



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Características del kéfir de leche de cabras alimentadas
con una dieta que contiene subproducto de la industria
vitivinícola

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Aguilar Salcedo, María Amparo

Tutor/a: Montes Estellés, Rosa M^a

Cotutor/a: Molina Pons, María Pilar

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO NATURAL
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
Curso 2023-2024



**Características del kéfir de leche de cabras alimentadas con una
dieta que contiene subproducto de la industria vitivinícola**

AUTORA:

María Amparo Aguilar Salcedo

TUTORAS ACADÉMICAS:

Rosa María Montes Estellés

María Pilar Molina Pons

Valencia, Septiembre 2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO NATURAL
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
Curso 2023-2024



**Características del kéfir de leche de cabras alimentadas con una
dieta que contiene subproducto de la industria vitivinícola**

AUTORA:

María Amparo Aguilar Salcedo

**El trabajo forma parte del proyecto PID2021-1229620B-C32, financiado por
MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE.**

RESUMEN

El objetivo de este estudio ha sido conocer el efecto de la inclusión de ensilado de orujo de uva negra en la alimentación del ganado caprino sobre el proceso de elaboración y las características físico-químicas y microbiológicas del kéfir de leche de cabra. Para ello se emplearon 2 lotes de cabras de raza Murciano Granadina que fueron alimentadas con una dieta tipo (Control) y otra suplementada con dicho residuo vitivinícola (Orujo). Se realizaron 3 fabricaciones de kéfir en semanas diferentes empleando leche pasteurizada a 90°C durante 5 minutos y posteriormente enfriada a una temperatura de 20-24°C. La fermentación se realizaba mediante fermentos comerciales hasta alcanzar un pH de 4,55 con una duración de entre 15 a 16 horas. Se analizaron la calidad física química e higiénico sanitaria de la leche empleada en cada fabricación. En cuanto al kéfir se determinaron las características físico-químicas y microbiológicas tras 1, 14 y 28 días de almacenamiento a 4°C. La leche procedente de las cabras alimentadas con Orujo presentó un mayor contenido en materia grasa (4,93 vs 4,72 %) y materia seca (13,41 vs 13,04%) que la leche del grupo Control, no encontrándose diferencias en ninguno de los otros parámetros analizados. Tampoco el proceso de elaboración y, en general, la composición química del kéfir se vio afectados por el tipo de dieta ($p > 0,05$). Solamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la acidez, con un menor valor de pH ($p < 0,05$) en el kéfir procedente de la dieta Orujo. Ninguno de los parámetros físico químicos analizados se vio afectado por el tiempo de conservación de las muestras. En cuanto a las características microbiológicas, el kéfir presenta una comunidad microbiana compuesta por bacterias ácido lácticas (lactobacilos y lactococos), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp.) y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter* spp.). Los valores medios del primer día fueron: 8,65 para el log UFC/g de lactobacilos, 8,87 para el log UFC/g de lactococos y 3,79 para el log UFC/g de levaduras. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas en el valor de los recuentos dependiendo del tipo de leche con que se ha fabricado, mientras que sí que hay diferencias significativas medida que pasa el tiempo de refrigeración, la cantidad de bacterias beneficiosas como los lactobacilos y lactococos disminuye significativamente. Por el contrario, la cantidad de levaduras aumenta. Estos resultados sugieren que el kéfir pierde parte de sus propiedades probióticas con el tiempo de almacenamiento y que podría producirse una fermentación prolongada o un desequilibrio en la microbiota.

Con este estudio se pretende contribuir a mejorar la eficiencia productiva y la sostenibilidad del ganado caprino lechero, reduciendo los costes de alimentación y el impacto ambiental evaluando el posible efecto de la dieta sobre la calidad de la leche y derivados.

Palabras clave: kéfir, leche de cabra, subproducto, orujo uva negra

SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of the inclusion of black grape pomace silage in goat feed on the production process and the physical-chemical and microbiological characteristics of goat's milk kefir. For this purpose, 2 batches of Murciano Granadina goats were used that were fed with a type diet (Control) and another supplemented with this wine residue (Pomace). 3 kefir productions were made in different weeks using pasteurized milk at 90°C for 5 minutes and then cooled to a temperature of 20-24°C. Fermentation was carried out by commercial ferments until a pH of 4.55 was reached, with a duration of between 15 and 16 hours. The physical, chemical and hygienic and sanitary quality of the milk used in each manufacture was analyzed. As for kefir, the physical-chemical and microbiological characteristics were determined after 1, 14 and 28 days of storage at 4°C. Milk from goats fed with pomace had a higher fat content (4.93 vs 4.72 %) and dry matter (13.41 vs 13.04%) than milk from the Control group, with no differences found in any of the other parameters analysed. Nor was the production process and, in general, the chemical composition of kefir affected by the type of diet ($p > 0.05$). Only statistically significant differences in acidity were detected, with a lower pH value ($p < 0.05$) in kefir from the Pomace diet. None of the physicochemical parameters analyzed were affected by the conservation time of the samples. In terms of microbiological characteristics, kefir has a microbial community composed of lactic acid bacteria (lactobacilli and lactococci), yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp.) and acetic acid bacteria (*Acetobacter* spp.). The mean values on the first day were: 8.65 for the log CFU/g of lactobacilli, 8.87 for the log CFU/g of lactococci and 3.79 for the log CFU/g of yeast. The results obtained show that there are no significant differences in the value of the counts depending on the type of milk with which it has been manufactured, while there are significant differences as the refrigeration time passes, the amount of beneficial bacteria such as lactobacilli and lactococci decreases significantly. On the contrary, the amount of yeast increases. These results suggest that kefir loses some of its probiotic properties over storage time and that prolonged fermentation or an imbalance in the microbiota could occur.

This study aims to contribute to improving the production efficiency and sustainability of dairy goats, reducing feed costs and environmental impact by evaluating the possible effect of the diet on the quality of milk and derivatives.

Keywords: kefir, goat's milk, by-product, black grape pomace

RESUM

L'objectiu d'aquest estudi ha sigut conèixer l'efecte de la inclusió d'ensitjament d'orujó de raïm negre en l'alimentació del bestiar caprí sobre el procés d'elaboració i les característiques fisicoquímiques i microbiològiques del quefir de llet de cabra. Per a això es van emprar 2 lots de cabres de raça Murcià Granadina que van ser alimentades amb una dieta tipus (Control) i una altra suplementada amb aquest residu vitivinícola (Orujo). Es van realitzar 3 fabricacions de quefir en setmanes diferents emprant llet pasteuritzada a 90 °C durant 5 minuts i posteriorment refredada a una temperatura de 20-24 °C. La fermentació es realitzava mitjançant fermentos comercials fins a aconseguir un pH de 4,55 amb una duració d'entre 15 a 16 hores. Es van analitzar la qualitat física química i higiènica sanitària de la llet emprada en cada fabricació. Quant al quefir es van determinar les característiques fisicoquímiques i microbiològiques després de 1, 14 i 28 dies d'emmagatzematge a 4 °C. La llet procedent de les cabres alimentades amb Orujo va presentar un major contingut en matèria grassa (4,93 vs 4,72%) i matèria seca (13,41 vs 13,04%) que la llet del grup Control, no trobant-se diferències en cap dels altres paràmetres analitzats. Tampoc el procés d'elaboració i, en general, la composició química del quefir es va veure afectats pel tipus de dieta ($p > 0,05$). Solament es van detectar diferències estadísticament significatives en l'acidesa, amb un menor valor de pH ($p < 0,05$) en el quefir procedent de la dieta Orujo. Cap dels paràmetres físic químics analitzats es va veure afectat pel temps de conservació de les mostres. Quant a les característiques microbiològiques, el quefir presenta una comunitat microbiana composta per bacteris àcid làctics (lactobacilos i lactococos), llevats (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp.) i bacteris àcid acètics (*Acetobacter* spp.) Els valors mitjans del primer dia van ser: 8,65 per al log UFC/g de lactobacilos, 8,87 per al log UFC/g de lactococos i 3,79 per al log UFC/g de llevats. Els resultats obtinguts mostren que no hi ha diferències significatives en el valor dels recomptes depenent del tipus de llet amb què s'ha fabricat, mentre que si que hi ha diferències significatives mesura que passa el temps de refrigeració, la quantitat de bacteris beneficiosos com els lactobacilos i lactococos disminueix significativament. Per contra, la quantitat de llevats augmenta. Aquests resultats suggereixen que el quefir perd part de les seues propietats probiòtiques amb el temps d'emmagatzematge i que podria produir-se una fermentació prolongada o un desequilibri en la microbiota.

Amb aquest estudi es pretén contribuir a millorar l'eficiència productiva i la sostenibilitat del bestiar caprí lleter, reduint els costos d'alimentació i l'impacte ambiental avaluant el possible efecte de la dieta sobre la qualitat de la llet i derivats.

Paraules clau: kéfir, llet de cabra, subproducte, orujo raïm negre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi madre Yolanda Salcedo Picó y también a mi padre Alejandro Aguilar Alonso porque me apoyan todos los días de mi vida, me ayudan a lograr mis sueños y me han educado con todo su amor.

Quiero agradecer también a mis directoras del TFM, Dra. Rosa M^a Montes Estellés y Dra. M^a Pilar Molina Pons, por toda la ayuda, enseñanza y apoyo que me han dado durante la realización de mi trabajo. También por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con ellas. A Mari Carmen y Amin por su aportación, atención y esfuerzo.

Por último, agradecer a mis compañeras María Jose, Sara, Raquel y todos los compañeros con los que he compartido tiempo a lo largo del todo el trabajo, del curso académico y de esta pequeña etapa en la Universitat Politècnica de Valencia.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición y características del kéfir de cabra	1
1.1.1. Aspectos generales	1
1.1.2. Características físico-químicas del kéfir	3
1.1.3. Aspectos microbiológicos del kéfir	4
1.2. Producción y calidad de la leche de cabra	5
1.2.1. Generalidades	5
1.2.2. Propiedades físico-químicas y nutritivas de la leche de cabra	6
1.2.3. Calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra	8
1.3. El uso de subproductos en la alimentación de cabras	9
1.2.1. Consideraciones previas	9
1.2.1. Residuos de la industria vitivinícola en alimentación animal	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Diseño experimental	14
3.2. Leche de cabra	14
3.3. Proceso de elaboración de kéfir	14
3.4. Análisis fisicoquímicos	16
3.4.1. Acidez	16
3.4.2. Composición	17
3.5. Análisis microbiológico	17
3.5.1. Recuentos de bacterias y levaduras	17
3.5.2. Identificación de levaduras	19
3.6. Análisis estadístico	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Características de la leche de cabra	21
4.2. Efecto de la dieta sobre el proceso de fermentación del kéfir de leche de cabra	23
4.3. Efecto de la dieta y el tiempo de conservación sobre las características físico-químicas del kéfir de leche de cabra	24
4.4. Efecto de la dieta y el tiempo de conservación sobre las características microbiológicas del kéfir de leche de cabra	27
5. CONCLUSIONES	35
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del kéfir de leche de vaca y de cabra.....	3
Tabla 2. Principales grupo de bacterias presentes en el kéfir.....	5
Tabla 3. Composición de la leche de cabra según diferentes autores.....	7
Tabla 4. Características físico-químicas e higiénico sanitarias de la leche de cabra utilizada en la elaboración de los distintos lotes experimentales de kéfir.....	21
Tabla 5. Parámetros del proceso de elaboración del kéfir de leche de cabra.....	23
Tabla 6. Características fisico-químicas del kéfir de leche de cabra según la dieta (D) y el tiempo de almacenamiento (t) y su interacción (D x t).....	26
Tabla 7. Efecto de la dieta y tiempo de conservación sobre las características microbiológicas del kéfir de leche de cabra.....	27
Tabla 8. Efecto de la dieta sobre los análisis microbiológicos del kéfir de leche de cabra..	30
Tabla 9. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los análisis microbiológicos del kéfir de leche de cabra.....	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencia en el consumo de kéfir para el año 2028.	1
Figura 2. Producción mundial de leche de cabra.	6
Figura 3. Incubador con envases de kéfir en el interior.	15
Figura 4. pHmetro para medida continua durante el proceso de fermentación del kéfir.	16
Figura 5. Determinación de la acidez valorable del kéfir según el método Dornic.	16
Figura 6. Equipo de infrarrojos Milkoscan FT+ para análisis de composición del kéfir.	17
Figura 7. Caja de anaerobiosis con placas con medio de cultivo.	18
Figura 8. Recuento de actobacilos en superficie en agar MRS.	19
Figura 9. Tira API® 32C para identificación de levaduras.	19
Figura 10. Efecto de la presencia de ensilado de orujo de uva negra en la dieta sobre la cinética de acidificación del kéfir de leche de cabra.	23
Figura 11. Levaduras crecidas en PDA y resultado de la tira API® 32C.	27
Figura 12. Tira API® 32C crecida que da como resultado <i>Cándida famata</i>	27
Figura 13. Log UGC/g de lactobacilos, lactococos y levaduras en el kéfir de leche de cabra según la dieta.	28
Figura 14. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los recuentos (Log UFC/g) de lactobacilos, lactococos y levaduras en el kéfir de leche de cabra.	29
Figura 15. Efecto de la dieta sobre el recuento de lactobacilos del kéfir de leche de cabra (C: Control, OT: Orujo).	30
Figura 16. Efecto de la dieta sobre el recuento de lactococos del kéfir de leche de cabra (C: Control, OT: Orujo).	31

