



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DETERMINACIÓN DE BIOACTIVIDADES EN QUESO DE ZACAZONAPAN DURANTE MADURACIÓN Y SUS ATRIBUTOS TANGIBLES E INTANGIBLES

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

M. B. VERENICE TORRES SALAS

Bajo la supervisión de:

DR. ARTURO HERNÁNDEZ MONTES



Chapingo, Estado de México, 2020.



APROBADA

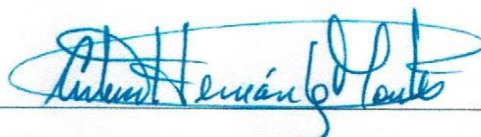


DETERMINACIÓN DE BIOACTIVIDADES EN QUESO DE ZACAZONAPAN
DURANTE MADURACIÓN Y SUS ATRIBUTOS TANGIBLES E INTANGIBLES

Tesis realizada por **VERENICE TORRES SALAS** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:



Dr. Arturo Hernández Montes

CO-DIRECTOR:



Dr. Holber Zuleta Prada

ASESOR:



Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

LECTOR EXTERNO:



Dr. José Andrés Herrera Corredor

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	iii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE APÉNDICES.....	xviii
ABREVIATURAS USADAS	xix
DEDICATORIAS.....	xxii
AGRADECIMIENTOS	xxiii
DATOS BIOGRÁFICOS	xxv
RESUMEN GENERAL	xxvi
GENERAL ABSTRACT.....	xxvii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Quesos tradicionales mexicanos	5
2.1.1. Queso añejo de Zacazonapan	6
2.2. Valores humanos en la preferencia de los alimentos	7
2.2.1. Estructura de los valores humanos	7
2.2.2. Los valores humanos y su influencia en el consumo de los alimentos	9
2.2.3. Modelos de influencia de los valores humanos sobre la preferencia de los alimentos	11
2.3. Cultura y símbolo.....	13
2.3.1. Significados en los alimentos	14
2.4. Emociones asociadas a la preferencia de los alimentos	16
2.5. Estudios sobre vida de sensorial de anaquel	18

2.6. Calidad de los alimentos.....	20
2.6.1. Modelo analítico de la calidad de los alimentos	20
2.7. Funcionalidad de las proteínas lácteas.....	21
2.7.1. Péptidos bioactivos.....	22
2.7.2. Papel de la maduración y las bacterias ácido lácticas en la producción de péptidos bioactivos en queso	23
2.7.3. Péptidos bioactivos en queso	25
2.8. Literatura citada.....	37
3. RUTAS DE INFLUENCIA DE LOS VALORES HUMANOS EN EL CONSUMO DEL QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN	60
3.1. Resumen	60
3.2. Introducción	62
3.3. Materiales y métodos.....	64
3.3.1. Muestra de consumidores	64
3.3.2. Diseño y aplicación de la encuesta	64
3.4. Análisis estadístico	65
3.4.1 Estructura de los valores humanos en consumidores	65
3.4.2. Influencia directa e indirecta de los valores humanos en el consumo del queso añejo de Zacazonapan	69
3.5. Resultados y discusión	70
3.5.1. Estructura de los valores humanos en consumidores	70
3.5.2. Influencia directa e indirecta de los valores humanos en el consumo del queso añejo de Zacazonapan	74
3.6. Conclusiones	83
3.7. Agradecimientos	83

3.8. Literatura citada.....	84
4. SIGNIFICADOS PARA QUESOS TRADICIONALES MEXICANOS: QUESO DE ZACAZONAPAN	87
4.1. Resumen	87
4.2. Introducción	89
4.3. Metodología	91
4.3.1. Sitio de encuesta	91
4.3.2. Encuesta	91
4.3.3. Análisis estadístico	92
4.4. Resultados y discusión	92
4.4.1. Queso de Zacazonapan	92
4.5. Conclusiones	97
4.6. Agradecimientos	98
4.7. Literatura citada	98
5. ACEPTABILIDAD DEL QUESO DE ZACAZONAPAN A TRAVÉS DE EMOCIONES Y DEL ESTADO DE MADUREZ.....	102
5.1. Resumen	102
5.2. Introducción	104
5.3. Materiales y métodos.....	105
5.3.1. Obtención de muestras	105
5.3.2. Determinación de pH y composición química parcial	106
5.3.3. Magnitud de diferencia (d')	106
5.3.4. Evaluación de la aceptabilidad global.....	107
5.3.5. Perfil Flash de quesos	107

5.3.6. Frecuencia e intensidad de emociones en consumidores de queso añejo de Zacazonapan	108
5.3.7. Vida útil sensorial	108
5.4. Análisis estadístico	109
5.4.1. Variables físicas y químicas	109
5.4.2. Análisis de datos sensoriales	109
5.5. Resultados y discusión	110
5.5.1. Determinación de pH y composición química parcial	110
5.5.2. Magnitud de diferencia (d')	114
5.5.3. Perfil Flash de quesos	114
5.5.4. Evaluación de aceptabilidad global	116
5.5.5. Frecuencia e intensidad de emociones en consumidores de queso añejo de Zacazonapan	117
5.5.6. Vida útil sensorial	120
5.6. Conclusiones	122
5.7. Agradecimientos	123
5.8. Literatura citada	123
6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA EN EL QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN	126
6.1. Resumen	126
6.2. Introducción	128
6.3. Materiales y métodos	129
6.3.1. Reactivos analíticos	129
6.3.2. Obtención de las muestras de queso añejo de Zacazonapan	130

6.3.3. Extracción de compuestos solubles en agua	130
6.3.4. Liofilización de los extractos solubles.....	131
6.3.5. Composición proximal de extractos liofilizados de queso añejo de Zacazonapan.....	131
6.3.6. Determinación de mapa peptídico de extractos liofilizados	134
6.3.7. Determinación del perfil de pesos moleculares de péptidos por FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography).....	135
6.3.8. Actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno	136
6.3.9. Determinación de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.....	137
6.4. Análisis estadístico	138
6.5. Resultados y discusión	139
6.5.1. Composición proximal de extractos liofilizados de queso añejo de Zacazonapan.....	139
6.5.2. Perfil de aminoácidos en extractos liofilizados	140
6.5.3. Aminoácidos libres en extractos liofilizados	143
6.5.4. Mapa peptídico de extractos liofilizados	146
6.5.5. Perfil de pesos moleculares de péptidos por FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)	147
6.5.6. Actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno	148
6.5.7. Actividad antihipertensiva de extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan.....	151
6.6. Conclusiones	152
6.7. Literatura citada	152

7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRACCIONES MOLECULARES DE EXTRACTOS DE QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN, MÉXICO DURANTE SU MADURACIÓN	159
7.1. Resumen	159
7.2. Introducción	161
7.3. Materiales y métodos	162
7.3.1. Reactivos analíticos	162
7.3.2. Obtención de la muestra de queso añejo de Zacazonapan	163
7.3.3. Extracción de compuestos solubles en agua	163
7.3.4. Liofilización de los extractos solubles	164
7.3.5. Obtención de fracciones peptídicas en función del peso molecular	164
7.3.6. Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas	164
7.3.7. Determinación del contenido de calcio libre	165
7.3.8. Determinación de la actividad quelante de Cobre (II)	166
7.3.9. Determinación de la actividad quelante de Fe (II)	166
7.3.10. Determinación de la actividad antioxidante por captación del radical libre ABTS ^{•+}	167
7.4. Análisis estadístico	167
7.5. Resultados y discusión	168
7.5.1. Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas	168
7.5.2. Contenido de Calcio libre	175
7.5.3. Actividad quelante de Cobre (II)	176
7.5.4. Actividad quelante de Fe (II)	178
7.5.5. Actividad antioxidante por captación del radical libre ABTS ^{•+}	181
7.6. Conclusiones	184

7.7. Literatura citada.....	185
8. CAMBIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN, MÉXICO DURANTE SU MADURACIÓN	190
8.1. Resumen	190
8.2. Introducción	192
8.3. Materiales y métodos.....	193
8.3.1. Obtención de muestras	194
8.3.2. Extracción de compuestos solubles en agua	194
8.3.3. Determinación de proteína soluble en extractos	194
8.3.4. Determinación de grado de hidrólisis	195
8.3.5. Determinación <i>in vitro</i> de actividad antioxidante	196
8.4. Análisis estadístico	199
8.5. Resultados y discusión	199
8.5.1. Proteína soluble en extractos	199
8.5.2. Grado de hidrólisis en extractos acuosos.....	200
8.5.3. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	201
8.6. Conclusiones	206
8.7. Literatura citada.....	207
9. BIOACTIVIDAD, ANALISIS SENSORIAL Y TEXTURAL DE QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN DURANTE SU MADURACIÓN	212
9.1. Resumen	212
9.2. Introducción	214
9.3. Materiales y métodos.....	215
9.3.1. Obtención de muestras	216

9.3.2. Análisis fisicoquímicos del queso	216
9.3.3. Extracción de compuestos solubles en agua	216
9.3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana	217
9.3.5. Determinación de la actividad antitrombótica	218
9.3.6. Perfil flash de queso añejo de Zacazonapan.....	219
9.3.7. Análisis de perfil de textura (TPA)	220
9.4. Análisis estadístico	220
9.5. Resultados.....	221
9.5.1. Análisis fisicoquímicos del queso	221
9.5.2. Sustancias proteicas inhibidoras del crecimiento bacteriano	223
9.5.3. Actividad antitrombótica de extractos	225
9.5.4. Perfil Flash de queso añejo de Zacazonapan	225
9.5.5. Análisis de perfil de textura (TPA)	227
9.6. Conclusiones	230
9.7. Literatura citada.....	231
10. CONCLUSIONES GENERALES	236
11. APÉNDICES	238

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Funciones biológicas de las proteínas de la leche.	21
Cuadro 2. Péptidos inhibidores de la ECA-I provenientes de queso.....	26
Cuadro 3. Péptidos con capacidad antioxidante en quesos mexicanos.....	33
Cuadro 4. Definiciones de los 40 valores humanos y su clasificación respecto a los valores motivacionales y dominios de valor de orden superior.	66
Cuadro 5. Promedio y desviaciones estándar para los valores humanos evaluados por los consumidores de queso Añejo de Zacazonapan.	70
Cuadro 6. Resultados de regresión múltiple de los factores de los atributos tangibles.	74
Cuadro 7. Correlaciones entre los atributos tangibles y los factores de los atributos tangibles significativos en la regresión múltiple del bloque uno.	75
Cuadro 8. Resultados de regresión múltiple de los factores de solo los valores humanos y los residuales de los atributos tangibles contra el consumo del queso.	77
Cuadro 9. Cargas de los atributos tangibles en el factor residual 12 y cargas de los valores humanos en los factores 2, 3, 5 y 10.	78
Cuadro 10. Resultados de la regresión múltiple de los factores de solo los valores humanos y el consumo del queso (bloque tres).....	79
Cuadro 11. Resultados de las regresiones múltiples de la importancia de los atributos tangibles (bloque uno) en el consumo de Queso añejo de Zacazonapan; y los valores humanos más los residuales de los atributos tangibles (bloque dos) en el consumo del mismo queso.....	80
Cuadro 12. Resultados de la regresión múltiple de únicamente los valores humanos y el consumo de Queso añejo de Zacazonapan.	81

Cuadro 13. Categorías de ideas o palabras expresadas por los consumidores del queso de Zacazonapan, Estado de México.	93
Cuadro 14. Comunalidades de categorías de significados por sexo, para el queso de Zacazonapan, Estado de México.	95
Cuadro 15. Variables físicas y químicas de quesos añejos de Zacazonapan con 20 d de maduración (base húmeda).	113
Cuadro 16. Características físicas y químicas del queso C, con 0, 30, 95 y 180 d de maduración (base húmeda).	113
Cuadro 17. Magnitud de diferencia (d') para pares de quesos de Zacazonapan.	114
Cuadro 18. Aceptabilidad global para quesos añejos de Zacazonapan.....	117
Cuadro 19. Intensidad de emociones que permiten diferenciar entre quesos añejos de Zacazonapan.....	119
Cuadro 20. Predicción de porcentajes de aceptación de queso de Zacazonapan (quesería C) en cinco tiempos de maduración empleando las distribuciones de Weibull y normal logarítmica de tres parámetros.	120
Cuadro 21. Contenido de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas expresados en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado y significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo de maduración.....	140
Cuadro 22. Contenido de algunos aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado) en los quesos A y B.	141
Cuadro 23. Contenido de algunos aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado) en los diferentes tiempos de maduración de queso añejo de Zacazonapan. .	141
Cuadro 24. Contenido de aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado) en los quesos A y B con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de factores queso-tiempo.	142
Cuadro 25. Contenido total de aminoácidos libres en los quesos A y B a los 0, 30, 95 y 180 días de maduración expresado en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado.	143

Cuadro 26. Aminoácidos libres (g·100 g ⁻¹ de extracto liofilizado) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor queso.	144
Cuadro 27. Contenido de aminoácidos libres (g·100 g ⁻¹ de extracto liofilizado) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo de maduración.	144
Cuadro 28. Contenido de aminoácidos libres (g·100 g ⁻¹ de extracto) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la interacción de factores queso-tiempo.	145
Cuadro 29. Proporción de degradación (PD), porcentaje de inhibición (PI) y coeficiente de variación de actividad antioxidante (CAA) significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción de los factores queso-tiempo de maduración.	150
Cuadro 30. Porcentaje de inhibición de la ECA-I respecto al factor tiempo... ..	151
Cuadro 31. Contenido de aminoácidos (g·100 g ⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el factor queso en las muestras de queso añejo de Zacazonapan sin fraccionar.	168
Cuadro 32. Contenido de aminoácidos (g·100 g ⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el factor tiempo de las muestras de queso añejo de Zacazonapan sin fraccionar.	169
Cuadro 33. Contenido de aminoácidos (g·100 g ⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para la interacción de los factores queso-tiempo en quesos añejos de Zacazonapan sin fraccionar.	169
Cuadro 34. Contenido de aminoácidos (g·100 g ⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) considerando la interacción de los factores queso-tiempo en fracciones de queso añejo de Zacazonapan.	170
Cuadro 35. Contenido de aminoácidos (g·100 g ⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) considerando la interacción de los factores queso-fracción en las muestras fraccionadas de quesos añejos de Zacazonapan.	172
Cuadro 36. Contenido de aminoácidos (g·100 g ⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción de quesos añejos de Zacazonapan.	173

Cuadro 37. Contenido de calcio libre ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-tiempo.....	175
Cuadro 38. Contenido de calcio libre ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-fracción.....	175
Cuadro 39. Contenido de calcio libre ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1} \pm$ error estándar) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.	176
Cuadro 40. Porcentaje de actividad quelante de Cu^{2+} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-tiempo.....	177
Cuadro 41. Porcentaje de actividad quelante de Cu^{2+} significativo ($p \leq 0.05$) para la interacción de los factores queso-fracción.	177
Cuadro 42. Actividad quelante de Cu (%) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.	178
Cuadro 43. Porcentaje de actividad quelante de Fe^{2+} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-fracción.....	180
Cuadro 44. Porcentaje de actividad quelante de Fe^{2+} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.....	180
Cuadro 45. Actividad antioxidante (mM Trolox) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-tiempo.....	183
Cuadro 46. Actividad antioxidante (mM Trolox) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-fracción.....	183
Cuadro 47. Actividad antioxidante (mM Trolox) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.....	184
Cuadro 48. Porcentaje de parámetros fisicoquímicos con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor queso.	221
Cuadro 49. Porcentaje de parámetros fisicoquímicos con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al tiempo de maduración (0, 30, 95 y 180 d).....	222
Cuadro 50. Actividad de agua (a_w), pH y minerales en los quesos A y B a los 0, 30, 95 y 180 d de maduración.....	223

Cuadro 51. Porcentaje de inhibición de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 y <i>Micrococcus luteus</i> CDBBB1018 significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo.	224
Cuadro 52. Cohesividad y masticabilidad del queso añejo de Zacazonapan con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el factor queso.	228
Cuadro 53. Masticabilidad del queso añejo de Zacazonapan a los 0, 30, 95 y 180 d de maduración.	229
Cuadro 54. Dureza, adhesividad y elasticidad del queso añejo de Zacazonapan significativas ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo.	229

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la estructura teórica de los valores humanos divididos en cuatro dominios de valor de orden superior (Schwartz, 2012).	8
Figura 2. Escalamiento multidimensional de las distancias euclídeanas obtenidas de un análisis de disimilaridad de los valores humanos de una muestra de consumidores locales del queso Añejo de Zacazonapan.	72
Figura 3. Comparaciones de los porcentajes de las comunalidades de las categorías de significados otorgados al queso de Zacazonapan y sus aportaciones a los significados psicológicos.	94
Figura 4. Representación gráfica de los quesos y descriptores con los dos primeros ejes principales del análisis procrusteano generalizado (APG).	115
Figura 5. Frecuencia de emociones percibidas por consumidores locales después de degustar queso añejo de Zacazonapan.	118
Figura 6. Porcentaje de aceptación de consumidores de queso contra el tiempo de almacenamiento utilizando la distribución de Weibull.	121
Figura 7. Perfil de elución de extractos de queso añejo de Zacazonapan con diferentes tiempos de maduración, separados por RP-HPLC. (A) Extracto queso A y (B) extracto queso B con 0 (azul), 30 (morado), 95 (verde) y 180 d de maduración (magenta).	146
Figura 8. Pesos moleculares en cada uno de los picos encontrados en los quesos A (a) y B (b) durante los diferentes tiempos de maduración 0, 30, 95 y 180 d.	148
Figura 9. Parámetros asociados a la actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno: proporción de degradación (a), porcentaje de inhibición (b), coeficiente de actividad antioxidante (c).	149

Figura 10. Actividad quelante de hierro del BHT, la muestra no fraccionada (F0) y de las fracciones de extracto de los quesos de Zacazonapan A y B, a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (F1 >10kDa, 10 kDa > F2 > 3 kDa, 3 kDa > F3 > 1 kDa, 1 kDa > F4 > 200 Da y F5 < 200 Da).....	179
Figura 11. Captación del radical libre ABTS ^{•+} por BHT, la muestra no fraccionada (F0) y por las fracciones de extracto de los quesos de Zacazonapan A y B, a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (F1 >10kDa, 10 kDa > F2 > 3 kDa, 3 kDa > F3 > 1 kDa, 1 kDa > F4 > 200 Da y F5 < 200 Da).....	182
Figura 12. Sustitución nucleofílica aromática del ácido trinitrobencenosulfónico con los grupos α -amino primarios (Adler-Nissen, 1979).	196
Figura 13. Proteína ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\pm$ error estándar) en extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan durante la maduración significativa ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo. a, b, c (diferencia significativa entre tiempos $p \leq 0.05$) y x, y (diferencia significativa entre quesos $p \leq 0.05$).....	200
Figura 14. Porcentaje de grado de hidrólisis de queso añejo de Zacazonapan ($\pm$ error estándar) significativo para el factor tiempo de maduración. Valores con distinta letra son estadísticamente diferentes de acuerdo a DMS ($p \leq 0.05$). .	201
Figura 15. Porcentaje de captación del radical DPPH ($\pm$ error estándar) significativo para el factor tiempo de maduración en queso añejo de Zacazonapan. Valores con distinta letra son estadísticamente diferentes de acuerdo con DMS ($p \leq 0.05$).	202
Figura 16. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno ($\pm$ error estándar) significativo ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo. a, b, c (diferencia significativa entre tiempos $p \leq 0.05$) y x,y (diferencia significativa entre quesos $p \leq 0.05$).....	205
Figura 17. Distribución de los quesos A y B en 0, 30 y 180 d de maduración de acuerdo con los atributos consensuados.	226

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Formato para identificación de valores.	238
Apéndice 2. Formato de encuesta de atributos tangibles.	239
Apéndice 3. Formato de encuesta de frecuencia de consumo de queso.	241
Apéndice 4. Formato de encuesta para simbolismo.	242

ABREVIATURAS USADAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
CJ	Comercio Justo
Ao	Atributos hacia el objeto
t	Tiempo
d	Días
ECA-I	Enzima Convertidora de Angiotensina-I
CN	Caseína
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina

Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	sal de diamonio 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
MDS	Método de escalamiento multidimensional
SAMCOF	Procedimiento de escalamiento por mayorización de una función convexa
B1	Bloque 1
B2	Bloque 2
B3	Bloque 3
T	Atributos tangibles
V	Valores humanos
TR	Factores residuales
R	Coeficiente de correlación
ANDEVA	Análisis de varianza
APG	Análisis Procrusteano Generalizado
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad)
ATP	Adenosin trifosfato
Da	Daltones
kDa	Kilodaltones
PD	Proporción de degradación
PI	Porcentaje de inhibición
CAA	Coeficiente de actividad antioxidante
AOX	Valor antioxidante

HHL	Hipuril-L-histidil-Leucina
AAL	Aminoácidos libres
AALT	Aminoácidos libres totales
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
AAPH	Diclorohidrato de 2,2 azobis 2-metilpropionamida
AUC	Área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia
%GH	Porcentaje de grado de hidrólisis
TPA	Análisis de perfil de textura
UACH	Universidad Autónoma Chapingo
UV-Vis	Ultravioleta Visible
Ec	Ecuación
CAA	Coeficiente de actividad antioxidante
IC ₅₀	Concentración a la que un compuesto puede inhibir un proceso biológico particular en un 50 %.
a _w	Actividad de agua

DEDICATORIAS

A Dios.

A mis papás Ma. Isabel Salas Medina y Jorge N. Torres Y Uribe.

A mis abuelos: Eustolia y Sidronio †, Carmen † y Timoteo †.

A mis hermanos: Isabel y Jorge.

A mis primos: Eli, Abraham y Luis.

A mis sobrinos: Santiago y Johari.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma Chapingo.

Al Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, en especial al Doctorado en Ciencias Agroalimentarias del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto mediante la beca 283773.

Al Dr. Arturo Hernández Montes por ser mi guía en esta etapa de mi formación en la investigación, por ser mi ejemplo, por darme ánimo, por su paciencia. Por los conocimientos compartidos y las facilidades para llevar a cabo la presente investigación.

A la Dra. Blanca E. Hernández Rodríguez por ayudarme en el desarrollo de la presente investigación, por dirigirme de la mejor manera, por su paciencia, por hacerme ver mis errores aconsejarme para ser mejor investigadora.

Al Dr. Holber Zuleta Prada por sus observaciones, comentarios para la mejora de este trabajo. Y por el trabajo realizado en el artículo de NMR, así mismo al Dr. Herbert Pucheta.

A la Dra. Diana Guerra por apoyarme y darme apertura para trabajar la parte de liofilización y ORAC en el laboratorio de productos naturales.

Al Dr. Javier Vioque Peña por el apoyo, la guía, los conocimientos compartidos y por recibirme en el Instituto de la Grasa-CSIC dándome acceso a toda su infraestructura durante mi estancia de investigación.

Al Dr. Manuel Alaiz y al Dr. Julio Girón Calle por el apoyo y compartir sus conocimientos durante mi estancia de investigación.

Al Q.F.B. Adalberto por apoyarme y darme la apertura para trabajar en su laboratorio.

A las autoridades y productores de Zacazonapan por el apoyo y aporte de producto, en especial a la Sra. Juana y su familia, y a la Sra. Anita.

A Carolina Illescas, Guadalupe Alarcón, Larissa, Carla Jauregui y Magdiel Pablo por ayudarme durante la fase de campo.

A Daysi Gómez, Flor Guerrero, Daniel Miranda y Sergio Zúñiga por su amistad, su apoyo, por estar allí y compartir conmigo estos cuatro años de mi historia. A Magali Cañarejo, Diana Becerra, Lupita Crispín, Irene Arenales y Beatriz Quiroz colegas en este camino.

A Melbys López y Carolina Illescas por su amistad, consejos, intercambio de ideas, su apoyo, y la oportunidad de haber compartido gratos momentos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Verenice Torres Salas
Fecha de nacimiento: 19 mayo 1984
Lugar de nacimiento: Ciudad de México
CURP: TOSV840519MDFRLR06



Desarrollo académico

Bachillerato: Escuela Preparatoria Plantel «Texcoco».

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo. Cédula profesional 7320792.

Maestría: Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.

Cédula profesional: 9722620.

Ha sido asesora de producción y calidad en la empresa Queso Tijuana durante el 2015. Desarrolló la investigación: «Determinación de péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772» durante el 2012-2014. Fungió como jefa de producción en la empresa Productos Artesanales Agropecuarios S. de P. R. de R. L. del 2009-2012. Así mismo, fue auxiliar de laboratorio en la empresa Lácteos Menonitas de Chihuahua en el 2008. En ese mismo año desarrollo la investigación titulada «Caracterización de queso Chihuahua Menonita». Ha participado en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco en el 2015, con la presentación: «Actividad antitrombótica y antihipertensiva durante la fermentación de leche con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus delbrueckii*»

RESUMEN GENERAL

Determinación de bioactividades en queso de Zacazonapan durante maduración y sus atributos tangibles e intangibles

El queso añejo de Zacazonapan es un queso tradicional producido a partir de leche cruda de vaca y cuyo origen se remonta a más de 100 años. El objetivo de esta investigación fue determinar las rutas de influencia de los valores humanos sobre el consumo del queso, la importancia de los atributos intangibles, tales como el significado y las emociones en consumidores, y los atributos tangibles como las características fisicoquímicas, sensoriales, texturales y de actividad biológica del queso. Los resultados mostraron que la influencia de los valores humanos en el consumo del queso fue indirecta. Las mayores comunilidades de significado se observaron para las categorías de hedonismo, platillos y maridaje, y atributos de apariencia. Sin embargo, el significado de identidad fue mínimo e indicó que los consumidores no se identificaron con el queso. Las emociones contribuyeron a diferenciar al queso añejo de Zacazonapan con la misma aceptabilidad, y la probabilidad de su consumo disminuyó al madurar. Durante la maduración del queso se generaron cambios fisicoquímicos como disminución en la a_w y la humedad, un aumento en la concentración de proteína y grasa. Los cambios sensoriales y texturales permitieron diferenciar a los quesos con 0, 30, 95 y 180 d de maduración. En los extractos solubles de los quesos se observó una disminución en la concentración de proteína y un incremento en los lípidos. Así como cambios en los perfiles aminoacídicos y los mapas peptídicos, asociados a la generación de péptidos con diferentes pesos moleculares. Los péptidos en los extractos solubles presentaron actividad antioxidante potencial (decoloración β -caroteno, captación de radicales libres DPPH, ABTS^{•+}, y ORAC), así como antihipertensiva y quelante de Cu^{2+} . Las bioactividades menos relevantes fueron la antimicrobiana, quelante de Fe^{2+} y nula actividad antitrombótica.

Palabras clave: queso de Zacazonapan, valores humanos, emociones, simbolismo, antioxidante, antihipertensivo.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verénice Torres Salas.

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

GENERAL ABSTRACT

Determination of bioactivities in Zacazonapan cheese during ripening and its tangible and intangible attributes

The Zacazonapan añejo cheese is a traditional cheese produced from raw cow's milk and whose origin dates back more than 100 years. The aim of this investigation was to determine the routes of influence of human values on consumption of cheese, the importance of intangible attributes, such as meaning and emotions in consumers, and tangible attributes such as physicochemical, sensory, textural and biological activity traits of the cheese. The results showed that the influence of human values on cheese consumption was indirect. The greatest communalities of meaning were observed for the categories of hedonism, courses and pairing, and appearance attributes. However, the identity meaning was minimal and indicated that consumers did not identify with the cheese. Emotions contributed to differentiate Zacazonapan añejo cheese with the same acceptability, and consumption probability decreased as cheese ripened. During cheese ripening, physicochemical changes were generated such as a decrease in a_w and moisture, and an increase in the concentration of protein and fat. Sensory and textural changes allowed to differentiate cheeses with 0, 30, 95 and 180 d of ripened. A decrease in protein concentration and an increase in lipids were observed in soluble cheese extracts. As well as changes in amino acid profiles and peptide maps, associated with generation of peptides with different molecular weights. Peptides in soluble extracts showed potential antioxidant activity (β -carotene discoloration, free radical scavenge DPPH, ABTS^{•+}, and ORAC), as well as antihypertensive and Cu²⁺ chelation. Other less relevant activities were antimicrobial, Fe²⁺ chelation and null antithrombotic activity.

Keywords: Zacazonapan cheese, human values, emotions, symbolism, antioxidant, antihypertensive.

Thesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Verénice Torres Salas.

Advisor: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México se han identificado alrededor de 40 tipos de quesos artesanales, los cuales presentan tipicidad, contribuyen a la autosuficiencia agroalimentaria local, mantienen la integridad de las cadenas agroindustriales leche-queso, valorizan los recursos territoriales locales y representan un patrimonio cultural y gastronómico (Villegas y Cervantes, 2011; Villegas *et al.*, 2014). c

El consumo de este queso puede estar ligado a los valores humanos, al simbolismo y las emociones. Los valores son objetivos deseables, transituacionales, variables en importancia, que sirven de principios rectores en la vida de las personas y que responden a las tres exigencias universales de la existencia humana: necesidades biológicas, requisitos de interacción social coordinada, y exigencias de supervivencia y funcionamiento del grupo social (Schwartz, 1994, 2012). Estos valores humanos pueden estar asociados al simbolismo y también tener un efecto directo o indirecto sobre la elección por parte de los consumidores de determinado producto (Allen, 2008). Además, los productos de consumo pueden ser considerados como objetos psicológicos los cuales son símbolo de atributos, objetivos de patrones sociales y metas (Levy, 1959). El significado simbólico asociado con algún producto, puede afectar en gran medida su adopción y uso, en ocasiones ese significado puede superar o dominar su desempeño técnico como determinante del consumo, sobre todo si se utiliza para significar la posición social y/o identidad propia (Hirschman, 1981). Por otra parte, las emociones vistas como una compleja experiencia psicofisiológica del estado mental de un individuo provienen de cinco distintas fuentes: atributos sensoriales, consecuencias experimentadas, consecuencias anticipadas, significados personales o culturales y acciones de agentes

asociados que determinan la elección de ciertos productos (Desmet & Schifferstein, 2008; Myers, 2004).

El significado simbólico asociado con algún producto, puede afectar en gran medida su adopción y uso, en ocasiones ese significado puede superar o dominar su desempeño técnico como determinante del consumo, sobre todo si se utiliza para significar la posición social y/o identidad propia (Hirschman, 1981). Por otra parte, las emociones vistas como una compleja experiencia psicofisiológica del estado mental de un individuo provienen de cinco distintas fuentes: atributos sensoriales, consecuencias experimentadas, consecuencias anticipadas, significados personales o culturales y acciones de agentes asociados que determinan la elección de ciertos productos (Desmet & Schifferstein, 2008; Myers, 2004).

El consumo del queso también puede estar asociado con los atributos fisicoquímicos, sensoriales y bioactivos que posea. Por ejemplo, el queso intacto tiene potencial para disminuir la presión y los factores de riesgo cardiovascular (obesidad, dislipidemia y diabetes tipo 2) (Santiago-López *et al.*, 2018). Además es una buena matriz para la liberación de compuestos biológicamente activos, los cuales incrementan durante el proceso de maduración (Santiago-López *et al.*, 2018).

El queso de Zacazonapan se comercializa fresco, oreado, (dos a cuatro semanas de elaborado), y «añejo», cuando madura más de un mes (Villegas de Gante *et al.*, 2014). Este proceso de maduración involucra una compleja serie de transformaciones químicas y bioquímicas, que le confieren al queso cierto sabor, aroma y textura. El más complejo de estos procesos es la proteólisis, la cual consiste en la degradación parcial de las proteínas en productos más simples y solubles como son: proteosas, aminoácidos, aminos, amoníaco, sulfuro de hidrógeno, ácidos volátiles, aldehídos, cetonas, péptidos, etc. (Villegas, 2004). En el caso de los péptidos pueden tener actividad biológica, como antihipertensiva, antimicrobiana, antitrombótica, inmunomoduladora,

antiamnésica, opioide y acarreadora de minerales. Algunas de estas actividades han sido reportadas en quesos entre ellos destacan: Fresco mexicano (Torres-Llanez, González-Córdova, Hernandez-Mendoza, García, & Vallejo-Cordoba, 2011), Cheddar (Lydia Ong, Henriksson & Shah, 2007; Pritchard, Phillips, & Kailasapathy, 2010), Cotija (Hernández-Galán *et al.*, 2016), Gouda (Saito, Nakamura, Kitazawa, Kawai & Itoh, 2000) y Manchego (Gómez-Ruiz, Ramos & Recio, 2002). Adicionalmente, los productos lácteos fermentados por bacterias ácido lácticas (BAL) tienen efecto antimicrobiano atribuido principalmente a la producción de ácidos orgánicos, pero también a otros compuestos tales como péptidos antifúngicos y bacteriocinas (De Vuyst *et al.*, 2007). A su vez autores señalan que el 99 % de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina (González-Martínez, 2003).

Dentro de este contexto, la información científica publicada acerca de las asociaciones entre el consumo del queso añejo de Zacazonapan y los valores, las emociones y el simbolismo son escasas, del mismo modo no existe información que documente la presencia y funcionalidad de péptidos bioactivos con propiedades antihipertensivas, antioxidantes, antimicrobianas, antitrombóticas, y las características sensoriales durante la maduración del queso. Para lograr los objetivos de la investigación, el trabajo se dividió en nueve capítulos, descritos en la presente tesis doctoral a partir del **Capítulo 3**.

En el **Capítulo 3** se determinó la estructura de los valores humanos en consumidores locales del queso añejo de Zacazonapan, y las rutas de influencia de estos valores en el consumo de este queso. Las determinaciones se realizaron mediante un análisis de escalamiento multidimensional y regresiones múltiples.

En el **Capítulo 4** se describe la identificación de comunalidades de diferentes significados otorgados por consumidores locales de queso añejo de Zacazonapan. Esto se determinó por la aplicación de encuestas, y el tratamiento de los datos se realizó mediante la clasificación en categorías, análisis de frecuencias, pruebas de K proporciones y el procedimiento de Marascuilo.

En el **Capítulo 5** se determinó la contribución de la medición de emociones, percibidas por consumidores de queso añejo de Zacazonapan, para distinguir quesos con diferentes características físicas, químicas y sensoriales, pero con la misma aceptabilidad. Además, se estimó el tiempo máximo de maduración del queso, donde la probabilidad de aceptación de consumo fuera igual al 50 %. Esto por medio del análisis de variables físicas y químicas, magnitud de diferencia (d'), perfil Flash, aceptabilidad global, intensidad de emociones y vida útil sensorial.

En el **Capítulo 6** se determinó la composición fisicoquímica de extractos liofilizados del queso añejo de Zacazonapan, perfil de aminoácidos, mapa peptídico, pesos moleculares de péptidos, y la presencia de grupos de péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva. Esto mediante análisis espectrofotométricos, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) y cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés).

En el **Capítulo 7** se determinó el perfil de aminoácidos, la actividad antioxidante en fracciones de extractos liofilizados del queso añejo de Zacazonapan con diferente peso molecular; mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), análisis espectrofotométricos asociadas a la determinación de la capacidad quelante de Cu^{2+} , de Fe^{2+} y captación del radical libre $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

En el **Capítulo 8** el objetivo fue determinar el contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis de extractos acuosos del queso y la presencia de péptidos con actividad antioxidante, mediante análisis espectrofotométricos.

Finalmente, en el **Capítulo 9** se determinó la actividad antitrombótica y antimicrobiana de extractos acuosos del queso de Zacazonapan a través de análisis espectrofotométricos. Además, se realizó un análisis fisicoquímico y sensorial del queso mediante pruebas fisicoquímicas, perfil Flash y análisis de perfil de textura (TPA) durante su maduración.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Quesos tradicionales mexicanos

Los quesos tradicionales mexicanos genuinos tienen una importancia múltiple dentro del país debido a que mantienen la integridad de las cadenas agroindustriales, dado que pequeños y medianos productores de leche tienen la oportunidad de estabilizar el precio de la leche, ofertar empleo y dar valor agregado a su producto, y con ello mejorar los ingresos familiares en los territorios donde se elaboran (Grass, Sánchez, & Altamirano, 2015; Villegas de Gante *et al.*, 2014). Así mismo, valorizan los recursos territoriales locales (ganado, forrajes, agua, suelo, clima, el saber hacer, etc.) y mantienen un patrimonio cultural y gastronómico que contribuye a la identidad nacional (Villegas de Gante *et al.*, 2014). Generalmente, son consumidos a nivel regional, buscados por personas que desean un producto de calidad con evocación de lo tradicional y genuino, pero respetando las tradiciones locales y el medio ambiente (Villegas & Cervantes, 2011). Sin embargo, debido a la presión que ejercen productos «similares» (quesos extendidos y análogos) se encuentran propensos al reemplazo, aunado a los pocos conocimientos de los más de 40 tipos de quesos genuinos. Esto conlleva a una poca valorización por parte de la población, una pérdida de la tradición y posiblemente de la identidad (Villegas & Cervantes, 2011). Los quesos mexicanos genuinos se caracterizan por ser elaborados a partir de leche fluida de vaca o cabra, con el empleo mínimo de aditivos, y gozan de una fuerte raíz histórica, así mismo son fabricados dentro del territorio nacional por mexicanos. Muchos son regionales por su vinculación con las condiciones ecológicas del territorio donde se producen, mientras que otros se han difundido por todo el país o al extranjero, caso del queso Oaxaca y Cotija (Villegas, Santos, & Hernández, 2009).

Los quesos mexicanos genuinos tienen beneficios potenciales dada su microflora nativa, el tipo de leche utilizado, y las diversas técnicas de los procesos de producción (Santiago-López *et al.*, 2018). Estudios en México sobre los componentes bioactivos son limitados, y su principal enfoque es en la actividad antioxidante y antihipertensiva de extractos solubles en agua obtenidos a partir de algunos quesos artesanales como queso de leche de oveja, queso Cotija, queso Crema de Chiapas, cocido y fresco de Sonora (Hernández-Galán *et al.*, 2016; Hernández -Galán *et al.*, 2017; Santiago-López *et al.*, 2018).

2.1.1. Queso añejo de Zacazonapan

El queso añejo de Zacazonapan es un queso tradicional mexicano producido en el suroeste del Estado de México, específicamente en el municipio de Zacazonapan localizado en las coordenadas geográficas 19° 04' 22" latitud norte y 100° 15' 18" longitud oeste, 1350 m de altitud con una superficie de 67 km² y cuya actividad principal es la ganadería (Hernández, Hernández, Villegas, & Aguirre, 2011). El origen de este queso no es conocido, pero se estima que tiene más de 100 años de existencia. Se elabora con leche cruda de vacas en libre pastoreo (Pardo Suizo europeo y americano con Cebú, Holstein con Cebú y Charolais con Holstein, y en menor proporción Cebú, Charolais, Gyr, Simmental y ganado criollo), se produce durante todo el año, aunque el mayor pico de producción se da durante el verano o en época de lluvias debido a la disponibilidad de pastura natural (Hernández *et al.*, 2011; Villegas de Gante *et al.*, 2014).

El queso puede ser consumido con diferente estado de madurez: fresco, el cual es menos salado y su formato de venta es un cilindro con un peso entre 200-250 g, oreado con dos o cuatro semanas de maduración, y «añejo» cuando madura más de un mes. El queso oreado se puede clasificar como un queso de pasta prensada, tajable y ligeramente afinado; el añejo, como de pasta prensada y friable con maduración hasta de un año. La presentación más frecuente es en forma de un bloque prismático rectangular, con una cara ligeramente convexa, a

manera de una ligera joroba. A menudo, ya en el mercado, las piezas se presentan con una superficie enchilada, debido a la aplicación de una pasta de chile guajillo que se unta como una fina capa (Hernández-Morales, Hernández-Montes, Aguirre-Mandujano, & Villegas De Gante, 2010; Villegas De Gante *et al.*, 2014). Una mínima comercialización se da a nivel local, la mayor parte del queso se vende en las comunidades de Colorines, Santo Tomás de los Plátanos, Valle de Bravo, Tejupilco, Luvianos y Temascaltepec, en el Estado de México (Hernández-Morales, Hernández-Montes, Aguirre-Mandujano, & Villegas De Gante, 2010).

2.2. Valores humanos en la preferencia de los alimentos

Los valores son objetivos deseables, transituacionales, variables en importancia, que sirven de principios rectores en la vida de las personas (Schwartz, 2012). El aspecto crucial del contenido que distingue entre los valores está determinado por el tipo de meta motivacional que expresan y las tres exigencias universales de la existencia humana que son las necesidades biológicas, requisitos de interacción social coordinada, y exigencias de supervivencia y funcionamiento del grupo social al que se pertenezca (Schwartz, 1994). Cada grupo e individuo representa cognitivamente estas necesidades como valores específicos, los cuales se comunican con el fin de explicar, coordinar y racionalizar sus conductas, ya que influyen en todos los aspectos de la vida diaria de los individuos (Pakizeh, Gebauer, & Maio, 2007; Schwartz, 1994).

2.2.1. Estructura de los valores humanos

Los valores humanos son usados para caracterizar a grupos culturales, sociedades e individuos, así mismo para rastrear el cambio a lo largo del tiempo y poder explicar las bases motivacionales de las actitudes y el comportamiento. (Schwartz, 2012). Estos pueden medirse utilizando métodos cuantitativos o cualitativos (Kitsawad & Guinard, 2014). Uno de los instrumentos utilizados con este fin es la estructura de valores de Schwartz (1992), la cual plantea cuatro

dominios de valor de orden superior: Auto-trascendencia, auto-mejora, apertura al cambio y conservación, que engloban a diez tipos de valores motivacionales dentro de los cuales quedan clasificados 56 valores humanos (Schwartz, 1992). En conjunto forman una estructura circular donde los valores próximos son complementarios, en tanto que, los valores opuestos son aquellos que se encuentran en lados contrarios, por ejemplo el valor motivacional de logro está relacionado con el de poder, mientras que en posición contraria a estos valores motivacionales se encuentran los de benevolencia y universalismo, aquellos que buscan el bienestar de los demás y no tan solo el propio (Figura 1) (Schwartz, 1994).

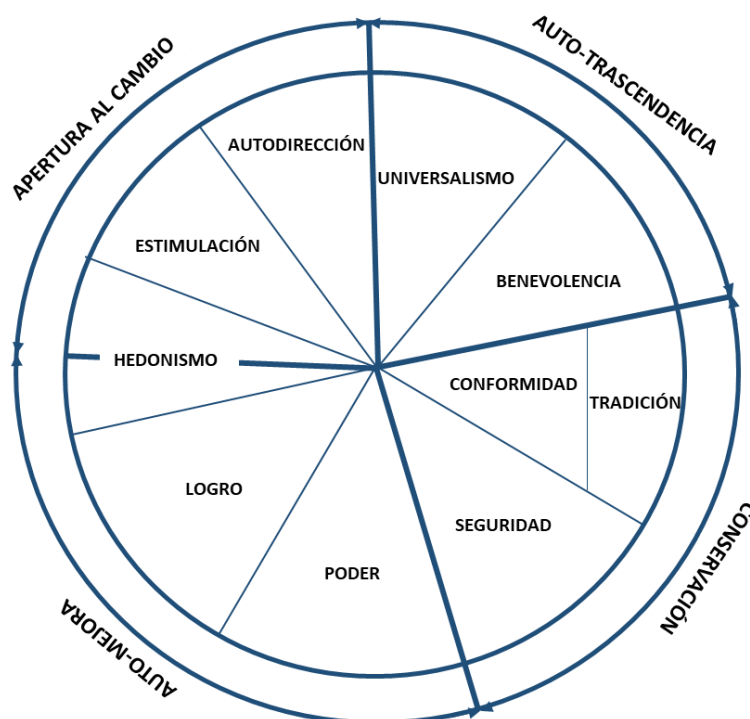


Figura 1. Modelo de la estructura teórica de los valores humanos divididos en cuatro dominios de valor de orden superior (Schwartz, 2012).

Es importante destacar que, aunque la naturaleza de los valores y su estructura pueden ser universales, los individuos y los grupos difieren sustancialmente en la importancia relativa que atribuyen a éstos (Schwartz, 2012), es decir, las únicas

diferencias individuales y culturales consisten en cuáles valores se consideran más importantes (Dreezens, Martijn, Tenbült, Kok, & De Vries, 2005).

2.2.2. Los valores humanos y su influencia en el consumo de los alimentos

Los valores son universales y están reconocidos por diferentes culturas alrededor del mundo, así como se encuentran conectados a las estructuras cognitivas de las personas y pueden influir en la percepción, la evaluación y las actitudes hacia objetos, personas o situaciones (Schwartz, 1992). Estos valores y las creencias influirán en el consumo de alimentos, ya que algunas personas decidirán consumir o no un alimento basados en consideraciones morales, adicional a los atributos de sabor, precio, disponibilidad y el valor nutritivo del producto (Dreezens *et al.*, 2005; Sharma & Mithileshwar, 2017). Gran parte de las investigaciones sobre consumidores se ha centrado en lo tangible de los bienes y servicios, los cuales realizan funciones utilitarias basadas en características objetivas (calorías, millas por galón, etc.). Por otra parte, una perspectiva experiencial indaga sobre los significados simbólicos de características más subjetivas (alegría, sociabilidad y elegancia) apoyando también la investigación de las relaciones multisensoriales en el comportamiento del consumidor, es decir una visión experiencial que se enfoca en la naturaleza simbólica, hedónica y estética del consumo dirigida a la búsqueda de fantasías, sentimientos y diversión (Holbrook & Hirschman, 1982). La prioridad del valor humano influiría en las motivaciones detrás de las elecciones de alimentos y en cómo las personas establecerán conexiones entre los atributos del producto (A), sus consecuencias (C) y sus valores personales (V). Por ejemplo, los consumidores con valores de hedonismo tenderían a dirigir sus enlaces A-C-V de modo que las consecuencias mantengan relación con el placer y el disfrute de la vida (Kitsawad & Guinard, 2014). Este es el caso de investigaciones donde se señala cómo influyen los valores sobre el consumo de carne, donde se mostró que una mayor valoración del Universalismo predijo actitudes más positivas hacia la reducción y el consumo menos frecuente de carnes rojas, carnes blancas y

pescados/mariscos, mientras que una alta valoración de Poder priorizó actitudes menos positivas hacia la reducción y el consumo más frecuente de estas carnes. Alta seguridad predijo actitudes menos positivas hacia la reducción y el consumo más frecuente de carnes blancas y pescados/mariscos, mientras que la valoración de la Conformidad produjo este último efecto solo para pescados/mariscos (Hayley, Zinkiewicz, & Hardiman, 2015). Otras investigaciones muestran un efecto positivo y significativo de los valores de Igualdad y Justicia Social en el consumo de productos de comercio justo (CJ), un efecto negativo y significativo de los valores de Poder y Estatus Social en el consumo de productos CJ; y ningún efecto significativo de los valores Auto-dirección en el consumo de este tipo de productos (Ladhari & Tchetgna, 2015). Estudios reportan influencia de los valores de Seguridad, Hedonismo, Benevolencia y Autodirección sobre las decisiones de consumo de bebidas saludables (Lee, Lusk, Miroso, & Oey, 2014).

Otras investigaciones señalan que cuatro dominios de valor: Auto-trascendencia, Auto-mejora, Apertura al Cambio y Conservación, influyen en la auto-identidad verde, que a su vez determina la intención del consumidor de adquirir automóviles eléctricos, tanto directa como indirectamente a través motivaciones de cuidado ecológico y obligación moral. Además, los consumidores que consideran que los valores del dominio de Auto-trascendencia y de Apertura al Cambio son importantes, tienden a expresar su Auto-identidad verde directamente en intenciones de adquirir un auto eléctrico, y mediante evaluaciones de obligación moral. Por el contrario, las personas quienes dieron más importancia a valores de Auto-mejora expresaron su Auto-identidad verde directamente tomando en cuenta las consideraciones ecológicas y morales para comportarse de manera menos ecológica. Finalmente, los consumidores que dieron importancia a los valores humanos de Conservación presentaron menor intención de adquirir automóviles eléctricos, y dieron menos importancia a los aspectos ecológicos y morales de las elecciones de consumo (Barbarossa, De Pelsmacker, & Moons, 2017). Por otra parte, hay investigaciones donde se señala la influencia directa e

indirecta de los valores humanos sobre el consumo de carne, automóviles y viajes (Allen, 2008). En este contexto, el desarrollo y comercialización de un producto implica determinar qué valores humanos priorizan los consumidores, y el papel que estos valores desempeñan en la gestión de las decisiones de consumo de alimentos (Lee *et al.*, 2014).

2.2.3. Modelos de influencia de los valores humanos sobre la preferencia de los alimentos

Allen (2000) clasifica la influencia de los valores en la preferencia del consumidor bajo tres enfoques: enfoque de influencia directa (relación preferencia del producto y valores humanos), enfoque general actitud-mediación (específica la estructura cognitiva – actitud a través de la cual los valores humanos median para influir en la preferencia del producto), y enfoque de mediación - atributo. Este último enfoque de mediación de atributos especifica las variables que intervienen entre los valores humanos y el comportamiento, así como la manera en que estas variables son aplicadas por los consumidores en el juicio del producto.

El enfoque de mediación por atributos tiene tres variantes, las cuales concuerdan en que la influencia de los valores humanos sobre la preferencia del producto esta mediada por los atributos, pero difieren en los roles de las creencias, la variable intermedia entre los valores humanos y la importancia de los atributos (Allen, 2000):

- a. Enfoque multi-atributo. Los consumidores derivan sus preferencias generales hacia los productos a partir de sus creencias sobre los atributos del producto que refuerzan los valores humanos y la importancia de esos valores (Lindberg, Gärling, & Montgomery, 1989).
- b. Cadena medio-fin. Considera que los valores humanos influyen en la importancia de los atributos del producto, que a su vez guían la evaluación del producto y la compra. Además los consumidores asocian los atributos

del producto con consecuencias que refuerzan los valores humanos (Gutman, 1982).

- c. Enfoque de centralidad de creencias. Afirma que los valores humanos son valores abstractos y centralmente influidos, los cuales organizan elementos de nivel inferior; el flujo teórico de la influencia es de valores humanos a valores de consumo para atribuir importancias (Scott & Lamont, 1973).

Estos enfoques tienen su fundamento en la teoría de expectativa valor de Fishbein (1967) y Rosenberg (1956) los cuales sugieren que una actitud hacia un objeto es una función de la probabilidad subjetiva de que el objeto produzca consecuencias positivas o negativas y la importancia de estas consecuencias. Esta conceptualización incluye dos componentes que son: la evaluación o importancia (predisposiciones a responder favorable o desfavorablemente a los objetos y son aprendidas por experiencia directa o indirecta con el objeto) y la creencia (referida a la existencia de ciertas características del objeto o la relación de este con otros objetos u objetivos), las cuales se combinan y conforman la actitud. Por lo que las actitudes hacia el objeto (A_o) por parte de los consumidores quedaría representada con la siguiente ecuación (Allen, 2000, 2008):

$$A_o = \sum_{i=1}^n B_i a_i$$

Donde B_i es la creencia de que el producto tiene el atributo i , a_i importancia asignada al atributo i , y n el número de atributos. La desventaja de esta teoría radica en que los consumidores solo evalúan los atributos tangibles sin poder explicar la proporción de la preferencia del producto derivada a partir de la evaluación de los atributos intangibles del producto (Allen, 2008). La distinción entre atributos tangibles e intangibles deberían ser consecuencia de la influencia de los valores humanos, estos como mediadores a través de ambos tipos de atributos para influir en la preferencia del producto (Allen, 2000). Allen & Ng (1999) y Allen (2000) propusieron el enfoque de significado del producto, el cual

describe dos subsistemas de la estructura de valor – actitud - comportamiento, que configuran la elección de un producto por parte de los consumidores. En el primero, los consumidores emiten un juicio fragmentado del producto, atributo por atributo, evaluando el significado utilitario del producto, y los valores humanos pueden influir en la importancia de los atributos tangibles que a su vez influyen en la preferencia del producto. En segundo lugar, cuando los consumidores evalúan el significado simbólico del producto y emiten un juicio afectivo, intuitivo y holístico, los valores humanos pueden influir directamente en la preferencia del producto. Cada ruta de influencia de valor tiene una función fisiológica distinta; la influencia indirecta es necesaria para los consumidores pues a través de ella sienten que pueden controlar su entorno de manera competente y efectiva, es decir el producto cumple una función instrumental; y la influencia directa satisface la necesidad que tienen los consumidores de expresar, mejorar y mantener sus identidades personales y sociales, cumpliendo el producto una función expresiva (Allen, 2001).

2.3. Cultura y símbolo

La cultura es definida como una colección de información, significados, normas y prácticas que son compartidas dentro de una población de individuos, no transmitida genéticamente entre ellos, y mantenida entre generaciones a través del tiempo, en donde se incluye la producción, elaboración y consumo de alimentos (Lo Monaco & Bonetto, 2019). En el estudio de las culturas, las representaciones sociales son empleadas y éstas pueden ser definidas como conjuntos estructurados de ideas, opiniones, conocimiento y creencias compartidas por un grupo social acerca de objetos sociales específicos. Estas construcciones sociales son consideradas como predictores de conductas y prácticas, e interesadas en la estructuración de visiones comunes de un objeto social a través de las interacciones interpersonales dentro de un grupo social específico (Lo Monaco & Bonetto, 2019). En el comportamiento de un individuo,

incluido el comportamiento de compra la cultura funge como una influencia fundamental externa (Neme Chaves & Rodríguez González, 2013).

El símbolo es definido como el signo cuyo significado se asocia a un código de otro plano o de otra lengua, los símbolos son conjuntos subjetivos y complejos de creencias abstractas asociadas con un objeto y referidas al contexto sociocultural en el que se desarrollan (Lotman, 2002). Estos símbolos permiten que los miembros de una misma comunidad pueden compartir los significados de objetos y acciones, lo cual contribuye al desenvolvimiento de la cotidianidad en la vida comunitaria (Páramo, 2011). McCracken (1986) sugirió que los significados están conformados por dos elementos: las categorías culturales (v.g. marcas de autos) y los principios culturales (v.g. bandera nacional). Las categorías culturales son las creadas por la comunidad para hacer distinciones de clase, estatus, género, edad y ocupación. Mientras que los principios culturales se asocian con los ideales y los valores humanos que determinan cómo se organizan, evalúan y clasifican los fenómenos culturales; cuando un producto simboliza un principio cultural, el simbolismo tiene un fuerte contenido de valor humano de ahí que, los valores humanos son una forma de principio cultural. Los individuos comparan los valores humanos simbolizados por un producto con sus propios valores humanos. En consecuencia, un producto que simboliza un valor humano que el individuo rechaza, resulta de menor preferencia, mientras que un producto que simboliza un valor humano que el individuo endosa debe resultar en una mayor preferencia de producto (McCracken, 1986). Los valores y las creencias son las unidades que construyen las actitudes en los consumidores (Dreezens *et al.*, 2005).

2.3.1. Significados en los alimentos

Los seres humanos como entes sociales interpretan su entorno, proporcionándole significados derivados de él, permitiendo la selección de productos dependiendo de lo que representa para ellos y para otros en sus grupos de referencia, en lugar de considerar primero las funcionalidades del

producto y su desempeño (Bakar, Lee, & Rungie, 2013). Lo anterior resulta de la entrada de información sensorial y su procesamiento en la mente, en consecuencia la naturaleza del objeto se hace evidente, por lo que el consumidor comienza a hacer asociaciones entre la identidad del objeto en particular y otras asociaciones conceptuales mantenidas en el cerebro, algunas de estas asociaciones se aprenden de fuentes externas y algunas se basan en experiencias internas; ellas permiten interpretar, comprender y de otra manera asignar significado a lo experimentado, no solo se reacciona al producto en sí, sino también a las conceptualizaciones asociadas, las cuales pueden ser funcionales, emocionales y abstractas (Thomson, Crocker & Marketo, 2010). El resultado de este proceso de interpretación es el significado (Richins, 1994).

Los productos de consumo pueden ser definidos como objetos psicológicos los cuales son símbolo de atributos, objetivos de patrones sociales y de esfuerzos realizados para su obtención (Levy, 1959). Algunos consumidores toman decisiones basados en la creencia de las propiedades «mágicas» de los alimentos, por ejemplo, la comida preparada por un ser querido es más saludable que la comida preparada por extraños (Aarnio & Lindeman, 2004). Por lo tanto, el campo del consumo simbólico es un área innovadora, compleja e intrigante para la investigación del comportamiento del consumidor (Hirschman, 1981).

Los productos que son símbolos, son vistos como poseedores de significado más allá de su presencia tangible, es decir, los consumidores les incorporan atributos que se extienden más allá de su naturaleza física inmediata (Hirschman, 1981). El significado simbólico asociado con el producto puede afectar en gran medida su adopción y uso, este significado simbólico puede, en algunas clases de productos, superar o dominar su desempeño técnico como determinante del consumo, esto es especialmente probable si el producto se utiliza con frecuencia para definir la posición social y/o identidad propia (Hirschman, 1981). Para que un producto funcione como símbolo debe ostentar comunalidad de significado entre los consumidores, esto manifiesta que un grupo de referencia posee en

común una conceptualización compartida del significado del producto y es expresada en porcentaje (Elliott, 1994). Adicional a esto, el simbolismo del consumo es más intenso con el incremento de la edad (Elliott, 1994). Lee (1990) propone al acto del consumo como una conducta simbólica para el consumidor, dado que éste posee mayor importancia que los beneficios funcionales del producto; y establece que los productos y servicios poseen una imagen determinada no solamente por sus atributos funcionales, sino también por una gran cantidad de factores intangibles, tales como reconocimiento de marca, precio, publicidad, país de origen, tiendas, empaque, etc.

2.4. Emociones asociadas a la preferencia de los alimentos

La emoción es una compleja experiencia psicofisiológica del estado mental de un individuo que interactúa con influencias bioquímicas (internas) y ambientales (externas). La emoción es un estado mental de preparación de un individuo, que surge de evaluaciones cognitivas de eventos o pensamientos, y ocurre como una respuesta a un estímulo (Bagozzi, Gopinath, & Nyer, 1999). La emoción implica una respuesta senso-motriz inconsciente y un proceso consciente de la experiencia emocional (Churchill & Behan, 2010; King, Meiselman, & Carr, 2010). En los seres humanos, la emoción implica fundamentalmente la excitación fisiológica, los comportamientos expresivos y la experiencia consciente (Myers, 2004). La elección de los alimentos, la motivación y la frecuencia de su consumo, además de satisfacer necesidades fisiológicas y nutricionales influye en los estados de ánimo y de activación de los consumidores (Booth, 1994; Kanjanakorn & Lee, 2017). Lund, Jaeger, Amos, Brookfield, & Harker (2006) indicaron que los consumidores tienen conexiones emocionales y sensoriales con los alimentos. Medir las emociones como parte o en adición a otras pruebas sensoriales, ha adquirido impulso en el campo de la ciencia sensorial y la investigación de los consumidores, ya que las emociones permiten diferenciar productos, predecir la elección del consumidor y actuar como una herramienta de mercadotecnia para atraer una amplia gama de consumidores (Kenney &

Adhikari, 2016; King, Meiselman, & Carr, 2010). Se han propuesto cinco fuentes diferentes de emociones alimentarias para representar las diversas condiciones de inducción reportadas: atributos sensoriales, consecuencias experimentadas, consecuencias anticipadas, significados personales o culturales y acciones de agentes asociados (Desmet & Schifferstein, 2008).

Los métodos empleados para medir las emociones incluyen los fisiológicos (Desmet & Schifferstein, 2008; Verastegui-Tena, van Trijp & Piqueras-Fiszman, 2019), los auto-reportes verbales (King & Meiselman, 2010) y los auto-reportes visuales (Liao, Corsi, Chrysochou & Lockshin, 2015). La metodología EsSense Profile® revisa las diferencias entre emociones y estados de ánimo, es un tipo de auto-reporte verbal conformado por una lista de 39 emociones, cuyas intensidades son medidas con una escala Likert de cinco puntos; además de medir la aceptabilidad global con una escala hedónica de nueve puntos para contrastar con las respuestas emocionales generadas por el producto (King & Meiselman, 2010; King *et al.*, 2010). Este método proporciona información adicional a las pruebas sensoriales tradicionales, además la lista de emociones puede ser editada para tener en cuenta emociones específicas según el producto a evaluar (King *et al.*, 2010).

