3,55 %), seguida de SB40 y PA40 con valores similares (3,45 %). La composición química de las leches fermentadas no se vio afectada por el tiempo de almacenamiento en ambos cultivos iniciadores.

5.3.4. Contenido de azúcares y ácido láctico en las leches fermentadas.

Los azúcares (lactosa, glucosa y galactosa) y el ácido láctico en las leches fermentadas contribuyen al sabor característico de este tipo de productos. El contenido de lactosa en leche cruda osciló entre 4,75 y 4,29 %, y se redujo con la fermentación con YO-MIX™ 300 y MA400 a valores de hasta 1,78 y 1,70 %, y 1,72 y 1,56 % después de T2 y T30 durante el almacenamiento en refrigeración, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre T2 y T30 de almacenamiento en algunas elaboraciones ($p < 0,05$) pero sin una tendencia clara, pudiendo considerarse causadas por el metabolismo microbiano durante la refrigeración. El mayor contenido de lactosa se observó en las producciones PE y PL y el menor contenido en FL. En el estudio previo, el segundo artículo de investigación de esta tesis, también se observó un valor residual de la lactosa de 1,90 % en leche fermentada por *L. bulgaricus*, que es uno de los microorganismos que forman parte del cultivo iniciador YO-MIX™ 300 en el presente estudio. También concuerdan con la observación en este estudio que sólo se detectaron trazas de glucosa en PL en T2 con cultivo MA400, pero se observó que los valores de glucosa aumentaron (0,24 y 0,34% para T2 y T30 de refrigeración, respectivamente) en lactaciones posteriores (PL y ML) y T30 de almacenamiento.

Con respecto al contenido en galactosa, se alcanzaron valores más altos con YO-MIX™ 300 y con respecto a la evolución del contenido durante la lactación, en la producción PE se observaron los valores más altos que fueron posteriormente disminuyendo. Esto mismo se observó para las leches fermentadas con MA400. En cualquier caso, los niveles residuales de glucosa y galactosa estaban en un rango similar y no se vieron influenciados por los factores estudiados: tiempo de almacenamiento y dieta.

El contenido de ácido láctico no se vio afectado por el tiempo de almacenamiento, mientras que debido a la dieta si se detectaron ligeras diferencias ($p < 0,05$), en coherencia con los valores de pH observados, pero sin una tendencia causal clara. Las leches fermentadas con YO-MIX™ 300 tenían menos ácido láctico y un pH más alto que las de MA400. Valores similares fueron encontrados en el segundo artículo de esta tesis con un contenido de ácido láctico de 0,59 % en leche fermentada por MA400, similar al presente estudio en PE. Se puede observar que aumenta más de 0,70 puntos a partir de la semana 12 de lactación y se mantiene hasta el final del experimento con ligeras variaciones. También se observó que el contenido de ácido láctico fue mayor en la leche fermentada procedente de animales alimentados con subproducto de brócoli, que también fue la de mayor contenido de materia seca.

5.3.5. Sinéresis y composición del suero

La sinéresis es la separación de la fase líquida del gel y en este caso, para medirla se ha obtenido de forma forzada por centrifugación. Según Domagala et al. (2009), en leches fermentadas puede ocurrir espontáneamente en condiciones normales o cuando el gel se rompe mecánicamente por corte, agitación o congelación, lo que no es deseable porque puede influir negativamente en la aceptación por el consumidor. En estudios previos se han observado que cuando se incrementa el contenido proteico y en sólidos totales se observa un aumento en la capacidad de retención del suero, evitando la sinéresis espontánea y obteniéndose productos con mayor viscosidad aparente y firmeza (Domagala et al., 2009; Medeiros et al., 2012). En este estudio se observa que los valores de sinéresis son ligeramente superiores en las leches fermentadas con YO-MIX™ 300 respecto a los obtenidos con MA400. Valores similares se encontraron en el segundo artículo de esta tesis. Martín-Diana et al. (2003) explicaron que cuando se usa leche de cabra para elaborar leches fermentadas, se requiere fortificar la leche en proteínas para mejorar las características del coágulo porque la leche de cabra presenta ligeramente menor contenido de caseína (α 1-caseína) que la leche de vaca. Cuanto menor sea el contenido de α 1-caseína mayores serán las micelas de caseína y el número de poros hidratados que producen una estructura de gel menos densa (Brosser, 2021). Es importante mencionar que no se observaron diferencias significativas en la sinéresis entre los tiempos de almacenamiento. Sin embargo, Jiménez et al. (2022) encontraron un mayor porcentaje de sinéresis con el tiempo de almacenamiento en yogur de leche de vaca. Cabe señalar que la proteína en el suero eliminado por sinéresis fue alrededor del 0,30 % y disminuyó considerablemente al final de la lactación en todas las leches fermentadas, independientemente

de la dieta de los animales. Se observó que las leches fermentadas cultivadas con MA400 perdieron más grasa con el suero que las cultivadas con YO-MIX™ 300.

5.3.6. Capacidad antioxidante y contenido total en compuestos fenólicos.

La fermentación con los cultivos termófilos y mesófilos ocasionó un ligero incremento en el contenido total de compuestos fenólicos (TPC) en comparación a la leche sin fermentar. Es importante resaltar que al final de la lactación los valores más bajos de fenoles totales en leches fermentadas fueron los de la leche control, en dieta convencional, mientras que los valores más altos se obtuvieron cuando se incorporó un 40 % de ensilado de subproducto de brócoli. No se observaron diferencias entre los tiempos de almacenamiento (T2 y T30). Sin embargo, en estudios previos Cano et al. (2017) y Jiménez et al. (2022), observaron una degradación de los compuestos fenólicos (especialmente las antocianinas, no presentes en el presente estudio) durante la fermentación y el almacenamiento de leches fermentadas.

En cuanto a la actividad antioxidante, los valores de DPPH no mostraron diferencias significativas entre las dietas tanto en leche cruda como en leche fermentada, excepto cuando se utilizó el cultivo mesófilo. En cuanto al ensayo ABTS, hay un incremento significativo en leche cruda de la dieta con 40 % de ensilado de planta de alcachofa, pero no se observan diferencias significativas debido a las dietas en las leches fermentadas. Aunque se necesitaría más investigación, este cambio en la capacidad antioxidante de la leche cruda a la fermentada podría deberse a la formación de péptidos bioactivos, que brindan una gran capacidad antioxidante (principalmente ABTS) en la leche fermentada (Ahmed et al., 2015).

5.3.7. Índices nutricionales/salud de ácidos grasos en la leche cruda

En este apartado, para evitar resultados repetitivos, solamente sintetizamos los resultados de índices nutricionales/salud de ácidos grasos de leche cruda y leches fermentadas del final de la lactación (FL) y tras un período de almacenamiento de 30 días (no se detectaron diferencias entre 2 y 30 días de almacenamiento en refrigeración). De forma general, en la producción PE, no se observaron diferencias significativas entre lotes de animales, mientras que las diferencias debidas a las dietas fueron evidentes en PL, ML (valores no presentados), así como en los resultados presentados de FL.

Chen et al (2020) revisaron recientemente los índices de salud/nutrición en diferentes alimentos, incluidos los productos lácteos. Todos los valores encontrados en este estudio se encuentran dentro de los intervalos establecidos en las publicaciones de investigación para productos de leche de cabra. La relación PUFA/SFA es un índice general para el valor nutricional de las grasas y oscila entre 0,02 y 0,175 en productos lácteos de cabra. Los índices n6/n3 y LA/ALA son un índice de calidad, sobre todo en los alimentos para bebés, dada la relevancia de los ácidos grasos n3 (en leche de vaca se sitúa entre 2,46–3,44). Los índices de IA y IT en productos lácteos de leche de cabra oscilan entre 1,89 -2,91 y 2,70-3,20, respectivamente. Sobre el índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico (HH) no se han encontrado valores en

productos de leche de cabra, pero en otros productos lácteos van desde 0,32 a 1,29. El índice Health Promoting Index (HPI) es el inverso del IA y oscila entre 0,37 y 0,68 en los quesos de cabra. Los siguientes son índices de desaturasa que relacionan cada ácido graso insaturado con la forma saturada precursora Σ CLA/ácido vaccénico, ID14, ID16 y ácido oleico/esteárico y ID18 que están estrechamente relacionados. La fermentación de la leche por parte de ambos cultivos tuvo poca influencia en el perfil de ácidos grasos y los índices calculados. Solo n6/n3 y LA/ALA junto con el índice hipercolesterolémico (HFA) aumentaron en el proceso de la fermentación y todos los índices de desaturasa disminuyeron.