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza		X		
ODS 2. Hambre cero	X			
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables	X			
ODS 13. Acción por el clima			X	
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X

El trabajo se alinea con varios ODS de la agenda 2030 de la siguiente manera:

ODS2: Hambre cero: La inclusión del subproducto de orujo de uva en la alimentación de cabras reduce el desperdicio alimentario y contribuye a la sostenibilidad mejorando la eficiencia y reduciendo costos de la dieta. La alimentación del ganado caprino cabras con subproductos de la industria vitivinícola podría contribuir a la seguridad alimentaria, ya que abaratando los costes de producción de los alimentos se participa en el objetivo de "Hambre cero"

ODS 3 Salud y bienestar: El kéfir es una fuente de probióticos, calcio, proteínas y otros nutrientes esenciales, que contribuye a mejorar la nutrición y salud de los consumidores. Los probióticos presentes en el kéfir favorecen una microbiota intestinal saludable, asociada a una mejor inmunidad y prevención de enfermedades. También al reciclar los residuos de la industria agroalimentaria y promover una producción más sostenible, se contribuye a un entorno más saludable y mayor bienestar.

ODS 12: Producción y consumo responsable: Con la utilización de subproductos de la industria agroalimentaria en la alimentación animal se promueve la economía circular y la reducción de residuos lo que fomenta la gestión responsable y el uso eficiente de recursos naturales.

ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres: El empleo de subproductos en la alimentación del ganado contribuye a la conservación de los ecosistemas y la biodiversidad al minimizar la degradación de tierras agrícolas con cultivos intensivos de materias primas para alimentación animal. La elección de una dieta sostenible para las cabras puede tener un impacto positivo en el medio ambiente y en la biodiversidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y características del kéfir de cabra

1.1.1. Aspectos generales

El kéfir es un producto lácteo fermentado que se originó en las montañas del Cáucaso hace muchos siglos y que tradicionalmente es muy popular en Europa del Este y Asia Central, aunque cada vez es más conocido y consumido en otras partes del mundo (Aidarbekova & Aider, 2022).

Dado su alto valor nutritivo y sus propiedades probióticas que resultan beneficiosas para la salud (Schwan *et al.*, 2022) la producción de kéfir ha ido aumentando en todo el mundo. En la Figura 1 se presenta la tendencia en el consumo de kéfir para el año 2028 donde se observa un gran aumento en la demanda en especial en Europa.



Figura 1. Tendencia en el consumo de kéfir para el año 2028.
Fuente: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/kefir-market>

El kéfir es conocido por sus propiedades sensoriales únicas, se caracteriza por un sabor específico típico de las levaduras y una sensación en boca chispeante procedente de componentes como el ácido acético, el etanol y el CO₂ (Barukčić *et al.*, 2017). Se considera un alimento funcional debido a sus efectos terapéuticos y de promoción de la salud, tales como: los efectos antimicrobianos, antitumorales (Leite *et al.*, 2013), reductores del colesterol y estimulantes del sistema inmunológico (Irigoyen *et al.*, 2005).

Los efectos comentados están relacionados con componentes bioactivos, principalmente exopolisacáridos y péptidos bioactivos, presentes en el kéfir después del proceso de fermentación y su composición de proteínas, vitaminas, lípidos, minerales, aminoácidos y microelementos del kéfir (Ahmed *et al.*, 2013). Además, los fermentos del kéfir inhiben el crecimiento de coliformes y otros patógenos, por lo que contribuyen a la seguridad alimentaria (Glibowski *et al.*, 2012).

La fermentación de la leche para obtener kéfir se ha realizado tradicionalmente a partir de los conocidos como “granos o gránulos de kéfir” que son masas gelatinosas, irregulares, con forma de coliflor, de tamaño variable (0,3 a 3,5 cm de diámetro), de color blanco o ligeramente amarillento y consistencia elástica que se inoculan directamente en la leche de diferentes especies. Estos granos contienen aproximadamente un 83% (p/p) de agua, 4-5% (p/p) proteínas y un 10% (p/p) de polisacáridos (Bengoa *et al.*, 2019) y están formados por una matriz de polisacárido (denominado “kefiran”) y proteínas.

Además, los granos contienen una mezcla de microorganismos (bacterias y levaduras) que coexisten e interactúan para producir un producto lácteo fermentado único (Farag *et al.*, 2020). Una vez inoculados los gránulos en la leche y dadas las condiciones de temperatura adecuadas, las bacterias y levaduras presentes en el gránulo comienzan el proceso de fermentación durante el cual algunos de los microorganismos pasan a la leche, dando lugar a un incremento en el número de microorganismos viables en la leche, acompañado de la producción de diferentes metabolitos bioactivos tales como ácido láctico, péptidos bioactivos, exopolisacáridos y bacteriocinas. Al finalizar la fermentación, los gránulos son removidos o separados por filtración de manera tal que pueden ser inmediatamente utilizados para una nueva fermentación o almacenados en condiciones adecuadas (Bengoa *et al.*, 2019).

Actualmente a nivel industrial se utilizan fermentos comerciales en diferentes formatos: liofilizados, congelados o activos, con el objetivo de estandarizar las características del producto final y garantizar la seguridad alimentaria.

En cuanto al proceso de elaboración se caracteriza por realizarse a bajas temperaturas (20-24 °C) y durante tiempos largos que pueden alcanzar incluso las 24 horas hasta alcanzar un pH menor de 4,6.

El kéfir obtenido puede ser consumido inmediatamente o refrigerado a 4°C para su posterior consumo. Esta etapa de refrigeración favorece la fermentación alcohólica con acumulación de CO₂, etanol y vitamina B y, además, conduce a una reducción aun mayor del contenido de lactosa, haciendo el producto más apropiado para personas con intolerancia a este hidrato de carbono (Rosa *et al.*, 2017).

Los principales productos finales de la fermentación del kéfir son ácido láctico, acetaldehído, diacetilo, acetoína, etanol, dióxido de carbono y ácidos grasos libres, por ejemplo, acético, propiónico, butírico, hexanoico (Beshkova *et al.*, 2003).

1.1.2. Características físico-químicas del kéfir

Las propiedades fisicoquímicas del kéfir incluyen un pH ácido de 4,6, alcohol de 0,5% a 2%, sabor ácido y sabor a levadura (Farag *et al.*, 2020). Durante el proceso de fermentación, se observa una disminución del pH y un aumento en la acidez titulable, lo cual es indicativo de la producción de ácido láctico por parte de los granos de kéfir o fermento. Estos cambios afectan significativamente la textura y el sabor del producto final (Giraldo, 2023).

En la Tabla 1 se presenta la composición media del kéfir fabricado con leche de cabra junto a los valores de composición del kéfir elaborado a partir de leche de vaca. Tal y como se observa en dicha Tabla el kéfir de leche de cabra presenta un perfil nutricional más rico en comparación con el kéfir de leche de vaca. Por cada 100 gramos, el kéfir caprino contiene mayores cantidades de grasa (3,79 g), proteína (4 g), ácido láctico (0,710 g) y materia seca (12,09 g) en comparación con el fabricado con leche de vaca (3,37, 3,57, 0,690 y 11,33 g respectivamente).

Tabla 1. Composición del kéfir de leche de vaca y de cabra.

Componente (g/100g)	Kéfir de vaca	Kéfir de cabra
Grasa	3,37	3,79
Proteína	3,57	4
Ácido láctico	0,690	0,710
Materia seca	11,33	12,09

Fuente: Satir & Guzel-Seydim (2016).

La composición química del kéfir depende no sólo del cultivo iniciador, sino también de su origen geográfico, la temperatura y las condiciones de fermentación relacionadas con el tiempo, y especialmente del tipo y volumen de la leche utilizada (Farag *et al.*, 2020).

El contenido de grasa en el kéfir de cabra puede variar dependiendo del tipo de leche utilizada y del proceso de fermentación. En general, la leche de cabra tiene una composición de ácidos grasos única que contribuye a la cremosidad y sabor distintivos del kéfir. Estos ácidos grasos también tienen propiedades antiinflamatorias y pueden mejorar la salud cardiovascular (Trujillo, 2019).

Las propiedades organolépticas, como el sabor, la textura y el aroma, son cruciales para la aceptación del kéfir de cabra entre los consumidores. El kéfir de cabra tiende a tener un sabor ligeramente ácido y una textura cremosa, lo que lo hace atractivo para aquellos que disfrutan de productos lácteos fermentados (Silva *et al.*, 2023). La fermentación también contribuye a un aroma característico que puede variar según las condiciones de fermentación y el tipo de cultivos utilizados (Gómez *et al.*, 2019).

1.1.3. Aspectos microbiológicos del kéfir

En los granos o gránulos de kéfir se encuentran inmersas bacterias ácido lácticas-BAL (10^8 - 10^9 UFC/g de gránulo), bacterias ácido-acéticas (10^5 - 10^6 UFC/g de gránulo) y levaduras (10^7 - 10^8 UFC/g de gránulo) formando una comunidad simbiótica donde los productos generados por algunos microorganismos durante la fermentación pueden ser utilizados como fuente de energía o factores de crecimiento por otros microorganismos presentes en la matriz (Tamang *et al.*, 2016). Los gránulos de distintas procedencias presentan distinta estructura y composición microbiana, lo que se debe no solo al origen diferente sino también al empleo de distintas técnicas y condiciones durante el proceso de elaboración de la bebida fermentada (Marsh *et al.*, 2013).

La Tabla 2 muestra la composición de la microbiota presente en los granos de kéfir mostrando gran variedad de especies de microorganismos que la conforman, particularmente los pertenecientes a las BAL, encontrando a las bifidobacterias en menor proporción (Liu *et al.*, 2006).

Las bacterias se pueden clasificar en dos grupos, bacteria lácticas homofermentativas y heterofermentativas. En general, la microbiota del kéfir está constituida por un 65-80% de *Lactobacillus* (*Lactobacillus kefir*) y el 20-35% de *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus kefiranofaciens*. Además del género *Lactococcus*, *Acetobacter* y *Leuconostoc* (Prado *et al.*, 2015).

También se encuentran diferentes especies de levaduras oxidativas y fermentadoras de lactosa. En el kéfir han sido aisladas más de 23 especies de levadura diferentes, aunque las predominantes son *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir* y *Kluyveromyces marxianus* ssp. *Marxianus* (Prado *et al.*, 2015).

Estos microorganismos se encuentran bien organizados dentro de los granos de kéfir, en las capas periféricas están los *Lactobacillus*, mientras que a medida que se avanza hacia el centro va aumentando el número de levaduras (Ordoñez, 1998).

Tabla 2. Principales grupos de bacterias presentes en el kéfir.

