

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



**INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE SALES EN EL RENDIMIENTO,  
ACEPTACIÓN, ACTIVIDAD ECA INHIBITORIA Y ANTIOXIDANTE EN  
REQUESÓN**

**POR:**

**M.C. IVETTE KARINA RAMÍREZ RIVAS**

**DISERTACIÓN PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR IN PHILOSOPHIA**

**ÁREA MAYOR: TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**SEPTIEMBRE 2020**



Influencia de la adicción de sales en el rendimiento, aceptación, actividad ECA inhibitoria y antioxidante en requesón. Disertación presentada por Ivette Karina Ramírez Rivas como requisito parcial para obtener el grado de Doctor in Philosophia, ha sido aprobado y aceptada por:

---

Ph.D. Carlos Ortega Ochoa  
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

---

D.Ph. Agustín Corral Luna  
Secretario de Investigación y Posgrado

---

Ph.D. Iván Adrián García Galicia  
Coordinador Académico

---

Ph.D. América Chávez Martínez  
Presidente

---

08 SEPTIEMBRE DE 2020  
Fecha

Comité:  
Dr. Néstor Gutiérrez Méndez  
Ph.D. Ana Luisa Rentería  
Monterrubio  
Dr. Eduardo Santellano Estrada  
Dr. Rogelio Sánchez Vega

© Derechos Reservados  
AUTOR. IVETTE KARINA  
RAMÍREZ RIVAS  
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO  
FRANCISCO R. ALMADA KM.  
1, CHIHUAHUA, CHIH.,  
MÉXICO C.P. 31453  
SEPTIEMBRE 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Dios por todo lo que me ha brindado a lo largo de la vida y permitirme culminar esta etapa de mi carrera profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico durante el periodo que cursé el doctorado.

A mi directora de tesis, la Dra. América Chávez, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo y orientación durante estos años. También agradezco a todos los integrantes del comité, al Dr. Néstor, la Dra. Ana Rentería, Dr. Macías y Dr. Santellano, gracias por sus colaboraciones.

Al señor Fernando Piñón de la quesería “Los Piñones” por proporcionarme el suero para desarrollar la tesis.

A mis compañeros y grandes amigos de posgrado quienes me han brindado su amistad, apoyo y cariño, en especial a Juliana, gracias por todo.

A todas aquellas personas que me brindaron soporte con el HPLC, a Ricardo, al Dr. David y especialmente al Ing. Ernesto Salgado que me ayudó cada vez que tenía dudas con el equipo y siempre estaba disponible cuando necesitaba su ayuda.

A todos los que contribuyeron directa o indirectamente en mi formación doctoral, gracias con todo cariño.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su apoyo y amor incondicional, en especial a mi mamá que siempre me ha apoyado en mis decisiones, gracias por tus consejos, por tus palabras de aliento, por escucharme y entenderme siempre.

A Ximena, mi pedacito de cielo, eres el regalo más hermoso que la vida me ha dado, TE AMO.

## CURRICULUM VITAE

La autora nació el 7 de enero de 1986 en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

2003 – 2008	Estudios de Licenciatura en Ingeniería Química opción alimentos en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.
2007 – 2008	Formación de microempresa de Productos Ahumados de Chihuahua, S. de R. L.
2009 – 2011	Estudios de posgrado en la Universidad Autónoma de Chihuahua de la Facultad de Ciencias Químicas, obteniendo el grado de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
Mar – Sep 2011	Control de calidad de leche en la empresa “Productores de Chihuahua S. P. R. de R. L.”
Sep 2011 – Nov 2012	Químico Analista en la empresa “Mead Johnson Nutrition de México, S. de R. L. de C. V.” en el área de Calidad. Ciudad Delicias, Chihuahua.
Ene 2014 – Dic 2017	Estudiante de doctorado en Tecnología de Productos de Origen Animal en la Facultad de Zootecnia y Ecología, UACH.
Sep - Dic 2018	Docente en la Universidad Tecnológica de Chihuahua Sur
Ene 2018 – Ene 2019	Supervisor de calidad en comedor industrial “Grupo Prosesa”.
Ene 2019 – A la fecha	Ingeniero de Servicios en la empresa “Food Safety Consulting and Training Solutions”.

## RESUMEN GENERAL

### INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE SALES EN EL RENDIMIENTO, ACEPTACIÓN, ACTIVIDAD ECA INHIBITORIA Y ANTIOXIDANTE EN REQUESÓN

POR:

M. C. Ivette Karina Ramirez Rivas

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph. D. América Chávez Martínez

El requesón es un subproducto de la industria láctea de poco rendimiento. Aunque existen estudios que mencionan que la sal ejerce una gran influencia para precipitar las proteínas séricas, y algunos productores chihuahuenses comentan que la adición de sal al suero durante la etapa de calentamiento incrementa su rendimiento, no existen evidencias científicas de esto último. Por lo anterior, el presente trabajo está conformado por dos estudios. El primero se titula “Evaluación fisicoquímica y sensorial de la adición de sales de sodio, potasio y calcio en la elaboración de requesón”. En este estudio se emplearon diferentes tipos y concentraciones de sales (1 y 1.5 % de NaCl, combinaciones 1:1 de NaCl/KCl al 1 y 1.5 % y 0.1 % de CaCl<sub>2</sub>) las cuales se adicionaron en la etapa de calentamiento del suero durante la elaboración del requesón. Como tratamiento control se consideró requesón sin adición de sal. Las variables de respuesta fueron rendimiento, color (L\*, a\*, b\*, IB y ΔE\*), textura, análisis fisicoquímico

(humedad, cenizas, grasa y proteína), concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  y evaluación sensorial de aceptación (color, olor, sabor, textura y apariencia general). El segundo estudio se tituló “Evaluación del efecto del tipo de empaque sobre las actividades inhibitoria de la ECA y antioxidante *in-vitro* en el requesón”. Se seleccionaron cuatro tratamientos (incluyendo el tratamiento control) del estudio I, basado en la aceptación sensorial. En estos tratamientos se utilizaron dos tipos de empaque: bolsa de polietileno de baja densidad (Ziploc®) y empaque al vacío (bolsa de polietileno y poliamida). Se midió el grado de proteólisis, proteína por el método Bradford, actividad antioxidante (DPPH y ABTS) y la actividad inhibitoria de la ECA a través del tiempo (1, 7 y 14 días) para ambos empaques.

## ABSTRACT

INFLUENCE OF ADDING SALTS IN YIELD, ACCEPTANCE, ACE  
INHIBITORY, AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES IN CURD CHEESE

BY:

IVETTE KARINA RAMIREZ RIVAS

Curd cheese is a byproduct of the low yield dairy industry. Although there are studies that mention that salt exerts a great influence to precipitate whey proteins, and some Chihuahua producers comment that salt addition to whey during the heating stage increases its yield, there is no scientific evidence on this matter. Therefore, the present work is made up of two studies. The first was "Physicochemical and sensory evaluation of addition sodium, potassium and calcium salts in preparation of curd cheese". In this study, different types and concentrations of salts (1 and 1.5 % de NaCl, 1:1 combination of 1 and 1.5 % of NaCl/KCl and 0.1 of % CaCl<sub>2</sub>) were used, which were added during whey heating stage during curd cheese processing. Control treatment was curd cheese without salt. Response variables were yield, color (L\*, a\*, b\*, IB and ΔE\*), texture, physicochemical analysis (moisture, ash, fat and protein), Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> ions concentrations and acceptance sensory evaluation (color, aroma, flavor, texture and general appearance). The second study was entitled "Evaluation of effect of type of packaging on ACE inhibitory activity and antioxidant activity *in-vitro* in curd cheese". Four treatments (including control) were selected from study I, based on sensory acceptance. Two types of packaging were used: low density polyethylene bag (Ziploc®) and vacuum packing (polyethylene and polyamide bag). Proteolysis

degree, protein by Bradford method, antioxidant activity (DPPH and ABTS) and ACE inhibitory activity over time (1, 7 and 14 days) for both packages were measured.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DEL APÉNDICE.....	xvi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Leche y Producción.....	4
Suero de Leche.....	4
Proteínas del suero.....	7
Factores que afectan a las proteínas del suero.....	9
Usos del LS.....	10
Proteólisis.....	11
Péptidos Bioactivos.....	12
Hipertensión.....	14
Actividad Antioxidante.....	17
LITERATURA CITADA.....	20
ESTUDIO I. EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y SENSORIAL DE LA ADICIÓN DE SALES DE SODIO, POTASIO Y CALCIO EN LA ELABORACIÓN DE REQUESÓN.....	26
RESUMEN.....	27
ABSTRACT.....	28

INTRODUCCIÓN.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Suero de Leche de Vaca.....	32
Tratamientos .....	32
Elaboración de Requesón.....	34
Rendimiento.....	34
Análisis Físicoquímico.....	34
Contenido de Sal.....	35
Color.....	36
Textura.....	36
Evaluación Sensorial.....	37
Análisis Estadístico.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Análisis Físicoquímico.....	39
Concentración de Iones.....	42
Color.....	44
Textura.....	47
Evaluación Sensorial.....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
LITERATURA CITADA.....	60
ESTUDIO II. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIPO DE EMPAQUE SOBRE LAS ACTIVIDADES INHIBITORIA DE LA ECA Y ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> EN EL REQUESÓN.....	62
RESUMEN.....	63

ABSTRACT.....	64
INTRODUCCIÓN.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
Preparación de las Muestras.....	68
Preparación del Extracto Soluble en Agua (WSE).....	68
Actividad Antioxidante.....	69
ABTS.....	69
DPPH.....	69
Proteólisis.....	70
Concentración Peptídica.....	71
Actividad Inhibitoria de la ECA.....	71
Análisis Estadístico.....	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
Correlaciones.....	75
Capacidad Antioxidante.....	78
Proteólisis.....	83
Concentración Peptídica.....	86
Actividad Inhibitoria de la ECA.....	88
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	93
LITERATURA CITADA.....	94
APÉNDICES.....	98