La incorporación de ensilados de subproductos de brócoli (SB40) y la planta de alcachofa (PA40) en la dieta modificaron el perfil de ácidos grasos de la leche cruda, y en consecuencia se modificaron los ratios/índices de ácidos grasos calculados, excepto ID16. En el presente estudio, se observaron ligeras reducciones de MUFA/SFA, relación HH, Σ CLA/ácido vaccénico, IA e índice HPI en leche con inclusiones de PA40 y SB40 en la dieta. Las reducciones de n6/n3 y LA/ALA fueron muy relevantes. Si bien todos los valores observados se encuentran dentro de valores previamente encontrados en la literatura científica, también se puede decir que al incluir en la dieta SB40 y PA40 se observó un leve aumento del índice hipercolesterolémico (HFA) de la leche cruda. El índice de trombogenicidad (IT) también aumentó ligeramente cuando se incluyó SB40 en la dieta, mientras que cuando se agregó PA40, no se observó ningún efecto. Es importante destacar el aumento de oleico/esteárico, ID14 y ID18 tanto en leche cruda como fermentada cuando se incluyó PA40. Estudios previos detectaron una menor concentración de ácidos linoleico, vaccénico y ruménico en leches cuando se utilizaba como alimento el subproducto de brócoli debido a la menor proporción de linoleico y α -linolénico en tallos y hojas de brócoli, precursores de los ácidos antes mencionados (Monllor et al., 2020c).

5.3.8. Índices nutricionales/salud de ácidos grasos en leches fermentadas

Con respecto a las leches fermentadas, el índice IA presentó valores estadísticamente más altos en MA400 que en YO-MIX™ 300. La relación Σ CLA/Ácido vaccénico se incrementó en la leche cruda cuando se incluyeron ensilados en la dieta, pero estas diferencias estadísticas desaparecieron en el proceso de fermentación de la leche. El índice hipercolesterolémico (HFA) aumentó ligeramente en leches fermentadas elaboradas con ambos cultivos iniciadores con la inclusión de SB40 y PA40 en la dieta, debido al aumento de C12:00 + C14:00 + C16:00 totales. El índice de trombogenicidad aumentó significativamente cuando se incluyó SB40 en la dieta en leches fermentadas por ambos cultivos, mientras que la dieta con PA40 no tuvo ningún efecto. También se observó un incremento de IA con SB40 en la alimentación en la leche fermentada por YO-MIX™ 300. En todas las leches fermentadas, las relaciones MUFA/SFA, LA/ALA y HPI disminuyeron durante el proceso de fermentación, sin embargo, la relación PUFA/SFA disminuyó en leche de dietas con SB40, mientras que no se detectó ningún efecto en dietas con PA40. Es importante destacar el aumento de oleico/esteárico, ID14 y ID18 en leche fermentada

cuando se incorporó a la dieta un PA40. Los índices de salud mencionados (oleico/esteárico, ID14 y ID18) no se vieron afectados cuando se incorporó SB40 a la dieta.

5.3.9. Perfil de compuestos volátiles en leches fermentadas

Los compuestos volátiles se analizaron en leches fermentadas de la producción PE (antes de introducir los ensilados en la dieta) y en la producción FL (tras cuatro meses con las dietas diferenciadas). Se identificaron 51 compuestos en leches fermentadas por el cultivo MA400 siendo 11 aldehídos, 8 hidrocarburos, 8 terpenos, 7 cetonas, 6 ésteres, 5 alcoholes, 5 ácidos y 1 compuesto azufrado. En leches fermentadas por el cultivo termófilo YO-MIX™300 se identificaron cuarenta y cinco compuestos: 10 aldehídos, 7 hidrocarburos, 6 terpenos (algunos de ellos en el límite inferior a 0,2 de prevalencia), 7 cetonas, 6 ésteres, 4 alcoholes, 4 ácidos y 1 compuesto azufrado. Compuestos similares fueron encontrados por Huang et al., (2020) en otros productos lácteos fermentados de leche de cabra. Los principales compuestos encontrados en las leches fermentadas, independientemente del cultivo usado, fueron: hexanal, 2-heptanona, heptanal, ácido hexanoico, octanal, 2-etilhexanol, alcohol bencílico, 2-nonanona, nonanal y nonanedienol. Los compuestos acetoína, hexanal, 2-heptanona, 2-nonanona y nonanal se consideran claves en el sabor de la leche fermentada (Dan et al., 2019). En cuanto a los compuestos principalmente responsables del sabor “a cabra”, el ácido hexanoico fue el más prevalente y mostró una tendencia a aumentar al final de la lactación y también en leches fermentadas procedentes de dietas con SB40 y PA40. El ácido hexanoico también se reconoce como una fuente importante de sabor en las leches fermentadas (Dan et al., 2017). Los ácidos octanoico y decenoico tuvieron una menor prevalencia y no se vieron afectados por el estado de lactación.

La prevalencia de compuestos volátiles en leches fermentadas con el cultivo MA400 se modificó debido al estado de lactación para los siguientes compuestos: hexanal, heptanal, dodecano y tridecano que disminuyeron al final de la misma, mientras que el ácido butanoico, 2-heptanona, 2-nonano aumentaron. En cuanto a la dieta, modificó significativamente la prevalencia de varios compuestos: el ácido butanoico, ácido hexanoico, octanal y ácido octanoico que fueron más prevalentes en leches fermentadas de leche de las dietas con ensilados SB40 y PA40, mientras que los contenidos de heptanal, alcohol bencílico, nonanal y salicilato de metilo fueron menores que en leche de DC. La inclusión de brócoli aumentó significativamente ($p < 0,05$) la prevalencia de 2-heptanona en la leche fermentada (esta sustancia proporciona un olor afrutado).

En el caso de leche fermentada con YO-MIX™ 300, el estado de lactación afectó a los compuestos: acetoína, hexanal, heptanal, octanal, nonadial y decenal que disminuyeron, mientras que aumentaron 2-heptanona, ácido hexanoico, etil-hexenol, alcohol bencílico, 2-nonanona, ácido octanoico y decanal. La dieta provocó diferencias significativas en hexanal, nonanal y decanal que aumentaron por la inclusión de ensilados SB40 y PA40, y 2-heptanona y ácido octanoico que disminuyeron con respecto a DC al final de la lactación. La inclusión de

ensilado de subproducto de brócoli produjo leche con menor prevalencia de heptanal y cubebeno. La inclusión de ensilado de planta de alcachofa provocó una disminución de la prevalencia de 2-nonanona, sustancia que puede impartir un olor herbáceo, afrutado o graso en función del sustrato y concentración.

En general, los aldehídos disminuyeron al final de la lactación en ambas leches fermentadas, independientemente de la dieta. El contenido de aldehídos en las leches fermentadas es dependiente, principalmente, de la actividad enzimática del sustrato ya que se producen a partir de la degradación de la grasa de la leche o del catabolismo de los aminoácidos, que se degradan bien por oxidación a ácidos carboxílicos o por reducción a alcoholes (Papaioannou et al., 2021).

En la leche fermentada por MA400 la prevalencia de ácidos aumentó cuando se incluyeron ensilados en la dieta, por lo que se esperaba que estos productos tuvieran un mayor sabor a cabra, mientras que en la leche fermentada por YO-MIX™ 300 la prevalencia de aldehídos aumentó cuando se incluyeron ensilados, por lo que se esperaban sabores verdes y frescos. Al manipular las muestras, los autores percibieron que todas tenían un olor suave y no se detectaron diferencias de olor evidentes entre los tratamientos, por lo que en un futuro sería de interés el análisis sensorial para evaluar la percepción del aroma en detalle.