Género	Especie	Características
Lactobacilos	<i>Lactobacillus kefir</i>	Heterofermentativos, Predominan en leche fermentada. 60- 80% en los gránulos.
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	<i>Lactobacillus kéfirgranum</i>	
	<i>Lactobacillus casei</i>	
	<i>Lactobacillus parakéfir</i>	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
<i>Lactobacillus viridescens</i>		
<i>Lactobacillus gasserii</i>		
<i>Lactobacillus crispatus</i>		
Lactococos	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	Acidificación muy rápida.
	<i>Lactis</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp	
Estreptococos	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Raramente encontrado
	<i>Streptococcus durans</i>	
Leuconostoc	<i>Leuconostoc durans</i>	Aporta sabor
Enterococos	<i>Enterococcus durans</i>	
Bacterias ácido acéticas	<i>Acetobacter</i> sp.	Mantiene la simbiosis
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
Otras bacterias	<i>Bacillus</i> spp	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Pseudomonas</i> spp	

Fuente: Farnworth (2008).

1.2. Producción y calidad de la leche de cabra

1.2.1. Generalidades

La producción mundial de leche entera de cabra en el año 2022 fue de 19,2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2024). Esta producción se distribuye de manera muy variable a lo largo de todos los continentes (Figura 2) concentrándose especialmente, en los países en vías de desarrollo. Asia y África engloban cerca del 80% de la producción mundial donde desempeña un papel importante en la nutrición de las respectivas poblaciones, siendo menor en otras áreas como América y Oceanía. En Europa, se localiza el 16% de la producción de leche de cabra, especialmente en Francia (32%), España (22%) y Grecia (20%).

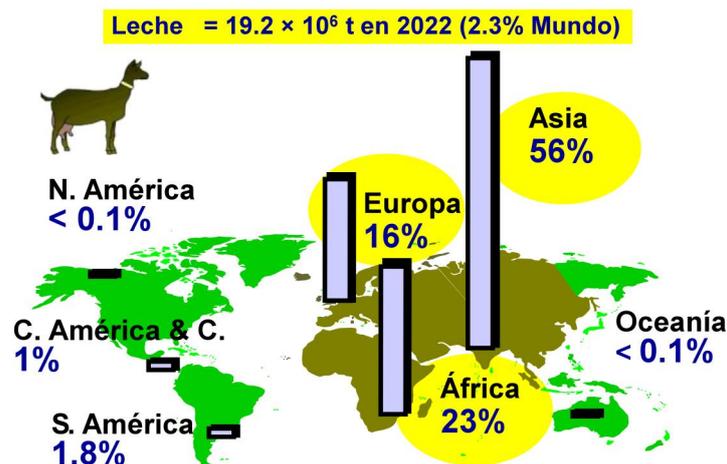


Figura 2. Producción mundial de leche de cabra.
Fuente: FAOSTAT (2024).

La leche de cabra se destina principalmente a su transformación en productos derivados, especialmente diferentes tipos de queso (frescos y curados, de coagulación láctica y enzimática, etc.) y muchos de ellos, con Denominación de Origen Protegida (DOP). En los últimos años la diversificación en la elaboración de otros derivados de la leche de cabra ha ido en aumento como es el caso de las leches fermentadas, tanto de yogur como de kéfir.

La leche de cabra y sus derivados suponen una alternativa muy interesante a la leche de vaca por su característico sabor, textura, tipicidad y la percepción que tiene el consumidor de ella como un producto saludable y natural (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Su consumo resulta una buena opción para personas que sufren trastornos gástricos, como digestiones pesadas y de úlceras alta digestibilidad y fácil asimilación. Además, por su escaso contenido de caseína αS_1 es adecuada para quienes son alérgicos a esta proteína (Bidot-Fernández, 2017).

1.2.2. Propiedades físico-químicas y nutritivas de la leche de cabra

En la Tabla 3 se presenta la composición química de la leche de cabra en distintas razas. Cabe destacar que la leche de las razas más locales (Griega, Nguni y Sarda) tienen una mayor concentración de grasa y proteína y como consecuencia mayor materia seca. Sin embargo, la leche de las razas lecheras más especializadas (Alpina, Saanen, Nubian, etc.) por lo general presentan menores cantidades de grasa y proteína, principalmente debido a la diferencia entre los niveles de producción.

Tabla 3. Composición de la leche de cabra según diferentes autores.

Raza	Materia seca	Proteína	Lactosa	Grasa	Referencias
Murciano-Granadina	14,67	3,72	4,66	5,61	Beltrán <i>et al.</i> (2014)
Alpina	9,17	6,45	5,02	3,6	Costa <i>et al.</i> (2014)
Saanen	11,61	3,55	4,85	3,15	Costa <i>et al.</i> (2014)
Damascus	11,30-12,90	3,20-3,90	2,3-4,9	3,60-4,90	Bhosale <i>et al.</i> (2009)
Granadina	13,57	3,48	4,11	5,23	Sanz Ceballos <i>et al.</i> (2009)
India	12,33-13,66	3,21-4,09	4,19-4,88	3,54-4,54	Bhosale <i>et al.</i> (2009)
Griega	14,8	3,77	4,76	5,63	Raynal-Ljutovac <i>et al.</i> (2008)
Sarda	-	3,9	-	5,1	Raynal-Ljutovac <i>et al.</i> (2008)
Canaria	13,64	4,82	-	3,87	Salvador <i>et al.</i> (2006)
Nubian	13,2-14,6	3,90-4,50	-	4,40-4,50	Soryal <i>et al.</i> (2005)
Boer	-	4,97-5,03	4,48-4,97	6,13-6,39	Mmbengwa <i>et al.</i> (2000)
Nguni	-	4,54-4,95	4,27-4,51	6,04-7,48	Mmbengwa <i>et al.</i> (2000)
	9,50-16,50	2,40-6,45	2,30-4,97	2,7-7,48	Rango

Fuente: Quintanilla (2019).

Los valores que se presentan deben considerarse como orientativos, ya que los componentes de la leche de cabra además de por la raza varían de forma natural a lo largo de la lactación, viéndose afectados por numerosos factores como el tipo y época de parto, edad del animal, estado sanitario, ordeño y alimentación entre otros (Salvador & Martínez, 2007).

La composición de la grasa de la leche de cabra se caracteriza por glóbulos de tamaño pequeño, altos niveles de ácidos grasos de cadena corta como el ácido caproico, caprílico y cáprico y también ácidos grasos de cadena media.

La leche de cabra proporciona una matriz de fácil acceso, rica en una gran variedad de nutrientes y proteínas esenciales con perfiles de aminoácidos equilibrados, así como minerales y vitaminas que son importantes para respaldar muchas funciones corporales (Satir *et al.*, 2015).

1.2.3. Calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra

Las cualidades nutritivas de la leche la sitúan entre los alimentos básicos por excelencia, pero desde su secreción en el interior de la ubre hasta su llegada al consumidor, puede encontrar un elevado número de riesgos, como son: el desarrollo incontrolado de microorganismos, infecciones por gérmenes patógenos de los animales productores, absorción de olores extraños, producción de malos sabores, presencia de sustancias químicas extrañas (antibióticos, detergentes, desinfectantes, pesticidas, metales, partículas de suciedad, etc.), lo que puede afectar de forma negativa la calidad higiénica del producto.

La legislación europea relativa a la higiene de los alimentos de origen animal destinados a la alimentación humana (Reglamentos CE nº 852, 853 y 854/2004) realiza una valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en base a su contenido en gérmenes totales, células somáticas y residuos de antibióticos, estableciendo para cada uno de estos parámetros unos valores máximos para que la leche pueda ser comercializada en el ámbito de la Unión europea.

En el caso de la leche de cabra para el recuento de gérmenes totales límites corresponden a 500.000 UFC/ml para la leche destinada a la elaboración de productos derivados sin tratamiento térmico y a 1.500.000 UFC/ml para la leche destinada a productos que incluyan en su elaboración algún tipo de tratamiento térmico

A su vez, el Recuento de Células Somáticas (RCS) es otro de los parámetros utilizados de manera rutinaria para valorar la calidad higiénica de la leche cruda ya que constituye un buen indicador del nivel sanitario de los animales, principalmente en relación a la presencia de mamitis subclínica. Para el ganado caprino la situación no está tan clara ya que determinados factores no infecciosos como el estado de lactación, la aparición del celo o el manejo de los animales, pueden influir de manera importante sobre el recuento de células somáticas, especialmente en el ganado caprino (Paape *et al.*, 2007). Este hecho, unido a la particularidad de los sistemas de producción y a la menor importancia socioeconómica de la leche caprina ha hecho que todavía no haya sido posible establecer los límites para este parámetro dejando la cuestión pendiente de estudio.

Otro de los aspectos considerados en la legislación para valorar la calidad higiénica de la leche cruda es la presencia de residuos de inhibidores, entre los que se encuentran los antibióticos. La principal causa de la presencia de estas sustancias en la leche es la utilización de medicamentos veterinarios a base de antibióticos para el tratamiento y profilaxis de las enfermedades infecciosas del ganado, especialmente la mamitis.

1.3. El uso de subproductos en la alimentación del ganado caprino

1.2.1. Consideraciones previas

La alimentación del ganado cumple un papel fundamental y determinante sobre la calidad de los productos animales y en el caso de la leche se considera el factor extrínseco de mayor influencia, no sólo sobre la cantidad producida, sino también sobre la calidad de la misma (composición química y propiedades tecnológicas) y, en consecuencia, sobre las características de los productos derivados.

En la Unión Europea, la alimentación del ganado lechero representa más del 50% del coste total de producción (Morand-Fehr *et al.*, 2007). Por lo que y debido a la baja rentabilidad del sector de los pequeños rumiantes, es muy importante reducir el coste de su dieta (Garg *et al.*, 2013).

Durante los últimos años, el estudio del valor nutritivo de los subproductos o residuos agroindustriales ha sido uno de los principales campos de investigación en la nutrición de rumiantes ya que estos productos pueden reemplazar a los alimentos concentrados en las dietas de los animales, sin afectar a las características del producto final (leche, queso, yogur, carne y productos cárnicos) con mejores resultados económicos (Fava *et al.*, 2013). Además, el uso de subproductos agroindustriales es de gran interés desde el punto de vista medioambiental ya que se reduce la descarga de desechos y el costo de gestión de residuos.

La valorización de subproductos en materias primas para alimentación animal contribuye a la economía circular mejorando la eficiencia de la producción agroalimentaria y la interconexión de la actividad agrícola, ganadera y agroindustrial. Se reducen el consumo de energía y agua, las necesidades de suelo y las emisiones de gases de efecto invernadero para la producción de piensos, con un beneficio económico para los ganaderos al reducir los costos de alimentación animal y aumentando la competitividad de los procesos de producción ganadera (Muhlack *et al.*, 2018).

Esta revalorización mediante un uso alternativo también afecta positivamente a los agricultores al aumentar los ingresos y ayudará a responder a las demandas de los consumidores de alimentos saludables, nutritivos, sensoriales, de origen ético y sostenible.

En el caso del ganado caprino su explotación ha estado muy relacionada con la utilización de subproductos locales procedentes de la industria agroalimentaria. Sin embargo, para optimizar sus producciones, en especial la láctea, requiere cereales y oleaginosas, que

son principalmente importados, generando dependencia extranjera y elevando los costes de la alimentación.

Por ello es importante encontrar materias primas alternativas y el uso de subproductos de la industria agroalimentaria es una de ellas. No obstante, existen inconvenientes en el uso de subproductos agrícolas en la alimentación animal: la disponibilidad estacional, la falta de conocimiento sobre su conservación, la falta de conocimiento sobre su efecto en la producción, fertilidad y calidad de productos animales, incluida la leche de cabra, y la falta de conocimiento sobre su efecto en los productos animales derivados (Fava *et al.*, 2013).

Según Gasa y Castrillo (1992) para determinar si un subproducto puede utilizarse para la alimentación animal, es necesario saber su composición, digestibilidad y aceptación por los animales, así como su disponibilidad y posibilidades de conservación.

Por otro lado, el precio y el valor nutricional de estos subproductos deben ser adecuados (incluidos los costos de transporte y procesamiento), debe haber mano de obra adicional disponible para su manipulación y distribución, y deben ser seguros (libres de contaminantes y residuos).

1.2.1. Residuos de la industria vitivinícola en alimentación animal

La uva (*Vitis vinífera*) es uno de los cultivos de gran importancia y mayor envergadura a nivel mundial para la industria vitivinícola (Gonzales, 2018). Como consecuencia de su uso en lo que respecta a la producción de vino surgen subproductos como el orujo de uva que representa el 62%, las lías de vino el 14% y el raspón el 12% de los residuos orgánicos (Naziri *et al.*, 2014). El orujo de uva que es el residuo mayoritario esta formado por restos de pulpa, raspones , hollejos y pepitas.

España ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en producción de uva con 6.800.000 t/año, generando 1.200.000 t/año de subproducto (FAOSTAT, 2024) extendido por toda la geografía nacional.

El orujo está formado por el subproducto generado tras el prensado de la uva y está compuesto por restos de pulpa, raspones o raspones, hollejos y pepitas, que pueden provocar un impacto ambiental negativo (Muhlack *et al.*, 2018), por lo que se requieren rutas alternativas para su valorización.

La gestión del orujo sigue siendo un problema, aunque existen ayudas para la destilación. Así, su aprovechamiento mediante usos alternativos distintos a la destilería

contribuirá a la valorización del subproducto, reforzando la sostenibilidad del sector vitivinícola y al mismo tiempo contribuyendo a reducir el impacto ambiental.

La composición del orujo de uva incluye polisacáridos de la pared celular, como hemicelulosas y celulosa, pectina, lignina, proteínas, grasas y minerales, azúcares no fermentados, alcohol, fenoles, taninos, pigmentos y otros compuestos bioactivos (Muhlack *et al.*, 2018; Luga & Mironeasa, 2020).

Los compuestos fitoquímicos se consideran promotores de la salud., ya que se ha demostrado que tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas para la prevención de enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios y estados fisiopatológicos degenerativos, con actividad en salud humana (Teixeira *et al.*, 2014) y animal (Corredu *et al.*, 2020).

Entre sus compuestos bioactivos destacan los compuestos fenólicos, como los ácidos benzoico e hidroxicinámico, catequinas, proantocianidinas, flavonoles y antocianinas (Luga & Mironeasa, 2020).

A pesar de todos estos efectos beneficiosos, también se han descrito efectos nocivos de los polifenoles en los procesos reproductivos cuando estos subproductos no se utilizan adecuadamente. Estos compuestos actúan como disruptores hormonales y pueden alterar el equilibrio hormonal y las funciones reproductivas tanto en hombres como en mujeres (Hashem *et al.*, 2020).

La inclusión de orujo de uva en las raciones para rumiantes en grandes cantidades tiene efectos negativos sobre la digestibilidad ruminal y el consumo, y puede limitar la producción (Moate *et al.*, 2020), dado su alto contenido en taninos. Los taninos, en niveles adecuados, provocan efectos deseables como menor degradabilidad de las proteínas en el rumen y metanogénesis e hidrogenación de ácidos grasos, que permiten un perfil lipídico más saludable de los productos derivados (Hassan *et al.*, 2020).

Las cabras son una especie capaz de aceptar un mayor nivel de taninos en su dieta que ovinos o vacunos, en condiciones de variedad alimentaria, dada la presencia de proteína salival con capacidad de unir taninos (Ventura-Cordero *et al.*, 2017) que bloquean su actividad y, por tanto, el efecto negativo sobre el rumen y la limitación del consumo observado en otras especies (Corredu *et al.*, 2020).

No existen casi trabajos publicados sobre el uso del orujo de uva en la dieta del ganado caprino, y los resultados no son concluyentes (Tsiplakou *et al.*, 2008). Por ello resulta necesario realizar estudios sobre los efectos de la suplementación de la ración con orujo de uva en cabras y cuáles serían los niveles adecuados de inclusión como forma de

incorporar los beneficios de los fenoles para la salud animal. Además, es importante conocer los efectos de esta suplementación sobre la composición de la leche y los derivados lácteos obtenidos.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la dieta empleando subproductos de la industria vitivinícola, como es el orujo de uva negra, sobre la calidad del kéfir de leche de cabra.

Los objetivos específicos planteados han sido:

- Analizar los efectos de la introducción del orujo de uva negra en la alimentación de cabras sobre la calidad de la leche empleada para la elaboración del kéfir de cabra
- Evaluar el impacto del uso de orujo de uva negra en la dieta de los animales en el proceso de elaboración del kéfir de leche de cabra
- Establecer las características físico-químicas y microbiológicas del kéfir elaborado con leche de cabras alimentadas con una dieta que incluye orujo de uva negra
- Estudiar la influencia del tiempo de conservación en refrigeración sobre las características físico-químicas y microbiológicas del kéfir de cabra.

Con este estudio se pretende contribuir a mejorar la eficiencia productiva y la sostenibilidad del ganado caprino lechero, reduciendo los costes de alimentación y el impacto ambiental evaluando el posible efecto de la dieta sobre la calidad de la leche y los productos derivados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

Para la realización del estudio se emplearon 2 lotes de cabras de raza Murciano Granadina del rebaño experimental de ganado caprino de la Universidad Miguel Hernández (Orihuela, Alicante), que fueron alimentadas con una dieta tipo (Control) y otra suplementada con un 12 % de ensilado de orujo de uva negra (Orujo). La preparación y características de las dos dietas utilizadas ha sido descrita por Fernández *et al.* (2024). La leche obtenida de los 2 lotes de cabras en tres momentos diferentes se transportaba en refrigeración a la Universitat Politècnica de València donde se realizaron 3 fabricaciones de kéfir de leche de cabra de cada uno de los grupos experimentales. En cada una de las fabricaciones se prepararon 42 kéfires de cada uno de los 2 lotes (Control y Orujo) por lo que se elaboraron un total de 252 kéfires.

Se analizó la calidad fisicoquímica e higiénico-sanitaria de la leche cruda de cada fabricación, así como los análisis fisicoquímicos y microbiológicos del kéfir se realizaron a diferentes tiempos de conservación en refrigeración. (1, 14 y 28 días)

3.2. Leche de cabra

Desde el momento del parto los animales se ordeñaron una vez al día en una sala de ordeño 2x12x12 en línea alta (Gea Farm Technologies, Bönen, Alemania) y la leche se almacenaba en un tanque de refrigeración a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ para su envío a la Universitat Politècnica de València donde se realizaron las elaboraciones de kéfir de cabra.

La leche cruda se analizó el mismo día de su recepción en el LICOVAL (Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana), para determinar sus características fisico-químicas mediante un equipo de infrarrojo medio MilkoScan FT+ (Foss, Hillerød, Dinamarca), la calidad bacteriológica (Bactoscan, Foss) y el Recuento de Células Somáticas (Fossomatic, Foss)

3.3. Proceso de elaboración de kéfir

Las fabricaciones de kéfir se realizaron en la Planta Piloto del Departamento de Ciencia Animal de la UPV empleando los equipos y material disponibles en dicha planta.

Para garantizar la calidad microbiológica en la elaboración del kéfir la leche se pasteurizó a 90°C durante 5 minutos empleando una Thermomix TM6 (Vorwerk, Alemania).

Una vez realizada la pasteurización la leche se homogeneizaban y se enfriaban a temperatura ambiente (22-25°C) para proseguir con la inoculación del fermento.

El fermento comercial que se utilizó fue CHOOZIT Kefir DG (Dairy Connection, Madison, EEUU), que produce un kéfir ligeramente burbujeante de sabor suave, textura homogénea y de espesor medio a grueso. Este fermento consta de: microflora de granos de kéfir, levaduras del kéfir, *Lactococcus* subsp., *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp y *Streptococcus thermophilus*.

Para la aplicación del fermento se pasteurizó 500 ml de leche de cabra, a 90°C durante 5 min, en la que se disolvió un sobre entero del fermento comercial. Dado que la concentración recomendada por el fabricante es de 1 sobre por cada 1000 litros de leche y que el volumen empleado para la elaboración era muy reducido, se consideró adecuado inocular en cada mezcla como dosis de fermento 25 ml/L lo que supone 0,25 g de fermento por litro de leche.

La fermentación se llevó a cabo a una temperatura entre 22-24°C empleando un incubador (Marca Suministros Químicos Arroyo S.L. y Modelo Doctor Arroyo) (Figura 3). Durante todo el proceso de incubación se realizó una medida de pH de manera continua (Figura 4) con pH metros Hanna modelo HI522 de canal doble (Hanna instruments, Eibar, España) previamente calibrados que registraban el pH cada 15 minutos y se consideró finalizada al llegar a un $\text{pH} \leq 4,55$. Una vez alcanzado este pH los envases de kéfir se refrigeraron a 4°C.



Figura 3. Incubador con envases de kéfir en el interior.



Figura 4. pHmetro de doble canal para medición continua durante el proceso de fermentación del kéfir.

3.4. Análisis fisicoquímicos

Todos los análisis físico-químicos del kéfir se realizaron sobre una muestra obtenida a partir de la mezcla de seis unidades individuales de kéfir de cada grupo y fabricación.

3.4.1. Acidez

La acidez del kéfir se midió sobre el producto final (día 1, 14 y 28 de refrigeración) mediante la medida del pH con el equipo portátil Sension+ pH1 (Hach, Iowa, EEUU) previamente calibrado. También se determinó la acidez valorable según el método Dornic (Casado, 1991) empleando una dilución de la muestra 1:1 del kéfir con agua destilada.

Para la medida de la acidez Dornic se tomaron 10 ml de la dilución en un vaso de precipitados y se le añadieron 4 o 5 gotas de fenolftaleína al 1% (ITW Panreac, Barcelona, España) como indicador, valorando la mezcla con sosa Dornic 0,111 mol/l (ITW Panreac, Barcelona, España) hasta conseguir una tonalidad rosa pálido permanente (Figura 5). Los grados Dornic se calcularon a partir del volumen consumido en la neutralización teniendo en cuenta que 0,1 ml de sosa Dornic equivale a un grado Dornic (°D) y multiplicando por el factor de dilución.



Figura 5. Determinación de la acidez valorable del kéfir según el método Dornic.

3.4.2. Composición

El análisis de la composición del kéfir se realizó empleando una dilución 1:1 de kéfir en agua destilada, mediante un equipo automático (Figura 6) basado en la espectrofotometría de infrarrojo (MilkoScan FT+, Foss, Hillerød, Dinamarca), el cual previamente había sido calibrado para leche de cabra en cuanto al contenido de grasa, proteína, lactosa y materia seca. También periódicamente se comprobaba la calibración mediante los métodos oficiales de referencia.



Figura 6. Equipo de infrarrojos Milkoscan FT+ para análisis de composición del kéfir

3.5. Análisis microbiológico

3.5.1. Recuentos de bacterias y levaduras

Las muestras de kéfir de cabra se llevaron al laboratorio de microbiología de la UPV y se trataron de forma aséptica en cabina de flujo.

En primer lugar, se analizaron 10 gramos de kéfir de cabra obtenido a partir de la mezcla de 6 muestras conservadas en refrigeración. Se depositaron en asepsia en una bolsa estéril para hacer los análisis, donde se añadieron 90 ml de agua de peptona tamponada esterilizada previamente. La bolsa se homogeneizó en un Stomacher (Sussex Occidental, Reino Unido) durante 3 minutos.

La muestra homogeneizada corresponde con la primera dilución (10^{-1}) y a partir de ahí, en una cabina se hicieron las diluciones decimales con micropipeta de 1 ml desde 10^{-2} hasta 10^{-8} en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, agitándose el tubo de ensayo previamente a cada dilución.

Posteriormente, con una micropipeta se transfirieron 0,1 ml de cada dilución a las placas por duplicado. Se realizaron los tres recuentos simultáneamente utilizando medios de cultivo distintos para cada recuento.

- Agar MRS (Scharlau, Barcelona, España) para el recuento de lactobacillus.
- Agar M17 (Scharlau, Barcelona, España) para el recuento de lactococcus.
- Agar de Patata Dextrosada suplementado con cloranfenicol (PDA+Cl) (Scharlau, Barcelona, España) para recuento de levaduras.

El inóculo depositado en la superficie del medio se distribuyó con asa Digralsky estéril. Las placas para los recuentos de lactobacilos y lactococos en posición invertida se colocaron en caja de anaerobiosis (Figura 7) a las que se le añaden sobres para generar una atmósfera anaerobia AnareroGen (Thermo Scientific™ Waltham, MA, EE. UU) y se llevaron a estufa termostataada a 37°C durante 72 h.



Figura 7. Caja de anaerobiosis con placas de cultivo.