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición media del lactosuero dulce y ácido de leche de vaca.....	6
2	Péptidos de suero de leche con actividad inhibitoria de la ECA.....	16
3	Péptidos de suero de leche con actividad antioxidante.....	18
4	Formulación de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca, adicionado con diferentes sales (cloruro de sodio – NaCl, cloruro de potasio – KCl y cloruro de calcio – CaCl <sub>2</sub> ) a diferentes concentraciones.....	33
5	Composición fisicoquímica de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca (media ± desviación estándar).....	40
6	Concentración en partes por millón (ppm) de iones calcio, potasio y sodio de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales (media ± desviación estándar).....	43
7	Valores de color, índice de blancura y diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales (media ± desviación estándar).....	45
8	Valores de dureza y adhesividad de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales (media ± desviación estándar).....	48
9	Valores de Chi-cuadrada y su significancia para evaluar el efecto de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, sobre las variables organolépticas y apariencia general.....	58
10	Coeficientes de correlación y valores de P de las variables concentración peptídica, proteólisis, actividad antioxidante (métodos DPPH y ABTS) y actividad inhibitoria de la ECA de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales.....	76

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Valores promedio de los parámetros de evaluación sensorial por tratamiento de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales.....	56
2	Capacidad antioxidante por la técnica ABTS a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío. La concentración está expresada en $\mu\text{M}$ equivalentes de Trolox.....	79
3	Capacidad antioxidante por la técnica DPPH a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío. La concentración está expresada en $\mu\text{M}$ equivalentes de Trolox.....	81
4	Grado de proteólisis a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío.....	84
5	Concentración peptídica por el método Bradford a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío.....	87
6	Porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío.....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Análisis de correspondencia para la categoría olor de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl <sub>2</sub> ; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.....	50
2	Análisis de correspondencia para la categoría color de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl <sub>2</sub> ; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.....	51
3	Análisis de correspondencia para la categoría sabor de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl <sub>2</sub> ; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.....	52
4	Análisis de correspondencia para la categoría textura de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl <sub>2</sub> ; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.....	54
5	Análisis de correspondencia para la categoría apariencia general de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl <sub>2</sub> ; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.....	55

## LISTA DEL APÉNDICE

Apéndice		Página
1	Formato de evaluación de sensorial, prueba de aceptación de los tratamientos de requesón.....	98
2	Curva de calibración de ABTS.....	99
3	Curva de calibración de DPPH.....	100
4	Curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) para la determinación de proteína por el método Bradford...	101
5	Resultados de ABTS para los tratamientos de requesón ( $\mu\text{M}$ equivalentes Trolox) (Medias $\pm$ desviación estándar).....	102
6	Resultados de DPPH para los tratamientos de requesón ( $\mu\text{M}$ equivalentes Trolox) (Medias $\pm$ desviación estándar).....	103
7	Resultados de proteólisis para los tratamientos de requesón (absorbancia a 340 nm) (Medias $\pm$ desviación estándar).....	104
8	Proteína por método Bradford de los tratamientos de requesón, expresada como $\mu\text{g}$ concentración de albúmina bovina (Medias $\pm$ desviación estándar).....	105
9	Porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) de los tratamientos de requesón. (Medias $\pm$ desviación estándar).....	106

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La industria quesera produce como su único subproducto remanente, grandes volúmenes de suero lácteo. Por cada kilogramo de queso, se producen aproximadamente 9 litros de suero, los cuales comúnmente son desechados al drenaje, práctica que incrementa los niveles de contaminación. Se estima que por cada litro de suero la demanda biológica de oxígeno (DBO) es de 30 a 60 g y de la demanda química de oxígeno (DQO) de 50 a 80 g/L, provocando serios problemas de contaminación ambiental (Parra-Huertas, 2010; Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2012). Por otro lado, el suero lácteo posee un alto valor nutritivo, contiene más del 50 % de los sólidos de la leche, incluyendo proteínas, lactosa, minerales y vitaminas (Cuellas y Wagner, 2010). Debido a estas propiedades, el suero se ha utilizado como ingrediente o alimento funcional, el cual se puede encontrar en presentación en polvo como concentrado y aislado de proteína de suero (WPC, whey proteine concentrate y WPI, whey proteine isolate), en fórmulas infantiles, como suplemento para deportistas y en repostería (Frydenberg *et al.*, 2016). En estado líquido lo emplean para la alimentación de ganado porcino (Bauza *et al.*, 2005), en la elaboración de bebidas fermentadas (Dragone *et al.*, 2009) y en la elaboración de requesón (Inda, 2000).

También se ha reportado que el suero lácteo es un alimento de alto valor nutricional (como fuente de energía, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales) y que adicional a esto es una fuente de péptidos con actividad biológica (hipotensivos, antioxidantes, antitrombóticos e inmunomoduladores), lo

anterior sustenta su empleo como ingrediente o alimento funcional (Alvarado y Guerra, 2010).

El requesón es el resultado de la precipitación de las proteínas del suero lácteo mediante la aplicación de calor en medio acidificado por un cultivo de bacterias lácticas o por ácidos orgánicos permitidos para ese fin (Ruiz-Marroquín, 2006). El rendimiento de este producto lácteo es bajo, por lo que algunos autores dan algunas recomendaciones para incrementarlo, entre ellas; emplear suero dulce para asegurar que la acidez (ácido láctico) sea de alrededor del 12 %, elevar la temperatura lentamente hasta alcanzar 90 °C y posteriormente acidificar el medio con ácido láctico, acético o cítrico (Inda, 2000). Además, algunos productores locales han indicado que añadir sal (NaCl, cloruro de sodio) durante la etapa de calentamiento del suero para elaborar requesón ayuda a incrementar el rendimiento; sin embargo, no se ha encontrado evidencia científica que sustente lo anterior, aunque existen estudios que mencionan que la sal ejerce una gran influencia para precipitar las proteínas séricas (Mailliart y Ribadeau-Dumas, 1988; Inda, 2000).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) está relacionada con la elevación de la presión arterial, por lo que su inhibición es esencial para que el individuo disminuya el riesgo de enfermedades coronarias y de accidentes cerebrovasculares. Las enfermedades cardiovasculares causan el 25 % de las defunciones a nivel mundial representando la primera causa de mortalidad (Armas de Hernández *et al.*, 2006). Los países desarrollados han logrado disminuir la hipertensión entre sus pobladores haciendo campañas de prevención en donde se promueve un estilo de vida saludable realzando la importancia de

reducir el consumo de sodio y alcohol, evitando el tabaco y realizar actividad física. No obstante, el número de personas que sufren enfermedades cerebrovasculares va en aumento en países en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2013). Por ejemplo, en 31 de 35 países de América Latina este tipo de enfermedades es la causa principal de muerte (Armas de Hernández *et al.*, 2006). Investigaciones recientes han encontrado péptidos bioactivos con efecto inhibidor de la ECA en productos lácteos como bebidas fermentadas, proteínas hidrolizadas, quesos (Sieber *et al.*, 2010; Ong y Shah, 2008), yogurt y suero de leche. Sin embargo, hasta nuestro actual conocimiento, no se tiene registro de reportes sobre la actividad ECA inhibitoria que presenta el requesón o bien identifique péptidos bioactivos en este producto lácteo.

Por lo anterior, el presente estudio tiene dos objetivos, el primero fue observar si la adición de sal(es) como cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) y cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) durante la etapa del calentamiento del suero tienen influencia en el rendimiento del requesón, así como evaluar la aceptación sensorial de estos. El segundo objetivo fue estudiar la actividad inhibitoria de la ECA y antioxidante *in vitro* del requesón, así como la estabilidad de estas bioactividades a través del tiempo.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Leche y Producción

La industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria alimentaria en México. Según cifras de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el año 2018, México ocupó la octava posición en la producción mundial de leche. Al tercer trimestre de 2018, la producción acumulada de leche de bovino alcanzó 8 mil 949 millones de litros; es decir, 1.7 % más que en el mismo periodo del 2017. La producción lechera se desarrolla en todo el país; sin embargo, los principales estados productores de leche son Jalisco, Chihuahua, Guanajuato y Chiapas (SIAP-SAGARPA, 2018).

### Suero de Leche

El lactosuero (LS) es el líquido resultado de la coagulación de las proteínas de la leche durante la elaboración del queso, una vez que se separa la cuajada de la leche, la cual está compuesta principalmente por caseínas y grasa (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2010). La coagulación de la caseína puede ser mediante enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario o por la acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína (NOM-155-SCFI-2012).

La composición fisicoquímica del LS variará dependiendo del método de fabricación del queso, tipo de leche (bovina, caprina, ovina, etc.), época del año, tipo de alimentación del rebaño y etapa de lactación. Considerando que a partir

de la coagulación enzimática de 100 litros de leche se pueden obtener aproximadamente entre 9 y 30 kg de cuajada, la cantidad de LS resultante será entre 70 % y 90 % del volumen total de la leche empleada inicialmente, y en él se retendrá alrededor del 55 % de los nutrientes originales de la leche (Alvarado y Guerra, 2010).

Dentro de los nutrientes más abundantes se encuentran la lactosa (45 – 50 g/L), proteínas solubles (6 – 8 g/L), lípidos (4 – 5 g/L) y sales minerales (8 – 10 % de extracto seco). Las sales minerales comprenden NaCl y KCl (más del 50 %), sales de calcio (principalmente fosfato) y otros. También contiene cantidades considerables de ácido láctico (0.5 g/L) y ácido cítrico, compuestos nitrogenados no proteicos (urea y ácido úrico) y vitaminas del complejo B (Dragone *et al.*, 2009), donde se incluyen; vitamina B<sub>2</sub>, y la lactoflavina, responsable del color verde del lactosuero (Spreer, 1991).

Dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, el LS se clasifica como ácido o dulce. El LS ácido proviene de la fabricación de quesos frescos de pasta blanda, en estos, la lactosa se ha transformado en ácido láctico, los sueros resultantes de estos quesos son ricos en calcio y fósforo. Por otra parte, el LS dulce proviene de quesos de pasta cocida y prensada, es pobre en ácido láctico, calcio y fósforo. El Cuadro 1 muestra la composición del LS en g/kg del producto bruto, según Hernández-Callejas *et al.*, (2012).