Aunque se esperaba que las dietas afectaran en gran medida al aroma de la leche, el hecho de observar escasas diferencias significativas en los volátiles, puedan estar relacionado con la observación realizada por Clarke et al. (2022) de que la complejidad del sabor es mayor cuando los animales son alimentados con una ración mixta que incluye concentrados. Además, las vías metabólicas para la degradación del ácido láctico se consideran el principal factor que modifica el perfil volátil de las leches fermentadas (Dan et al., 2017).

De todas las familias de compuestos identificados, los terpenos se han propuesto como indicadores de la dieta, principalmente cuando los animales consumen pasto fresco, en cuyo caso el contenido en terpenos puede ser cinco veces mayor en comparación con la alimentación en un sistema intensivo (Borge et al., 2016), y de hecho, se han propuesto como indicadores de la leche de pastos de montaña (Cifuni et al., 2021). En cambio, otros autores observaron que en una alimentación con pasto combinada con concentrados, los terpenos no permitían diferenciarla de la alimentación basada en un sistema intensivo (Valdivielso et al., 2017).

Fan et al. (2020) encontraron que los terpenoides de la alcachofa estaban bien conservados en ensilados de 60 días, y los principales cambios en su perfil ocurrieron durante los primeros días de ensilado y fueron altamente dependientes de la microbiota que formaba parte del ensilado. En el presente estudio, los ensilados se almacenaron durante mucho más tiempo y no se encontró presencia de los terpenoides encontrados en la alcachofa por Fan et al. (2020) en el perfil de volátiles de las leches fermentadas. Los terpenos pueden sufrir más transformaciones, y así pueden transferirse directamente de la dieta (al inhalarse) a la leche o pueden modificarse aún más en el rumen (biohidrogenados e isomerizados) (Koczura et al., 2021). Incluso durante

la fermentación de la leche, los terpenos pueden sufrir más modificaciones (Borge et al., 2016), lo que puede haber motivado su escaso contenido en leche fermentada.





6

Conclusiones

6. Conclusiones

Los resultados de los tres artículos incluidos en esta tesis doctoral nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. En el estudio que se incluyó hasta un 25 % de ensilados de planta y subproducto de alcachofa en la ración de cabras Murciano-Granadinas no se observaron cambios significativos en la composición de la leche ni en su aptitud tecnológica a la fermentación y coagulación ácida y enzimática. Las leches fermentadas obtenidas a partir de leche de cabras alimentadas con estos ensilados a un 25 % de inclusión presentan características sensoriales indiferenciables de las observadas en la leche control.
2. La inclusión durante una lactación completa de un 40 % de ensilados de subproducto de brócoli y de planta de alcachofa en dietas equilibradas de caprino lechero permite la obtención de leche de característica adecuadas para la fermentación por cultivos de yogur y queso tomando como base:
 - a. Las dietas con ensilado de brócoli dan lugar a un mayor contenido de grasa y sólidos totales en la leche y en consecuencia en las leches fermentadas. La inclusión de ensilado de planta de alcachofa no induce diferencias de composición en comparación a la dieta convencional.
 - b. La estabilidad de los geles ácidos obtenidos, los recuentos de bacterias lácticas y el desarrollo de la fermentación (acidez, perfil de ácidos orgánicos y azúcares) no se modifican a causa de dietas con 40 % de ensilado de subproducto de brócoli y planta de alcachofa.
 - c. La leche obtenida de dietas con inclusión de brócoli mejora las propiedades antioxidantes de la leche. La propia fermentación mejora las propiedades antioxidantes en leche con independencia de la dieta ensayada, en especial cuando se fermenta con cultivo mesófilo MA400. La inclusión de planta de alcachofa no modifica las propiedades antioxidantes en comparación a la dieta control.
 - d. Los índices de salud calculados a partir del perfil graso de la leche y leches fermentadas obtenidas con las dietas ensayadas se encuentran entre los valores de referencias habituales en leche de cabra. La inclusión de ensilado de planta de alcachofa mejora algunos índices por su perfil de ácidos grasos insaturados. Sin embargo con la inclusión de SB no se observaron mejoras en dichos índices, posiblemente por su mayor contenido en ácidos grasos saturados en las leches fermentadas.
 - e. En el perfil de compuestos volátiles, la inclusión de ambos ensilados aumenta el contenido de ácido hexanoico y del contenido en aldehídos en leche fermentada por el cultivo de yogur (YO-MIX™ 300), y el contenido en butanoico, hexanoico y

octanoico en leche fermentada por el cultivo mesófilo (MA400). Los aldehídos volátiles aumentan en todas las dietas con el avance de la lactación. Los terpenos volátiles detectados no son de utilidad para diferenciar dietas con inclusión de ensilados de subproducto de brócoli y planta de alcachofa. La escasa diferencia en la prevalencia de los compuestos del perfil de volátiles sugiere que habrá escasas diferencias en el aroma de las leches fermentadas.

3. La evaluación de cepas puras para la fermentación de leche de cabra proporciona datos a la industria para su uso como potenciales cultivos adjuntos.
 - a. Todas las bacterias lácticas ensayadas presentan una alta viabilidad en leche de cabra (superior a 10^7 cfu·g⁻¹) con excepción de *L. bulgaricus*.
 - b. Las principales diferencias entre las cepas ensayadas residen en su velocidad de acidificación, la estabilidad del gel obtenido, el metabolismo de los azúcares, y su capacidad aromatizante (perfil de volátiles y aroma).
 - c. Las cepas ensayadas no tienen la capacidad de modificar el contenido en ácido linoleico conjugado y el perfil de ácidos grasos.
 - d. *L. helveticus*, *L. paracasei* y *Lc. lactis* poseen la mejor capacidad acidificante y un comportamiento a la fermentación similar a un cultivo mixto comercial, si bien todas las cepas ensayadas pueden resultar de interés para el desarrollo de productos lácteos de leche de cabra en función de las características sensoriales deseadas.

La inclusión de ensilado de planta de alcachofa y subproducto de brócoli y alcachofa en las concentraciones estudiadas en la ración de cabras Murciano-Granadinas permite obtener leche adecuada para la transformación a productos lácteos fermentados y constituye una implementación real de prácticas sostenibles en línea con las estrategias de economía circular, además de mejorar la rentabilidad de las granjas al permitir incluir raciones más económicas para los animales.



Investigaciones futuras

7. Investigaciones futuras

En vista de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se evidencia la necesidad de seguir estudiando el efecto del uso de estos ensilados en la dieta de caprino lechero en la calidad de los productos lácteos obtenidos. A continuación, se detallan algunos estudios que serían de gran interés:

- Estudiar el efecto de estas dietas con ensilados de brócoli y alcachofa en el comportamiento de cultivos probióticos y cultivos adjuntos, en especial de su capacidad aromatizante y sensorial, así como la potencial liberación de péptidos bioactivos que confieran propiedades funcionales a los productos lácteos
- Evaluar el efecto que esta dieta aplicada a caprino lechero tendría en la calidad del queso obtenido: aptitud a la coagulación, rendimiento quesero, características nutritivas y sensoriales de los quesos
- Caracterización de la microflora de la leche de tanque obtenida con el uso de estos ensilados a altos niveles de inclusión
- Ampliar el alcance de los ensayos realizados incluyendo estudios de análisis sensorial y de consumidores para valorar la su aceptación.
- Evaluar la inclusión de otros subproductos en dietas de caprino lechero en lactaciones completas para evaluar su efecto en la aptitud tecnológica de la leche, y la aceptabilidad y potencial funcionalidad de los productos desarrollados.