Las placas para los diferentes recuentos se incuban en las siguientes condiciones:

- Recuento de lactobacillus en Agar MRS, incubación a 37 °C, durante 72 h en anaerobiosis.
- Recuento de lactococcus en Agar M17 incubación a 37 °C, durante 72 h en anaerobiosis.
- Recuento de levaduras en Agar de Patata Dextrosada suplementado con cloranfenicol (PDA+Cl) incubación a 28 °C durante 4 días en aerobiosis.

Una vez incubadas las placas, se procedió al recuento de las colonias. Para obtener los resultados, se seleccionaron las placas de las diluciones que contenían entre 15 y 300 colonias totales (Figura 8). Para los recuentos, se utilizó un dispositivo especializado en contar colonias (Colony Counter (Digital S, P Selecta) que, con ayuda de una lupa y un sistema de conteo, permitía el recuento de las colonias blancas.

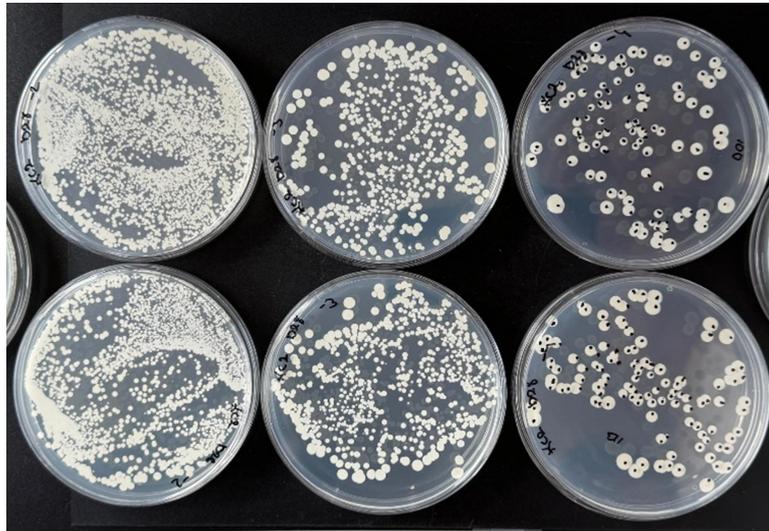


Figura 8. Recuento de lactobacilos en superficie en agar MRS

3.5.2. Identificación de levaduras

Para la identificación de levaduras se empleó el sistema API® ID 32C (BioMérieux, Lyon, Francia) (Figura 9). Se tomaron una o varias colonias idénticas de levadura y se realizó una suspensión en un tubo de 2 ml de agua estéril de turbidez igual al patrón 2 de McFarland. A continuación, se abrió una ampolla de API® C Médium, y se transfirió 250 µl de la suspensión anterior y se homogeneizó bien con la pipeta. Posteriormente, se inoculó los pocillos de la galería con 135 µl de la suspensión realizada en API® C Médium. Se cerró con la tapa e incubó a 28°C durante 2-3 días. Se comparó con el control (pocillo 0) y se anotó las cúpulas que aparecen más turbias que el control. Finalmente, se leyeron los resultados con el banco de datos del sistema API® LAB.

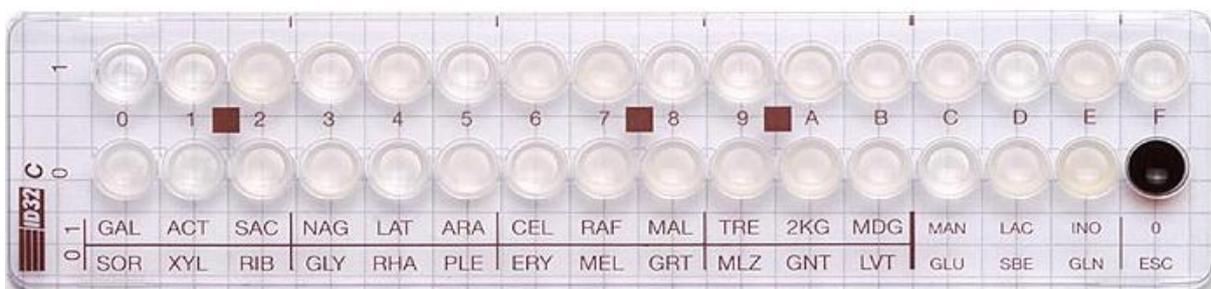


Figura 9. Tira API® ID32C para identificación de levaduras

3.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion XIX. Se realizó el análisis descriptivo de los datos y se realizó un ANOVA a una vía para evaluar el efecto de la dieta (Control y Orujo) sobre la calidad de la leche y el

proceso de fabricación del kéfir de leche de cabra. También se aplicó un ANOVA multifactorial para estudiar el efecto de la dieta (D: Control y Orujo) y del tiempo de conservación (t = 1, 14 y 28 días), así como de la interacción de estos dos factores (D x t), sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del kéfir de leche de cabra según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + t_j + (D_i \times t_j) + \varepsilon_{ijk}$$

Siendo: Y_{ijk} = Variable dependiente; μ = Media general; D_i = Alimentación de los animales; t_j = tiempo de conservación; $D_i \times t_j$ = interacción; ε_{ijk} = Error residual

La comparación de medias se llevó a cabo con el test de Tukey HSD con objeto de determinar diferencias estadísticamente significativas al 95 % ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características de la leche de cabra

Las características físico-químicas e higiénico-sanitarias de la leche de cabra con la que se elaboraron los distintos lotes experimentales de kéfir se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Características físico-químicas e higiénico sanitarias de la leche de cabra utilizada en la elaboración de los distintos lotes experimentales de kéfir.

Parámetros	Control			Orujo		
	Media \pm SD	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	Mínimo	Máximo
pH	6,78 \pm 0,04	6,71	6,82	6,76 \pm 0,04	6,71	6,80
Dormic	13,92 \pm 0,86	13,00	15,00	13,16 \pm 0,25	13,00	13,50
Grasa (%)	4,69 \pm 0,07 ^a	4,63	4,76	4,95 \pm 0,14 ^b	4,87	5,11
Proteína (%)	3,44 \pm 0,02	3,42	3,47	3,51 \pm 0,04	3,47	3,55
Lactosa (%)	4,62 \pm 0,05	4,57	4,67	4,63 \pm 0,06	4,58	4,69
ESM (%)	8,71 \pm 0,04	8,66	8,74	8,86 \pm 0,07	8,78	8,91
MS (%)	13,4 \pm 0,07 ^a	13,35	13,48	13,81 \pm 0,19 ^b	13,66	14,02
Log RCS	6,00 \pm 0,07	5,94	6,08	6,17 \pm 0,14	6,00	6,26
Log RGT	4,92 \pm 0,20	4,78	5,15	5,15 \pm 0,22	4,94	5,38

ESM: Extracto Seco Magro; MS: Materia Seca; RCS Recuento Células Somáticas; RGT: Recuento Gérmenes Totales; a, b: diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La leche de cabra presentó una composición química característica de esta especie, con valores similares a los indicados por otros autores en leche de cabras de la misma raza, Murciano-Granadina (Beltrán *et al.*, 2014).

Los resultados del análisis de la varianza del factor dieta sobre la calidad físico-química e higiénico sanitaria de la leche solo han mostrado diferencias significativas en el porcentaje de grasa ($p < 0,05$) siendo superior en la leche de las cabras alimentadas con ensilado de orujo de uva negra (Orujo) que en el grupo Control (4,95 vs 4,69) y,

consecuentemente, en la Materia Seca ($p < 0,05$) que también resulto superior en el grupo Orujo (13,81 vs 13,4). En los otros parámetros de calidades de la leche no se observaron diferencias debidas a la alimentación de las cabras.

El aumento en el porcentaje de grasa conduce a un incremento en la materia seca total de la leche, ya que la grasa es un componente significativo de la materia seca. Es importante destacar que estos cambios, aunque pequeños en términos absolutos, son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) lo que señala el efecto positivo del ensilado de orujo de uva negra en la composición de la leche.

Estos resultados pueden ser debido a que el orujo de uva negra es rico en compuestos bioactivos como polifenoles y antioxidantes. Los polifenoles podrían estar jugando un papel crucial en el metabolismo lipídico de las cabras. Estos compuestos tienen la capacidad de modular la expresión de genes relacionados con la síntesis de grasa en la glándula mamaria, aumentando la producción de grasa. Además, el orujo de uva es rico en fibra y carbohidratos complejos (López-Astorga *et al.*, 2022).

Domínguez (2013), empleando otro subproducto como es la pulpa de naranja en la dieta de cabras Murciano-Granadinas, también observó un incremento del contenido de grasa (5,13% vs 4,66%; $p < 0,001$) y materia seca (14,06% vs 13,59%, $p < 0,001$) en la leche, no viéndose afectados el resto de componentes ($p > 0,05$).

En cuanto a la calidad higiénica, ambos tipos de leche presentaron similares recuentos de células somáticas (Log RCS (cél/ml): $6,00 \pm 0,07$ y $6,17 \pm 0,14$; $p > 0,05$) con valores de 1.000.000 y 1.479.108 células/ml para cada uno de los grupos experimentales que resultan bastante característicos de la leche de cabra que en general muestra elevados recuentos de células somáticas (Marín *et al.*, 2010). A su vez el recuento de gérmenes totales (RGT) tampoco presentó diferencias entre los dos grupos experimentales (Log RGT (ufc/ml): $4,92 \pm 0,20$ y $5,15 \pm 0,22$; $p > 0,05$) con recuento de 83.176 y 141.252 ufc/ml que indican una buena calidad bacteriológica, ya que el recuento es menor al límite máximo establecido en la UE para la elaboración de productos de leche de oveja y cabra a partir de leche cruda (500.000 ufc/ml).

4.2. Efecto de la dieta sobre el proceso de fermentación del kéfir de leche de cabra

En la Figura 10 se presenta la evolución del pH durante el proceso de elaboración del kéfir fue similar en ambos tipos de leche, presentando una curva de acidificación característica de este proceso.

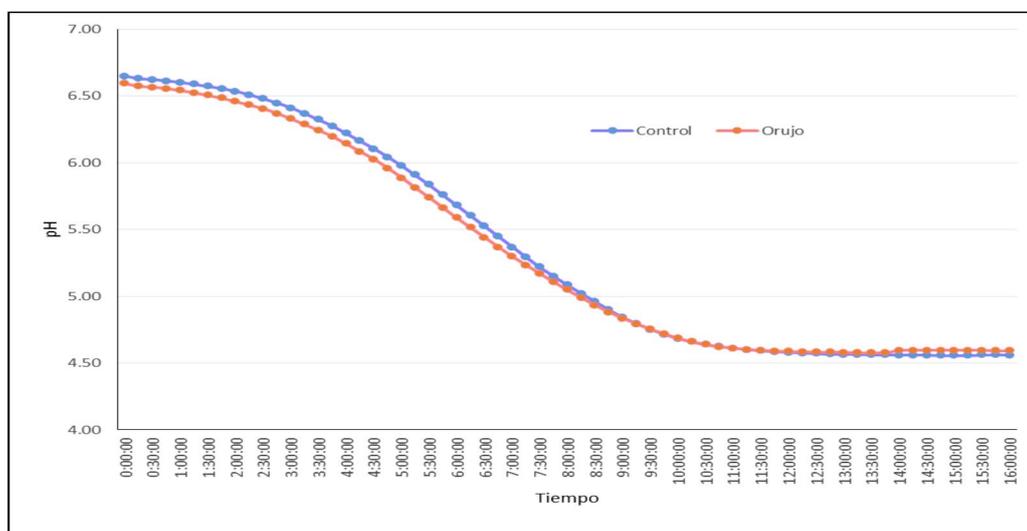


Figura 10. Efecto de la presencia de ensilado de orujo de uva negra en la dieta sobre la cinética de acidificación del kéfir de leche de cabra.

En la Tabla 5 se presentan algunos de los parámetros característicos del proceso de fermentación del kéfir de cabra de los dos lotes experimentales, Aunque el tiempo transcurrido hasta alcanzar el pH de 4,55 fue superior en la leche del grupo orujo las diferencias estadísticas no fueron significativas ($p < 0,05$).