El LS dulce varía en su composición dependiendo de diversos factores, por una parte, si hubo o no acción de bacterias ácido lácticas (BAL) durante el proceso de elaboración del queso y antes de la separación del LS, y, por

Cuadro 1. Composición media del lactosuero dulce y ácido de leche de vaca

<b>Parámetro</b>	<b>Suero dulce (g/kg)</b>	<b>Suero ácido (g/kg)</b>
Materia seca	55 - 75	55 - 65
Proteína	6 - 10	6 - 8
Lactosa	46 - 52	44 - 46
Grasa bruta	9 - 14	7 - 12
Cenizas	4 - 6	6 - 8
Calcio	0.4 - 0.6	1.2 - 1.4
Fósforo	0.4 - 0.7	0.5 - 0.8
Potasio	1.4 - 1.6	1.4 - 1.6
Cloruros	2.0 - 2.2	2.0 - 2.2
Ácido láctico	0 - 0.3	7 - 8
pH	> 6.0	< 4.5
Grados Dornic	< 20 °	> 50 °

Parra-Huertas (2009); Hernández-Callejas *et al.*, (2012).

otra parte, del tipo de cuajo. En general, el LS dulce tiene un pH más elevado y mayor contenido de sólidos totales, proteínas, lactosa y lípidos, y menor cantidad de calcio y fósforo que los sueros ácidos. Además, tiene mayor contenido de péptidos y aminoácidos debido a la proteólisis producida por el cuajo (Alvarado y Guerra, 2010).

**Proteínas del suero.** El LS representa alrededor del 20 % (p/p) del total de las proteínas de la leche. Es una mezcla compleja de proteínas globulares comprendiendo la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG, ~50 – 65 % p/p),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA, ~20 – 25 % p/p), inmunoglobulinas (Ig ~10 % p/p) y seroalbúmina bovina (BSA, ~6 – 8 % p/p), así como otros componentes proteicos en menor cantidad como la lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y factores de crecimiento (Qi y Onwulata, 2011; Ahtesh *et al.*, 2018).

Las proteínas séricas pueden ser insolubles en pH inferior a 6.5 cuando la leche se calienta, este cambio está relacionado con la desnaturalización de las proteínas, las cuales precipitan en estas condiciones (Walstra *et al.*, 2006).

La  $\beta$ -LG es la principal proteína del LS, su solubilidad depende en gran medida al pH y la fuerza iónica (Walstra *et al.*, 2006). Está compuesta por 162 aminoácidos residuales, 84 de los cuales son aminoácidos esenciales (Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014). Las estructuras secundarias y terciarias tienen enlaces disulfuro y un grupo sulfhidrilo libre, este último no está expuesto en el estado nativo de la proteína (Walstra *et al.*, 2006). La  $\beta$ -LG es sensible a cambios de pH y temperatura. En un rango de pH de 5.1 – 7.5, las moléculas existen como dímeros de aproximadamente 36,700 Da y a pH entre 3.5 - 5.2,

existen como octámeros de aproximadamente 147,000 Da. En condiciones ácidas (pH 3), los dímeros se disocian en monómeros debido a las fuerzas electrostáticas de repulsión, pero la disociación no está acompañada por cambios en la forma molecular. La disociación también puede ocurrir en medios alcalinos, a un pH de 8. Esta proteína se desnatura a una temperatura cercana a 65 °C (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

La  $\alpha$ -LA es una proteína globular, pequeña, compacta y plegada con cuatro enlaces disulfuro intramoleculares y la desnaturación térmica se observa a partir de los 65 °C. El punto isoeléctrico ocurre a un pH entre 4.2 y 4.5 (Frydenberg *et al.*, 2016). La  $\alpha$ -LA funciona como coenzima en la síntesis de lactosa. Tiene un sitio de unión no expuesto específico para un ion de calcio. El calcio está fuertemente unido y estabiliza la conformación de la proteína. El eliminar el calcio o bajar el pH aproximadamente a 4, causa un despliegue parcial en el glóbulo, en este caso la proteína está sujeta a la desnaturación irreversible por calor a temperaturas relativamente bajas (Walstra *et al.*, 2006). A un pH de 6.5 y una temperatura de 62 °C esta proteína comienza a desdoblarse, pero al enfriarse, la molécula recupera su configuración inicial (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

La BSA es una proteína globular de 582 aminoácidos y un peso molecular de 66,000 Da. Contiene 17 enlaces disulfuro y un grupo tiol libre. La BSA puede unirse a ácidos grasos libres y lípidos, que estabilizan a la molécula contra la desnaturación térmica (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

Las Ig son una familia heterogénea de glicoproteínas de peso molecular entre 150 a 1000 kDa. Estas proteínas poseen propiedades antibacterianas cuando no han sido sometidas a tratamientos térmicos. Más del 80 % de las Ig del LS son del tipo IgG. Estas moléculas están compuestas de cuatro cadenas de polipéptidos unidas por puentes disulfuro y se desnaturalizan a temperaturas más altas que la  $\beta$ -lactoglobulina o la  $\alpha$ -lactoalbúmina. Sin embargo, son térmicamente inestables en la presencia de otras proteínas con grupos tioles como la  $\beta$ -LG y la BSA (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

**Factores que afectan a las proteínas del suero.** La precipitación de una proteína es el resultado del desplegamiento de la misma, es un paso que se da después de la agregación, y existen muchos factores externos que pueden facilitar estas etapas, tales como: enzimas, calor y sales (Ju y Kilara, 1998).

Las proteínas del LS (PLS) se desnaturalizan fácilmente con calor, y debido al desplegamiento de la molécula sufren cambios conformacionales, de esta forma quedan expuestos ciertos sitios que normalmente se encuentran “ocultos” dentro de la proteína, por ejemplo, la liberación de pequeños compuestos como el sulfuro de hidrógeno y metanotiol, los cuales son causantes del sabor a “leche cocida”. Además, el desplegamiento de la molécula permite establecer interacciones intermoleculares y la formación de redes para formar un gel (Wijayanti *et al.*, 2014; Queirós y Lopes-da-Silva 2017).

En general, la agregación de las PLS involucra la interacción de grupos -SH libres con enlaces S-S de proteínas que contienen cistina como  $\beta$ -LG,  $\kappa$ -caseína,  $\alpha$ -LA y BSA. Estas interacciones proteína-proteína producen la agrega-

ción irreversible de los complejos de proteínas (Wijayanti *et al.*, 2014).

Ravindra *et al.* (2007) mencionan que las sales afectan el comportamiento reológico del WPI, ya que en su presencia se forman estructuras de geles más “filamentosas,” con tamaño de poro más pequeño, en comparación a los geles que se forman solo con calor.

Las sales de calcio ejercen un gran efecto en las propiedades microestructurales, reológicas y de textura en los geles de proteína de suero. La agregación de las proteínas inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  surge a través de tres efectos: blindaje electrostático, interacción hidrofóbica específica de iones y el enlace de moléculas aniónicas adyacentes (grupos carboxílicos) mediante la formación de puentes de proteína -  $\text{Ca}^{2+}$  - proteína (Ju y Kilara, 1998; Kuhn *et al.*, 2010).

La adición de sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  o magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) a la leche a una concentración de 260 g/L causa una completa precipitación de la caseína junto con las Ig. La saturación de la leche con NaCl a 37 °C precipita la caseína y las Ig mientras que la mayoría de las PLS permanecen solubles, siempre y cuando se encuentren desnaturalizadas (Fox y McSweeney, 1998). Sin embargo, para que ocurra el efecto “salting-out” de las proteínas en el suero se necesita un contenido de sal en agua superior al 7 % (Pastorino *et al.*, 2003).

**Usos del LS.** El LS puede considerarse un producto residual parcialmente aprovechable. Una gran parte del LS no transformado se destina a la alimentación animal, principalmente ganado porcino (Bauza *et al.*, 2005), también se aprovecha en la elaboración de bebidas adicionadas con aromas frutales, proteínas vegetales (Spreer, 1991), fibras de origen vegetal (Baccouche *et al.*, (2013)) y bebidas alcohólicas de fermentación microbiana (Dragone *et al.*, 2009).

Las bebidas también se desarrollan a partir de hidrolizados del LS (Cuellas y Wagner (2010).

Otro de productos elaborado con LS es el requesón, el cual se produce por la precipitación de las proteínas séricas mediante la aplicación de calor en un medio acidificado con ácidos orgánicos; sin embargo, el rendimiento de este producto es bajo, aproximadamente 4.7 % (Ruiz-Marroquín, 2006). Para incrementar este rendimiento se ha recomendado utilizar LS dulce con una acidez inicial de cerca de 12 % de ácido láctico, subir la temperatura del suero lentamente (aproximadamente 1°C/min) hasta llegar a una temperatura mínima de 95 °C; posteriormente, bajar la acidez a un pH aproximado de 4.5 con algún ácido orgánico (Inda, 2000).

### **Proteólisis**

La proteólisis es el evento bioquímico principal y más complejo que ocurre en las variedades de quesos madurados, causada por diversos factores tales como enzimas contenidas en la leche (plasmina), la renina (pepsina y quimosina) o por microorganismos (Ong y Shah, 2008). Además de suavizar el cuerpo del queso, la proteólisis influye en el desarrollo del sabor a través de la formación de aminoácidos y péptidos. Así mismo, se ha determinado que la sal influye en la velocidad de proteólisis del queso cambiando el estado de agregación de las moléculas de proteínas y modificando el crecimiento de las bacterias iniciadoras y no iniciadoras, afectando con esto directamente la actividad de las enzimas involucradas (*Katsiari et al.*, 2000).

Existen diversos métodos para evaluar la proteólisis en quesos, por ejemplo; extracción de péptidos solubles con solventes como el ácido tricloroacético (TCA), urea y solventes orgánicos (Bansal *et al.*, 2010). La electroforesis capilar, es un método con el que se obtienen resultados cuantitativos en el análisis de la degradación de proteínas (Fox y McSweeney, 1998; Walstra *et al.*, 2006). También se puede determinar la proteólisis al cuantificar espectrofotométricamente los grupos amino libres con ácido trinitro bencenosulfónico o con dialdehído o-ftálico y el nitrógeno amoniacal (Walstra *et al.*, 2006).

### **Péptidos Bioactivos**

Los péptidos bioactivos (PBA) se definen como fragmentos específicos de proteínas, de origen animal o vegetal, que pueden ser absorbidos y actuar en diferentes procesos fisiológicos, e influir más allá del plano nutricional en la salud humana (Alvarado y Guerra, 2010; Betancourt-López y Afanador-Téllez, 2009). Los PBA tienen funciones anticancerígenas, antimicrobianas, antihipertensivas, antitrombóticas, antimutagénicas, antioxidantes e inmunomoduladoras entre otras (Betancourt-López y Afanador-Téllez, 2009; Ahtesh *et al.*, 2018).

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del péptido, su administración oral podría afectar positivamente alguno de los principales sistemas del organismo: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune. Es decir, que la actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que los conforman (Alvarado y Guerra, 2010).