Referencias

8. Referencias

- Abo-Zeid, H.M.; El-Zaiat, H.M.; Morsy, A.S.; Attia, M.F.A.; Abaza, M.A.; Sallam, S.M.A. 2017. Effects of replacing dietary maize grains with increasing levels of sugar beet pulp on rumen fermentation constituents and performance of growing buffalo calves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 234: 128–138. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.09.011.
- Ahmed, A.S.; El-Bassiony, T.; Elmalt, L.M.; Ibrahim, H.R. 2015. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Res. Int.*, 74: 80–88. doi: 10.1016/j.foodres.2015.04.032.
- Andreu-Coll, L.; Cano-Lamadrid, M.; Sendra, E.; Carbonell-Barrachina, A.; Legua, P.; Hernández, F. Fatty acid profile of fruits (pulp and peel) and cladodes (young and old) of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] from six Spanish cultivars. 2019 *J. Food Compos. Anal.*, 84: 103294. doi: 10.1016/j.jfca.2019.103294.
- Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoglu, 2016. Antioxidant Activity/Capacity Measurement 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 64 (5): 997-1027. doi/10.1021/acs.jafc.5b04739.
- Arco-Pérez, A.; Ramos-Morales, E.; Yáñez-Ruiz, D.R.; Abecia, L.; Martín-García, A.I. 2017. Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 232: 57–70. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.08.008.
- Arioli, S.; Scala, G.D.; Remagni, M.C.; Stuknyte, M.; Colombo, S.; Guglielmetti, S.; De Noni, I.; Ragg, E.M.; Mora, D. 2017. *Streptococcus thermophilus* Urease Activity Boosts *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus* Homolactic Fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.*, 247: 55–64. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.006.
- Aunbjerg, S. D.; Honoré, A. H.; Marcussen, J.; Ebrahimi, P.; Vogensen, F. K.; Benfeldt, C.; Skov, T.; Knøchel, S. 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.*, 194: 46-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007.
- Baixauli, 2017a. Alcachofa. En: Maroto Borrego J.V. y Baixauli Soria (coordinadores). 2017. Cultivos hortícolas al aire libre. Edita: Cajamar Caja Rural: 341-369.
- Baixauli y Maroto, 2017b. Bróculis, coliflores y coles. En: Maroto Borrego J.V. y Baixauli Soria (coordinadores). 2017. Cultivos hortícolas al aire libre. Edita: Cajamar Caja Rural: 371-434.
- Balthazar, C. F.; Silva, H. L. A.; Esmerino, E. A.; Rocha, R. S.; Moraes, J.; Carmo, M. A. V.; Azevedo, L.; Camps, I.; K.D Abud, Y.; Sant'Anna, C.; Franco, R. M.; Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L.; Escher, G. B.; Granato, D.; Senaka Ranadheera, C.; Nazarro, F.; Cruz, A. G. 2018. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chem.*, 246: 464-472. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.002.

- Barłowska, J.; Szwajkowska, M.; Litwińczuk, Z.; Król, J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 10:291–302. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00163.
- Batista, A. L. D.; Silva, R.; Cappato, L. P.; Ferreira, M. V. S.; Nascimento, K. O.; Schmiele, M.; Esmerino, E. A.; Balthazar, C. F.; Silva, H. L. A., Moraes, J.; Pimentel, T. C.; Freitas, M. Q.; Raices, R. S. L.; Silva, M. C.; Cruz, A. G. 2017. Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. *J. Funct. Foods.*, 38: 242-250. doi: 10.1016/j.jff.2017.09.037.
- Biadala, A.; Konieczny, P. 2018. Goat's milk-derived bioactive components - a review. *Mljekarstvo.*, 68 (4): 239-253. doi: 10.15567/mljekarstvo.2018.0401.
- Borge, G.I.A.; Sandberg, E.; Øyaas, J.; Abrahamsen, R.K. 2016. Variation of terpenes in milk and cultured cream from Norwegian alpine rangeland-fed and in-door fed cows. *Food Chem.*, 199: 195–202. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.098.
- Borsini, A.A.; Llavata, B.; Umaña, M.; Cárcel, J.A. 2021. Artichoke by Products as a Source of Antioxidant and Fiber: How It Can Be Affected by Drying Temperature. *Foods.*, 10: 459. doi: 10.3390/foods10020459.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *L.W. Technol.*, 28: 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Calabrese, F. M.; Russo, N.; Celano, G.; Pino, A.; Lopreiato, V.; Litrenta, F.; Randazzo, C. L. 2023. Effect of olive by-products feed supplementation on physicochemical and microbiological profile of provola cheese. *Front. Microbiol.*, 14. doi:10.3389/fmicb.2023.1112328.
- Cais-Sokolińska, D.; Wójtowski, J.; Pikul, J.; Danków, R.; Majcher, M.; Teichert, J.; Bagnicka, E. 2015. Formation of volatile compounds in kefir made of goat and sheep milk with high polyunsaturated fatty acid content. *J. Dairy Sci.*, 98 (10): 6692-6705. Doi:10.3168/jds.2015-9441.
- Campione, A.; Natalello, A.; Valenti, B.; Luciano, G.; Rufino-Moya, P.J; Avondo, A.; Morbidini, L.; Pomete, C.; Krol, B.; Wilk, M.; Migdal, P.; Pauselli, M. 2020. Effect of Feeding Hazelnut Skin on Animal Performance, Milk Quality, and Rumen Fatty Acids in Lactating Ewes. *Animals.*, 10(4): 588. doi: 10.3390/ani10040588.
- Cano-Lamadrid, M.; Trigueros, L.; Wojdyło, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Sendra, E. 2017. Anthocyanins Decay in Pomegranate Enriched Fermented Milks as a Function of Bacterial Strain and Processing Conditions. *LWT-Food Sci. Technol.*, 80: 193–199. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.023.
- Catunda, K.L.M.; de Aguiar, E.M.; de Góes Neto, P.E.; da Silva, J.G.M.; Moreira, J.A.; do Nascimento Rangel, A.H.; de Lima Júnior, D.M. 2016. Gross composition, fatty acid profile and sensory characteristics of saanen goat milk fed with cacti varieties. *Trop. Anim. Health Prod.*, 48: 1253–1259. doi: 10.1007/s11250-016-1085-7.

- Champagne, C. P.; Gomes da Cruz, A.; Daga, M. 2018. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Curre. Opin. Food Sci.*, 22: 160-166. doi: 10.1016/j.cofs.2018.04.008.
- Cheng, H. 2010. Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 50 (10): 938-950. doi: 10.1080/10408390903044081.
- Chen, J.; Liu, H. 2020. Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 5695. doi: 10.3390/ijms21165695.
- Cheng, L. J.; Clarke, P.T.; Augustin, M. A. 2002. Seasonal variation in yogurt properties. *Aust. Dairy Technol.*, 57: 187-191.
- Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Rouel, J.; Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.*, 86: 1751–1770. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73761-8.
- 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. doi: 10.1016/j.smallrumres.2003.12.011.
- Cifuni, G.F.; Claps, S.; Signorelli, F.; Di Francia, A.; Di Napoli, M.A. 2021. Fatty acid and terpenoid profile: A signature of mountain milk. *Int. Dairy J.*, 127: 105301. doi: 10.1016/j.idairyj.2021.105301.
- Clarke, H.J.; Fitzpatrick, E.; Hennessy, D.; O'Sullivan, M.G.; Kerry, J.P.; Kilcawley, K.N. 2022. The Influence of Pasture and Non-pasture Based Feeding Systems on the Aroma of Raw Bovine Milk. *Front. Nutr.* 9, 841454. doi: 10.3389/fnut.2022.841454.
- CODEX.2022. Codex Stan 243-2003; Standard for Fermented Milks. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy; World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- Correddu, F.; Caratzu, M.F.; Lunesu, M.F.; Carta, S.; Pulina, G.; Nudda, A. 2023. Grape, Pomegranate, Olive, and Tomato By-Products Fed to Dairy Ruminants Improve Milk Fatty Acid Profile without Depressing Milk Production. *Foods*, 12:865. doi.org/10.3390/foods12040865.
- Dan, T.; Wang, D.; Jin, R.L.; Zhang, H.P.; Zhou, T.T.; Sun, T.S. 2017. Characterization of Volatile Compounds in Fermented Milk Using Solid-Phase Microextraction Methods Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Dairy Sci.*, 100: 2488–2500. doi: 10.3168/jds.2016-11528.
- Dan, T.; Ren, W.; Liu, Y.; Tian, J.; Chen, H.; Li, T.; Liu, W. 2019. Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Front. Microbiol.*, 10: 2183. doi: 10.3389/fmicb.2019.02183.
- Dantas, A. B.; Jesus, V. F.; Silva, R., Almada, C. N.; Esmerino, E. A.; Cappato, L. P.; Silva, M. C.; Raices, R. S. L.; Cavalcanti, R. N.; Carvalho, C. C.; Sant'Ana, A. S.; Bolini, H. M. A.; Freitas, M. Q.; Cruz, A. G. 2016. Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. *J. Dairy Sci.*, 99 (1): 18-30. doi:10.3168/jds.2015-9880.