Las metodologías antes mencionadas se han utilizado en el estudio de emociones evocadas en los consumidores por diversos productos. Manzocco, Rumignani, & Lagazio (2013) encontraron que ensaladas en mal estado se asociaron a que los consumidores se sintieran menos pacíficos, amistosos y ansiosos. Por otro lado, Kim, Prescott, & Kim (2017) mostraron diferencias en la intensidad de emociones entre pares de productos con diferente grado de dulzor; mientras que, Mora, Urdaneta, & Chaya (2018) señalaron que en vino hay una asociación de emociones positivas con atributos como afrutado y floral, y emociones negativas, como agresivo y culpable con atributos relacionados con un vino añejo. Respecto a las emociones que evoca el queso en los consumidores Schouteten *et al.* (2015) investigaron la influencia de la información

contenida en las etiquetas de queso Gouda sobre las emociones provocadas en consumidores, y encontraron que la mayoría de los consumidores asociaron la emoción «alegre» con el queso en cuya etiqueta no se incluyeron los términos «reducido en sal o light». Lund *et al.* (2006) demostraron que el impacto de las conexiones emocionales sobre el consumo de fruta no debe subestimarse, ya que puede influir notablemente en el valor monetario que el consumidor está dispuesto a pagar.

2.5. Estudios sobre vida de sensorial de anaquel

La evaluación sensorial es un factor clave en la determinación de la vida útil de muchos productos alimentarios (Hough, Langohr, Gomez, & Curia, 2003), por ejemplo galletas y mayonesa son productos microbiológicamente estables cuya vida útil puede determinarse por cambios en sus características sensoriales (López & Novoa, 2009). Mientras que muchos alimentos frescos, como el yogur o las pastas, después de un tiempo de almacenamiento relativamente prolongado pueden ser microbiológicamente seguros para comer, pero muchos pueden ser rechazados por cambios en sus características sensoriales (Hough *et al.*, 2003). Kamleh, Toufeili, Ajib, Kanso, & Haddad (2012) señalaron que la vida útil de un alimento está determinada por los cambios químicos, bioquímicos, microbiológicos y físicos que tiene lugar en la matriz del alimento después de su producción, distribución y venta. Esto se contradice con el punto de vista sensorial, donde se señala que los alimentos no tienen vida útil propia sino que esta depende de la interacción que tengan los alimentos con el consumidor, ya que se enfocará en la probabilidad de aceptación o rechazo del producto por parte de los consumidores después de un cierto tiempo (Hough *et al.*, 2003; Hough, 2010; Lund *et al.*, 2006). Esta vida útil sensorial es evaluada mediante un análisis de supervivencia (Hough *et al.*, 2003), el cual permite investigar eventos que contribuyen a un resultado a lo largo del tiempo (Kim, 2012). Esta es una función definida como la probabilidad de que un consumidor acepte un producto almacenado más allá de cierto tiempo (t) (Hough *et al.*, 2003). Este tipo de

análisis es ventajoso porque el trabajo sensorial experimental es relativamente simple. Un grupo de consumidores responde si aceptan o rechazan muestras con diferentes tiempos de almacenamiento o diferentes niveles de un defecto sensorial. Así mismo, la decisión de aceptar o rechazar estará relacionada con la percepción del consumidor al estar frente a un producto alimenticio cerca del final de su vida útil sensorial o cerca de los límites sensoriales intolerables (Garitta, Langohr, Gómez, Hough, & Beeren, 2015). Para la evaluación de la función de supervivencia se emplean modelos paramétricos dado que proporcionan estimaciones más precisas que los estimadores no paramétricos, las distribuciones aplicadas pueden ser lineal logarítmica, normal logarítmica y de Weibull (Gámbaro, Giménez, Varela, Garitta, & Hough, 2004; Garitta *et al.*, 2018). Esta última distribución sesgada a la derecha es muy flexible, por lo que es particularmente apropiada para modelar datos de supervivencia (Garitta *et al.*, 2015), donde los datos son de naturaleza discreta. Debido a que no se conoce exactamente a qué tiempo el consumidor rechazará el producto, por lo tanto se realiza un análisis de censura (Kim, 2012). Si se conoce que este tiempo es superior al tiempo observado, la censura que se hace es a la derecha; si se conoce que este tiempo es inferior al observado se tiene una censura a la izquierda. Mientras que la censura de intervalo está dada cuando el tiempo de interés cae dentro de un intervalo observado, y es el tipo de censura más frecuente (Hough *et al.*, 2003; Hough, 2010). El riesgo no está enfocado en el deterioro del producto sino en el rechazo del producto por el consumidor (Hough *et al.*, 2003). Este análisis se ha reportado en yogurth (Curia, Aguerrido, Langohr, & Hough, 2005; Garitta *et al.*, 2015; Hough *et al.*, 2003), queso Halloumi de Chipre (Kamleh *et al.*, 2012), queso mantecoso Hucariz y Cepof de Cajamarca, Perú (Sánchez-González & Pérez, 2016), queso doble crema y campesino de Colombia (López & Novoa, 2009; Novoa & López, 2008), entre otros.

2.6. Calidad de los alimentos

2.6.1. Modelo analítico de la calidad de los alimentos

La calidad de los alimentos es definida por Peri (2006) como un conjunto de requerimientos del consumidor que actúan en un circuito que va de los consumidores a los productores y viceversa. Estos requerimientos se pueden dividir en aquellos vistos como consumidor y los vistos como cliente. Los primeros agrupan a los requerimientos de seguridad (ausencia de factores de riesgo que pudieran afectar la salud del consumidor), de conformidad (adecuación del producto con su definición, y es establecido por la ley, regulaciones voluntarias o prácticas consuetudinarias), nutricionales (el principal objetivo de comer es satisfacer necesidades nutricionales). Los tres requerimientos anteriores son implícitos debido a que son medibles, verificables y certificables en el producto. Así mismo, en este grupo de requerimientos vistos como consumidor también se encuentran a los sensoriales (percepción e interacción del consumidor y el producto), los concernientes al contexto de la producción (requerimientos inmateriales que satisfacen las necesidades psicológicas y culturales, y su atractivo para los consumidores no depende en el «qué» de un producto alimenticio, pero sí del «cómo», «cuándo» y «dónde» se produjo) y los éticos (relacionado al sistema de valores que condiciona los comportamientos del consumidor).

Referente a los requerimientos vistos por el cliente se tienen a los de garantía (referidos a la certificación y trazabilidad, basados en la certificación de comportamientos y análisis final de las personas), del sistema empaque/producto (asociados a la funcionalidad y estética del empaque, información y conveniencia, y facilitando el reconocimiento, comercialización y uso del producto) y del sistema mercado/producto (referido al precio, a la disponibilidad del producto en el momento adecuado, en el lugar correcto y en la cantidad deseada).

Bajo este enfoque: los consumidores expresan expectativas y necesidades, es decir, «requisitos»; los cuales deben cumplirse por las «funciones» del producto; las funciones pueden derivar a partir de «características», y finalmente, las características se obtienen a través del control del proceso de producción.

2.7. Funcionalidad de las proteínas lácteas

En los últimos años dada la percepción de la relación entre los alimentos y la salud han surgido los denominados alimentos funcionales (Murray & Fitzgerald, 2007), parte de este grupo lo conforman la leche y sus derivados dado que presentan una doble función puesto que proveen de nutrientes y son fuente de sustancias biológicamente activas (Ariyoshi, 1993). En el Cuadro 1 se muestra las proteínas intactas de la leche con actividades biológicas.

Cuadro 1. Funciones biológicas de las proteínas de la leche.

Proteína	Función
Caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ)	Transporte de minerales y elementos traza (Ca, PO_4^{2-} , Fe, Zn y Cu), precursor de péptidos bioactivos con actividad inmunomoduladora, anticancerígena y fijadora de ácidos grasos.
β lactoglobulina	Transporte de vitaminas (retinol), antiviral, precursor de péptidos bioactivos, antioxidante, anticancerígeno, ligador de ácidos grasos y efectos hipercolesterolémico.
α lactoalbúmina	Transporte de calcio, inmunomodulador, anticancerígeno, precursor de péptidos bioactivos, papel potencial en la leche humana (promotor de la digestión, prevención de infecciones gastrointestinales) y síntesis de lactosa en glándulas mamarias.
Inmunoglobulinas G, M y A	Protección inmune específica (antisueros y sistemas complementarios), potencial precursor de péptidos bioactivos.
Glicomacropéptido	Antiviral, antimicrobiano, antitrombótico, bifidogénico y regulación de hormonas gástricas.

Lactoferrina	Antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, inmunomodulador, transportador de Fe, regulador de crecimiento celular, precursor de péptidos bioactivos y estimulación de proliferación de osteoblastos.
Lactoperoxidasa	Sistema antimicrobiano asociado al tiocianato y peróxido de hidrógeno, efecto sinérgico con inmunoglobulinas, lactoferrina y lisozima.
Lizosima	Antimicrobiana, efecto sinérgico con inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa.
Seroalbúmina	Precursor de péptidos bioactivos

Fuente: Modificado de Korhonen (2009) y Spadoti & Moreno (2005).

Como se muestra en el Cuadro 1 las proteínas de la leche son precursores de diferentes péptidos bioactivos, los cuales se encuentran inactivos dentro de la secuencia de las proteínas pero pueden ser liberados a través de la proteólisis durante la digestión gastrointestinal o el procesamiento de alimentos (como la fermentación de la leche) (Gobbetti, Ferranti, Smacchi, Goffredi, & Addeo, 2000).

2.7.1. Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos específicos de proteínas, los cuales varían en tamaño de 2 a 50 residuos de aminoácidos, y son capaces de ejercer una actividad reguladora en el organismo humano independiente de actuar como fuente de energía, nitrógeno o aminoácidos (Korhonen, 2009; Murray & Fitzgerald, 2007). Estos péptidos pueden ser obtenidos a través de diferentes vías como: hidrólisis por enzimas digestivas, proteólisis generada por bacterias ácido lácticas o por hidrólisis derivada de la acción de enzimas provenientes de microorganismos y plantas (Korhonen, 2009).

Durante la maduración del queso, en el proceso de proteólisis se liberan péptidos debido a la acción de las proteasas y peptidasas propias de la leche, cuajo, cultivos iniciadores, y microflora secundaria (López-Expósito, Miralles, Amigo, & Hernández-Ledesma, 2016). Estos péptidos pueden sobrevivir a la digestión gastrointestinal o servir como precursores para un péptido final, el cual puede

interactuar con los mismos receptores de los péptidos endógenos y ejercer efectos agonistas o antagonistas en el organismo (López-Expósito, Lourdes Amigo, 2012). Una vez que los péptidos son liberados pueden actuar como moduladores fisiológicos similares a una hormona, representando nutracéuticos encaminados a mejorar la salud, además de utilizarse en alimentos y darles una aplicación farmacéutica (Li, Le, Shi & Shrestha, 2004).

2.7.2. Papel de la maduración y las bacterias ácido lácticas en la producción de péptidos bioactivos en queso

En los quesos está presente un complejo microbiano conformado por BAL, levaduras y algunos hongos (Santiago-López *et al.*, 2018). Durante la maduración las BAL pueden ser adicionadas como cultivos iniciadores, y al menos un grupo de BAL no iniciadoras (lactobacilos, pediococos, enterococos y *Leuconostoc*), pueden presentarse en el queso, ambos grupos contribuyen al desarrollo de las características bioquímicas en quesos frescos y madurados (Santiago-López *et al.*, 2018). En estos últimos las BAL liberan exopolisacáridos, ácidos grasos, ácido γ -amino butírico (GABA), ácidos orgánicos, vitaminas y péptidos bioactivos (Beermann & Hartung, 2013).

La maduración es un proceso complejo llevado a cabo por enzimas propias de la leche, enzimas coagulantes, microorganismos que están presentes en la pasta del queso y las enzimas secretadas por éstos, que generan en la cuajada fresca una serie de cambios secuenciales en sus principales componentes (lactosa, proteínas, lípidos) transformándola en una masa homogénea de calidad fisicoquímica y sensorial, atractiva para los consumidores (Sánchez-Ponte, 2003). Los cambios bioquímicos llevados a cabo durante la maduración pueden ser agrupados en eventos primarios, los cuales incluyen metabolismo de la lactosa residual, lactato y citrato, lipólisis y proteólisis. Posteriormente, se dan los eventos bioquímicos secundarios importantes en el desarrollo de muchos compuestos volátiles relacionados con el aroma y sabor, e incluye el metabolismo de los ácidos grasos y de aminoácidos (McSweeney, 2004). El patrón de la

proteólisis puede ser resumido como sigue: inicialmente las caseínas son hidrolizadas mediante la actividad coagulante residual retenida en la cuajada (quimosina), por la plasmina, y quizá otras enzimas proteolíticas nativas, a un tamaño de péptidos grandes e intermedios que son hidrolizados a péptidos cortos y aminoácidos mediante proteinasas y peptidasas a partir de BAL, BAL no nativas y quizá microflora secundaria (McSweeney, 2004). El patrón y su extensión variará para cada tipo de queso por diferencias en la manufactura, y protocolos de maduración (tiempo, temperatura, humedad, actividad coagulante residual, activación del plasminógeno a plasmina y posiblemente el desarrollo de una alta actividad proteolítica de la microflora secundaria) (McSweeney, 2004).

Los péptidos bioactivos en su mayoría están encriptados o inactivos en la estructura de la proteína nativa y pueden ser liberados por hidrólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal o por acción de la plasmina (proteasa de la leche), proteasas y peptidasas intracelulares de las BAL, éstas últimas pueden contribuir a una mayor degradación después de la lisis celular (Ong *et al.*, 2007). La proteólisis llevada a cabo por las BAL involucra tres componentes: (1) proteinasas de la pared celular, las cuales inician la degradación de la caseína extracelular a oligopéptidos; (2) transportadores de péptidos dedicados a llevar los péptidos al interior de la célula; y (3) peptidasas intracelulares que degradan los péptidos en péptidos más cortos y aminoácidos (Liu, Bayjanov, Renckens, Nauta, & Siezen, 2010). Los péptidos bioactivos provenientes de queso han tenido un impacto positivo en la salud humana, y su actividad está basada en su composición y su habilidad para llegar al sitio blanco (Kwak, Ganesan & Hong, 2011). Esta composición de péptidos cambia dinámicamente durante la maduración del queso, debido a que algunas partes de la caseína son menos preferidas como sustrato por ciertas enzimas, y algunos de los péptidos liberados se descomponen rápidamente, mientras que otros péptidos se acumulan (Ardö, McSweeney, Magboul, Upadhyay & Fox, 2017). Cada variedad de queso tiene su desarrollo específico de composición peptídica determinada por las

actividades enzimáticas presentes, así como por las condiciones físicas de la matriz del queso (Ardö *et al.*, 2017).

2.7.3. Péptidos bioactivos en queso

Actividad antihipertensiva

Entre los péptidos bioactivos encontrados en quesos, los inhibidores de la ECA-I (enzima convertidora de angiotensina I) conforman la mayor contribución (Kwak *et al.*, 2011). El mecanismo más estudiado para referir que los péptidos tienen actividad antihipertensiva es la inhibición de la actividad de la ECA-I. Esta es una enzima dipeptidil carboxipeptidasa (EC 3.4.15.1) perteneciente a la familia de las proteasas que se unen a zinc, así mismo, es una exopeptidasa que separa dipéptidos del lado C-terminal de varios oligopéptidos y forma parte del sistema renina-angiotensina, el cual regula la presión arterial periférica (FitzGerald, Murray & Walsh, 2004; Lin, Zhang, Han & Cheng, 2017). La ECA-I cataliza la conversión de angiotensina I en el vasoconstrictor angiotensina II, y a la par genera la degradación del vasodilatador bradiquinina; propiciando con estas reacciones una contracción de los vasos sanguíneos, y en consecuencia incremento de la presión arterial (Sieber *et al.*, 2010).

El tipo de inhibición de los péptidos hacia la ECA-I se evalúa en función de la gráfica de Lineweaver-Burk, y muchos de estos inhibidores actúan como inhibidores competitivos de la ECA-I aunque algunos lo pueden hacer de modo acompetitivo y no competitivo (Li *et al.*, 2004). La ECA-I parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos (cadenas laterales aromáticos o ramificadas) en cada una de las tres posiciones C-terminal, aunque una Lys o Arg en el C-terminal con carga positiva en el grupo ϵ -amino también contribuyen con la inhibición (Vermeirssen, Camp, & Verstraete, 2004). Los tripéptidos o dipéptidos con alta actividad inhibidora contienen Trp, Phe, Tyr o Pro en el C-terminal y aminoácidos alifáticos ramificados en el N-terminal (Li *et al.*, 2004). La afinidad de unión del péptido al sitio activo de la

enzima puede ser favorecida por aminoácidos cargados positivamente (Gómez-Ruiz *et al.*, 2002). Adicionalmente, el mecanismo de inhibición de la ECA-I implica la interacción con sub-sitios que normalmente no están ocupados por sustratos o con un inhibidor aniónico enlazado al sitio que es diferente del sitio catalítico de la enzima (Li *et al.*, 2004).

Los péptidos inhibidores de la ECA-I cuyo origen son proteínas de alimentos, pueden ser utilizados como aditivos funcionales, dado que representan una alternativa natural y saludable a los fármacos inhibidores de ECA-I (Li *et al.*, 2019). Kwak *et al.* (2011) señalan que péptidos inhibidores de la ECA-I obtenidos de quesos no son tan potentes como los fármacos usados para este tratamiento, pero poseen una moderada bioactividad, por lo cual pueden ser usados como alimentos funcionales en la dieta diaria (Cuadro 2). Estos péptidos son liberados durante etapas de maduración tempranas e intermedias, por ello podrían hidrolizarse hasta llegar a ser fragmentos inactivos debido a un mayor grado de proteólisis (Gómez-Ruiz, Taborda, Amigo, Recio, & Ramos, 2006). Esta extensión de la degradación varía con el tipo y el almacenamiento de cada queso, el queso Gouda ha presentado mayor actividad durante un almacenamiento de dos años (Saito *et al.*, 2000), así mismo los quesos Parmesano Reggiano y Grana Padano después de 2.6 años de maduración presentaron actividad inhibidora de la ECA-I (Bernabucci, Catalani, Basiricò, Morera & Nardone, 2014).

Cuadro 2. Péptidos inhibidores de la ECA-I provenientes de queso.

Queso	Péptido inhibidor de la ECA-I	Referencias
Gouda	α_{s1} -CN f ^z (1-9), β -CN f (60-68)	Saito <i>et al.</i> (2000)
Festivo	α_{s1} -CN f (1-9), f (1-7) y f (1-6)	Ryhänen, Pihlanto-Leppälä, & Pahkala, (2001)
Manchego	Fragmentos de caseínas α_{s1} , α_{s2} y β de leche de oveja	Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2002)
Emmental	Péptidos bioactivos no identificados	Parrot, Degraeve, Curia, & Martial-Gros (2003)
Cheddar	κ -CN f (96-102), α_{s1} -CN f (1-9), α_{s1} -CN f (1-7), α_{s1} -CN f (1-6), α_{s1} -CN f (24-32) y β -CN f (193-209)	Ong & Shah (2008)

Manchego	Gln-Pro, Pro-Pro, Phe-P, Pro-Phe-Pro, Asp-Lys-Ile-His-Pro y Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe	Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2006)
Roncal	Gln-Pro, Pro-Pro, Pro-Lys-His-Pro, Asp-Lys-Ile-His-Pro y Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe.	Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2006)
Idiazábal	Gln-Pro, Phe-Pro, Asp-Lys-Ile-His-Pro y Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe	Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2006)
Cabrales	Pro-Pro, Asp-Lys-Ile-His-Pro y Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe.	Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2006)
Queso de cabra	VRGP, QP, PP, Asp-Lys-Ile-His-Pro y Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe	Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2006)
Tipo Roquefort	Nueve fragmentos de β -CN, cinco de α_{s2} -CN, y tres derivados de la α_{s1} -CN.	Meira <i>et al.</i> (2012)
Fresco mexicano	α_{s1} -CN: f (1-15), f (1-22), f (14-23) y f (24-34) β -CN: f (193-205), f (193-207) y f (193-209)	Torres-Llanez <i>et al.</i> (2011)

^{zf} Fragmento

Las concentraciones de inhibición de estos péptidos también varían entre los quesos, Smacchi & Gobbetti (1998) señalaron las concentraciones de inhibición de varios quesos italianos como Gorgonzola, Mozzarella e Itálico entre 59 – 80 %. Otra investigación señala porcentajes de inhibición entre 48.8 - 78.2 para quesos Gouda, Emmental, Azul, Camembert, Edam y Havarti (Saito *et al.*, 2000). Mientras que Gómez-Ruiz, Taborda, Amigo, Recio, & Ramos (2006) reportaron porcentajes de inhibición de la ECA-I para quesos españoles Idiazábal, Roncal, Mahón, Cabrales, Manchego y queso de cabra entre 70.6 y 87.5. Así mismo, quesos elaborados con leche cruda presentan una actividad inhibidora de la ECA-I más alta que quesos elaborados con leche pasteurizada (Bütikofer, Meyer, Sieber, Walther, & Wechsler, 2008; Gómez-Ruiz *et al.*, 2002).

Existen pocos reportes de actividad antihipertensiva en quesos mexicanos, Torres-Llanez, González-Córdova, Hernandez-Mendoza, Garcia, & Vallejo-Cordoba (2011) reportaron en queso fresco mexicano elaborado con BAL específicas porcentajes de inhibición de la ECA-I de 95.3-99.8. Otra investigación

reporta en queso Cotija un 100 % de inhibición de la ECA-I a los 6 meses de maduración (Hernández-Galán *et al.*, 2016).

Actividad antitrombótica

El queso se ha relacionado con una imagen nutricional adversa debido a su asociación con enfermedades cardiovasculares debido al contenido de ácidos grasos saturados, colesterol y sal (Ash & Wilbey, 2010). Pese a lo anterior, existen péptidos encriptados dentro de la secuencia del glicomacropéptido que son liberados a través del corte de κ -caseína por la renina, y tienen la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria y la unión del fibrinógeno (cadena- γ) a los receptores plaquetarios de la superficie para evitar la formación de trombos (Hartmann & Meisel, 2007). A nivel molecular existen similitudes entre la coagulación de la leche y la de la sangre, a esto se puede asociar la inhibición de la agregación plaquetaria (Jollès & Caen, 1991; Mulero, Zafrilla, Martínez-Cachá, Leal & Abellán, 2011). La región de interacción de la cadena γ de fibrinógeno humano en la agregación plaquetaria es la secuencia C-terminal del decapeptido (residuos 400-411), el cual posee efectos inhibitorios similares a los de los fragmentos típicos de κ -CN. Tres residuos de aminoácidos (Ile¹⁰⁸, Lis¹¹², Asp¹¹⁵) del citado undecapeptido de κ -CN (residuos 106-116) están en posiciones homólogas comparados con la cadena γ del fibrinógeno (Jollès *et al.*, 1986). Estos residuos parecen ser importantes para el efecto inhibitorio, el cual es producto de la competencia entre los péptidos antitrombóticos y los receptores plaquetarios de la cadena γ (Jollès, Loucheux-Lefebvre, & Henschen, 1978; Meisel, 1997). Por lo que, un péptido antitrombótico inhibe la reacción de la coagulación del fibrinógeno catalizada por la trombina (EC 3.4.21.5) (Domínguez-González *et al.*, 2014).

Respecto a la generación de péptidos lácteos con actividad antitrombótica Rutherford & Gill (2000) reportaron la existencia de varios péptidos derivados de la κ -CN y la lactoferrina. En leche fermentada por *Lactobacillus casei* Shirota

Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) reportaron al péptido Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val proveniente de β -CN (f 193 - 209) con actividad antitrombótica e inhibidora de la ECA-I; otra investigación de leche fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* reportó fracciones peptídicas con actividad antitrombótica (Domínguez-González *et al.*, 2014). En leche fermentada por *Lactobacillus casei* Shirota Guzmán-Rodríguez *et al.* (2019) señalaron péptidos inhibidores de la formación del coágulo con un 79.1 % de inhibición.

En general, los péptidos son candidatos a fármacos deficientes debido a su baja biodisponibilidad oral asociada a la degradación enzimática pre-sistémica y la mala penetración de la mucosa intestinal, por ende la propensión a metabolizarse rápidamente; por ello se requiere de investigación en el estudio detallado de la agregación plaquetaria con el fin de mejorar la baja biodisponibilidad oral (Kong, Huang, Shao, Li, & Wei, 2013).

Actividad antioxidante

El metabolismo oxidativo es esencial para la supervivencia de las células, pero contribuye a la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que generan procesos oxidativos (Pihlanto, 2006a). Los radicales libres son especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad (Venereo, 2002). Dentro de las especies reactivas de oxígeno se encuentran el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radicales peroxil ($\text{ROO}\cdot$) y aloxil ($\text{RO}\cdot$), óxido ($\text{NO}\cdot$ y dióxido nítrico ($\text{NO}_2\cdot$), peroxinitrito ($\text{OONO}\cdot$) (Lee *et al.*, 2004). Cuando existe un exceso de radicales libres los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión-s-transferasa no son protectores suficientes, y se da origen a efectos celulares destructivos y letales (por ejemplo, apoptosis) producto de la oxidación de los lípidos de la membrana, las proteínas celulares,

el ADN y enzimas, inhibiéndose la respiración celular (Lorenzo *et al.*, 2018; Pihlanto, 2006b). La estabilidad oxidativa de los alimentos está relacionada con el balance entre factores antioxidantes y prooxidantes, dentro de los sistemas antioxidantes se incluyen captadores de radicales libres (v.g. ascorbato y tocoferoles), quelantes de metales (v.g. ácidos orgánicos) y enzimas que inactivan especies reactivas de oxígeno (Elias, Kellerby & Decker, 2008).

Las moléculas antioxidantes juegan un papel importante ayudando a estos sistemas antioxidantes en el cuerpo humano, y en los sistemas alimentarios en la reducción de los procesos oxidativos, ya que en estos últimos retrasan la peroxidación lipídica y la formación de sus compuestos secundarios, contribuyendo a mantener el sabor, el aroma, la textura y, en algunos casos, el color (Elias *et al.*, 2008; Samaranayaka & Li-Chan, 2011), y por consiguiente un incremento de la vida de anaquel (Pihlanto, 2006a). Los péptidos antioxidantes presentes en alimentos tienen un papel importante en el mantenimiento de los sistemas antioxidantes de defensa del cuerpo humano, debido a la prevención en la formación o captación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, los cuales inducen daño oxidativo de biomoléculas y causan envejecimiento, cáncer, enfermedades del corazón, infarto y arterioesclerosis (Silva *et al.*, 2012). Muchos estudios hacen evidente que los radicales libres juegan un papel importante en diversas enfermedades tales como lesiones tisulares del pulmón, corazón, sistema cardiovascular, riñones, hígado, ojos, piel, músculos, cerebro, y el proceso de envejecimiento (Qian *et al.*, 2011; Shahidi, 2015). Los compuestos involucrados con estas enfermedades son los peróxidos lipídicos y los compuestos de bajo peso molecular producidos durante la etapa tardía de la reacción oxidativa (Pihlanto, 2006a). Como una alternativa que contrarresta el daño oxidativo provocado por radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) se tienen a los péptidos antioxidantes provenientes de fuentes naturales, los cuales actúan impidiendo que otras moléculas como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y moléculas del ADN se unan al oxígeno; como resultado de su capacidad de quelar metales, interactuar con los radicales libres presentes en

un determinado microambiente, tales como los de la membrana plasmática, el citosol, el núcleo o líquido extracelular (Qian *et al.*, 2011; Venereo, 2002; Thomas, 1994).

Los antioxidantes empleados en los alimentos, o presentes en ellos, según su naturaleza pueden ser primarios (neutralizan los radicales libres mediante donación de átomos de hidrógeno o transferencia de electrones) y secundarios (neutralizan los catalizadores prooxidantes, por ejemplo quelantes de metales prooxidantes o desactivadores de especies reactivas –radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido, oxígeno singlete, oxígeno nítrico, peróxido, semiquinona y ozono-) (Shahidi, 2015; Venereo, 2002). Potentes antioxidantes artificiales como el BHA (hidroxianisol butilado) BHT (hidroxitolueno butilado) y galato actúan sobre los sistemas oxidativos, pero originan cierto riesgo, por lo que su uso es restringido o incluso prohibido (Pihlanto, 2006a).

En el proceso de elaboración y maduración del queso son generados varios péptidos con actividades antioxidantes, los cuales son obtenidos de dominios de proteínas de la leche que muestran actividad antioxidante (Hernández-Galán, Cardador-Martínez, *et al.*, 2017; Kwak *et al.*, 2011). Samaranayaka & Li-Chan (2011) señalaron que el potencial antioxidante de los péptidos está determinado por la composición de aminoácidos, secuencia y tamaño. Esto porque diferentes residuos de aminoácidos y secuencias del péptido son responsables de la inhibición de reacciones oxidativas que son iniciadas por distintos tipos de radicales libres o prooxidantes tales como iones metálicos. Así como por el diferente ambiente molecular en el que se desarrollan las reacciones (acuoso, lipídico, o sistema de emulsión, diferentes condiciones de pH, presencia de otros compuestos en la matriz del alimento o sistemas biológicos, etc.) (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Los péptidos tienen la ventaja de contener múltiples unidades en una sola cadena, y por lo tanto, el poder antioxidante podría ser aditivo y superior al de los aminoácidos libres de una sola unidad (Aluko, 2015). Un mayor contenido de aminoácidos aromáticos como Tyr, Pro, Phe y Met puede mejorar

las interacciones con el radical libre hidrófobo DPPH (Aluko, 2015). La Leu mejora la interacción del péptido con el entorno liofílico, incrementando la habilidad de captar radicales libres por parte de los péptidos (Aluko, 2015). La Met es un importante captador de radicales libres que puede ser regenerado en sistemas biológicos como el tocoferol, que es regenerado mediante el ácido ascórbico, que a su vez es regenerado subsecuentemente por NADPH (Elias *et al.*, 2008). La mayoría de antioxidantes derivados de alimentos tienen pesos moleculares en un rango de 500 a 1500 Da, a veces pueden incluir residuos de aminoácidos hidrófobos como Val o Leu en el extremo N-terminal de los péptidos, y Pro, His, Tyr, Trp, Met y Cys (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). La existencia de unidades repetidas de aminoácidos hidrófobos (Ala, Gly, Leu, Val y Pro) pueden aumentar la interacción de péptidos con lípidos y mejorar la captación de peróxidos dañinos o radicales libres; y unidades repetidas de donantes de electrones como Glu, Met y Asn mejoran la captación de radicales libres, reducen el estado oxidativo, aumentando la captación de cationes metálicos (Aluko, 2015). Los grupos fenólico e indólico del Trp y la Tyr específicamente presentes en leche pueden actuar como donadores de átomos de hidrógeno (Hernández-Ledesma, Dávalos, Bartolomé, & Amigo, 2005). Reportes atribuyen a los residuos de aminoácidos His y Pro la actividad inhibitoria de péptidos, de la peroxidación de lipoproteínas (Gupta, Mann, Kumar, & Sangwan, 2009). Estos últimos autores reportaron que en extractos de queso Cheddar la mayor actividad antioxidante se obtuvo con una maduración de cuatro meses, posteriormente los péptidos con esta actividad se degradaron al continuar la maduración. Mientras que en extractos acuosos de queso Parmesano Reggiano los péptidos con esta actividad no fueron afectados por el tiempo de maduración ni por la digestión gastrointestinal simulada, atribuyendo la actividad principalmente a los aminoácidos libres, principalmente Tyr, Met y Trp (Bottesini *et al.*, 2013). Pritchard *et al.* (2010) identificaron péptidos con un peso molecular mayor a 10 kDa en varios quesos comerciales y orgánicos producidos en Australia, los cuales generan mayor captación del radical DPPH (Cuadro 3).

Cuadro 3. Péptidos con capacidad antioxidante en quesos mexicanos.

Queso	Péptido capacidad antioxidante	con	Método	Referencias
Fresco mexicano de leche de oveja	ND		Captación radical DPPH	del Hernández- Galán <i>et al.</i> (2017)
Cotija	ND		Captación radical DPPH	del Hernández- Galán <i>et al.</i> (2016)
Cheddar	ND		Captación radical ABTS ^{•+} y DPPH	del Gupta <i>et al.</i> (2009; Pritchard <i>et al.</i> (2010)
Stracchino	Fragmentos de β - CN: f (115-120) y f (192-197).		Reducción del estrés celular oxidativo por inhibición de la liberación de especies reactivas de oxígeno y activación de la ruta Nrf2 y expresión de superóxido dismutasa	del Pepe <i>et al.</i> (2016)
Coalho	ND		Captación radical ABTS ^{•+}	del Silva <i>et al.</i> (2012)
Parmesano- Reggiano	ND		Captación radical ABTS ^{•+}	del Bottesini <i>et al.</i> (2013)
Cottage	ND		Captación radical DPPH	del Abadía-García <i>et al.</i> (2013)
Tipo Burgos	α_{s1} -CN f (180-199) β -CN f (193-209) y f (191-209)		Captación del radical DPPH y quelación de hierro	del Timón, Parra, Otte, Broncano, & Petrón (2014)
Tipo Roquefort	Nueve fragmentos provenientes de β - CN, cinco de α_{s2} - CN y tres fragmentos a partir de α_{s1} -CN.		Captación del radical ABTS ^{•+} , Poder reductor, actividad quelante, TBARS	del Meira <i>et al.</i> (2012)

ND. No determinado.

Muchas proteínas cuya función biológica específica no es almacenar o transportar metales son capaces de quelar metales, debido a la presencia de residuos de aminoácidos como His, Glu, Asp, Ser y Thr fosforiladas capaces de unir metales (Elias *et al.*, 2008).

Un parámetro asociado a la actividad antioxidante es el poder reductor, y éste se ha reportado en quesos Pecorino toscano, Roquefort y Pecorino brasileños, y en queso tipo Pecorino Sardo, Cerrillano de Uruguay y Tipo Feta con 0.2-0.3 unidades de absorbancia a 700 nm, esto implica que los extractos solubles en agua de estos quesos son fuente de protones y electrones para mantener el potencial redox (Meira *et al.*, 2012). Se sugiere que un alto poder reductor y la captación del radical DPPH en queso Roquefort está asociado a la presencia de péptidos con alto contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, por consecuencia una baja polaridad favorece estas propiedades (Meira *et al.*, 2012). La quelación de metales puede involucrar aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos y gran cantidad de His, debido a su anillo de imidazol (Megías *et al.*, 2007).

Actividad antimicrobiana

Los péptidos antimicrobianos pueden tener un origen ribosomal o no ribosomal (Rai, Pandit, Gaikwad, & Kövics, 2016), están compuestos por menos de 50 aminoácidos en su mayoría hidrófobos, y su peso molecular es menor a 10 kDa (Saadi, Saari, Anwar, Hamid, & Ghazali, 2015). El espectro de actividad de estos péptidos es amplio, pudiendo tener actividad antiviral, antifúngica, antibacteriana e incluso en algunos casos, antitumoral (Téllez & Castaño, 2014).

Las fuerzas físicas que impulsan la actividad antibacteriana incluyen carga neta positiva (interacción con los lípidos y otras bacterias blanco), hidrofobicidad (para inserción en la membrana) y flexibilidad (permite la transición del péptido en la disolución a una conformación para la interacción con la membrana); estas fuerzas pueden variar pero son importantes para la interacción péptido-membrana bacteriana (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006). La etapa inicial es la

interacción entre el péptido y la célula blanco mediante fuerzas electrostáticas entre el péptido catiónico y los componentes cargados negativamente que conforma la membrana de la bacteria tales como grupos fosfato y lipopolisacáridos en las gram negativas o ácidos lipoteicoicos en las membranas de gram positivas. Los péptidos pueden generar tres tipos de eventos: formación de un canal transitorio o poro, disolución de la membrana, o translocación a través de la membrana (generando inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de proteínas, actividad enzimática, y síntesis de la pared celular (Jenssen *et al.*, 2006).

Las proteínas de la leche como las α -CN, κ -CN y las proteínas del suero son una fuente importante de péptidos antimicrobianos, que por lo general poseen un carácter anfifílico y catiónico, los cuales son importantes en el mecanismo de acción (Benkerroum, 2010). Algunos de los factores que influyen en la actividad antimicrobiana de estos péptidos en el queso son el tiempo de maduración, el cual es promotor de la generación de péptidos. Lignitto *et al.* (2012) señalan que la actividad antilisterial de extractos acuosos de queso Asiago estuvo relacionada con la maduración, pero no con el sistema de producción del queso, las variaciones en las condiciones de alimentación y el ordeño de las vacas. Sin embargo, Rizzello *et al.* (2005) encontraron que mayor tiempo de maduración puede estar relacionado con la hidrólisis de los péptidos y la pérdida de la actividad antimicrobiana en quesos Parmesano Reggiano, Fossa y Gorgonzola. Así mismo, la leche de la especie animal de la cual se obtenga el queso y por consiguiente los péptidos, conlleva a tener diferencia en cuanto a la actividad antimicrobiana, por ejemplo López-Expósito, Gómez-Ruiz, Amigo, & Recio, (2006) señalaron que el fragmento α_{s2} -CN bovina f (183–207) presentó al menos 200 veces más actividad antibacteriana que el fragmento α_{s2} -CN ovina f (184–208).

Se han reportado péptidos antimicrobianos en varios quesos que hacen que la resistencia microbiana sea improbable, por ejemplo investigaciones han

señalado actividad antimicrobiana en extractos acuosos de queso Canastra artesanal contra *Escherichia coli* (Lopes et al., 2018); en queso Asiago contra *Listeria innocua* LRGIA 01 pero no *Listeria monocytogenes* cepa 102 (Lignitto et al., 2012); de queso Coalho brasileño contra *Enterococcus. faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Silva et al., 2012); extractos de queso Cheddar australiano contra *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* (Pritchard, Phillips, & Kailasapathy, 2010); de quesos Italianos contra *Escherichia. coli*, *Bacillus megaterium*, *Listeria innocua* y *Staphylococcus. aureus* (Rizzello et al., 2005).

Bacteriocinas

La actividad antimicrobiana en productos lácteos fermentados por BAL se debe principalmente a la producción de diversos metabolitos como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono, pero también a otros compuestos tales como péptidos antifúngicos y bacteriocinas (Leroy & De Vuyst, 2010). Estas últimas son un grupo heterogéneo de péptidos con actividad antimicrobiana. Pueden ser producidas por bacterias gram positivas (+) o gram negativas (-) (Beshkova & Frengova, 2012; Dolz, 2008). Investigadores señalan que el 99 % de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y pocas han sido aisladas, aunque en los últimos años el aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos naturales, como son las bacteriocinas (González-Martínez, Gómez-Treviño, & Jiménez-Salas, 2003).

Las bacteriocinas son clasificadas en: Clase I. Lantibióticos, Clase II (a, b y c). No lantibióticos y Clase III. Bacteriolisinas (González-Martínez et al., 2003; Leroy & De Vuyst, 2010). El modo de acción de las bacteriocinas es complejo en cuanto a las más estudiadas como la nisina y la pediocina, en general actúan destruyendo la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños que altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía, la síntesis de proteínas o de

ácidos nucleicos. En el caso de las bacteriocinas Clase IIa se ha sugerido que la región consenso (secuencia que representa a los aminoácidos que se encuentran con mayor frecuencia en cada posición de un fragmento de una proteína) amino terminal juega un papel importante en el reconocimiento de la membrana de la célula blanco. Las de Clase IIb dependen de la acción de dos péptidos para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana (González-Martínez *et al.*, 2003).

2.8. Literatura citada

- Aarnio, K., & Lindeman, M. (2004). Magical food and health beliefs: A portrait of believers and functions of the beliefs. *Appetite*, 43(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2004.03.002>
- Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S. T., Arvízu, S. M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., ... Amaya-Llano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.005>
- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 44(1).
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6685–6702. <https://doi.org/10.3390/ijms12106685>
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591(1–2), 181–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613051>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>

- Allen, M. W. (2000). The Attribute-mediation and Product Meaning Approaches to the influences of human values on consumer choices. *Advances in Psychology Research*, 1(January), 1–39.
- Allen, M. W. (2001). A practical method for uncovering the direct and indirect relationships between human values and consumer purchase. *Journal of Consumer Marketing*, 18(2), 102–120. <https://doi.org/10.1108/07363760110385983>
- Allen, M. W. (2008). *The direct and indirect influences of Human values on consumer choices*. Universidad Victoria de Wellington.
- Allen, M. W., & Ng, S. H. (1999). The direct and indirect influences of human values on product ownership. *Journal of Economic Psychology*, 20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4870\(98\)00041-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4870(98)00041-5)
- Alonzo-Paz, A. L., Lugo-Cervantes, E. C., Tovar-Pérez, E. G., & Chombo-Morales, M. P. (2016). Evaluación de la proteólisis del queso Cotija región de origen MC asociado al tiempo de maduración. In *Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ*.
- Aluko, R. E. (2015). *Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00005-1>
- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. (2017a). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Fourth, pp. 445–482). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Ariyoshi, Y. (1993). Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4(5), 139–144. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90033-7)
- Ash, A., & Wilbey, A. (2010). The nutritional significance of cheese in the UK diet. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 305–319. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00606.x>
- Bagozzi, R. P., Gopinath, M., & Nyer, P. U. (1999). The role of emotions in marketing. *Journal of the Academy of Marketing Science*, 27(2), 184–206. <https://doi.org/10.1177/0092070399272005>
- Bakar, A., Lee, R., & Rungie, C. (2013). The effects of religious symbols in product packaging on Muslim consumer responses. *Australasian Marketing Journal*, 21(3), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.ausmj.2013.07.002>
- Barbarossa, C., De Pelsmacker, P., & Moons, I. (2017). Personal Values, Green Self-identity and Electric Car Adoption. *Ecological Economics*, 140, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.05.015>

- Barth, A. (2000). The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 74(3–5), 141–173. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00021-3)
- Becker, E. M., Nissen, L. R., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219(6), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1012-4>
- Beermann, C., & Hartung, J. (2013). Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food and Function*, 4(2), 185–199. <https://doi.org/10.1039/c2fo30153a>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42(2), 227–236. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>
- Benkerroum, N. (2010). Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 320–338. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00584.x>
- Bernabucci, U., Catalani, E., Basiricò, L., Morera, P., & Nardone, A. (2014). In vitro ACE-inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses. *International Dairy Journal*, 37(1), 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.02.009>
- Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering Life Science*, 12(4), 2012.
- Booth, D. A. (1994). *Psychology of nutrition*. London: Taylor & Francis.
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., ... Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 953–958. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.821696>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bruinenberg, P. G., De Roo, G., & Limsowtin, G. K. Y. (1997). Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris SK11: Possible role in flavor compound formation during cheese maturation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 561–566. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.2.561-566.1997>

- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., & Wechsler, D. (2008). Occurrence of the Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibiting Tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in Different Cheese Varieties of Swiss Origin. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 29–38. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0413>
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.017>
- Choonpicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N., & Niamsup, H. (2015). Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3134–3139. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1581-6>
- Churchill, A., & Behan, J. (2010). Comparison of methods used to study consumer emotions associated with fragrance. *Food Quality and Preference*, 21(8), 1108–1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.07.006>
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & Drago, S. R. (2016). Chelating Properties of Peptides from Red Seaweed *Pyropia columbina* and Its Effect on Iron Bio-Accessibility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 96–101. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0533-x>
- Conway, V., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2013). Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 364–372. <https://doi.org/10.1021/jf304309g>
- Corrêa, F. A. P., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, M. M. S., Lopes, C. F., Segalin, J., ... Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247–2254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>
- Corrêa, Folmer Ana Paula, Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, M. M. S., Segalin, J., & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001>
- Curia, A., Aguerri, M., Langohr, K., & Hough, G. (2005). S : Sensory and Nutritive Qualities of Food Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Yogurts — I : Argentine Formulations. *Journal of Food Science*, 70(7), S442–S445.
- Dairou, V., & Sieffermann, J. M. (2002). A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. *Journal of Food Science*, 67(2), 826–834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10685.x>

- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004a). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004b). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Delarue, J., & Sieffermann, J. M. (2004). Sensory mapping using Flash profile. Comparison with a conventional descriptive method for the evaluation of the flavour of fruit dairy products. *Food Quality and Preference*, 15(4), 383–392. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00085-5)
- Delgadillo-Puga, C., Cuchillo-Hilario, M., León-Ortiz, L., Ramírez-Rodríguez, A., Cabiddu, A., Navarro-Ocaña, A., ... Pedraza-Chaverri, J. (2019). Goats' feeding supplementation with acacia farnesiana pods and their relationship with milk composition: Fatty acids, polyphenols, and antioxidant activity. *Animals*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/ani9080515>
- Desmet, P. M. A., & Schifferstein, H. N. J. (2008). Sources of positive and negative emotions in food experience. *Appetite*, 50(2–3), 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2007.08.003>
- Dolz, M. C. (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 28(3), 20–37.
- Domingues, G. B., Parra, B. D., Giacometti, C. F., & Lúcia, G. M. (2019). Lactobacillus rhamnosus GG improves the sensorial profile of Camembert-type cheese: An approach through flash-profile and CATA. *Lwt*, 107(March), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.077>
- Domínguez-González, K. N., Cruz-Guerrero, A., González-Márquez, H., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J., & Rodríguez-Serrano, G. (2014). Antihypertensive and antithrombotic activities of a commercial fermented milk product made with Lactobacillus casei Shirota and Streptococcus thermophilus. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 358–364. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12133>
- Dreezens, E., Martijn, C., Tenbült, P., Kok, G., & De Vries, N. K. (2005). Food and the relation between values and attitude characteristics. *Appetite*, 45(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.03.005>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Elliott, R. (1994). Exploring the Symbolic Meaning of Brands. *British Journal of Management*, 5(June), S13–S19. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8551.1994.tb00126.x>

- Enab, A. K., Hassan, F. A. M., & Abd, M. A. M. G. E. (2012). Effect of manufacture steps on cheese structure (review). *International Journal of Academic Research*, 4(6), 79–89. <https://doi.org/10.7813/2075-4124.2012/4-6/a.11>
- Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18(7), 759–773. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.012>
- Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., & Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω -3 enriched milk. *Food Chemistry*, 123(4), 1081–1089. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.067>
- Fernández, M., & Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Fishbein, M. (1967). Readings in attitude theory and measurement. In I. M. Fishbein (Ed.) (pp. 389–400). New York: John Wiley & Sons.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive Peptides in Nutrition and Health Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S–988S. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1691>
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79246-8)
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. EE. UU.: Aspen Publishers.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1–2), 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)
- Gallegos-Tintoré, S., Torres-Fuentes, C., Martínez-Ayala, A. L., Solorza-Feria, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J., & Vioque, J. (2011). Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1618–1624. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4357>
- Gámbaro, A., Giménez, A., Varela, P., Garitta, L., & Hough, G. (2004). ANALYSIS, 19, 500–509.
- Ganesan, B., & Weimer, B. C. (2017). Amino Acid Catabolism and Its Relationship to Cheese Flavor Outcomes. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Vol. 1, pp. 483–516). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
- Garitta, L., Langohr, K., Elizagoyen, E., Gugole, F., Gómez, G., & Hough, G. (2018). Survival analysis model to estimate sensory shelf life with temperature and illumination as accelerating factors. *Food Quality and*

Preference, 68(March), 371–376.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.03.014>

- Garitta, L., Langohr, K., Gómez, G., Hough, G., & Beeren, C. (2015). Sensory cut-off point obtained from survival analysis statistics. *Food Quality and Preference*, 43, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.02.012>
- Gkatzionis, K., Hewson, L., Hollowood, T., Hort, J., Dodd, C. E. R., & Linforth, R. S. T. (2013). Effect of *Yarrowia lipolytica* on blue cheese odour development: Flash profile sensory evaluation of microbiological models and cheeses. *International Dairy Journal*, 30(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.010>
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898–3904. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3898-3904.2000>
- Gómez-Ruiz, J. Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., & Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1061–1067. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0820-3>
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12(8), 697–706. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00059-6)
- Gómez-Ruiz, J. Á., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., & Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223(5), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0238-0>
- González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4(2).
- Grass, R. J. F., Sánchez, G. J., & Altamirano, C. J. R. (2015). Análisis de redes en la producción de tres quesos mexicanos genuinos. *Estudios Sociales*, 23(45), 185–212.
- Guinee, T. P., & Fox, P. F. (2004). *Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects*. (E. Ltd., Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Third, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., & Sangwan, R. B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 339–347. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00509.x>

- Gutman, J. (1982). Chain Model Consumer Categorization. *Journal of Marketing*, 46(2), 60–72.
- Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Iron binding and antithrombotic peptides released during the fermentation of milk by *Lactobacillus casei* Shirota. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1161–1165.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/guzman>
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Hayley, A., Zinkiewicz, L., & Hardiman, K. (2015). Values, attitudes, and frequency of meat consumption. Predicting meat-reduced diet in Australians. *Appetite*, 84, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.10.002>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., López-del-, M., Picque, D., Spinnler, H. E., Martín, S. T., ... Martín, S. T. (2017). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fresh goat cheese prepared without starter culture : a preliminary study. *CyTA - Journal of Food*, 15(1), 49–57. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1202325>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H. E., López-del-Castillo Lozano, M., & Martín del Campo, S. T. (2016). ACEI and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85–91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n3p85>
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588–593.
<https://doi.org/10.1021/jf048626m>
- Hernández-Montes, A. (2019). Influencia de valores humanos en la aceptación del queso chapingo y sus significados intangibles de compra influence of human values on the acceptance of chapingo cheese and its intangible meanings of purchase. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 16(4), 497–511.
<https://doi.org/https://doi.org/10.22231/asyd.v16i4.1283>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., & De Gante, A. V. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., & Villegas De Gante, A. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of*

- Dairy Technology*, 63(4), 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hernández, M. C., Hernández, M. A., Villegas, D. G. A. Z., & Aguirre, M. E. (2011). El proceso socio-técnico de producción de Queso Añejo de Zacazonapan, Estado de México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2(2), 161–176.
- Hickey, C. D., O'Sullivan, M. G., Davis, J., Scholz, D., Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., & Sheehan, J. J. (2018). The effect of buttermilk or buttermilk powder addition on functionality, textural, sensory and volatile characteristics of Cheddar-style cheese. *Food Research International*, 103(September 2017), 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.081>
- Hickey, D. K., Guinee, T. P., Hou, J., & Wilkinson, M. G. (2013). Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 30(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.006>
- Hirschman, E. C. (1981). Comprehending Symbolic Consumption: Comprehending three theoretical issues. In *In Symbolic Consumer Behavior* (pp. 4–6). Hirschman and Morris B. Holbrook, New York, NY : Association for Consumer Research.
- Holbrook, M. B., & Hirschman, E. C. (1982). The Experiential Aspects of Consumption: Consumer Fantasies, Feelings, and Fun. *Journal of Consumer Research*, 9(2), 132. <https://doi.org/10.1086/208906>
- Hough, G., Langohr, K., Gomez, G., & Curia, A. (2003). Survival Analysis Applied to. *Journal of Food Science*, 68(1), 359–362.
- Hough, Guillermo. (2010). *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products*.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Huma, N., Rafiq, S., Sameen, A., Pasha, I., & Khan, M. I. (2018). Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(2), 287–292. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0031>
- Illescas-Marin, C., Hernández-Montes, A., Estrada-Estrada, E., Murguía-Cozar, R., Espejel-García, A., & Santos-Moreno, A. (2019). Influencia de los valores humanos en el consumo de quesos tradicionales chiapanecos: una comparación de las rutas directa e indirecta. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(4), 966–985. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i4.4799>
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate.

- Food Chemistry*, 121(1), 178–184.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jollès, P., & Caen, J. P. (1991). Parallels between milk clotting and blood clotting: opportunities for milk-derived products. *Trends in Food Science and Technology*, 2(C), 42–43. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(91\)90614-O](https://doi.org/10.1016/0924-2244(91)90614-O)
- Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A., Soria, C., Gillesen, D., Thomaidis, A., ... Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein: Effect of an undecapeptide isolated from k-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158(2), 379–382. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09764.x>
- Jollès, P., Loucheux-Lefebvre, M.-H., & Henschen, A. (1978). Journal of Molecular Evolution: Introduction. *Journal of Molecular Evolution*, 11, 271–277. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9284-8>
- Kamleh, R., Toufeili, I., Ajib, R., Kanso, B., & Haddad, J. (2012). Estimation of the shelf-life of halloumi cheese using survival analysis. *Czech Journal of Food Sciences*, 30(6), 512–519.
- Kanjanakorn, A., & Lee, J. (2017). Examining emotions and comparing the EsSense Profile® and the Coffee Drinking Experience in coffee drinkers in the natural environment. *Food Quality and Preference*, 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.09.014>
- Kenney, E., & Adhikari, K. (2016). Recent developments in identifying and quantifying emotions during food consumption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(11), 3627–3630. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7717>
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>
- Kim, J. (2012). Survival analysis. *Pediatrics in Review*, 33(4), 172–174.
- Kim, J. Y., Prescott, J., & Kim, K. O. (2017). Emotional responses to sweet foods according to sweet liker status. *Food Quality and Preference*, 59, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.013>
- Kim, S. Y., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.006>

- King, S. C., & Meiselman, H. L. (2010). Development of a method to measure consumer emotions associated with foods. *Food Quality and Preference*, 21(2), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.02.005>
- King, S. C., Meiselman, H. L., & Carr, B. T. (2010). Measuring emotions associated with foods in consumer testing. *Food Quality and Preference*, 21(8), 1114–1116. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.08.004>
- Kitsawad, K., & Guinard, J. X. (2014). Combining means-end chain analysis and the Portrait Value Questionnaire to research the influence of personal values on food choice. *Food Quality and Preference*, 35, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.01.003>
- Kłobukowski, J. A., Skibniewska, K. A., & Kowalski, I. M. (2014). Calcium bioavailability from dairy products and its release from food by in vitro digestion. *Journal of Elementology*, 19, 277–288. <https://doi.org/10.5601/jelem.2014.19.1.436>
- Kondyli, E., Pappa, E. C., & Svarnas, C. (2016). Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a white-brined goat milk cheese. *Small Ruminant Research*, 145, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.10.022>
- Kong, Y., Huang, S. L., Shao, Y., Li, S., & Wei, J. F. (2013). Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.048>
- Kontoghiorghe, C. N., Kolnagou, A., & Kontoghiorghe, G. J. (2015). Phytochelators intended for clinical use in iron overload, other diseases of iron imbalance and free radical pathology. *Molecules*, 20(11), 20841–20872. <https://doi.org/10.3390/molecules201119725>
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>
- Kwak, H. S., Ganesan, P., & Hong, Y. H. (2011). Nutritional benefits in cheese. *Cheese: Types, Nutrition and Consumption*, (December 2012), 267–288.
- Ladhari, R., & Tchegnina, N. M. (2015). The influence of personal values on Fair Trade consumption. *Journal of Cleaner Production*, 87(1), 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.10.068>
- Lamichhane, P., Kelly, A. L., & Sheehan, J. J. (2018). Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2692–2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>
- Lamothe, S., Corbeil, M. M., Turgeon, S. L., & Britten, M. (2012). Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food and Function*, 3(7), 724–731. <https://doi.org/10.1039/c2fo10256k>

- Lang, K. W., & Steinberg, M. P. (1980). Calculation of Moisture Content of a Formulated Food System To Any Given Water Activity. *Journal of Food Science*, 45(5), 1228–1230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06527.x>
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748–1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- Lee, D. H. (1990). Symbolic interactionism: some implications for consumer self-concept and product symbolism research. *Advances in Consumer Research*, 17, 386–393.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- Lee, N. K., Jeewanthi, R. K. C., Park, E. H., & Paik, H. D. (2016). Short communication: Physicochemical and antioxidant properties of Cheddar-type cheese fortified with *Inula britannica* extract. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 83–88. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9935>
- Lee, P. Y., Lusk, K., Miroso, M., & Oey, I. (2014). The role of personal values in Chinese consumers' food consumption decisions. A case study of healthy drinks. *Appetite*, 73, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.11.001>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2010). Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65(3), 143–149.
- Levy, S. J. (1959). Symbols for sale. *Harvard Business Review*, 37, 117–124.
- Li, G. H., Le, G. W., Shi, Y. H., & Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24(7), 469–486. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.10.014>
- Liao, L. X., Corsi, A. M., Chrysochou, P., & Lockshin, L. (2015). Emotional responses towards food packaging: A joint application of self-report and physiological measures of emotion. *Food Quality and Preference*, 42, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.01.009>
- Lignitto, L., Segato, S., Balzan, S., Cavatorta, V., Oulahal, N., Sforza, S., ... Novelli, E. (2012). Preliminary investigation on the presence of peptides inhibiting the growth of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in Asiago d'Alvevo cheese. *Dairy Science and Technology*, 92(3), 297–308. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0057-6>
- Lin, K., Zhang, L. wei, Han, X., & Cheng, D. you. (2017). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular

- docking study. *Journal of Functional Foods*, 32, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.008>
- Lindberg, E., Gärling, T., & Montgomery, H. (1989). Belief-value structures as determinants of consumer behaviour: A study of housing preferences and choices. *Journal of Consumer Policy*, 12(2), 119–137. <https://doi.org/10.1007/BF00412067>
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics*, 11(1), 5–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-36>
- Lo Monaco, G., & Bonetto, E. (2019). Social representations and culture in food studies. *Food Research International*, 115, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.029>
- Lopes, F. T., Clícia, C. L., Magalhães, J. J. M., Baracat-pereira, M. C., Hilsdorf, P. R., & Ronaldo, D. A. L. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, 107(August 2017), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.009>
- López-Expósito, I., Amigo, L., & Recio, I. (2012). A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Science & Technology*, 92, 419–438. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0066-5>
- López-Expósito, I., Miralles, B., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Health Effects of Cheese Components with a Focus on Bioactive Peptides. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 239–273). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00011-X>
- López-Expósito, Iván, Gómez-Ruiz, J. Á., Amigo, L., & Recio, I. (2006). Identification of antibacterial peptides from ovine α 2-casein. *International Dairy Journal*, 16(9), 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.006>
- López, N. C., & Novoa, C. F. (2009). Efecto de dos niveles de grasa sobre la vida útil sensorial del queso campesino; Effect of two levels of fat on the sensory life of campesino cheese. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 56(1), 32–40.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 79(March), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Lotman, Y. (2002). El símbolo en el sistema de la cultura. *Entretextos: Revista Electrónica Semestral de Estudios Semióticos de La Cultura*, (2), 4.
- Lund, C. M., Jaeger, S. R., Amos, R. L., Brookfield, P., & Harker, F. R. (2006). Tradeoffs between emotional and sensory perceptions of freshness influence the price consumers will pay for apples: Results from an experimental market.

- Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 172–180.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.011>
- Manzocco, L., Rumignani, A., & Lagazio, C. (2013). Emotional response to fruit salads with different visual quality. *Food Quality and Preference*, 28(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.08.014>
- McCracken, G. (1986). Culture and Consumption: A Theoretical Account of the Structure and Movement of the Cultural Meaning of Consumer Goods. *Journal of Consumer Research*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.1086/209048>
- McSweeney, P. L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal or Dairy Technology*, 57(2/3), 127–140. <https://doi.org/10.4038/agrieast.v10i0.25>
- McSweeney, Paul L.H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80(3), 293–324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1973–1977. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.010>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Julio Girón-Calle, M. A., Millán, F., & Vioque, J. (2007). Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3949–3954. <https://doi.org/10.1021/jf063401s>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Meisel, H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 43(2), 119–128. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)43:2<119::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<119::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y)
- Michaylova, V., & Ilkova, P. (1971). Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Analytica Chimica Acta*, 53, 194–198.
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of «autoxidation» reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 95–108.
- Mobarez, A. M., Doust, R. H., Sattari, M., & Mantheghi, N. (2008). Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Journal of Biological Sciences*, 8(1), 221–224.
- Molenaar, D., Bosscher, J. S., Brink, B. T., Driessen, A. J. M., & Konings, W. N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and

- electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2864–2870. <https://doi.org/10.1128/jb.175.10.2864-2870.1993>
- Mora, M., Urdaneta, E., & Chaya, C. (2018). Emotional response to wine: Sensory properties, age and gender as drivers of consumers' preferences. *Food Quality and Preference*, 66(December 2017), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.015>
- Mulero, C. J., Zafrilla, R. P., Martínez-Cachá, M. A., Leal, H. M., & Abellán, A. J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 23(5), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Murray, B. A., & Fitzgerald, R. J. (2007). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins : Biochemistry , Bioactivity and Production. *Current Pharmaceutical Desing*, 773–791.
- Mushtaq, M., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2019). Himalayan cheese (Kalari/Kradi) fermented with different probiotic strains: In vitro investigation of nutraceutical properties. *Lwt*, 104, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.024>
- Myers, D. (2004). Theories of Emotion. In *Psychology* (Seventh, p. 500). New York, N. T.: Worth Publishers.
- Neme Chaves, S., & Rodríguez González, L. (2013). Consumo simbólico: una perspectiva sociocultural en la comprensión del comportamiento del consumidor. *Revista Iberoamericana de Psicología: Ciencia y Tecnología*, 6(2), 27–34. <https://doi.org/10.33881/2027-1786.rip.%x>
- Novoa, C. F., & Lopéz, N. (2008). Evaluación de la vida útil sensorial del queso doble crema con dos niveles de grasa. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 55(1), 91–99.
- Ong, L., & Shah, N. P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1555–1566. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.026>
- Ong, Lydia, Henriksson, A., & Shah, N. P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149–165. <https://doi.org/10.1051/lait>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2018). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Pakizeh, A., Gebauer, J. E., & Maio, G. R. (2007). Basic human values: Interval structure in memory. *Journal of Experimental Social Psychology*, 43(3), 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jesp.2006.04.007>

- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D., & Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates : assessing the factor «indicator microorganism», *14*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-30>
- Páramo, M. D. (2011). Mundos simbólicos. *Pensamiento & Gestión*, (31), vii–x.
- Parrot, S., Degraeve, P., Curia, C., & Martial-Gros, A. (2003). In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung - Food*, *47*(2), 87–94. <https://doi.org/10.1002/food.200390032>
- Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M. C., Adesso, S., Ostacolo, C., ... Campiglia, P. (2016). Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of «Stracchino» soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, *26*, 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.021>
- Peri, C. (2006). The universe of food quality. *Food Quality and Preference*, *17*(1–2), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.03.002>
- Pihlanto, A. (2006a). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1306–1314. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>
- Pihlanto, A. (2006b). Bioactive peptides: Functionality and production. *Agro Food Industry Hi-Tech*, *17*(6), 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(8), 4712–4718. <https://doi.org/10.1021/jf904456r>
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants / bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, *18*, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, *43*(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Qian, Z.-J., Choi, I.-W., Jung, W.-K., Park, S.-G., Jeong, Y.-J., Jo, H.-Y., & Kim, S.-K. (2011). A Novel Anticoagulant Protein with High Affinity to Blood Coagulation Factor Va from *Tegillarca granosa*. *BMB Reports*, *40*(5), 832–838. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.5.832>
- Rae, P. S., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, *43*(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>

- Rafiq, S., Huma, N., & Pasha, I. (2017). antithrombotic activities of soluble peptide extracts from buffalo and cow milk Cheddar cheeses, 70(3). <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12373>
- Rafiq, S., Huma, N., Rakariyatham, K., Hussain, I., Gulzar, N., & Hayat, I. (2018). Anti-inflammatory and anticancer activities of water-soluble peptide extracts of buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 432–438. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12483>
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3381–3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>
- Ramírez-Navas, J. S., Aguirre-Londoño, J., Aristizabal-Ferreira, V. A., & Castro-Narváez, S. (2016). La sal en el queso: diversas interacciones. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 303. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Ramírez-Rivera, E. de J., Ramón-Canul, L. G., Díaz-Rivera, P., Juárez-Barrientos, J. M., Herman-Lara, E., Prinyawiwatkul, W., & Herrera-Corredor, J. A. (2017). Sensory profiles of artisan goat cheeses as influenced by the cultural context and the type of panel. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 1789–1800. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13452>
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., & Everett, D. W. (2013). Effects of catechin on the phenolic content and antioxidant properties of low-fat cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(12), 2448–2455. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12234>
- Richins, M. L. (1994). Valuing Things: The Public and Private Meanings of Possessions. *Journal of Consumer Research*, 21(3), 504. <https://doi.org/10.1086/209414>
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 295–302. <https://doi.org/10.1021/jf0003911>
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348–2360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1)
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., ... García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.05.002>

- Rosenberg, M. J. (1956). Cognitive structure and attitudinal affect. *Journal of Abnormal and Social Psychology*, 53(3), 367–372. <https://doi.org/10.1037/h0044579>
- Rutherford, K. J., & Gill, H. S. (2000). Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 99–102. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002312>
- Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A., & Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11(4–7), 441–447. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00079-6)
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Abdul Hamid, A., & Ghazali, H. M. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 80–116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003>
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661–3667. <https://doi.org/10.1021/jf021156g>
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668–3674. <https://doi.org/10.1021/jf021191n>
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434–1440. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75013-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2)
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sánchez-González, J. A., & Pérez, J. A. (2016). Sensory shelf life of mantecoso cheese using accelerated testing. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 215–222. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.08>
- Sánchez-Ponte, M. D. (2003). Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. *Revista Científica, FVC-LUZ*, 13(4), 299–306.
- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018a). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>

- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018b). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>
- Sarabandi, K., Mahoonak, S. A., Hamishekar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of Food Engineering*, 237(May), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.036>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Schouteten, J. J., de Steur, H., de Pelsmaeker, S., Lagast, S., de Bourdeaudhuij, I., & Gellynck, X. (2015). Impact of health labels on flavor perception and emotional profiling: A consumer study on cheese. *Nutrients*, 7(12), 10251–10268. <https://doi.org/10.3390/nu7125533>
- Schwartz, S. H. (1992). Universals in the Content and Structure Theoretical Advances and Empirical Test in 20 Countries. *Advances in Experimental Social Psychology*, 25, 1–66. [https://doi.org/10.1016/S0065-2601\(08\)60281-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2601(08)60281-6)
- Schwartz, S. H. (1994). Are There Universal Aspects in the Structure and Contents of Human Values? *Journal of Social Issues*, 50(4), 19–45. <https://doi.org/10.1111/j.1540-4560.1994.tb01196.x>
- Schwartz, S. H. (2012). An overview of the Schwartz theory of basic values. *Online Readings in Psychology and Culture*, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.9707/2307-0919.1116>
- Scott, J. E., & Lamont, L. M. (1973). Relating consumer values to consumer behavior: A model and method for investigation. In *In Greer, T. W. , Increasing Marketing Productivity*. Chicago, IL: American Marketing Association.
- Shahidi, F. (2015). *Antioxidants: Principles and applications. Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00001-4>
- Shahidi, Fereidoon, & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sharma, R., & Mithileshwar, J. (2017). Values influencing sustainable consumption behaviour: Exploring the contextual relationship. *Journal of Business Research*, 76, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2017.03.010>

- Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Wechsler, D., Sieber, R., ... Walther, B. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties To cite this version : HAL Id : hal-00895741 ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. <https://doi.org/10.1051/dst/2009049>
- Silva, D. D. da, Lima, M. dos S. F. de, Silva, M. F. da, Silva, G. R. da, Campos, J. F., Albuquerque, W. W. C., ... Porto, A. L. F. (2019). Bioactive water-soluble peptides from fresh buffalo cheese may be used as product markers. *LWT-Food Science and Technology*, 108(July 2018), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.035>
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., ... Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal «coalho» cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135(3), 1533–1538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058>
- Smacchi, E., & Gobetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(8), 687–694. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00261-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00261-5)
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327–345.
- Spadoti, L. M., & Moreno, I. (2005). Peptídeos bioativos de produtos lácteos. *Funcionais & Nutracêuticos*, 26–38.
- Sun, H., Yao, X., Wang, X., Wu, Y., Liu, Y., Tang, J., & Feng, J. (2015). Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation. *CYTA - Journal of Food*, 13(2), 264–272. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.948072>
- Sun, S., Liu, F., Liu, G., Miao, J., Xiao, H., Xiao, J., ... Cao, Y. (2018). Effects of casein phosphopeptides on calcium absorption and metabolism bioactivity in vitro and in vivo. *Food and Function*, 9(10), 5220–5229. <https://doi.org/10.1039/c8fo00401c>
- Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rojas, A. D., Robles-Sánchez, M., Gutiérrez-Méndez, N., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2015). Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7635–7639. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9388>
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2014). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70093-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70093-x)
- Thomson, D. M. H., Crocker, C., & Marketo, C. G. (2010). Linking sensory characteristics to emotions: An example using dark chocolate. *Food Quality*

- and *Preference*, 21(8), 1117–1125.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.04.011>
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petrón, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 359–365.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.020>
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 129(2), 485–490.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.103>
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 134(3), 1585–1588.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.112>
- Torres-Llanaez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3794–3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
- Tsopmo, A., Romanowski, A., Banda, L., Lavoie, J. C., Jenssen, H., & Friel, J. K. (2011). Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chemistry*, 126(3), 1138–1143.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.146>
- Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Svenning, C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), S91–S98.
<https://doi.org/10.1017/s0007114500002300>
- Venereo, G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Verastegui-Tena, L., van Trijp, H., & Piqueras-Fiszman, B. (2019). Heart rate, skin conductance, and explicit responses to juice samples with varying levels of expectation (dis)confirmation. *Food Quality and Preference*, 71(May 2018), 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.08.011>
- Vermeirssen, V., Camp, J. Van, & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357–366. <https://doi.org/10.1079/bjn20041189>
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, 19(38), 146–164.
<https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=417/41719205006>
- Villegas, A., Santos, M. A., & Hernández, M. A. (2009). Los quesos mexicanos genuinos: Contribución a su rescate a través de la vinculación Universidad-productores. *Claridades Agropecuarias*, (191), 29–35.

- Villegas, D. G. A. (2004). *Tecnología quesera*. México: Trillas.
- Villegas de Gante, A., Cervantes, E. F., Cesín, V. A., Espinoza, O. A., Hernández, M. A., Santos, M. A., & Martínez, C. A. R. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. Texcoco, Estado de México: Colegio de Postgraduados.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. del M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 132–136. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Food Science and Technology. Technology and Culture* (2da.). Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.2307/3101767>
- Wang, C., Li, B., & Ao, J. (2012). Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 134(2), 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.204>
- Wu, H., Liu, Z., Zhao, Y., & Zeng, M. (2012). Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. *Food Research International*, 48(2), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.013>
- Wu, W., Li, B., Hou, H., Zhang, H., & Zhao, X. (2017). Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. *Journal of Functional Foods*, 35, 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.013>
- Wu, W., Yang, Y., Sun, N., Bao, Z., & Lin, S. (2020). Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. *Food Research International*, 131(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108976>
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1509–1518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.063>
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.078>
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120(3), 810–816. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.018>
- Yvon, Mireille and Rijnen, L. (2001). Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185–201. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.005>

- Zhang, B. S., Wang, Z., & Xu, Y. S. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 521–527. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1217-y>
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Qi, X., & Qian, H. (2011). Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal. *European Food Research and Technology*, 232(6), 941–950. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1466-0>
- Zhao, X., Zheng, Z., Zhang, J., Sarwar, A., Aziz, T., & Yang, Z. (2019). Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine. *Food Science and Nutrition*, 7(4), 1540–1550. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1003>
- Zhu, L., Jie, C., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714–2721. <https://doi.org/10.1021/jf703697e>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

3. RUTAS DE INFLUENCIA DE LOS VALORES HUMANOS EN EL CONSUMO DEL QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN

3.1. Resumen

Los consumidores evalúan atributos tangibles e intangibles en la aceptación de productos. Las rutas de influencia (directa e indirecta) de los valores humanos en el consumo permiten identificar el empleo de ambos tipos de atributos o únicamente a los tangibles en la selección de un producto. Los objetivos de esta investigación fueron identificar la estructura de los valores humanos en consumidores nativos, y las rutas de influencia de éstos sobre el consumo del queso añejo de Zacazonapan. Se aplicó una encuesta ($n = 203$) a consumidores, quienes eligieron los 13 valores más importantes y los 13 menos, de una lista de 40. Posteriormente calificaron la importancia de 16 atributos tangibles, y la frecuencia de consumo del queso. Un análisis de escalamiento multidimensional fue empleado para identificar la estructura de los valores humanos en consumidores. Los valores humanos y los atributos tangibles fueron reducidos en número mediante un análisis factorial. Regresiones múltiples proporcionaron tres coeficientes de correlación, con los cuales se calcularon las rutas de influencia de los valores humanos. Los valores motivacionales priorizados fueron Benevolencia, Seguridad, Universalismo, Hedonismo y Conformidad. La influencia de los valores en el consumo fue indirecta y fluyó solamente a través de los atributos tangibles.

Palabras clave: afectivo, intangible, tangible, queso tradicional, simbólico, utilitario.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verenice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes

INFLUENCE OF HUMAN VALUES ON THE CONSUMPTION OF ZACAZONAPAN AÑEJO CHEESE

Abstract

Consumers evaluate tangible and intangible attributes in the acceptance of products. The routes of influence (direct and indirect) of human values in consumption allow identifying the use of only the tangible attributes or both types of attributes in the selection of a product. The objectives of this research were to identify the structure of human values in native consumers, and the routes of influence of these on the consumption of aged Zacazonapan cheese. A survey was applied ($n = 203$) to consumers, who chose the 13 most important values and the 13 least, from a list of 40. Later on, consumers rated the importance of 16 tangible attributes, and the frequency of cheese consumption. Multidimensional scaling analysis was applied to identify the structure of human values in consumers. The human values and the tangible attributes were reduced in number by factor analysis. Multiple regressions provided three correlation coefficients, with which the routes of influence of the human values were calculated. The prioritized motivational values were Benevolence, Security, Universalism, Hedonism and Conformity. The influence of values on consumption was indirect and flowed only through tangible attributes.

Keywords: affective, intangible, tangible, traditional cheese, influence routes, symbolic, utilitarian.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Verenice Torres Salas
Advisor: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

3.2. Introducción

En México se han identificado alrededor de 40 variedades de quesos artesanales, los cuales presentan atributos de tipicidad únicos, resultado de un contexto físico-ambiental, económico, social y cultural particular; son considerados bienes culturales alimentarios que sostienen una cadena agroindustrial local que puede contribuir al desarrollo regional (Villegas *et al.*, 2011). Este es el caso del queso añejo de Zacazonapan producido en el suroeste del Estado de México, elaborado con leche cruda de vacas en libre pastoreo y comercializado como un queso oreado o madurado; la presentación en forma de un bloque prismático rectangular con una cara convexa, cubierto con una pasta de chile guajillo (Hernández-Morales *et al.*, 2010). El consumo de este y otros productos está determinado por factores tales como el sabor, el precio, la disponibilidad y el valor nutritivo, beneficios convencionales de bienes y servicios que realizan funciones utilitarias basadas en características objetivas, aunque se ha reportado la decisión de consumo de un alimento con base a consideraciones morales (Dreezens *et al.*, 2005; Holbrook *et al.*, 1982). Los procesos experienciales en la conducta de compra de los consumidores centrados en la naturaleza simbólica, hedónica y estética son importantes en el consumo, es decir se exploran las características subjetivas o los atributos intangibles del producto; y las decisiones de consumo pueden ser influenciadas por los valores y creencias de las personas, de acuerdo a su cultura (Holbrook *et al.*, 1982; Sharma *et al.*, 2017). Los productos del mercado son una colección de atributos tangibles e intangibles; lo tangible se refiere a elementos del producto verificables objetivamente y lo intangible es aquello que no altera la forma física del producto, pero ayuda a determinar su significado simbólico (Hirshman, 1981). Los consumidores establecen conexiones entre los atributos del producto, sus consecuencias y sus valores personales, esta influencia, de los valores humanos ha sido evaluada en el consumo de carne roja, carne blanca, pescado/marisco, bebidas saludables, productos de conveniencia, productos de comercio justo, conducta de consumo sostenible y adquisición de carros eléctricos (Botonaki *et al.*, 2010; Lee *et al.*,

2014; Kitsawad *et al.*, 2014; Hayley *et al.*, 2015; Ladhari *et al.*, 2015; Barbarossa *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). La influencia de los valores humanos usando como mediadores a los atributos tangibles del producto sobre el consumo de productos puede seguir dos rutas: la indirecta, en la que los consumidores evalúan el significado utilitario de un producto; y los valores humanos pueden influir en la importancia de los atributos tangibles del producto, que a su vez influyen en el consumo del mismo; y la ruta directa, donde los consumidores evalúan el significado simbólico de un producto haciendo un juicio afectivo, intuitivo y holístico; estas influencias han sido evaluadas en los consumos de queso Chapingo, automóviles, viajes y carne (Allen, 2000; Allen, 2008; Hernández, 2019).

Los valores son objetivos deseables, transituacionales, variables en importancia, que sirven de principios rectores en la vida de las personas y que responden a las tres exigencias universales de la existencia humana: necesidades biológicas, requisitos de interacción social coordinada, y exigencias de supervivencia y funcionamiento del grupo (Schwartz, 1994; Schwartz, 2012). Existen diez tipos de valores motivacionales organizados dentro de cuatro dominios de valor de orden superior (Schwartz, 2012). En el desarrollo y comercialización de productos, adicionalmente a los atributos tangibles, la priorización de los valores humanos juega un papel importante en la decisión de consumo (Holbrook *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 2014).

Los propósitos de este trabajo fueron identificar en consumidores de queso añejo de Zacazonapan la estructura de los valores humanos y el tipo de ruta de influencia de los valores humanos sobre el consumo del queso, empleando a los atributos tangibles como mediadores.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Muestra de consumidores

Una muestra de consumidores locales ($n = 203$, 103 mujeres y 100 hombres) de queso añejo de Zacazonapan estuvo conformada por personas mayores de 40 años, debido a que el simbolismo de consumo es más intenso con el incremento de la edad en los consumidores (Belk, Bahn, & Mayer, 1982). Un muestreo de conveniencia se empleó y la muestra se calculó para una población infinita considerando la máxima varianza, una confiabilidad del 95 % y un error del 6.89 % (Martínez *et al.*, 2008).

3.3.2. Diseño y aplicación de la encuesta

Una encuesta descriptiva de respuestas cerradas se diseñó utilizando el programa Microsoft Access 2016 (Microsoft Corporation, EE. UU.) mediante el uso de una computadora portátil, y comprendió tres secciones (Anexos 1 al 4).

En la primera sección se solicitó a los consumidores que eligieran los 13 valores más importantes y los 13 menos importantes de una lista de 40 valores, la cual se presentó en orden alfabético y balanceado (50 % de las encuestas en orden ascendente y el resto en orden descendente), a los encuestados se les proporcionó una hoja impresa con las definiciones de los valores humanos (Cuadro 4) y alguna duda al respecto se consultó con el encuestador. Se asignó un valor de tres a los valores humanos más importantes, uno a los menos importantes y a los valores restantes se les dio un valor de dos (Schwartz, 1994; Allen, 2008).

En la segunda sección, se solicitó a los encuestados que indicaran la importancia que tenían 16 atributos tangibles del queso para determinar su compra, empleando una escala de 10 puntos (1 «no es importante» y 10 «es muy importante»); los atributos tangibles fueron: aroma a leche, aroma a leche ácida, aroma a mantequilla, aroma a queso maduro, desmoronable, firmeza, forma,

disponible, precio accesible, grasa, húmedo, masticable, sabor ácido, sabor amargo, sabor salado y seco.

En la tercera sección de la encuesta, se realizó al encuestado la siguiente pregunta: ¿cuántas veces en los últimos tres días ha consumido cualquier tipo de queso, incluido el queso añejo de Zacazonapan? (Allen, 2000; Allen, 2008).

3.4. Análisis estadístico

3.4.1 Estructura de los valores humanos en consumidores

Los datos de la encuesta de valores humanos se analizaron con el programa XLSTAT (Addinsoft, EE. UU., 2014), a la matriz de proximidad creada a partir de las distancias euclídeas obtenidas de un análisis de disimilaridad se le aplicó el método de escalamiento multidimensional (MDS) no-métrico; el procedimiento de escalamiento por mayorización de una función convexa (SMACOF) fue aplicado. El criterio para decidir el número de dimensiones a ser utilizado fue un estrés de Kruskal menor a 0.2 (Rodríguez *et al.*, 2004). Los puntajes del factor uno, de los valores humanos obtenidos del análisis factorial para cada género siguieron una distribución normal (prueba de Kolmogorov Smirnov), y se les aplicó una prueba de z de una cola para dos muestras (Allen, 1994) para evaluar el efecto del género.

Cuadro 4. Definiciones de los 40 valores humanos y su clasificación respecto a los valores motivacionales y dominios de valor de orden superior.

Dominio de orden superior	Valor motivacional	Definición	Valor humano	Definición
Apertura al cambio	Auto-dirección	Pensamiento independiente y acción -elección, creatividad, investigación-.	Auto-respeto	Autoestima
			Imaginativo Independiente Libertad	Atrevido, creativo Auto confiable, auto suficiente Independencia, selección libre
	Estimulación	Estimulación, novedad y desafío en la vida.	Mente amplia Una vida excitante Valiente	Mente abierta Una vida estimulante, vida activa De pie por tus convicciones
Apertura al cambio /auto-mejora	Hedonismo	Placer y gratificación sensual para uno mismo.	Alegre	Poco serio
			Felicidad Placentero Una vida confortable	Sentirse contento Agradable, vida relajada Una vida próspera
Auto-mejora	Logro	Éxito personal a través de la competencia acorde con los patrones sociales.	Ambicioso	Trabajar duro, aspirar
			Auto-determinación Capaz	Habilidad para determinar su propio destino Competente, efectivo
			Intelectual Lógico	Inteligente, reflexivo Consistente, racional
			Un sentido de logro	Contribución duradera

	Poder	Status social y prestigio, control o poder sobre las personas y los recursos.	Poder social	Posición de autoridad e importancia
			Reconocimiento social	Respeto, admiración
Auto-trascendencia	Benevolencia	Preservación y mejora del bienestar de las personas con las que uno está en contacto con frecuencia.	Amistad verdadera	Compañerismo cercano
			Amor maduro	Intimidad espiritual y sexual
			Cariñoso	Afectivo, tierno
			Honesto	Sincero, creíble
			Indulgencia	Deseo de perdonar a otros
			Útil	Trabajar para el bienestar de otros
			Responsable	Digno de confianza, confiable
	Universalismo	Comprensión, aprecio, tolerancia y protección del bienestar de todo el mundo y de la naturaleza.	Justicia social	Rectitud, no discriminación
			Igualdad	Comunidad, oportunidad igual para todos
			Armonía interior	Libre de conflictos internos
			Sabiduría	Un entendimiento maduro de la vida
			Un mundo de paz	Libre de guerras y conflictos
			Un mundo de belleza	Belleza de la naturaleza y las artes
			Equidad	Cada persona es gratificada de acuerdo a cuanto haya realizado
Conservación	Conformidad	Restricción de acciones, inclinaciones e impulsos que probablemente pudieran	Auto-controlado	Refrenado, auto disciplinado

	contrariar o dañar a otros y violar las expectativas o normas sociales.	Educado	Cortes, buena manera
Tradición	Respeto, compromiso y aceptación de las costumbres e ideas que la cultura tradicional o la religión proveen.	Obediente Salvación	Con obligaciones, respetable Salvado, vida eterna
Seguridad	Seguridad, armonía y estabilidad de la sociedad, de las relaciones y de uno mismo.	Limpio Seguridad familiar Seguridad nacional	Ordenado, pulcro Tomar cuidado de los seres queridos Protección de ataque

Modificado de Schwartz, 1994.

3.4.2. Influencia directa e indirecta de los valores humanos en el consumo del queso añejo de Zacazonapan

Con la finalidad de reducir el número de variables se realizaron dos análisis factoriales empleando el método de análisis de componentes principales un análisis se llevó a cabo para los valores humanos y el otro para los atributos tangibles, considerando las medias de la escala ordinal para ambos casos). El criterio para seleccionar a los factores importantes consistió en que presentaran valores propios ≥ 1 . Así mismo, se comprobó que las calificaciones (scores) de los factores siguieran una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov empleando el paquete estadístico Minitab 17 (Pennsylvania, EE. UU., 2018). Posteriormente, se realizaron tres regresiones múltiples; en la primera regresión las variables independientes fueron los factores importantes de los atributos tangibles (T) y la variable dependiente fue el consumo de queso en los últimos tres días anteriores, a esta regresión se le denominó bloque uno (B1); en la segunda regresión las variables independientes fueron los factores importantes de los valores humanos (V), más los factores que no resultaron importantes para los atributos tangibles (factores residuales, TR), y la variable dependiente fue el consumo de queso, a esta regresión se le llamó bloque dos (B2). Finalmente, en la última regresión las variables independientes fueron solo los factores importantes de los valores humanos y el consumo de queso fue la variable dependiente, a esto se le denominó bloque tres (B3). Las regresiones se realizaron con el método por pasos y para la inclusión o exclusión de las variables independientes se empleó un $\alpha = 0.1$, el programa XLSTAT (Addinsoft, EE. UU., 2014) fue utilizado para ejecutar las regresiones. Los coeficientes de correlación (R), fueron obtenidos para cada una de las regresiones. La influencia directa de los valores humanos sobre el consumo de queso añejo de Zacazonapan utilizando como mediadores a los atributos tangibles; se obtuvo al restar el valor del coeficiente de correlación (R_2) el coeficiente de correlación (R_1), a esto se le denominó cambio en R. Ambos coeficientes fueron transformados a z' de Fisher y se aplicó una prueba de t-student para evaluar la hipótesis nula de igualdad de

los coeficientes de correlación (Chalmer, 1987). La influencia indirecta se obtuvo de la diferencia entre el coeficiente de correlación (R_3) y el cambio en R (Allen, 2000; Allen, 2008; Chalmer, 1987).

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Estructura de los valores humanos en consumidores

En el Cuadro 5 se muestran los promedios para cada uno de los valores humanos, las personas dieron mayor importancia a los valores motivacionales de la Benevolencia (amistad verdadera, honesto y responsable), la Seguridad (seguridad familiar), el Universalismo (mundo en paz), el Hedonismo (alegre y felicidad) y la Conformidad (obediente y educado). Mientras que los valores motivacionales menos importantes fueron el Logro (ambicioso), el Poder (poder social), la Auto-dirección (imaginativo) y la Estimulación (valiente).

Cuadro 5. Promedio y desviaciones estándar para los valores humanos evaluados por los consumidores de queso Añejo de Zacazonapan.

Valor	Promedio	Desviación estándar
Amistad verdadera	2.596	0.492
Seguridad familiar	2.581	0.611
Honesto	2.542	0.705
Responsable	2.507	0.632
Mundo de paz	2.458	0.733
Felicidad	2.384	0.711
Obediente	2.355	0.739
Alegre	2.340	0.763
Educado	2.296	0.752
Limpio	2.241	0.768
Auto-respeto	2.207	0.708
Libertad	2.182	0.732
Cariñoso	2.153	0.839
Sabiduría	2.108	0.763
Útil	2.089	0.857
Justicia social	2.089	0.785
Igualdad	2.059	0.749
Armonía interior	2.015	0.829
Vida confortable	2.000	0.796

Independiente	2.000	0.771
Indulgencia	1.966	0.835
Mente amplia	1.897	0.741
Seguridad nacional	1.882	0.715
Equidad	1.872	0.713
Mundo de belleza	1.852	0.788
Vida excitante	1.847	0.839
Salvación	1.847	0.772
Sentido de logro	1.842	0.721
Capaz	1.818	0.784
Auto-determinación	1.803	0.704
Reconocimiento social	1.798	0.767
Amor maduro	1.798	0.786
Auto-controlado	1.719	0.728
Intelectual	1.714	0.716
Lógico	1.690	0.687
Placentero	1.680	0.765
Valiente	1.640	0.811
Imaginativo	1.562	0.717
Poder social	1.379	0.596
Ambicioso	1.300	0.632

En la Figura 2 se observa la formación de pequeños grupos de valores humanos compatibles, por ejemplo, el primer grupo formado por lógico, reconocimiento social y salvación; el segundo formado por responsable, limpio y obediente, así como un tercer grupo formado por amistad verdadera, educado y felicidad. Dos dimensiones (estrés de Kruskal = 0.192) fueron suficientes para explicar la información de los valores humanos evaluados, en la primera dimensión (línea horizontal) del lado derecho encontramos valores humanos tales como ambicioso, valiente, poder social e imaginativo; estos pertenecen a los valores motivacionales del Logro, la Estimulación, el Poder y la Auto-dirección; en tanto que, del lado izquierdo se ubicaron los valores honesto, seguridad familiar, mundo en paz y alegre, los cuales se relaciona a los valores motivacionales de la Benevolencia, la Seguridad, el Universalismo y el Hedonismo.

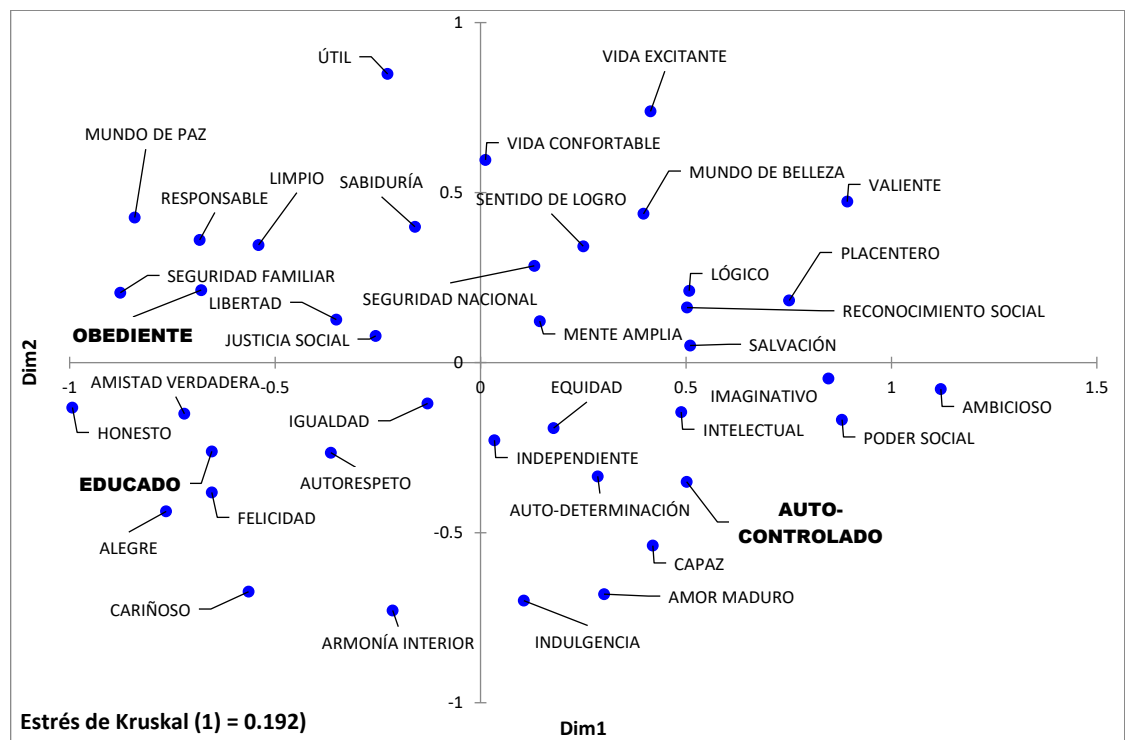


Figura 2. Escalamiento multidimensional de las distancias euclídeas obtenidas de un análisis de disimilaridad de los valores humanos de una muestra de consumidores locales del queso Añejo de Zacazonapan.

En cuanto a la dimensión dos (línea vertical), del lado positivo se observa que los valores humanos fueron: útil, vida excitante, vida confortable y mundo de belleza, enfocados a valores motivacionales de Benevolencia, Estimulación, Hedonismo y Universalismo; mientras que del lado negativo se tuvieron los valores humanos de armonía interior, indulgencia, amor maduro y capaz, los cuales corresponden a valores motivacionales de Universalismo, Benevolencia y Logro. Los puntajes del factor uno de los valores humanos por género presentaron una distribución normal, ($p \geq 0.05$) y la prueba de z no mostró diferencia significativa ($p = 0.388$) entre ellos.

La estructura de los valores humanos de los consumidores del queso añejo de Zacazonapan, fue congruente con la estructura universal de los valores humanos propuesta por Schwartz (1994) obtenida a partir de encuestas aplicadas en diferentes países, incluido México. Los valores motivacionales de Benevolencia

y Seguridad identificados en la muestra de consumidores de queso añejo de Zacazonapan fueron los más importantes y esto coincide con los valores importantes identificados en ciudadanos Wellingtonianos (Nueva Zelanda) y también con los menos importantes, tales como el Poder y el Logro (Allen, 1994; Schwartz, 1992; Schwartz, 1994). Lo anterior implica que los consumidores de Zacazonapan le dan importancia a las relaciones sociales (amistad verdadera, seguridad familiar, honesto) y a la protección de quienes les rodean (mundo en paz y seguridad familiar); sin embargo, mantienen poco interés por el poder y el prestigio social (Allen, 1994; Schwartz, 2012). En el primero de los tres grupos de valores humanos formados en el MDS destaca la relación entre los valores lógico, reconocimiento social y salvación, esto implica que entre mayor sea la cercanía en estos valores, mayor será la relación entre ellos, dentro de cada grupo. Por ejemplo, las personas que le dieron mayor importancia al valor lógico creerán que el reconocimiento social y la salvación también son igualmente importantes (Allen, 1994). Por otro lado, la dimensión uno del MDS mostró que los valores motivacionales de Poder, Logro, Hedonismo, Estimulo y Auto-dirección fueron adyacentes entre sí, y de acuerdo al modelo circular de las relaciones entre los tipos de valores motivacionales, estos se ubican en los dominios de valor de orden superior de Auto-mejora y Apertura al cambio (Barbarossa *et al.*, 2017; Bottonaki & Mattas, 2010; Brunsø, Scholderer, & Grunert, 2004; Hayley *et al.*, 2015; Pakizeh, Gebauer, & Maio, 2007; Sagiv & Schwartz, 2000; Schwartz, 1992, 1994, 2012) Del lado opuesto se encuentran los dominios de valor de orden superior de Auto-trascendencia y Conservación conformados por los valores motivacionales de la Benevolencia, el Universalismo y la Conformidad (Barbarossa *et al.*, 2017; Bottonaki & Mattas, 2010; Brunsø *et al.*, 2004; Hayley *et al.*, 2015; Pakizeh *et al.*, 2007; Sagiv & Schwartz, 2000; Schwartz, 1992, 1994, 2012). Por otro lado, los promedios de las calificaciones del factor uno, para cada género no mostró diferencia significativa, indicando que los géneros no presentaron patrones psicossociales diferentes, lo cual ha sido reportado por otros autores (Allen, 1994; Hernández, 2018).

3.5.2. Influencia directa e indirecta de los valores humanos en el consumo del queso añejo de Zacazonapan

El análisis factorial de los valores humanos proporcionó 15 factores importantes (valores propios ≥ 1), los cuales explicaron el 62.6 % de la varianza total. En el caso del análisis factorial para los atributos tangibles se obtuvo una reducción de los 16 atributos tangibles iniciales a solamente cuatro factores importantes (valores propios ≥ 1), los cuales explicaron el 52.8 % de la variación total de los datos.

El Cuadro 6 muestra que en la regresión múltiple B1 resultaron tres factores significativos (T1, T2 y T4) y en el Cuadro 7 se muestran las correlaciones de los atributos tangibles con cada uno de los factores significativos, el factor T1 se correlacionó positivamente con los atributos de aroma a queso maduro, firmeza, grasa, aroma a leche ácida y húmedo; en tanto que el factor T2 tuvo correlaciones positivas con los atributos de forma y aroma a leche, y correlaciones negativas con sabor amargo, sabor ácido y sabor salado. Finalmente, el factor T4 mantuvo una correlación positiva con un precio accesible y una correlación negativa con desmoronable.

Cuadro 6. Resultados de regresión múltiple de los factores de los atributos tangibles.

Parámetros del modelo				
Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t
Intercepto	2.409	0.167	14.409	< 0.0001
T1	0.243	0.097	2.514	0.013
T2	0.236	0.103	2.284	0.023
T3	0.000	0.000		
T4	0.375	0.148	2.540	0.012
Ecuación del modelo	Consumo=2.40887-0.24341-T1+0.23565-T2+0.37548-T4			

Cuadro 7. Correlaciones entre los atributos tangibles y los factores de los atributos tangibles significativos en la regresión múltiple del bloque uno.

Atributo	T1	T2	T4
Aroma a leche	0.408	0.480	-0.119
Aroma a leche ácida	0.515	0.015	-0.209
Aroma a mantequilla	0.236	0.401	0.211
Aroma a queso maduro	0.562	0.253	0.011
Desmoronable	0.315	0.088	-0.547
Disponible	0.410	0.315	-0.240
Firmeza	0.544	0.331	-0.234
Forma	0.034	0.550	0.413
Grasa	0.538	0.225	0.339
Húmedo	0.492	0.041	-0.124
Masticable	0.454	-0.085	-0.211
Precio accesible	0.292	0.350	0.448
Sabor ácido	0.449	-0.685	0.036
Sabor amargo	0.477	-0.738	0.116
Sabor salado	0.457	-0.669	0.228
Seco	0.391	-0.093	0.391

En el Cuadro 8 se muestran los resultados de la regresión del B₂, solo un factor residual de los atributos tangibles (TR12) y cuatro factores de los valores humanos fueron significativos (V2, V3, V5 y V10). En el Cuadro 9 se presentan las correlaciones de las variables con cada uno de los factores significativos, TR12 mantuvo una correlación positiva con la forma y el aroma a leche ácida, mientras que se correlacionó negativamente con aroma a mantequilla y precio accesible. Respecto a los factores de los valores humanos tenemos que factor V2 se correlacionó positivamente con valores motivacionales de Seguridad (seguridad familiar) y Conformidad (auto-controlado) y negativamente con Universalismo (igualdad) y Auto-dirección (independiente). El factor V3 se correlacionó positivamente con valores motivacionales de Universalismo (mundo en paz), Seguridad (seguridad familiar) y Hedonismo (alegre), y negativamente con Hedonismo (placentero). El factor V5 se correlacionó de manera positiva con los valores motivaciones de Logro (ambicioso y sentido de logro) y Auto-dirección (imaginativo), mientras que negativamente con Conformidad (educado). Respecto al factor V10, este presentó correlación positiva con los valores

motivacionales de la Benevolencia (responsable), Conformidad (educado) y Auto-dirección (imaginativo) y una correlación negativa con Auto-dirección (libertad). En el Cuadro 10 se muestran los resultados para la regresión múltiple del B3 donde los factores significativos de los valores humanos fueron V2, V3, V5 y V10, cuyas correlaciones fueron explicadas previamente.

Cuadro 8. Resultados de regresión múltiple de los factores de solo los valores humanos y los residuales de los atributos tangibles contra el consumo del queso.

Parámetros del modelo				
Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t
Intercepto	2.409	0.165	14.589	< 0.0001
TR5	0	0		
TR6	0	0		
TR7	0	0		
TR8	0	0		
TR9	0	0		
TR10	0	0		
TR11	0	0		
TR12	0.485	0.229	2.123	0.035
TR13	0	0		
TR14	0	0		
TR15	0	0		
TR16	0	0		
V1	0	0		
V2	-0.278	0.105	-2.649	0.009
V3	0.228	0.115	1.987	0.048
V4	0	0		
V5	0.305	0.127	2.395	0.018
V6	0	0		
V7	0	0		
V8	0	0		
V9	0	0		
V10	-0.242	0.146	-1.664	0.098
V11	0	0		
V12	0	0		
V13	0	0		
V14	0	0		
V15	0	0		
Ecuación del modelo	Consumo = 2.40887+0.48520-TR12-0.27770-V2+0.22799-V3+0.30469-V5-0.24210-V10			

Cuadro 9. Cargas de los atributos tangibles en el factor residual 12 y cargas de los valores humanos en los factores 2, 3, 5 y 10.

Factores residuales de atributos tangibles		Factores de los valores humanos				
Atributo tangible	TR12	Valor humano	V2	V3	V5	V10
Aroma a leche	-0.175	Alegre	0.261	0.351	0.302	0
Aroma a leche ácida	0.323	Ambicioso	-0.198	-0.034	0.453	0.129
Aroma a mantequilla	-0.238	Amistad verdadera	0.323	0.053	0.165	0.062
Aroma a queso maduro	0.090	Amor maduro	0.216	-0.072	-0.115	-0.166
Desmoronable	-0.022	Armonía interior	-0.081	0.099	-0.093	-0.219
Disponible	-0.035	Auto-controlado	0.412	-0.346	-0.099	0.008
Firmeza	-0.102	Auto-determinación	-0.054	-0.138	0.133	-0.084
Forma	0.443	Auto-respeto	0.003	-0.056	0.007	-0.098
Grasa	-0.135	Capaz	-0.050	-0.183	-0.140	0.230
Húmedo	0.054	Cariñoso	0.152	0.292	-0.108	0.034
Masticable	0.172	Educado	0.082	0.208	-0.392	0.302
Precio accesible	-0.202	Equidad	-0.342	-0.074	-0.123	0.204
Sabor ácido	-0.077	Felicidad	-0.013	0.096	0.018	0.080
Sabor amargo	-0.078	Honesto	-0.048	0.324	-0.022	0.098
Sabor salado	0.045	Igualdad	-0.556	0.256	-0.040	-0.111
Seco	0.128	Imaginativo	-0.222	-0.295	0.350	0.274
		Independiente	-0.528	-0.256	-0.06	0.177
		Indulgencia	0.214	-0.372	-0.261	-0.081
		Intelectual	0.179	0.156	0.109	0.186
		Justicia social	-0.322	0.045	-0.336	0.011
		Libertad	-0.247	0.010	0.067	-0.506
		Limpio	0.027	-0.041	0.341	0.165
		Lógico	-0.118	-0.123	-0.305	0.208
		Mente amplia	-0.245	0.051	0.232	-0.183
		Mundo de belleza	0.296	-0.105	-0.219	0.114
		Mundo de paz	0.396	0.392	0.031	-0.141
		Obediente	0.408	-0.328	0.242	-0.023
		Placentero	0.138	-0.471	-0.078	-0.048
		Poder social	-0.274	-0.279	0.079	-0.257
		Reconocimiento social	-0.078	-0.324	0.095	-0.143
		Responsable	-0.032	0.201	0.023	0.387
		Sabiduría	-0.141	0.06	-0.165	-0.222
		Salvación	0.279	-0.305	0.068	-0.102
		Seguridad familiar	0.419	0.357	-0.055	-0.110
		Seguridad nacional	0.114	0.107	-0.362	-0.252

Sentido de logro	0.119	0.08	0.385	-0.042
Útil	-0.210	0.179	-0.081	-0.087
Valiente	-0.280	0.313	0.157	-0.094
Vida confortable	0.009	0.110	0.158	0.129
Vida excitante	0.019	0.039	-0.152	0.169

Cuadro 10. Resultados de la regresión múltiple de los factores de solo los valores humanos y el consumo del queso (bloque tres).

Parámetros del modelo				
Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t
Intercepto	2.409	0.167	14.461	< 0.0001
V1	0	0		
V2	-0.282	0.106	-2.665	0.008
V3	0.231	0.116	1.997	0.047
V4	0	0		
V5	0.31	0.128	2.413	0.017
V6	0	0		
V7	0	0		
V8	0	0		
V9	0	0		
V10	-0.278	0.146	-1.91	0.058
V11	0	0		
V12	0	0		
V13	0	0		
V14	0	0		
V15	0	0		
Ecuación del modelo	Consumo= 2.40887-0.28186-V2+0.23117-V3+0.30958-V5-0.27849-V10			

El coeficiente de correlación R_1 fue de 0.288 y en la regresión del bloque dos (B_2) se obtuvo un R_2 de 0.338 (Cuadro 11). A partir de estos coeficientes de correlación se calculó la influencia directa de los valores humanos sustrayendo R_1 de R_2 , por lo que el cambio en R fue de 0.05. La prueba de t para las z' (transformaciones de Fisher de los valores de los coeficientes de correlación para cada bloque) no fue significativa ($p= 0.29$), por lo que la influencia de los valores humanos en el consumo de queso no fluyó más allá de los atributos tangibles.

Cuadro 11. Resultados de las regresiones múltiples de la importancia de los atributos tangibles (bloque uno) en el consumo de Queso añejo de Zacazonapan; y los valores humanos más los residuales de los atributos tangibles (bloque dos) en el consumo del mismo queso.

Bloque 1 Importancia atributos tangibles			Bloque 2 Valores humanos + Residuales de factores de atributos tangibles			
Factores introducidos ^z	Coeficientes (β)	R múltiple	Factores introducidos	Coeficientes (β)	R múltiple	Cambio en R (Influencia directa) ^y
T1 (Aroma a queso maduro, firmeza, grasa, aroma a leche ácida y húmedo)	0.243	0.288 F=5.996 g.l.=3,199 p=0.0006	TR12 (Forma, aroma a leche, aroma a leche ácida, aroma a mantequilla y precio accesible)	0.485	0.338 F=5.087 g.l.=5,194 p=0.0002	0.05 z = 0.554 p = 0.29
T2 (Forma, sabor salado, sabor ácido, sabor amargo y aroma a leche)	0.236		V2 (Universalismo, Auto-dirección, Seguridad y Conformidad)	-0.278		
T4 (Desmoronable y precio accesible)	0.375		V3 (Hedonismo, Universalismo, Benevolencia y Seguridad)	0.228		
			V5 (Logro, Conformidad, Seguridad y Auto-dirección)	0.305		
			V10 (Auto-dirección, Benevolencia, Conformidad y Poder)	-0.242		

^zFactores significativos a un nivel < 0.1.

^yCambio en R se obtuvo al restar al R de B2 el R de B1 (0.338-0.288 = 0.05).

El Cuadro 12 muestra que el coeficiente de correlación de solo los valores humanos y el consumo fue de 0.307. La influencia indirecta de los valores humanos sobre el consumo del queso se calculó restando el cambio en R (influencia directa) del R^2 , resultando un valor de 0.257, el cual fue mayor que la influencia directa, por lo que los valores humanos fluyeron en el consumo de queso añejo de Zacazonapan a través de los atributos tangibles.

Cuadro 12. Resultados de la regresión múltiple de únicamente los valores humanos y el consumo de Queso añejo de Zacazonapan.

Valores humanos			
Factores introducidos ^z	Coeficientes (β)	R Múltiple	Influencia indirecta ^y
V2 (Universalismo, Auto-dirección, Seguridad y Conformidad)	-0.282	0.307 F=5.141 g.l.=4,198 p=0.0006	0.257
V3 (Hedonismo, Universalismo, Benevolencia y Seguridad)	0.231		
V5 (Logro, Conformidad, Seguridad y Auto-dirección)	0.310		
V10 (Auto-dirección, Benevolencia, Conformidad y Poder)	-0.278		

^zFactores significativos a un nivel < 0.1 .

^yInfluencia indirecta se obtuvo del coeficiente de regresión de los valores humanos menos el cambio en R ($0.307 - 0.05 = 0.257$).

De acuerdo al análisis, la ruta de influencia de los valores humanos en el consumo de queso añejo de Zacazonapan resultó ser indirecta, lo cual implica que los consumidores asocian principalmente un significado utilitario al queso, en lugar de un significado simbólico o afectivo; es decir, el producto cumple una función psicológica instrumental en lugar de una función expresiva (Allen, 2001;

Allen & Ng, 1999). Lo anterior implica que los consumidores priorizan cada uno de los atributos tangibles del queso, tales como aroma a queso maduro, firmeza y grasa para decidir consumir o no el producto (Allen, 2000). Este resultado concuerda con lo encontrado para el consumo de queso Chapingo y el queso Bola de Ocosingo para los cuales la influencia directa fue de 0.008 y 0.051, mientras que la indirecta de 0.212 y 0.191, respectivamente (Hernández-Montes, 2019; Illescas-Marin *et al.*, 2019).

Los resultados contrastan con los obtenidos para el consumo del queso Crema de Chiapas (Illescas-Marin *et al.*, 2019) y el consumo de carne roja (Allen, 2008), donde se obtuvieron valores para el cambio en R (influencia directa) de 0.104 y 0.16, respectivamente, y de 0.10 para la influencia indirecta, en ambos casos. Esto implicó que los consumidores asociaban un significado simbólico y afectivo al producto (Allen, 2000b, 2008; Illescas-Marin *et al.*, 2019). Hayley *et al.* (2015) reportaron la influencia de los valores humanos sobre el consumo de carne, demostrando que quienes dieron mayor importancia al valor motivacional de Universalismo presentaron actitudes más positivas hacia la reducción y consumo menos frecuente de carnes rojas, carnes blancas y pescados/mariscos, mientras que quienes dieron mayor importancia al valor motivacional de Poder priorizaron actitudes positivas al consumo más frecuente de estas carnes, pero mostraron actitudes menos positivas hacia la reducción de las mismas; quienes dieron mayor importancia al valor de Seguridad presentaron actitudes menos positivas hacia la reducción de consumo de carne roja y una actitud positiva al consumo más frecuente de carnes blancas y pescados/mariscos. Las personas que dieron mayor importancia al valor de Conformidad tendieron a consumir con mayor frecuencia pescados/mariscos (Hayley *et al.*, 2015). Por otro lado, en la compra de automóviles compactos familiares se reportó una influencia directa de cero y una indirecta de 0.16, por lo que la imagen y estética del automóvil fueron menos importantes, siendo la funcionalidad del auto lo que buscaban los consumidores (Allen, 2000).

3.6. Conclusiones

La muestra de consumidores del municipio de Zacazonapan se caracterizó por presentar como valores motivacionales importantes a los de Benevolencia, Seguridad, Universalismo, Hedonismo y Conformidad. Los valores humanos se ajustaron al modelo circular de las relaciones entre los tipos de valores motivacionales propuesto por Schwartz dado que los valores motivacionales adyacentes se ubicaron adecuadamente así como sus valores opuestos, a excepción del Hedonismo.

La influencia de los valores humanos sobre el consumo del queso añejo de Zacazonapan fluyó a través de los atributos tangibles, es decir, las personas le dieron al queso un significado utilitario y no uno simbólico o afectivo. Dado que para los consumidores los valores de Benevolencia, Seguridad, Universalismo, Hedonismo y Conformidad fueron importantes, esto implica que los productores y comercializadores del queso deberían enfatizar este tipo de valores motivacionales en su conducta y en la publicidad de su producto, para que exista una alineación de valores entre las expectativas del consumidor y lo expresado por el quesero. A partir de estos hallazgos y dado que el consumo es a nivel regional, se sugiere colocar información en la etiqueta del producto, y planear estrategias mercadotécnicas dirigidas a grupos de consumidores diferenciados socio-demográficamente para promover al queso resaltando sus atributos tangibles.

3.7. Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca 283773 y a las autoridades y pobladores del Municipio de Zacazonapan por su contribución al desarrollo del trabajo de campo.

3.8. Literatura citada

- Allen, M. W. (1994). Personal Values of Wellingtonians: A Multi-dimensional scaling analysis. *New Zealand Journal of Psychology*, 23, 71–76.
- Allen, M. W. (2000). The Attribute-mediation and Product Meaning Approaches to the influences of human values on consumer choices. *Advances in Psychology Research*, 1(January), 1–39. https://doi.org/http://works.bepress.com/michael_allen1/4/
- Allen, M. W. (2001). A practical method for uncovering the direct and indirect relationships between human values and consumer purchase. *Journal of Consumer Marketing*, 18(2), 102–120. <https://doi.org/10.1108/07363760110385983>
- Allen, Michael. 2008. The direct and indirect of the human values on consumer choices [doctoral thesis]. Wellington, New Zealand. Victoria University.
- Allen, M. W., & Ng, S. H. (1999). The direct and indirect influences of human values on product ownership. *Journal of Economic Psychology*, 20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4870\(98\)00041-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4870(98)00041-5)
- Barbarossa, C., De Pelsmacker, P., & Moons, I. (2017). Personal Values, Green Self-identity and Electric Car Adoption. *Ecological Economics*, 140, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.05.015>
- Botonaki, A., & Mattas, K. (2010). Revealing the values behind convenience food consumption. *Appetite*, 55(3), 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.09.017>
- Brunso, K., Scholderer, J., & Grunert, K. G. (2004). Testing relationships between values and food-related lifestyle: Results from two European countries. *Appetite*, 43(2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2004.05.001>
- Chalmer, B. J. (1986). *Understanding statistics* (1st ed.). USA: Marcel Dekker Inc.
- Dreezens, E., Martijn, C., Tenbült, P., Kok, G., & De Vries, N. K. (2005). Food and the relation between values and attitude characteristics. *Appetite*, 45(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.03.005>
- Hayley, A., Zinkiewicz, L., & Hardiman, K. (2015). Values, attitudes, and frequency of meat consumption. Predicting meat-reduced diet in Australians. *Appetite*, 84, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.10.002>
- Hernández Montes, Arturo. (2018) Propuesta para identificar simbolismo y valores en consumidores de quesos tradicionales mexicanos: caso Queso Chapingo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. Vol.15; Núm. 3: 399-412.
- Hernández-Montes, A. (2019). Influencia de valores humanos en la aceptación del queso chapingo y sus significados intangibles de compra influence of human values on the acceptance of chapingo cheese and its intangible

- meanings of purchase. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 16(4), 497–511. <https://doi.org/https://doi.org/10.22231/asyd.v16i4.1283>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., & Villegas De Gante, A. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hirschman, E. C. (1981). Comprehending Symbolic Consumption: Comprehending three theoretical issues. In *In Symbolic Consumer Behavior* (pp. 4–6). Hirschman and Morris B. Holbrook, New York, NY : Association for Consumer Research.
- Holbrook, M. B., & Hirschman, E. C. (1982). The Experiential Aspects of Consumption: Consumer Fantasies, Feelings, and Fun. *Journal of Consumer Research*, 9(2), 132. <https://doi.org/10.1086/208906>
- Illescas-Marin, C., Hernández-Montes, A., Estrada-Estrada, E., Murguía-Cozar, R., Espejel-García, A., & Santos-Moreno, A. (2019). Influencia de los valores humanos en el consumo de quesos tradicionales chiapanecos: una comparación de las rutas directa e indirecta. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(4), 966–985. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i4.4799>
- Kitsawad, K., & Guinard, J. X. (2014). Combining means-end chain analysis and the Portrait Value Questionnaire to research the influence of personal values on food choice. *Food Quality and Preference*, 35, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.01.003>
- Ladhari, R., & Tchetgna, N. M. (2015). The influence of personal values on Fair Trade consumption. *Journal of Cleaner Production*, 87(1), 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.10.068>
- Lee, P. Y., Lusk, K., Miroso, M., & Oey, I. (2014). The role of personal values in Chinese consumers' food consumption decisions. A case study of healthy drinks. *Appetite*, 73, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.11.001>
- Martínez, J. A., & Martínez, C. L. (2008). Determinación de la máxima varianza para el cálculo del factor de imprecisión sobre la escala de medida, y extensión a diferentes tipos de muestreo. *Psicothema*, 20(2), 311–316.
- Montes, A. H. (2018). Propuesta para identificar simbolismo y valores en consumidores de quesos tradicionales mexicanos: caso queso chapingo, 399–412.
- Pakizeh, A., Gebauer, J. E., & Maio, G. R. (2007). Basic human values: Inter-value structure in memory. *Journal of Experimental Social Psychology*, 43(3), 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jesp.2006.04.007>
- Rodríguez, S. C., Gutiérrez, P. J., & Fernández, C. A. (2004). Posibilidades del escalamiento multidimensional en la modelización de desajustes asociados

- a la reforma de planes de estudio universitarios. *Revista de Investigación Educativa*, 22(2), 377–391.
- Sagiv, L., & Schwartz, S. H. (2000). Value priorities and subjective well-being: Direct relations and congruity effects. *European Journal of Social Psychology*, 30(2), 177–198. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0992\(200003/04\)30:2<177::AID-EJSP982>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0992(200003/04)30:2<177::AID-EJSP982>3.0.CO;2-Z)
- Schwartz, S. H. (1992). Universals in the Content and Structure Theoretical Advances and Empirical Test in 20 Countries. *Advances in Experimental Social Psychology*, 25, 1–66. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2601\(08\)60281-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2601(08)60281-6)
- Schwartz, S. H. (1994). Are There Universal Aspects in the Structure and Contents of Human Values? *Journal of Social Issues*, 50(4), 19–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1540-4560.1994.tb01196.x>
- Schwartz, S. H. (2012). An overview of the Schwartz theory of basic values. *Online Readings in Psychology and Culture*, 2(1), 1–20. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.9707/2307-0919.1116>
- Sharma, R., & Mithileshwar, J. (2017). Values influencing sustainable consumption behaviour: Exploring the contextual relationship. *Journal of Business Research*, 76, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2017.03.010>
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, 19(38), 146–164. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=417/41719205006>

4. SIGNIFICADOS PARA QUESOS TRADICIONALES MEXICANOS: QUESO DE ZACAZONAPAN

4.1. Resumen

Los quesos como alimentos tradicionales están asociados a un lugar de origen y deberían poseer un significado de identidad para los consumidores. Sin embargo, este tipo de significado no ha sido reportado para el queso de Zacazonapan. A 200 consumidores de cada queso se les aplicó una encuesta de elección libre donde se les presentó una imagen del queso y se pidió escribieran tres palabras que asociarían a la imagen, las respuestas se agruparon por afinidad y a sus frecuencias se les aplicó una prueba de k proporciones y el procedimiento de Marascuilo. Las mayores comunidades de significado se obtuvieron para las categorías de hedonismo (17.5 %), platillos y maridaje (14.7 %) y atributos de apariencia (12.7 %). Mientras que, la comunalidad del significado de identidad para el queso de Zacazonapan fue de 5.1 %, con ello se conoció el porcentaje con el que consumidores locales se identifican con el queso.

Palabras clave: identidad; intangible; significado, Zacazonapan.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verénice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

MEANINGS FOR MEXICAN TRADITIONAL CHEESES: ZACAZONAPAN CHEESE

Abstract

Cheeses as traditional foods are associated with a place of origin and should have a meaning of identity for consumers. However, this meaning has not been reported for Zacazonapan cheese. A free choice survey was applied to 200 consumers of each cheese, on which they were presented with an image of the cheese and were asked to write three words that would be associated with the image, answers were grouped by affinity, and a k proportions test and Marascuilo procedure were applied to their frequencies. The highest communalities of meaning were obtained for the categories of hedonism (17.5 %), saucers and pairing (14.7 %) and appearance attributes (12.7 %). While the communality of meaning of identity for Zacazonapan cheese was 5.1 %, with this percentage with which local consumers identifying with cheese was known.

Keywords: identity, intangible, meaning, Zacazonapan.

4.2. Introducción

La alimentación es el primer aprendizaje social del hombre y cada alimento se encuentra inmerso en su tiempo y cultura (Arias, 2014). Un alimento tradicional es un producto frecuentemente consumido o asociado a una temporada específica, elaborado acorde a la herencia gastronómica, conocido debido a sus propiedades sensoriales y asociado a cierta área local, región o país (Guerrero *et al.*, 2009). En México, dentro de este tipo de alimentos destacan los quesos tradicionales genuinos, los cuales valorizan los recursos territoriales locales (ganado, forrajes, agua, suelo, clima, el saber hacer, etc.) y mantienen un patrimonio cultural y gastronómico que contribuye a la identidad nacional (Villegas *et al.*, 2014). Sin embargo, por la presión que ejercen productos sustitutos, los quesos tradicionales se encuentran propensos al reemplazo, aunado al poco conocimiento de éstos, lo que implica poca valorización por parte de la población (Villegas & Cervantes, 2011). Dentro de estos quesos tradicionales mexicanos se encuentran el queso de Zacazonapan del Estado de México, el Quesillo de Reyes Etlá en Oaxaca, y el queso de Poro de Balancán y Tenosique de Pino Suárez en Tabasco; elaborados con leche cruda de vaca (Hernández, Hernández, Aguirre & Villegas, 2010; González *et al.*, 2016).