Los PBA se pueden producir por diversas vías: a) hidrólisis enzimática por enzimas digestivas (pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas), b) fermentación biológica con cultivos iniciadores proteolíticos y c) proteólisis por acción de enzimas producidas por microorganismos o plantas, los péptidos una vez liberados pueden actuar como compuestos reguladores (Betancourt-López y Afanador-Téllez, 2009; Tsutsumi y Tsutsumi, 2014; Egger y Ménard, 2017).

La mayoría de los PBA descritos hasta ahora tienen propiedades estructurales en común: conformarse de cadenas cortas de aminoácidos (entre 2 y 9), presentar residuos hidrofóbicos y mostrar resistencia a la acción de peptidasas digestivas, esto último permite su absorción y paso al torrente sanguíneo sin sufrir alteración alguna (Alvarado y Guerra, 2010).

Las proteínas de la leche han sido ampliamente estudiadas debido a que son una fuente rica de PBA (Rojas-Ronquillo *et al.*, 2012; Elkhtab *et al.*, 2017), que presentan actividades antihipertensivas, antitrombóticas, opioides y antimicrobianas, y que además sirven como estimuladores del sistema inmune, transportadores de minerales e incluso hay péptidos que ayudan a disminuir el colesterol (Ong y Shah, 2008).

Se considera que el LS es una excelente fuente de proteínas funcionales (Qi and Onwulata, 2011) que contienen una amplia gama de aminoácidos, incluyendo los aminoácidos de cadena ramificada o aminoácidos alifáticos como leucina, isoleucina y valina, así como lisina, triptófano, metionina y cisteína (estos últimos dos son aminoácidos azufrados). Los aminoácidos alifáticos son necesarios para el crecimiento y reparación tisular; en particular la leucina, juega

un rol importante en la traducción-iniciación de la síntesis protéica (Londoño-Ospina, 2006; Tsutsumi y Tsutsumi, 2014).

La cisteína es esencial para la formación del glutatión en las células, el glutatión (GSH) es una molécula pequeña que se encuentra en la mayoría de las células, que se constituye de tres aminoácidos: glicina, glutamato y cisteína. La velocidad de formación del GSH depende de la disponibilidad de la cisteína, la cual es escasa en los alimentos, así mismo, se considera que el glutatión es el principal antioxidante producido por las células, que las protege de los radicales libres (Tsutsumi y Tsutsumi, 2014).

### **Hipertensión**

La hipertensión es un problema global de salud pública, y su tratamiento reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El organismo regula la presión sanguínea a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS, renine angiotensin aldosterone system). La renina es producida por los riñones y actúa sobre el angiotensinógeno produciendo angiotensina I, que posteriormente pasa a través de la circulación pulmonar y con la ayuda de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) cataliza la conversión a angiotensina II, la cual es un potente vasoconstrictor, por lo tanto, la inhibición de la ECA disminuye la formación de la angiotensina II y de esta manera mitiga el aumento de la presión arterial (Gleeson *et al.*, 2015; Elkhtab *et al.*, 2017).

El uso de medicamentos a largo plazo para controlar la hipertensión ha mostrado efectos secundarios como: tos, erupción cutánea o insuficiencia renal (Ahtesh *et al.*, 2016).

Los péptidos de productos lácteos tienen la capacidad de inhibir la ECA, y por lo tanto controlar la hipertensión. Por ejemplo, las BAL empleadas para elaborar productos lácteos fermentados como el yogur, quesos y leches fermentadas, han mostrado producir péptidos con actividad inhibitoria de la ECA (Ahtesh *et al.*, 2016).

Las BAL utilizan los aminoácidos libres y péptidos pequeños para su crecimiento, sin embargo, los péptidos generados que no son consumidos por estos microorganismos son los que promueven las distintas funciones biológicas dentro del organismo (Hafeez *et al.*, 2014). En los quesos, se ha observado que la proteólisis aumenta la actividad inhibitoria de la ECA, pero llega un momento en que si la proteólisis continúa (por ejemplo, en quesos madurados) esta actividad disminuye (Smacchi y Gobbetti, 2000), ya que los péptidos bioactivos se convierten en otros péptidos y aminoácidos conforme avanza la maduración (Ryhänen *et al.*, 2001). Así mismo, se han aislado péptidos inhibidores de la ECA a partir de un hidrolizado de caseína (dodecapéptido, IC<sub>50</sub> = 77 µM) (Mulero-Cánovas *et al.*, 2011) y en leches fermentadas (Domínguez-González *et al.*, 2014)

En productos lácteos como el requesón y el queso Ricotta no se han reportado actividades inhibitorias de la ECA. No obstante, hay estudios que reportan péptidos presentes en el LS con esta actividad (Alvarado-Carrasco y Guerra, 2010). Tavares y Malcata (2012), mencionan que la actividad ECA inhibitoria ocurre cuando los péptidos contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en sus tres posiciones C-terminal. En el Cuadro 2 se resaltan algunos péptidos con inhibición de la ECA.

Cuadro 2. Péptidos de suero de leche con actividad inhibitoria de la ECA

<b>Fracción de proteína</b>	<b>Secuencia peptídica</b>
$\alpha$ -LA f(10 – 15 )	Arg-Glu-Leu-Lys-Asp-Leu
$\alpha$ -LA f(16 – 23)	Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu
$\alpha$ -LA f(16 – 26)	Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp
$\alpha$ -LA f(97 – 103)	Asp-Lys-Val-Gly-Ile-Asn-Tyr
$\alpha$ -LA f(97 – 104)	Asp-Lys-Val-Gly-Ile-Asn-Tyr-Trp
$\beta$ -LG f(9 – 14)	Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys
$\beta$ -LG f(15 – 20)	Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr
$\beta$ -LG f(22 – 25)	Leu-Ala-Met-Ala
$\beta$ -LG f(32 – 40)	Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg
$\beta$ -LG f(33 – 42)	Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-Val-Tyr
$\beta$ -LG f(58 – 61)	Leu-Gln-Lys-Trp
$\beta$ -LG f(78 – 80)	Ile-Pro-Ala
$\beta$ -LG f(81 – 83)	Val-Phe-Lys
$\beta$ -LG f(94 – 100)	Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys
$\beta$ -LG f(102 – 103)	Tyr-Leu
$\beta$ -LG f(102 – 105)	Tyr-Leu-Leu-Phe
$\beta$ -LG f(106 – 111)	Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala
$\beta$ -LG f(142 – 148)	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg

Fuente: Hernández-Ledesma *et al.*, 2008; Tavares y Malcata, 2012.

## **Actividad Antioxidante**

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas debido a su inestabilidad al tener uno o más electrones desapareados en su orbital externo. En el organismo, la mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) (Li et al., 2011; Guija-Poma *et al.*, 2015). A pesar de que existen varios sistemas de defensa antioxidante de naturaleza enzimática como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc. (todos encontrados en la leche) y no enzimáticas como ascorbato, ferritina, ceruloplasmina, polifenoles y antiocianinas (Hernández-Ledesma y Amigo, 2004; Guija-Poma *et al.*, 2015), frecuentemente, la defensa antioxidante es insuficiente para proteger al organismo de los radicales libres, es entonces cuando ocurre el llamado estrés oxidativo, lo que conlleva a diversos trastornos degenerativos como el cáncer, aterosclerosis, cataratas, diabetes *mellitus*, psoriasis, Alzheimer, envejecimiento e hipertensión (Hernández-Ledesma y Amigo, 2004; Guija-Poma *et al.*, 2015).

Los péptidos generados de la digestión de las proteínas lácteas que presentan actividad antioxidante incluyen los aminoácidos prolina, histidina, tirosina y triptófano (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008). En el LS los péptidos que presentan actividad antioxidante son provenientes de la  $\beta$ -LG (Cuadro 3) (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Péptidos de suero de leche con actividad antioxidante

<b>Fracción de proteína</b>	<b>Secuencia peptídica</b>
$\beta$ -LG f(19 – 20)	Trp-Tyr
$\beta$ -LG f(19 – 21)	Trp-Tyr-Ser
$\beta$ -LG f(19 – 22)	Trp-Tyr-Ser-Leu
$\beta$ -LG f(19 – 23)	Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala
$\beta$ -LG f(19 – 24)	Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met
$\beta$ -LG f(19 – 25)	Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala
$\beta$ -LG f(19 – 29)	Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile
$\beta$ -LG f(42 – 46)	Tyr-Val-Glu-Glu-Leu
$\beta$ -LG f(94 – 100)	Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys
$\beta$ -LG f(96 – 100)	Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys
$\beta$ -LG f(122 – 131)	Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu
$\beta$ -LG f(123 – 131)	Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu
$\beta$ -LG f(145 – 149)	Met-His-Ile-Arg-Leu

Fuente: Hernández-Ledesma *et al.*, 2008 y Ricci-Cabello *et al.*, 2012; Athira *et al.*, 2014.

Cichosz *et al.* (2017) mencionan que el antioxidante más activo en la grasa de la leche es el ácido linoleico conjugado (CLA, conjugated linoleic acid) y se ha reportado que varios productos lácteos como la nieve, mantequilla, yogurt, crema y diversos quesos son ricos en este antioxidante lipofílico, por ejemplo, el queso Ricotta contiene 84 % de CLA. En requesón no se encontraron a la fecha estudios que reporten la presencia de péptidos con actividad antioxidante.

Existen varios métodos para determinar la actividad antioxidante en los alimentos. Comúnmente se usan dos técnicas para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, la técnica que emplea el ABTS ((ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzo tiazolin-6-sulfónico)) y la que utiliza el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). El ensayo ABTS mide la capacidad relativa del antioxidante para eliminar los ABTS generados en la fase acuosa, en comparación con un estándar Trolox (análogo de la vitamina E). El ABTS se genera por la reacción de un agente oxidante fuerte (permanganato o persulfato de potasio) con la sal ABTS, la solución se torna azul-verde por el antioxidante donador de hidrógeno y el descenso de la coloración se mide en el espectrofotómetro a una absorción de onda de 734 nm (Shalaby y Shanab, 2013).

El DPPH es un radical libre estable con una banda de absorción a 215 nm. El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo se reduce a 2,2-difenil-1-picril hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH y por lo tanto el reactivo se decolora (Echavarría *et al.*, 2009; Shalaby y Shanab, 2013).