- De Bok, F. A. M.; Janssen, P. W. M.; Bayjanov, J. R.; Sieuwerts, S.; Lommen, A.; Van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Molenaar, D. 2011. Volatile compound fingerprinting of mixed-culture fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (17): 6233-6239. doi:10.1128/AEM.00352-11.
- De Evan, T., Marcos, C. N., Ranilla, M. J., & Carro, M. D. 2020. In Vitro and In Situ Evaluation of Broccoli Wastes as Potential Feed for Ruminants. *Animals*, 10 (11): 1-14. doi: 10.3390/ani10111989.
- De Evan, T.; Marcos, C.; Ranilla, M.J.; Carro, M.D. 2020. In Vitro and In Situ Evaluation of Broccoli Wastes as Potential Feed for Ruminants. *Animals*, 10: 1989. doi: 10.3390/ani10111989.
- Demirci, M.; Kara, K.; Karsli, M.A. 2023. Determination of quality and nutrient content of artichoke by-products ensilaged with barley and molases. *J. Anim. Feed Sci.*, 32 (3): 324–330. doi: 10.22358/jafs/159346/2023.
- Dimitrellou, D.; Salamoura, C.; Kontogianni, A.; Katsipi, D.; Kandylis, P.; Zakynthinos, G.; Varzakas, T. 2019. Effect of Milk Type on the Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Probiotic Fermented Milk. *Microorganisms.*, 7: 274. doi: 10.3390/microorganisms7090274.
- Domagała, J. 2009. Instrumental Texture, Syneresis and Microstructure of Yoghurts Prepared from Goat, Cow and Sheep Milk. *Int. J. Food Prop.*, 12: 605–615. doi: 10.1080/10942910801992934.
- Domínguez-Perles, R.; Martínez-Ballesta, M.C.; Carvajal, M.; García-Viguera, C.; Moreno, D.A. 2010. Broccoli-Derived By-Products-A Promising Source of Bioactive Ingredients. *J. Food Sci.*, 75: C383–C392. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01606.x.
- Duboc, P.; Mollet, B.; 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.*, 11: 759-768. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00119-4.
- Elferink, E.V.; Nonhebel, S.; Moll, H.C. 2008. Feeding livestock food residue and the consequences for the environmental impact of meat. *J. Clean. Prod.*, 16: 1227–1233. doi: 10.1016/j.jclepro.2007.06.008.
- Fan, Z.; Chen, K.; Ban, L.; Mao, Y.; Hou, C.; Li, J. 2020. Silage Fermentation: A Potential Biological Approach for the Long-Term Preservation and Recycling of Polyphenols and Terpenes in Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) By-Products. *Molecules*, 25: 3302. doi: 10.3390/molecules25143302.
- FAOSTAT, 2023. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <http://faostat.fao.org>. Consultado a fecha de 13/04/2023.
- FEDNA.2016. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Composición Alimentos. Valor nutritivo de subproductos fibrosos húmedos. 93 pp.
- Ferlay, A.; Bernard, L.; Meynadier, A.; Malpuech-Brugère, C. 2017. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*, 141: 107-120. doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.006.

- García-Rodríguez, J.; Ranilla, M.J.; France, J.; Alaiz-Moretón, H.; Carro, M.D.; López, S. 2019. Chemical composition, in vitro digestibility and rumen fermentation kinetics of agro-industrial by-products. *Animals*, 9: 861. doi: 10.3390/ani9110861.
- Grattepanche, F.; Lacroix, C.; Audet, P.; Lapointe, G. 2005. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66: 414–421. doi: 10.1007/s00253-004-1705-4.
- Gómez-Torres, N.; Ávila, M.; Delgado, D.; Garde, S. 2016. Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 232: 103-110. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.031.
- Haenlein, G.F.W.; Wendorff, W.L. 2006: Sheep milk. In: “Handbook of milk of non-bovine mammals”. Eds. Y.W., Park, G.F.W. Haenlein. Blackwell Publishing Ltd. Oxford UK: 137-194. doi: 10.1002/9780470999738.ch7.
- Herrero, A.M.; Requena, T. 2006. The effect of supplementing goats milk with whey protein concentrate on textural properties of set-type yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41: 87-92. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.01045.x.
- Hickey, M. W.; Hillier, A. J.; Jago, G. R. 1986. Transport and Metabolism of Lactose, Glucose, and Galactose in Homofermentative *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 (4): 825-831. doi: 10.1128/aem.51.4.825-31.1986.
- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11: 506. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- Huang, Z.; Huang, L.; Xing, G.; Xu, X.; Tu, C.; Dong, M. 2020. Effect of Co-Fermentation with Lactic Acid Bacteria and *K. marxianus* on Physicochemical and Sensory Properties of Goat Milk. *Foods* 9: 299. doi: 10.3390/foods9030299.
- Huppertz T.; Grosman S.; Fox P.F.; Kelly A.L. 2004. Heat and ethanol stabilities of high-pressure-treated bovine milk. *Int. Dairy J.*, 14 (2): 125-133. doi/10.1016/S0958-6946(03)00170-5.
- Imhof, R.; Bosset, J. O. 1994. Relationships between micro-organisms and formation of aroma compounds in fermented dairy products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 198 iek (4): 267-276.
- Inglingstad, R.A.; Steinshamn, H.; Dagnachew, B.S.; Valenti, B.; Criscione, A.; Rukke, E.O.; Devold, T.G.; Skeie, S.B.; Vegarud, G.E. 2014. Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *J. Dairy Sci.*, 97: 3800–3814. doi: 10.3168/jds.2013-7542.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Quae, Paris.
- Janiaski, D. R.; Pimentel, T. C.; Cruz, A. G., Prudencio, S. H. 2016. Strawberry-flavored yogurts and whey beverages: What is the sensory profile of the ideal product?. *J. Dairy Sci.*, 99 (7): 5273–5283. doi/10.3168/jds.2015-10097.