En la valorización de los productos alimenticios, el significado juega un papel importante debido al poder de comunicación inherente del bien poseído, en el cual los consumidores son participantes activos al seleccionar y evaluar productos por sus significados dentro de sistemas culturales (Richins, 1994), en donde los seres humanos como entes sociales interpretan su entorno, proporcionándole significados derivados del mismo, permitiendo la selección de productos, de acuerdo a lo que representa para ellos y para otros en sus grupos de referencia, en lugar de considerar primero las funcionalidades del producto y su desempeño (Bakar, Lee & Rungie, 2013). Thomson, Crocker & Marketo (2010) señalan que los consumidores al procesar información sensorial obtienen conceptualizaciones funcionales, emocionales y abstractas; además, buscan

construir símbolos, mostrando actitudes más favorables hacia productos cuando éstos simbolizan los valores que ellos endorsan (Firat & Venkatesh, 1995; Allen, 2002). Considerando a los alimentos como una colección de atributos tangibles (elementos verificables objetivamente) e intangibles (no alteran forma física del producto), estos últimos son los que ayudan a determinar su significado simbólico (Hirschman, 1986), ya que no solo en los elementos tangibles del producto se encuentran los significados culturales, sino que se construyen socialmente e imponen por interacción social (Almeida, Paiva, Costa & Ferreira, 2016). Los productos símbolo son vistos como poseedores de significado más allá de su presencia tangible, es decir los consumidores les incorporan atributos que se extienden más allá de su naturaleza física inmediata (Hirschman, 1981). En este sentido, se supera la visión funcional del producto como el eje central del consumo, para aceptar al significado social como el mayor impulsor de las decisiones tomadas por los consumidores (Páramo, 2011). Por ello, el campo del consumo simbólico es un área innovadora, compleja e intrigante para la investigación del comportamiento del consumidor (Hirschman, 1981). Además de que, el significado simbólico asociado con el producto puede afectar en gran medida su adopción y uso; este significado simbólico puede, en algunas clases de productos, superar o dominar su desempeño técnico como determinante del consumo, esto es especialmente probable si el producto se utiliza con frecuencia para definir la posición social y/o identidad propia (Hirschman, 1981).

Los significados subjetivos asignados a un objeto por observadores externos (no los dueños) se llaman significados públicos, y los significados privados son la suma de los significados subjetivos que el objeto mantiene para un individuo en particular (Richins, 1994). Para que un producto funcione como símbolo debe ostentar comunalidad de significado entre los consumidores, y esto revela que un grupo de referencia posee en común una conceptualización compartida del significado del producto y es expresada en porcentaje (Hirschman, 1981). Lee (1990) propone al acto del consumo como una conducta simbólica para el consumidor, dado que ésta posee mayor importancia que los beneficios

funcionales del producto; y establece que los productos y servicios poseen una imagen determinada no solamente por sus atributos funcionales, sino también por una gran cantidad de factores intangibles, tales como reconocimiento de marca, precio, publicidad, país de origen, tiendas, empaque, etc.

El queso es un producto cultural rico en significados, dado que representa la subjetividad de un grupo de agentes activos en la producción (Almeida *et al.*, 2016). En la actualidad, el problema entre los quesos tradicionales es que existe muy poca información sobre las comunalidades de significados para ellos, y en especial para el significado de identidad relacionado a su origen. Por ello, el propósito de esta investigación fue identificar comunalidades de categorías de significados en consumidores locales del queso añejo de Zacazonapan, especialmente el significado de identidad de origen, adicional a la determinación de las comunalidades de los significados psicológicos utilitarios y simbólicos otorgados al queso, con el fin de utilizarlo como información que contribuya a la obtención de figuras de protección y a enfoques mercadotécnicos para cada queso.

4.3. Metodología

4.3.1. Sitio de encuesta

Se realizaron encuestas en Zacazonapan, Estado de México, México dentro de las coordenadas geográficas 19° 04' 22" latitud norte y 100° 15' 18" longitud oeste, 1350 m de altitud.

4.3.2. Encuesta

Una encuesta de elección libre se aplicó a una muestra de consumidores locales ($n = 200$), usando el programa Microsoft Access 2016 (Microsoft Corporation, EE. UU.). Los encuestados fueron personas ciudadinas consumidoras del queso evaluado, con una edad de al menos 40 años, con una representación del 50 % para cada sexo. Los muestreos fueron de conveniencia para una población

infinita y los tamaños de muestra se calcularon empleando la máxima varianza, con una confiabilidad del 95 % y un margen de error del siete por ciento (Martínez & Martínez, 2008). A cada uno de los consumidores se le mostró una imagen digital del queso estudiado y se les pidió que escribieran tres palabras (ideas o conceptos) que les vinieran en mente, asociadas con el estímulo presentado (Lo Monaco & Bonetto, 2019). Posteriormente, las respuestas fueron agrupadas consensuadamente por cinco personas con experiencia en agrupación mediante diagramas de afinidad. A cada categoría formada con al menos dos ideas se le otorgó un título (Elliot, 1994).

4.3.3. Análisis estadístico

Las frecuencias de las palabras asociadas a cada categoría de significados se colocaron en una tabla, enseguida se aplicó la prueba de k proporciones, mediante el estadístico de prueba de χ^2 ($p \leq 0.05$) y el procedimiento de Marascuilo para agrupar/diferenciar a las proporciones de las categorías de los significados. Los resultados se graficaron empleando el procedimiento de la rueda sensorial, que para efecto de esta investigación se denominó rueda de significados. Los datos fueron analizados empleando el programa XLSTAT versión 2017 (Addinsoft, EE.UU.).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Queso de Zacazonapan

Las diferentes ideas o palabras empleadas, por los consumidores locales, para las diferentes categorías de significados otorgados al queso de Zacazonapan se muestran en el Cuadro 13. Las 16 categorías consensuadas para este queso fueron: emociones, tradición, identidad, proceso, añoranza familiar y social, apetencia, hedonismo, platillos y maridaje, atributos de apariencia, productos lácteos, atributos de sabor, economía, atributos de textura, inocuidad, salud y características negativas. Las primeras siete categorías quedaron agrupadas dentro del significado psicológico simbólico y las otras nueve categorías restantes

en el significado psicológico utilitario. Los porcentajes de las frecuencias de palabras para cada categoría y los porcentajes de las comunalidades de significados psicológicos de la muestra global de consumidores del queso de Zacazonapan se muestran en la Figura 3.

Cuadro 13. Categorías de ideas o palabras expresadas por los consumidores del queso de Zacazonapan, Estado de México.

Categoría	Idea o palabra
Añoranza familiar y social	Abuelita, casa, familia, compadre, etc.
Apetencia	Antojo, hambre, guisar, gusto, etc.
Atributos de apariencia	Adobera, amarillo, apariencia, etc.
Atributos de sabor	Amargo, añejo, grasa, etc.
Atributos de textura	Cremoso, desmoronable, textura, etc.
Características negativas	Daño, desagradable, polilla, etc.
Economía	Comprar, adquirirlo, precio, etc.
Emociones	Amistad, confianza, curioso, etc.
Hedonismo	Agradable, sabroso, apetitoso, etc.
Identidad	Propio, pueblo, Zacazonapan, etc.
Inocuidad	Higiene, limpio, inocuo, etc.
Productos lácteos	Crema, leche, mantequilla, requesón, etc.
Platillos y maridaje	Botana, comida, tequila, etc.
Proceso	Artesanal, elaboración, ingredientes, etc.
Salud	Natural, nutritivo, salud, etc.
Tradición	Criollo, feria, fiesta, etc.

El estadístico de prueba de $\chi^2 = 368.85$ para el análisis de k proporciones para las diversas categorías de significados del queso Zacazonapan resultó significativo ($p < 0.0001$), tanto para el global de consumidores (Figura 3), como dentro de cada grupo de consumidores por sexo (Cuadro 14). Las categorías de significados que presentaron las mayores comunalidades fueron las relacionadas con el hedonismo (17.5 %), los platillos y maridaje (14.7 %) y los atributos de apariencia (12.7 %), los cuales resultaron sin diferencia significativa. La comunalidad para el significado de identidad fue de 5.1 %, el cual resultó sin diferencia significativa a la categoría de proceso (5.4 %), entre otras. Dentro de los significados psicológicos, el estadístico de $\chi^2 = 1.7$ no resultó significativo ($p = 0.216$), por lo que no se rechazó la hipótesis nula de igualdad de proporciones

entre las comunales de los significados utilitarios (51.9 %) y los simbólicos (48.1 %). Las comunales de las diversas categorías de significados por sexo (Cuadro 14) resultaron diferentes entre sí ($p < 0.05$), aunque agrupadas similarmente a las comunales globales (ambos sexos). Sin embargo, dado que el tamaño de las muestras por sexo representó el 50 % del total, para el caso de las mujeres, los grupos de categorías con la mayor comunalidad fueron siete e incluyeron hedonismo, añoranza familiar y social, apetencia, productos lácteos, atributos de apariencia, platillos y maridaje, e identidad. Para el caso de los hombres el grupo de categorías de significados conformado con la mayor comunalidad fueron once, los cuales incluyeron hedonismo, apetencia, añoranza familiar y social, tradición e identidad, entre otros.

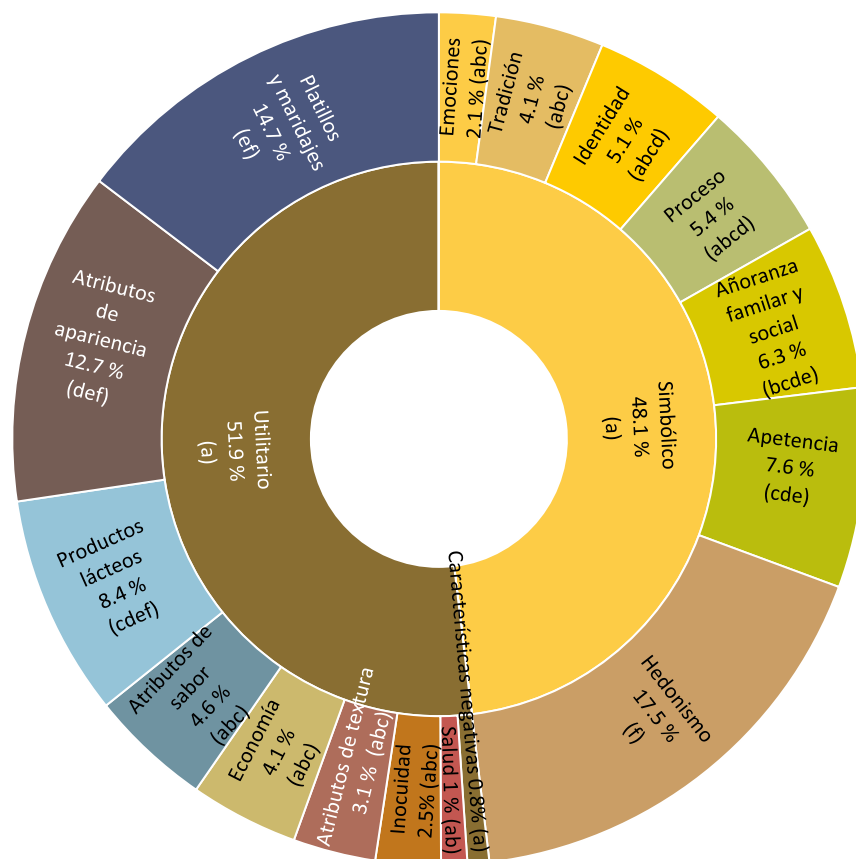


Figura 3. Comparaciones de los porcentajes de las comunales de las categorías de significados otorgados al queso de Zacazonapan y sus aportaciones a los significados psicológicos.

Cuadro 14. Comunalidades de categorías de significados por sexo, para el queso de Zacazonapan, Estado de México.

Categorías	Mujer %	Hombre %
Características negativas	1.0a ^z	0.7a
Salud	1.0a	1.0a
Emociones	1.3ab	3.0ab
Productos lácteos	10.4bcde	6.4abc
Atributos de apariencia	12.0cde	13.4bc
Platillos y maridaje	15.3de	14.0bc
Hedonismo	17.9e	17.1c
Inocuidad	2.6abc	2.3a
Economía	3.2abc	5.0abc
Tradición	3.2abc	5.0abc
Atributos de textura	4.2abcd	2.0a
Atributos de sabor	4.5abcd	4.7abc
Proceso	4.9abcd	6.0abc
Identidad	5.5abcde	4.7abc
Añoranza familiar y social	6.5abcde	6.0abc
Apetencia	6.5abcde	8.7abc

^zMedias seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en columna indican diferencia estadística entre sexo (DMS, $p \leq 0.05$).

En el queso tradicional evaluado se observó que, dentro del significado psicológico utilitario, las comunalidades de las categorías de significados relacionados con platillos/maridaje y los atributos de apariencia fueron los predominantes. En este queso de Zacazonapan, los consumidores interpretaron al queso y le otorgaron tanto un significado utilitario como simbólico (Richins, 1994). La muestra de consumidores se centró en el uso del producto, lo cual está intrínsecamente vinculado a la conveniencia, la eficiencia y el intercambio en el sentido económico; el significado utilitario está ubicado en atributos objetivos y tangibles que las personas perciben del queso a través de sus sentidos (Allen, 2000). Los consumidores no percibieron su calidad desde la base afectiva y psicológica, la cual considera las sensaciones, los sentimientos y las emociones experimentadas en respuesta al alimento (Peri, 2006); sino lo percibieron desde la base cognitiva, la cual contiene los atributos tangibles positivos y negativos,

además de consecuencias de naturaleza más funcional (Cervellon & Dubé, 2005).

Dentro de los significados simbólicos del queso de Zacazonapan, la comunalidad de la categoría de hedonismo resultó con el mayor porcentaje, lo cual mostró la influencia de los atributos tangibles del queso sobre la interpretación otorgada por los consumidores. Además, presentó una categoría de características negativas (daño, desagradable, polilla, etc.); Letarte, Dubé & Troche (1997) señalan que actitudes negativas hacia el consumo de los alimentos pueden resultar de experiencias sensoriales negativas, tales como el miedo al daño corporal y de simbolismos negativos asociados al pensamiento de la comida o su origen. La comunalidad de significado de identidad para el queso añejo de Zacazonapan (5.1 %) fue mayor a lo reportado para la comunalidad de identidad del queso de Chapingo que fue del 2.3 % (Hernández, 2018), y menor al reportado para el queso Bola de Ocosingo con 7.17 % y el queso Crema de Chiapas con 14.18 %, expresándose así el porcentaje de personas que comparten el concepto de identidad para cada uno de los quesos (Hernández-Montes, Illescas-Marin & Espejel-García, 2019). Debido a la menor comunalidad de significado de identidad que el queso de Zacazonapan obtuvo con el lugar de origen, es un tipo de queso con el cual los consumidores mexicanos no presentan un mayor involucramiento, de acuerdo a lo conceptualizado por Juhl & Poulsen (2000) y una asociación a su lugar de origen. Y mantiene relación con el hecho de que los consumidores no son solo beneficiarios de los productos, sino también actúan como productores y difusores del simbolismo de los mismos (Hirshman, 1986).

Las comunalidades de significados que los consumidores le dieron al queso estuvieron definidas como un conjunto estructurado de ideas, opiniones, conocimientos y creencias compartidos por el grupo de consumidores del queso y podrían ser consideradas como predictores de conducta de consumo del queso (Lo Monaco & Bonetto, 2019). De acuerdo con Richins (1994) el significado que

los consumidores le otorgan a los productos, en este caso a los quesos tradicionales mexicanos serviría para entender, en alguna medida, el por qué los consumidores prefieren y adquieren frecuentemente algunos quesos en específico. El hecho de que el significado simbólico de identidad fuera mayor posibilitaría la postulación del queso, por parte de las autoridades de desarrollo social correspondientes, para promover alguna indicación de origen de los mismos.

Aquellos consumidores que presenten una actitud positiva al consumo de los quesos como productos naturales (Pieniak, Verbeke, Vanhonacker, Guerrero & Hersleth, 2009), a la comunicación de autenticidad del producto por el lugar de origen (Kuznesof, Tregear & Moxey, 1997) y a la disposición a pagar más por ellos, contribuirían al mejoramiento económico (Balogh, Békesi, Gorton, Popp & Lengyel, 2016; Dogan & Gokovali, 2012) de las regiones de producción. Por lo que, en este tipo de alimentos lo tradicional es una manifestación de autenticidad y fortalece el sentido del lugar de origen, lo cual se relaciona de manera importante con la patrimonialización del producto, como una figura de rescate de productos auténticos con fuertes identidades (Gade, 2004), estableciéndose así una posición de diferenciación simbólica entre los productores artesanales y los productores de la industria (Almeida *et al.*, 2016).

4.5. Conclusiones

En consumidores de queso añejo de Zacazonapan se identificaron 16 categorías de significados, no se percibieron predominantemente atributos intangibles, incluyendo aspectos afectivos y emotivos, además de apreciar los aspectos tangibles intrínsecos de los quesos. Además, no presentó diferencia significativa respecto a los porcentajes para los significados psicológicos de utilitario y de simbolismo, y su comunalidad de significado de identidad fue de mínima, esto se asoció a que los consumidores no valoran en este caso a este queso tradicional, por lo que se deberá trabajar en la comunicación del significado de identidad entre sus consumidores. Este estudio permitió ampliar la información referente a

las comunalidades de significados en este queso tradicional mexicano expresados por los consumidores y evidenciando su significado de identidad para este queso. Lo anterior puede contribuir a la patrimonialización de este producto y obtención de una figura de protección tal como una marca colectiva o una denominación de origen, lo que permitiría establecer una diferenciación simbólica entre un producto artesanal y uno industrial.

4.6. Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca 283773. Se agradece a las autoridades y pobladores de los municipios de Zacazonapan, Estado de México por su contribución al desarrollo del trabajo de campo.

4.7. Literatura citada

- Allen, M. W. (2000). The attribute-mediation and product meaning approaches to the influences of human values on consumer choices. *Advances in Psychology Research*, 1(January), 1–39. http://works.bepress.com/michael_allen1/4/
- Allen, M. W. (2002). Human values and product symbolism: Do consumers form product preference by comparing the human values symbolized by a product to the human values that they endorse? *Journal of Applied Social Psychology*, 32(12), 2475-2501. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1559-1816.2002.tb02752.x>
- Almeida, S. de L., Paiva, J. F. G., Costa, C., & Ferreira, G. J. R. (2016). Geographical indication re-signifying artisanal production of curd cheese in Northeastern Brazil. *Revista de Administração Contemporânea*, 20(6), 715–732. <https://doi.org/10.1590/1982-7849rac2016150315>
- Arias, G. J. (2014). Un vertiginoso viaje etnohistórico dentro de los ‘imaginarios alimentarios’ en el simbolismo del Cacao en México. *Anales de Antropología*, 48(1), 79–95. [https://doi.org/10.1016/s0185-1225\(14\)70490-4](https://doi.org/10.1016/s0185-1225(14)70490-4).
- Bakar, A., Lee R., & Rungie C. (2013). The effects of religious symbols in product packaging on Muslim. *Australian Marketing Journal*, 21, 198-204. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ausmj.2013.07.002>

- Balogh, P., Békesi D., Gorton M., Popp J., & Lengyel P. (2016). Consumer willingness to pay for traditional food products. *Food Policy*, 61, 176-184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2016.03.005>
- Belk, R. W., Bahn, K. D., & Mayer, R. N. 1982. Developmental Recognition of Consumption Symbolism. *Journal of Consumer Research*, 9(1), 4-17. <https://doi.org/10.1086/208892>
- Cervellon, M. C., & Dubé L. (2005). Cultural influences in the origins of food likings and dislikes. *Food Quality and Preference*, 16, 455-460. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.09.002>
- Dogan, B., & Gokovali U. (2012). Geographical indications: the aspects of rural development and marketing through the traditional products. *Procedia – Social and Behavioral Sciences*, 62, 761-765. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2012.09.128>
- Elliot, R. (1994). Exploring the symbolic meaning of brands. *British Journal of Management*, 5(1), S13-S19. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-8551.1994.tb00126.x>
- Firat, F., & Venkatesh A. (1995). Liberatory postmodernism and the reenchantment of consumption. *Journal of Consumer Research*, 22(3), 239-267. doi: <http://dx.doi.org/10.1086/209448>
- Gade, D. W. (2004). Tradition, territory, and terrior in French viniculture: Cassis, France , & appellation contrôlée. *Annals of the Association of American Geographers*, 94 (4), 848–67. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-8306.2004.00438.x>
- González, C. A. F., Yescas C., Ortiz E. A. M., De la Rosa A. M. A, Hernández M. A., & Vallejo C. B. (2016). Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250-3262. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>
- Guerrero, L., Guardia M. M. D., Xicola J., Verbeke W., Vanhonacker F., Zakowska-Biemans S., Sajdakowskac M., Sulmont-Rosséd C., Issanchoud S., Conte M., Scalvedie M. L., Granlif B. S., & Herslethf M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52(2), 345-354. doi: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.11.008>
- Hernández, M. A. (2018). Propuesta para identificar simbolismo y valores en consumidores de quesos tradicionales mexicanos: caso Queso Chapingo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(3), 399-412. Recuperado el 7 de octubre del 2019. <https://www.colpos.mx/asyd/volumen15/numero3/asd-16-081.pdf>
- Hernández-Montes, A., Illescas-Marin, C., & Espejel-García, A. (2019). Estructura de los valores humanos en consumidores y sus significados para quesos tradicionales chiapanecos. *Estudios Sociales Revista de Alimentación*

- Contemporánea y Desarrollo Regional*, 29(54), 1-23. doi: <https://dx.doi.org/10.24836/es.v29i54.793>
- Hernández, M. C., Hernández M. A., Aguirre M. E., & Villegas G. A. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552-560. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hirschman, E. (1981). Comprehending Symbolic Consumption: Three Theoretical Issues, in E. Hirschman and M. Holbrook (eds), *Symbolic Consumer Behavior*, pp. 4-6, Association for Consumer Research, New York. Recuperado el 10 de octubre del 2019. <http://acrwebsite.org/volumes/12219/volumes/sv04/SV-04>
- Hirschman, E. (1986). The creation of product symbolism. En R. J. Lutz, U.T. Provo (Ed.) *Advances in Consumer Research*, 13, 327-331.1 Duluth, MN. USA. Association for Consumer Research. Recuperado el 1 de junio del 2019. <http://acrwebsite.org/volumes/6513/volumes/v13/NA-13>
- Juhl, H. J., & Poulsen, C. S. (2000). Antecedents and effects of consumer involvement in fish as a product group. *Appetite*, 34(3), 261-267. doi: <https://doi.org/10.1006/appe.2000.0318>
- Kuznesof, S., Tregear A., & Moxey A. (1997). Regional foods: a consumer perspective. *British Food Journal*, 99(6), 199-216. <https://doi.org/10.1108/00070709710181531>
- Lee, D. H. (1990) Symbolic interactionism: some implications for consumer Self-Concept and product Symbolism research. *Advances in Consumer Research*, 17, 386-393. Recuperado el 14 de octubre del 2019. de <http://acrwebsite.org/volumes/7037/volumes/v17/NA-17>
- Letarte, A., Dubé L., & Troche V. (1997) Similarities and differences in affective and cognitive origins of food likings and dislikes, *Appetite*, (28), 115-129. doi: <https://doi.org/10.1006/appe.1996.0069>
- Lo Monaco, G., & Bonetto E. (2019). Social representations and culture in foods studies. *Food Research International*, 115, 474-479. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.029>
- Martínez, J. A., & Martínez C. L. (2008). Determinación de la máxima varianza para el cálculo del factor de imprecisión sobre la escala de medida, y extensión a diferentes tipos de muestreo. *Psicothema*, 20 (2), 311-16.
- Páramo, M. D. (2011). Mundos simbólicos. *Pensamiento & Gestión*, 31: vii-x.
- Peri, C. (2006). The universe of food quality. *Food Quality and Preference*, 17(1-2), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.03.002>
- Pieniak, Z., Verbeke W., Vanhonacker F., Guerreiro L., & Hersleth M. (2009). Association between traditional food consumption and motives for food

- choice in six European countries. *Appetite*, 53(1), 101-108. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2009.05.019>
- Richins M. L. (1994). Valuing things: The public and private meanings of possessions. *Journal of consumer Research*, (3), 504-521. doi: <http://dx.doi.org/10.1086/209414>
- Thomson, D. M. H., Crocker C. & Marketo C. G. (2010). Linking sensory characteristics to emotions: An example using dark chocolate. *Food Quality and Preference*, 21(8), 1117-1125. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.04.011>
- Villegas, G. A., & Cervantes E. F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, 19 (38), 146–64. <https://doi.org/www.redalyc.org/articulo.oa?id=417/41719205006>.
- Villegas, G. A., Cervantes E. F., Cesín V. A., Espinoza O. A., Hernández M. A., Santos M. A., & Martínez C. A. R. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. México, Biblioteca Básica de Agricultura, Editorial Colegio de Posgraduados.

5. ACEPTABILIDAD DEL QUESO DE ZACAZONAPAN A TRAVÉS DE EMOCIONES Y DEL ESTADO DE MADUREZ

5.1. Resumen

Las emociones y su medición en consumidores son relevantes en la evaluación sensorial porque permiten diferenciar productos y predecir la elección del consumidor. El objetivo de esta investigación fue evaluar la contribución de la medición de emociones percibidas por consumidores de queso de Zacazonapan, México, para diferenciar quesos con diferentes características físicas, químicas y sensoriales pero con la misma aceptabilidad, y estimar el tiempo máximo de maduración para su aceptación. Las hipótesis a probar fueron a) el queso de Zacazonapan con diferencias en variables físicas, químicas y sensoriales, a pesar de tener la misma aceptabilidad se pueden diferenciar a través de las emociones de los consumidores, y b) la probabilidad de consumo del queso disminuye al aumentar el estado de madurez. Para las variables físicas y químicas se aplicó un diseño completamente al azar; para aceptabilidad e intensidad de emociones un diseño de bloques completos al azar; y un análisis de supervivencia para la aceptación del queso con diferente estado de madurez. A quesos de cinco queserías (A, B, C, D y E) se les determinó pH, composición química parcial, magnitud de diferencia (d') entre dos pares de quesos, perfil descriptivo, aceptabilidad, e intensidad de emociones; únicamente al queso C se le determinó vida útil sensorial. Existió diferencia significativa en las variables físicas y químicas, excepto en pH. Los quesos con la mayor aceptabilidad sensorial fueron A, B, C y E. El queso A se relacionó con el atributo astringencia, B y C con sequedad, arenosidad, dureza y friabilidad mientras que D y E con granulosis, sal y masticabilidad. Los quesos A y C con la misma aceptabilidad se diferenciaron a través de las emociones: activo, amable, amigable, seguro y tranquilo. Quesos con un tiempo de maduración mayor a 78 d presentaron una probabilidad de aceptación menor al 50 %.

Palabras clave: Aceptabilidad, emociones, perfil Flash, queso artesanal, Zacazonapan.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verénice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

ACCEPTABILITY OF ZACAZONAPAN CHEESE THROUGH EMOTIONS AND STATE OF RIPENING

Abstract

Emotions and their measurement in consumers have acquired relevance in the sensory field since they allow differentiating products, predicting consumer choice and serving as an instrument of marketing. The objective of this research was to evaluate the contribution of the measurement of emotions perceived by consumers of Zacazonapan aged cheese, to differentiate cheeses with different physicochemical and sensory characteristics but with the same acceptability. A cheese from five local cheese factories encoded as A, B, C, D and E; they were made a physicochemical analysis, descriptive profile, global acceptability, intensity of emotions and magnitude of difference (d') between two pairs of cheeses. Cheese C was determined sensory shelf life. There was a significant difference in physicochemical variables, with the exception of pH. Sensory, cheeses B and C were associated with the attributes of dryness, gritty, hardness and friability. Cheeses D and E were related to the attributes of granularity and salt, while cheese A was associated with attributes of astringency and chewiness. The cheeses with the highest acceptability were A, B, C and E. The emotions that allowed us to differentiate cheeses with the same acceptability were active, friendly, friendly, safe and calm; and cheeses B, C, D and E had the highest intensities. Cheeses B, C and E had the highest acceptability and intensity of emotions. 50 % of consumers accepted the cheese with up to 78 days of maturation. Depending on the parameters determined, there were differences between each of the cheeses evaluated, and emotions contributed to differentiate cheeses with the same acceptability.

Keywords: Acceptability, emotions, Flash profile, artisanal cheese, Zacazonapan.

5.2. Introducción

Las emociones en las personas son reacciones fisiológicas y mentales breves e intensas centradas en un referente (King & Meiselman, 2010). La medición de las emociones en consumidores ha adquirido relevancia para la industria alimentaria, debido a que permiten diferenciar productos, predecir la elección del consumidor y ser un instrumento de la mercadotecnia (Kenney & Adhikari, 2016).

Los métodos utilizados para medir las emociones incluyen los fisiológicos (Verastegui-Tena, Van Trip, Piqueras-Fiszman, 2019), los auto-reportes verbales (King & Meiselman, 2010) y los auto-reportes visuales (Liao, Corsi, Chrysochou, & Lockshin, 2015). El EsSense Profile© es un auto-reporte verbal conformado por una lista de 39 emociones, cuyas intensidades se miden en una escala Likert de cinco puntos; además mide la aceptabilidad global para contrastar con las respuestas emocionales (King & Meiselman, 2010). Las emociones evocadas por los consumidores se han reportado en jugo de mango, bebida de naranja, galletas de chocolate y galletas de avena con diferente grado de dulzor (Kim, Prescott, & Kim, 2017), y en vino (Mora, Urdaneta, & Chaya, 2018). Schouteten *et al.* (2015) investigaron la influencia de la información contenida en las etiquetas de queso Gouda sobre las emociones provocadas en consumidores, y encontraron que la mayoría de los consumidores asociaron la emoción «alegre» con el queso cuya etiqueta no incluía los términos «reducido en sal o light».

Además de la medición de las emociones y la composición de un alimento, es importante evaluar su vida útil sensorial, la cual se determina por la interacción entre el alimento y el consumidor (Hough, 2010). La vida útil sensorial se enfoca en la probabilidad de aceptación o rechazo del producto por parte de los consumidores después de un cierto tiempo, y se evalúa con un análisis de supervivencia (Hough, 2010) con distribuciones de tipo lineal logarítmica, normal logarítmica y de Weibull (Garitta *et al.*, 2018). Este análisis se ha reportado en queso Halloumi (Kamleh, Toufeili, Ajib, Kanso, & Haddad, 2012) y queso mantecoso (Sánchez-González & Pérez, 2016), entre otros.

En México se han identificado alrededor de 31 variedades de quesos artesanales, los cuales presentan tipicidad, contribuyen a la autosuficiencia agroalimentaria local, mantienen la integridad de las cadenas agroindustriales leche-queso, valorizan los recursos territoriales locales y representan un patrimonio cultural y gastronómico (Villegas *et al.*, 2014). Este es el caso del queso añejo de Zacazonapan, el cual se estima que tiene más de 100 años de existencia, y se elabora en el suroeste del estado de México con leche cruda de vacas en libre pastoreo, se presenta en forma de un prisma rectangular, con una cara convexa cubierta con pasta de chile guajillo (Hernández-Morales, Hernández-Montes, Aguirre-Mandujano, & Villegas, 2010; Villegas *et al.*, 2014). El objetivo de este estudio fue determinar la contribución de la medición de emociones, percibidas por consumidores de queso añejo de Zacazonapan, para distinguir quesos con diferentes características físicas, químicas y sensoriales, pero con la misma aceptabilidad; así como estimar el tiempo máximo de maduración del queso, en el que la probabilidad de aceptación de consumo sea igual al 50 %.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Obtención de muestras

Piezas de queso de un kilogramo se adquirieron en cinco queserías de Zacazonapan, México (codificados como A, B, C, D y E). En cada quesería, cada pieza (unidad experimental) se obtuvo de un lote de leche cuajada en la misma tina y se dejaron orear durante 20 días a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) previo a su análisis. Las unidades experimentales utilizadas en las tres repeticiones se elaboraron en días consecutivos. Después, las piezas se trasladaron al Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

Para la evaluación de la vida útil sensorial se trabajó con quesos de la quesería C, debido a la estandarización de su proceso de elaboración; de esta quesería se obtuvieron unidades experimentales que se almacenaron a 15 °C y humedad

relativa de 85 %, para obtener muestras a los 0, 30, 95, 180 y 730 d de maduración; una pieza de queso se utilizó para cada tiempo de maduración. En el análisis de las variables físicas y químicas se utilizaron tres piezas de queso con maduraciones de 0, 30, 95 y 180 d.

5.3.2. Determinación de pH y composición química parcial

El pH de las muestras se determinó con un potenciómetro Conductronic PH120 (Conductronic, Puebla, México) de acuerdo con el método descrito por Villegas (2012) y la actividad de agua (a_w) con un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices Inc., Washington, EE. UU.) utilizando el método que señala Öztürk, & Akin (2018). Las concentraciones de proteína, grasa, humedad, sal, minerales y sólidos totales se determinaron mediante un analizador de infrarrojo cercano FoodScan™ Lab (FOSS Analytical AB, Hillerød, Dinamarca). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado para los cinco quesos a los 20 días de maduración («oreado») y para los quesos en los cuatro tiempos de maduración (0, 30, 95, 180 d) de la quesería C; en el caso del queso con 730 d de maduración se realizó una sola medición.

5.3.3. Magnitud de diferencia (d')

Pruebas triangulares se realizaron con 21 panelistas consumidores de queso del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la UACH, quienes efectuaron cinco mediciones repetidas (Bi, 2006). Los pares de muestras evaluadas fueron los quesos A - B y C - D; el primer par de quesos fue supuesto a ser sensorialmente similar y el segundo par diferente. En las pruebas triangulares, los seis juegos de permutaciones de las triadas de las muestras (AAB, ABA, BAA, BBA, BAB y ABB) se presentaron de forma aleatoria y balanceada a los panelistas. Cada juego de cinco mediciones repetidas se evaluó en sesiones de 30 min, y cada uno de los dos juegos de pares de quesos se evaluó en diferentes d. Cada muestra de queso (prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm) se presentó en vasos codificados de plástico, del número cero, con números aleatorios de tres dígitos y se

proporcionaron vasos con agua a los panelistas para enjuagar su boca entre muestras (Bi, 2006).

5.3.4. Evaluación de la aceptabilidad global

Esta prueba se realizó con el método descrito por Hernández-Morales *et al.* (2010), en la localidad de Zacazonapan, estado de México. Se reclutaron 100 consumidores locales del queso (50 mujeres y 50 hombres), con una frecuencia de consumo mínima de una vez por semana. A cada consumidor se le presentaron las cinco muestras de queso (prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm) en orden balanceado, en un contenedor de poliestireno expandido (21.2 x 9.1 cm). Las muestras se codificaron con números aleatorios de tres dígitos y se evaluaron por cada consumidor con el uso de un formato con escalas hedónicas de 9 puntos (1 = Me disgusta extremadamente, 9 = Me gusta extremadamente), y por duplicado en d diferentes. Los panelistas tuvieron disponibles agua y galletas Habaneras Clásicas (Gamesa®) para eliminar el sabor residual de la muestra anterior.

5.3.5. Perfil Flash de quesos

El método utilizado fue el descrito por Domingues, Parra, Giacometti, & Lúcia (2019) con modificaciones. Doce estudiantes se reclutaron del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la UACH. En la primera sesión que duró 30 min, a cada panelista se le presentaron simultáneamente cinco muestras de quesos (queserías A, B, C, D y E) en vasos de polietileno del número cero (capacidad de 30 mL), y se les pidió crear una lista de atributos que permitieran diferenciarlas. Después, la lista se socializó y se seleccionaron 16 atributos (aroma a vaca o ácido propiónico, aroma a leche ácida o fermentación láctica, olor a pies, granulosis, dureza, friabilidad, arenosidad, masticabilidad, sabor ácido, sabor amargo, sabor lácteo, sequedad, sal, astringencia, residuos en boca y garganta, así como resabio picante). En la segunda sesión con una duración de 90 min, a cada panelista se le presentaron simultáneamente las cinco muestras (dos

prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm de cada queso) en vasos de polietileno del número cero (capacidad de 30 mL), y se les pidió jerarquizarlas para cada uno de los atributos, mediante un formato con escalas ordinales del 1 al 5, y asignaron un cinco a la muestra con la mayor intensidad del atributo correspondiente. La jerarquización se realizó por triplicado.

5.3.6. Frecuencia e intensidad de emociones en consumidores de queso añejo de Zacazonapan

Después de realizar la prueba de aceptabilidad se evaluaron las emociones en los consumidores con el método descrito por King & Meiselman (2010). Los consumidores locales (50 mujeres y 50 hombres, con una frecuencia de consumo del queso de una vez por semana) eligieron de las 39 emociones que reporta la metodología EsSense Profile® todas aquellas que describieran cómo se sintieron después de consumir el queso añejo de Zacazonapan. A cada consumidor se le presentaron las cinco muestras de queso (prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm) de forma balanceada en un contenedor de unicel (21.2 x 9.1 cm), codificadas con números aleatorios de tres dígitos y evaluadas en el orden presentado. La lista de emociones utilizada en la evaluación se presentó en forma balanceada (50 % en el orden A - Z y el resto de Z - A) para reducir el sesgo por orden de presentación. Todas aquellas emociones con una frecuencia ≥ 30 se utilizaron para medir su intensidad por duplicado, mediante un formato con una escala de cinco puntos: 1 = nada, 2 = poco, 3 = moderado, 4 = mucho y 5 = extremadamente (King & Meiselman, 2010).

5.3.7. Vida útil sensorial

La prueba se realizó con el método descrito por Hough (2010) y se aplicó a 101 consumidores de queso, miembros del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la UACH. Cada consumidor evaluó monádica y aleatoriamente cinco muestras del queso C con diferente tiempo de maduración (0, 30, 95, 180 y 730 d). Las muestras fueron prismas rectangulares de 1 x 1 x 1.5 cm colocadas

cada una en vasos de plástico del número cero codificados con números aleatorios de tres dígitos. Los consumidores degustaron la muestra y contestaron a la pregunta: ¿Usted normalmente consumiría este producto? y las opciones de respuestas fueron Si o No. Entre muestras tuvieron disponibilidad de agua y galletas Habaneras clásicas (Gamesa®) para realizar enjuagues.

5.4. Análisis estadístico

5.4.1. Variables físicas y químicas

Las variables físicas y químicas de los quesos producidos en diferentes queserías (A, B, C, D y E) y del queso C con diferentes tiempos de maduración (0, 30, 95 y 180 d) se evaluaron mediante un diseño completamente al azar. Un análisis de varianza (ANDEVA) se realizó y al existir evidencia para rechazar la hipótesis nula ($\alpha = 0.05$), se llevó a cabo una comparación de medias con la prueba de Tukey. Se utilizó el programa SAS versión 9.4 (SAS, 2019).

5.4.2. Análisis de datos sensoriales

Los datos obtenidos de las pruebas triangulares se analizaron mediante el modelo Beta Binomial Corregido (BBC) para calcular la magnitud de diferencia (valor d') de pares de muestras. Una prueba de hipótesis se realizó para evaluar la diferencia entre las magnitudes obtenidas ($H_0: d'_1 = d'_2$) con un $\alpha = 0.05$; al final se calculó la potencia de las pruebas triangulares con mediciones repetidas y los valores d' (Bi, 2006). Para estos análisis se utilizó el programa Tools (IFP, 2019).

Los datos de la aceptabilidad global se evaluaron mediante un diseño en bloques completos al azar, la variable respuesta fue la aceptabilidad, y los bloques los panelistas. Para evaluar la normalidad de los datos obtenidos se aplicó la prueba de Kolmogorov - Smirnov; al no cumplir con el supuesto de normalidad se aplicó la prueba de Friedman y comparaciones múltiples por pares de medias de jerarquizaciones con el procedimiento de Nemenyi, mediante el programa XLSTAT versión 2014.5.03 (2014).

Respecto al Perfil Flash, los datos de las tres repeticiones se analizaron mediante un diseño completamente al azar para seleccionar a los panelistas que mostraran diferencia significativa en la mayoría de los atributos evaluados, usando el programa SAS versión 9.4 (SAS, 2019). Posteriormente, con los datos de los panelistas seleccionados se realizó un análisis procrusteano generalizado (APG), con el programa XLSTAT versión 2014.5.03 (2014).

En el caso de las emociones, la frecuencia seleccionada por los consumidores se reportó para cada una de las 39 emociones. La intensidad de las emociones se analizó con un diseño en bloques completos al azar, en donde los consumidores fueron los bloques. Para evaluar la normalidad de los datos obtenidos se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov; al no cumplir con el supuesto de normalidad se aplicó la prueba de Friedman y comparaciones múltiples por pares de medias de jerarquizaciones con el procedimiento de Nemenyi. El análisis se llevó a cabo mediante el programa XLSTAT versión 2014.5.03 (2014).

La determinación de la vida útil sensorial comenzó con el análisis de censura de los datos, debido a la naturaleza discreta de los tiempos de maduración; basados en las censuras se obtuvieron los datos de inicio y fin de la aceptación, con sus respectivas frecuencias (Hough, 2010). Después, para realizar el análisis de supervivencia, se eligió la distribución con el mejor ajuste de datos, de acuerdo al menor valor del estadístico Anderson Darling (AD) (Hough, 2010). Las distribuciones comparadas fueron Weibull, normal, normal logarítmica, logística, logística logarítmica (Hough, 2010) y normal logarítmica de tres parámetros.

5.5. Resultados y discusión

5.5.1. Determinación de pH y composición química parcial

Las diferencias en las variables físicas y químicas fueron significativas. La excepción fue el pH, el cual se encontró en un rango de 5.29 - 5.52 (Cuadro 15), cercano a lo reportado en quesos de Zacazonapan con 23 - 27 d de maduración,

5.1 - 5.4 (Hernández-Morales *et al.*, 2010). La actividad de agua (a_w) se mantuvo en el rango de 0.902 - 0.951, lo cual coincide con los valores de 0.937 - 0.951 reportados en quesos de Zacazonapan por Hernández-Morales *et al.* (2010). El contenido de proteína se encontró entre 26.42 y 37.77 %, y el contenido de grasa entre 23.76 y 30.44 %, los cuales son comparables a los obtenidos por Hernández-Morales *et al.* (2010) y Villegas *et al.* (2014), quienes reportaron para este queso contenidos de proteína de 25.8 a 30.4 % y de grasa 24.69 a 33.8 %. Con base en el contenido de grasa los quesos quedarían clasificados como bajos en grasa ($\geq 10\%$ y $\leq 25\%$) y semigrasos ($\geq 25\%$ y $< 45\%$) de acuerdo a la NMX-F-713-COFOCALEC-2005.

La humedad osciló entre 32.43 - 40.51 % y la sal entre 1.92 - 2.75 %, lo cual coincide con otras investigaciones que documentaron una humedad de 31.8 - 41.9 % y un contenido de sal entre 1.8 - 2.8 % (Hernández-Morales *et al.*, 2010 y Villegas *et al.*, 2014). Estas variables se relacionan de manera inversa, ya que concentraciones altas de sal favorecen la sinéresis en el queso, asimismo disminuyen la a_w y la actividad microbiana (Ramírez-Navas, Aguirre-Londoño, Aristizabal-Ferreira, & Castro-Narváez, 2017). Al considerar el porcentaje de humedad sin materia grasa y acorde con la NMX-F-713-COFOCALEC-2005, los quesos evaluados estarían clasificados como duros (49 – 56 %) y extraduros ($< 51\%$).

En cuanto a sólidos totales se obtuvieron valores entre 59.49 - 67.57 % y un contenido de minerales de 6.04 - 8.28 %. En suma, las diferencias entre cada una de las variables de respuesta pueden asociarse a la raza, alimentación y estado de lactancia de los animales, de los cuales cada productor obtiene la leche, así mismo, el grado de estandarización del proceso que se traduce en variaciones durante la manufactura y tiene efecto sobre las características del producto final (Perna, Simonetti, Intaglietta, & Gambacorta, 2014; Hernández-Morales *et al.*, 2010; Bonanno *et al.*, 2013). El queso de Zacazonapan al madurarse a temperatura ambiente por lo menos 30 d y cuya fermentación y

maduración se efectúa por microbiota nativa de la leche, se considera un queso añejo (NMX-F-713-COFOCALEC-2005).

Durante la maduración del queso C las variables físicas y químicas presentaron diferencia estadística significativa con excepción del pH. En cuanto a la a_w y la humedad, la tendencia fue a disminuir conforme transcurrió el tiempo de maduración, en el a_w se obtuvo una diferencia de 0.088 unidades entre el tiempo 0 y 180 d (Cuadro 16), y a los 730 d una a_w de 0.726 y una humedad de 15.6 %. La a_w decrece durante la maduración del queso, debido a que el agua interacciona mediante puentes de hidrógeno con los grupos amino y carboxilo generados durante el proceso de proteólisis (Ardö, McSweeney, Magboul, Upadhyay, & Fox., 2017). Además, a medida que se incrementa la concentración de sal las variables a_w y humedad disminuirán (Ramírez-Navas, *et al.*, 2017).

Cuadro 15. Variables físicas y químicas de quesos añejos de Zacazonapan con 20 d de maduración (base húmeda).

Queso	pH	a_w	Proteína (%)	Grasa (%)	Humedad (%)	Sólidos totales (%)	Sal (%)	Minerales (%)
A	$5.42 \pm 0.26a^z$	$0.931 \pm 0.016ab$	$29.98 \pm 1.10b$	$24.32 \pm 2.22c$	$38.90 \pm 2.99a$	$61.10 \pm 2.99b$	$2.16 \pm 0.15c$	$6.81 \pm 0.30b$
B	$5.52 \pm 0.06a$	$0.917 \pm 0.010bc$	$29.53 \pm 0.69bc$	$30.44 \pm 1.43a$	$33.19 \pm 2.02b$	$66.81 \pm 2.02a$	$2.11 \pm 0.11c$	$6.84 \pm 0.42b$
C	$5.46 \pm 0.06a$	$0.902 \pm 0.004c$	$37.77 \pm 0.41a$	$23.76 \pm 0.43c$	$32.43 \pm 0.80b$	$67.57 \pm 0.80a$	$2.75 \pm 0.02a$	$6.04 \pm 0.20c$
D	$5.38 \pm 0.04a$	$0.925 \pm 0.008bc$	$28.83 \pm 0.58c$	$23.59 \pm 0.72c$	$39.29 \pm 1.05a$	$60.70 \pm 1.05b$	$2.59 \pm 0.05b$	$8.28 \pm 0.20a$
E	$5.29 \pm 0.06a$	$0.951 \pm 0.007a$	$26.42 \pm 0.55d$	$26.78 \pm 1.20b$	$40.51 \pm 1.92a$	$59.49 \pm 1.92b$	$1.92 \pm 0.09d$	$6.3 \pm 0.28c$

^zMedias $\pm$ desviación estándar seguidas con distinta letra en cada columna son diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 16. Características físicas y químicas del queso C, con 0, 30, 95 y 180 d de maduración (base húmeda).

Maduración (d)	pH	a_w	Proteína	Humedad	Grasa	Sal	Sólidos totales	Minerales
0	$5.41 \pm 0.06a^z$	$0.967 \pm 0.002a$	$24.23 \pm 1.53c$	$45.60 \pm 1.41a$	$23.88 \pm 0.26d$	$2.06 \pm 0.04b$	$54.40 \pm 1.41d$	$6.28 \pm 0.38c$
30	$5.33 \pm 0.10a$	$0.937 \pm 0.002b$	$29.61 \pm 1.48b$	$37.36 \pm 0.98b$	$26.14 \pm 0.32c$	$2.34 \pm 0.08ab$	$62.63 \pm 0.98c$	$6.88 \pm 0.28bc$
95	$5.35 \pm 0.09a$	$0.901 \pm 0.006c$	$33.89 \pm 1.40a$	$30.85 \pm 1.27c$	$27.83 \pm 0.29b$	$2.54 \pm 0.12a$	$69.13 \pm 1.28b$	$7.42 \pm 0.23b$
180	$5.31 \pm 0.06a$	$0.879 \pm 0.006d$	$35.66 \pm 1.06a$	$27.21 \pm 1.22d$	$28.77 \pm 0.18a$	$2.33 \pm 0.16ab$	$72.79 \pm 1.22a$	$8.36 \pm 0.31a$

^zMedias $\pm$ desviación estándar seguidas con distinta letra en cada columna son diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Durante la maduración se observó una tendencia al incrementó en los sólidos totales, lo cual está asociado con hecho de que la elaboración de un queso es un proceso en el cual la caseína y la grasa de la leche se concentran aproximadamente 10 veces según el tipo de queso, esto depende de la temperatura, la sinéresis, la acidificación de la pasta, el trabajo mecánico, la adición de sal y el proceso de maduración (Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony, 2015; Ramírez-Navas *et al.*, 2017).

5.5.2. Magnitud de diferencia (d')

Los pares de quesos A vs B y D vs E presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$; Cuadro 17), los valores d' indican que las personas detectaron diferencia sensorial en ambos pares de quesos. (Bi, 2006). Al realizar la comparación de los valores d' obtenidos para cada par de quesos, no se encontró diferencia significativa; es decir, la hipótesis nula de igualdad no se rechazó. Las potencias (β) de ambas pruebas fueron de 100 y 99.8 %, lo cual indica la probabilidad de encontrar diferencias entre los pares de muestras A vs B y D vs E, respectivamente (Bi, 2006).

Cuadro 17. Magnitud de diferencia (d') para pares de quesos de Zacazonapan.

	Queso A vs queso B	Queso D vs queso E
Proporción de juicios correctos	0.64	0.56
Significancia H_0 : $p = 0.33$ de igualdad muestra	1.72×10^{-10}	1.27×10^{-6}
d'	2.17	1.78
Varianza de d'	0.059	0.060
Sobre dispersión de los datos (γ)	0.007	0.006
Significancia H_0 : $d'_{AB} = d'_{DE}$	$p = 0.261$	
Potencia (β)	1	0.998

5.5.3. Perfil Flash de quesos

Al realizar el análisis correspondiente de los datos se consideró la selección de siete panelistas y de ocho atributos que permitieron diferenciar entre quesos. En

el APG la transformación óptima de la configuración consensuada indicó que fue suficiente retener los dos primeros componentes, los cuales explicaron el 81 % de la variabilidad total de los datos, el primero explicó un 64.48 %, y los atributos que contribuyeron con las mayores cargas fueron arenosidad, sequedad, dureza y friabilidad, mientras que el segundo componente explicó el 16.52 % y las mayores cargas se asociaron a los atributos de astringencia, granulosidad, friabilidad y dureza (Figura 4).

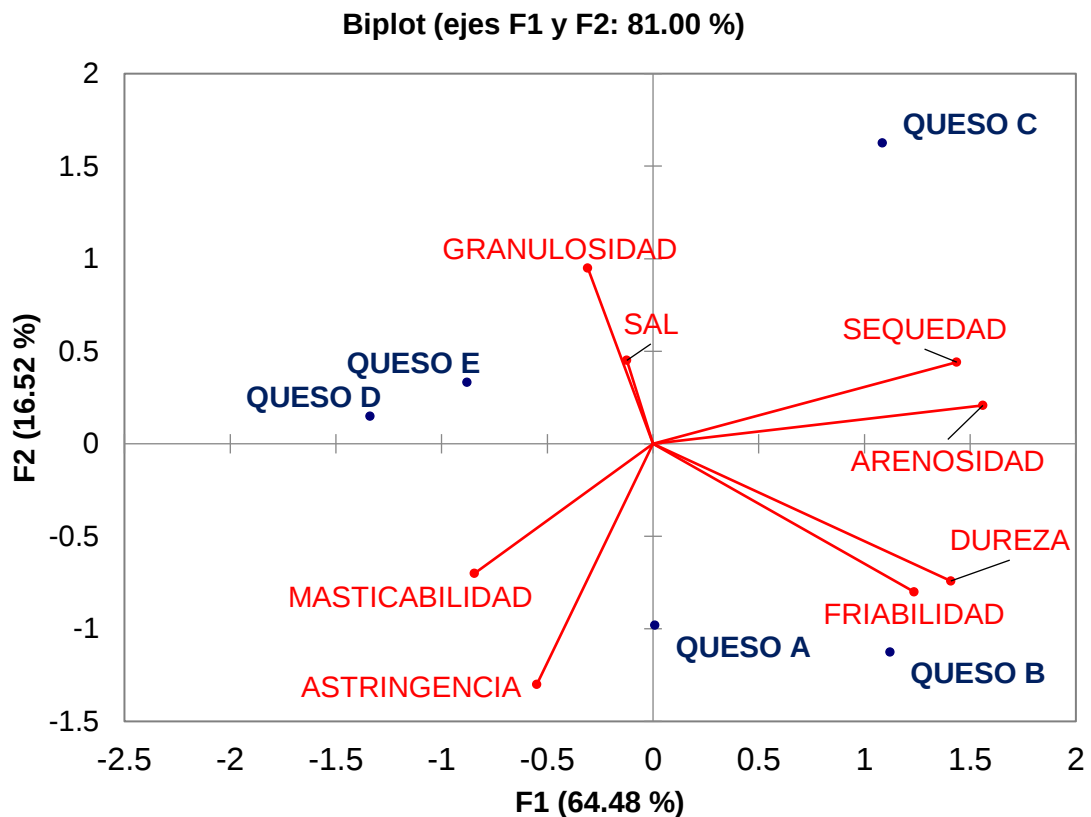


Figura 4. Representación gráfica de los quesos y descriptores con los dos primeros ejes principales del análisis procrusteano generalizado (APG).

Con base en la distribución de quesos y descriptores se tiene que los quesos B y C se asociaron con los atributos de sequedad, arenosidad, dureza y friabilidad. Los quesos D y E se relacionaron con los atributos de granulosidad, sal y masticabilidad, mientras que el queso A se asoció con el atributo de astringencia

(Figura 4). Basados en la NMX-F-713-COFOCALEC-2005 este queso se consideraría de pasta friable o desmorable, dado que permite su disgregación en pequeñas partes al ser sometido a esfuerzos mecánicos específicos, como la masticación.

5.5.4. Evaluación de aceptabilidad global

En el análisis de los datos se consideraron 98 consumidores debido a que una persona no cumplió con lo solicitado y para cumplir con el balance entre el número de mujeres y hombres se descartó a otra. La prueba de Kolmogorov Smirnov mostró que los datos no presentaron una distribución normal ($p = 0.005$), por lo cual se utilizó la prueba de Friedman y comparaciones múltiples por pares de medias de jerarquizaciones por medio de la prueba de Nemenyi (Cuadro 18). El grupo con mayor aceptación lo conformaron los quesos A, B, C y E, mientras que los de menor aceptación fueron A, C, D y E. Se observa que cuatro de cinco quesos tienen la misma aceptabilidad, adicional a que tres quesos se encuentran en grupos de mayor y menor aceptabilidad. Estos resultados indican que la medición de aceptabilidad no es un punto de referencia suficiente para diferenciar o desarrollar productos (King & Meiselman, 2010).

De acuerdo a la escala hedónica utilizada, la mayor aceptación se representó con un valor de 9, en este caso se obtuvieron promedios de jerarquías entre 2.71 – 3.19, los cuales equivalen a valores de aceptabilidad entre 5.6 - 6.2 relacionados con los términos de «Ni me disgusta ni me gusta» y «Me gusta poco». Estos valores de aceptabilidad indican que los consumidores reclutados probablemente preferían quesos en otras etapas de maduración; investigaciones señalan que las personas pueden distinguir sabores añejos y frescos en los quesos (Hernández-Morales *et al.*, 2010). En este caso los quesos más aceptados fueron el queso A que se relacionó con el atributo de astringencia, y los quesos B y C relacionados con los atributos arenosidad, sequedad, dureza y friabilidad, características asociadas con mayor tiempo de maduración. Esto difiere con lo reportado por Hernández-Morales *et al.* (2010) quienes señalan que los quesos

menos aceptados presentaron atributos asociados a un queso añejo (olor a pies, olor a pescado, pungencia, amargor, astringencia, duración de sabor global y acidez), y los más aceptados presentaron sabor a mantequilla, textura porosa y desmoronable.

Cuadro 18. Aceptabilidad global para quesos añejos de Zacazonapan.

Quesería	Aceptabilidad global
A	3.08ab ^z
B	3.19a
C	3.14ab
D	2.71b
E	2.88ab

^zMedias de jerarquizaciones con letra distinta indican diferencia estadística (Nemenyi, $p \leq 0.05$).

5.5.5. Frecuencia e intensidad de emociones en consumidores de queso añejo de Zacazonapan

Veintiún emociones, de las 39 que provee la metodología EsSence Profile®, tuvieron una frecuencia ≥ 30 , las cuales fueron: *activo, agradable, alegre, amable, amigable, bien, buen carácter, calmado, comprensivo, contento, divertido, estable, feliz, interesado, libre, obediente, pacífico, satisfecho, seguro, sensible y tranquilo*; es importante considerar que ninguna emoción fue de valencia negativa (no placenteras) (Figura 5). La presencia de emociones de valencia positiva (placenteras) y su mayor frecuencia, se relaciona con el hecho de que los alimentos pueden ejercer una experiencia agradable en los consumidores (Edwards, Hartwell, & Brown, 2013).

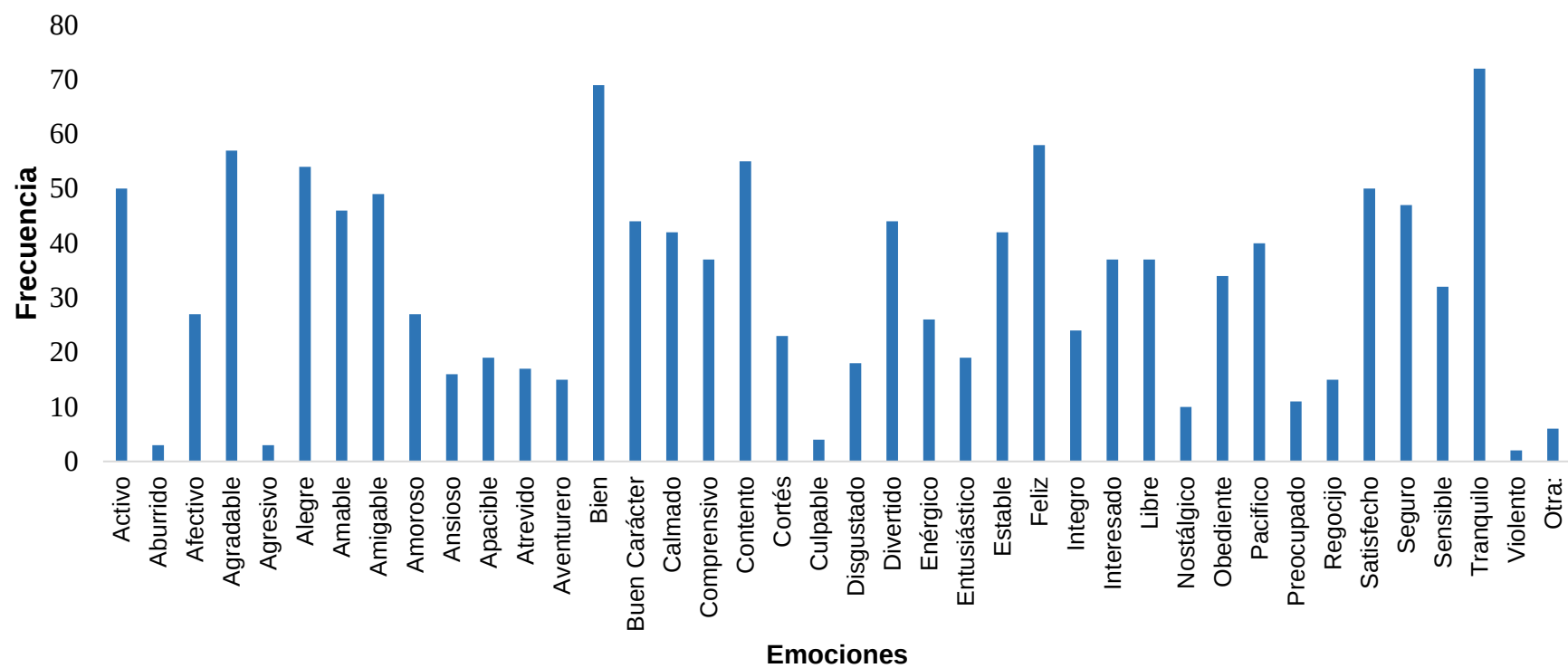


Figura 5. Frecuencia de emociones percibidas por consumidores locales después de degustar queso añejo de Zacazonapan.