## LITERATURA CITADA

- Ahtesh, F., L. Stojanovska, N. Shah y V. K. Mishra. 2016. Effect of Flavourzyme® on angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides formed in skim milk and whey protein concentrate during fermentation by *Lactobacillus helveticus*. *J. Food Sci.* 81:135-143.
- Ahtesh, F. B., L. Stojanovska y V. Apostolopoulos. 2018. Anti-hypertensive peptides released from milk proteins by probiotics. *Maturitas.* 115:103-109.
- Alvarado-Carrasco, C. y M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An. venez. nutr.* 23:42-49.
- Armas de Hernández, M. J., M. C. Armas-Padilla y R. Hernández-Hernández. 2006. La hipertensión en Latinoamérica. *Rev. Latinoam. Hiperte.* 1:10-17.
- Athira, S., B. Mann, P. Saini, R. Sharma, R. Kumar y A. Kumar. 2014. Production and characterization of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *J. Sci. Food Agr.* 95:2908-2915.
- Baccouche, A., M. Ennouri, I. Felfoul y H. Attia. 2013. A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. *Food Hydrocolloid.* 33:234–244.
- Bansal, N., P. Piraino y P. L. H. McSweeney. 2010. Determination of proteolysis in cheese. En *Handbook of dairy foods analysis*. L. M. L. Nollet y F. Toldrá, eds. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, E. U. A.
- Bauza, R., A. González, G. Panissa, H. Petrocelli y V. Miller. 2005. Evaluación de dietas para cerdos en recría incluyendo forraje y suero de queso. *Revista Argentina de producción animal.* 25:11-18.
- Betancourt-López, L. y G. Afanador-Téllez. 2009. Alimentos de origen animal con efectos nutracéuticos para la salud humana. *Revista Ciencia Animal.* 2:41–52.
- Cichosz, G., H. Czczot, A. Ambroziak y M. M. Bielecka. 2017. Natural antioxidants in milk and dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* 70:165-178.
- Cuellas, A. y J. Wagner. 2010. Elaboración de bebida energizante a partir de suero de quesería. *Innotec.* 5:54–57.
- Domínguez-González, K. N., A. E. Cruz-Guerrero, H. González-Márquez, L. C. Gómez-Ruiz, M. García-Garibay y G. M. Rodríguez-Serrano. 2014. El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Rev. Argent. Microbiol.* 46:58-65.

- Dragone, G., S. I. Mussatto, J. M. Oliveira y J. A. Teixeira. 2009. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.* 112:929–935.
- Echavarría, B., A. Franco y A. Martínez. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae-Columbia.* 16:126-131.
- Egger, L. y O. Ménard. 2017. Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Curr. Opin. Food Sci.* 14:116-121.
- Elkhtab, E., M. El-Alfy, M. Shenana, A. Mohamed y A. E. Yousef. 2017. New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures. *J. Dairy Sci.* 100:1-13.
- Fox, P. F. y P. L. H. McSweeney. 1998. *Dairy chemistry and biochemistry.* 1a ed. Editorial Blackie Academic & Professional. Londres.
- Frydenberg, R. P., M. Hammershoj, U. Andersen, M. T. Greve y L. Wiking. 2016. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. *Food Chem.* 192:415–423.
- Guerrero-Rodríguez, W. J., P. Castilla-Hernández, K. N. Cárdenas-Medina, C. A. Gómez-Aldapa y J. Castro-Rosas. 2012. Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores UASB. *Tecnología Química.* 32:99-106.
- Gleeson, J. P., J. Heade, S. M. Ryan y D. J. Brayden. 2015. Stability, toxicity and intestinal permeation enhancement of two food-derived antihypertensive tripeptides, Ile-Pro-Pro and Leu-Lys-Pro. *Peptides.* 71:1-7.
- González-Olivares, L. G., J. Jiménez-Guzmán, A. Cruz-Guerrero, G. Rodríguez-Serrano, L. Gómez-Ruiz y M. García-Garibay. 2011. Liberación de peptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10:179-188.
- Guerrero-Rodríguez, W. J., C. A. Gomez-Aldapa, J. Castro-Rosa, C. A. González-Ramírez, y E. M. Santos-López. 2010. Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el Valle de Tulancingo. Páginas 321-328 en *Memorias del XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos.* Universidad de Guanajuato. División Ciencias de la Vida Campus Irapuato-Salamanca. Guanajuato, Gto. México.
- Guija-Poma, E., M. A. Inocente-Camones, J. Ponce-Pardo y E. Zarzosa-Norabuena. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Med.* 15:57-60.

- Hafeez, Z., C. Cakir-Kiefer, E. Roux, C. Perrin, L. Miclo y A. Dary-Mourot. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res. Int.* 63:71-80.
- Hernández-Callejas, J., F. Prieto-García, V. E. Reyes-Cruz, Y. Marmolejo-Santillán y M. A. Méndez-Marzo. 2012. Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria.* 22:11–18.
- Hernández-Ledesma, B. I. Recio y L. Amigo. 2008.  $\beta$ -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids.* 35:257-265.
- Hernández-Ledesma, B. y L. Amigo. 2004. La leche como fuente de antioxidantes naturales. *Alim. Nutri. Salud.* 11:61-65.
- Hernández-Rojas, M. y J. F. Vélez-Ruiz. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 8:13-22.
- Inda, C. A. E. 2000. Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad en la industria de la quesería. 1a ed. Editorial GTZ. Saltillo, Coahuila, México.
- Ju, Z. Y. y A. Kilara. 1998. Aggregation induced by calcium-chloride and subsequent thermal gelation of whey protein isolate. *J. Dairy Sci.* 81:925-931.
- Katsiari, M., E. Alichanidis, L. Voutsinas, y I. Roussis. 2000. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* 10:635–646.
- Kuhn, K. R., A. L. Fazani-Cavallieri y R. Lopes de Cunha. 2010. Cold-set whey protein gels induced by calcium or sodium salt addition. *Int. J. Food Sci. Tech.* 45:348-357.
- Li, Z., Y. Yang, M. Ming y B. Liu. 2011. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414:5-8.
- Londoño-Ospina, M. 2006. Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en Nutrición Humana.* 16:11-20.
- Maubois, J. L. y F. V. Kosikowski. 1978. Making Ricotta cheese by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.* 61:881-884.

- Mailliart, P. y B. Ribadeau-Dumas. 1988. Preparation of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\beta$ -Lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *J. Food Sci.* 53:743-745.
- Monsalve J. y D. González. 2005. Elaboración de un queso tipo Ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Revista científica.* 15:543-550.
- Mulero-Cánovas, J., P. Zafrilla-Rentero, A. Martínez-Cachá Martínez, M. Leal-Hernández, y J. Abellán-Alemán. 2011. Péptidos bioactivos. *Clínica e investigación en arteriosclerosis.* 23:219–227.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Secretaría de Economía.
- Ong, L. y N. P. Shah. 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Food Sci. Tech-Brazil.* 41:1555-1566.
- Organización Mundial de la Salud. 2013. Información general sobre la hipertensión en el mundo. WHO Document Production Services, Ginebra, Suiza.
- Parra-Huertas, R. A. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 62:4967-4982.
- Parra-Huertas, R. A. 2010. Digestión anaerobia de lactosuero: efecto de altas cargas puntuales. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 63:5385-5394.
- Pastorino, A. J., C. L. Hansen y D. J. McMahon. 2003. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. *J. Dairy Sci.* 86:60-69.
- Pérez-Gago, M. y Krochta J. 2002. Formation and Properties of Whey Protein Films and Coatings. En *Protein-based films and coatings*, Gennadios, A. 1a ed. CRC press. Boca Ratón, Florida, E.U.A.
- Qi, P. X., y C. I. Onwulata. 2011. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: effect of extrusion moisture content. *J. Dairy Sci.* 94:2231–44.
- Queirós, A. S. y J. A. Lopes-da-Silva. 2017. Nonthermal gelation of whey proteins induced by organic acids. *J. Appl. Polym. Sci.* 134:45134.
- Ravindra, P., E. S. Chan y K. Upender-Reddy. 2007. Effect of temperature and salt concentration on rheological behavior of whey protein isolate-starch mixed dispersions. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58:542-547.

- Ricci-Cabello, I., M. Olalla-Herrera y R. Artacho. 2012. Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutr Rev.* 70:241-255.
- Rojas-Ronquillo, R., A. Cruz-Guerrero, A. Flores-Nájera, G. Rodríguez-Serrano, L. Gómez-Ruiz, J. P. Reyes-Grajeda, J. Jiménez-Guzmán y M. García-Garibay. 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* 26:147-154.
- Ruiz-Marroquín, J. Á. 2006. Efecto de la acidez sobre las características sensoriales, físico-químicas y rendimiento del requesón de lactosuero de queso crema. Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.
- Ryhänen, E. L., A. Pihlanto-Leppälä y E. Pahkala. 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* 11:441-447.
- Salvatore, E., M. Pes, G. Falchi, D. Pagnozzi, S. Furesi, M. Fiori, T. Roggio, M. F. Addis y A. Pirisi. 2014. Effect of whey concentration on protein recovery in fresh ovine ricotta cheese. *J. Dairy Sci.* 97:4686-4694.
- Shalaby, E. A. y S. M. M. Shanab. 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 42:556-564.
- SIAP-SAGARPA. 2018. Panorama de la leche en México.
- Sieber, R., U. Bütikofer, C. Egger, R. Portmann, B. Walther y D. Wechsler. 2010. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci. Technol.* 90:47-73.
- Smacchi, E. y M. Gobbetti. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 17:129-141.
- Spreer, E. 1991. *Lactología industrial*. 2a edición. Editorial Acribia. España.
- Tavares, T. G. y F. X. Malcata. 2012. The Portuguese Paradox: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? *Food Chem.* 131:727-729.
- Tsutsumi, R., y Y. M. Tsutsumi. 2014. Peptides and proteins in whey and their benefits for human health. *J. Nutri. Food Sci.* 1:1-9.
- Walstra, P., J. T. Wouters y T. Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology*. Second Edition. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton.

Wijayanti H. B., Bansal N. y Deeth H. C. 2014. Stability of whey proteins during thermal processing: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.*13:1235-1251.