Tabla 5. Parámetros del proceso de elaboración del kéfir de leche de cabra

Parámetros	Control	Orujo
pH inicial	6,65 ± 0,05	6,59 ± 0,08
pH final	4,55 ± 0,01	4,55 ± 0,02
Tiempo de incubación	15 h 34 m ± 0,32	16 h 32 m ± 2,16

En un estudio experimental de Ertekin, & Guzel-Seydi (2010) al fabricar kéfir y reemplazar parte de la grasa de la leche por sustitutos como la inulina, y luego almacenar este kéfir durante diferentes períodos, no se observaron cambios significativos en el nivel de acidez del producto final. Por tanto, los sustitutos de grasa y el tiempo de almacenamiento

no alteraron el proceso de fermentación de manera que afectara significativamente la producción de ácido láctico.

Güzel-Seydim *et al.* (2005) encontraron que las cabras alimentadas con una dieta rica en forrajes producen leche con un perfil de ácidos grasos diferente y un contenido proteico que puede influir en la fermentación del kéfir. El pH inicial típico es alrededor de 6.5 a 6.7. Durante la fermentación, el pH disminuye rápidamente debido a la actividad de las bacterias lácticas, alcanzando un pH final de aproximadamente 4.2 a 4.6 después de 24 horas de incubación a 25°C. También observó que la fermentación del kéfir de leche de cabra puede ser más rápida que la de la leche de vaca, lo que se atribuye a la composición de la leche y la mayor actividad de las bacterias en la leche de cabra.

En un estudio comparativo sobre el proceso de fermentación del kéfir de leche de vaca y de leche de cabra, Magalhães *et al.* (2011) encontraron que el kéfir de leche de cabra tiene un pH inicial similar al de la leche de vaca, pero la caída del pH es más rápida en la leche de cabra. El pH final del kéfir de leche de cabra se situó alrededor de 4.3 después de 24 horas de fermentación a 25°C, mientras que el kéfir de leche de vaca tuvo un pH final ligeramente más alto, alrededor de 4.5. Este resultado se atribuyó a la diferente composición de la leche de cabra, que tiene un mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta y media, facilitando una fermentación más activa y rápida.

Giraldo (2023) estudió las características fisicoquímicas y organolépticas del kéfir de leche de cabra y lactosuero, realizando el análisis en diferentes tiempos de almacenamiento refrigerado (1, 7, 14 y 21 días). En este estudio solamente la acidez titulable (Dornic) del kéfir de leche de cabra se incrementó significativamente durante los primeros 7 días de almacenamiento, pero el valor de pH se mantuvo constante entre los días 7 y 21, sugiriendo una baja actividad del fermento durante este periodo.

4.3. Efecto de la dieta y el tiempo de conservación sobre las características físico-químicas del kéfir de leche de cabra

La incorporación de ensilado de orujo de uva negra en la dieta tampoco parece afectar en gran medida a las características físico-químicas del kéfir de leche de cabra (Tabla 6) solamente en el valor de pH y la materia seca se presentaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. En cuanto al pH fue mayor en los kéfires del grupo Control que en aquellos elaborados a partir de leche de cabras alimentadas con la dieta que contiene orujo de uva negra (4,53 vs 4,48; $p > 0.01$). Mientras que el contenido en materia seca fue menor significativamente en el kéfir del grupo Control (13,04 vs 13,41%;

$p < 0,05$) lo que puede deberse a un mayor contenido en grasa de los kéfires elaborados con la leche del grupo Orujo que, aunque resulta mayor en este grupo, las diferencias estadísticas no fueron significativas ($p > 0,05$).

Los resultados sugieren que la composición de la dieta de las cabras puede influir en las características del kéfir final, aunque el efecto parece ser limitado. El pH ligeramente inferior en el kéfir del grupo con orujo podría estar relacionado con cambios en la actividad de los microorganismos del kéfir, posiblemente debido a la presencia de compuestos bioactivos provenientes del orujo de uva en la leche.

En cuanto al tiempo de conservación en refrigeración no afectó significativamente a ningunas de las variables estudiadas al igual que la interacción entre los dos factores estudiados tampoco resultó significativa en ningún caso.

En un estudio sobre kéfir en Noruega, se observó que el pH disminuyó significativamente ($PAG < 0,05$) durante la primera semana de almacenamiento de 4,50 a 4,41 y permaneció en el mismo nivel durante el almacenamiento (Grønnevik *et al.* 2011).

Marchena & Vergara, (2016) no obtuvieron diferencias significativas al estudiar el pH del kéfir de leche de cabra y del kéfir de leche de vaca durante 9 días pero sí que se encontró que el pH disminuyó en relación con el tiempo de almacenamiento en ambos casos. El pH promedio del kéfir de leche de vaca fue de 4,46 y del kéfir de leche de cabra, fue de 4,48.

A su vez, Irigoyen *et al.* (2005) en kéfir de leche de vaca inoculada con distintas proporciones de granos de kéfir, detectaron menores concentraciones de grasa y materia seca a partir de los 14 días de almacenamiento lo que podría estar relacionado, según estos autores, con el crecimiento de hongos, que son uno de los principales agentes lipolíticos de las leches fermentadas. Este aspecto no se ha visto confirmado en los resultados obtenidos en el presente trabajo donde a pesar de que los porcentajes de grasa disminuyeron durante el almacenamiento las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 6. Acidez y composición química del kéfir de leche de cabra según la dieta (D) y el tiempo de almacenamiento (t) y su interacción (D x t).

Parámetros	Dieta (D)		Tiempo de almacenamiento (t)				ANOVA			
	Control	Orujo	SE	1	14	28	SE	D	t	D x t
Acidez										
pH	4,53 ^b	4,48 ^a	0,013	4,49	4,50	4,51	0,016	**	ns	ns
Dornic	83,28	76,78	3,042	74,08	81,67	84,33	3,726	ns	ns	ns
Composición										
Grasa (%)	4,72	4,93	0,101	4,99	4,84	4,68	0,124	ns	ns	ns
Proteína (%)	4,21	4,29	0,034	4,19	4,29	4,27	0,046	ns	ns	ns
Lactosa (%)	3,63	3,67	0,047	3,55	3,74	3,68	0,058	ns	ns	ns
ESM (%)	8,31	8,47	0,080	8,22	8,50	8,45	0,098	ns	ns	ns
MS (%)	13,04 ^a	13,41 ^b	0,111	13,21	13,34	13,13	0,136	*	ns	ns

ESM: Extracto Seco Magro; MS: Materia Seca; **, *, indica niveles de significación de $p < 0,010$ y $p < 0,05$ respectivamente; ns = no significativo; a, b, valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias estadísticamente significativas

4.4. Efecto de la dieta y el tiempo de conservación sobre las características microbiológicas del kéfir de leche de cabra

Las características microbiológicas del total de las muestras de kéfir recién fabricados se pueden observar en la tabla Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de los recuentos de lactobacilos, lactococos y levaduras del kéfir de leche de cabra

Parámetro (Log)	Media \pm SD	Mínimo	Máximo
Lactobacilos	$5.5 \cdot 10^8 \pm 2.8 \cdot 10^8$	$8.0 \cdot 10^7$	$8.8 \cdot 10^8$
Lactococos	$8.5 \cdot 10^8 \pm 5.1 \cdot 10^8$	$4.0 \cdot 10^8$	$1.8 \cdot 10^9$
Levaduras	$7.6 \cdot 10^3 \pm 5.2 \cdot 10^3$	$2.6 \cdot 10^3$	$1.4 \cdot 10^4$

Los resultados son similares a los obtenidos por otros autores en el caso de lactococos y lactobacilos pero algo menores en el caso de las levaduras (Irigoyen *et al.* 2005)

De los diferentes recuentos de levaduras se tomaron algunas colonias al azar para su identificación con la tira API® ID 32C (Figura 11 y 12)



Figura 11. Levaduras crecidas en PDA y resultado de la tira API® ID 32C



Figura 12. Tira API ID 32C crecida que da como resultado *Candida famata*.

De las colonias identificadas el 75% presentón como resultado *Candida famata* y el 25% de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros autores también encuentran *Candida famata* en los granos de Kefir bien en su forma anamorfa o telemorfa que se denomina *Debaromyces hanseii*.(Lopitz-Otsoa *et al.* 2006). Las cepas de *Debaromyces hanseii* tambien se utilizan para estudiar el efecto de las levaduras en las fermentaciones tipo kefir. Las levaduras suelen proporcionar un sabor equilibrado y niveles medios a altos de formación de CO₂ (Paucean *et al.* 2009).

Las medias de las tres fabricaciones para los dos tipos de muestras indican una similitud de estos tres grupos de microorganismos, lactobacilos, lactococos y levaduras, entre los dos productos obtenidos de los dos tipos de leche, la leche de cabras control y la leche de cabras alimentadas con suplemento de orujo de uva negra (Figura 13).

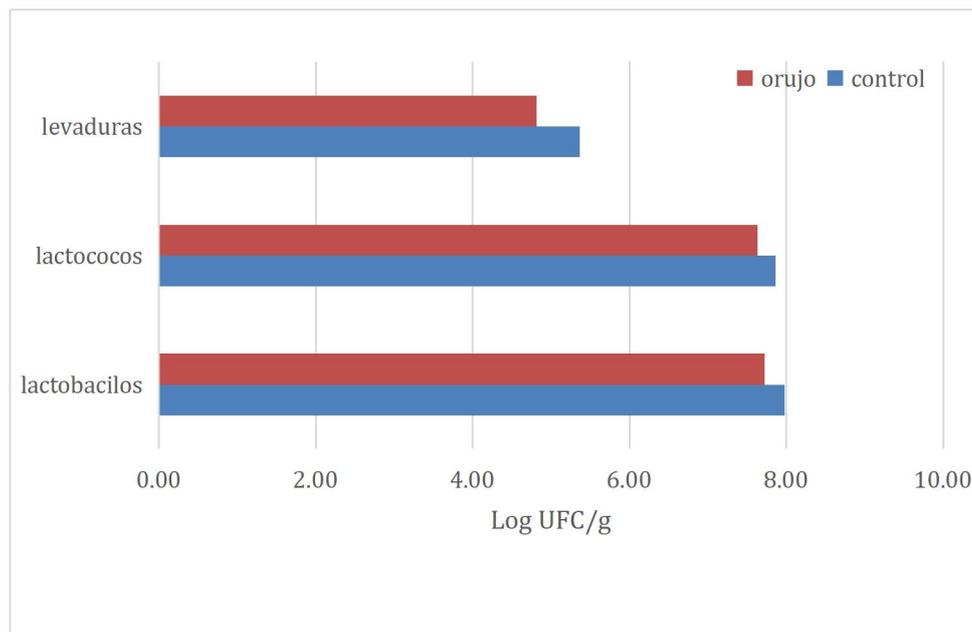


Figura 13. Log UFC/g de lactobacilos, lactococos y levaduras en el kéfir de leche de cabra según la dieta

En la Figura 13 se puede observar que los resultados para lactobacilos y lactococos son bastante homogéneos, siendo el recuento lactococos algo menor, para las levaduras, también los valores son similares, aunque los recuentos son menores que los de lactobacterias.

La evolución de los recuentos durante el almacenamiento (Figura 14), señala para lactobacilos y lactococos un ligero descenso entre los días 1 y 14 con una disminución mucho más marcada en el día 28. Al contrario, las levaduras empiezan con valores menores creciendo de forma lineal hasta alcanzar valores similares a los de las bacterias.