- Jaramillo, D.P.; Buffa, M.N.; Rodríguez, M.; Pérez-Baena, I.; Guamis, B.; Trujillo, A.J. 2010. Effect of the inclusion of artichoke silage in the ration of lactating ewes on the properties of milk and cheese characteristics during ripening. *J. Dairy Sci.*, 93: 1412–1419. doi: 10.3168/jds.2009-2740.
- Jiménez-Redondo, N.; Vargas, A.; Teruel-Andreu, C.; Lipan, L.; Muelas, R.; Hernández-García, F.; Sendra, E.; Cano-Lamadrid, M. 2022. Evaluation of cinnammon (*Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum verum*) enriched yoghurt during refrigerated storage. *LWT* 159: 113240. doi: 10.1016/j.lwt.2022.113240.
- Jones, S. E.; Versalovic, J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.*, 9 (1): 35. doi: 10.1186/1471-2180-9-35.
- Jöudu, I.; Henno, M.; Kaart, T.; Püssa, T.; Kärt, O. 2008. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *Int. Dairy J.*, 18: 964–967. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.02.002.
- Ketto, I.A.; Knutsen, T.M.; Øyaas, J.; Heringstad, B.; Ådnøy, T.; Devold, T.G.; Skeie, S.B. 2017. Effects of milk protein polymorphism and composition, casein micelle size and salt distribution on the milk coagulation properties in norwegian red cattle. *Int. Dairy J.*, 70: 55–64. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.10.010.
- Kim, D.-O.; Chun, O.K.; Kim, Y.J.; Moon, H.-Y.; Lee, C.Y. 2003. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6509–6515. doi: 10.1021/jf0343074.
- Koczura, M.; Martin, B.; Musci, M.; Di Massimo, M.; Bouchon, M.; Turille, G.; Kreuzer, M.; Berard, J.; Coppa, M. 2021. Little Difference in Milk Fatty Acid and Terpene Composition Among Three Contrasting Dairy Breeds When Grazing a Biodiverse Mountain Pasture. *Front. Veter-Sci.*, 7: 612504. doi: 10.3389/fvets.2020.612504.
- Kücükçetin, A.; Demir, M.; Asci, A.; Çomak, E. 2011. Graininess and roughness of stirred yoghurt made with goat's, cow's or a mixture of goat's and cow's milk. *Small Rumin. Res.*, 96: 173–177. doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.12.003.
- Lashkari, S.; Taghizadeh, A. 2013. Nutrient digestibility and evaluation of protein and carbohydrate fractionation of citrus by-products. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97: 701–709. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01312.x.
- Li, C.; Song, J.; Kwok, L. Y.; Wang, J.; Dong, Y.; Yu, H. 2017. Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage. *J. Dairy Sci.* 100 (4): 2512–2525. doi/10.3168/jds.2016-11864.
- Li, W.; Hosseinian, F. S.; Tsopmo, A.; Friel, J. K.; Trust Beta, T. 2009. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Basic Nutritional Investigation*. 25 (1): 105-114. doi: 10.1016/j.nut.2008.07.017.
- Liotta, L.; Randazzo, C.L.; Russo, N.; Zumbo, A.; Di Rosa, A.R.; Caggia, C.; Chiofalo, V. 2019. Effect of Molasses and Dried Orange Pulp as Sheep Dietary Supplementation on Physico-

- Chemical, Microbiological and Fatty Acid Profile of Comisana Ewe's Milk and Cheese. *Front. Nutr.*, 6: 1. doi: 10.3389/fnut.2019.00001.
- Liu, W.; Yu, J.; Sun, Z.; Song, Y.; Wang, X.; Wang, H.; Wuren, T.; Zha, M.; Menghe, B.; Heping, Z. 2016. Relationships between functional genes in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus isolates and phenotypic characteristics associated with fermentation time and flavor production in yogurt elucidated using multilocus sequence typing. *J. Dairy Sci.*, 99: 89–103. doi: 10.3168/jds.2015-10209.
- Lock, A. L.; Garnsworthy, P. C. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, 79 (1): 47-59. doi: 10.1016/S0301-6226(02)00118-5.
- Lu, J.; Liu, L.; Pang, X.; Zhang, S.; Jia, Z.; Ma, C.; Zhao, L.; Lv, J. 2016. Comparative proteomics of milk fat globule membrane in goat clostrum and mature milk. *Food Chem.*, 209: 10-16. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.020.
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuario de estadística. 2021a. Superficies, producciones, destino, siembra, recolección y comercialización de los cultivos de alcachofa y brócoli. <https://www.mapa.gob.es/es/>. [consultado el 13 de mayo de 2023].
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuario de estadística. 2021b. Censo total y evolución de hembras caprinas en ordeño y producción de leche. <https://www.mapa.gob.es/es/>. [consultado el 13 de mayo de 2023].
- Markakiou, S.; Gaspar, P.; Johansen, E.; Zeidan, A.A.; Neves, A.R. 2020. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 61: 142. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.019.
- Martín, B.; Pomiès, D.; Pradel, P.; Verdier-Metz, L.; Rémond, B. 2009. Yield and sensory properties of cheese made with milk from Holstein or montbéliarde cows milked twice or once daily. *J. Dairy Sci.* 92 (10): 4730-4737. doi: 10.3168/jds.2008-1914.
- Martín-Diana, A.B.; Janer, C.O.; Peláez, C.; Requena, T. 2003. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 13: 827–833. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00117-1.
- Martinez-Férez, A.; Rudloff, S.; Guadix, A.; Henkel, C.A.; Pohlentz, G.; Boza, J.J.; Gaudix, E.M.; Kunz, C. 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.*, 16: 173–181.
- McSweeney, P.L.H.; Sousa, M.J.F. 2000. Biochemical Pathways for the Production of Flavour Compounds in Cheeses during Ripening: A Review. *Lait*, 80: 293–324. doi: 10.1051/lait:2000127.
- Medeiros, F.H.V.; Bettiol, W.; Souza, R.M.; Alves, E.; Pinto, Z.V.; Iost, R. 2012. Microorganisms, application timing and fractions as players of the milk-mediated powdery mildew management. *Crop Prot.*, 40: 8–15. doi: 10.1016/j.cropro.2012.04.022.

- Meneses, M.; Megías, M.D.; Madrid, J.; Martínez-Teruel, A.; Hernández, F.; Oliva, J. 2007. Evaluation of the phytosanitary, fermentative and nutritive characteristics of the silage made from crude artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product feeding for ruminants. *Small Rumin. Res.*, 70: 292–296. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.05.008.
- Meneses, M.; Martínez-Marín, A.L.; Madrid, J.; Martínez-Teruel, A.; Hernández, F.; Megías, M.D. 2020. Ensilability, in vitro and in vivo values of the agro-industrial by-products of artichoke and broccoli. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27: 2919–2925. doi: 10.1007/s11356-019-07142-2.
- Mirabella, N.; Castellani, V.; Sala, S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *J. Clean. Prod.*, 65: 28–41. doi: 10.1016/j.jclepro.2013.10.051.
- MMA. 2006. Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del Sector de los Transformados Vegetales; Ministerio de Medio Ambiente, Gobierno de España: Madrid, Spain.
- Molina-Alcaide, E.; Yáñez-Ruiz, D.R. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147: 247–264. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.021.
- Monllor, P.; Muelas, R.; Roca, A.; Atzori, A.S.; Díaz, J.R.; Sendra, E.; Romero, G. 2020c. Long-Term Feeding of Dairy Goats with Broccoli By-Product and Artichoke Plant Silages: Milk Yield, Quality and Composition. *Animals* 10: 1670. doi: 10.3390/ani10091670.
- Monllor, P.; Romero, G.; Atzori, A.S.; Sandoval-Castro, C.A.; Ayala-Burgos, A.; Roca, A.; Sendra, E.; Díaz, J.R. 2020b. Composition, mineral and fatty acid profiles of milk from goats fed with different proportions of broccoli and artichoke plant by-products. *Foods*, 9:700. doi: 10.3390/foods9060700.
- Monllor, P.; Romero, G.; Muelas, R.; Sandoval-Castro, C.A.; Sendra, E.; Díaz, J.R. 2020. Ensiling process in commercial bales of horticultural by-products from artichoke and broccoli. *Animals.*, 10:831. doi: 10.3390/ani10050831.
- Monllor, P.; Romero, G.; Sendra, E.; Atzori, A.S.; Díaz, J.R. 2020a. Short-Term Effect of the Inclusion of Silage Artichoke By-Products in Diets of Dairy Goats on Milk Quality. *Animals*, 10:339. doi: 10.3390/ani10020339.
- Monllor, P.; Muelas, R.; Roca, A.; Bueso-Ródenas, J.; Atzori, A.S.; Sendra, E.; Romero, G.; Díaz, J.R. 2021. Effect of the Short-Term Incorporation of Different Proportions of Ensiled Artichoke By-Product on Milk Parameters and Health Status of Dairy Goats. *Agronomy* 11: 1649. doi: 10.3390/agronomy11081649.
- Morais, J.S.; Bezerra, L.R.; Silva, A.M.A.; Araújo, M.J.; Oliveira, R.L.; Edvan, R.L.; Torreño, J.N.C.; Lanna, D.P.D. 2017. Production, composition, fatty acid profile and sensory analysis of goat milk in goats fed buriti oil. *J. Anim. Sci.*, 95. 395–406. doi: 10.2527/jas.2016.0746.
- Morgan, F.; Massouras, T.; Barbosa, M.; Roseiro, L.; Ravasco, F.; Kandarakis, I.; Bonnin, V.; Fistakoris, M.; Anifantakis, E.; Jaubert, G.; et al. 2003. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in greece, portugal and france. *Small Rumin. Res.*, 47: 39–49. doi: 10.1016/S0921-4488(02)00252-3.