**ESTUDIO I. EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y SENSORIAL DE LA ADICIÓN  
DE SALES DE SODIO, POTASIO Y CALCIO EN LA ELABORACIÓN DE  
REQUESÓN**

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de diferentes tipos y concentraciones de sales (NaCl, KCl y CaCl<sub>2</sub>) sobre el rendimiento y aceptación del requesón. Las variables analizadas fueron rendimiento, humedad, ceniza, grasa y proteína, textura, color L\*, a\* y b\*, índice de blancura (IB), diferencia de color ( $\Delta E^*$ ), y los iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. El diseño de experimentos fue completamente al azar con 5 repeticiones, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se probaron las diferencias de medias mediante la prueba de Tukey. La evaluación sensorial de aceptación del requesón se realizó con 50 panelistas no entrenados, se empleó una escala hedónica de 5 puntos y las variables medidas fueron color, olor, sabor, textura y apariencia general, los resultados se analizaron con Chi-cuadrada. Con los resultados obtenidos se encontró que la sal no aumentó ( $P > 0.05$ ) el rendimiento del requesón de manera significativa. Sin embargo, se observó un ligero incremento ( $P > 0.05$ ) del rendimiento (0.63 %) del tratamiento que tenía 1 % (1:1) NaCl/KCl en comparación con el tratamiento control (sin sal); además, sería más recomendable usar el tratamiento que contiene ambas sales para disminuir el consumo de sodio en el requesón. En cuanto a la evaluación sensorial, el tratamiento que tuvo mayor aceptación fue el que contenía 1.5 % de NaCl. La prueba Chi-cuadrada mostró que las variables olor, sabor, textura y apariencia general se afectaron por el contenido de sal ( $P < 0.05$ ).

## ABSTRACT

The effect of different types and concentrations of salts (NaCl, KCl and CaCl<sub>2</sub>) on yield and acceptance of curd cheese was evaluated. The variables analyzed were yield, moisture, ash, fat, and protein, texture, L\*, a\* and b\* color, whiteness index (WI), color difference ( $\Delta E^*$ ), and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> ions. Experiment design was completely randomized with 5 repetitions, an analysis of variance (ANOVA) was performed and the differences in means were tested using Tukey test. Acceptance sensory evaluation for curd cheese, 50 untrained panelists participated, a 5 point hedonic scale was used and the variables measured were color, aroma, flavor, texture, and general appearance, results were analyzed with Chi-square. With the results obtained, it was found that salt did not significantly increase ( $P>0.05$ ) the yield of curd cheese. However, there was a slight increase in yield (0.63 %) ( $P>0.05$ ) of the treatment that had 1 % (1:1) NaCl/KCl compared to the control treatment (curd cheese without salt); also, it would be more advisable to use the treatment that contains both salts to reduce sodium intake in curd cheese. In sensory evaluation, the treatment that had highest acceptance was the one that contained 1.5 % NaCl. The chi-square test showed that the variables aroma, flavor, texture, and general appearance are affected by salt content ( $P<0.05$ ).

## INTRODUCCIÓN

El suero lácteo (LS) es el líquido obtenido por la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes ya sean de origen vegetal, animal o microbiano o por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimenticio (NOM-035-SSA1-1993). Los principales componentes del suero son la lactosa (44-58 g/L), proteínas (3 – 4 g/L) y las sales minerales (4.3 – 9.5 g/L) (Londoño-Ospina, 2006). Dependiendo del queso fabricado, el suero lácteo se clasifica en suero ácido y suero dulce. El suero ácido se obtiene de la fabricación de queso crema, asadero y Oaxaca; el suero dulce proviene del queso Chihuahua, y este último es ideal para producir requesón. El requesón es un producto obtenido a partir del LS el cual es coagulado por calentamiento en medio ácido para favorecer la obtención de la cuajada, la cual es salada, drenada, empacada y etiquetada para su posterior conservación en refrigeración (NOM-035-SSA1-1993). De acuerdo con Ramírez-López y Vélez-Ruiz (2012) el requesón se considera como queso fresco, cuyas características principales son el elevado contenido de humedad, sabor suave y no presentar corteza, su periodo de vida en anaquel es corto, por lo que debe mantenerse en refrigeración. El rendimiento de este producto es de aproximadamente 4.7 % (Ruiz-Marroquín, 2006). De acuerdo con Inda (2000) para obtener el mayor rendimiento de requesón es necesario partir de LS con una acidez titulable de 0.12 %, calentar el suero a temperaturas entre 71 y 101 °C a una velocidad aproximada de 1 °C/min y acidificar el medio a valores de pH entre 4.95 y 5.35 para precipitar la proteína. Sin embargo, son varios los factores que influyen en la agregación de las proteínas del LS y por ende que afectan el rendimiento durante la obtención

de requesón, entre ellos se encuentran la temperatura de calentamiento, la concentración inicial de proteína, el pH y el tipo y concentración de sales (Salvatore *et al.*, 2014).

Comúnmente al requesón se sala después que se recupera en mantas antes de ser refrigerado, sin embargo, productores locales mencionan que añadir la sal durante la etapa del calentamiento del suero (antes de acidificarlo) incrementa su rendimiento. Salvatore *et al.* (2014) mencionan que la fuerza iónica del LS es un parámetro importante que determina la agregación de las proteínas y la formación del gel. Particularmente la presencia de cationes divalentes, como el calcio, son fundamentales para promover la agregación de las proteínas ya que protegen las cargas negativas de éstas de forma parcial, reducen la repulsión electrostática y por lo tanto favorece la formación de grandes agregados.

Por otra parte, en los últimos años se ha tratado de disminuir la cantidad de sodio de los alimentos, ya que el consumo de este mineral en grandes cantidades contribuye al desarrollo de la hipertensión arterial, el cual se ha convertido en un problema serio de salud pública (Grummer y Schoenfuss, 2011). Por lo anterior, es importante para la industria de alimentos buscar opciones o nuevos procesos que ayuden a disminuir el sodio en los productos alimenticios procesados, siempre tratando de no afectar la calidad sensorial que esperan los consumidores.

Sin embargo, específicamente en la industria de los quesos, es complicado reducir o reemplazar por completo el NaCl, debido a que esta sal juega un papel crucial en el sabor, en el grado de sinéresis de la cuajada, en la

calidad sanitaria y en la actividad enzimática que se lleva a cabo durante la maduración (Grummer y Schoenfuss, 2011).

A la fecha, en requesón, no se han encontrado estudios sobre el reemplazo o la disminución de NaCl, aunque en quesos sí existen investigaciones al respecto (Grummer y Schoenfuss, 2011). Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de distintas proporciones de sales (NaCl, KCl y CaCl<sub>2</sub>) en las características fisicoquímicas y aceptación organoléptica del requesón.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Suero de Leche de Vaca**

El LS se obtuvo de la quesería “Los Piñones” ubicada en la ciudad de Chihuahua, Chih., México. El LS se recolectó inmediatamente después de la elaboración de queso Chihuahua, de acuerdo con su origen y características fisicoquímicas fue considerado como LS dulce. Los lotes de LS fueron de 10 L y se tomaron en diferentes días. Para su traslado se emplearon recipientes de plástico y no se utilizó ningún sistema de refrigeración debido a que el traslado de la quesería al laboratorio fue corto (aproximadamente 7 min). Los análisis del LS se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de Origen Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua; se evaluó, temperatura, pH y acidez (expresado como ácido láctico). Cuando fue necesario se ajustó la acidez a 0.12 % con una solución de hidróxido de calcio (J. T. Baker, México) al 10 %.

### **Tratamientos**

Los tratamientos de requesón se diferenciaron de acuerdo al tipo y cantidad de sal adicionada (cloruro de sodio (Sal La Fina<sup>®</sup>), cloruro de potasio (Golden Bell Reactivos, México) y cloruro de calcio (J. T. Baker, México). Las sales se añadieron durante la etapa del calentamiento del LS, los tratamientos se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Formulación de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca, adicionado con diferentes sales (cloruro de sodio – NaCl, cloruro de potasio – KCl y cloruro de calcio – CaCl<sub>2</sub>) a diferentes concentraciones

Tratamiento	Sal (% p/v)		
	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>
1 (control)	-	-	-
2 (1 % NaCl)	1	-	-
3 (1.5 % NaCl)	1.5	-	-
4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl]	0.5	0.5	-
5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl]	0.75	0.75	-
6 (0.1 % CaCl <sub>2</sub> )	-	-	0.1

## **Elaboración de Requesón**

Se utilizaron lotes de 10 L de LS para elaborar los tratamientos de requesón, modificando la metodología de Inda (2000). Se elevó la temperatura del suero hasta 96 °C a una velocidad aproximada de 1 °C/min. Al llegar a esa temperatura, se añadió 0.1 % de ácido cítrico (CTR Scientific, México) y la sal correspondiente para cada tratamiento. Posteriormente, se mantuvo la temperatura a 96 °C por 10 min, y a continuación se dejó reposar durante 30 min sin agitación. Finalmente, el requesón se recuperó con mantas, las cuales se colgaron para eliminar por acción de la gravedad el exceso de líquido remanente durante dos horas a temperatura ambiente. El requesón obtenido se empacó en bolsas de polietileno de baja densidad con cierre hermético (Ziploc®) y las muestras se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

## **Rendimiento**

Se determinó el porcentaje del rendimiento de requesón con la siguiente fórmula. Se consideraron; el volumen inicial del suero y el peso del producto final después de la etapa de filtrado.

$$Rendimiento = \frac{\text{peso del requesón (g)}}{\text{volumen del suero (lt)}} * 100$$

## **Análisis Físicoquímico**

El pH se midió en el LS sin diluir con un potenciómetro (Orion VersaStar, Thermo Scientific®, Singapur). Para la determinación del porcentaje de acidez se siguió la metodología de Vargas-Uscategui *et al.* (2017), se explica brevemente; se tomaron 9 ml de suero y se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N (J. T.

Baker), utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador (Golden Bell Reactivos). El porcentaje de acidez se obtuvo de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\% \text{ acidez} = \frac{A \times B \times C}{D} * 100$$

donde:

*A*: Cantidad de ml gastados de NaOH en la titulación

*B*: Normalidad del NaOH

*C*: Peso equivalente expresado en g del ácido predominante en el producto (ácido láctico), miliequivalentes de ácido láctico = 0.09 g

*D*: ml de la muestra o peso de la muestra en g (en caso de muestra sólida)

Para determinar la acidez y el pH en el requesón se pesó 1 g de muestra y se diluyó en 10 ml de agua destilada y se siguió la metodología descrita anteriormente. El contenido de grasa se determinó de acuerdo con el método mojonier (989.05 AOAC, 1998) y proteína se cuantificó por el método Kjeldahl (991.20 AOAC, 1998). Para la determinación de la humedad y cenizas se emplearon técnicas gravimétricas con base en los métodos 926.08 y 935.42 del AOAC (1998), respectivamente. Estas técnicas se aplicaron tanto al suero como a las muestras de requesón, todas las evaluaciones se realizaron por quintuplicado.