Estos resultados no coinciden con otros autores donde el recuento de lactobacilos se mantiene a lo largo de los 28 días. (Temiz *et al.* 2015), mientras que en otro estudio experimental también encuentran que el recuento de lactococos disminuye mientras que el de levaduras aumenta. (Bulat & Topcu, 2021)

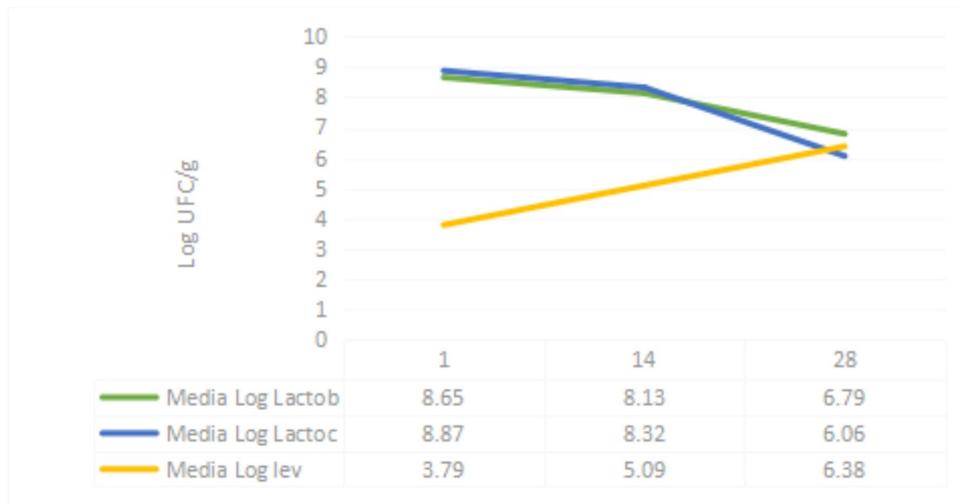


Figura 14. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los recuentos (Log UFC/g) de lactobacilos, lactococos y levaduras en el kéfir de leche de cabra

Para el estudio de las diferencias estadísticas se ha realizado un análisis de varianza de los factores de variación (D: dieta; t: tiempo de conservación). Este análisis mostró que la interacción entre ambos factores no resultó en ningún caso significativa por lo que para una mayor claridad se presentan los resultados por separado para cada factor de variación.

La Tabla 8 muestra que la concentración de lactobacilos medida en logaritmos que fue ligeramente mayor en el kéfir de leche de cabra del grupo control (7,98) comparado con el del grupo de orujo (7,23). Sin embargo, la diferencia no resulto estadísticamente significativa ($p= 0,2097$). Tampoco en el recuento de lactococos se encontraron diferencias significativas ($p = 0,4636$) relacionadas con la dieta entre los grupos Control (7,86) y Orujo (7,64). Por último, las levaduras, aunque presentaron una disminución en su concentración en el grupo Orujo (4,81) en comparación con el Control (5,36) estas diferencias tampoco resultaron estadísticamente significativas ($p= 0,2401$).

Tabla 8. Efecto de la dieta sobre los análisis microbiológicos del kéfir de leche de cabra

Parámetro (Log UFC/g)	Dieta			ANOVA	
	Control	Orujo	ES	p	NS
Lactobacilos	7.98	7.23	0.13	0.2097	ns
Lactococos	7.86	7.64	0.21	0.4636	ns
Llevaduras	5.36	4.81	0.31	0.2401	ns

NS: nivel de significación; ns: no significativo

Las Figuras 15, 16 y 17 presentan los logaritmos de los diferentes recuentos (Log UFC/g) realizados para los kéfirs de cada grupo experimental (C: Control; OT: Orujo).

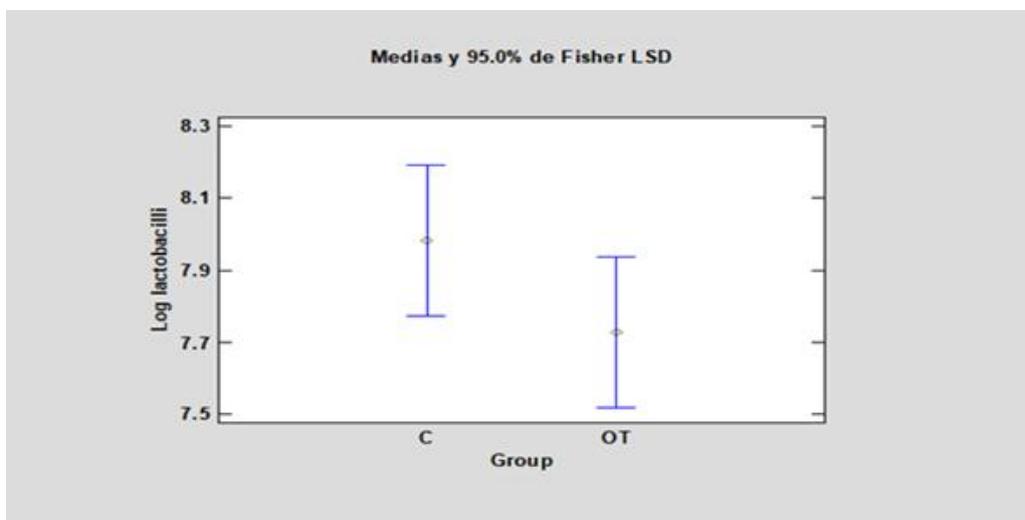


Figura 15. Efecto de la dieta sobre el recuento de lactobacilos del kéfir de leche de cabra (C: Control, OT: Orujo)

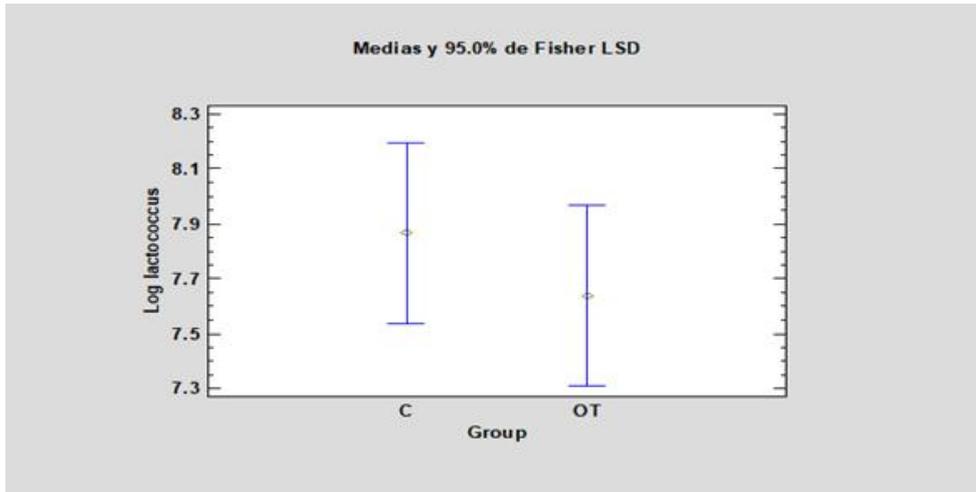


Figura 16. Efecto de la dieta sobre el recuento de lactococos del kéfir de leche de cabra (C: Control , OT: Orujo).

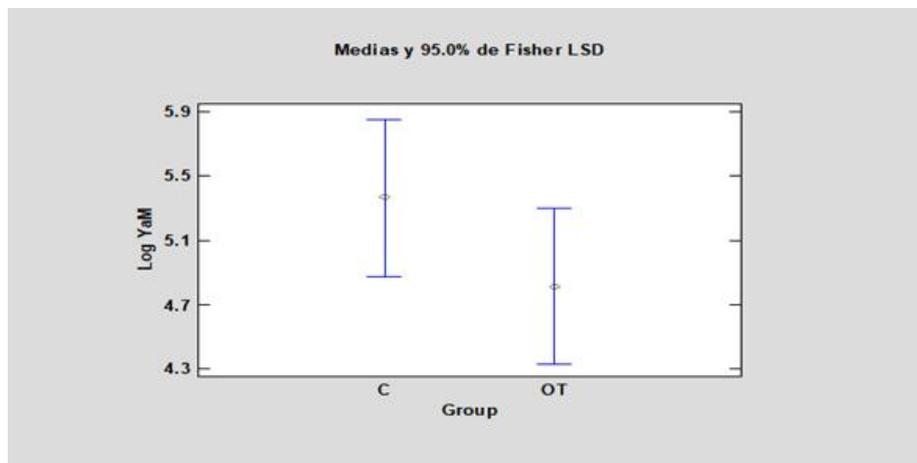


Figura 17. Efecto de la dieta sobre el recuento de levaduras del kéfir de leche de cabra (C; Control, OT: Orujo)

Se puede concluir que la dieta, en este caso la inclusión de orujo de uva negra, no tiene un efecto significativo en las poblaciones de lactobacilos, lactococos y levaduras en el kéfir de leche de cabra. Todos los valores de p son mayores que 0,05, lo cual indica que no hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos evaluados. Este análisis sugiere que la suplementación con orujo no altera de manera significativa la composición microbiana del kéfir de leche de cabra.

En cuanto al efecto del tiempo de almacenamiento en refrigeración del kéfir de leche de cabra sobre los recuentos microbianos en la Tabla 9 se presentan los resultados

obtenidos junto al resultado del análisis de la varianza aplicado en el estudio de este factor de variación.

Tabla 9. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los análisis microbiológicos del kéfir de leche de cabra.

Parámetro (Log UFC/g)	Tiempo de almacenamiento (días)				ANOVA	
	1	14	28	ES	p	ES
Lactobacilos	8.65 ^c	8.13 ^b	6.79 ^a	0.17	<0.001	***
Lactococos	8.87 ^b	8.32 ^b	6,06 ^a	0.26	<0.001	***
Levaduras	3.79 ^a	5.09 ^b	6.38 ^c	0.38	<0.01	**

a, b, c: diferentes letras en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$); NS: nivel de significación
 *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

En la Tabla 9 se puede observar que los valores medios del log lactobacilos disminuyen con el tiempo de almacenamiento en refrigeración, desde 8,65 el primer día, 8,13 a los 14 días hasta disminuir a 6,79 el día 28. El análisis de varianza señala que las diferencias entre los recuentos de Lactobacilos entre los distintos tiempos de conservación son estadísticamente significativas ($p < 0,001$)

También, los valores del lactococos (log UFC/g) disminuyen durante el almacenamiento mostrando diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tres momentos estudiados (día 1: 8,87; 14 días: 8,32; 28 días: 6,06).

En ambos casos, lactobacilos y lactococos se observa un descenso notable entre los 14 y los 28 días de refrigeración lo que sugiere que el kéfir pierde una parte de su flora bacteriana beneficiosa con el paso del tiempo indicando que 28 días es un periodo demasiado largo de conservación que disminuiría los efectos probióticos del kéfir.

Por el contrario, el recuento del logaritmo de las levaduras aumenta significativamente ($p < 0,01$) con el tiempo de conservación, 3,79 (1 día), 5,09 (14 días) y 6,38 (28 días). Las levaduras a diferencia de las bacterias, aumentan con el tiempo de conservación, lo que podría implicar un proceso de fermentación prolongada o una menor competencia con las bacterias, favoreciendo el crecimiento fúngico.

En resumen, el tiempo de conservación tiene un impacto significativo en la microbiota del kéfir de leche de cabra. Según García *et al.* (2006), el recuento de lactococos en kéfir de leche de cabra puede variar dependiendo de factores como la calidad de la leche, las condiciones de fermentación, y la cepa de kéfir utilizada. En su estudio, encontraron recuentos de lactococos entre 10^7 y 10^8 UFC/g, lo cual es comparable con los valores obtenidos en este estudio. En otro trabajo experimental, Farnworth (2005) señala que los lactobacilos en el kéfir son bastante resistentes a variaciones en la composición del medio de cultivo, lo que puede explicar que no existan diferencias significativas en este estudio entre los dos tipos de leche.

Lopitz-Otsoa *et al.* (2006) encontraron que la población de levaduras en el kéfir puede ser relativamente constante, independientemente de pequeñas variaciones en el medio de cultivo o en la dieta de los animales productores de leche. Este hallazgo sugiere que las levaduras son bastante robustas frente a cambios en la dieta caprina, manteniendo una población estable en el kéfir de leche de cabra.

A su vez, Zhang *et al.* (2024) investigaron cómo la suplementación dietética y las condiciones de almacenamiento afectan a las características microbiológicas del kéfir, encontrando que el tiempo de conservación influye significativamente en la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas y en el crecimiento de levaduras. Al comparar sus resultados con los obtenidos en este trabajo, se observan similitudes en la reducción de las poblaciones de lactobacilos y lactococos durante el almacenamiento, así como un incremento en la proliferación de levaduras. Sin embargo, Zhang *et al.* (2024) observaron que la dieta sí influía más directamente en las características microbiológicas que en los resultados de este estudio, donde la dieta no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la composición microbiana del kéfir. Este contraste podría atribuirse a diferencias en los tipos de dietas suplementarias y las condiciones experimentales utilizadas en ambos estudios.

Se puede destacar que ciertos factores, como la temperatura y el almacenamiento, no necesariamente impactan de manera significativa la calidad microbiológica, lo que sugiere otras variables, como el tipo de cultivo o las condiciones de fermentación.