- Mortera, P.; Zuljan, F.A.; Magni, C.; Bortolato, S.A.; Alarcón, S.H. 2018. Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. *Talanta*, 178: 15–23. doi: 10.1016/j.talanta.2017.09.005.
- Nantapo, C. T.; Muchenje, V.; Hugo, A. 2014. Atherogenicity index and health-related fatty acids in different stages of lactation from Friesian, Jersey and FriesianxJersey cross cow milk under a pasture-based dairy system. *Food Chem.*, 146: 127-133. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.009.
- Nayik, G.A.; Jagdale, Y.D.; Gaikwad, S.A.; Anupama N. Devkatte, A.N.; Aamir Hussain Dar, A.H.; Mohammad Javed Ansari, M.J. 2022. Nutritional Profile, Processing and Potential Products: A Comparative Review of Goat Milk. *Dairy*, (3): 622-647. doi: 10.3390/dairy3030044.
- Neofytou, M.; Miltiadou, D.; Symeau, S.; Sparaggis, D.; Tzamaloukas, O. 2021. Short-term forage substitution with ensiled olive cake increases beneficial milk fatty acids in lactating cows. *Trop Anim Health Prod.*, 12, 53 (2): 251. doi: 10.1007/s1125-021-02706-2.
- Nozière, P.; Graulet, B.; Lucas, A.; Martin, B.; Grolier, P.; Doreau, M. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131: 418–450. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018.
- Nudda, A.; McGuire, M.A.; Battacone, G., Pulina, G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. *J. Dairy Sci.* 88: 1311–1319.
- Nudda, A.; 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. *J. Dairy Sci.*, 89: 277–282. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72092-6.
- Nudda, A.; Buffa, G.; Atzori, A.S.; Cappai, M.G.; Caboni, P.; Fais, G.; Pulina, G. 2019. Small amounts of agro-industrial byproducts in dairy ewes diets affects milk production traits and hematological parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 251: 76–85. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2019.02.007.
- Nudda, A.; Cannas, A.; Correddu, F.; Atzori, A. S., Lunesu, M. F.; Battacone, G.; Pulina, G. 2020. Sheep and goats respond differently to feeding strategies directed to improve the fatty acid profile of milk fat. *Animals*, 10 (8): 1-22. doi: 10.3390/ani10081290.
- Oltramari, C.E.; Nápoles, G.G.O.; De Paula, M.R.; Silva, J.T.; Gallo, M.P.C.; Soares, M.C.; Bittar, C.M.M. 2016. Performance and metabolism of dairy calves fed starter feed containing citrus pulp as a replacement for corn. *Anim. Prod. Sci.*, 58: 561–567. doi: 10.1071/AN14851.
- Pandya, A.J.; Ghodke, K.M. 2007. Goat and sheep milk products other than cheese and yogurt. *Small Rumin. Res.*, 68: 193-206. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.007.
- Panwar, V.S.; Sheoran, N.; Vinus; Tewatia, B.S. 2017. Chemical composition and nutritive value of broccoli crop residue in goats. *Forage Res.*, 43(1): 50-53.

- Papaioannou, G.; Kosma, I.; Badeka, A.V.; Kontominas, M.G. 2021. Profile of Volatile Compounds in Dessert Yogurts Prepared from Cow and Goat Milk, Using Different Starter Cultures and Probiotics. *Foods* 10: 3153. doi: 10.3390/foods10123153.
- Park, D.Y.; Ahn, Y.T.; Park, S.H.; Huh, C.S.; Yoo, S.R.; Yu, R., Sung, M.K.; McGregor, R. A.; Choi, M.S. 2013. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS ONE.*, 8 (3): e59470. doi: 10.1371/journal.pone.0059470.
- Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68: 88–113. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.
- Park, Y.W. 2009. Bioactive Components in Goat Milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. 43-81pp, ISBN 978-0-8138-2150-4.
- Pinto, S. M.; Clemente, M. D. G.; De Abreu, L. R. 2009. Behaviour of volatile compounds during the shelf life of yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.*, 62 (2): 215–223. doi/10.1111/j.1471-0307.2009.00476.x.
- Pogačić, T.; Maillard, M.-B.; Leclerc, A.; Hervé, C.; Chuat, V.; Yee, A. L.; Valence, F.; Thierry, A. 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.*, 46: 145-153. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.018.
- Poudel, R.; Thunell, R.K.; Oberg, C.J.; Overbeck, S.; Lefevre, M.; Oberg, T.S.; McMahon, D.J. 2022. Comparison of growth and survival of single strains of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* during Cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.*, 105, 2069–2081. doi: 10.3168/jds.2021-20958.
- Prosser, C.G. 2021. Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula. *J. Food Sci.*, 86: 257–265. doi: 10.1111/1750-3841.15574.
- Ranadheera, C. S.; Naumovski, N.; Ajlouni, S. 2018. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations. *Curr. Opin. Food Sci.*, 22: 109-114. doi: 10.1016/j.cofs.2018.02.010.
- Quatravaux, S.; Remize, F.; Bryckaert, E.; Colavizza, D.; Guzzo, J. 2006. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J. Appl. Microbiol.*, 101 (4): 903-912. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02955.x.
- Raynal-Ljutovac, K.; Park, Y.W.; Gaucheron, F.; Bouhallab, S. 2007. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68: 207–220. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.006.
- 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 Radic. Biol. Med.*, 26: 1231–1237. doi/10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

- Rincón, A.A.; García-Fraga, J.M.; Álvarez, S.; Pino, V.; Fresno, M.R.; Ayala, J.H.; Afonso, A.M. 2017. Effect of the inclusion of banana silage in the diet of goats on physicochemical and sensory characteristics of cheeses at different ripening times. *Small Rumin. Res.*, 149: 52–61. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.212.043.
- Romero-Huelva, M.; Ramos-Morales, E.; Molina-Alcaide, E. 2012. Nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial abundances, and milk yield and composition in dairy goats fed diets including tomato and cucumber waste fruits. *J. Dairy Sci.*, 95: 6015–6026. doi: 10.3168/jds.2012-5573.
- Romero-Huelva, M.; Ramírez-Fenosa, M.A.; Planelles-González, R.; García-Casado, P.; Molina-Alcaide, E. 2017. Can by-Products replace conventional ingredients in concentrate of dairy goat diet?. *J. Dairy Sci.*, 100:4500-4512. doi: 10.3168/jds.2016.11766.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. 2004. Comparison of two methods for the extraction of fat from human milk. *Anal. Chim. Acta*, 513 (2): 457-461. doi: 10.1016/j.aca.2004.02.038.
- Ru, J.; Han, C.; Hui, C.; Wu, D. 2016. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *J. Dairy Sci.*, 99:221-227. doi/10.3168/jds.2015-10114.
- Salman, F.M.; El-Nameary, Y.A.A.; Abedo, A.A.; Abd El-rahman, H.H.; Mohamed, M.I.; Ahmed, S.M. 2014. Utilization of artichoke (*Cynara scolymus*) by-products in sheep feeding. *Am. J. Agric. Environ. Sci.*, 14: 624–630. Doi: 10.5829/idosi.ajeaes.2014.14.07.12362.
- Salvador, A.; Igual, M.; Contreras, C., Martines-Navarrete, N.; del Mar Camacho, M. 2014. Effect of the inclusion of citrus pulp in the diet of goats on cheeses characteristics. *Small Rumin. Res.*, 121: 361–367. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.06.012.
- Samah, M.S.; Sally, S.S.; Nagwa, H. 2020. The impact of supplementing goats' milk with quinoa extract on some properties of yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.*, 73 (1): 126-133. doi: 10.1111/1471-0307.12628.
- Sano, A.; Takatera, M.; Kawai, M.; Ichinose, R.; Yamasaki-Yashiki, S.; Katakura, Y. 2020. Suppression of lactate production by aerobic fed-batch cultures of *Lactococcus lactis*. *J. Biosci. Bioeng.*, 130: 402–408. doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.06.004.
- Schader, C.; Muller, A.; El-Hage Scialabba, N.; Hecht, J.; Isensee, A.; Erb, K.H.; Smith, P.; Makkar, H.P.S.; Klocke, P.; Leiber, F.; Schwegler, P.; Stolze, M.; Niggli, U. 2015. Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. *J. R. Soc. Interface*, 12: 20150891. doi: 10.1098/rsif.2015.0891.
- Serhan, M.; Mattar, J.; Debs, L. 2016. Concentrated yogurt (Labneh) made of a mixture of goats' and cows' milk: Physicochemical, microbiological and sensory analysis. *Small Rumin. Res.*, 138: 46–52. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.04.003.
- Siek, T. J.; Albin, I. A.; Sather, L. A.; Lindsay, R. C. 1969. Taste Thresholds of Butter Volatiles in Deodorized Butteroil Medium. *J. Food Sci.*, 34 (3): 265-265. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1969.tb10338.x.