### **Contenido de Sal**

Según Bintsis *et al.* (2008) el contenido de sal se puede determinar por método potenciométrico; por lo tanto, se midieron los iones de calcio (Ca<sup>2+</sup>) con el electrodo 9720BNWP, potasio (K<sup>+</sup>) con el electrodo 9719BNPW y sodio (Na<sup>+</sup>)

con el electrodo 8611BNPW. Se tomó 1 g de muestra (requesón) y se diluyó en 10 ml de agua destilada y se añadió 1 ml de la solución ajustadora de fuerza iónica (ISA, ionic strength adjuster) dependiendo del ion analizado. El potenciómetro y los electrodos fueron de la marca Orion VersaStar, Thermo Scientific®, Singapur.

### **Color**

El color del requesón se evaluó con un colorímetro (Konica Minolta®, modelo CR-410, Japón), en términos de  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (valores negativos indican tendencia al color verde y los positivos hacia el rojo) y  $b^*$  (valores negativos indican tonalidad azul y positivos amarillo), y con estos valores se calcularon el índice de blancura (IB) y la diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de acuerdo con las siguientes fórmulas. Para  $\Delta E^*$  se usaron como valores de referencia (*ref*) el requesón del tratamiento control.

$$IB = L - 3b + 3a$$

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2}$$

### **Textura**

La dureza y adhesividad del requesón se evaluaron con un texturómetro TA.XT-Plus (Stable Microsystems®, Gran Bretaña), modificando ligeramente la metodología de textura para queso crema descrito por Brighenti *et al.* (2008), se

seleccionó la metodología del queso crema por poseer características similares de textura. El requesón se depositó en un recipiente de vidrio de aproximadamente 10 cm de profundidad hasta llenarlo por completo con el producto. Se usó un aditamento cónico TA-15A (cono de acrílico de 45 °) y las condiciones de operación fueron: velocidad de prueba 1 mm/s y distancia de desplazamiento de 10 mm. Los resultados que se obtuvieron fueron la fuerza máxima de compresión (dureza) y la fuerza mínima que indicó el valor de adhesividad, ambas fueron expresadas en Newtons (N).

### **Evaluación Sensorial**

Se realizó una prueba de aceptación sensorial con 50 panelistas (consumidores) de entre 18 y 60 años de edad. Se evaluaron (Apéndice 1) las características organolépticas olor, color, sabor, textura y apariencia general en los 6 tratamientos de requesón utilizándose una escala hedónica de 5 puntos. Las muestras se presentaron aleatoriamente a los panelistas identificadas con un código de 3 dígitos, el consumidor debía enjuagar el paladar con agua entre muestras (Ruiz-Marroquín, 2006).

### **Análisis Estadístico**

Se empleó un diseño completamente al azar de una vía. Las variables de respuesta para los tratamientos de requesón fueron rendimiento, humedad, cenizas, grasa, proteína,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , IB,  $\Delta E^*$ , dureza y adhesividad. Los resultados de los análisis fisicoquímicos del suero se usaron como covariables. Se realizaron 5 repeticiones para cada tratamiento. Los datos fueron analizados a través del procedimiento ANOVA, usando el procedimiento GLM en SAS versión

9.1.3 (Institute Inc. E. U. A., 2006). Posteriormente se realizó la comparación múltiple de medias por medio de la prueba Tukey, usando un valor de  $\alpha = 0.05$ . Los datos de la concentración de iones se analizaron de la misma manera. En cuanto a la evaluación sensorial, se realizó una prueba de Chi cuadrada para determinar si existía asociación entre tratamientos y las respuestas sensoriales (olor, color, sabor, textura y apariencia general), utilizando el procedimiento FREQ del paquete SAS; posteriormente, se realizó un Análisis de Correspondencia para revisar qué tratamientos correspondían más con qué niveles de respuesta sensorial en la escala hedónica, utilizando el procedimiento CORRESP del mismo paquete.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis Físicoquímico

Los resultados del rendimiento y análisis proximal (humedad, cenizas, grasa y proteína) de los tratamientos de requesón se observan en el Cuadro 5. El T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] presentó mayor rendimiento y el T1 (control) el menor (4.43 y 3.80 %, respectivamente), pero no se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos ( $P > 0.05$ ). Para que se hubiera observado un efecto significativo sobre el rendimiento añadiendo la sal al suero como se describió en la metodología, se necesitaría emplear grandes cantidades de sal (aproximadamente el 7 %) (Pastorino *et al.*, 2003), pero probablemente se obtendría un producto lácteo con sabor desagradable. No obstante, hubo una tendencia central de aumento (aproximadamente 16 %) en el rendimiento entre el T4 en comparación con el T1 y una disminución aproximada del 75 % de sodio en comparación con la adición de 1.5 % de NaCl.

Intrago-Sampedro y Merizalde Avilés (2013) reportaron un rendimiento de requesón del 1.81 % con 1 % de sal y de 2.43 % con 0.5 % de sal, valores inferiores a los encontrados en este estudio, probablemente porque utilizaron suero ácido proveniente de la elaboración de queso crema.

Rashid *et al.* (2017) investigaron la optimización del  $\text{CaCl}_2$ , temperatura y pH para maximizar el rendimiento de queso Ricotta elaborado con LS de búfalo, estos investigadores mencionan que la adición de  $\text{CaCl}_2$  al suero durante el tratamiento térmico ayuda a disminuir el pH, formándose complejos proteína-Ca-

Cuadro 5. Composición fisicoquímica de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca (media  $\pm$  desviación estándar)

Tratamiento	Rendimiento (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
1	3.80 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	75.81 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>	7.79 $\pm$ 1.82 <sup>a</sup>	11.69 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>
2	4.32 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	76.53 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	2.33 $\pm$ 0.80 <sup>ab</sup>	4.28 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>	10.00 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>
3	4.40 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	76.30 $\pm$ 2.59 <sup>a</sup>	2.58 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	5.04 $\pm$ 2.41 <sup>ab</sup>	9.51 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>
4	4.43 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	75.26 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	5.29 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>	10.05 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>
5	4.30 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	76.76 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	2.48 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	5.28 $\pm$ 1.08 <sup>ab</sup>	9.25 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>
6	3.89 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	76.30 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	5.66 $\pm$ 2.23 <sup>ab</sup>	11.51 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>

**T1:** Control; **T2:** 1 % NaCl; **T3:** 1.5 % NaCl; **T4:** 1 % (1:1) NaCl/KCl; **T5:** 1.5 % (1:1) NaCl/KCl; **T6:** 0.1 % CaCl<sub>2</sub>

<sup>a-c</sup>Valores con literales diferentes en superíndice en columnas indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre tratamientos.

proteína que posteriormente se agregan y que los agregados que se forman son de tamaño pequeño. Las condiciones donde obtuvieron mayor rendimiento (7.52 %) fueron: 90°C, pH 7 y  $\text{CaCl}_2$  6 mM. El rendimiento fue más alto que el de cualquiera de los tratamientos encontrados en este estudio, sin embargo, cabe mencionar que el queso Ricotta es una mezcla entre LS y leche entera o descremada, y el requesón se elabora con 100 % de LS bovina.

Considerando la parte tecnológica, se realizó una simulación de las ganancias de una quesería por mes, suponiendo que se añadiera la combinación de sales del T4, que fue el tratamiento con mayor rendimiento, en lugar de solo emplear NaCl al 1 %, y siguiendo la misma metodología. Para esto se consideró una producción diaria de 600 litros de suero proveniente de queso Chihuahua y el precio a la venta del kilogramo de requesón (\$ 44.00 MXN). La combinación de sales del T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl], aumentaría aproximadamente \$ 5 000.00 las ganancias mensuales.

En cuanto a las cenizas, que representan el contenido mineral de los alimentos, los tratamientos que presentaron menor porcentaje de cenizas fueron el control con 1.51 % y el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  con 1.17 % ( $P>0.05$ ), lo que pudiera deberse a que el primero no contenía ningún tipo de sal y en el T6 ( $\text{CaCl}_2$ ) la concentración de sal fue más baja que el resto de los tratamientos. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas para cenizas ( $P>0.05$ ); los tratamientos con valores numéricos más altos fueron los que contaron con mayor cantidad de adición de sales, tal fue el caso de los tratamientos 2 (1 % NaCl), 3

(1.5 % NaCl), 4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] y 5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl], con valores de 2.33 %, 2.58 %, 2.14 % y 2.48 % de cenizas, respectivamente.

El tratamiento control tuvo el mayor porcentaje de grasa y el T2 (NaCl 1 %) el menor (7.79 y 4.28 %, respectivamente) ( $P < 0.05$ ). Intrago-Sampedro y Merizalde-Avilés (2013) reportaron valores de grasa para requesón de 5.67 %; sin embargo, en ese estudio el requesón fue elaborado con suero proveniente de queso crema y la sal se añadió directamente al requesón (después del desuerado), aun así, esos valores se asemejan a los reportados en el presente estudio en los tratamientos 3 (1.5 % NaCl), 4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl], 5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] y 6 (0.1 %  $\text{CaCl}_2$ ) con 5.04 %, 5.29 %, 5.28 % y 5.66 % de grasa, respectivamente. Villarruel-López *et al.* (2016) realizaron un muestreo de requesón de 55 queserías de Guadalajara, México, para evaluar la calidad microbiológica y fisicoquímica del producto, en promedio el contenido de proteína se encontró entre 8.4 y 9.6 % y el contenido de grasa fue de alrededor de 6.38 %, lo que coincide con los resultados que se obtuvieron en este estudio.