Wang *et al.* (2020) se centran en la sucesión autogénica de bacterias y levaduras en granos de kéfir cuando se subcultivan en leche de cabra durante un período de 2 a 4 meses. Utilizan técnicas de secuenciación de alto rendimiento para analizar la diversidad microbiana de granos de kéfir originarios de diferentes países. Los resultados muestran que, aunque hay una alta estabilidad microbiana en los granos de kéfir subcultivados en leche de cabra durante más de 3 meses, existen variaciones según el origen geográfico de los granos.

También resaltan cómo las condiciones de subcultivo, incluyendo el tipo de leche y el tiempo, afectan significativamente la composición y estabilidad microbiana del kéfir. Además, proporcionan un enfoque específico sobre la estabilidad microbiana a lo largo del tiempo en diferentes condiciones de subcultivo.

5. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en este trabajo indican que la inclusión de ensilado de orujo de uva negra en la dieta del ganado caprino lechero podría resultar beneficiosa, ya que no presenta ningún efecto negativo sobre la calidad de la leche, ni sobre el proceso de elaboración del kéfir, así como no afecta en general a la calidad físico-química del kéfir elaborado.

Este estudio sugiere además que la dieta del ganado caprino tiene un impacto mínimo en la composición microbiana del kéfir, mientras que el tiempo de conservación es un factor crucial que afecta significativamente a la presencia de microorganismos beneficiosos. Para mantener la calidad probiótica del kéfir, es recomendable limitar el tiempo de conservación y considerar prácticas que optimicen la estabilidad de las poblaciones bacterianas benéficas.

La utilización del ensilado de orujo de uva negra en la dieta de las cabras lecheras contribuye a reducir los costes de alimentación y a optimizar la gestión de este subproducto, por lo que incrementa la sostenibilidad y la economía circular del sector caprino lechero.

Sin embargo, sería conveniente profundizar más el estudio de las características del kéfir elaborado con leche de cabras alimentadas con subproductos vitivinícolas con el estudio de otros parámetros físico-químicos como la presencia de antioxidantes y la composición en ácidos grasos que podría aumentar el valor del producto elaborado, así como la realización de análisis sensorial para que los resultados fueran más concluyentes.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and health: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 422-434. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360>
- Aidarbekova, S., & Aider, M. (2022). Study of the physico-chemical, structural, microbiological properties and volatile flavour compounds profile of kefir supplemented with electro-activated whey. *International Dairy Journal*, 126, 105218. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105218>
- Barukčić, I., Gracin, L., Jambrak, A. R., & Božanić, R. (2017). Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir produced by kefir grains and commercial kefir starter. *Mljekarstvo*, 67, 169-176. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0301>
- Beltrán, M.C.; Borràs, M.; Romero, T.; Molina, M.P. (2011). "Composición de la leche de cabra Murciano-Granadina mediante la espectroscopia de ultrasonidos". 213- 216. XXXVI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. San Sebastián, España.
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: Their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 686-700. <https://doi.org/10.1111/jam.14110>
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., & Dimitrov, Zh. P. (2003). Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 13, 529-535. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00058-X)
- Bidot-Fernández, A. (2017). Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. *Revista de Producción Animal*, 29, 32-41. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222479202017000200005&lng=es&tln_g=es
- Correddu, F., Lunesu, M. F., Buffa, G., Atzori, A. S., Nudda, A., Battacone, G., & Pulina, G. (2020). ¿Se pueden utilizar ventajosamente los subproductos agroindustriales ricos en polifenoles en la alimentación y nutrición de pequeños rumiantes lecheros? *Animals*, 10, 131. <https://doi.org/10.3390/ani10010131>
- Domínguez, M. (2013). Efecto de la incorporación de pulpa de naranja en la dieta de cabras lecheras sobre la producción, composición de la leche y rendimiento quesero. Trabajo Fin de Master. Universitat Politècnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/handle/10251/50023>
- Ertekin B., & Guzel-Seydi Z.B. (2010) Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 543-548. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3855>
- FAOSTAT. 2024. Estadísticas. Fodd Agruculture Organization (FAO). <https://www.fao.org/statistics/es>.
- Farag, M. A., Jomaa, S. A., Abd El-Wahed, A., & El-Seedi, H. R. (2020). The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety – A review. *Nutrients*, 12, 346. <https://doi.org/10.3390/nu12020346>
- Farnworth, E. R. (2008). The evidence to support health claims for probiotics. *The Journal of Nutrition*. 138, 1250S-1254. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1250S>

- Fava, F., Zanaroli, G., Vannini, L., Guerzoni, E., Bordoni, A., Viaggi, D., & Talens, C. (2013). New advances in the integrated management of food processing by-products in Europe: Sustainable exploitation of fruit and cereal processing by-products with the production of new food products (NAMASTE EU). *New Biotechnology*, 30, 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.02.004>
- Fernández, N., Andrade, J. C., Palomares, J. L., Vicente, C., Gálvez, M., & Rodríguez, M. (2024). Estudio del nivel de incorporación de ensilado de orujo de uva negra en la dieta de cabras lecheras de raza Murciano-Granadina y sus efectos sobre los aspectos productivos. Resultados preliminares. XLVII Congreso Nacional y XXIII Internacional de la SEOC. Valencia, España.
- Garg, M. R., Sherasia, P. L., Bhandari, B. M., Phondba, B. T., Shelke, S. K., & Makkar, H. P. S. (2013). Effects of feeding nutritionally balanced rations on animal productivity, feed conversion efficiency, feed nitrogen use efficiency, rumen microbial protein supply, parasitic load, immunity, and enteric methane emissions of milking animals under field conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 179, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.11.005>
- Gasa, J., & Castrillo, C. (1992). Criterios de utilización de subproductos agroindustriales en la alimentación de los rumiantes. *Hoja Divulgadora MAPA*, 13, 1-24. <https://portalrecerca.uab.cat/en/publications/criterios-de-utilizaci%C3%B3n-de-subproductos-agroindustriales-en-la-a>
- Giraldo M. (2023). Características fisicoquímicas y organolépticas del kéfir de leche de cabra y lactosuero. Trabajo Fin de Master. Universitat Politècnica de Valencia
- Glibowski, P., & Kowalska, A. (2012). Propiedades reológicas, texturales y sensoriales de kéfir de alto rendimiento e inulina nativa. *Revista de Ingeniería de Alimentos*, 111, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.019>
- Gómez, M. D., Avanza, M. V., Alayón, P., & Socolovsky, S. E. (2019). Propiedades fisicoquímicas y cinéticas de extractos enzimáticos de Bromelia serra. En *XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos y XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos* (pp. 38-39). Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. ISBN 978-987-22165-9-7. <http://hdl.handle.net/11336/153600>
- Gonzales, M. (2018). Determinación de ácidos grasos, compuestos fenólicos y efecto gastroprotector de semillas de uva (*Vitis vinífera*) variedad Malbec, sub producto de la industria vitivinícola, Ica-Perú (Tesis de Maestría). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/12826>
- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21, 601-606. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>
- Guzel-Seydim, Z., Wyffels, J. T., Seydim, A. C., & Greene, A. K. (2005). Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 25-29. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00177>
- Hassan, F. U., Arshad, M. A., Ebeid, H. M., Rehman, M. S. U., Khan, M. S., Shahid, S., (2020). Phytogetic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction – A review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 575801. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801>

- Hashem, N. M., González-Bulnes, A., & Simal-Gándara, J. (2020). Polifenoles en animales de granja: ¿Fuente de ganancias o desechos reproductivos? *Antioxidants*, 9, 1023. <https://doi.org/10.3390/antiox9101023>
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., & Ibáñez, F. C. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90, 613-620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.021>
- Leite, A. M. de O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 341–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- López-Astorga, M., Molina-Quijada, C.C. Ovando-Martínez, M., & Leon-Bejarano, M. (2022). Orujo de uva: Más que un residuo, una fuente de compuestos bioactivos. *Epistemos (Sonora)*, 16(33), 115-122. <https://doi.org/10.36790/epistemos.v16i33.283>
- Luga, M., & Mironeasa, S. (2020). Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 2473–2505. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12597>
- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 693-702. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200034>
- Marchena, A.M., & Vergara, E.M. (2016). Características físicoquímicas y aceptabilidad general de un kefir de leche de vaca (*Bos taurus*) y de cabra (*Capra hircus*). <https://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/359/326>
- Marsh, A. J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PloS one*, 8(7), e69371 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069371>
- Marín, M.P., Fuenzalida, M.I., Burrows, J., & Gecele, P. (2010). Recuento de células somáticas y composición de leche de cabra, según nivel de producción y etapa de lactancia, en un plantel intensivo de la zona central de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(2), 79-85. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000200009>
- Moate, P. J., Jacobs, J. L., Hixson, J. L., Deighton, M. H., Hannah, M. C., Morris, G. L., Ribaux, B. E., Wales, W. J., & Williams, S. R. O. (2020). Effects of feeding either red or white grape marc on milk production and methane emissions from early-lactation dairy cows. *Animals*, 10, 976. <https://doi.org/10.3390/ani10060976>
- Monroy, L., Rosales-Nieto, C., Nájera, M. de J., Chávez Solis, U., & Salinas-Gonzalez, H. (2015). *Producción de leche de cabra en la comarca lagunera (intensivo y extensivo) durante la época de estiaje*. <https://www.researchgate.net/publication/281685331>
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M., & Le Frileux, Y. (2007). Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 20-34. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.019>
- Muhlack, R. A., Potumarthi, R., & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilization for value-added products. *Waste Management*, 72, 99-118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>

- Naziri, E., Nenadis, N., Mantzouridou, F. T., & Tsimidou, M. Z. (2014). Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications. *Food Research International*, 65, 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.013>
- Paape, M. J., Wiggans, G. R., Bannerman, D. D., Thomas, D. L., Sanders, A. H., Contreras, A., Moroni, P., & Miller, R. H. (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, 68, 114-125. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.014>
- Quintanilla, P. (2019). Effect of antibiotics in goat milk on the manufacture and characteristics of cheese. Tesis Doctoral. Universitat Universitat Politècnica de Valencia.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79, 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>
- Rosa, D.D., Dias, M.M., Grzeškowiak, Ł.M., Reis, S.A., Conceição, L.L., & Maria do Carmo, G.P. (2017) Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition research reviews* 30(1), 82-96 <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Salvador, A., & Martínez, G. (2007). Factores que afectan la producción y composición de la leche de cabra: Revisión bibliográfica. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48, 61-76. ISSN 0258-6576. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2950290>
- Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2015). Influence of kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 852-858. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.057>
- Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2016). How kefir fermentation can affect product composition? *Small Ruminant Research*, 134, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.022>
- Schwan, R. F., Magalhães-Guedes, K., & Ribeiro, D. (2022). Innovations in preservation and improving functional properties of kefir. In *Advances in Dairy Microbial Products*, Chapter 15, 225-234. Woodhead Publishier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85793-2.00024-2>
- Silva, T., Pires, A., Gomes, D., Viegas, J., Pereira-Dias, S., Pintado, M. E., Henriques, M., & Dias-Pereira C. (2023). Sheep's butter and correspondent buttermilk produced with sweet cream and cream fermented by aromatic starter, kefir and probiotic culture. *Foods*, 12, 331-350- <https://doi.org/10.3390/foods12020331>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Trujillo, E. D. (2019). Diseño de un proceso industrial para la elaboración de kéfir en la microempresa de Lácteos Camilita. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/11062>
- Tsiplakou, E., & Zervas, G. (2008). The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 75, 270-278. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003270>

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 15638-15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>

Ventura-Cordero, J., Sandoval-Castro, C. A., Torres-Acosta, J. F. J., & Capetillo-Leal, C. M. (2017). Do goats have a salivary constitutive response to tannins? *Journal of Applied Animal Research*, 45, 29-34. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1102728>

Wang, H., Wang, C., & Guo, M. (2020). Autogenic successions of bacteria and fungi in kefir grains from different origins when sub-cultured in goat milk. *Food Research International*, 138(Part B), 109784. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109784>

Zhang, T., Chang, M., Zhou, Y., Wang, M., Yan, M., Hou, X., Liu, R., Yuan, Y., & Yue, T. (2024). Dynamic alterations of flavor, functional nutrients, and microbial community during fermentation of different animal milk kefir. *Food Research International*, 186, 114305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114305>