Al evaluar la intensidad de las 21 emociones, la prueba de Kolmogorov Smirnov demostró que los datos no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se aplicó la prueba de Friedman y comparación múltiples por pares de medias de jerarquizaciones por la prueba de Nemenyi; solo cinco emociones mostraron diferencia significativa entre quesos (Cuadro 19).

Cuadro 19. Intensidad de emociones que permiten diferenciar entre quesos añejos de Zacazonapan.

Emoción	Queso				
	A	B	C	D	E
Activo	2.74b ^z	2.86ab	3.25a	2.93ab	3.220a
Amable	2.70b	3.00ab	2.98a	2.99ab	3.09ab
Amigable	2.78b	2.88ab	3.24a	2.99ab	3.10ab
Seguro	2.75b	2.92ab	3.27a	3.03ab	3.04ab
Tranquilo	2.77b	2.85ab	3.24a	3.13ab	3.00ab

^zMedias de jerarquías con letra distinta indican diferencia estadística (Nemenyi, $p \leq 0.05$).

El grupo conformado por los quesos B, C, D y E presentaron las mayores intensidades de emociones, mientras que el grupo con las menores intensidades fue conformado por los quesos A, B y D. Al comparar estos grupos con los formados en el caso de la aceptabilidad global, se destaca que la intensidad de las emociones: amable, amigable, seguro y tranquilo, permitieron diferenciar en particular a los quesos A y C, los cuales presentaban la misma aceptabilidad.

Los resultados muestran que las emociones proporcionan una medida sensible para diferenciar productos, y en ocasiones puede existir o no una correlación entre la aceptabilidad global y los términos de emoción; debido a esto, investigadores sugieren la combinación del uso de la medición de la intensidad de emociones y la aceptabilidad global (King & Meiselman, 2010). Al realizar esta consideración con los resultados obtenidos, los quesos B, C y E generaron la mayor intensidad de emociones en el consumidor y fueron calificados con una mayor aceptabilidad global. Las relaciones entre aceptabilidad y emoción pueden variar según el producto, los datos socio-demográficos y la psicología del consumidor (Schouteten *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2018).

5.5.6. Vida útil sensorial

Al analizar los datos se encontró que la censura de intervalo fue la más frecuente, y el intervalo con mayor frecuencia comprendió un inicio y fin de aceptación de 30 y 95 d, respectivamente (Hough, 2010). Al realizar la prueba de bondad de ajuste para las distribuciones evaluadas, los valores de AD fueron: logística (1.816), normal (1.563), Weibull (0.800), normal logarítmica (0.772), logística logarítmica (0.763) y normal logarítmica de tres parámetros (0.761); por lo que se eligió esta última distribución y la de Weibull, la cual se ha utilizado con mayor frecuencia en el modelado de la vida útil sensorial de alimentos (Hough, 2010; Kamleh *et al.*, 2012).

En el queso C se observó que el porcentaje de aceptación de consumo disminuye al incrementarse el tiempo de maduración (Cuadro 20), esto debido a las características que desarrolla el queso durante el proceso de maduración, asociado a la generación de compuestos derivados del metabolismo de la lactosa residual, lactato y citrato, lipólisis y proteólisis (Fox *et al.*, 2015).

Cuadro 20. Predicción de porcentajes de aceptación de queso de Zacazonapan (quesería C) en cinco tiempos de maduración empleando las distribuciones de Weibull y normal logarítmica de tres parámetros.

Tiempo de maduración (d)	Weibull		Normal logarítmica de tres parámetros			
	Porcentaje de aceptación	Intervalo de confianza (95 %)		Porcentaje de aceptación	Intervalo de confianza (95 %)	
		LI ^z	LS ^y		LI	LS
0	97	91	99	98	93	99
30	70	57	79	76	65	84
95	45	34	56	44	34	55
180	29	19	39	25	17	36
730	4	1	10	4	1	10

^zLímite inferior

^yLímite superior.

Hernández-Morales *et al.* (2010) reportaron para quesos de Zacazonapan una lista de veinte descriptores y destacan que algunos quesos presentaron sabores

jóvenes y subdesarrollados, y otros quesos presentaron valores altos para aromas como ácido propionico, a pies (aroma asociado con zapatos y calcetines sudados y sucios), a pescado (aroma asociado con pescado seco), y sabores tales como pungente (sensación aguda asociada con la producida por la capsaicina y otras especias), astringente, ácido y amargo. Ácidos grasos libres volátiles como el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico se reportaron en el queso de Zacazonapan (Hernández-Morales *et al.*, 2010).

El 50 % de consumidores aceptaría el queso de Zacazonapan hasta con 78.2 d, con un intervalo de confianza del 95 % que comprende de 50.7 a 105.7 d de acuerdo a la gráfica de supervivencia generada con la distribución normal logarítmica de tres parámetros. Un resultado similar se obtuvo para la distribución de Weibull, en la cual el 50 % de aceptación de consumo se presentó a los 77.8 d de maduración con un intervalo de confianza de 95 % entre 48.5 - 124.7 d (Figura 6).

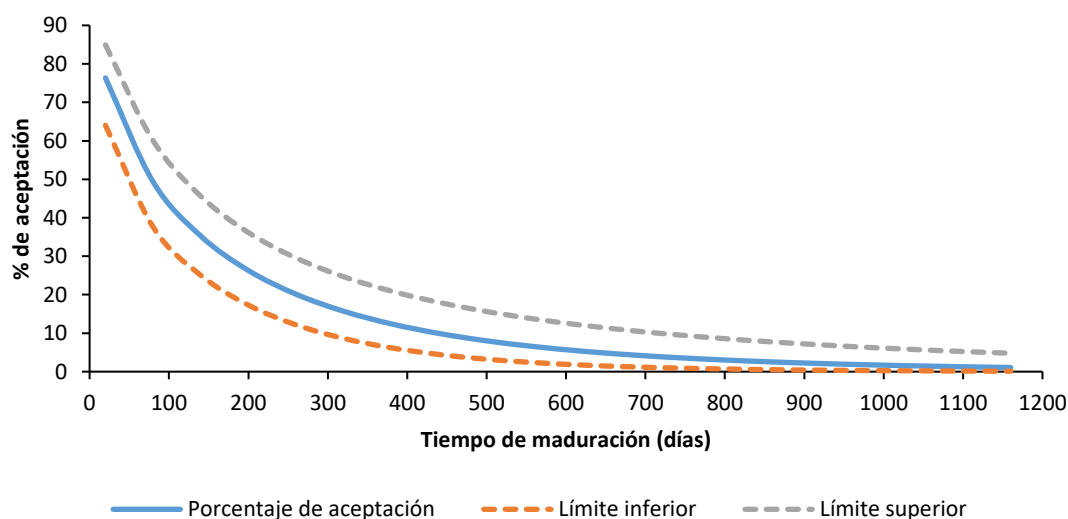


Figura 6. Porcentaje de aceptación de consumidores de queso contra el tiempo de almacenamiento utilizando la distribución de Weibull.

Hernández-Morales *et al.* (2010) reportan que este queso se consume fresco con 15 a 30 d después de su elaboración; o añejo con una maduración de 3 a 12

meses, pero no se tenía un reporte asociado a estudios con consumidores, que determinará de manera cuantitativa este dato.

Investigaciones de vida útil sensorial se han realizado en queso mantecoso Huacariz y Cepof de Cajamarca, Perú en los cuales sus medianas de vida útil fueron de 7.6 d y 41.7 d a 10 °C, respectivamente (Sánchez-González & Pérez, 2016). Así mismo, en queso Halloumi de Chipre se reportó una mediana de vida útil de 37.8 d a 15 °C (Kamleh *et al.*, 2012). No existen reportes en los cuales el método de supervivencia con el que se determina la vida útil sensorial se haya utilizado para conocer el estado de madurez, en el cual el 50 % de los consumidores aceptarían al queso añejo de Zacazonapan, ni los intervalos de tiempo en los cuales el productor podría conservar en maduración el queso para disminuir el rechazo del mismo.

5.6. Conclusiones

Los quesos evaluados presentaron diferencias en sus características físicas, químicas y sensoriales. En la prueba de aceptabilidad global se identificaron quesos con la misma aceptación, sin embargo, cinco emociones (activo, amable, amigable, seguro y tranquilo) contribuyeron para diferenciarlos; esto hace evidente la ventaja discriminativa de la medición de emociones sobre las pruebas de aceptabilidad global. Respecto a la vida útil sensorial, el 50 % de los consumidores aceptaron el queso de Zacazonapan hasta con 78 d de maduración, esto implica que los consumidores reclutados tuvieron preferencia por este queso en estados con menor madurez, ya que la probabilidad de consumo disminuye al incrementarse el tiempo de maduración. Sin embargo, se tendría que obtener más información de otros tipos de muestras poblacionales, ya sean consumidores locales o de otras regiones del país, de muestras de consumidores segmentadas por sus características sociodemográficas, o consumidores con preferencia por los quesos añejos.

La información obtenida incrementa el conocimiento de la caracterización sensorial del queso, que contribuye a su tipificación, generando bases para la construcción de una figura de protección, tal como una marca colectiva con referencia geográfica o una denominación de origen para salvaguardar al queso añejo de Zacazonapan.

5.7. Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado, por el financiamiento de la investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 283773. A las autoridades y pobladores del municipio de Zacazonapan, estado de México, por su contribución al desarrollo del trabajo de campo.

5.8. Literatura citada

- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. 2017. Biochemistry of cheese ripening: proteolysis. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Fourth, pp. 445–482). Elsevier Ltd. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Bi, J. 2006. Sensory discrimination tests and measurements. Statistical principles, procedures and tables. Blackwell Publishing, Ames Iowa. 560 p. <https://doi.org/10.1002/9780470277669>
- Bonanno, A., Tornambè, G., Bellina, V., De Pasquale, C., Mazza, F., Maniaci, G., & Di Grigoli, A. 2013. Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. *J. Dairy Sci.* 96: 710–24. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5973>
- Domingues, G. B., Parra B. D., Giacometti C. F., & Lúcia G. M. 2019. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves the sensorial profile of Camembert-type cheese: An approach through flash-profile and CATA. *LWT - Food Sci. Technol.* 107: 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.077>
- Edwards, A. J. S., Hartwell, H. J., & Brown, L. 2013. The relationship between emotions, food consumption and meal acceptability when eating out of the home. *Food Qual. Prefer.* 30: 22–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.04.004>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. 2015. Chemistry and biochemistry of cheese. In *Dairy chemistry and*

- biochemistry, 2nd ed., 499–546. Switzerland: Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_12.
- Garitta, L., Langohr, K., Elizagoyen, E., Gugole O. F., Gómez, G., & Hough, G. 2018. Survival analysis model to estimate sensory shelf life with temperature and illumination as accelerating factors. *Food Qual. Prefer.* 68: 371–376. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.03.014>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., & Villegas de Gante, A. 2010. Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 63: 552-560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hough, G. 2010. Sensory shelf life estimation of food products. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. 264 p. <https://doi.org/10.1201/9781420092943>
- Kamleh, R., Toufeili, I., Ajib, R., Kanso, B., & Haddad, J. 2012. Estimation of the shelf-life of Halloumi cheese using survival analysis. *Czech J. Food Sci.* 30: 512–19.
- Kenney, E., & Adhikari, K. 2016. Recent developments in identifying and quantifying emotions during food consumption. *J. Sci. Food Agric.* 96: 3627-3630. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7717>.
- Kim J. Y., Prescott, J., & Kim, K. O. 2017. Emotional responses to sweet foods according to sweet liker status. *Food Qual. Prefer.* 59: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.013>
- King, S. C., & Meiselman, H. L. 2010. Development of a method to measure consumer emotions associated with foods. *Food Qual. Prefer.* 21: 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.02.005>
- Liao, L. X., Corsi, A. M., Chrysochou, P., & Lockshin, L. 2015. Emotional responses towards food packaging: A joint application of self-report and physiological measures of emotion. *Food Qual. Prefer.* 42: 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.01.009>
- Mora, M., Urdaneta, E., & Chaya, C. 2018. Emotional response to wine: Sensory properties, age and gender as drivers of consumers' preferences. *Food Qual. Prefer.* 66: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.015>
- NMX-F-713-COFOCALEC-2005. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Queso y Queso de Suero-. Denominaciones, Especificaciones y Métodos de Prueba.
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. 2018. Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Sci Technol.* 38(4):674-682. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.11917>

- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., & Gambacorta, E. 2014. Effects of genetic type, stage of lactation, and ripening time on Caciocavallo cheese proteolysis. *J. Dairy Sci.* 97(4), 1909–1917. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7288>
- Ramírez-Navas J. S., Aguirre-Londoño, J., Aristizabal-Ferreira, V. A., & Castro-Narváez, S. 2017. La sal en el queso: diversas interacciones. *Agron. Mensoam.* 28: 303-316. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>.
- Sánchez-González, & Pérez, C. J. A. 2016. Sensory shelf life of mantecoso cheese using accelerated testing. *Sci. Agropecu.* 7: 215–222. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.08>
- Statistical Analysis System (SAS). 2019. SAS/STAT Software. Versión 9.4. SAS Institute. Inc. Cary, NC, USA.
- Schouteten, J. J., De Steur, H., De Pelsmaeker, S., Lagast, S., De Bourdeaudhuij, I., & Gellynck, X. 2015. Impact of health labels on flavor perception and emotional profiling: A consumer study on cheese. *Nutrients.* 7: 10251–10268. <http://dx.doi.org/10.3390/nu7125533>
- The Institute for Perception (IFP). 2019. Tools IFPrograms®. Richmond, VA. USA.
- Verastegui-Tena, L., Van Trijp, H., & Piqueras-Fiszman, B. 2019. Heart rate, skin conductance, and explicit responses to juice samples with varying levels of expectation (dis)confirmation. *Food Qual. Prefer.* 71: 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103893>
- Villegas, A. 2012. Tecnología quesera. Ed. Trillas. 2da. ed. México. 404 p.
- Villegas, A., Cervantes, F., Cesín, A., Espinoza, A., Hernández, A., Santos, A., & Martínez, A. 2014. Atlas de los quesos mexicanos genuinos. Ed. Biblioteca Básica de Agricultura. México. 395p.
- XLSTAT. 2014. XLSTAT versión 2014.5.03. Addisoft. NY, EE. UU.

6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA EN EL QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN

6.1. Resumen

El queso añejo de Zacazonapan es un producto artesanal genuino elaborado en el suroeste del Estado de México, México; con leche cruda de vacas en libre pastoreo. A extractos solubles de quesos provenientes de dos queserías (A y B), con diferente tiempo de maduración se les determinó composición, perfil de aminoácidos, mapa peptídico y capacidad antioxidante por decoloración de β -caroteno, así como, actividad antihipertensiva. En el contenido de aminoácidos destacaron los esenciales como Val, Leu, Ile, Thr, Met, Phe, Trp y Arg. Por otro lado, durante la maduración incrementaron los aminoácidos libres siendo de 7.95 ± 0.44 y de $12.65 \pm 0.44 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para el queso A y B, respectivamente. Los pesos moleculares de los péptidos en el queso A se encontraron en un rango de 0.12 – 22.43 kDa y para el queso B fue de 0.10 – 15.51 kDa. El queso con el mayor contenido de aminoácidos libres fue el B, a los 180 d con 12.65 %. La inhibición de la decoloración del β -caroteno se encontró por debajo del 50 % a los 0, 95 y 180 d de maduración. Los extractos mostraron actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I), siendo la mayor a los 180 d de maduración ($39.28 \pm 1.97 \%$), con un IC_{50} para el queso A y B de $0.42 \pm 0.04 \text{ mg mL}^{-1}$ y $0.38 \pm 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. Este queso es una fuente potencial de péptidos bioactivos, por lo que futuras investigaciones se podrían enfocar en la separación de fracciones y obtención de secuencias de aminoácidos, a las cuales se asocia cada bioactividad.

Palabras clave: Perfil de aminoácidos, mapa peptídico, péptidos bioactivos, actividad antioxidante, actividad antihipertensiva.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verenice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

ANTIOXIDATIVE AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITY IN ZACAZONAPAN AÑEJO CHEESE

Abstract

Añejo Zacazonapan cheese is a genuine artisan product made in the southwest of the State of Mexico, Mexico; with raw milk from cows in free-grazing. Soluble extracts of this cheese from two cheese factories (A and B), with different ripening time were determined composition, amino acid profile, peptide map and antioxidant capacity by decolourization of β -carotene, as well as antihypertensive activity. In content highlighted essentials amino acids such as Val, Leu, Ile, Thr, Met, Phe, Trp and Arg. On the other hand, during ripening free amino acids increased, being 7.95 ± 0.44 and 12.65 ± 0.44 g·100 g for cheese A and B, respectively. The molecular weights of the peptides in cheese A were in a range of 0.12 - 22.43 kDa and for cheese B it was 0.10 - 15.51 kDa. The cheese with the highest content of free amino acids was B, at 180 d with 12.65%. Inhibition of β -carotene discoloration was found below 50% at 0, 95 and 180 d of maturation. The extracts showed angiotensin-converting enzyme-I (ACE-I) inhibitory activity, being the highest at 180 d of ripening ($39.28 \pm 1.97\%$), with an IC_{50} for cheese A and B of 0.42 ± 0.04 mg mL⁻¹ and 0.38 ± 0.02 mg mL⁻¹, respectively. This cheese is a potential source of bioactive peptides, so future research may focus on separating fractions and obtaining amino acid sequences, to which each bioactivity is associated.

Keywords: Amino acid profile, peptide map, bioactive peptides, antioxidant activity, antihypertensive activity.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Verenice Torres Salas
Advisor: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

6.2. Introducción

La proteólisis durante la maduración del queso constituye un proceso de suma importancia dada la concentración de proteína, la cual es degradada a péptidos, aminoácidos, aminos, ácidos orgánicos, tioles, tioésteres (Fox, 1989; Niro *et al.*, 2017). Diversos trabajos han reportado el potencial biológico-funcional de péptidos encriptados en las proteínas de la leche, los cuales son liberados durante el proceso de maduración del queso, exhibiendo diferentes tipos de actividad biológica como antihipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante, inmunomoduladora y opioide (Korhonen, 2009; López-Expósito, Amigo, & Recio, 2012; Santiago-López *et al.*, 2018). En particular, los péptidos con actividad antioxidante actúan impidiendo que sustratos oxidables como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y moléculas del ADN se unan al oxígeno (Venereo, 2002). La actividad de este tipo de péptidos dependerá del tamaño y la secuencia de aminoácidos (Peña-Ramos, Xiong, & Arteaga, 2004). Por otro lado, la actividad antihipertensiva de los péptidos está asociada a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), una dipeptidil carboxipeptidasa que cataliza la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (octapéptido). Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por consiguiente, el incremento de la presión arterial. Además la ECA-I actúa simultáneamente en el sistema caliceína-cinina, remueve el dipéptido del C-terminal de la bradiquinina (potente vasodilatador) resultando en la formación de fragmentos de péptido inactivos y favoreciendo el incremento de la presión arterial (FitzGerald, Murray, & Walsh, 2004).

Los fármacos sintéticos dirigidos a inhibir la actividad de la ECA-I, han demostrado su efectividad; sin embargo, debido a los efectos secundarios que producen, como la tos y el angioedema (Beltrami, Zingale, Carugo, & Cicardi, 2006), se han buscado alternativas de origen natural, tal es el caso de los péptidos obtenidos a partir de proteínas alimentarias (Ariyoshi, 1993; Lee & Hur, 2017; Saito, Nakamura, Kitazawa, Kawai, & Itoh, 2000; Yamamoto, 1997).

Existen pocos reportes de actividad antihipertensiva en quesos mexicanos algunos de ellos son en queso fresco (Torres-Llanez, González-Córdova, Hernandez-Mendoza, Garcia, & Vallejo-Cordoba, 2011), queso Cotija (Hernández-Galán *et al.*, 2016) y queso fresco de cabra (Hernández-Galán, Cardador-Martínez, *et al.*, 2017), por lo cual es de gran interés explorar el potencial biológico de los péptidos obtenidos durante la manufactura de productos artesanales como el queso añejo de Zacazonapan.

El queso añejo de Zacazonapan se caracteriza por su importancia social y cultural a nivel regional, aunado al impacto económico dado que sostiene la cadena agroindustrial leche-queso a nivel local contribuyendo al desarrollo de la región (Villegas & Cervantes, 2011). El queso añejo de Zacazonapan, es elaborado con leche cruda de vacas en libre pastoreo, cuajo de «cuerito» (abomaso seco de ternero cuyo principio activo cuajante es la enzima renina), sal de Araró (90 % de pureza) y comercializado como un queso oreado o madurado (Hernández-Morales, Hernández-Montes, Aguirre-Mandujano, & Villegas De Gante, 2010; Hernández, Hernández, Villegas, & Aguirre, 2011; Villegas *et al.*, 2014; Williams, 2016). Debido a la importancia regional de este queso y la carente información relacionada con la actividad biológica de sus componentes, esta investigación tuvo como objetivo determinar la capacidad antioxidante y antihipertensiva de los extractos solubles obtenidos en diferentes tiempos de maduración, con el fin de contribuir a la tipicidad del producto, para la obtención de una figura de protección como una marca colectiva o denominación de origen.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Reactivos analíticos

Los reactivos analíticos D-L- α -ácido amino butírico, dietil etoximetilenmalonato, β -caroteno, ácido linoleico, tween 20, $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_3$, BHT (Hidroxitolueno butilado), ferroxina, hidrato de N-hipuril histidil leucina (HHL), enzima convertidora de angiotensina - I (E.C. 3.4.15.1, de pulmón de conejo, 1U), ácido

hipúrico ($C_9H_9NO_3$), glicina ($C_2H_5NO_2$), fenol (C_6H_6O), cloruro de sodio (NaCl), cloroformo ($CHCl_3$), metanol (CH_3OH), borato de sodio ($Na_2B_4O_7$), azida de sodio (NaN_3), glucosa ($C_6H_{12}O_6$), acetonitrilo (grado HPLC) correspondieron a la marca Sigma-Aldrich (Missouri, E.E. U.U.). El estándar de L – aminoácidos fue de la marca (Sigma-Aldrich, Missouri, E.E. U.U.) Los reactivos azul dextrano, citocromo C, aprotinina, bacitracina y citidina fueron de la marca Amersham Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia. Los reactivos grado analítico hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), acetato de sodio ($NaC_2H_3O_2$) y ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$) correspondieron a la marca Merck© (Darmstadt, Alemania). El ácido bórico (H_3BO_3) correspondió a la marca Meyer® (Ciudad de México, México). En los reactivos utilizados no se realizó ninguna purificación adicional.

6.3.2. Obtención de las muestras de queso añejo de Zacazonapan

Las piezas de queso se obtuvieron en dos queserías de Zacazonapan, Estado de México, México (codificadas como A y B). La quesería A fue seleccionada por su proceso de elaboración tradicional, y la B por el grado de estandarización durante su proceso tradicional. En cada quesería, a partir de un lote de leche cruda de bovino cuajado en la misma tina se elaboraron piezas de queso (1 kg) y cada pieza se consideró una unidad experimental. Los quesos se trasladaron al Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y se conservaron a una temperatura de 15 °C y humedad relativa de 85 %. Seis piezas de queso (tres del queso A y tres del queso B) se colectaron y analizaron a los 0, 30, 95 y 180 días de maduración. Las unidades experimentales usadas en las tres repeticiones se elaboraron en días consecutivos.

6.3.3. Extracción de compuestos solubles en agua

La extracción de los compuestos solubles se realizó de acuerdo a la metodología descrita por (Rae, Phillips, & Kailasapathy, 2010), con modificaciones respecto a

la homogenización, tiempo de centrifugación y ajuste de pH. 250 g de queso se homogeneizaron con 750 mL de agua destilada durante 5 min en una licuadora (Osterizer, Wisconsin, EE. UU.). La mezcla se agitó a 150 rpm durante 1 h a 40 °C en una incubadora orbital (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.), después el pH de la mezcla se llevó a 4.5 utilizando HCl 1 M. La mezcla se centrifugó a 8801 g por 10 min a 4 °C (Centrifuga Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania). Enseguida la capa superior de grasa y el sedimento se descartaron, mientras que el extracto soluble en agua se filtró a gravedad por medio de una capa de algodón, y después se filtró bajo condiciones de vacío usando papel Whatman No. 42. Los extractos se almacenaron a -20 °C.

6.3.4. Liofilización de los extractos solubles

Los extractos congelados se colocaron en nitrógeno líquido por 10 min y se liofilizaron en un equipo FreeZone 2.5 (Labconco Corporation, Kansas, EE. UU.) a una presión de 0.015 mbar y una temperatura de -50 °C.

6.3.5. Composición proximal de extractos liofilizados de queso añejo de Zacazonapan

Determinación de humedad y cenizas en extractos liofilizados

La humedad y cenizas se realizaron con el método descrito por Kirk, Sawyer, & Egan (2002). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se reportaron en g·100 g⁻¹ de extracto.

Determinación de carbohidratos en extractos liofilizados

Los carbohidratos se realizaron con el método descrito por Dubois, Giles, Hamilton, Rebers, & Smith (1956). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g·100 g⁻¹ de extracto liofilizado.

Determinación de lípidos en extractos liofilizados

Los lípidos se determinaron por el método de Folch, Lees, & Stanley (1957). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado.

Perfil de aminoácidos y aminoácidos libres en extractos liofilizados

La determinación de aminoácidos se llevó a cabo como lo describe (Alaiz, Navarro, Girón, & Vioque (1992). Los extractos liofilizados se sometieron a una hidrólisis ácida colocando 2 mg de cada liofilizado con 8 μL D, L- α - ácido aminobutírico 6.2 mM como estándar interno y 1 mL de HCl 6 N, las mezclas se incubaron en horno a 110°C durante 20 h (EC33, Ríos Rocha S. A., Ciudad de México, México). Después, la disolución se burbujeó con nitrógeno, en un baño maría a 80 °C (J. P. Selecta, Barcelona, España), con el fin de eliminar el $\text{HCl}_{(g)}$. Enseguida se derivatizó el residuo sólido adicionando 1 mL de amortiguador borato 1 M a pH 9, más 1 μL de dietil etoximetilenmalonato concentrado (pureza $\geq 98 \%$). Las muestras se incubaron a 50 °C durante 50 min en un bloque de calentamiento SHT100 (Bibby Stuart Cientifica, Staffordshire, Reino Unido), la disolución se centrifugó a 829 g durante cuatro min (Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Una curva de cada aminoácido (50-2000 μM) se realizó bajo las mismas condiciones.

Finalmente, las muestras se inyectaron en un HPLC, integrado por un módulo de separación modelo 126, un inyector tipo válvula de reodine, un detector UV-Vis modelo 166 (Beckman-Coulter, EE. UU.) y una columna de fase reversa Nova-Pack C18 (300 x 3.9 mm, 4 mm; Waters, EE. UU.). 15 μL de muestra se inyectaron, el flujo de corrida fue de $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, en condiciones de gradiente a una temperatura de 18 °C, utilizando una disolución A (25 mM de acetato de sodio y 0.02 % de azida de sodio a pH 6) y una disolución B (acetonitrilo). Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 0 - 3 min, un gradiente lineal partiendo de A - B (91:9) hasta A - B (86:14); 3 - 13 min elución con A - B (86:14);

de 13 - 30 min gradiente lineal de A - B (86:14) hasta A - B (69:31); 30 - 35 min elución con A - B (69:31). Mientras que, la determinación del triptófano se llevó a cabo como lo describe Yust *et al.* (2004) con modificaciones, ya que se incrementó en 10 °C la temperatura de incubación y se anexó un proceso de centrifugación. Una hidrólisis básica se realizó colocando 2 mg de extracto liofilizado y 3 mL de NaOH 4 N en un tubo de ensayo, enseguida la disolución se incubó durante 4 h a 100 °C (EC33, Ríos Rocha S. A., Ciudad de México, México). Después, ésta se centrifugó a 829 g por cuatro min (Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y 20 µL del centrifugado se inyectaron en un HPLC (Beckman-Coulter, EE. UU.) cuyas características se mencionaron anteriormente. La elución se realizó con un flujo isocrático binario compuesto por acetato de sodio 25 mM, azida de sodio 0.02 % (p/v) a pH 6 (disolución A) y acetonitrilo (disolución B) en una relación 91:9 con un flujo de 0.9 mL·min⁻¹. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado a una longitud de onda de 280 nm. La adquisición de datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante el programa informático 32 Karat versión 7.0 (Beckman-Coulter, EE. UU.).

La determinación de los aminoácidos libres se realizó con la metodología descrita por Megías *et al.* (2015), con modificaciones que consistieron en una menor centrifugación después de la extracción, y la sustitución de ácido acético por acetato de sodio en la fase móvil. A 2 mg de extracto liofilizado se adicionaron 24 µL de patrón interno (ácido D-h-α- aminobutírico 6.2 mM) y 1 mL de etanol al 30 % (v/v). Esta mezcla se agitó durante 30 min a 300 rpm en agitador orbital (SSM1, Bibby Sterilin LTD., Staffordshire, Reino Unido) a temperatura ambiente (25 ±1 °C). Después la mezcla se centrifugó a 829 g durante cuatro min (Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La fase líquida se extrajo y al pellet formado se le adicionó nuevamente 1 mL de etanol al 30 % (v/v), esta mezcla se agitó y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Las fases líquidas obtenidas se sometieron a sequedad con nitrógeno en un baño maría a 80 °C (J. P. Selecta, UNIVEA, Barcelona, España). Enseguida se llevó a cabo la derivatización de las

muestras adicionando al residuo sólido 3 mL de amortiguador borato de sodio 1 M a pH 9 y 2 μ L de dietil etoximetilenmalonato concentrado (pureza $\geq$ 98 %), la mezcla se incubó a 50 °C durante 50 min en un bloque de calentamiento SHT100 (Bibby Stuart Scientifica, Staffordshire, Reino Unido). Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 829 g durante cuatro min (Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y 20 μ L de sobrenadante se inyectaron en un HPLC cuyas características se mencionaron anteriormente. La determinación se realizó a una temperatura de 18 °C, un flujo de 0.9 mL·min⁻¹, con un gradiente conformado por la disolución A (25 mM de acetato de sodio y 0.02 % de azida de sodio a pH 6) y acetonitrilo como disolución B. Las condiciones del gradiente fueron las mismas que se utilizaron para la determinación del perfil de aminoácidos de la hidrólisis ácida. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron en g·100 g⁻¹ de extracto liofilizado. La adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software 32 Karat 7.0 (Beckman-Coulter, EE. UU.).

6.3.6. Determinación de mapa peptídico de extractos liofilizados

El mapa peptídico de los liofilizados se determinó como lo describe Hernández-Jabalera *et al.* (2015). A 2 mg de extracto liofilizado se adicionaron 24 μ L de D, L- α - ácido aminobutírico como estándar interno (6.2 mM) y 1 mL de etanol al 30 % (v/v). Las mezclas se agitaron a 300 rpm (agitador orbital SSM1, Bibby Sterilin LTD., Staffordshire, Reino Unido) durante 30 min a temperatura ambiente (25 $\pm$ 1 °C). Enseguida éstas se centrifugaron a 829 g durante cuatro min a 4 °C (Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). A continuación, la fase líquida se transfirió a un microtubo, y el pellet nuevamente se mezcló con etanol al 30 % (v/v) y se centrifugó. Ambas fases líquidas se sometieron a sequedad con nitrógeno en un baño maría a 80 °C (J. P. Selecta, Barcelona, España). Al residuo sólido generado se le adicionaron 3 mL de amortiguador borato 1 M a pH 9 más 2 μ L de dietil etoximetilenmalonato (pureza $\geq$ 98 %), la mezcla se incubó a 50 °C durante 50 min en un bloque de calentamiento SHT100 (Bibby Stuart Scientifica, Staffordshire, Reino Unido) y se centrifugó a 829 g durante cuatro min

a 4 °C (Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). 20 µL del sobrenadante se inyectaron en un HPLC (Beckman-Coulter, Brea, EE. UU.) cuyas características se describieron anteriormente. Para esta determinación se utilizó una columna Discovery BIO Wide Pore C18 (250 mmx4.6 mm, 5 µm, Supelco, Pensilvania, EE. UU.). La elución de la muestra se realizó con un gradiente binario compuesto por una disolución A: agua con 0.1 % (v/v) ácido trifluoroacético, y una disolución B: acetonitrilo con 0.1 % (v/v) de ácido trifluoroacético. La composición inicial fue A - B (100/0) hasta A - B (70/30) durante 60 min a un flujo de 1 mL·min⁻¹, a 25 ± 1 °C. La detección se realizó a una longitud de onda de 215 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron en g·100g⁻¹ de extracto liofilizado. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó utilizando el software 32 Karat 7.0 (Beckman-Coulter, EE. UU.).

6.3.7. Determinación del perfil de pesos moleculares de péptidos por FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

El peso molecular de los péptidos contenidos en los liofilizados se determinó por cromatografía de filtración en gel descrito por Hernández-Jabalera *et al.* (2015). En 1 mL de agua destilada se disolvieron 20 mg de proteína (atendiendo al contenido de proteína del extracto liofilizado) con una agitación de 300 rpm durante 30 min en un agitador orbital (SSM1, Bibby Sterilin LTD., Staffordshire, Reino Unido) a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Enseguida se centrifugaron a 963 g durante 15 min (Centrifuga eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemania). 500 µL de cada muestra se inyectaron en un FPLC equipado con una bomba binaria P-900, un detector UV UPC-900 (ÄKTApurifer General Electric, EE. UU.) y una columna Superdex 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La columna estaba constituida por una matriz de agarosa y dextrano formando una red con un tamaño medio de partícula de 13 µm y con un rango de separación de 3 a 70 kDa. Como fase móvil se utilizó amortiguador bicarbonato de amonio 0.75 M y una longitud de onda de 215 nm con un flujo de 0.5 mL·min⁻¹. El peso molecular

de los péptidos se determinó con una curva de calibración de los patrones de peso molecular conocido: glicina (75 Da) citidina (246 Da), bacitracina (1450 Da), aprotinina (6512 Da), citocromo C (12.5 kDa) y azul dextrano (2000 kDa) (Amersham Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia).

6.3.8. Actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno

La determinación se realizó considerando el método descrito por Marco (1968), con modificaciones respecto a la sustitución de Tween 40, por Tween 20 y la remoción del cloroformo con nitrógeno. Brevemente, 2 mg de β -caroteno se pesaron y se disolvieron con 1 mL de cloroformo. Enseguida 200 μ L de Tween-20 se añadieron y 20 μ L de ácido linoleico. Después el cloroformo se eliminó totalmente usando nitrógeno. La disolución de β -caroteno se mezcló con 25 mL de agua a la que se burbujeó oxígeno (200 μ L en el pocillo de la microplaca con absorbancia a 450 nm de 1). La determinación se realizó mezclando 200 μ L de la disolución de β -caroteno con 2 μ L de muestra (concentración de 12 μ g μ L⁻¹). El blanco se preparó sustituyendo la muestra por agua destilada, mientras que el control positivo sustituyéndola por BHT (hidroxitolueno butilado) a una concentración de 12 μ g μ L⁻¹. Las determinaciones se realizaron mediante una cinética de tiempo midiendo cada 10 min durante 1 h a 50 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado a 450 nm mediante un lector de microplacas (Thermo Lab Systems, Vantaa, Finlandia). En la actividad antioxidante se consideraron tres parámetros. En el primero, se calculó la proporción de degradación con la ecuación 1 (Al-Saikhan, Howard, & Miller, 1995):

$$\text{Proporción de degradación} = \frac{\ln \frac{Abs_{t=0}}{Abs_{t=60}}}{60} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde Abs t = 0 min es la absorbancia al tiempo 0 y Abs t = 60 es la absorbancia al tiempo 60 min.

En el segundo, se calculó el porcentaje de inhibición respecto al blanco con la ecuación 2 (Al-Saikhan *et al.*, 1995):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{DR_{\text{Blanco}} - DR_{\text{Extracto}}}{DR_{\text{Blanco}}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde DR_{Blanco} y DR_{Extracto} fueron las proporciones de decoloración de β -caroteno en la mezcla de reacción sin antioxidante y con extracto de queso, respectivamente.

El tercer parámetro se calculó el coeficiente de actividad antioxidante (CAA) con la ecuación 3 (Mallet, Cerrati, Ucciani, Gamisans, & Gruber, 1994):

$$CAA = \frac{Abs E_{60} - Abs C_{60}}{Abs C_0 - Abs C_{60}} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde $AbsE_{60}$ fue la mezcla antioxidante a los 60 min, $AbsC_{60}$ la absorbancia del control a los 60 min, y $AbsC_0$ la absorbancia del control a los 0 min.

6.3.9. Determinación de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

La determinación se realizó con el método descrito por Wanasundara *et al.* (2002). Previo a la determinación, los extractos se centrifugaron a 5000 g durante 10 min a 4 °C, y se filtraron por papel Whatman 42. A continuación los extractos se llevaron a un pH de 8.3 con NaOH 1 M. A 100 μ L de extracto se le adicionaron 200 μ L de amortiguador de sustrato (ácido bórico 0.1 M, NaCl 0.3 M, HHL 5 mM, pH 8.3) y 100 μ L de ECA-I (2 mU). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 60 min y se detuvo adicionando 300 μ L de HCl 1 M, enseguida se filtró (membrana de nylon 0.2 μ m, Agilent technologies, California, EE. UU.) para inyectarla en un equipo HPLC (Agilent® serie 1260, California, EE. UU.). El 0 % de actividad se midió sustituyendo los 100 μ L de enzima por agua desionizada y el 100 % de actividad sustituyendo el extracto por 100 μ L de amortiguador de borato 0.1 M a pH 8.3. La inhibición de la ECA-I se obtuvo mediante la ecuación 4 reportada por Wanasundara *et al.* (2002)

$$\text{Inhibición de la ECA} - I (\%) = \frac{[AH]_{\text{Control}} - [AH]_{\text{Extracto}}}{[AH]_{\text{Control}}} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde, $[AH]_{Control}$ es la concentración de ácido hipúrico en el control y $[AH]_{Extracto}$ es la concentración de ácido hipúrico en la mezcla de reacción con extracto.

Para determinar la concentración de ácido hipúrico se empleó la técnica de cromatografía de líquidos con una columna de fase reversa. El análisis se llevó a cabo en un equipo HPLC (Agilent® serie 1260, California, EE. UU.) con las siguientes características: Bomba cuaternaria G1311B (Agilent® serie 1260, California, EE. UU.) conectada a una columna de cromatografía de fase reversa, (Jupiter®, 250x4.6mm, 5µm, C18, 300 Å Phenomenex, California, EE. UU.). La absorbancia del eluyente fue medida por un detector de arreglo de diodos G7114A (Agilent® serie 1260, California, EE. UU.). Las condiciones de análisis fueron: volumen de inyección 20 µL, corridas isocráticas de 75 min con una fase móvil de acetonitrilo 12.5 % (v/v) a pH 3 y un flujo de 1 mL min⁻¹; a una presión < 3000 psi y temperatura 25 ± 1°C. Se inyectó una curva de ácido hipúrico en un rango de 0.05-0.5 µmol. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición de la ECA-I.

6.4. Análisis estadístico

En este trabajo se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el cual consideró a los factores queso con dos niveles (A y B), y tiempo con cuatro niveles (0, 30, 95 y 180 días de maduración). Las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa con un $\alpha = 0.05$ (DMS), usando el programa estadístico SAS versión 9.0 (Carolina del Norte, EE. UU.). Para comparar el control positivo de algunas determinaciones contra las muestras se realizó una prueba de contrastes ortogonales.

6.5. Resultados y discusión

6.5.1. Composición proximal de extractos liofilizados de queso añejo de Zacazonapan

El análisis estadístico indicó diferencia significativa en los factores queso, tiempo y la interacción de ambos. Respecto al factor queso difirió la humedad siendo de 1.85 ± 0.29 y $2.85 \pm 0.29 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para el queso A y B, respectivamente. Mientras que la interacción queso-tiempo fue significativa para el contenido de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas (Cuadro 21). Estos componentes cambian debido al proceso de maduración donde se lleva a cabo el metabolismo de la lactosa, lactato y citrato, lipólisis y proteólisis generando compuestos con mayor solubilidad (McSweeney, 2004).

La proteína soluble en los extractos fue inferior a los 180 d de maduración para ambos quesos, esto se relacionó con el incremento del grado de hidrólisis de la matriz de proteína, generándose la ruptura de enlaces peptídicos y con ello, la liberación de péptidos y aminoácidos solubles (Alonzo-Paz, Lugo-Cervantes, Tovar-Pérez, & Chombo-Morales, 2016; Fernández, Singh, & Fox, 1998; Niro *et al.*, 2017; Pappa & Sotirakoglou, 2008). La concentración de lípidos se incrementó a los 180 d, producto del proceso de deshidratación en la elaboración del queso, donde los componentes principales como la proteína y los lípidos se concentran (Fox, 1989). El contenido de cenizas en el extracto es más alto que el reportado por Bernabucci, Catalani, Basiricò, Morera, & Nardone (2014), el cual fue de 13.8 % para queso Parmigiano Reggiano y de 13.6 % para Grana Padano. Estas diferencias pueden asociarse al efecto amortiguador que ejercen las proteínas al momento de ajustar el pH a los extractos acuosos, lo que implica utilizar una mayor cantidad de HCl para llegar al pH requerido y por ende mayor formación de sal.

Cuadro 21. Contenido de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas expresados en g·100 g⁻¹ de extracto liofilizado y significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo de maduración.

Parámetro	Tiempo de maduración (días)	Queso	
		A	B
Proteína	0	29.27±0.48a ^z x ^w	30.53±0.48ax
	30	27.79±0.48abx	24.78±0.48by
	95	28.20±0.48ax	23.54±0.48by
	180	26.31±0.48bx	14.68±0.48cy
Lípidos	0	6.40±0.23by	8.26±0.28bx
	30	8.27±0.28ay	10.20±0.28ax
	95	8.14±0.23ax	8.80±0.23bx
	180	8.66±0.23ay	10.93±0.28ax
Carbohidratos	0	2.46±0.40ay	7.76±0.40ax
	30	0.44±0.40bx	0.59±0.40bx
	95	0.40±0.33bx	0.49±0.40bx
	180	0.54±0.40bx	0.56±0.40bx
Cenizas	0	58.69±0.74bcx	52.99±0.74by
	30	59.78±0.61bx	59.18±0.74ax
	95	57.56±0.74cx	54.88±0.61by
	180	66.04±0.74ax	59.23±0.74ay

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en columna indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

6.5.2. Perfil de aminoácidos en extractos liofilizados

El análisis estadístico de los datos indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de algunos aminoácidos en los factores queso y / o tiempo, mientras que para otros en la interacción de ambos factores. Respecto al factor queso, los aminoácidos con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) fueron Asp/Asn, His y Lys, los cuales no presentaron diferencia por interacción de factores. El mayor contenido de estos aminoácidos se observó en el queso A (Cuadro 22). Mientras que, los aminoácidos que solo presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo fueron Asp/Asn, His, Pro y Lys. El contenido más alto de Asp/Asn se observó a los 30, 95 y 180 d, para His a los 95 d, en Pro a los 30 y 95 d, y en Lys a los 95 y 180 d (Cuadro 23). La concentración de los diversos aminoácidos encontrados en el queso y los diferentes tiempos se puede asociar a la tecnología

de fabricación (tipo de cuajado, adición de proteinasas, cultivos iniciadores, condiciones de maduración), tiempo de maduración y extensión, así como el tipo de proteólisis (Pino, Prados, Galán, Vivo, & Fernández-Salguero, 2009).

Cuadro 22. Contenido de algunos aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado) en los quesos A y B.

Aminoácido	Queso	
	A	B
Ácido aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	$2.21 \pm 0.04 \text{a}^z$	$2.06 \pm 0.04 \text{b}$
Histidina (His)	$2.14 \pm 0.03 \text{a}$	$1.97 \pm 0.03 \text{b}$
Lisina (Lys)	$2.70 \pm 0.06 \text{a}$	$2.49 \pm 0.06 \text{b}$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Cuadro 23. Contenido de algunos aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado) en los diferentes tiempos de maduración de queso añejo de Zacazonapan.

Aminoácido	Tiempo de maduración (d)			
	0	30	95	180
Ácido aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	$1.86 \pm 0.06 \text{b}^z$	$2.15 \pm 0.06 \text{a}$	$2.34 \pm 0.06 \text{a}$	$2.18 \pm 0.06 \text{a}$
Histidina (His)	$1.86 \pm 0.04 \text{c}$	$2.04 \pm 0.04 \text{b}$	$2.27 \pm 0.04 \text{a}$	$2.06 \pm 0.04 \text{b}$
Prolina (Pro)	$2.45 \pm 0.08 \text{b}$	$2.54 \pm 0.08 \text{ab}$	$2.72 \pm 0.08 \text{a}$	$1.97 \pm 0.08 \text{c}$
Lisina (Lys)	$2.16 \pm 0.09 \text{c}$	$2.62 \pm 0.08 \text{b}$	$2.92 \pm 0.09 \text{a}$	$2.69 \pm 0.09 \text{ab}$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

En la interacción queso-tiempo se presentaron aminoácidos esenciales como Val, Leu, Ile, Thr, Met, Phe, Trp y Arg (Cuadro 24). Investigaciones señalan que la mayor concentración de Lys, Pro, Ile y Gly es propio de quesos añejos (Ardö, Thage, & Madsen, 2002), lo cual coincide para Ile y Gly en ambos quesos a los 180 d. La Arg está presente en mayor porcentaje durante los primeros días de maduración, ya que posteriormente las bacterias presentes en el queso la utilizan como fuente de energía, causando su decremento (Ardö, McSweeney, Magboul, Upadhyay, & Fox, 2017).

Cuadro 24. Contenido de aminoácidos (g·100 g⁻¹ de extracto liofilizado) en los quesos A y B con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de factores queso-tiempo.

Aminoácido	Queso	Tiempo de maduración (d)			
		0	30	95	180
Ácido glutámico/Glutamina (Glu/Gln)	A	5.49±0.30b ^z x ^w	6.78±0.30ax	7.06±0.30ax	6.75±0.30ax
	B	6.24±0.30ax	4.40±0.30cy	5.56±0.30aby	4.65±0.30bcy
Serina (Ser)	A	1.45±0.06by	1.52±0.06bx	2.07±0.05ax	2.01±0.06ax
	B	1.69±0.06ax	1.10±0.06cy	1.52±0.06aby	1.35±0.06by
Glicina (Gly)	A	0.55±0.03bx	0.69±0.03bx	0.89±0.04ax	0.84±0.04ax
	B	0.54±0.04acx	0.49±0.03bcy	0.62±0.03ay	0.57±0.04aby
Treonina (Thr)	A	1.1±0.020by	0.94±0.02cx	1.29±0.02ax	1.29±0.02ax
	B	1.24±0.02ax	0.69±0.02dy	0.93±0.02by	0.78±0.02cy
Isoleucina (Ile)	A	1.42±0.08cx	1.82±0.08bx	2.44±0.08ax	2.55±0.08ax
	B	1.53±0.08ax	1.27±0.08by	1.68±0.08ay	1.50±0.08aby
Arginina (Arg)	A	1.03±0.03ax	1.00±0.02ax	0.99±0.03ax	0.86±0.03bx
	B	0.92±0.03ay	0.71±0.03by	0.55±0.02cy	0.41±0.03dy
Alanina (Ala)	A	0.72±0.04cx	0.90±0.05bx	0.97±0.05bx	1.16±0.05ax
	B	0.71±0.05ax	0.52±0.04by	0.67±0.04ay	0.58±0.04aby
Tirosina (Tyr)	A	0.48±0.03ay	0.46±0.02ax	0.48±0.02ax	0.42±0.03ax
	B	0.65±0.03ax	0.29±0.02by	0.29±0.02by	0.18±0.03cy
Valina (Val)	A	1.91±0.06by	1.93±0.06bx	2.78±0.06ax	2.65±0.06ax
	B	2.21±0.06ax	1.32±0.06dy	1.81±0.06by	1.53±0.06cy
Metionina (Met)	A	0.51±0.05bx	0.47±0.05bx	0.86±0.05ax	0.82±0.05ax
	B	0.48±0.05abx	0.38±0.05acx	0.53±0.05ay	0.3±0.05bcy
Cisteína (Cys)	A	0.024±0.002ay	0.024±0.002ax	0.025±0.002ax	0.027±0.002ax
	B	0.041±0.002ax	0.007±0.002cy	0.016±0.002by	0.004±0.002cy
Tryptófano (Trp)	A	0.85±0.022ax	0.78±0.022acx	0.79±0.022abx	0.76±0.022bcx
	B	0.68±0.022by	0.80±0.022ax	0.78±0.022ax	0.77±0.022ax
Leucina (Leu)	A	2.91±0.013cx	3.34±0.013bx	4.18±0.013ax	3.98±0.013ax
	B	3.15a±0.013ax	2.68±0.013bcy	2.80±0.013aby	2.74±0.013acy
Fenilalanina (Phe)	A	1.47±0.06cx	1.69±0.06bx	2.01±0.06ax	1.81±0.06bx
	B	1.65±0.06ax	1.06±0.06cy	1.38±0.06by	1.14±0.06cy

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

6.5.3. Aminoácidos libres en extractos liofilizados

El análisis de varianza indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en los aminoácidos libres totales (AALT) respecto a los factores queso, tiempo y su interacción. En el Cuadro 25 se observa que la tendencia de los AALT fue a incrementar conforme transcurrió el tiempo de maduración, lo cual concuerda con lo reportado en otras investigaciones (Moreira *et al.*, 2018; Niro *et al.*, 2017; Pappa & Sotirakoglou, 2008). El comportamiento de los AALT se debe a que durante la proteólisis, la caseína y los péptidos de masa molecular alta y media son gradualmente degradados por enzimas a péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos (Kondyli, Pappa, & Svarnas, 2016). Así mismo, la liberación de péptidos estará asociada al contenido de la sal en el queso, cuando es alta, hay menos moléculas de agua para interactuar con la parte polar de la proteína y entonces la interacción en la proteína es más fuerte, inhibiendo la liberación de aminoácidos libres (Diana, Rafecas, Arco, & Quílez, 2014). Por otra lado, el patrón de aminoácidos libres es característico de cada queso porque resulta del sistema enzimático que interactúa en la materia prima (leche) y posteriormente en la matriz del queso, así mismo de la interconversión y degradación de aminoácidos (Niro *et al.*, 2017; Pino *et al.*, 2009).

Cuadro 25. Contenido total de aminoácidos libres en los quesos A y B a los 0, 30, 95 y 180 días de maduración expresado en $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de extracto liofilizado.

Queso	Tiempo de maduración (d)			
	0	30	95	180
A	$0.44 \pm 0.44 \text{d}^z \text{x}^w$	$3.49 \pm 0.44 \text{cy}$	$5.55 \pm 0.44 \text{by}$	$7.95 \pm 0.44 \text{ay}$
B	$0.50 \pm 0.44 \text{dx}$	$4.93 \pm 0.44 \text{cx}$	$9.50 \pm 0.44 \text{bx}$	$12.65 \pm 0.44 \text{ax}$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Por otra parte, el análisis estadístico para cada uno de los aminoácidos libres (AAL) indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo y su interacción. El factor queso fue significativo ($p \leq 0.05$) para dos

aminoácidos esenciales Thr y Leu, y dos aminoácidos ácidos Asp/Asn. El queso A presentó la mayor concentración para Asp/Asn y Leu (Cuadro 26).

Cuadro 26. Aminoácidos libres (g·100 g⁻¹ de extracto liofilizado) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor queso.

Aminoácido	Queso	
	A	B
Ácido aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	0.40±0.02a ^z	0.34±0.02b
Treonina (Thr)	0.15±0.005b	0.16±0.005a
Leucina (Leu)	1.20±0.045a	1.04±0.043b

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

En los aminoácidos con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo la tendencia fue a incrementar conforme transcurrió la maduración (Cuadro 27). Contrariamente, Ardö *et al.* (2002) señalaron acumulación de Pro, Lys, Gly y Ile, y un decremento para Leu, Phe, Gln y Asn durante la maduración.

Cuadro 27. Contenido de aminoácidos libres (g·100 g⁻¹ de extracto liofilizado) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo de maduración.

Aminoácido	Tiempo de maduración (d)			
	0	30	95	180
Ácido aspártico (Asp)	0.010±0.020d ^z	0.260±0.020c	0.490±0.020b	0.740±0.020a
Glicina (Gly)	0.006±0.020d	0.080±0.020c	0.190±0.020b	0.340±0.020a
Treonina (Thr)	0.001±0.007d	0.099±0.006c	0.220±0.007b	0.290±0.007a
Tirosina (Tyr)	0.003±0.001b	0.120±0.0014a	0.014±0.001a	0.012±0.020a
Metionina (Met)	0.002±0.006d	0.080±0.007c	0.190±0.006b	0.250±0.006a
Leucina (Leu)	0.070±0.060d	0.960±0.060c	1.560±0.070b	1.900±0.060a
Fenilalanina (Phe)	0.037±0.030c	0.403±0.030b	0.680±0.030a	0.770±0.030a

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

En la interacción de los factores queso-tiempo de maduración se observó una tendencia de la mayoría de aminoácidos a incrementar conforme transcurrió el tiempo de maduración (Cuadro 28), este comportamiento ha sido reportado en quesos Caciocavallo (Niro *et al.*, 2017), Teleme (Pappa & Sotirakoglou, 2008) y Gorgonzola (Moreira *et al.*, 2018).

Los cambios presentados en los aminoácidos como Glu, Asp y Ala son debidos a su papel en actividades de aminotransferasa en la cual el α -cetoglutarato, oxaloacetato y piruvato actúan como aceptores del grupo amino, y la Glu, Asp y Ala son producidos, respectivamente (Ardö *et al.*, 2002). El uso de un solo aminoácido como producto final de la transaminación facilita el metabolismo, y si se usa piruvato u oxaloacetato, comúnmente, Asp y Ala se desaminan después con el uso de α -cetoglutarato y en la producción de Glu (Ardö *et al.*, 2002). Los aminoácidos libres con mayor concentración para el queso A fueron Asp, Ser, Glu, His, Arg, Ala, Pro, Val, Cys, Ile y Lys en el tiempo 180 días. Para el queso B destacaron estos aminoácidos excepto la Cys. La presencia de aminoácidos como Leu, Phe y Val se asociaron a la proteólisis de la caseína α_{s1} , la cual es rica en estos aminoácidos y cuya degradación ocurre durante los primeros días de maduración (Pappa & Sotirakoglou, 2008).

Cuadro 28. Contenido de aminoácidos libres (g·100 g⁻¹ de extracto) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la interacción de factores queso-tiempo.

Aminoácido	Queso	Tiempo de maduración (d)			
		0	30	95	180
Ácido	A	0.027±0.04c ^z x ^w	0.34±0.04ax	0.19±0.04by	0.24±0.04aby
Glutámico (Glu)	B	0.14±0.04dx	0.32±0.031cx	1.11±0.04bx	1.62±0.04ax
Asparagina (Asp)	A	0.002±0.007ax	0.009±0.006ay	0.01±0.007ay	0.01±0.007ay
	B	0.007±0.007cx	0.13±0.007bx	0.22±0.007ax	0.24±0.007ax
Serina (Ser)	A	0.0003±0.007bcx	0.024±0.007ay	0.008±0.007acy	0.018±0.007aby
	B	0.001±0.005dx	0.061±0.007cx	0.25±0.007bx	0.42±0.007ax
Glutamina (Gln)	A	0±0.009ax	0.01±0.01ay	0.003±0.01ay	0.02±0.01ay
	B	0±0.01dx	0.10±0.01cx	0.24±0.01ax	0.17±0.01bx
Histidina (His)	A	0.018±0.02ax	0.05±0.02ay	0.02±0.02ay	0.07±0.02ay
	B	0.02±0.02dx	0.16±0.02cx	0.50±0.02bx	0.62±0.02ax
Arginina (Arg)	A	0±0.003ax	0±0.003ax	0.003±0.003ay	0.009±0.003ay
	B	0.001±0.003cx	0.009±0.003cx	0.03±0.003bx	0.06±0.003ax
Alanina (Ala)	A	0.007±0.02dx	0.13±0.02cx	0.33±0.02bx	0.49±0.02ax
	B	0.01±0.01dx	0.11±0.02cx	0.26±0.01by	0.31±0.01ay
Prolina (Pro)	A	0.12±0.02bx	0.20±0.02ay	0.21±0.02ay	0.15±0.02aby
	B	0.08±0.02cx	0.34±0.02bx	0.82±0.02ax	0.76±0.02ax
Valina (Val)	A	0.020±0.04dx	0.46±0.04cx	0.75±0.04bx	1.15±0.04ax
	B	0.03±0.04dx	0.35±0.03cx	0.74±0.03bx	0.90±0.03ay
Cisteína (Cys)	A	0±0.0003cx	0.003±0.0003bx	0.005±0.0003ax	0.005±0.0003ax
	B	0±0.0003bx	0.003±0.0003ax	0±0.0003by	0±0.0003by

Isoleucina (Ile)	A	0.006±0.04dx	0.17±0.04cx	0.36±0.04by	0.61±0.04ay
	B	0.01±0.04dx	0.22±0.03cx	0.59±0.03bx	0.79±0.03ax
Lisina (Lys)	A	0.0099±0.04bx	0.17±0.04ay	0.23±0.04ay	0.29±0.04ay
	B	0.05±0.04cx	0.53±0.04bx	1.44±0.04ax	1.54±0.04ax

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

6.5.4. Mapa peptídico de extractos liofilizados

El proceso de proteólisis es diferente en cada queso debido al proceso de elaboración, tiempo de maduración, etc., lo cual resulta en un único mapa peptídico característico para cada variedad (Hernández-Galán, Cardador-Martínez, *et al.*, 2017). El mapa peptídico de los extractos del queso añejo de Zacazonapan cambió durante la maduración. La cantidad de los péptidos solubles en agua al inicio del periodo de maduración fue mínimo, pero conforme transcurrió el tiempo de maduración incrementaron (Figura 7).

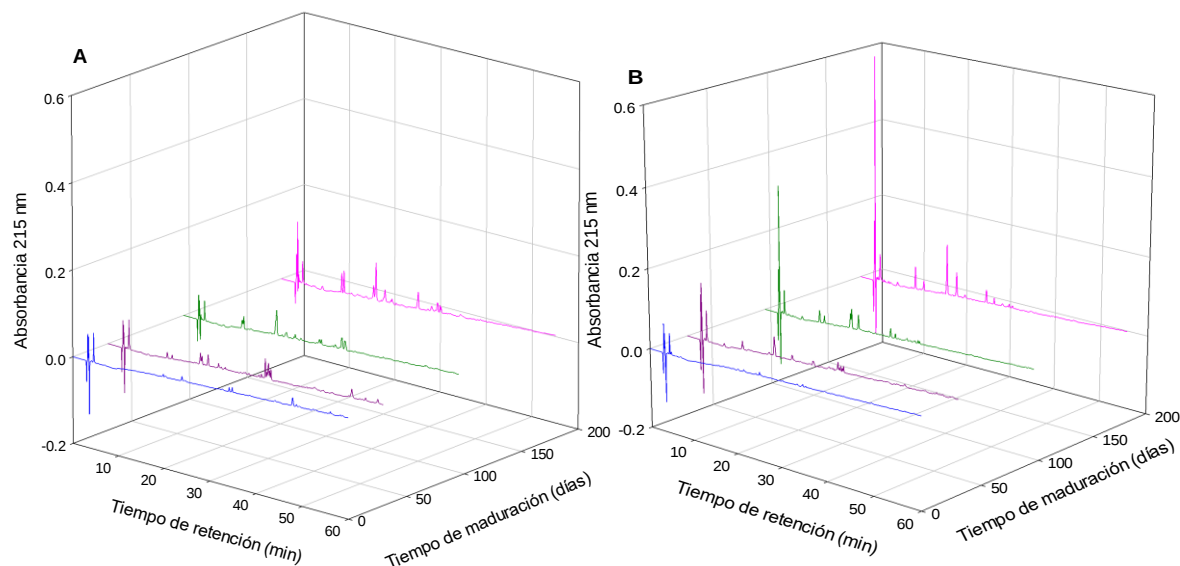


Figura 7. Perfil de elución de extractos de queso añejo de Zacazonapan con diferentes tiempos de maduración, separados por RP-HPLC. (A) Extracto queso A y (B) extracto queso B con 0 (azul), 30 (morado), 95 (verde) y 180 d de maduración (magenta).