- Sieuwerts, S.; De Bok F. A. M.; Hugenholtz, J.; Van Hylckama Vlieg, J. E. T.; 2008 Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4997-5007. doi: 10.1128/AEM.00113-08.
- Silva, H. L. A.; Balthazar, C. F.; Esmerino, E. A.; Neto, R. P. C.; Rocha, R. S.; Moraes, J.; Cavalcanti, R. N.; Franco, R. M.; Tavares, M. I. B.; Santos, J. S.; Granato, D.; Costa, R. G. B.; Freitas, M. Q.; Silva, M. C.; Raices, R. S. L.; Senaka Ranadheera, C.; Nazzaro, F.; Mortazavian, A. M.; Cruz, A. G. 2018. Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor enhancers on probiotic Prato cheese: A study covering manufacturing, ripening and storage time. *Food Chem.*, 248:192-200. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.064.
- Slažcanac, V.; Božanić, R.; Hardi, J.; Szabó, J.R.; Lužcan, M.; Krstanović, V. 2010. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int. J. Dairy Technol.*, 63: 171–189. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00575.x.
- Solah, V.A.; Staines, V.; Honda, S.; Limley, H.A. 2007. Measurement of milk color and composition: Effect of dietary intervention on western australian holstein-friesian cow's milk quality. *J. Food Sci.*, 72: S560–S566. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00491.
- Stone, H. 1993. *Sensory Evaluation Practices*/Herbert Stone, Joel L. Sidel; Academic Press: San Diego, CA, USA.
- Symeou, S.; Miltiadou, D.; Constantinou, C.; Papadema, P.; Tzamaloukas, O. 2021. Feeding olive cake silage up to 20% of DM intake in sheep improves lipid quality and health-related indices of milk and ovine halloumi cheese. *Trop Anim Health Prod.*, 26: 53 (2):229. doi: 10.1007/s11250-021-02674-7.
- 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. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.02.003.
- Trigueros, L., Sayas-Barberá, E., Pérez-Álvarez, J. A., Sendra, E. 2012. Use of date (*Phoenix dactylifera* L.) blanching water for reconstituting milk powder: Yogurt manufacture. *Food and Bioproducts Processing*, 90 (3): 506-514. doi: 10.1016/j.fbp.2011.10.001.
- Trigueros, L.; Barber, X.; Sendra, E. 2015. Conjugated linoleic acid content in fermented goat milk as affected by the starter culture and the presence of free linoleic acid. *Int. J. Dairy Technol.*, 68 (2): 198-206. doi: 10.1111/1471-0307.12177.
- Trigueros, L.; Sendra, E. 2015. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) content in fermented milks as assessed by direct methylation. *LWT - Food Sci. Technol.*, 60 (1): 315-319. doi: 10.1016/j.lwt.2014.09.053.
- Tunick, M.; Iandola, S.; Van Hekken, D. 2013. Comparison of SPME methods for determining volatile compounds in milk, cheese, and whey powder. *Foods*, 2 (4): 534. Doi: 10.3390/foods2040534.

- Valdivielso, I.; de Renobales, M.; Aldai, N.; Barron, L.J.R. 2017. Changes in terpenoid composition of milk and cheese from commercial sheep flocks associated with seasonal feeding regimens throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 100: 96–105. doi: 10.3168/jds.2016-11761.
- Varga, L.; Süle, J.; Nagy, P. 2014. Short communication: Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* 97: 2039–2044. doi: 10.3168/jds.2013-7339.
- Vargas, M.; Chafer, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. 2008. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *Int. Dairy J.*, 18: 1146–1152. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.06.007.
- Vasta, V.; Nudda, A.; Cannas, A.; Lanza, M.; Priolo, A. 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 146: 223–246. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.020.
- Vasta, V.; Priolo, A.; Scerra, M.; Hallett, K.G.; Wood, J.D.; Doran, O. 2009. $\Delta 9$ desaturase protein expression and fatty acid composition of longissimus dorsi muscle in lambs fed green herbage or concentrate with or without added tannins. *Meat Sci.*, 82: 357–364. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.02.007.
- Wang, T.; Xu, Z.; Lu, S.; Xin, M.; Kong, J. 2016. Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int. Dairy J.*, 61: 22–28. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.03.012.
- Watkins, P. J.; Jaborek, J. R.; Teng, F.; Day, L.; Castada, H. Z.; Baringer, S.; Wick, M. 2021. Branched chain fatty acids in the flavour of sheep and goat milk and meat: A review. *Small Rumin. Res.*, 200. doi: 10.1016/j.smallrumres.2021.106398.
- Williams, S.R.O.; Chaves, A.V.; Deighton, M.H.; Jacobs, J.L.; Hannah, M.C.; Ribaux, B.E.; Morris, G.L.; Wales, W.J.; Moate, P.J. 2018. Influence of feeding supplements of almond hulls and ensiled citrus pulp on the milk production, milk composition, and methane emissions of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 101 (3): 2072-2083. doi: 10.3168/jds.2017-13440.
- Yamauchi, R.; Maguin, E.; Horiuchi, H.; Hosokawa, M.; Sasaki, Y. 2019. The critical role of urease in yogurt fermentation with various combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, doi: 10.3168/jds.2018-15192.
- Yu, P.; Li, N.; Geng, M.; Liu, Z.; Liu, X.; Zhang, H.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. 2020 Short communication: Lactose utilization of *Streptococcus thermophilus* and correlations with β -galactosidase and urease., *J. Dairy Sci.* 103: 166–171. doi: 10.3168/jds.2019-17009.
- Zhang, H.; Wu, J.; Gao, L.; Yu, J.; Yuan, X.; Zhu, W.; Wang, X.; Cui, Z. 2018. Aerobic deterioration of corn stalk silage and its effect on methane production and microbial community dynamics in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.*, 250: 828-837. doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.149.
- Zhuoyan, F.; Kai, C.; Lingyin B.; Yu, M.; Caiyun, H.; Jingming L. 2020. Silage Fermentation: A Potential Biological Approach for the Long-Term Preservation and Recycling of

Polyphenols and Terpenes in Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) By-Products. *Molecules*, 25 (14): 3302. doi: 10.3390/molecules25143302.

Ziarno, M.; Truszkowska, K.; Wlasciwosci, M.K.; Jęgo, P. 2005. The properties of goat's milk and its products. *Polish Dairy J.*, 3: 4–8.