El queso A presentó el perfil más complejo, pero el pico más alto respecto a los péptidos lo registró el queso B a los 180 d de maduración. Este incremento se puede asociar a la actividad enzimática de la plasmina, a otras enzimas proteolíticas y a la actividad coagulante residual en el queso que generaron una serie de péptidos de diferente tamaño a partir de las caseínas (α_{S1} , α_{S2} , β y κ) (McSweeney, 2004). En la Figura 7 los picos en estados iniciales de maduración incrementaron o decrecieron de tamaño a lo largo del tiempo (Mallatou, Pappa, & Boumba, 2004) asociado a la degradación y acumulación de péptidos en el queso producto de la maduración (McSweeney, 2004).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Öztürk & Akin (2018) para extractos de quesos turcos Tulum elaborados con leche de vaca y de cabra, ellos señalaron cambios en el contenido peptídico en un periodo de 0 a 120 d de maduración, obteniendo el pico más alto al tiempo máximo de maduración. Así mismo, estos autores señalaron un contenido alto de péptidos hidrofílicos en quesos elaborados con leche de cabra que en los elaborados con leche de vaca.

6.5.5. Perfil de pesos moleculares de péptidos por FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

La elución de cada uno de los extractos generó diferentes perfiles cromatográficos de entre cinco a siete picos. El peso molecular de los picos encontrados para el queso A en los diferentes tiempos de maduración se encontró en un rango de 0.12 – 22.43 kDa y para el queso B entre 0.10 – 15.51 kDa (Figura 8). Conforme transcurrió el tiempo de maduración incrementó la generación de péptidos con menor peso molecular para ambos quesos, lo cual se relacionó con los resultados del mapa peptídico. El tamaño de los péptidos juega un papel importante en la actividad biológica que presenten los péptidos, ya sea actividad antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, etcétera (Pritchard *et al.*, 2010; Timón, Parra, Otte, Broncano, & Petró, 2014; Torres-Llanez *et al.*, 2011).

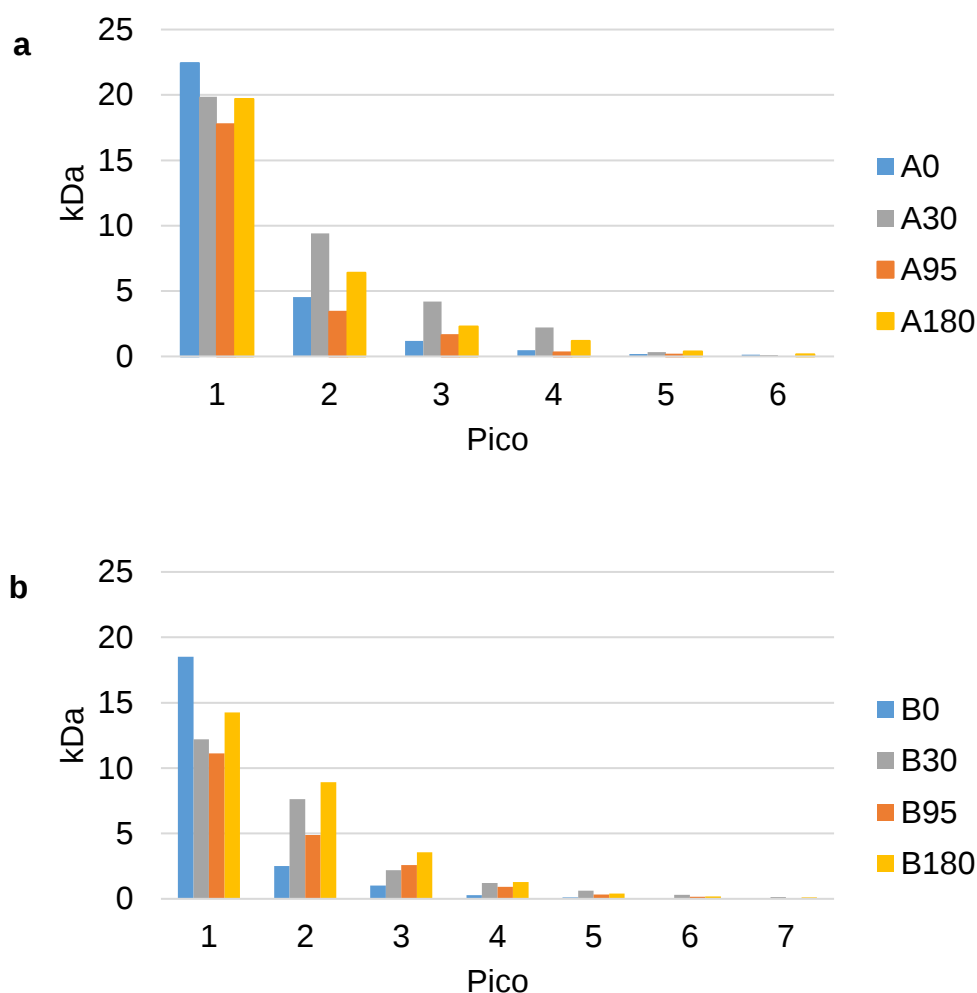


Figura 8. Pesos moleculares en cada uno de los picos encontrados en los quesos A (a) y B (b) durante los diferentes tiempos de maduración 0, 30, 95 y 180 d.

6.5.6. Actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno

Los péptidos con actividad antioxidante son liberados durante la elaboración y maduración del queso (Hernández-Galán *et al.*, 2017) La prueba de contrastes ortogonales indicó una diferencia significativa entre los extractos y el control positivo BHT, donde los extractos presentaron una proporción de degradación superior al control (Figura 9 a). En la Figura 9 b se observa el porcentaje de inhibición de las muestras, las cuales presentaron de 11.36 – 45.30 %, un porcentaje inferior al obtenido en el control (92.39 %). Mientras que, el coeficiente

de actividad antioxidante se encontró entre 71.71 a 34.3, también inferior al BHT (Figura 9 c).

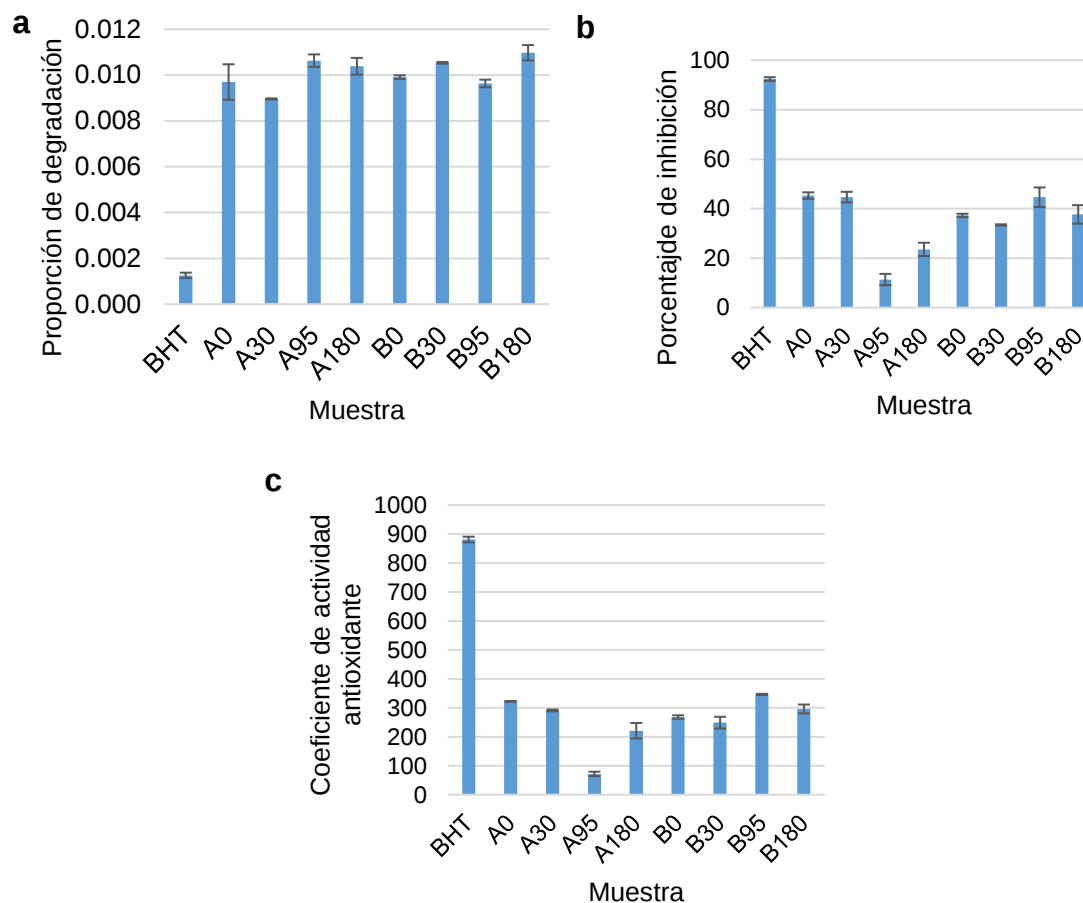


Figura 9. Parámetros asociados a la actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno: proporción de degradación (a), porcentaje de inhibición (b), coeficiente de actividad antioxidante (c).

El análisis de varianza mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo y a la interacción de este con el factor queso, pero no para este último factor. En cuanto a la interacción, la proporción de degradación incrementó después de los 0 días de maduración. El mayor porcentaje de inhibición se observó para el queso A con 0 y 180 d de maduración, y para el queso B solo con 180 d (Cuadro 29). Cabe destacar que estos porcentajes son mayores a los

reportados para especies vegetales como chile campana (14.7 %), zanahoria (24.7 %), cebolla (31.8 %) y por debajo del brócoli (95.8 %) y la papa (68.7 %) (Al-Saikhan *et al.*, 1995). El mayor coeficiente de actividad antioxidante se presentó en los tiempos 0 y 180 d para ambos quesos. Los valores obtenidos a partir de los liofilizados son cercanos a los reportados para extractos de hojas de plantas como *Pelargonium sp.*, *Simmondsia chinensis* y *Thalictrum flavum* en los que se reportaron valores de 395, 290 y 251, respectivamente (Mallet *et al.*, 1994).

Cuadro 29. Proporción de degradación (PD), porcentaje de inhibición (PI) y coeficiente de variación de actividad antioxidante (CAA) significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción de los factores queso-tiempo de maduración.

Parámetro	Queso	Tiempo de maduración (d)			
		0	30	95	180
PD	A	0.01±0.0002b ^z x ^w	0.011±0.0002ax	0.0099±0.0002abx	0.0096±0.0002by
	B	0.009±0.0002bx	0.010±0.0002ax	0.010±0.0002ax	0.011±0.0002ax
PI	A	45.300±1.86ax	11.36±1.86cy	37.270±1.86bx	44.630±1.52ax
	B	44.670±1.52ax	23.53±1.86cx	33.430±1.86bx	37.680±1.86by
CAA	A	322.33±9.58ax	71.71±9.58cy	268.00±9.58bx	346.33±9.58ax
	B	291.08±9.58ay	220.96±9.58bx	248.79±9.58bx	296.09±9.58ay

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c,) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

La actividad antioxidante de los extractos puede relacionarse al contenido de Tyr, Met, Trp y Phe capaces de donar un electrón sin perder ellos mismos su estabilidad, y en el caso de Gly como donante de hidrógeno (Bottesini *et al.*, 2013; Rajapakse, Mendis, Jung, Je, & Kim, 2005). Lee, Jeewanthi, Park, & Paik (2016) relacionaron la actividad antioxidante con los aminoácidos Pro y His, este último dentro la secuencia de los péptidos es capaz de captar especies reactivas de oxígeno y actuar como un quelante de iones metálicos (Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto, & Nokihara, 1998). La Cys debido al grupo SH puede funcionar en la captación de radicales libres (Patterson & Rhoades, 1988).

6.5.7. Actividad antihipertensiva de extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan

El análisis estadístico indicó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en cuanto a los factores queso y tiempo, pero no su interacción. En cuanto al primer factor, el queso B generó una inhibición de la ECA-I de 28.51 ± 1.39 %, mientras que el queso A una de 17.60 ± 1.39 %. Respecto al factor tiempo, el mayor porcentaje de inhibición se observó a los 180 d de maduración (Cuadro 30). En contraste con estos resultados otros investigadores reportan entre un 73.03 a un 100 % en extractos de queso Cotija (Hernández-Galán *et al.*, 2016), queso fresco de leche de cabra (Hernández-Galán, *et al.*, 2017) y de queso fresco de leche de vaca (Torres-Llanez *et al.*, 2011).

Cuadro 30. Porcentaje de inhibición de la ECA-I respecto al factor tiempo.

Tiempo de maduración (días)	Inhibición de la ECA-I (%)
0	$6.470 \pm 1.97c^z$
30	$23.28 \pm 1.97b$
95	$23.20 \pm 1.97b$
180	$39.28 \pm 1.97a$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en columna indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

Dado que los mayores porcentajes de inhibición de la ECA-I se obtuvieron con los extractos de ambos quesos a los 180 d, se procedió a calcular el IC_{50} . El análisis estadístico indicó que no existió diferencia significativa entre los quesos A y B, el IC_{50} fue de 0.42 ± 0.04 mg mL⁻¹ y 0.38 ± 0.02 mg mL⁻¹, respectivamente. Estos resultados en IC_{50} son menores a los encontrados en queso Gouda (13.4 mg mL⁻¹ y 14.8 mg mL⁻¹) (Maruyama, Tanaka, Tomizuka, Suzuki, & Mitachi, 1987); en Gamalost (1 mg mL⁻¹), Brie (1.3 mg mL⁻¹), Port Salut (1.4 mg mL⁻¹) y para queso Kesam (7.7 mg mL⁻¹) (Pripp, Sørensen, Stepaniak, & Sørhaug, 2006). Por lo anterior, los extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan presentaron una actividad potencial inhibidora de la ECA-I. Aunque se han

reportado menores IC₅₀ en queso Parmigiano Reggiano (0.0168 mg mL⁻¹) y Grana Prado (0.010 mg mL⁻¹), respectivamente. Torres-Llana et al. (2011) señalaron en queso fresco mexicano un IC₅₀ entre 0.0052 mg mL⁻¹ a 0.0107 mg mL⁻¹.

6.6. Conclusiones

Los extractos provenientes de los quesos añejos de Zacazonapan (A y B) presentaron diferencias en composición relacionadas con el queso y el tiempo de maduración. En el contenido de aminoácidos destacaron los esenciales como Val, Leu, Ile, Thr, Met, Phe, Trp y Arg, importantes para el ser humano. Por otro lado, durante la maduración incrementaron los aminoácidos libres, producto de la degradación gradual de las caseínas y el trabajo enzimático. Cada queso en diferente tiempo de maduración presentó un perfil de aminoácidos y un mapa peptídico característicos, los cuales pueden ser utilizados para diferenciar a otras variedades de quesos tradicionales mexicanos. Los extractos presentaron actividad antioxidante protegiendo al β-caroteno de la oxidación, así como una actividad antihipertensiva potencial. Este trabajo permitió determinar algunas bioactividades en un queso tradicional, las cuales son de gran interés para los consumidores de alimentos con propiedades nutraceuticas. Además, la información obtenida contribuye a la tipicidad del queso dándole originalidad, especificidad y un rasgo distintivo en el mercado.

6.7. Literatura citada

- Al-Saikhan, M. S., Howard, L. R., & Miller, J. C. (1995). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Different Genotypes of Potato (*Solanum tuberosum*, L.). *Journal of Food Science*, 60(2), 341–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05668.x>
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591(1–2), 181–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613051>
- Alonzo-Paz, A. L., Lugo-Cervantes, E. C., Tovar-Pérez, E. G., & Chombo-Morales, M. P. (2016). Evaluación de la proteólisis del queso Cotija región

de origen MC asociado al tiempo de maduración. In *Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ*.

- Ardö, Y., Thage, B. V., & Madsen, J. S. (2002). Dynamics of free amino acid composition in cheese ripening. *Australina Journal of Dairy Technology*, 57(2), 109–115.
- Ariyoshi, Y. (1993). Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4(5), 139–144. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90033-7)
- Beltrami, L., Zingale, L. C., Carugo, S., & Cicardi, M. (2006). Angiotensin-converting enzyme inhibitor-related angioedema: how to deal with it. *Expert Opin. Drug Saf.*, 5(5), 643–649.
- Bernabucci, U., Catalani, E., Basiricò, L., Morera, P., & Nardone, A. (2014). In vitro ACE-inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses. *International Dairy Journal*, 37(1), 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.02.009>
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., ... Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 953–958. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.821696>
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49–53. <https://doi.org/10.1021/jf970649w>
- Diana, M., Rafecas, M., Arco, C., & Quílez, J. (2014). Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35(2), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.06.007>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (3), 350-356. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fernández, M., Singh, T. K., & Fox, P. F. (1998). Isolation and Identification of Peptides from the Diafiltration Permeate of the Water-Soluble Fraction of Cheddar Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4512–4517. <https://doi.org/10.1021/jf9710950>
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive Peptides in Nutrition and Health Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans. *The*

Journal of Nutrition, 134(4), 980S-988S.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1691>

- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 497–509.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79246-8)
- Hernández-Galán, L., Cardador-martínez, A., López-del-, M., Picque, D., Spinnler, H. E., Martín, S. T., ... Martín, S. T. (2017). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fresh goat cheese prepared without starter culture: a preliminary study. *CyTA - Journal of Food*, 15(1), 49–57. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1202325>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., López-del-Castillo, M., Picque, D., Spinnler, H. E., & Martín del Campo, S. T. (2017). Actividad antioxidante e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en queso fresco de cabra preparado sin cultivos iniciadores: estudio preliminar. *CYTA - Journal of Food*, 15(1), 49–57. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1202325>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H. E., López-del-Castillo Lozano, M., & Martín del Campo, S. T. (2016). ACEI and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85–91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n3p85>
- Hernández-Jabalera, A., Cortés-giraldo, I., Dávila-ortíz, G., Vioque, J., Alaiz, M., Girón-calle, J., ... Jiménez-martínez, C. (2015). Influence of peptides – phenolics interaction on the antioxidant profile of protein hydrolysates from *Brassica napus*, 178, 346–357. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.063>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., & Villegas De Gante, A. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hernández, M. C., Hernández, M. A., Villegas, D. G. A. Z., & Aguirre, M. E. (2011). El proceso socio-técnico de producción de Queso Añejo de Zacazonapan, Estado de México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2(2), 161–176.
- Kirk, S. R., Sawyer, R., & Egan, H. 2002. Composición y análisis de alimentos. CECSA. México. 662 pp.

- Kondyli, E., Pappa, E. C., & Svarnas, C. (2016). Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a white-brined goat milk cheese. *Small Ruminant Research*, 145, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.10.022>
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>
- Lee, N. K., Jeewanthi, R. K. C., Park, E. H., & Paik, H. D. (2016). Short communication: Physicochemical and antioxidant properties of Cheddar-type cheese fortified with *Inula britannica* extract. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 83–88. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9935>
- Lee, S. Y., & Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039>
- López-Expósito, I., Amigo, L., & Recio, I. (2012). A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Science & Technology*, 92, 419–438. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0066-5>
- Mallatou, H., Pappa, E. C., & Boumba, V. A. (2004). Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 14(11), 977–987. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.009>
- Mallet, J. F., Cerrati, C., Ucciani, E., Gamisans, J., & Gruber, M. (1994). Antioxidant activity of plant leaves in relation to their alpha-tocopherol content. *Food Chemistry*, 49(1), 61–65. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90233-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90233-X)
- Marco, G. J. (1968). A Rapid Method for Evaluation of Autoxidation and Antioxidants. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(1), 594–598. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.34.142>
- Maruyama, S., Tanaka, H., Tomizuka, N., Suzuki, H., & Mitachi, H. (1987). Studies on the Active Site and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors Derived from Casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(6), 1581–1586. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.1581>
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal or Dairy Technology*, 57(2/3), 127–140. <https://doi.org/10.4038/agrieast.v10i0.25>
- Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque, J., Santana-Méridas, O., ... Sánchez-Vioque, R. (2015). Determination of the Neurotoxin 3-N-Oxalyl-2,3-Diaminopropionic Acid and Other Free Amino Acids in *Lathyrus cicera* and *L. sativus* Seeds by Reversed-Phase High-

- Performance Liquid Chromatography. *Food Analytical Methods*, 8(8), 1953–1961. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0084-4>
- Moreira, G. M. M., Costa, R. G. B., Teodoro, V. A. M., Paula, J. C. J., Sobral, D., Fernandes, C., ... Gloria, A. (2018). LWT - Food Science and Technology Effect of ripening time on proteolysis , free amino acids , bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 98(September), 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.026>
- Mushtaq, M., Gani, A., Haladay, P., Masoodi, F. A., & Ahmad, M. (2015). LWT - Food Science and Technology Himalayan cheese (Kalari / kradi): Effect of different storage temperatures on its physicochemical , microbiological and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.054>
- Niro, S., Succi, M., Tremonte, P., Sorrentino, E., Coppola, R., Panfilì, G., & Fratianni, A. (2017). Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9521–9531. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13308>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2018). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Pappa, E. C., & Sotirakoglou, K. (2008). Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. *Food Chemistry*, 111(3), 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.027>
- Patterson, C. E., & Rhoades, R. A. (1988). protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. *Experimental Lung Research*, 14, 1005–1019.
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., & Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1908–1918. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1886>
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., Vivo, R., & Fernández-Salguero, J. (2009). Amino acids evolution during ripening of goats' milk cheese manufactured with different coagulants. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(10), 2062–2069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02031.x>
- Pripp, A. H., Sørensen, R., Stepaniak, L., & Sørhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 39(6), 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.03.018>

- Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99(6), 1690–1698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.005>
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.002>
- Rae, S. P., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434–1440. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75013-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2)
- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petrón, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.020>
- Torres-Llanaez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3794–3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
- Venereo, G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, 19(38), 146–164. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=417/41719205006>
- Villegas de Gante, A., Cervantes, E. F., Cesín, V. A., Espinoza, O. A., Hernández, M. A., Santos, M. A., & Martínez, C. A. R. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. Texcoco, Estado de México: Colegio de Postgraduados.
- Wanasundara P. K.J. P. D., Ross, A. R. S., Amarowicz, R., Ambrose, S. J., Pegg, R. B., & Shand, P. J. (2002). Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine

plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6981–6988.
<https://doi.org/10.1021/jf025592e>

- Williams, E. 2016. La sal de tierra. Etnoarqueología de la producción salinera en el Occidente de México. 2da. Ed. Editorial El Colegio de Michoacán. Yamamoto, N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 43(2), 129–134.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296–1302.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.029>

7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRACCIONES MOLECULARES DE EXTRACTOS DE QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN, MÉXICO DURANTE SU MADURACIÓN

7.1. Resumen

La proteólisis durante la maduración de los quesos genera gran variedad de péptidos, algunos con actividad antioxidante, pudiendo ésta incrementar con el fraccionamiento molecular. El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad antioxidante en fracciones de diferente peso molecular provenientes de extractos de queso añejo de Zacazonapan, con diferentes tiempos de maduración. Perfiles de aminoácidos de fracciones peptídicas de quesos añejos de Zacazonapan (F0, F1, F2, F3, F4 y F5) se obtuvieron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP – HPLC). Métodos espectrofotométricos se utilizaron para determinar el contenido de Ca^{2+} libre, actividad quelante de Cu^{2+} , actividad quelante de Fe^{2+} y la captación del radical libre $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Dentro del perfil de aminoácidos fueron significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo y con mayor contenido los aminoácidos His, Thr, Pro, Cys y Trp a los 0 d en ambos quesos; a los 95 días se presentaron Glu/Gln, Ala, Pro y Phe, y a los 180 días fueron Asp/Asn, Glu/Gln, Ser, Val y Lys. El contenido de calcio libre fue mayor a los 0 d en F5 ($1.70 \pm 0.093 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). La mayor actividad quelante de Cu^{2+} se observó en F0 a los 180 d ($23.34 \pm 0.57 \%$). La actividad quelante de Fe^{2+} destacó a los 0 d en F3 ($12.60 \pm 0.66 \%$) y F4 ($12.50 \pm 0.72 \%$). La mayor captación del radical libre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se observó en F0 a los 180 d de maduración ($2.07 \pm 0.03 \text{ mM}$). Estos resultados indicaron que el queso añejo de Zacazonapan es una fuente potencial de péptidos con capacidad antioxidante.

Palabras clave: aminoácidos, maduración, antioxidante, quelante.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verénice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

ANTIOXIDANT CAPACITY OF MOLECULAR FRACTIONS OF ZACAZONAPAN AÑEJO CHEESE EXTRACTS DURING RIPENED

Abstract

Proteolysis during cheese ripening generates a wide variety of peptides, some with antioxidant activity, which may increase with molecular fractionation. The objective of this research was to determine antioxidant capacity in fractions of different molecular weight from extracts of ripening cheese from Zacazonapan, with different ripening times. Amino acid profiles of peptidic fractions of ripening cheeses from Zacazonapan (F0, F1, F2, F3, F4 and F5) were obtained by reversed phase high efficiency liquid chromatography (RP-HPLC). Spectrophotometric methods were used to determine content of free Ca^{2+} , chelating activity of Cu^{2+} , chelating activity of Fe^{2+} and uptake of free radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Within the amino acid profile, amino acids His, Thr, Pro, Cys and Trp were significant ($p \leq 0.05$) for cheese-time interaction and at 0 d in both cheeses; At 95 days, Glu / Gln, Ala, Pro and Phe were presented, and at 180 days they were Asp / Asn, Glu / Gln, Ser, Val and Lys. Free calcium content was greater than 0 d in F5 ($1.70 \pm 0.093 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). The highest Cu^{2+} chelating activity was observed in F0 at 180 d ($23.34 \pm 0.57 \%$). Fe^{2+} chelating activity stood out at 0 d in F3 ($12.60 \pm 0.66 \%$) and F4 ($12.50 \pm 0.72 \%$). The highest uptake of the free radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ was observed in F0 at 180 d of ripening ($2.07 \pm 0.03 \text{ mM}$). These results indicated that Zacazonapan ripened cheese is a potential source of peptides with antioxidant capacity.

Keywords: amino acids, ripening, antioxidant, chelator.

Thesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Verenice Torres Salas

Advisor: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

7.2. Introducción

La formación de una gran variedad de péptidos ocurre durante la maduración del queso, producto de la proteólisis donde se lleva a cabo la descomposición de la α_{s1} -caseína, β -caseína y la para- κ -caseína en polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres (Sieber *et al.*, 2010). Dentro de estos péptidos se encuentran aquellos que ejercen alguna actividad reguladora en el organismo humano, independientemente de su aporte nutricional (Korhonen, 2009; Murray & Fitzgerald, 2007). Estos biopéptidos reportados en quesos tienen actividad antiinflamatoria, anticancerígena (Rafiq *et al.*, 2018), antihipertensiva, inmunomoduladora, antimicrobiana y antioxidante (Kwak, Ganesan, & Hong, 2011). Los péptidos con propiedades antioxidantes presentes en los alimentos son importantes porque mantienen los sistemas de defensa antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión-s-transferasa), y con ello captan a los radicales libres y las especies de oxígeno activo, que inducen daños oxidativos a las biomoléculas y causan envejecimiento, cáncer, enfermedades del corazón, derrame cerebrovascular y arteriosclerosis (Silva *et al.*, 2012). Así mismo, los antioxidantes protegen a los alimentos de la oxidación lipídica (Zhang *et al.*, 2011). Algunos trabajos señalan que la actividad antioxidante incrementa con el fraccionamiento molecular (Tarango-Hernández, Alarcón-Rojó, Robles-Sánchez, Gutiérrez-Méndez, & Rodríguez-Figueroa, 2015). Las proteínas juegan un papel importante en la actividad antioxidante dado que la función biológica específica no es almacenar o transportar metales, sino captar metales debido a la presencia de residuos de aminoácidos como His, Glu, Asp, Ser y Thr (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). La actividad quelante se da tanto en proteínas como en péptidos, en estos últimos son importantes los que poseen actividad quelante de Fe^{2+} y Cu^{2+} y que contienen aminoácidos ácidos y básicos por sus grupos amino y carboxilo en las ramificaciones (Saiga, Tanabe, & Nishimura, 2003). La quelación de metales puede involucrar aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, y gran cantidad de His (Megías *et al.*, 2007).

El queso añejo de Zacazonapan es un producto genuino artesanal mexicano que se caracteriza por su forma prismática rectangular cubierto de una pasta de chile guajillo y elaborado a partir de leche cruda de vacas en libre pastoreo (Hernández, Hernández, Villegas, & Aguirre, 2011). El queso puede ser consumido fresco y añejo desde 20 días hasta un año de maduración. En este queso se carece de información sobre los cambios en las características funcionales (liberación de péptidos con capacidad antioxidante) durante su maduración. Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad antioxidante en fracciones de diferente peso molecular de extractos solubles en agua de queso añejo de Zacazonapan durante su maduración.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1. Reactivos analíticos

Los reactivos analíticos D-L- α -ácido amino butírico, dietil etoximetilenmalonato, arsenazo III (ácido 2,2'-1,8-dihidroxi-3,6-disulfonaftileno-2,7-bisazo bisbenceno), imidazol pirocatecol violeta, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ferrocianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), sal de diamonio 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), trolox (ácido ($\pm$)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), hidroxitolueno butilado (BHT), cloruro de calcio ($CaCl_2$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), ferroxina ($C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$), etanol (C_2H_5OH), borato de sodio ($Na_2B_4O_7$), azida de sodio (NaN_3), acetonitrilo (grado HPLC), hidróxido de sodio ($NaOH$) correspondieron a la marca Sigma-Aldrich (Minessota, EE. UU.). Los reactivos cloruro de hierro (III) hexahidratado, ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), cloruro de hierro II ($FeCl_2$) correspondieron a la marca Honeywell FlukaTM (Seelze, Alemania). Los reactivos ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$), acetato de sodio ($NaC_2H_3O_2$), fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4), fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), ácido clorhídrico (HCl) correspondieron a la marca Merck (Darmstadt, Alemania). Los reactivos grado analítico hidróxido de sodio ($NaOH$), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), acetato de sodio trihidratado ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$) y ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$) correspondieron

a la marca Merck© (Darmstadt, Alemania). El ácido bórico (H_3BO_3) correspondió a la marca Meyer® (Ciudad de México, México). Cada uno de los reactivos se utilizó sin realizarles una purificación adicional.

7.3.2. Obtención de la muestra de queso añejo de Zacazonapan

Las piezas de queso se obtuvieron en dos queserías de Zacazonapan, Estado de México, México (codificadas como A y B). La quesería A fue seleccionada por su proceso de elaboración tradicional, y la quesería B por el grado de estandarización durante su proceso tradicional. En cada quesería se elaboraron piezas de un kilogramo, las cuales se obtuvieron de un lote de leche cruda de bovino que se cuajó en la misma tina y cada pieza se consideró una unidad experimental. Cada lote se elaboró en días consecutivos para obtener tres repeticiones independientes. Los quesos se trasladaron al Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo y se conservaron a 15 °C y una humedad relativa de 85 %. Se colectaron y analizaron seis piezas de queso (tres para A y tres para B) a los 0, 30, 95 y 180 días de maduración.

7.3.3. Extracción de compuestos solubles en agua

La extracción de los compuestos solubles se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rae, Phillips, & Kailasapathy (2010), con modificaciones respecto a la homogenización, tiempo de centrifugación y ajuste de pH. 250 g de queso se pesaron y se homogeneizaron con 750 mL de agua destilada durante 5 min en una licuadora (Osterizer, Wisconsin, EE. UU.). Después, la mezcla se agitó a 150 rpm durante 1 h a 40 °C en una incubadora orbital (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). El pH de la mezcla se llevó a 4.5 utilizando NaOH y HCl 1 M. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 8801 g por 10 min a 4 °C y se descartó tanto la capa superior de grasa como el sedimento. El extracto acuoso, se filtró a gravedad por medio de una capa de algodón, y enseguida bajo condiciones de vacío utilizando papel Whatman No. 42. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C.

7.3.4. Liofilización de los extractos solubles

Los extractos congelados se colocaron en nitrógeno líquido por 10 min y se liofilizaron durante tres días en un equipo FreeZone 2.5 (Labconco Corporation, Kansas, EE. UU.) a una presión de 0.015 mbar y temperatura de -50 °C.

7.3.5. Obtención de fracciones peptídicas en función del peso molecular

La obtención de fracciones peptídicas se realizó hidratando el extracto liofilizado (1 mg de proteína por mL de agua destilada). Esta disolución se ultra-filtró usando un dispositivo AMICON ULTRA a través de membranas con tamaños de poro de 10 kDa, 3 kDa, 1 kDa y 200 Da (Centriprep, Amicon Inc, Massachusetts, EE. UU.). Cada fracción se mantuvo a -20 °C. Las fracciones se codificaron como sigue: *F0* (muestra sin fraccionar), *F1* >10 kDa, 10 kDa > *F2* > 3 kDa, 3 kDa > *F3* > 1 kDa, 1 kDa > *F4* > 200 Da y *F5* < 200 Da.

7.3.6. Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas

El método para la determinación de aminoácidos en los liofilizados se realizó con el método descrito por Alaiz, Navarro, Girón, & Vioque (1992). Primero, 5 - 500 µL de cada fracción se mezcló con 8 µL D, L- α -ácido aminobutírico 6.2 mM como estándar interno y 1 mL de HCl 3 o 6 N. Las mezclas se incubaron a 110 °C durante 20 horas (Horno EC33, Ríos Rocha S. A., Ciudad de México, México) para llevar a cabo una hidrólisis ácida. Después la disolución se llevó a sequedad con nitrógeno, en un baño maría a 80 °C (P. Selecta®, UNIVEA, Barcelona, España), para eliminar el HCl_(g). Enseguida se derivatizó el residuo sólido mezclándolo con 300 – 1000 µL de amortiguador borato de sodio 1 M a pH 9, y se adicionó 1 µL de dietil etoximetilenmalonato (pureza $\geq$ 98 %). Posteriormente las disoluciones se incubaron a 50 °C durante 50 min, enseguida las disoluciones se centrifugaron a 829 x g durante 4 min. Al final cada muestra se inyectó en un HPLC (Beckman-Coulter, California, EE. UU.) integrado por un inyector tipo válvula de reodine con loop de 20 µL, con una bomba cuaternaria modelo 126 conectada a una columna de fase reversa Nova-Pack C18 (300 x 3.9 mm, 4 mm;

Waters, EE. UU.), la cual se mantuvo a una temperatura de 18 °C. La absorbancia del eluyente se midió por un detector UV/Vis modelo 166 (Beckman-Coulter, California, EE. UU.). Las condiciones de análisis fueron: flujo de 0.9 mL·min⁻¹ y una corrida en gradiente utilizando una disolución A (25 mM de acetato de sodio y 0.02 % de azida de sodio a pH 6) y una disolución B (acetonitrilo). Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 0 - 3 minutos, un gradiente lineal partiendo de A - B (91:9) a hasta A - B (86:14); 3 - 13 minutos elución con A - B (86:14); de 13 - 30 minutos gradiente lineal de A - B (86:14) hasta A - B (69:31); 30 - 35 minutos elución con A - B (69:31).

La determinación del triptófano se llevó a cabo como lo describe Yust *et al.* (2004) con modificaciones, ya que se incrementó en 10 °C la temperatura de incubación y se anexó un proceso de centrifugación. 5 - 500 µL de la fracción correspondiente se mezclaron con 3 mL de NaOH 4 N, la mezcla se incubó durante 4 horas a 100 °C (Horno EC33, Ríos Rocha S. A., Ciudad de México, México). Enseguida las muestras se centrifugaron a 829 g por cuatro min (5415R Eppendorff, Hamburgo, Alemania). En un equipo de HPLC cuyas características se describieron anteriormente se inyectaron 20 µL del hidrolizado correspondiente. La única variante respecto a la metodología anterior fue el uso de un flujo isocrático binario con una disolución A (acetato de sodio 25 mM, azida de sodio 0.02 % a pH 6) y una B (acetonitrilo) en una relación 91:9 con un flujo de 0.9 mL·min⁻¹. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 280 nm y los resultados se reportaron en g·100 g⁻¹ de proteína. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó con el software 32 Karat 7.0 (Beckman-Coulter, California, EE. UU.).

7.3.7. Determinación del contenido de calcio libre

El contenido de calcio libre se determinó por el método descrito por Michaylova & Ilkova (1971). En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 2 µL de la fracción (1 mg·mL⁻¹ de proteína) y 200 µL de arsenazo III 0.001 M, la mezcla se dejó reposar 5 min. El blanco se preparó sustituyendo la fracción por agua destilada y

se sometió a las mismas condiciones de ensayo. La absorbancia se midió por triplicado a 650 nm en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, Massachusetts, EE. UU.).

7.3.8. Determinación de la actividad quelante de Cobre (II)

La actividad quelante de Cu^{2+} se determinó con el método descrito por Saiga *et al.* (2003), con modificaciones al utilizarse un procedimiento escalado en microplaca, y el uso de amortiguador de acetato en lugar de piridina. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 5 μL de la fracción correspondiente (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína), más 290 μL de amortiguador acetato de sodio a pH 6, más 10 μL de CuSO_4 12.5 mM y la mezcla se dejó reposar durante 5 min. Enseguida se adicionaron 6 μL de pirocatecol violeta 20 mM y se dejó reposar durante 5 min, la absorbancia se midió por triplicado a una longitud de onda de 632 nm en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, Massachusetts, EE. UU.). El blanco se preparó mediante la sustitución de la fracción y del CuSO_4 por agua destilada, mientras que en el control se sustituyó solo la fracción por agua destilada, y en el control positivo por EDTA (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El porcentaje de quelación se calculó con la ecuación 5:

$$\text{Quelación de } \text{Cu}^{2+} (\%) = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{632\text{Muestra}}}{\text{Abs}_{632\text{Control}}} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

Donde $\text{Abs}_{632\text{Muestra}}$ es la absorbancia de la muestra a 632 nm y $\text{Abs}_{632\text{Control}}$ es la absorbancia del control a 632 nm.

7.3.9. Determinación de la actividad quelante de Fe (II)

La actividad quelante de Fe^{2+} se llevó a cabo como describe Carter (1971). En una microplaca se colocaron en cada pocillo 10 μL de la fracción correspondiente (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína), 250 μL de amortiguador de acetato de sodio 100 mM a pH 4.9 y 30 μL de FeCl_2 1.6 mM, la mezcla se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), enseguida se adicionaron 12.5 μL de ferrozina 40 mM y se dejó reposar 5 minutos. Las determinaciones se realizaron por triplicado a 562

nm en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, Massachusetts, EE. UU.). El blanco se preparó sustituyendo la fracción y el FeCl_2 por agua destilada, para el control se sustituyó la fracción de muestra por agua destilada, y para el control positivo sustituyendo la fracción por EDTA ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). El porcentaje de quelación de Fe^{2+} se calculó con la ecuación 6:

$$\text{Quelación de } \text{Fe}^{2+} (\%) = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{562\text{Muestra}}}{\text{Abs}_{562\text{Control}}} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde $\text{Abs}_{562\text{Muestra}}$ es la absorbancia de la muestra a 562 nm y $\text{Abs}_{562\text{Control}}$ es la absorbancia del control a 562 nm.

7.3.10. Determinación de la actividad antioxidante por captación del radical libre ABTS^{•+}

La determinación se realizó con el método de microdiluciones en placa descrito por Re *et al.* (1999). Las determinaciones se realizaron por triplicado y una curva estándar de Trolox en un rango de concentración 0.0199 a 3.99 mM se utilizó para expresar la actividad antioxidante en mM equivalentes de Trolox (TE).

7.4. Análisis estadístico

En este trabajo se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial considerando tres factores que fueron queso (dos niveles: A y B), tiempo (cuatro niveles: 0, 30, 95 y 180 días de maduración) y fracción (seis niveles: F0, F1, F2, F3, F4 y F5). La comparación de medias se realizó por diferencia mínima significativa (DMS, $\alpha = 0.05$), usando el programa estadístico SAS versión 9.0 (Carolina del Norte, EE. UU.). Así mismo se realizó una prueba de comparación de medias por contrastes ortogonales para comparar el control positivo correspondiente con las diferentes muestras.

7.5. Resultados y discusión

7.5.1. Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas

El análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo y fracción, además de sus interacciones queso-tiempo, queso-fracción y tiempo-fracción. En los aminoácidos Asn/Asp, His y Lys solo se tuvo diferencia estadística respecto al factor queso (Cuadro 31). El queso A presentó la mayor concentración de estos aminoácidos.

Cuadro 31. Contenido de aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el factor queso en las muestras de queso añejo de Zacazonapan sin fraccionar.

Aminoácido	Queso	
	A	B
Ácido aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	2.21±0.040a ^z	2.06±0.04b
Histidina (His)	2.14±0.030a	1.97±0.03b
Lisina (Lys)	2.70±0.061a	2.49±0.063b

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

El factor tiempo en la muestra sin fraccionar solo fue significativo ($p \leq 0.05$) para los aminoácidos Asp, His, Pro y Lys, destacando el mayor contenido para el primer aminoácido en los tiempos 30, 95 y 180 d, mientras que para His solo a los 95 d, para Pro en los 30 y 95 d, y finalmente para Lys a los 95 y 180 d (Cuadro 32). El incremento en Lys y Pro puede asociarse a que son productos biosintéticos del metabolismo del Glu y la Arg.

Respecto a la interacción queso-tiempo en la muestra sin fraccionar destacan los aminoácidos esenciales Ile, Thr, Val, Leu, Arg, Met y Trp, además de aminoácidos hidrófobos como Gly, Ile, Ala, Val, Met, Trp, Leu y Phe (Cuadro 33). La tendencia de la mayoría de los aminoácidos en esta interacción y para el queso A fue a incrementar. Por ejemplo, la mayor concentración de Glu se puede asociar a su función como intermediario en el metabolismo de aminoácidos por bacterias ácido lácticas (BAL) (Fernández & Zúñiga, 2006). En el queso B un decremento en Ser, Thr y Val se puede relacionar con su función como

precursores en la generación de ácidos grasos como acético y propiónico (Ganesan & Weimer, 2017). La Ser también es precursor en la biosíntesis de Cys y Met (Fernández & Zúñiga, 2006; McSweeney, 2004).

Cuadro 32. Contenido de aminoácidos (g·100 g⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el factor tiempo de las muestras de queso añejo de Zacazonapan sin fraccionar.

Aminoácido	Tiempo de maduración (días)			
	0	30	95	180
Ácido aspártico (Asp)	1.86±0.06b ^z	2.15±0.06a	2.34±0.06a	2.18±0.06a
Histidina (His)	1.86±0.04c	2.04±0.04b	2.27±0.04a	2.06±0.04b
Prolina (Pro)	2.45±0.08b	2.54±0.08ab	2.72±0.08a	1.97±0.08c
Lisina (Lys)	2.16±0.09c	2.62±0.08b	2.92±0.09a	2.69±0.09ab

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

Cuadro 33. Contenido de aminoácidos (g·100 g⁻¹ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para la interacción de los factores queso-tiempo en quesos añejos de Zacazonapan sin fraccionar.

Aminoácido	Queso	Tiempo de maduración (días)			
		0	30	95	180
Ácido glutámico/Glutamina (Glu/Gln)	A	5.49±0.30b ^z _w	6.78±0.30ax	7.06±0.30ax	6.75±0.30ax
	B	6.24±0.30ax	4.40±0.30cy	5.56±0.30aby	4.65±0.30bcy
Serina (Ser)	A	1.45±0.06by	1.52±0.06bx	2.07±0.05ax	2.01±0.06ax
	B	1.69±0.06ax	1.10±0.06cy	1.52±0.06aby	1.35±0.06by
Glicina (Gly)	A	0.55±0.03bx	0.69±0.03bx	0.89±0.04ax	0.84±0.04ax
	B	0.54±0.04acx	0.49±0.03bcy	0.62±0.03ay	0.57±0.04aby
Treonina (Thr)	A	1.1±0.020by	0.94±0.02cx	1.29±0.02ax	1.29±0.02ax
	B	1.24±0.02ax	0.69±0.02dy	0.93±0.02by	0.78±0.02cy
Isoleucina (Ile)	A	1.42±0.08cx	1.82±0.08bx	2.44±0.08ax	2.55±0.08ax
	B	1.53±0.08ax	1.27±0.08by	1.68±0.08ay	1.50±0.08aby
Arginina (Arg)	A	1.03±0.03ax	1.00±0.02ax	0.99±0.03ax	0.86±0.03bx
	B	0.92±0.03ay	0.71±0.03by	0.55±0.02cy	0.41±0.03dy
Alanina (Ala)	A	0.72±0.04cx	0.90±0.05bx	0.97±0.05bx	1.16±0.05ax
	B	0.71±0.05ax	0.52±0.04by	0.67±0.04ay	0.58±0.04aby
Tirosina (Tyr)	A	0.48±0.03ay	0.46±0.02ax	0.48±0.02ax	0.42±0.03ax
	B	0.65±0.03ax	0.29±0.02by	0.29±0.02by	0.18±0.03cy
Valina (Val)	A	1.91±0.06by	1.93±0.06bx	2.78±0.06ax	2.65±0.06ax
	B	2.21±0.06ax	1.32±0.06dy	1.81±0.06by	1.53±0.06cy
Metionina (Met)	A	0.51±0.05bx	0.47±0.05bx	0.86±0.05ax	0.82±0.05ax
	B	0.48±0.05abx	0.38±0.05acx	0.53±0.05ay	0.3±0.05bcy
Cisteína (Cys)	A	0.02±0.002ay	0.02±0.002ax	0.02±0.002ax	0.03±0.002ax
	B	0.04±0.002ax	0.01±0.002cy	0.02±0.002by	0.004±0.002cy
Tryptófano (Trp))	A	0.85±0.022ax	0.78±0.02acx	0.79±0.02abx	0.76±0.02bcx
	B	0.68±0.022by	0.80±0.022ax	0.78±0.022ax	0.77±0.022ax
Leucina (Leu)	A	2.91±0.013cx	3.34±0.013bx	4.18±0.013ax	3.98±0.013ax

Fenilalanina (Phe)	B	3.15±0.013ax	2.68±0.01bcy	2.80±0.01aby	2.74±0.01acy
	A	1.47±0.06cx	1.69±0.06bx	2.01±0.06ax	1.81±0.06bx
	B	1.65±0.06ax	1.06±0.06cy	1.38±0.06by	1.14±0.06cy

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

En la interacción queso-tiempo de las muestras fraccionadas ambos quesos presentaron un decremento en His, Arg, Pro, Cys y Trp (Cuadro 34). La His y Arg son degradadas por BAL para la obtención de energía metabólica y regulación del pH (Molenaar, Bosscher, Brink, Driessen, & Konings, 1993). Mientras que, la Pro puede ser usada como fuente de energía (Ganesan & Weimer, 2017). Por otra parte, la Cys es degradada por BAL a amoníaco, sulfuro de hidrógeno y piruvato, o utilizada en la síntesis de Met (Fernández & Zúñiga, 2006). A partir del Trp se puede obtener indol piruvato y/o generarse triptamina, (Bruinenberg, De Roo, & Limsowtin, 1997; Fernández & Zúñiga, 2006). En la mayoría de las interacciones de factores los aminoácidos más abundantes fueron Glu/Gln y Leu, caso contrario el de Cys y Met. El contenido de Cys y Met en las caseínas es mínimo (Ganesan & Weimer, 2017).

Cuadro 34. Contenido de aminoácidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) considerando la interacción de los factores queso-tiempo en fracciones de queso añejo de Zacazonapan.

Aminoácido	Queso	Tiempo de maduración (días)		
		0	95	180
Ácido Aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	A	7.57±0.17b ^z x ^w	7.57±0.17by	9.07±0.17ax
	B	6.80±0.17cy	8.07±0.17bx	8.77±0.17ax
Ácido glutámico/Glutamina (Glu/Gln)	A	17.41±0.30by	18.31±0.28ay	16.10±0.31cy
	B	19.31±0.29bx	20.28±0.30ax	20.74±0.31ax
Serina (Ser)	A	6.68±0.22bx	6.29±0.22bx	8.02±0.22ax
	B	5.45±0.21cx	6.09±0.21bx	6.88±0.22ay
Histidina (His)	A	5.44±0.19ay	2.95±0.17cy	3.80±0.20by
	B	7.17±0.20ax	3.54±0.19cx	5.71±0.19bx
Glicina (Gly)	A	3.87±0.18bx	4.16±0.16abx	4.37±0.16ax
	B	2.82±0.17by	3.84±0.17ax	2.90±0.16by
Treonina (Thr)	A	3.85±0.11ax	3.24±0.10bx	3.72±0.10ax
	B	3.40±0.11ay	3.20±0.10abx	2.93±0.10by

Arginina (Arg)	A	3.87±0.08ax	2.51±0.08bx	2.20±0.08cx
	B	3.58±0.08ay	1.83±0.07by	1.86±0.08by
Alanina (Ala)	A	3.63±0.14ax	3.80±0.16ay	3.76±0.15ax
	B	3.05±0.14by	5.55±0.13ax	2.42±0.15cy
Prolina (Pro)	A	4.34±0.28ay	3.87±0.27aby	3.09±0.28bx
	B	6.08±0.28ax	5.45±0.28ax	2.02±0.28by
Valina (Val)	A	6.92±0.13cx	8.14±0.13bx	8.83±0.14ax
	B	6.23±0.14ay	6.59±0.13ay	6.58±0.14ay
Cisteína (Cys)	A	0.11±0.01ay	0.043±0.01by	0.017±0.01bx
	B	0.22±0.01ax	0.12±0.01bx	0.034±0.01cx
Triptófano Trp)	A	2.76±0.20ay	2.35±0.20abx	2.09±0.21by
	B	3.37±0.21ax	1.48±0.21cy	2.74±0.21bx
Leucina (Leu)	A	10.81±0.23by	12.71±0.22ax	12.43±0.23ax
	B	11.69±0.23ax	10.55±0.23by	10.47±0.24by
Lisina (Lys)	A	7.22±0.18ay	7.31±0.19ay	6.76±0.21ay
	B	8.15±0.20cx	10.68±0.20bx	11.78±0.21ax
Fenilalanina (Phe)	A	5.34±0.10bx	5.86±0.10ax	5.91±0.10ax
	B	5.20±0.10ax	4.96±0.10aby	4.87±0.10by

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

En la interacción queso-fracción de las muestras fraccionadas destacaron aminoácidos esenciales como His, Thr, Val, Ile, Trp, Leu, Lys y Phe. Además, ambos quesos presentaron aminoácidos hidrofóbicos, en F1 el mayor contenido fue de Ile y Trp, este último también en F4, en F2 la mayor concentración fue de Pro, en F3 destaca Gly, y en F5 se tuvo para Val, Leu, Phe y Trp (Cuadro 35).

Respecto a la interacción tiempo-fracción fue significativo ($p \leq 0.05$) para el contenido de aminoácidos esenciales como His, Thr, Ile, Trp, Val, Leu, Lys, Phe, Arg y Met. En el caso de los aminoácidos hidrofóbicos la interacción fue significativa ($p \leq 0.05$) para Gly, Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe (Cuadro 36).

Los aminoácidos como Glu, Val, Met, Leu, Ile e His presentaron cambios, debido a que son utilizados por las BAL para la generación de ATP, regulación de pH, mantenimiento de potencial redox, y balance de requerimientos nutricionales. Los aminoácidos son precursores en la generación de compuestos importantes en el flavour (aroma-sabor) del queso como ácidos, aldehídos, alcoholes, ésteres y otros (Fernández & Zúñiga, 2006; Yvon, Mireille, & Rijnen, 2001).

Cuadro 35. Contenido de aminoácidos (g·100 g⁻¹ de proteína) con diferencia significativa (p ≤0.05) considerando la interacción de los factores queso-fracción en las muestras fraccionadas de quesos añejos de Zacazonapan.

Aminoácido	Queso	Fracción				
		F1	F2	F3	F4	F5
Ácido aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	A	7.33±0.22bc ^z y ^w	7.91±0.20bx	8.80±0.22ax	9.16±0.21ax	7.16±0.22cx
	B	8.20±0.21bx	7.81±0.21bx	8.71±0.22ax	7.68±0.21by	7.01±0.22cx
Ácido glutámico/Glutamina (Glu/Gln)	A	21.58±0.38ay	19.80±0.38bx	15.03±0.41dy	17.95±0.36cy	12.028±0.41ey
	B	24.11±0.38ax	20.61±0.41cx	19.55±0.38cx	22.33±0.41bx	13.95±0.38dx
Serina (Ser)	A	7.88±0.27bx	8.08±0.30bx	9.86±0.28ax	5.32±0.27cx	3.84±0.30dy
	B	8.12±0.27ax	6.71±0.27by	6.36±0.30by	4.68±0.27cx	4.85±0.27cx
Histidina (His)	A	3.60±0.26cdx	3.80±0.24cy	2.97±0.24dy	5.42±0.26ay	4.52±0.24by
	B	4.17±0.22dx	4.55±0.24dx	5.39±0.26cx	7.02±0.27ax	6.23±0.26bx
Glicina (Gly)	A	2.80±0.22dx	3.87±0.23cx	6.23±0.22ax	2.77±0.20dx	5.01±0.22bx
	B	2.81±0.20cx	3.23±0.23bcx	4.39±0.23ay	1.87±0.20dy	3.64±0.22by
Treonina (Thr)	A	4.00±0.13ax	3.61±0.13bx	4.13±0.14ax	3.41±0.13bx	2.85±0.14cx
	B	4.26±0.14ax	3.92±0.14ax	3.39±0.14by	2.11±0.14cy	2.20±0.13cy
Prolina (Pro)	A	2.95±0.37bx	5.10±0.37ay	1.28±0.34cx	3.41±0.37bx	6.09±0.37ax
	B	2.97±0.37cx	8.25±0.37ax	1.81±0.37dx	4.26±0.37bx	5.29±0.37by
Valina (Val)	A	6.55±0.17cx	6.77±0.16cx	8.00±0.17bx	8.47±0.17bx	10.02±0.19ax
	B	6.62±0.16ax	6.43±0.19abx	6.53±0.20ay	5.94±0.17by	6.82±0.19ay
Cisteína (Cys)	A	0.12±0.01dx	0.08±0.01ax	0.06±0.01abx	0.02±0.01cx	0.02±0.01bcy
	B	0.14±0.01bx	0.11±0.01bx	0.05±0.01cx	0.04±0.01cx	0.28±0.01ax
Isoleucina (Ile)	A	6.79±0.12ax	6.15±0.12bx	6.04±0.12bx	7.01±0.12ax	5.46±0.12cx
	B	6.68±0.12ax	6.01±0.12by	5.82±0.12bx	5.91±0.12by	5.13±0.12cx
Triptófano (Trp)	A	2.77±0.25ax	2.81±0.27ax	0.94±0.25by	2.62±0.27ax	2.87±0.27ax
	B	2.55±0.27adx	2.04±0.27bcdy	2.61±0.27abx	2.58±0.27acx	2.88±0.27ax
Leucina (Leu)	A	8.16±0.29dx	9.92±0.27cx	12.22±0.31bx	11.73±0.29bx	17.89±0.31ax
	B	8.75±0.29cx	9.41±0.29cy	11.22±0.31by	10.92±0.31bx	14.21±0.31ay
Lisina (Lys)	A	8.44±0.25ax	7.44±0.25by	6.23±0.23cy	8.59±0.27ay	4.79±0.25dy
	B	8.60±0.23cx	9.10±0.25cx	9.87±0.28bx	14.12±0.25ax	9.31±0.28bcx
Fenilalanina (Phe)	A	4.25±0.12dx	4.51±0.13dx	6.24±0.14bx	5.37±0.12cx	8.15±0.13ax
	B	4.41±0.12cx	4.39±0.14cx	5.31±0.14by	3.96±0.12dy	6.98±0.12ay

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en fila indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, p ≤ 0.05).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, p ≤ 0.05).

Cuadro 36. Contenido de aminoácidos (g·100 g⁻¹ de proteína) con diferencia significativa (p ≤ 0.05) en la interacción de los factores tiempo-fracción de quesos añejos de Zacazonapan.

Aminoácido	Tiempo	Fracción				
		F1	F2	F3	F4	F5
Ácido aspártico/Asparagina (Asp/Asn)	0	8.05±0.27a ^z x ^w	7.56±0.25ax	8.20±0.27ay	6.73±0.25bz	5.40±0.27cz
	95	7.90±0.27abx	7.75±0.25bx	8.57±0.27ay	7.73±0.25by	7.15±0.27by
	180	7.35±0.25dx	8.27±0.25cx	9.49±0.27bx	10.80±0.27ax	8.70±0.27cx
Ácido glutámico/Glutamina (Glu/Gln)	0	17.32±0.45by	17.81±0.50by	20.38±0.45ax	21.26±0.45ax	15.06±0.50cx
	95	25.35±0.45ax	19.07±0.45cy	17.25±0.50dy	22.34±0.45bx	12.47±0.45ey
	180	25.87±0.50ax	23.74±0.50bx	14.25±0.50dz	16.82±0.50cy	11.43±0.50ey
Serina (Ser)	0	5.95±0.34bcy	7.71±0.34ax	6.50±0.34by	4.94±0.30dx	5.21±0.37cdx
	95	8.74±0.30ax	6.57±0.37by	6.59±0.37by	5.21±0.30cx	3.83±0.34dz
	180	9.29±0.34bx	7.90±0.34cx	11.25±0.37ax	4.82±0.37dx	4.00±0.34dy
Histidina (His)	0	5.03±0.30dx	6.13±0.30cx	4.97±0.33dx	7.16±0.33bx	8.22±0.30ax
	95	2.89±0.27bdz	2.90±0.27bcy	3.33±0.27by	4.60±0.30ay	2.49±0.30cdz
	180	3.74±0.30cdy	3.48±0.30cdy	4.23±0.30cx	6.89±0.33ax	5.41±0.30by
Glicina (Gly)	0	3.12±0.27acx	3.83±0.30ax	3.33±0.25abz	2.82±0.25bcx	3.63±0.30ay
	95	2.67±0.25cx	3.89±0.30bx	6.84±0.27ax	2.03±0.25cy	4.56±0.25bx
	180	2.62±0.25cdx	2.93±0.25cy	5.75±0.30ay	2.11±0.25dy	4.78±0.25bx
Treonina (Thr)	0	3.81±0.18by	4.71±0.18ax	4.89±0.18ax	3.13±0.16cx	1.56±0.16dy
	95	4.23±0.16axy	3.34±0.16by	2.95±0.18bcy	2.62±0.14cdy	2.94±0.16bdx
	180	4.35±0.14ax	3.25±0.14by	3.43±0.18by	2.52±0.18cy	3.07±0.18bx
Arginina (Arg)	0	3.69±0.12bx	3.45±0.12bx	3.79±0.13bx	4.22±0.13ax	3.46±0.12bx
	95	2.91±0.12ay	2.04±0.11bz	2.00±0.11by	2.80±0.12ay	1.10±0.12cy
	180	2.89±0.12ay	2.58±0.12ay	1.64±0.12bz	1.81±0.13bz	1.22±0.12cy
Alanina (Ala)	0	3.17±0.21bx	3.15±0.21by	2.77±0.21bcz	2.54±0.21cx	5.08±0.26ay
	95	2.60±0.21dx	4.60±0.24cx	5.96±0.24by	2.33±0.24x	7.89±0.24ax
	180	2.64±0.24bx	2.39±0.24bz	4.34±0.24ax	2.21±0.24bx	3.89±0.26az
Prolina (Pro)	0	3.78±0.45cx	6.15±0.45aby	4.65±0.45	5.01±0.45bcx	6.46±0.45ax
	95	3.10±0.45cxy	9.46±0.45ax	0±0.41	3.55±0.45cy	7.18±0.45bx
	180	1.99±0.45cy	4.42±0.45az	0±0.45	2.94±0.45bcy	3.43±0.45aby
Tirosina (Tyr)	0	1.60±0.08adx	1.61±0.09acx	1.65±0.07ax	1.48±0.08aex	1.39±0.09cdex
	95	1.46±0.09axy	1.01±0.09by	0.67±0.09cy	1.18±0.09by	0.54±0.08cy
	180	1.35±0.09ay	0.994±0.09by	0.92±0.09by	0.64±0.09cz	0.37±0.09dy

Valina (Val)	0	6.91±0.22ax	6.35±0.22acy	6.94±0.22ay	6.44±0.22aby	6.24±0.22bcz
	95	6.65±0.20cxy	7.01±0.20cx	7.75±0.22bx	7.01±0.20cy	8.41±0.22ay
	180	6.20±0.20dy	6.44±0.22dxy	7.12±0.24cxy	8.18±0.22bx	10.59±0.24ax
Metionina (Met)	0	0.16±0.08ay	0.16±0.08ax	0.31±0.08ax	0.16±0.08ay	0.19±0.08ax
	95	1.02±0.08ax	0.21±0.08bcx	0±0.07cdy	0.19±0.08bdy	0.33±0.08bx
	180	1.04±0.08ax	0.20±0.08cx	0.15±0.07cxy	0.49±0.08bx	0.18±0.08cx
Cisteína (Cys)	0	0.10±0.02cy	0.082±0.02cy	0.17±0.02by	0.09±0.02cx	0.39±0.02ax
	95	0.19±0.01ax	0.15±0.02ax	0±0.02cy	0±0.02cy	0.065±0.02by
	180	0.08±0.02ay	0.04±0.02aby	0±0.02by	0±0.02by	0±0.02bz
Isoleucina (Ile)	0	5.46±0.15by	5.40±0.15bz	6.30±0.15ax	5.76±0.14bz	3.74±0.15cz
	95	7.22±0.15ax	6.13±0.15by	5.59±0.15cy	6.52±0.15by	5.52±0.14cy
	180	7.52±0.15ax	6.70±0.15bcx	5.90±0.15dxy	7.09±0.15abx	6.62±0.15cx
Triptófano (Trp)	0	3.16±0.30abx	3.70±0.33ax	2.99±0.33abx	2.62±0.33bcx	2.85±0.33acx
	95	2.23±0.33by	1.90±0.33by	0±0.30cy	2.16±0.33bx	3.29±0.33ax
	180	2.59±0.33abxy	1.67±0.33bcdy	2.32±0.33adx	3.01±0.33ax	2.48±0.33acx
Leucina (Leu)	0	9.70±0.36cx	9.56±0.33cxy	10.14±0.33cy	11.91±0.36bx	14.95±0.40ay
	95	7.94±0.33ey	10.34±0.36dx	12.68±0.40bx	11.40±0.33cxy	15.80±0.33ay
	180	7.72±0.36ey	9.09±0.33dy	12.34±0.40bx	10.68±0.40cy	17.40±0.40ax
Lisina (Lys)	0	7.44±0.28bcy	7.41±0.28bdz	8.09±0.32abx	8.77±0.28az	6.72±0.32cdy
	95	8.84±0.28bx	8.22±0.28by	8.03±0.32bx	13.15±0.32ax	6.74±0.32cy
	180	9.27±0.32bx	9.18±0.35bx	8.03±0.32cx	12.14±0.35ay	7.70±0.35cx
Fenilalanina (Phe)	0	5.11±0.16bx	4.28±0.17cx	4.75±0.17bcy	4.90±0.16bx	7.32±0.17ay
	95	4.09±0.14dy	4.67±0.16cx	6.05±0.17bx	4.23±0.16cdy	8.00±0.16ax
	180	3.79±0.16ey	4.41±0.17dx	6.53±0.17bx	4.86±0.14cx	7.37±0.17ay

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en fila indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

7.5.2. Contenido de Calcio libre

El análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo y fracción, así como para las interacciones de factores queso-tiempo, queso-fracción y tiempo-fracción. En cuanto a la primera interacción de factores las mayores concentraciones se observaron en el tiempo 0 d para ambos quesos (Cuadro 37).

Cuadro 37. Contenido de calcio libre ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-tiempo.

Queso	Tiempo de maduración (días)		
	0	95	180
A	$0.57 \pm 0.052a^z x^w$	$0.30 \pm 0.054bx$	$0.30 \pm 0.054bx$
B	$1.15 \pm 0.054ay$	$0.40 \pm 0.054bx$	$0.43 \pm 0.054bx$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Respecto a la interacción queso-fracción el contenido de calcio libre permaneció constante en el queso A para todas las fracciones, en tanto que para el queso B la concentración más alta se registró en F4 (Cuadro 38).

Cuadro 38. Contenido de calcio libre ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-fracción.

Fracción	Queso	
	A	B
F0	$0.49 \pm 0.076a^z x^w$	$0.81 \pm 0.076by$
F1	$0.31 \pm 0.076ax$	$0.23 \pm 0.076cx$
F2	$0.38 \pm 0.076ax$	$0.34 \pm 0.076bcx$
F3	$0.38 \pm 0.076ax$	$0.53 \pm 0.076bx$
F4	$0.40 \pm 0.071ax$	$1.19 \pm 0.076ay$
F5	$0.39 \pm 0.076ax$	$0.87 \pm 0.076by$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

En la interacción de los factores tiempo-fracción el mayor contenido se obtuvo a los 0 d de maduración en la fracción F5 (< 200Da) y en el extracto no fraccionado con 95 y 180 d de maduración (Cuadro 39). Respecto a F5 es evidente que al incrementarse el tiempo de maduración se liberó una gran diversidad de péptidos (caseinofosfopéptidos) capaces de quelar al ion calcio, ya que al tiempo 0, F5 presentó el contenido más alto de calcio libre, caso contrario de F5 en los tiempos 95 y 180 días de maduración (Sun *et al.*, 2018).

Cuadro 39. Contenido de calcio libre (mg·mL⁻¹ ± error estándar) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.

Fracción	Tiempo de maduración (días)		
	0	95	180
F1	0.77±0.093c ^z x ^w	0.02±0.093bcy	0.03±0.093dy
F2	0.51±0.093cx	0.28±0.093bcx	0.29±0.093bcdx
F3	0.21±0.093dy	0.60±0.093ax	0.55±0.093abx
F4	1.45±0.085bx	0.45±0.093aby	0.49±0.093acy
F5	1.71±0.093ax	0.0±0.0938bcy	0.10±0.093dy

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

7.5.3. Actividad quelante de Cobre (II)

Los contrastes ortogonales mostraron que no existe diferencia significativa entre la actividad quelante de Cu²⁺ del control positivo (EDTA) y de las muestras de queso. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo y fracción, así como de las interacciones de los factores queso-tiempo, queso-fracción y tiempo-fracción, en las cuales se enfoca la discusión. En la primera interacción la mayor actividad quelante de Cu²⁺ se registró en el queso A con 95 días de maduración, y en el queso B con los 95 y 180 días (Cuadro 40). La quelación de Cu²⁺ aumentó al incrementarse el grado de hidrólisis, relacionado con el tiempo de maduración (You, Zhao, Regenstein, & Ren, 2010).

Cuadro 40. Porcentaje de actividad quelante de Cu^{2+} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-tiempo.

Queso	Tiempo de maduración(días)		
	0	95	180
A	7.43±0.40b ^z x ^w	9.14±0.33ax	7.72±0.36bx
B	5.47±0.41by	6.51±0.37aby	7.39±0.36ax

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

La mayor actividad quelante de Cu^{2+} considerando la interacción de los factores queso-fracción se obtuvo para ambos quesos en la muestra sin fraccionar (Cuadro 41). Esto se debe a la disponibilidad de sitios de unión donde se encuentran donadores de electrones (v.g. N, O y S), para que el ion metálico pueda enlazarse. Así mismo, a la proximidad adecuada para formar un anillo entre ellos (Kontoghiorghe, Kolnagou, & Kontoghiorghes, 2015).

Cuadro 41. Porcentaje de actividad quelante de Cu^{2+} significativo ($p \leq 0.05$) para la interacción de los factores queso-fracción.

Fracción	Queso	
	A	B
F0	18.59±0.47ax	18.47±0.51ax
F1	7.52±0.51cx	4.52±0.51bcy
F2	6.53±0.51cdx	4.24±0.54cy
F3	5.94±0.54dx	4.22±0.54cy
F4	8.8±0.54bx	5.87±0.54by
F5	1.21±0.51ex	1.96±0.4057dx

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Respecto a la interacción de los factores tiempo-fracción la mayor actividad quelante se presentó en F0, y una tendencia a incrementar conforme transcurrió el tiempo de maduración (Cuadro 42). Estableciéndose una proporcionalidad entre la quelación de Cu^{2+} y el aumentó en el grado de hidrólisis, es decir a mayor escisión de enlaces peptídicos mayor generación de productos con actividad quelante de iones metálicos, asociados a los tipos de enzimas que llevan a cabo

el proceso de hidrólisis (You, Zhao, Regenstein, & Ren, 2010; Jamdar *et al.*, 2010).

Cuadro 42. Actividad quelante de Cu (%) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.

Fracción	Tiempo de maduración (días)		
	0	95	180
F0	12.42±0.64a ^z w	19.83±0.57ay	23.34±0.57ax
F1	4.69±0.70cy	7.14±0.57cx	6.23±0.57bxy
F2	6.46±0.70bcx	4.41±0.64dy	5.30±0.57bcxy
F3	7.13±0.70bx	3.99±0.64dey	4.11±0.64cy
F4	6.45±0.70bcy	9.23±0.57bx	6.32±0.70by
F5	2.37±0.70dx	2.33±0.64ex	0.06±0.64dy

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y, z) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

La actividad quelante de Cu²⁺ por parte de las fracciones, puede asociarse a un determinado tamaño y composición de aminoácidos en los péptidos (Cian, Garzón, Ancona, Guerrero, & Drago, 2016). Por lo tanto, la escasa actividad en los extractos de este queso pudo estar relacionada con el bajo contenido de His, Met y Cys, relacionados con la formación de complejos con Cu²⁺ (Gaetke & Chow, 2003; Cian *et al.*, 2016). La capacidad quelante en los extractos puede ser resultado de la presencia de dos o más moléculas capaces de unirse al ion metálico. En compuestos alifáticos el ion metálico queda dentro de un anillo de cinco miembros e involucrando dos ligandos quelantes (v.g. Gly ligado a Cu²⁺), mientras que en compuestos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), o quelantes con dobles enlaces forma con el ion metálico un anillo de seis miembros con mayor estabilidad (Miller, Buettner, & Aust, 1990).

7.5.4. Actividad quelante de Fe (II)

Los contrastes ortogonales indicaron diferencia significativa del control positivo-EDTA (95.80 % de inhibición) respecto a las muestras sin fraccionar, y a las

muestras fraccionadas. Las muestras con la mayor actividad quelante fueron del queso A con 0 días de maduración en F3 y F4, así como a los 95 días en F1 y F3. Respecto al queso B se presentaron en el tiempo 0 para F0, F2, F3 y F4, para 95 d en F0 y F1, y en 180 d se presentó en F0. (Figura 10).

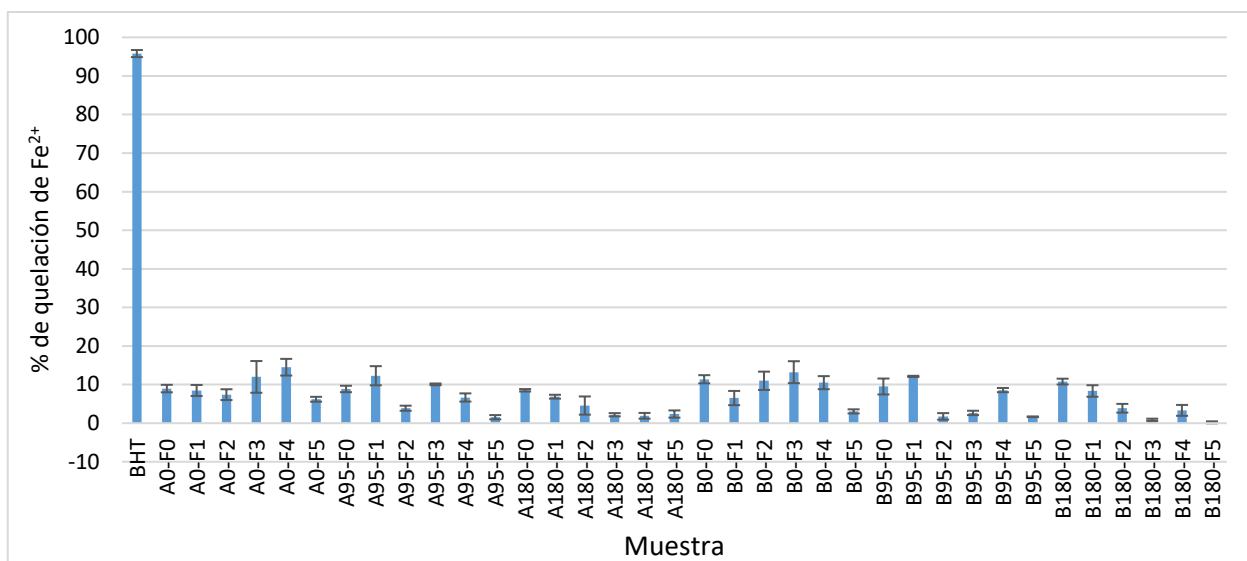


Figura 10. Actividad quelante de hierro del BHT, la muestra no fraccionada (F0) y de las fracciones de extracto de los quesos de Zacazonapan A y B, a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($F1 > 10 \text{ kDa}$, $10 \text{ kDa} > F2 > 3 \text{ kDa}$, $3 \text{ kDa} > F3 > 1 \text{ kDa}$, $1 \text{ kDa} > F4 > 200 \text{ Da}$ y $F5 < 200 \text{ Da}$).

El análisis de varianza indicó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores tiempo y fracción pero no al factor queso, además se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las interacciones de los factores queso-fracción y tiempo-fracción. Respecto a la interacción queso-fracción la menor actividad quelante para ambos quesos se obtuvo en F5, debido al menor número de sitios en donde el ion metálico podría ligarse (Kontoghiorghe *et al.*, 2015) (Cuadro 43).

En la interacción de los factores tiempo-fracción se observó que a los 0 días de maduración F3 y F4 presentaron la mayor actividad quelante, al igual que a 95 d en F1, y con 180 d en el extracto no fraccionado (F0) (Cuadro 44). Además en F3 y F4 la actividad quelante disminuyó al transcurrir el tiempo de maduración, lo cual concuerda con lo reportado por Öztürk & Akin (2018) en quesos Tulum.

Adicionalmente, Wu, Li, Hou, Zhang, & Zhao (2017) indicaron que una hidrólisis prolongada generó péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres, dando lugar a un decremento en la actividad quelante de hierro.

Cuadro 43. Porcentaje de actividad quelante de Fe^{2+} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-fracción.

Fracción	Queso	
	A	B
F0	8.78±0.48a ^z y ^w	10.55±0.48ax
F1	9.21±0.55ax	8.99±0.52bx
F2	5.28±0.52bx	5.54±0.59dx
F3	8.08±0.55ax	5.58±0.55dy
F4	7.69±0.55ax	7.46±0.55cx
F5	3.37±0.55cx	1.64±0.48ey

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Cuadro 44. Porcentaje de actividad quelante de Fe^{2+} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.

Fracción	Tiempo de maduración (días)		
	0	95	180
F0	10.17±0.59b ^z x ^w	9.18±0.59bx	9.65±0.59ax
F1	7.49±0.66cy	12.21±0.66ax	7.60±0.66by
F2	9.19±0.72bcx	2.82±0.66dy	4.21±0.66cy
F3	12.60±0.66ax	6.35±0.66cy	1.53±0.72dz
F4	12.50±0.72ax	7.61±0.59bcy	2.61±0.72cdz
F5	4.62±0.66dx	1.60±0.59dy	1.29±0.66dy

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y, z) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

El tiempo de hidrólisis tuvo un efecto inverso sobre la capacidad de quelar Fe^{2+} , asociado a que largos tiempos de hidrólisis propiciaron un decremento en la actividad quelante de Fe^{2+} (Corrêa *et al.*, 2011); esto debido a que los péptidos

responsables pudieron ser escindidos, y los productos tuvieron menor capacidad de quelar al ion metálico (Corrêa *et al.*, 2014). Este comportamiento fue contrario a lo observado en la quelación de Cu^{2+} , y las discrepancias pueden atribuirse a pequeñas diferencias químicas y físicas entre ambos metales, excluyendo el estado de oxidación, que es el mismo. Pero un factor que puede influir en su unión a los péptidos es el radio atómico, siendo de 1.26 Å para hierro y 1.28 Å para el cobre (Torres-Fuentes *et al.*, 2012). Así mismo, a la proximidad adecuada entre el quelante y el ion metálico (Kontoghiorghe *et al.*, 2015).

Por otro lado, en el tiempo 0, las fracciones no mantuvieron una tendencia, lo que concuerda con Wu, Liu, Zhao, & Zeng (2012) quienes señalaron que no hay una relación del peso molecular de los péptidos con la capacidad de quelación de hierro. Wu *et al.* (2020) reportaron que péptidos con un tamaño entre 300 – 1500 Da tienen una alta afinidad al hierro, lo cual se observó para el tiempo 0 d en F3 y F4. Otros factores asociados con la actividad quelante de hierro son las diferentes características estructurales de los péptidos, así como el arreglo y la composición de aminoácidos (Wu, Yang, Sun, Bao, & Lin, 2020). Las fracciones con la mayor actividad quelante en la interacción de factores queso-fracción y tiempo-fracción presentaron aminoácidos como Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, y Tyr relacionados con secuencias quelantes de hierro (Wu, Yang, Sun, Bao, & Lin, 2020). Así mismo, contenían Ile, Leu, Phe, Trp, Pro y Val que en altas concentraciones se asocian con la actividad quelante (Pownall *et al.*, 2010). Estos últimos autores correlacionan de manera positiva la quelación de Fe^{2+} y el contenido de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos.

7.5.5. Actividad antioxidante por captación del radical libre ABTS^{•+}

El análisis estadístico de contrastes ortogonales señaló una diferencia significativa entre las muestras y el control positivo (BHT) (Figura 11). Las muestras de los quesos A y B con 0, 95 y 180 días de maduración y sin fraccionar (F0) presentaron similar actividad de captación del radical ABTS^{•+} que el BHT. El análisis de varianza indicó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los

factores queso, tiempo y fracción, así como a las interacciones de los factores queso-tiempo, y tiempo-fracción. En cuanto a la interacción queso-tiempo se observó la mayor actividad en el queso A con 95 y 180 d de maduración (Cuadro 45). Esto concuerda con otras investigaciones donde señalaron que, al transcurrir el tiempo de maduración incrementó la actividad antioxidante en términos de inhibición del radical ABTS^{•+} (Huma, Rafiq, Sameen, Pasha, & Khan, 2018), aunque puede alcanzar un máximo y comenzar a decrecer (Gupta, Mann, Kumar, & Sangwan, 2009), como ocurrió con el queso B. Esto producto de la degradación de los péptidos con esta capacidad (Ardö, McSweeney, Magboul, Upadhyay, & Fox, 2017).

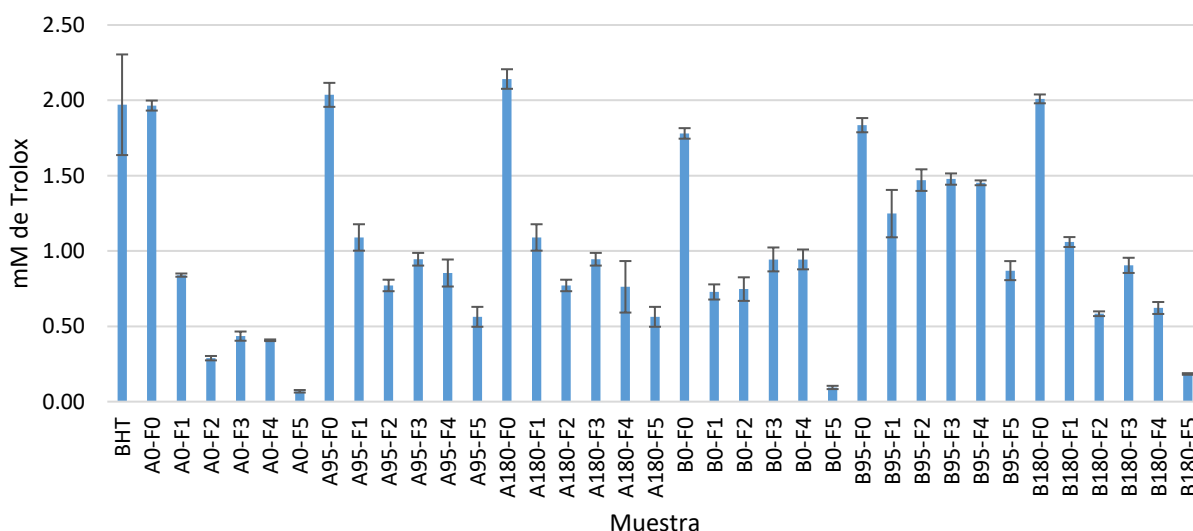


Figura 11. Captación del radical libre ABTS^{•+} por BHT, la muestra no fraccionada (F0) y por las fracciones de extracto de los quesos de Zacazonapan A y B, a una concentración de 1 mg·mL⁻¹ (F1 >10kDa, 10 kDa > F2 > 3 kDa, 3 kDa > F3 > 1 kDa, 1 kDa > F4 > 200 Da y F5 < 200 Da).

La actividad antioxidante de los extractos del queso de Zacazonapan puede estar asociada con su composición de aminoácidos. En el extracto del queso A con 95 d destacan aminoácidos como Gln/Glu, Ala, Trp, Leu, Lys y Phe, mientras que para 180 d se tienen a Asp/Asn, Ser, Thr, Ala, Val, Leu, Lys y Phe. Por otro lado, el extracto del queso B con 95 días de maduración destacó en el contenido de Gln/Glu, Thr, Ala, Pro, Val y Phe. Algunos autores asocian fuerte actividad antioxidante a péptidos que contienen Gln, Lys, Met, Tyr, His, Cys, y Pro (Huma

et al., 2018). Bottesini *et al.* (2013) atribuyen esta actividad a los aminoácidos libres como la Tyr, Met, Trp, y una mínima parte a los péptidos antioxidantes.

Cuadro 45. Actividad antioxidante (mM Trolox) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-tiempo.

Queso	Tiempo de maduración (días)		
	0	95	180
A	0.67±0.017b ^z y ^w	1.04±0.017ay	1.04±0.016ax
B	0.87±0.017bx	1.39±0.018ax	0.89±0.018by

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

En cuanto a la interacción queso-fracción la mayor actividad se registró en los extractos sin fraccionar (F0) y la menor en F5 (Cuadro 46). Similar comportamiento en F0 se registró en la interacción tiempo-fracción, así como una disminución de la actividad con el primer fraccionamiento de la muestra (Cuadro 47). Contrario a lo reportado en otros tipos de fuentes proteínicas (Choonpicharn, Jaturasitha, Rakariyatham, Suree, & Niamsup, 2015). Otros factores importantes en la actividad antioxidante son la concentración y la composición de aminoácidos de los extractos, principalmente la presencia de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (Ajibola, Fashakin, Fagbemi, & Aluko, 2011; Mushtaq, Gani, & Masoodi, 2019; Silva *et al.*, 2012).

Cuadro 46. Actividad antioxidante (mM Trolox) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores queso-fracción.

Fracción	Queso	
	A	B
F0	2.05±0.02a ^z x ^w	1.87±0.02ay
F1	1.01±0.02cy	1.01±0.02bx
F2	0.61±0.02bx	0.93±0.02cx
F3	0.77±0.02dy	1.11±0.02cx
F4	0.67±0.02dy	1.01±0.02dx
F5	0.40±0.02ex	0.38±0.02ex

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Cuadro 47. Actividad antioxidante (mM Trolox) con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la interacción de los factores tiempo-fracción.

Fracción	Tiempo de maduración (días)		
	0	95	180
F0	1.87±0.03ay	1.93±0.03ay	2.07±0.03ax
F1	0.78±0.03cz	1.17±0.03bx	1.07±0.03cy
F2	0.52±0.03bz	1.12±0.03bcx	0.68±0.03by
F3	0.69±0.03cy	1.21±0.03bdx	0.92±0.03dy
F4	0.67±0.03dz	1.15±0.03cdx	0.69±0.03dy
F5	0.08±0.03ez	0.72±0.03ex	0.37±0.03ex

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d, e) en columna indican diferencia estadística entre fracciones (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y, z) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

7.6. Conclusiones

Los perfiles de aminoácidos del queso añejo de Zacazonapan y de sus fracciones presentaron aminoácidos esenciales, así como hidrófobos estos últimos importantes en la actividad antioxidante. Además, la capacidad antioxidante que presentaron los extractos sin fraccionar (F0) como las fracciones fue evaluada mediante diferentes métodos, presentando variaciones relacionadas con las interacciones de factores como: el queso (productor A y B), tiempo de maduración y tamaño de fracción. Así como su relación con el contenido de ciertos aminoácidos en los extractos. El proceso de proteólisis generó péptidos capaces de donar electrones y reaccionar con iones metálicos como Fe^{2+} y Cu^{2+} , aunque de manera inversa y siendo más relevante la quelación de Cu^{2+} . Esta característica es importante porque se asocia a un incremento de la solubilidad y biodisponibilidad de los iones metálicos cuando este tipo de péptidos son utilizados en alimentos fortificados con este tipo de iones. Por otra parte, las muestras mostraron la capacidad de captar al radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ haciéndola una molécula más estable.

Esta información sobre las características del queso durante su maduración, contribuyen a su tipicidad, otorgándole rasgos distintivos que lo pueden

diferenciar en el mercado. Además, en estudios subsecuentes se deberían realizar pruebas simulando condiciones gastrointestinales utilizando el queso y probar la actividad de los péptidos, para posteriormente determinar sus beneficios al ser ingeridos.

7.7. Literatura citada

- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6685–6702. <https://doi.org/10.3390/ijms12106685>
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591(1–2), 181–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613051>
- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*, 1(2), 445–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., ... Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 953–958. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.821696>
- Bruinenberg, P. G., De Roo, G., & Limsowtin, G. K. Y. (1997). Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris SK11: Possible role in flavor compound formation during cheese maturation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 561–566. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.2.561-566.1997>
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.017>
- Choonpicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N., & Niamsup, H. (2015). Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3134–3139. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1581-6>
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & Drago, S. R. (2016). Chelating Properties of Peptides from Red Seaweed *Pyropia columbina* and Its Effect on Iron Bio-Accessibility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 96–101. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0533-x>
- Corrêa, F. A. P., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, M. M. S., Lopes, C. F., Segalin,

- J., ... Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247–2254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>
- Corrêa, Folmer Ana Paula, Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, M. M. S., Segalin, J., & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Fernández, M., & Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Ganesan, B., & Weimer, B. C. (2017). Amino Acid Catabolism and Its Relationship to Cheese Flavor Outcomes. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Vol. 1, pp. 483–516). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., & Sangwan, R. B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 339–347. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00509.x>
- Hernández, M. C., Hernández, M. A., Villegas, D. G. A. Z., & Aguirre, M. E. (2011). El proceso socio-técnico de producción de Queso Añejo de Zacazonapan, Estado de México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2(2), 161–176.
- Huma, N., Rafiq, S., Sameen, A., Pasha, I., & Khan, M. I. (2018). Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(2), 287–292. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0031>
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
- Kontoghiorghes, C. N., Kolnagou, A., & Kontoghiorghes, G. J. (2015). Phytochelators intended for clinical use in iron overload, other diseases of iron imbalance and free radical pathology. *Molecules*, 20(11), 20841–20872. <https://doi.org/10.3390/molecules201119725>
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to

- applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>
- Kwak, H. S., Ganesan, P., & Hong, Y. H. (2011). Nutritional benefits in cheese. *Cheese: Types, Nutrition and Consumption*, (December 2012), 267–288.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3), 127–140. <https://doi.org/10.4038/agriest.v10i0.25>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Julio Girón-Calle, M. A., Millán, F., & Vioque, J. (2007). Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3949–3954. <https://doi.org/10.1021/jf063401s>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Michaylova, V., & Ilkova, P. (1971). Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Analytica Chimica Acta*, 53, 194–198.
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of «autoxidation» reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 95–108.
- Molenaar, D., Bosscher, J. S., Brink, B. T., Driessen, A. J. M., & Konings, W. N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2864–2870. <https://doi.org/10.1128/jb.175.10.2864-2870.1993>
- Murray, B. A., & Fitzgerald, R. J. (2007). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins : Biochemistry , Bioactivity and Production. *Current Pharmaceutical Design*, 773–791.
- Mushtaq, M., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2019). Himalayan cheese (Kalari/Kradi) fermented with different probiotic strains: In vitro investigation of nutraceutical properties. *Lwt*, 104, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.024>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2018). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4712–4718. <https://doi.org/10.1021/jf904456r>
- Rae, P. S., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive

- peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rafiq, S., Huma, N., Rakariyatham, K., Hussain, I., Gulzar, N., & Hayat, I. (2018). Anti-inflammatory and anticancer activities of water-soluble peptide extracts of buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 432–438. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12483>
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661–3667. <https://doi.org/10.1021/jf021156g>
- Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Wechsler, D., Sieber, R., ... Walther, B. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties To cite this version : HAL Id : hal-00895741 ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. <https://doi.org/10.1051/dst/2009049>
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., ... Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal «coalho» cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135(3), 1533–1538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058>
- Sun, H., Yao, X., Wang, X., Wu, Y., Liu, Y., Tang, J., & Feng, J. (2015). Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation. *CYTA - Journal of Food*, 13(2), 264–272. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.948072>
- Sun, S., Liu, F., Liu, G., Miao, J., Xiao, H., Xiao, J., ... Cao, Y. (2018). Effects of casein phosphopeptides on calcium absorption and metabolism bioactivity in vitro and in vivo. *Food and Function*, 9(10), 5220–5229. <https://doi.org/10.1039/c8fo00401c>
- Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rojó, A. D., Robles-Sánchez, M., Gutiérrez-Méndez, N., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2015). Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7635–7639. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9388>
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 134(3), 1585–1588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.112>
- Wu, H., Liu, Z., Zhao, Y., & Zeng, M. (2012). Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. *Food Research International*, 48(2), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.013>

- Wu, W., Li, B., Hou, H., Zhang, H., & Zhao, X. (2017). Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. *Journal of Functional Foods*, 35, 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.013>
- Wu, W., Yang, Y., Sun, N., Bao, Z., & Lin, S. (2020). Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. *Food Research International*, 131(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108976>
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.078>
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120(3), 810–816. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.018>
- Yvon, Mireille and Rijnen, L. (2001). Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185–201. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.005>
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Qi, X., & Qian, H. (2011). Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal. *European Food Research and Technology*, 232(6), 941–950. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1466-0>

8. CAMBIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN, MÉXICO DURANTE SU MADURACIÓN

8.1. Resumen

Durante el proceso de elaboración y maduración del queso se producen compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antioxidante de extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan en diferentes tiempos de maduración (0, 30, 95 y 180 d). A los extractos solubles en agua obtenidos a partir de quesos provenientes de dos queserías (A y B) se les determinó contenido de proteína soluble mediante el método de Bradford, así como el porcentaje de grado de hidrólisis por cuantificación de los grupos amino libres. La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante el porcentaje de captación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés) y asimismo por la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). El contenido de proteína en los extractos difirió significativamente respecto a la interacción queso-tiempo siendo mayor para ambos quesos a los 95 d (1.24 ± 0.036 y 0.88 ± 0.036 mg mL⁻¹, respectivamente). El grado de hidrólisis fue significativo respecto al factor tiempo siendo el más alto a los 95 (7.43 ± 0.34 %) y 180 d (6.44 ± 0.31 %). El mayor porcentaje de captación del radical libre DPPH se presentó a los 30 y 180 d de maduración (18.70 ± 0.48 y 19.92 ± 0.48 , respectivamente). Así mismo al final de la maduración se observó el mayor valor de ORAC para ambos quesos siendo de 8119.34 ± 312.8 μM para A y de 6474.48 ± 255.4 μM para B. Este queso es una fuente potencial de péptidos con actividad antioxidante, los cuales podrían ser estudiados para su aplicación en alimentos y en el sector farmacéutico.

Palabras clave: péptidos bioactivos, queso añejo de Zacazonapan, maduración, antioxidante.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verénice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

CHANGE OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WATER-SOLUBLE EXTRACTS FROM CHEESE ZACAZONAPAN, MEXICO DURING ITS RIPENED

Abstract

During cheesemaking and ripening process, bioactive compounds with antioxidant properties are produced. The aim of this investigation was to determine antioxidant activity of water-soluble extracts of aging cheese from Zacazonapan at different ripening times (0, 30, 95 and 180 days). Water-soluble extracts obtained from cheese of two cheese factories (A and B) were determined soluble protein content by Bradford method, as well as the percentage of degree of hydrolysis by quantification of free amino groups. Antioxidant activity of the extracts was determined by percentage of scavenge of free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazil (DPPH) and also by oxygen radical absorption capacity (ORAC). Protein content in the extracts differed significantly with respect to interaction cheese-time, being higher for both cheeses at 95 d (1.24 ± 0.036 and 0.88 ± 0.036 mg mL⁻¹, respectively). Percentage of degree of hydrolysis was significant with respect to factor time, being the highest at 95 (7.43 ± 0.34 %) and 180 d (6.44 ± 0.31 %). The highest percentage of free radical inhibition DPPH occurred at 30 and 180 d of ripening (18.70 ± 0.48 and 19.92 ± 0.48 , respectively). Likewise, at the end of ripening, the highest ORAC value was observed for both cheeses, being 8119.34 ± 312.8 μ M for A and 6474.48 ± 255.4 μ M for B. This cheese is a potential source of peptides with antioxidant activity, which could be studied for application in food and in pharmaceutical sector.

Keywords: bioactive peptides, Zacazonapan añejo cheese, ripened, antioxidant.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Verenice Torres Salas
Advisor: Arturo Hernández Montes, Ph. D.

8.2. Introducción

El ser humano como organismo aerobio requiere de oxígeno para vivir, durante el metabolismo oxidativo se forman radicales libres, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Lee, Koo, & Min, 2004; Prior, 2015). Estas moléculas al estar presentes en el cuerpo causan lipoxidación, oxidación de proteínas, ruptura y modificación del ADN y modulación de expresión de genes (Lee *et al.*, 2004).

Existen de forma natural enzimas antioxidantes que protegen del estrés oxidativo como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa. Este estrés se observa comúnmente en adultos mayores, así mismo se asocia a un desbalance entre radicales libres y especies reactivas de oxígeno, con respecto a las enzimas antioxidantes (Lee *et al.*, 2004), y se les atribuye una relación con enfermedades como la artritis, arterioesclerosis, cáncer, diabetes, isquemia y Parkinson (Prior, 2015). Por ello, se requiere de una protección externa que genere un balance del estrés oxidativo (Bouayed & Bohn, 2010). La leche y los productos lácteos como el queso pueden beneficiar la defensa oxidativa en los consumidores a través de varios mecanismos (Khan *et al.*, 2019). La defensa oxidativa en los quesos es atribuida a los péptidos con capacidad antioxidante, los cuales son generados durante la elaboración y maduración del queso, donde están involucrados agentes coagulantes, enzimas de la leche, enzimas de microorganismos iniciadores y no iniciadores, flora secundaria, y enzimas exógenas; los cuales actúan sobre las caseínas (α -, β - y κ -caseína) y proteínas del suero (α -, β -lactoglobulina) (Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001). La generación de péptidos con actividad antioxidante se ha reportado en quesos como Cheddar (Pritchard *et al.*, 2010), Stracchino (Pepe *et al.*, 2016), Coalho (Silva *et al.*, 2012), Parmesano-Reggiano (Bottesini *et al.*, 2013), Tipo Burgos (Timón, Parra, Otte, Broncano, & Petrón, 2014), Tipo Roquefort (Meira *et al.*, 2012) y en el caso de quesos mexicanos solo en queso Fresco mexicano de leche de oveja (Hernández-Galán *et al.*, 2017), Cotija (Hernández-Galán *et al.*, 2016) y Cottage mexicano (Abadía-García *et al.*, 2013). Cada variedad de queso

desarrolla una composición peptídica específica determinada por las actividades enzimáticas presentes, así como por las condiciones físicas de la matriz del queso (Ardö, McSweeney, Magboul, Upadhyay, & Fox, 2017).

El queso añejo de Zacazonapan es un queso tradicional mexicano, con más de 100 años de historia al cual está arraigado a un saber-hacer (conjunto de conocimientos de los diferentes métodos para realizar una actividad determinada) (Hernández *et al.*, 2011; Villegas & Cervantes, 2011). Es elaborado a partir de leche cruda de vacas en libre pastoreo, presenta una forma prismática rectangular con una cara ligeramente convexa, cubierto de una pasta de chile guajillo, y es comercializado fresco, oreado y añejo (Hernández, Hernández, Villegas & Aguirre, 2011). Los estudios *in vitro* acerca del potencial para la generación de péptidos bioactivos en este queso son escasos. Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo determinar la generación de péptidos con actividad antioxidante presentes en extractos solubles en agua de queso añejo de Zacazonapan a diferentes tiempos de maduración.

8.3. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos reactivo de Bradford, albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), L-leucina, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés), diclorhidrato de 2,2-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH), flouresceína, trolox (ácido 6 hidroxil-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano 2- carboxílico) correspondieron a la empresa Sigma-Aldrich (Minessota, EE. UU.). El ácido picrilsulfónico fue de la marca Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Suiza). El fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) de la marca J. T. Baker (J. T. Baker, S. A. de C. V., Ecatepec de Morelos, Estado de México) y el fosfato dibásico sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) correspondió a la marca Tecsiquim (Tecsiquim, S. A. de C. V., Ciudad de México, México). El sulfito de sodio (Na_2SO_3) fue de la marca Productos químicos Monterrey (Nuevo León, México). El ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) correspondieron a la marca Meyer® (Química Suastes, S.A. de C.V., Ciudad de México, México).

8.3.1. Obtención de muestras

Las piezas de queso se obtuvieron de dos queserías de Zacazonapan, Estado de México, México, ubicado dentro de las coordenadas geográficas 19° 04' 22" latitud norte y 100° 15' 18" longitud oeste y 1350 m de altitud. Las queserías se codificaron como A y B. En cada quesería, se elaboraron piezas de un kilogramo, las cuales se obtuvieron de un lote de leche cruda de bovino que fue cuajada en la misma tina y cada pieza se consideró una unidad experimental. Las piezas se almacenaron a 15 °C y una humedad relativa de 85 %, para ser muestreadas a los 0, 30, 95 y 180 d de maduración.

8.3.2. Extracción de compuestos solubles en agua

La extracción de los compuestos solubles del queso añejo de Zacazonapan se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Rae, Phillips, & Kailasapathy, (2010), con modificaciones respecto a la homogeneización, tiempo de centrifugación y ajuste de pH. 250 g de queso se pesaron y se homogeneizaron con 750 mL de agua destilada durante 5 min en una licuadora (Osterizer, Wisconsin, EE.UU.). Posteriormente, la mezcla se agitó a 150 rpm durante 1 h a 40 °C en una incubadora orbital (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Al término de este periodo, el pH de la mezcla se llevó a 4.5 utilizando NaOH y HCl 1 M y enseguida la mezcla se centrifugó a 8801 g por 10 min a 4 °C (Centrifuga Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania) y se descartó tanto la capa superior de grasa como el sedimento. El extracto acuoso, se filtró a gravedad a través de una capa de algodón, enseguida se filtró a vacío utilizando papel Whatman No. 42. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C.

8.3.3. Determinación de proteína soluble en extractos

La determinación de proteína se realizó mediante el método descrito por Bradford (1976). Este procedimiento está basado en la formación de un complejo entre el Azul brillante G y proteínas en disolución, el cual provoca un cambio en la absorción máxima del azul brillante G a 595 nm, por lo que la lectura de la

absorción será proporcional a la proteína presente. Previo a la determinación los extractos se centrifugaron a 3438 g a 4 °C durante 10 min (Centrifuga Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania) y se filtraron mediante papel Whatman 42. Enseguida 50 µL del extracto acuoso se colocaron en un tubo de ensayo y se mezclaron con 1.5 mL de reactivo de Bradford. Después de 5 min la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 595 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, Massachusetts, EE. UU.). El blanco se preparó sustituyendo el extracto acuoso por agua destilada. Una curva de albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) 0.1-1.4 mg mL⁻¹ se preparó bajo las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron en mg mL⁻¹ de BSA.

8.3.4. Determinación de grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó mediante el método descrito por Adler-Nissen (1979), con modificaciones respecto al menor tiempo de reacción de 60 a 30 min, la reacción se detuvo con sulfito de sodio (Na₂SO₃) y no con HCl. En la Figura 12 se muestra la reacción de sustitución nucleofílica aromática del ácido trinitrobenzenosulfónico con los grupos α-amino primarios. Para llevar a cabo la reacción 64 µL de extracto se colocaron en un frasco ámbar, más 1 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.2125 M, pH 8.2 y 0.5 mL de ácido picrilsulfónico al 0.2 % (v/v). La mezcla se agitó e incubó en baño maría (OVAN TL60E, Suministro Grupo Esper, S. L., EE. UU.) durante 30 min a 50 °C. Concluido el tiempo de incubación se retiraron los frascos del baño maría y se adicionó 1 mL de Na₂SO₃ 0.1 M para detener la reacción, los frascos se agitaron en un vórtex Genie 2 (Scientific Industries Inc., Nueva York, EE. UU.) y se dejaron reposar 10 min. Seguidamente, se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, Massachusetts, EE. UU.). El blanco se preparó sustituyendo la muestra por agua destilada. Los datos se interpolaron al modelo de regresión lineal de una curva estándar de L-leucina (0 - 6 mM). Cada determinación se realizó por triplicado.

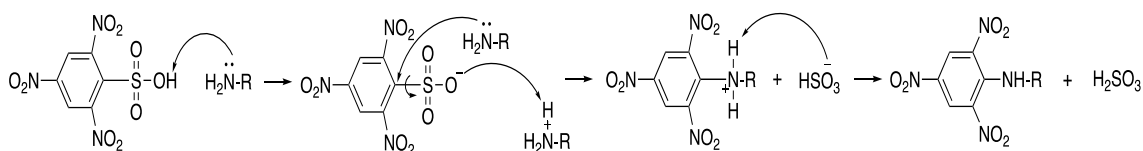


Figura 12. Sustitución nucleofílica aromática del ácido trinitrobencenosulfónico con los grupos α -amino primarios (Adler-Nissen, 1979).

La determinación del grado de hidrólisis total del queso se realizó pesando 0.5 g del queso correspondiente al tiempo cero de maduración y se adicionaron 2.5 mL de HCl 6 N, la mezcla se incubó a 100 °C por 24 h (EC33, Ríos Rocha S. A., Ciudad de México, México). Posterior a la incubación, se neutralizó la reacción adicionando 2.5 mL de NaOH, la mezcla se filtró mediante papel Whatman No. 1. Al sobrenadante obtenido se le aplicó la metodología descrita anteriormente para medir los grupos α -amino libres totales. El cálculo del porcentaje de grado de hidrólisis (% GH) se realizó mediante la ecuación 7:

$$\% GH = \frac{NH_{2tx} - NH_{2t0}}{NH_{2HT} - NH_{2t0}} \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

Donde:

NH_{2tx} = cantidad de grupos α -amino al tiempo x de maduración.

NH_{2t0} = cantidad de grupos α -amino al tiempo 0 de maduración.

NH_{2HT} = cantidad de grupos α -amino totales en la muestra de queso a los 0 d de maduración.

8.3.5. Determinación *in vitro* de actividad antioxidante

Método de captación del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

La actividad antioxidante de los péptidos producidos durante la maduración del queso añejo de Zacazonapan, se determinó de acuerdo al método descrito por Shahidi & Zhong (2015) considerando las modificaciones propuestas por Hernández-Galán *et al.* (2017). Este método está basado en la transferencia de

electrones, éste mide la capacidad del antioxidante en este caso los extractos acuosos del queso, para llevar a cabo la reducción del radical libre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Prior, 2015). Previo a la determinación de la actividad antioxidante, las muestras se centrifugaron a 3438 g durante 10 min a 4 °C (Centrifuga Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania) y se filtraron a través de papel Whatman No. 42. La concentración de proteína de los extractos se ajustó a 0.3 mg mL⁻¹. El ensayo se realizó mezclando 0.5 mL de cada extracto con 1.5 mL de DPPH 0.125 mM, la mezcla se dejó en reposo por 60 min, enseguida se centrifugaron las muestras a 3483 g durante cinco min a 4 °C (Centrifuga Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania) y la absorbancia se leyó a 515 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, Massachusetts, EE. UU). En el blanco se sustituyó el extracto por agua destilada y se preparó bajo las mismas condiciones. El porcentaje de captación del radical DPPH se calculó mediante la ecuación 8:

$$Captación\ del\ DPPH\ (\%) = \frac{A_{515\text{Blanco}} - A_{515\text{Extracto}}}{A_{515\text{Blanco}}} \times 100 \quad \text{Ec. 8}$$

Donde:

$A_{515\text{Blanco}}$ es la absorbancia a 515 nm del blanco, y $A_{515\text{Extracto}}$ es la absorbancia a 515 nm de la mezcla de reacción con péptidos.

Método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

El método para determinar la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) consiste en medir la disminución de la fluorescencia de una proteína como resultado de un daño oxidativo causado por una fuente de radicales peroxilo (ROO•) muy frecuente en la biología humana (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Prior, 2002; Prior, 2015). El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la proteína del daño oxidativo. Previo a la determinación, los extractos se centrifugaron a

3438 g durante diez min a 4 °C (Centrifuga Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania) y se filtraron utilizando papel Whatman No. 42.

Para realizar la determinación se utilizó el método de microdiluciones en placa descrito por Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé (2004), con modificaciones respecto a un incremento en la cantidad de muestra y fluoresceína. Así como en la duración de la cinética de la reacción de 80 a 60 min. En cada pocillo de la microplaca se colocaron 25 µL del extracto, o amortiguador de fosfato de potasio 75 mM a pH 7.4 en el caso del blanco y el control, y 150 µL de fluoresceína 1.4 µM (diluida 1:1000). La mezcla se incubó durante 20 min a 37 °C, enseguida se añadieron 25 µL de diclorhidrato de 2, 2-azobis-2-metilpropionamida (AAPH) 0.15 M. La placa se agitó por 10 s a una velocidad máxima y se comenzó la cinética tomando las lecturas de fluorescencia con intervalos de 1 min durante 1 h. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en un equipo BioTek Synergy 2 (Vermont, EE. UU.) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 535 nm con una temperatura de 37 °C. La temperatura de 37 °C juega un papel crítico, pues permite la descomposición térmica del AAPH fuente de los radicales ROO• (Huang *et al.*, 2002). Bajo las mismas condiciones se realizó una curva de Trolox en un rango de concentración de 5 a 100 µM.

Las curvas obtenidas para cada uno de los extractos (fluorescencia *versus* tiempo) se normalizaron a la curva del blanco correspondiente al mismo ensayo, mediante la multiplicación de los datos originales por el factor conformado con la fluorescencia en el blanco al tiempo cero entre la fluorescencia del extracto al tiempo cero (Dávalos *et al.*, 2004). Con las curvas normalizadas, se calculó el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia (AUC) con la ecuación 9.

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=60} f_i / f_0 \quad \text{Ec. 9}$$

Donde f_0 es la fluorescencia inicial leída al tiempo 0 y f_i es la fluorescencia leída al tiempo i .

Dado que los valores de ORAC se refieren al área de protección neta de la fluoresceína bajo la curva debido a la presencia de péptidos antioxidantes en los extractos acuosos. Las AUC netas de los extractos y las correspondientes a cada una de las concentraciones de Trolox (μM) se calcularon mediante la resta de la AUC neta correspondiente al blanco (Dávalos *et al.*, 2004). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como μM equivalentes de Trolox. Los cálculos se llevaron a cabo con el software Gen5™ (1. 11 versión 2005, Vermont, EE. UU.) del equipo BioTek Synergy 2 (Vermont, EE. UU.).

8.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el cual consideró al factor queso con dos niveles (A y B), y al factor tiempo con cuatro niveles (0, 30, 95 y 180 d de maduración). Las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS, $\alpha = 0.05$) usando el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., Carolina del Norte, EE. UU.).

8.5. Resultados y discusión

8.5.1. Proteína soluble en extractos

El contenido de proteína en los extractos acuosos presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo de maduración y su interacción. Respecto a la interacción, el mayor contenido de proteína se observó a los 95 d para ambos quesos, mientras que disminuyó a los 180 d (Figura 13). Esto concuerda con lo encontrado por Alonzo-Paz, Lugo-Cervantes, Tovar-Pérez & Chombo-Morales (2016) en extractos acuosos de queso Cotija en donde el contenido de proteína disminuyó entre los 8 y 90 d de maduración de 5.4 a 2.4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de queso, respectivamente. La disminución en el contenido de proteína se asoció con el incremento en la concentración de péptidos liberados (Alonzo-Paz *et al.*, 2016). Esto mantiene relación con los cambios en la solubilidad, puesto que la ruptura de enlaces peptídicos aumenta los niveles de grupos amino y

carboxilo libres, adicional a un cambio en la hidrofobicidad, ya sea un aumento o disminución debida a la hidrólisis y liberación de péptidos hidrófobos (Sarmadi & Ismail, 2010).

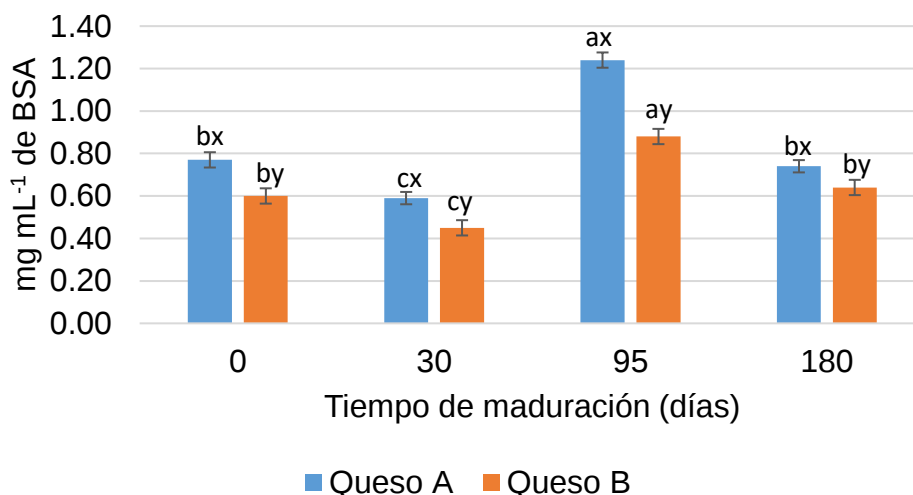


Figura 13. Proteína (mg·mL⁻¹, $\pm$ error estándar) en extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan durante la maduración significativa ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo. a, b, c (diferencia significativa entre tiempos $p \leq 0.05$) y x, y (diferencia significativa entre quesos $p \leq 0.05$).

8.5.2. Grado de hidrólisis en extractos acuosos

El análisis estadístico señaló diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo pero no para el factor queso o la interacción de ambos factores. El mayor porcentaje de grado de hidrólisis se observó a los 95 y 180 d de maduración (Figura 14). Esto porque la hidrólisis proteica durante la maduración genera la ruptura de enlaces peptídicos, en consecuencia la producción de péptidos de menor tamaño e incluso aminoácidos libres (Vioque, Clemente, Pedroche, Yust, & Millán, 2001). Las caseínas se caracterizan por tener una estructura «random coil» que les proporciona flexibilidad y facilidad de hidrólisis en comparación a las proteínas del lactosuero (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008). De acuerdo con Vioque *et al.* (2001) el grado de hidrólisis presentado en los extractos es bajo, debido a que se encuentran en el intervalo de 1 a 10 %. Alonzo-Paz *et al.* (2016) encontraron en queso Cotija porcentajes de grado de hidrólisis entre 7.89 % y 25

% para 8 y 90 d de maduración, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados incrementó conforme transcurrió el tiempo de maduración. Esto implica un aumento en la concentración de grupos α -amino libres generados a través del sistema proteolítico de las BAL presentes en el queso, debido a que degradan péptidos para obtener aminoácidos (Torres, 2014). El grado de hidrólisis afecta el cambio en la composición de aminoácidos y esto podría modular la actividad biológica de los péptidos formados durante la hidrólisis (Jamdar *et al.*, 2010). Por ejemplo, la generación de electrodonadores, los cuales pueden reaccionar con radicales libres, convirtiéndolos en moléculas más estables y terminando las reacciones en cadena (Corrêa *et al.*, 2011).

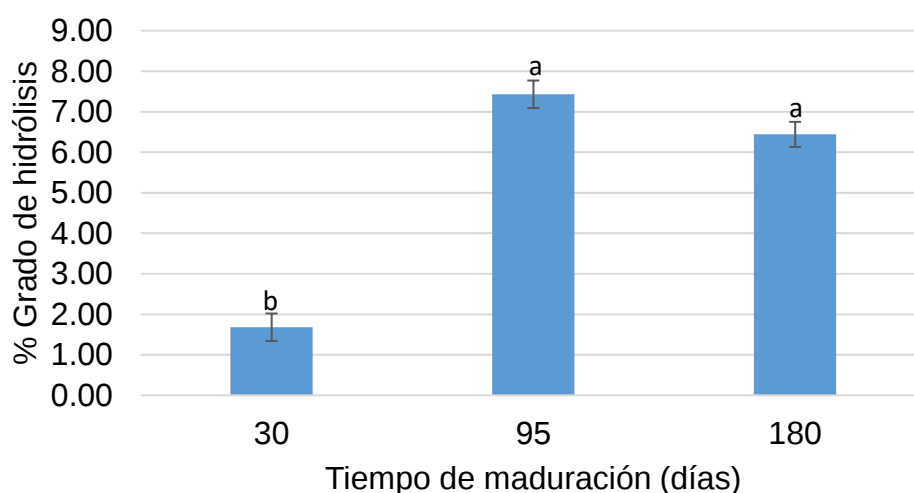


Figura 14. Porcentaje de grado de hidrólisis de queso añejo de Zacazonapan ($\pm$ error estándar) significativo para el factor tiempo de maduración. Valores con distinta letra son estadísticamente diferentes de acuerdo a DMS ($p \leq 0.05$).

8.5.3. Actividad antioxidante *in vitro*

Captación de radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El análisis estadístico indicó solo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo pero no para el factor queso o la interacción de ambos factores. En la Figura 15 se muestra el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH respecto

al tiempo de maduración, el cual fue mayor a los 30 y 180 d. Estos resultados se pueden asociar al grado de hidrólisis de cada uno de los extractos (Jamdar *et al.*, 2010) debido a la dinámica de reacciones llevada a cabo durante la maduración del queso relacionado con la degradación de las caseínas (Vegarud, Langsrud, & Svenning, 2000). Éstas fácilmente degradables debido a su estructura «random coil» (conformación polimérica donde los monómeros se orientan de manera aleatoria, mientras se encuentran enlazados a unidades adyacentes) (Vegarud, Langsrud, & Svenning, 2000). Esto ha sido reportado por Öztürk & Akin (2018) en queso Tulum elaborado con leche de vaca donde la capacidad antioxidante incrementó a medida que transcurrió el tiempo de maduración de 0 - 120 d con 13.25 y 30.96 %, respectivamente, y de 21.58 % y 29.87 % en quesos de leche de cabra, respectivamente.

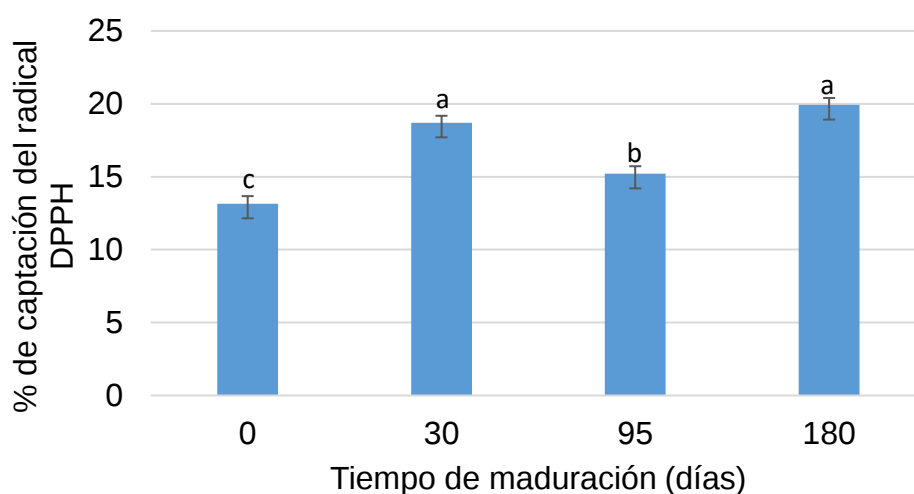


Figura 15. Porcentaje de captación del radical DPPH ($\pm$ error estándar) significativo para el factor tiempo de maduración en queso añejo de Zacazonapan. Valores con distinta letra son estadísticamente diferentes de acuerdo con DMS ($p \leq 0.05$).

Además, la captación del radical DPPH se relacionó con la liberación de péptidos y su subsecuente degradación o acumulación. Así mismo a la presencia en su secuencia de aminoácidos ácidos y básicos, al contenido de péptidos hidrofóbicos y una baja polaridad (Ardö *et al.*, 2017; Meira *et al.*, 2012; Öztürk &

Akin, 2018; Sun *et al.*, 2015). Estas dos últimas características incrementan la solubilidad en entornos no polares facilitando así la interacción con los radicales libres (Kim, Je, & Kim, 2007). Por otro lado, las condiciones físicas de la matriz proteínica, en este caso el queso, sobre la cual actúan determinadas enzimas desarrollando una composición específica que se asocia a la actividad antioxidante generada (Ardö *et al.*, 2017). La liberación de péptidos antioxidantes se produce no solo durante la maduración sino también durante el proceso de elaboración del queso (Hernández-Galán *et al.*, 2017).

Los cambios en la actividad antioxidante en los extractos acuosos del queso de Zacazonapan podrían relacionarse también con la presencia de aminoácidos libres y en parte a la liberación de péptidos (Bottesini *et al.*, 2013), aunque Elías *et al.* (2008) señalaron que los aminoácidos libres no son antioxidantes efectivos. Autores reportan que la efectividad de los péptidos en comparación con los aminoácidos libres estriba en las propiedades químicas y físicas únicas conferidas por sus secuencias, especialmente la estabilidad de los péptidos radicales resultantes que no inician ni propagan reacciones oxidativas (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

La actividad antioxidante obtenida en los extractos de queso añejo de Zacazonapan está determinada por la concentración utilizada (0.3 mg de proteína por mL⁻¹ de extracto) ya que investigaciones señalaron que una potencial captación del radical DPPH se relacionó con un aumento en la concentración del extracto acuoso (Silva *et al.*, 2019; Timón *et al.*, 2014), obteniéndose hasta un 63.27 % con una concentración de péptido de 20 mg mL⁻¹ (Silva *et al.*, 2019). Otro factor importante en la actividad antioxidante es el tamaño de los péptidos que estén presentes en los extractos acuosos del queso, ya que se ha reportado mayor captación del radical DPPH en fracciones de péptidos mayores de 10 kDa (Rae *et al.*, 2010).

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

El análisis estadístico no indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor queso ni en cuanto al factor tiempo, caso contrario la interacción de ambos factores. Respecto a esta última, se observó que para ambos quesos incrementó la capacidad de absorber radicales peroxilo ($\text{ROO} \cdot$) a medida que transcurrió el tiempo de maduración (Figura 16). Esto concuerda con Rashidinejad, Birch, Sun-Waterhouse, & Everett (2013) quienes señalaron un incremento en los valores de ORAC dependientes del tiempo de maduración. Esto puede relacionarse con la amplia variedad de proteinasas y peptidasas que catalizan la proteólisis en quesos durante la maduración (McSweeney, 2004). A través de estas enzimas las caseínas serán hidrolizadas a péptidos de mayor tamaño (insolubles en agua) y de tamaño intermedio (solubles en agua), enseguida se degradarán a péptidos de cadena corta y aminoácidos (Fox, 1989; McSweeney, 2004). Una alta actividad antioxidante en este tipo de ensayo se ha relacionado a la presencia de aminoácidos como el Trp y Tyr, por ser donantes de hidrógeno para el $\text{ROO} \cdot$, formando radicales indoilo y fenoxilo más estables. Otros aminoácidos reportados son la Met, la cual es propensa a la oxidación a sulfóxido de Met, y la Cys capaz de donar el átomo de hidrógeno correspondiente al azufre (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

Los diferentes comportamientos de la actividad antioxidante de los extractos del queso en ambos métodos se asocian a las diferencias en sus mecanismos de reacción, condiciones e incluso en los parámetros de detección (Delgadillo-Puga *et al.*, 2019).

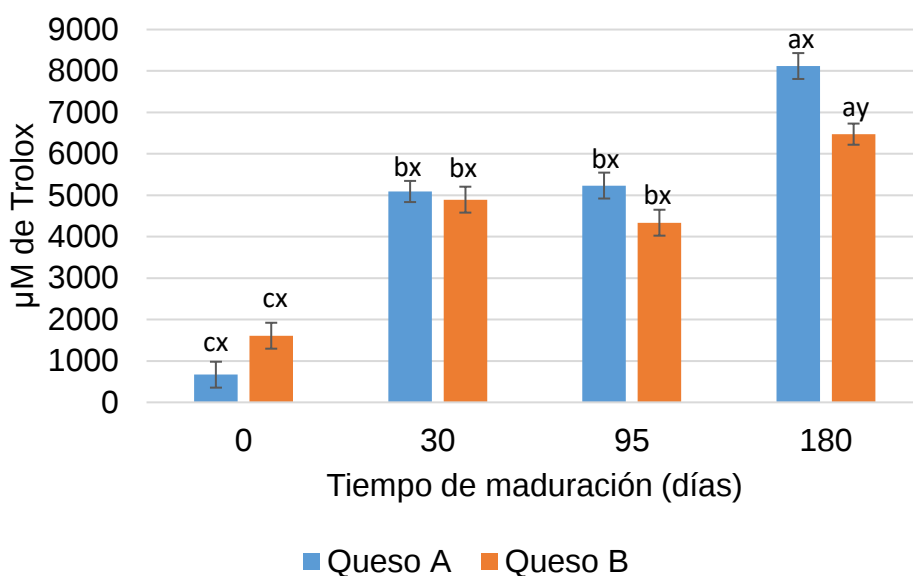


Figura 16. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno ($\pm$ error estándar) significativo ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo. a, b, c (diferencia significativa entre tiempos $p \leq 0.05$) y x,y (diferencia significativa entre quesos $p \leq 0.05$).

El método ORAC considera el tiempo y grado de captación del radical libre por parte del antioxidante (Prior, 2015), así como proporciona una medida directa de la capacidad antioxidante de la ruptura de una cadena hidrofílica y lipofílica en presencia de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Este tipo de ensayo implica la transferencia de átomos de hidrógeno aplicando un esquema competitivo en el cual tanto antioxidante y sustrato compiten por los radicales peroxil ($\text{ROO}\cdot$) generados (Zulueta, Esteve, & Frígola, 2009). Mientras que métodos asociados a una transferencia de electrones como el DPPH (puede aceptar hidrógeno) miden la capacidad del antioxidante para reducir a un oxidante, lo cual es detectado mediante su cambio de color (Xia, Bamdad, Gänzle, & Chen, 2012; Zulueta *et al.*, 2009). En el caso del DPPH, la reacción estequiometría difiere con el tipo de antioxidante (Becker, Nissen, & Skibsted, 2004). Cabe destacar que, los métodos basados en radicales estables que no están presentes en sistemas biológicos han sido criticados, en contraste al uso de los radicales de vida corta

como hidroxil ($\cdot\text{OH}$) y peroxil ($\text{ROO}\cdot$) productos intermedios de procesos oxidativos (Becker *et al.*, 2004).

En este sentido, los péptidos pueden actuar por diversos mecanismos antioxidantes bajo condiciones variables, reflejando las propiedades multifuncionales de estos compuestos en procesos fisiológicos y procesos de oxidación relacionados a los alimentos (Gómez-Ruiz, López-Expósito, Pihlanto, Ramos, & Recio, 2008). Autores señalaron que el efecto antioxidante de caseína y péptidos derivados de las mismas no solo se debe a la donación de átomos de hidrógeno sino que la diferencia en captación puede ser atribuida a la solubilidad del radical (Rival, Boeriu, & Wichers, 2001), a la composición de aminoácidos, secuencia y tamaño (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

8.6. Conclusiones

En esta investigación se determinó la cantidad de proteína soluble en los extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan y el porcentaje de grado de hidrólisis. Esta última hace evidente la proteólisis generada durante el proceso de maduración del queso; la cual llevó a la generación de péptidos con la capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno y de captar a los radicales libres DPPH, y peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) haciéndolos moléculas más estables y menos perjudiciales o inofensivas (ruptura de la reacción en cadena del radical). La variación que existió entre ambos métodos puede relacionarse con sus diferencias en los mecanismos de reacción, condiciones e incluso en los parámetros de detección. Los extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan con diferentes tiempos de maduración son fuente de péptidos con propiedades antioxidantes. Este es el primer reporte de péptidos con actividad antioxidante en este queso tradicional mexicano. Por ello, en posteriores investigaciones se sugiere incrementar la concentración del extracto, adicional a realizar un fraccionamiento por peso molecular y subsecuente purificación de los péptidos con mayor actividad. Esto con el fin de ser utilizados en alimentos que benefician la salud, ya sea mejorando la calidad de vida al prevenir o postergar

la presencia de enfermedades degenerativas. La información generada puede resultar en la revalorización de este queso y en un impacto positivo para seguir con su elaboración evitando ser sustituido por los denominados pseudoquesos.

8.7. Literatura citada

- Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S. T., Arvízu, S. M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., ... Amaya-Llano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.005>
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Alonzo-Paz, A. L., Lugo-Cervantes, E. C., Tovar-Pérez, E. G., & Chombo-Morales, M. P. (2016). Evaluación de la proteólisis del queso Cotija región de origen MC asociado al tiempo de maduración. In *Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ*.
- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. (2017a). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Fourth, pp. 445–482). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. (2017b). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*, 1(2), 445–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Becker, E. M., Nissen, L. R., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219(6), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1012-4>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42(2), 227–236. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., ... Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 953–958. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.821696>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus

- deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Corrêa, F. A. P., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, M. M. S., Lopes, C. F., Segalin, J., ... Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247–2254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004a). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004b). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Delgadillo-Puga, C., Cuchillo-Hilario, M., León-Ortiz, L., Ramírez-Rodríguez, A., Cabiddu, A., Navarro-Ocaña, A., ... Pedraza-Chaverri, J. (2019). Goats' feeding supplementation with acacia farnesiana pods and their relationship with milk composition: Fatty acids, polyphenols, and antioxidant activity. *Animals*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/ani9080515>
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79246-8)
- Gómez-Ruiz, J. Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., & Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1061–1067. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0820-3>
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., & Sangwan, R. B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 339–347. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00509.x>
- Hernández-Galán, L., Cardador-martínez, A., López-del-, M., Picque, D., Spinnler, H. E., Martín, S. T., ... Martín, S. T. (2017). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fresh goat cheese prepared without starter culture: a preliminary study. *CyTA - Journal of Food*, 15(1), 49–57. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1202325>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H. E., López-del-Castillo Lozano, M., & Martín del Campo, S. T. (2016). ACEI and

- antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85–91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n3p85>
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588–593. <https://doi.org/10.1021/jf048626m>
- Hernández, M. C., Hernández, M. A., Villegas, D. G. A. Z., & Aguirre, M. E. (2011). El proceso socio-técnico de producción de Queso Añejo de Zacazonapan, Estado de México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2(2), 161–176.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>
- Kim, S. Y., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.006>
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3), 127–140. <https://doi.org/10.4038/agrieast.v10i0.25>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>

- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2018). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M. C., Adesso, S., Ostacolo, C., ... Campiglia, P. (2016). Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of «Stracchino» soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 26, 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.021>
- Prior, R. L. (2015a). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants / bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Prior, R. L. (2015b). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rae, P. S., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., & Everett, D. W. (2013). Effects of catechin on the phenolic content and antioxidant properties of low-fat cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(12), 2448–2455. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12234>
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 295–302. <https://doi.org/10.1021/jf0003911>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., ... Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal «coalho» cheese

- from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135(3), 1533–1538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058>
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327–345.
- Sun, H., Yao, X., Wang, X., Wu, Y., Liu, Y., Tang, J., & Feng, J. (2015). Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation. *CYTA - Journal of Food*, 13(2), 264–272. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.948072>
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petrón, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.020>
- Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Svenning, C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), S91–S98. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002300>
- Venereo, G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, 19(38), 146–164. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=417/41719205006>
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. del M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 132–136. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1509–1518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.063>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

9. BIOACTIVIDAD, ANALISIS SENSORIAL Y TEXTURAL DE QUESO AÑEJO DE ZACAZONAPAN DURANTE SU MADURACIÓN

9.1. Resumen

La proteólisis durante la maduración de los quesos se asocia a la generación de péptidos con actividad biológica, así como a los cambios en las características sensoriales ya sea de sabor y texturales. El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antimicrobiana y antitrombótica, así como los cambios en las características sensoriales del queso añejo de Zacazonapan, durante la maduración. A extractos acuosos obtenidos a partir de quesos provenientes de dos queserías (A y B) y con maduración de 0, 30, 95 y 180 d, se les determinó actividad antimicrobiana midiendo la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* K12, *Listeria innocua* ATCC3309 y *Micrococcus luteus* CBBB 1018. La actividad antitrombótica fue determinada por inhibición de la formación del coágulo. Los quesos fueron descritos sensorialmente por aplicación de un Perfil Flash, y texturalmente por un análisis de perfil de textura (TPA). Los resultados indicaron una mayor actividad antimicrobiana de los extractos contra bacterias gram positiva. La actividad antitrombótica fue nula. Sensorialmente, los quesos con 180 d de maduración se asociaron a atributos como sabor residual amargo, olor a pies, firmeza o dureza, pungencia o picor, sabor a queso madurado y apariencia porosa; contrariamente a los quesos de 0 d. Respecto a la textura, la cohesividad disminuyó en el queso, mientras que la masticabilidad aumentó al transcurrir la maduración. Los quesos con 180 d de maduración son más duros (queso A, 11.52 ± 0.28 y queso B, 8.81 ± 0.28 N) y menos elásticos (queso A, 0.37 ± 0.08 y queso B, 0.46 ± 0.28).

Palabras clave: péptidos bioactivos, antimicrobiano, antitrombótico, perfil Flash, textura.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Verenice Torres Salas

Director de Tesis: Arturo Hernández Montes, Ph.D.

BIOACTIVITY, SENSORY AND TEXTURAL ANALYSIS OF ZACAZONAPAN AÑEJO CHEESE DURING RIPENING

Abstract

Proteolysis during cheese ripening is associated with generation of peptides with biological activity, as well as changes in sensory characteristics, both flavor and textural. The research objective was to determine the antimicrobial and antithrombotic activity, as well as the changes in the sensory and textural characteristics of Zacazonapan añejo cheese, during ripening. Aqueous extracts obtained from cheeses from two cheese factories (A and B) and with ripened of 0, 30, 95 and 180 days, were determined antimicrobial activity by measuring the inhibition of the growth of *Escherichia coli* K12, *Listeria innocua* ATCC3309 and *Micrococcus luteus* CBBB 1018 at 650 nm. Antithrombotic activity was determined by inhibition of clot formation. The cheeses were described sensory by application of a Flash Profile, and texturally by texture profile analysis (TPA). The results indicated greater antimicrobial activity of the extracts against gram positive bacteria. Antithrombotic activity was null. Sensory, cheese with 180 days of ripening was associated with attributes such as bitter residual taste, foot odor, firmness or hardness, pungency or itching, ripened cheese flavor and porous appearance: contrary the cheeses of 0 days. Regarding texture, cohesiveness decreased in cheese ripened, while chewiness increased. The cheeses at 180 d of ripening are harder (cheese A, 11.52 ± 0.28 and cheese B, 8.81 ± 0.28 N) and less elastic (cheese A, 0.37 ± 0.08 and cheese B, 0.46 ± 0.28).

Keywords: bioactive peptides, antimicrobial, antithrombotic, Flash profile, texture.

9.2. Introducción

La mayoría de los componentes de la leche se concentran en el queso (proteína, grasa, vitaminas, minerales, etc.) (Kwak *et al.*, 2011; Lamichhane, Kelly, & Sheehan, 2018; Walstra, Wouters, & Geurts, 2006). Estos componentes presentan cambios secuenciales durante la maduración, asociado a las enzimas propias de la leche, enzimas coagulantes, microorganismos que pueblan la pasta del queso y las enzimas secretadas por éstos (Sánchez-Ponte, 2003). El proceso principal en la maduración es la proteólisis, en la cual se generan diversos compuestos, dentro de ellos los péptidos, los cuales pueden tener bioactividad ya sea antihipertensiva, antioxidante, opioide, antiproliferativa, antimicrobiana y moduladora de absorción mineral (López-Expósito *et al.*, 2017). Los péptidos con actividad antimicrobiana están compuestos de menos de 50 aminoácidos, en su mayoría hidrófobos (Saadi *et al.*, 2015) y cuyo espectro de actividad puede ser antiviral, antifúngica, antibacteriana e incluso antitumoral (Téllez & Castaño, 2014). Por otro parte, los péptidos con actividad antitrombótica son aquellos capaces de inhibir la reacción de la coagulación del fibrinógeno catalizada por la trombina (EC 3.4.21.5) (Domínguez-González *et al.*, 2014).

Durante la maduración, los quesos también desarrollan características sensoriales determinadas en gran medida por la estructura y los procesos bioquímicos (Domingues, Parra, Giacometti, & Lúcia, 2019). Los factores que impactan sobre la textura incluyen a los glóbulos de grasa ocluidos dentro de la matriz proteica, los depósitos libres de grasa, la densidad de la matriz de caseína, el grado de proteólisis, el contenido de agua y la fuerza de unión, y la densidad entre cadenas de caseína (Everett & Auty, 2008). Las diferencias sensoriales entre productos pueden ser descritas y cuantificadas mediante un perfil sensorial (Delarue & Sieffermann, 2004), como el perfil Flash. Éste es un método rápido y flexible, derivado de la combinación del perfil de elección libre con un método de clasificación ordinal e intuitivo (Dairou & Sieffermann, 2002; Delarue & Sieffermann, 2004).

El queso añejo de Zacazonapan es un queso tradicional mexicano elaborado en el suroeste del Estado de México, México; con leche cruda de vacas en libre pastoreo, y caracterizado por su forma prismática rectangular con una cara convexa y cubierto con una pasta de chile guajillo, adicional a que durante su proceso de elaboración se utiliza cuajo de becerros (principio activo la quimosina) y sal de Araró (Hernández *et al.*, 2011). Dentro de este contexto, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antimicrobiana y antitrombótica de extractos de queso añejo de Zacazonapan, así como las características sensoriales del queso y el cambio en su textura durante su maduración.

9.3. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos utilizados fueron Catalasa a partir de hígado bovino, Proteinasa K a partir de *Tritirachium album*, Fibrinógeno de plasma humano y Trombina de plasma humano de la marca Sigma Aldrich (Missouri, EE. UU.). El reactivo Tris correspondió a la marca BioRad (California, EE. UU.). La cepa indicadora *Escherichia coli* K12 se obtuvo de la empresa Microbiologics (Minnesota, EE. UU.), *Listeria innocua* ATCC3309 del cepario de la Universidad Nacional Autónoma de México (Ciudad de México, México) y *Micrococcus luteus* CDBBB1018 del Departamento de Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Ciudad de México, México). Los caldos nutritivo e infusión cerebro corazón, peptona de caseína fueron de la marca BDBioxon (Becton Dickinson de México, S. A. de C. V., Estado de México, México). Los reactivos hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl) y cloruro de sodio (NaCl) correspondieron a la marca Meyer® (Química Suastes, S.A. de C.V., Ciudad de México, México), y la glucosa (C₆H₁₂O₆) de la marca Merck® (Darmstadt, Alemania).

9.3.1. Obtención de muestras

Piezas de queso de un kilogramo se obtuvieron en dos queserías de Zacazonapan, Estado de México (codificados como A y B) ubicado dentro de las coordenadas geográficas 19° 04' 22" latitud norte y 100° 15' 18" longitud oeste, 1350 m de altitud. En las queserías, cada pieza (unidad experimental) se obtuvo de un lote de leche que se cuajó en la misma tina, para asignar las tres repeticiones las piezas se elaboraron en días consecutivos. Las piezas se almacenaron a 15 °C y una humedad relativa de 85 %, para ser muestreadas a los 0, 30, 95 y 180 días de maduración.

9.3.2. Análisis fisicoquímicos del queso

El pH de las muestras se determinó mediante un potenciómetro Conductronic pH120 (Conductronic, Puebla, México) con el método descrito por Villegas (2004) y la actividad de agua (a_w) a través del método propuesto por Öztürk & Akin (2018) con un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices Inc., Washington, EE. UU.). El análisis composicional (proteína, grasa, humedad, sal, minerales y sólidos totales) se realizó con un analizador FoodScan™ Lab (FOSS Analytical AB, Hillerød, Dinamarca). Las determinaciones se realizaron por triplicado para ambas queserías en los cuatro tiempos de maduración (0, 30, 95 y 180 d).

9.3.3. Extracción de compuestos solubles en agua

La extracción de los compuestos solubles del queso añejo de Zacazonapan se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rae, Phillips, & Kailasapathy, (2010) con modificaciones respecto a la homogenización, tiempo de centrifugación y ajuste de pH. 250 g de queso se pesaron y homogeneizaron con 750 mL de agua destilada durante 5 min en una licuadora (Osterizer, Wisconsin, EE.UU.). A continuación, la mezcla se agitó a 150 rpm durante 1 h a 40 °C en una incubadora orbital (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Al término de este período, el pH de la mezcla se llevó a 4.5 utilizando NaOH y HCl 1 M. Después la mezcla se centrifugó a 8801 g por 10 min a 4 °C y se descartó

tanto la capa superior de grasa como el sedimento. El extracto acuoso, se filtró a gravedad por medio de una capa de algodón, y enseguida se filtró bajo condiciones de vacío utilizando papel Whatman No. 42. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C.

9.3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana

Para determinar la presencia de sustancias proteicas inhibidoras del crecimiento bacteriano en los distintos extractos, fue necesario realizar diferentes tratamientos con la finalidad de eliminar de manera secuencial la variedad de compuestos inhibidores presentes como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y sustancias proteicas. El primer tratamiento consistió en neutralizar los ácidos orgánicos presentes en 30 mL de los distintos extractos llevando el pH a 7.0, con NaOH 1 M (Sezer, 2009). Enseguida se tomó una alícuota de 10 mL de cada extracto neutralizado y se conservó a 4 °C. A la alícuota restante de 20 mL de cada extracto neutralizado, se le agregó catalasa (0.1 mg mL⁻¹) y se incubó a 25 ± 1 °C durante 90 min, esto para eliminar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). A continuación, con el objetivo de inactivar a la catalasa, las alícuotas de cada extracto se calentaron a 60 °C durante 10 min (Sezer, 2009). De esta alícuota se separaron nuevamente 10 mL de cada extracto tratado y se conservaron a 4 °C.

Finalmente, las alícuotas de 10 mL restantes de cada extracto tratado con catalasa se trataron con proteinasa K (0.1 mg mL⁻¹) incubando a 37 °C durante 2 h, con la finalidad de eliminar las sustancias proteicas presentes en las muestras (Mobarez, Doust, Sattari, & Mantheghi, 2008). A continuación, se inactivó la enzima a 60 °C durante 10 min. Estas últimas alícuotas y las conservadas a 4 °C se usaron para aplicar la técnica reportada por Papagianni, Avramidis, Filioussis, Dasiou, & Ambrosiadis (2006). Para ello, se utilizaron como microorganismos indicadores a *Escherichia coli* K12, *Micrococcus luteus* CD-B-BB1018 y *Listeria innocua* ATCC 33090. Cada microorganismo se cultivó por separado: *E. coli* K12 en caldo nutritivo, *M. luteus* CDBBB1018 en caldo infusión cerebro-corazón y *L.*

innocua ATCC 33090 en caldo nutritivo enriquecido con 2.5 g·L⁻¹ de glucosa, 5 g·L⁻¹ de NaCl y 15 g·L⁻¹ de peptona de caseína. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h a 150 rpm en una incubadora orbital Max Q 4450 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Al cabo de este tiempo, un volumen de 12.5 mL de cada cultivo se transfirió a una botella serológica con 50 mL de medio fresco y se incubó durante 3 h a 37 °C con agitación a 150 rpm para obtener células en fase logarítmica de crecimiento. Los tubos para realizar la prueba con los respectivos microorganismos contenían 0.5 mL ya sea del extracto con ácidos orgánicos neutralizados, o el tratado con catalasa o del tratado con proteinasa K. Y en el caso del control el respectivo medio de cultivo para cada microorganismo. Además 2 mL de cultivo con el respectivo microorganismo indicador cuya absorbancia inicial se llevó a 0.120 aproximadamente. Después, de 3 h de incubación a 37 °C se midió la absorbancia a 650 nm, el incremento en la absorbancia implicó una no inhibición del crecimiento (Acebo-González & Hernández-García, 2013). El porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano se determinó con la ecuación 10:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = 100 - \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{Ec. 10}$$

Donde:

A= Absorbancia a 650 nm de la prueba después de 3 h de incubación.

B= Absorbancia a 650 nm del control a las 3 h de incubación.

9.3.5. Determinación de la actividad antitrombótica

La determinación se realizó con el método descrito por Zhang, Wang, & Xu (2008) Para llevar a cabo esta determinación los extractos se centrifugaron a 3438 g durante 10 min a 4 °C y se filtraron con papel Whatman No. 42. A continuación, se depositaron en cada pocillo de la microplaca 40 µL de cada extracto y 140 µL de fibrinógeno 0.1 % (p/v). La mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C y la absorbancia se leyó a 405 nm. Enseguida a la mezcla se adicionaron 10 µL de

trombina 12 U·mL⁻¹ (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) y se incubó durante 10 min a 37 °C. El blanco se preparó sustituyendo el extracto y la trombina por amortiguador (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.12 mM, pH 7.2). Mientras que, el testigo con 100 % de actividad se preparó sustituyendo el extracto por amortiguador (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.12 mM, pH 7.2) bajo las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado y la absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de microplacas BioTek Synergy 2 (Vermont, EE. UU.). La inhibición de la formación del coágulo se calculó con la ecuación 11:

$$\text{Inhibición de la formación del coágulo (\%)} = \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100 \quad \text{Ec. 11}$$

Donde:

A= absorbancia después de agregar la trombina e incubar (testigo)

B= absorbancia inicial del fibrinógeno (testigo).

C= absorbancia después de agregar la trombina e incubar (extracto).

D= absorbancia inicial del extracto con fibrinógeno.

9.3.6. Perfil flash de queso añejo de Zacazonapan

El método utilizado fue el descrito por Dairou y Sieffermann (2002), con modificaciones ya que se obtuvo una lista consensuada de atributos. La prueba se aplicó a 17 estudiantes del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). En la primera sesión, a cada panelista se le presentaron las seis muestras de queso simultáneamente y se les pidió crearán una lista de atributos con los que pudieran diferenciar a las seis muestras de queso entre sí, esta sesión duró aproximadamente 30 min. A continuación, se socializó y consensó la información en una lista definitiva de 14 atributos, los cuales fueron: color amarillo, apariencia porosa, olor a pies, aroma a leche ácida, firmeza o dureza (al presionar el queso con las muelas), desmoronable (en boca), arenosidad o granulosidad, humedad, sabor salado, sabor ácido, sabor a queso madurado, pungencia o picor, sabor residual amargo, duración del sabor en la boca. En una segunda sesión, a cada panelista se le presentaron las seis

muestras (dos cubos de queso de 1 x 1 x 1.5 cm por muestra) de manera simultánea y se les pidió jerarquizarlas para cada uno de los atributos utilizando una escala ordinal del 1 al 6, considerando 6 como la muestra con la mayor intensidad del atributo, la sesión duró alrededor de 90 min. Los panelistas tuvieron disponible agua y galletas habaneras clásicas (Gamesa) para enjuagarse la boca entre muestras. La prueba se realizó en el laboratorio de evaluación sensorial de la UACH.

9.3.7. Análisis de perfil de textura (TPA)

El TPA se realizó con el método señalado por Hernández-Morales, Hernández-Montes, Aguirre-Mandujano, & Villegas (2010), mediante un analizador de textura TA Xt2i (Stable Micro Systems; Surrey, UK) con una celda de carga de 5 kg. Las muestras (cilindros de 10 mm de diámetro y de altura) se comprimieron uniaxialmente a una deformación del 50 % utilizando un disco de acrílico de 35 mm de diámetro (A/BE35) y una velocidad de pre-ensayo y post-ensayo del cabezal de 1 mm·s⁻¹. A partir de curvas de fuerza/tiempo se determinó la dureza (N), la adhesividad (N·s), la cohesividad (adimensional), la elasticidad (adimensional) y la masticabilidad (N).

9.4. Análisis estadístico

El diseño aplicado para el análisis de la actividad antimicrobiana y antitrombótica, así como para el análisis del perfil de textura (TPA) fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el cual consideró los factores queso (dos niveles A y B), y al factor tiempo con cuatro niveles (0, 30, 95 y 180 d de maduración). Las medias se compararon con la prueba de diferencia mínima significativa a un nivel de significancia de 5 % (DMS), usando el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., Carolina del Norte, EE. UU.).

En el caso del perfil Flash, la unidad experimental fueron dos cubos de queso por muestra. El diseño aplicado para el análisis fue un completamente al azar, con el fin de seleccionar a los panelistas que mostrarán diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

en la mayoría de los atributos, mediante el programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). A continuación, se realizó un análisis procrusteano generalizado (APG) mediante el programa XLSTAT versión 2014 (Addinsoft, EE. UU.).

9.5. Resultados

9.5.1. Análisis fisicoquímicos del queso

El análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo o su interacción en cada uno de los parámetros fisicoquímicos. En cuanto al factor queso, el queso B destacó en el contenido de proteína, sólidos totales y sal, mientras que el queso A presentó el mayor contenido en humedad y grasa (Cuadro 48). La humedad mantiene relación con las veces que la cuajada se corta y se drena, así como a las veces que se muele antes de colocarse en los moldes (Hernández-Morales, Hernández-Montes, Aguirre-Mandujano, & Villegas, 2010).

Cuadro 48. Porcentaje de parámetros fisicoquímicos con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor queso.

Parámetro	Queso	
	A	B
Proteína	28.33±0.31b ^z	30.85±0.31a
Humedad	37.92±0.31a	35.26±0.31b
Grasa	27.80±0.20a	26.65±0.20b
Sólidos totales	62.07±0.31b	64.74±0.31a
Sal	1.71±0.029b	2.28±0.027a

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

El factor tiempo fue significativo ($p \leq 0.05$) para el contenido de proteína, grasa, sal, sólidos totales y humedad. La proteína, grasa y por consecuencia los sólidos totales incrementaron al transcurrir el tiempo de maduración, mientras que en la humedad se observó lo contrario (Cuadro 49). Esto se relacionó con el proceso de deshidratación que es propio de la elaboración del queso, donde el contenido

de proteína y grasa de la leche se concentran y hay pérdida de humedad; relacionado con las condiciones de la temperatura, la sinéresis, la acidificación de la pasta, el trabajo mecánico, la adición de sal y el proceso de maduración (Fox, 1989; Ramírez-Navas, Aguirre-Londoño, Aristizabal-Ferreira, & Castro-Narváez, 2016). Por otro lado, la concentración de sal incrementó hasta los 95 días, este compuesto mantiene relación con un sabor deseable en el queso, contribuye a ocultar el amargor, controla la actividad microbiana y enzimática, se relaciona con la humedad y los cambios físicos en las proteínas del queso (solubilidad y conformación) que influyen en la textura del mismo (Guinee & Fox, 2004; Ramírez-Navas *et al.*, 2016).

Cuadro 49. Porcentaje de parámetros fisicoquímicos con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al tiempo de maduración (0, 30, 95 y 180 d).

Tiempo (días)	Proteína	Humedad	Grasa	Sal	Sólidos totales
	%				
0	23.53±0.43d ^z	45.97±0.43a	24.69±0.28d	1.87±0.038b	54.02±0.43d
30	28.17±0.43c	38.99±0.43b	26.36±0.28c	1.96±0.041b	61.01±0.43c
95	32.34±0.43b	32.63±0.43c	28.28±0.28b	2.20±0.038a	67.36±0.43b
180	34.33±0.43a	28.77±0.43d	29.59±0.28a	1.96±0.041b	71.23±0.43a

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en columna indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

La interacción entre los factores queso-tiempo fue significativa ($p \leq 0.05$) para los parámetros de pH, actividad de agua (a_w) y porcentaje de minerales (Cuadro 50). El pH en el queso B permaneció constante durante la maduración, mientras que en el queso A disminuyó en 30 y 95 d, asociado a la producción de ácido láctico (Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001). La mayor a_w para ambos quesos se presentó en el tiempo 0 y disminuyó conforme transcurrió la maduración. Esto concuerda con lo reportado por Hickey, Guinee, Hou, & Wilkinson (2013) para queso Cheddar con diferente tiempo de maduración, siendo de 0.964 al día 1 y de 0.956 a los 270 d. Marcos (1981) reportaron una relación positiva entre el contenido de humedad y la a_w . Por otra parte, Lamichhane *et al.* (2018) reportaron un decremento en la a_w conforme se incrementó el contenido de nitrógeno no

proteico y la sal, lo cual influyó en la actividad enzimática y el crecimiento microbiano, relacionados con la estabilidad del producto (Lang & Steinberg, 1980). El decremento en la a_w también se puede asociar a la hidrólisis de cada enlace peptídico en donde se liberan dos nuevos grupos cargados ($\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$) y el agua libre en el queso interacciona con ellos (McSweeney & Sousa, 2000).

En el porcentaje de minerales la tendencia fue a incrementar conforme maduró el queso, siendo el queso B el que presentó los mayores porcentajes. El contenido de minerales, en particular el calcio, está relacionado con la cantidad de puentes salinos, la repulsión electrostática entre las moléculas de caseína y las interacciones hidrofóbicas de proteína en la matriz del queso (Lamothe, Corbeil, Turgeon, & Britten, 2012).

Cuadro 50. Actividad de agua (a_w), pH y minerales en los quesos A y B a los 0, 30, 95 y 180 d de maduración.

Parámetro	Queso	Tiempo de maduración (días)			
		0	30	95	180
pH	A	5.58±0.04a ^z x ^w	5.26±0.043cx	5.43±0.043bx	5.50±0.043abx
	B	5.38±0.04ay	5.39±0.043ax	5.31±0.043ax	5.27±0.043ay
a_w	A	0.98±0.002ax	0.95±0.0002bx	0.93±0.002cx	0.90±0.0002dx
	B	0.97±0.002ay	0.94±0.002by	0.9±0.002cy	0.88±0.002dy
Minerales (%)	A	5.19±0.24by	6.31±0.24ax	6.07±0.20ay	6.26±0.20ay
	B	6.51±0.24cx	6.88±0.20bcx	7.42±0.20bx	8.36±0.20ax

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

9.5.2. Sustancias proteicas inhibidoras del crecimiento bacteriano

Los extractos con 30 días de maduración solo inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* K12, el análisis de varianza indicó diferencia significativa ($p \leq$

0.05) entre quesos, siendo de $6.57 \pm 0.89 \%$ y $7.71 \pm 0.89 \%$ para el queso A y B, respectivamente. Este tipo de inhibición ha sido reportada en extractos acuosos de queso Cheddar Australiano contra *Escherichia coli* ATCC 8739 (Pritchard *et al.*, 2010). El caso contrario también ha sido reportado en extractos obtenidos de quesos Tulum, los cuales no inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Öztürk & Akin, 2018), ni extractos de queso de leche de oveja inhibieron a *Escherichia coli* ATCC 8739 (Meira *et al.*, 2012).

En cuanto a la inhibición de *Listeria innocua* ATCC 33090 el análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en los factores queso, tiempo y su interacción. En esta última la mayor inhibición se presentó a los 0 d para ambos quesos, destacando el queso B (Cuadro 51). Esto porque la maduración prolongada y la proteólisis intensa pueden causar la descomposición de secuencias con actividad antimicrobiana (Rizzello *et al.*, 2005). Uno de los responsables en la generación de fragmentos antimicrobianos durante la maduración es la quimosina, sin excluir las proteasas de las bacterias ácido lácticas (Rizzello *et al.*, 2005). Respecto a *Micrococcus luteus* CDBBB1018, el análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo y su interacción. En la interacción queso-tiempo, destacaron con los mayores porcentajes de inhibición los extractos de 30 d de maduración para el queso A ($17.01 \pm 0.51 \%$), y para el queso B con 180 d ($22.99 \pm 0.93 \%$) (Cuadro 51).

Cuadro 51. Porcentaje de inhibición de *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Micrococcus luteus* CDBBB1018 significativos ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo.

Microorganismo	Queso	Tiempo			
		0	30	95	180
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	A	$6.41 \pm 0.29a^zy^w$	$0 \pm 0.29by$	$0 \pm 0.29by$	$0 \pm 0.29by$
	B	$9.25 \pm 0.35ax$	$5.40 \pm 0.35bx$	$5.09 \pm 0.35bx$	$5.66 \pm 0.35bx$
<i>M. luteus</i> CDBBB1018	A	$0 \pm 0.76bx$	$17.02 \pm 0.93ax$	$0 \pm 0.76by$	$0 \pm 0.76by$
	B	$0 \pm 0.93dx$	$18.45 \pm 0.93bx$	$10.11 \pm 0.93cx$	$22.99 \pm 0.93ax$

^zMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias $\pm$ error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Los extractos acuosos de queso añejo de Zacazonapan tuvieron mayor actividad inhibidora contra las bacterias gram positivas. Esto se relaciona con las diferencias en la composición de la membrana bacteriana, que influye en la acción inhibitoria y la especificidad del extracto antimicrobiano (Öztürk & Akin, 2018). Otros atribuyen la actividad antimicrobiana de algunos extractos acuosos de queso, al contenido mayoritario de péptidos hidrofóbicos, y la no actividad al contenido abundante de péptidos hidrofílicos (Rizzello *et al.*, 2005). Los péptidos antimicrobianos en comparación con los antibióticos son de gran importancia dado que pueden matar células blanco rápidamente, y poseen un amplio espectro de actividad, incluida la actividad contra algunos de los patógenos resistentes a antibióticos (Rizzello *et al.*, 2005).

9.5.3. Actividad antitrombótica de extractos

La actividad de los extractos acuosos de ambos quesos añejos de Zacazonapan durante los 0, 30, 95 y 180 d de maduración fue negativa, bajo las condiciones experimentales evaluadas. Algunos de los péptidos lácteos con esta actividad han sido reportados en extractos acuosos de queso Cheddar elaborado con leche de vaca o leche de búfala (Rafiq, Huma, & Pasha, 2017), en leches fermentadas por *Lactobacillus casei* Shirota (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2019; Rojas-Ronquillo *et al.*, 2012) por *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* (Domingues *et al.*, 2019). Rutherford & Gill (2000) señalaron la existencia de varios péptidos antitrombóticos derivados de la κ -CN y la lactoferrina.

9.5.4. Perfil Flash de queso añejo de Zacazonapan

Al realizar el análisis estadístico de los datos se consideró la selección de 15 panelistas y de 10 atributos que permitieran la diferenciación entre quesos. En el análisis procrusteano generalizado (APG), la transformación óptima de la configuración consensuada indicó que fue suficiente retener los componentes uno y dos, los cuales explicaron el 89.13 % de la variabilidad total de los datos. El primero explicó un 67.04 % de la variabilidad, y los atributos que contribuyeron

con las mayores cargas fueron pungencia o picor, sabor a queso madurado, firmeza o dureza y apariencia porosa. Mientras que el segundo componente explicó el 22.10 % de la variabilidad y las mayores cargas se asociaron a los atributos de color amarillo, arenosidad o granulosidad, desmoronable (en boca), aroma a leche ácida (Figura 17). Estos resultados se acercaron a los reportados para dos quesos mexicanos madurados de leche de cabra (88.07 % y 89.64 %) (Ramírez-Rivera *et al.*, 2017). Domingues *et al.* (2019) aplicaron este

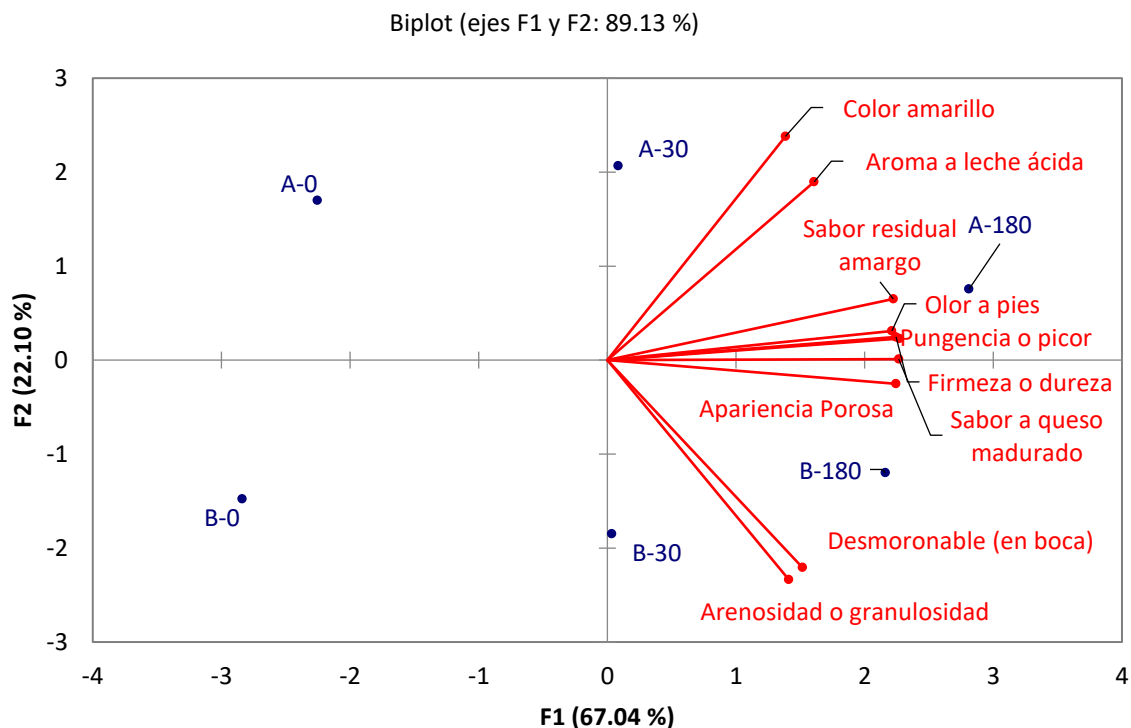


Figura 17. Distribución de los quesos A y B en 0, 30 y 180 d de maduración de acuerdo con los atributos consensuados.

procedimiento para describir queso Camembert y reportaron un 100% de explicación de la variabilidad total con dos componentes, mientras que otra investigación en queso azul señaló un 93.22 % de explicación con los primeros dos componentes.

La Figura 17 muestra la posición de cada queso en sus tres tiempos de maduración (0, 30 y 180 d) y los atributos evaluados a partir del APG. Existió una

clara separación entre los quesos de acuerdo con los atributos consensuados, relacionado con la buena repetibilidad de los evaluadores. Esto coincidió con lo reportado por Domingues *et al.* (2019) en atributos de queso Camembert y por Gkatzionis *et al.* (2013) para atributos de aroma en quesos azul y Cheddar. En la Figura 19 se observa que los quesos con una maduración de 180 d se asociaron principalmente a atributos como sabor residual amargo, olor a pies, firmeza o dureza, pungencia o picor, sabor a queso madurado y apariencia porosa; caso contrario ocurrió con los quesos de 0 d. Esto coincide con algunos atributos obtenidos para quesos madurados de leche de cabra como dureza, amargor después de probar y sabor a queso madurado (Ramírez-Rivera *et al.*, 2017). Mientras que el queso B con 30 d de maduración se asoció con atributos de desmoronable en boca y arenosidad o granulosidad, caso opuesto al queso A con 30 d que se relacionó con atributos de color amarillo y aroma a leche ácida.

Cabe destacar, que los atributos de sabor y aroma son importantes en el queso, originados por la mezcla de cientos de compuestos volátiles y no volátiles producto de reacciones bioquímicas como la proteólisis, lipólisis y glicólisis (McSweeney, 2004). La proteólisis tiene un papel primordial en el sabor del queso y la formación de sabores desagradables mediante la liberación de péptidos hidrofóbicos que generan sabor amargo, y aminoácidos libres que contribuyen al sabor dulce (Ala, Gly, Ser, Thr, Lys y Pro), amargo (His, Met, Val, Arg, Phe, etc.), ácido (Asp, Glu y Asn) o umami (glutamato y aspartato de sodio) (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2000). Adicional a esto, la sal tiene funciones de desarrollo del sabor, influye en la textura, garantiza la conservación y la seguridad bacteriológica (Ramírez-Navas *et al.*, 2016).

9.5.5. Análisis de perfil de textura (TPA)

Las caseínas son el principal componente del queso, están presentes en forma de red en la matriz del queso, dentro de la cual se encuentran intercalados glóbulos de grasa, agua, minerales, bacterias y solutos disueltos como lactosa, ácido láctico, sales solubles y péptidos (Lamichhane *et al.*, 2018). Varias fuerzas

moleculares (puentes de hidrógeno y disulfuro) e interacciones (electrostáticas e hidrofóbicas) entre los componentes del queso se consideran pueden influir en su funcionalidad (Lamichhane *et al.*, 2018). En el TPA, el análisis de varianza señaló diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo o su interacción.

El principal atributo textural que evalúa el consumidor es la masticación, la cual ocurre en la boca (Lamichhane *et al.*, 2018). Respecto a esta variable, el análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en cuanto a los factores queso y tiempo de maduración. El queso A presentó el mayor valor de masticación (Cuadro 52), y ésta incrementó a medida que transcurrió la maduración (Cuadro 53).

La cohesividad también fue significativa ($p \leq 0.05$) para los factores queso y tiempo, el queso A presentó los valores más altos en este parámetro (Cuadro 52). Respecto al factor tiempo de maduración la mayor cohesividad se presentó a los 0 d de maduración, 0.27 unidades por arriba de la cohesividad a 180 d (Cuadro 53). Lo anterior concuerda con lo reportado por Lamothe *et al.* (2012) en queso Cheddar con dos años de maduración, una menor cohesividad y menor elasticidad al ser comparado con un queso Cheddar fresco, el cual por su contenido de humedad exhibe mayor cohesividad y elasticidad.

Cuadro 52. Cohesividad y masticabilidad del queso añejo de Zacazonapan con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el factor queso.

Parámetro	Queso	
	A	B
Cohesividad	0.33±0.014a ^z	0.20±0.015b
Masticabilidad	0.80±0.068a	0.42±0.068b

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Cuadro 53. Masticabilidad del queso añejo de Zacazonapan a los 0, 30, 95 y 180 d de maduración.

Tiempo de maduración (días)	Cohesividad	Masticabilidad (N)
0	0.43±0.02a ^z	0.41±0.096b
30	0.27±0.02b	0.48±0.096b
95	0.19±0.02c	0.91±0.096a
180	0.16±0.02c	0.66±0.096ab

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en columna indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

Los parámetros significativos para la interacción queso-tiempo se presentan en el Cuadro 54. La mayor dureza se alcanza a los 180 d para ambos quesos, estableciendo con esto una asociación de la dureza con el contenido de humedad. Los quesos con menor contenido de humedad presentaron mayor dureza, se ha reportado que un contenido de humedad apropiado en el queso es importante para que el agua se una a la red de caseína y con ello, se mantenga una buena textura (Hickey *et al.*, 2018). Además, la dureza se relaciona directamente con el contenido de proteína, cuanta más proteína tenga el queso este será más firme, debido a que la microestructura de las redes proteicas será más ramificada, más densa y con mayor grado de reticulación (Enab, Hassan, & Abd, 2012).

Cuadro 54. Dureza, adhesividad y elasticidad del queso añejo de Zacazonapan significativas ($p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo.

Parámetro	Queso	Tiempo de maduración (días)			
		0	30	95	180
Dureza (N)	A	1.47±0.28d ^z x ^w	2.62±0.28cx	6.78±0.28bx	11.52±0.28ax
	B	1.33±0.28dx	2.48±0.28cx	6.85±0.28bx	8.81±0.28ay
Adhesividad (N·s)	A	-0.02±0.01cx	-0.10±0.01bx	-0.20±0.01ax	-0.23±0.01ax
	B	-0.01±0.01ax	-0.03±0.01ay	-0.04±0.01ay	-0.01±0.01ay
Elasticidad	A	0.77±0.02ax	0.59±0.02bx	0.51±0.02cy	0.37±0.02dy
	B	0.50±0.02bcy	0.54±0.02abx	0.59±0.02ax	0.46±0.02cx

^zMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^wMedias ± error estándar seguidas con distinta letra (x, y) en columna indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$).

Respecto a la adhesividad, el queso A en sus tiempos 95 y 180 d presentó los valores más altos, mientras que el queso B fue el menos adhesivo en todos sus

tiempos de maduración, esto relacionado con el contenido de humedad. Por otra parte, la elasticidad del queso A disminuyó durante el tiempo de maduración, mientras que la elasticidad del queso B fue mayor a los 30 y 95 d (Cuadro 54). Los resultados del queso A, concuerdan con Lawrence, Creamer, & Gilles, (1987) quienes señalaron una mayor elasticidad en los quesos frescos y menor en los quesos madurados. Hernández-Morales *et al.* (2010) señalaron que un alto contenido de grasa en queso añejo de Zacazonapan se asocia con valores menores de dureza, elasticidad y masticabilidad.

Hernández-Morales *et al.* (2010) reportaron que el molido y los bajos porcentajes de humedad le dan al queso de Zacazonapan la textura friable, asociado a los valores bajos en cohesividad, elasticidad y masticabilidad. Además, el tipo de cuajo guarda relación con el comportamiento de los parámetros texturales. En este caso se utiliza el abomaso seco de becerros (cuajo de «cuerito») cuyo principio activo es la quimosina (Hernández *et al.*, 2011). Algunos autores han señalado un aumento de dureza, cohesividad, masticabilidad y adhesividad, si se utiliza un cuajo microbiano en comparación con un cuajo comercial (Zhao *et al.*, 2019).

9.6. Conclusiones

El queso añejo de Zacazonapan presentó cambios en los parámetros fisicoquímicos evaluados durante la maduración producto de los cambios secuenciales en los principales componentes del queso (proteína y grasa). Esto mantuvo relación con la actividad biológica desarrollada en los extractos, en este caso la actividad antimicrobiana destacó para la inhibición del crecimiento de bacterias gram positivas, en específico para el queso B (producto con mayor grado de estandarización en su proceso de elaboración). Mientras que la actividad antitrombótica fue negativa para cada uno de los extractos de los quesos A y B durante su maduración, con el método evaluado.

Así mismo, el Perfil Flash permitió una diferenciación entre quesos frescos (0 d), oreados (30 d) y madurados (180 d) basado en los atributos consensuados. Esta descripción y el análisis fisicoquímico se relacionaron con los datos encontrados en el perfil de textura, dando así un panorama sobre el desarrollo de las características del queso en cada etapa de maduración. La información generada durante la investigación permitió conocer al queso añejo de Zacazonapan, abriendo la posibilidad a los productores de tener información sobre el producto durante su maduración, adicional al conocimiento previo sobre las características de su materia prima, sus características fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas, así como el sistema socioeconómico en el que se encuentra inmerso y los actores de este. Con ello, los productores pueden promocionar y resaltar las características del producto para ser adquirido por determinado grupo de consumidores que se enfoquen en ciertas características del producto para adquirirlo.

9.7. Literatura citada

- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 44(1).
- Dairou, V., & Sieffermann, J. M. (2002). A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. *Journal of Food Science*, 67(2), 826–834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10685.x>
- Delarue, J., & Sieffermann, J. M. (2004). Sensory mapping using Flash profile. Comparison with a conventional descriptive method for the evaluation of the flavour of fruit dairy products. *Food Quality and Preference*, 15(4), 383–392. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00085-5)
- Domingues, G. B., Parra, B. D., Giacometti, C. F., & Lúcia, G. M. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG improves the sensorial profile of Camembert-type cheese: An approach through flash-profile and CATA. *LWT*, 107(March), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.077>
- Domínguez-González, K. N., Cruz-Guerrero, A., González-Márquez, H., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J., & Rodríguez-Serrano, G. (2014). Antihypertensive and antithrombotic activities of a commercial fermented milk product made with *Lactobacillus casei* Shirota and

- Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 358–364. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12133>
- Enab, A. K., Hassan, F. A. M., & Abd, M. A. M. G. E. (2012). Effect of manufacture steps on cheese structure (review). *International Journal of Academic Research*, 4(6), 79–89. <https://doi.org/10.7813/2075-4124.2012/4-6/a.11>
- Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18(7), 759–773. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.012>
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79246-8)
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. EE. UU.: Aspen Publishers.
- Gkatzionis, K., Hewson, L., Hollowood, T., Hort, J., Dodd, C. E. R., & Linforth, R. S. T. (2013). Effect of *Yarrowia lipolytica* on blue cheese odour development: Flash profile sensory evaluation of microbiological models and cheeses. *International Dairy Journal*, 30(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.010>
- Guinee, T. P., & Fox, P. F. (2004). *Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects*. (E. Ltd., Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Third, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Iron binding and antithrombotic peptides released during the fermentation of milk by *Lactobacillus casei* Shirota. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1161–1165. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/guzman>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., & Villegas, A. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Hernández, M. C., Hernández, M. A., Villegas, D. G. A. Z., & Aguirre, M. E. (2011). El proceso socio-técnico de producción de Queso Añejo de Zacazonapan, Estado de México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2(2), 161–176.
- Hickey, C. D., O'Sullivan, M. G., Davis, J., Scholz, D., Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., & Sheehan, J. J. (2018). The effect of buttermilk or buttermilk powder addition on functionality, textural, sensory and volatile characteristics of

- Cheddar-style cheese. *Food Research International*, 103(September 2017), 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.081>
- Hickey, D. K., Guinee, T. P., Hou, J., & Wilkinson, M. G. (2013). Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 30(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.006>
- Kwak, H. S., Ganesan, P., & Hong, Y. H. (2011). Nutritional benefits in cheese. *Cheese: Types, Nutrition and Consumption*, (December 2012), 267–288.
- Lamichhane, P., Kelly, A. L., & Sheehan, J. J. (2018). Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2692–2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>
- Lamothe, S., Corbeil, M. M., Turgeon, S. L., & Britten, M. (2012). Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food and Function*, 3(7), 724–731. <https://doi.org/10.1039/c2fo10256k>
- Lang, K. W., & Steinberg, M. P. (1980). Calculation of Moisture Content of a Formulated Food System To Any Given Water Activity. *Journal of Food Science*, 45(5), 1228–1230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06527.x>
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748–1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- López-Expósito, I., Miralles, B., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Health Effects of Cheese Components with a Focus on Bioactive Peptides. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 239–273). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00011-X>
- McSweeney, P. L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3), 127–140. <https://doi.org/10.4038/agrieast.v10i0.25>
- McSweeney, Paul L.H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80(3), 293–324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Mobarez, A. M., Doust, R. H., Sattari, M., & Mantheghi, N. (2008). Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Journal of Biological Sciences*, 8(1), 221–224.

- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2018). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D., & Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates : assessing the factor «indicator microorganism », 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-30>
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rae, P. S., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rafiq, S., Huma, N., & Pasha, I. (2017). antithrombotic activities of soluble peptide extracts from buffalo and cow milk Cheddar cheeses, 70(3). <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12373>
- Ramírez-Navas, J. S., Aguirre-Londoño, J., Aristizabal-Ferreira, V. A., & Castro-Narváez, S. (2016). La sal en el queso: diversas interacciones. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 303. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Ramírez-Rivera, E. de J., Ramón-Canul, L. G., Díaz-Rivera, P., Juárez-Barrientos, J. M., Herman-Lara, E., Prinyawiwatkul, W., & Herrera-Corredor, J. A. (2017). Sensory profiles of artisan goat cheeses as influenced by the cultural context and the type of panel. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 1789–1800. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13452>
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348–2360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1)
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., ... García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.05.002>
- Rutherford, K. J., & Gill, H. S. (2000). Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 99–102. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002312>
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Abdul Hamid, A., & Ghazali, H. M. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and

- therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 80–116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003>
- Sánchez-Ponte, M. D. (2003). Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. *Revista Científica, FVC-LUZ*, 13(4), 299–306.
- Sezer, C. & Güven, A. (2009). Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 15(1), 45-50.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327–345.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2014). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70093-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70093-x)
- Villegas, D. G. A. (2004). *Tecnología quesera*. México: Trillas.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Food Science and Technology. Technology and Culture* (2da.). Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.2307/3101767>
- Zhang, B. S., Wang, Z., & Xu, Y. S. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 521–527. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1217-y>
- Zhao, X., Zheng, Z., Zhang, J., Sarwar, A., Aziz, T., & Yang, Z. (2019). Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine. *Food Science and Nutrition*, 7(4), 1540–1550. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1003>

10. CONCLUSIONES GENERALES

En el consumo de queso añejo de Zacazonapan los valores humanos influyeron de forma indirecta, es decir las personas dieron al queso un significado utilitario y no uno afectivo o simbólico. Esto coincidió con la mínima comunalidad en significado de identidad que los consumidores le otorgaron al queso.

Por otra parte, quesos añejos de Zacazonapan con diferentes características físicas, químicas y sensoriales, pero con la misma aceptabilidad se diferenciaron a través de la medición de la intensidad de las emociones. La vida útil sensorial se estimó en 78 d de maduración para la muestra poblacional evaluada.

La maduración del queso añejo de Zacazonapan, en cada tiempo de maduración evaluado, generó perfiles y mapas peptídicos específicos para cada una de las muestras, como resultado de la hidrólisis de proteína. Los péptidos en los extractos solubles en agua presentaron actividad antioxidante, actuando como donadores de electrones o de átomos de hidrógeno, capaces de reducir la oxidación del β -caroteno, captar radicales libres (ABTS^{•+}, DPPH) y peróxidos (ROO[•]), además de quelar iones metálicos (Fe²⁺ y Cu²⁺). Por otro lado, los péptidos mostraron actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* K12, *Micrococcus luteus* CD-B-BB1018 y *Listeria innocua* ATCC 33090. Así como, una actividad antihipertensiva potencial, pero nula actividad antitrombótica.

La información obtenida sobre los valores humanos y el significado permitiría crear estrategias para trabajar en la comunicación del significado de identidad entre los consumidores locales de este queso, con el fin de contribuir a su patrimonialización. Por otra parte, las características fisicoquímicas, sensoriales,

texturales y bioactivas desarrolladas durante la maduración del queso añejo de Zacazonapan podrían contribuir en su tipicidad, otorgándole rasgos distintivos que pueden utilizarse para planear estrategias mercadotécnicas dirigidas a grupos de consumidores que muestran interés por el cuidado de la salud mediante la ingesta de alimentos con propiedades nutracéuticas. Además, la información obtenida contribuye a la tipicidad del queso dándole originalidad, especificidad y un rasgo distintivo en el mercado. Con el fin de revalorizarlo para generar un impacto positivo y seguir con su elaboración evitando ser sustituido por los denominados pseudoquesos. Así mismo, esta información permitiría a los productores tener elementos para obtener una figura de protección para el queso, tal como una marca colectiva o una denominación de origen, lo que permitiría establecer una diferencia simbólica entre un producto artesanal y uno industrial.

11. APÉNDICES

Apéndice 1. Formato para identificación de valores.

Esta página es una encuesta de los sistemas de valores de las personas. Por tanto, no existen respuestas correctas o erróneas. La mejor respuesta es su opinión personal. Primero, lea toda la lista y seleccione los 13 valores más importantes para Usted. Realice esto seleccionando las casillas correspondientes de la primera columna.

Después lea de nuevo toda la lista y escoja los 13 valores menos importantes. Realice esto seleccionando las casillas correspondientes a la segunda columna.

Valor humano	Más importante	Menos importante
Alegre	☐ Más	☐ Menos
Ambicioso	☐ Más	☐ Menos
Amistad verdadera	☐ Más	☐ Menos
Amor maduro	☐ Más	☐ Menos
Armonía interior	☐ Más	☐ Menos
Auto-controlado	☐ Más	☐ Menos
Auto-determinación	☐ Más	☐ Menos
Auto-respeto	☐ Más	☐ Menos
Capaz	☐ Más	☐ Menos
Cariñoso	☐ Más	☐ Menos
Educado	☐ Más	☐ Menos
Equidad	☐ Más	☐ Menos
Felicidad	☐ Más	☐ Menos
Honesto	☐ Más	☐ Menos
Igualdad	☐ Más	☐ Menos
Imaginativo	☐ Más	☐ Menos
Independiente	☐ Más	☐ Menos
Indulgencia	☐ Más	☐ Menos
Intelectual	☐ Más	☐ Menos
Justicia social	☐ Más	☐ Menos

Libertad		Más		Menos
Limpio		Más		Menos
Lógico		Más		Menos
Mente amplia		Más		Menos
Obediente		Más		Menos
Placentero		Más		Menos
Poder social		Más		Menos
Reconocimiento social		Más		Menos
Responsable		Más		Menos
Sabiduría		Más		Menos
Salvación		Más		Menos
Seguridad familiar		Más		Menos
Seguridad nacional		Más		Menos
Un mundo de belleza		Más		Menos
Un mundo de paz		Más		Menos
Un sentido de logro		Más		Menos
Una vida confortable		Más		Menos
Una vida excitante		Más		Menos
Útil		Más		Menos
Valiente		Más		Menos

Apéndice 2. Formato de encuesta de atributos tangibles.

Pensando en el Queso de Zacazonapan, por favor califique que tan importante son para usted cada una de las características o atributos, cuando decide comparar el queso.

Por favor use la escala de 1 a 10, con 1 significado “no importante” y 10, significado “es muy importante”.

Aroma a Leche

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Aroma a leche ácida

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Aroma a mantequilla

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Aroma a queso maduro

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Desmoronable

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Firmeza

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Forma

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Disponible

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Precio accesible

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Grasa

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Húmedo

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Masticable

- ☐ 1 No es muy importante
☐ 2
☐ 3
☐ 4
☐ 5
☐ 6
☐ 7
☐ 8
☐ 9
☐ 10 Es muy importante

Sabor ácido ☐ 1 No es muy importante ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 Es muy importante	Sabor amargo ☐ 1 No es muy importante ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 Es muy importante	Sabor salado ☐ 1 No es muy importante ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 Es muy importante
Seco ☐ 1 No es muy importante ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 Es muy importante		

Apéndice 3. Formato de encuesta de frecuencia de consumo de queso.

Por favor indique, aproximadamente, cuantas veces en los tres días anteriores consumió Queso de Zacazonapan.

Consumo

Por favor indique, aproximadamente, cuantas veces en los tres días anteriores consumió cualquier tipo de queso, incluyendo el Queso de Zacazonapan.

Consumo

Usando la escala de abajo, indique cómo se considera usted para el consumo de queso

1 = Indiferente 10 = Entusiasta

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10

¿Con cuál de las siguientes frecuencias de consumo se identifica usted?

☐ 1 Rara vez (Consumo de queso menor a tres veces por mes)

☐ 2 Ocasional (Consumo de queso una vez por semana)

☐ 3 A menudo (Consumo de queso de tres veces por semana)

☐ 4 Asiduo (Consumo de queso todos los días)

Apéndice 4. Formato de encuesta para simbolismo.

Después de observar la imagen, escriba tres ideas (palabras) que le vengan a la mente. Una palabra por espacio.



Idea 1

Idea 2

Idea 3