### **Concentración de Iones**

Las concentraciones de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  de los tratamientos de requesón se observan en el Cuadro 6. El tratamiento 3 (1.5 % de NaCl) fue el que presentó mayor concentración de sodio (948.50 ppm), este resultado era de esperarse ya que fue el tratamiento que contenía mayor cantidad de NaCl. Los tratamientos 2 (1 % de NaCl) y 5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] no presentaron diferencia significativa entre sí ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 6. Concentración en partes por millón (ppm) de iones calcio, potasio y sodio de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales (media  $\pm$  desviación estándar)

Tratamiento	(ppm)		
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
1	136.23 $\pm$ 9.81 <sup>d</sup>	106.43 $\pm$ 5.44 <sup>c</sup>	1.97 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
2	335.06 $\pm$ 12.41 <sup>b</sup>	109.96 $\pm$ 7.81 <sup>c</sup>	2.82 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
3	948.50 $\pm$ 38.46 <sup>a</sup>	106.34 $\pm$ 7.73 <sup>c</sup>	2.62 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
4	236.06 $\pm$ 16.54 <sup>c</sup>	256.55 $\pm$ 21.01 <sup>b</sup>	1.30 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
5	339.47 $\pm$ 24.14 <sup>b</sup>	407.61 $\pm$ 17.29 <sup>a</sup>	2.47 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
6	123.26 $\pm$ 5.47 <sup>d</sup>	102.63 $\pm$ 4.14 <sup>c</sup>	2.60 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>

**T1:** Control; **T2:** 1 % NaCl; **T3:** 1.5 % NaCl; **T4:** 1 %, (1:1) NaCl/KCl; **T5:** 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; **T6:** 0.1 % CaCl<sub>2</sub>

a, b, c, <sup>d</sup>Valores con literales diferentes en superíndice en columnas indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre tratamientos.

En cuanto a la concentración de los iones  $K^+$ , el T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] presentó una concentración de 256.55 ppm y el T5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] de 407.61 ppm ( $P < 0.05$ ), siendo este último el más alto debido a que la cantidad de KCl fue mayor en ese tratamiento.

Los tratamientos 1 (control) y 4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] mostraron los valores más bajos de iones de  $Ca^{2+}$  (1.97 y 1.30 ppm, respectivamente), resultando estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos de requesón ( $P < 0.05$ ). Se esperaba que la concentración de  $Ca^{2+}$  en el T6 fuera mayor debido a que se le añadió  $CaCl_2$  únicamente. Sin embargo, la cantidad que se agregó al suero para hacer requesón de  $CaCl_2$  fue poca (0.1 %), debido a que la potencia de sabor es mayor por ser una sal divalente y esa fue la cantidad organolépticamente aceptable para consumirlo. Salvatore *et al.* (2014) reportan para queso Ricotta 22.94 mg/g de  $Ca^{2+}$  lo que equivaldría a 22 940 ppm de  $Ca^{2+}$ , que supera en gran medida a los resultados obtenidos de cualquier tratamiento de requesón de este estudio.

### **Color**

El Cuadro 7 muestra los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , índice de blancura (IB) y diferencia de color ( $\Delta E^*$ ). La adición de diferentes sales, la variación en su concentración y/o la combinación de algunas de estas, no generó cambios significativos en luminosidad, índice de blancura y diferencia de color entre tratamientos ( $P > 0.05$ ). Respecto al parámetro  $a^*$ , los tratamientos 1 (control) y 6 (0.1 %  $CaCl_2$ ) mostraron diferencia estadística ( $P < 0.05$ ), ambos valores fueron

Cuadro 7. Valores de color, índice de blancura y diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales (media  $\pm$  desviación estándar)

Tratamiento	$L^{*\blacktriangle}$	$a^{*\square}$	$b^{*\triangle}$	$IB^{\bullet}$	$\Delta E^{*\blacklozenge}$
1	92.36 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	-2.25 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	12.60 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	47.78 $\pm$ 3.43 <sup>a</sup>	-
2	92.24 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	-1.87 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	12.36 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>	49.53 $\pm$ 5.64 <sup>a</sup>	1.37 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>
3	92.21 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	-1.96 $\pm$ 0.46 <sup>ab</sup>	12.38 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	49.19 $\pm$ 4.76 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
4	92.59 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	-1.93 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	12.50 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	49.31 $\pm$ 5.09 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
5	92.33 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	-2.01 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>	12.72 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	48.14 $\pm$ 7.77 <sup>a</sup>	1.96 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>
6	92.61 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	-1.47 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	10.86 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	55.61 $\pm$ 2.38 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>

**T1:** Control; **T2:** 1 % NaCl; **T3:** 1.5 % NaCl; **T4:** 1 %, (1:1) NaCl/KCl; **T5:** 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; **T6:** 0.1 % CaCl<sub>2</sub>

<sup>ab</sup>Valores con literales diferentes en superíndice en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

$L^{*\blacktriangle}$  = luminosidad,  $a^{*\square}$  = verde (-) y rojo (+),  $b^{*\triangle}$  = azul (-) y amarillo (+).  $IB^{\bullet}$  = Índice de blancura (valor calculado).  $\Delta E^{*\blacklozenge}$  = Diferencia de color (valor calculado).

negativos, que indica tendencia al color verde, sin embargo, el valor del T1 (-2.25) fue mayor que el del T6 (-1.47). A pesar de la diferencia entre estos dos tratamientos, en el parámetro  $a^*$ , no se encontraron diferencias con el resto de los tratamientos de requesón. En cuanto al color  $b^*$ , los seis tratamientos tuvieron resultados positivos indicando tendencia hacia el color amarillo, sin diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ).

Vargas-Uscategui *et al.* (2017) reportaron valores de  $a^*$  y  $b^*$  pero en queso cottage, los valores fueron de -2.22 y 13.49, respectivamente. En queso Ricotta se han encontrado valores de  $a^*$  de -3.0 y de  $b^*$  de 12.3 (Ortiz-Araque *et al.*, 2017).

Los valores de índice de blancura superiores a 100 indican colores blancos azulados, mientras que los valores inferiores a este valor representan blancos amarillentos (Intrago-Sampedro y Merizalde-Avilés, 2013). Se observó que el valor más bajo de índice de blancura fue para el tratamiento control, que fue el tratamiento con mayor porcentaje de grasa, lo que concuerda con lo citado por Wendin *et al.* (2000) quienes mencionan que un alto contenido de grasa en quesos brinda una coloración amarillenta, a diferencia de los quesos que tienen menor porcentaje de grasa, que son más blancos. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ( $P>0.05$ ).

Según Ramírez-Navas y de Stouvenel (2012), los valores de  $\Delta E^*$  que se encuentran por debajo de 2.7 no son perceptibles al ojo humano (0 – 0.7 nada; 0.7 – 2.5 ligeramente; 2.5 – 3.0 notable; 3.0 – 6.0 apreciable; 6.0 – 12.0 considerable y 12.0 fuerte). En el presente estudio el valor más alto de  $\Delta E^*$  fue

para el T6 (0.1 %  $\text{CaCl}_2$ ) con un valor de 2.01; mientras que el menor valor (1.16) correspondió al T3 (1.5 %  $\text{NaCl}$ ). De acuerdo con los rangos y características que describen los autores mencionados con anterioridad, todos los tratamientos se encuentran dentro de tonalidades diferentes al control, aunque la diferencia es considerada ligeramente visible.

### **Textura**

El Cuadro 8 muestra los valores de textura (dureza y adhesividad) de los tratamientos. Londoño-Ospina (2006) define dureza como la fuerza máxima obtenida durante el primer ciclo de compresión, en otras palabras, es la fuerza que se requiere para comprimir un producto entre los molares o entre la lengua y el paladar. En este estudio no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ) de textura entre los tratamientos para este parámetro.

En cuanto a la adhesividad, que representa el área negativa después de la primera compresión, describe el trabajo fundamental para despegar el alimento del paladar (Londoño-Ospina, 2006). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ) entre el T1 (control) y T6 (0.1 %  $\text{CaCl}_2$ ) con valores de -0.13 N y -0.25 N, respectivamente. Ju y Kilara (1998) evaluaron los mismos parámetros de textura en geles hidrolizados de WPI, unos contenían  $\text{CaCl}_2$  (40 mM) y otros  $\text{NaCl}$  (200 mM), los resultados que obtuvieron para dureza fueron 0.22 N y 0.15 N, respectivamente, y para adhesividad 0.68 N (para el gel con  $\text{CaCl}_2$ ) y 0.29 N para el gel con  $\text{NaCl}$ , comparando con esos resultados, el presente estudio mostró valores de dureza más altos y los de adhesividad fueron

Cuadro 8. Valores de dureza y adhesividad de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales (media  $\pm$  desviación estándar)

Tratamiento	Dureza (N)	Adhesividad (N)
1	0.48 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	-0.13 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
2	0.54 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	-0.20 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
3	0.49 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	-0.16 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>
4	0.55 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	-0.18 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
5	0.39 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	-0.17 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
6	0.65 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	-0.25 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>

**T1:** Control; **T2:** 1 % NaCl; **T3:** 1.5 % NaCl; **T4:** 1 %, (1:1) NaCl/KCl; **T5:** 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; **T6:** 0.1 % CaCl<sub>2</sub>

<sup>a,b</sup> Valores con literales diferentes en superíndice en columnas indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre tratamientos.

más bajos, lo que pudiera deberse a que las concentraciones de sal que usaron estos autores fueron más altas.

### **Evaluación Sensorial**

La Figura 1 muestra el análisis de correspondencia entre los tratamientos y los niveles de percepción de olor, donde se observa la correspondencia existente entre el T5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] y el nivel sensorial 4 (me gusta), por lo que fue el tratamiento que más gustó a los panelistas. En olor, el T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] corresponde al nivel 3 (ni me gusta, ni me disgusta), finalmente ningún tratamiento correspondió cercanamente al nivel 1 (no me gusta).

El análisis de correspondencia de la categoría color se observa en la Figura 2. El T2 (1 % NaCl) corresponde al nivel 4 (me gusta), los T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] y T5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] corresponden al nivel 5 (me gusta mucho). El T6 (0.01 % CaCl<sub>2</sub>) corresponde al nivel 3 (ni me gusta ni me disgusta). Sin embargo, es notable la cercanía entre niveles sensoriales y tratamientos, lo que concuerda con los datos obtenidos de manera instrumental para  $\Delta E^*$ , en donde todos los tratamientos cayeron en la clasificación de diferencia “ligeramente visible”, de manera que fue difícil que los panelistas encontraran diferencias en el color.

En el parámetro sabor (Figura 3) se encontraron diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Se observó que el T3 (1.5 % NaCl) fue el preferido por los panelistas debido a que tuvo la mayor correspondencia con el nivel 5 (me gusta mucho), T2 (1 % NaCl) y T5 [1.5 %, (1:1) NaCl/ KCl] tuvieron mayor correspondencia con el nivel 4 (me gusta El T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] corres-

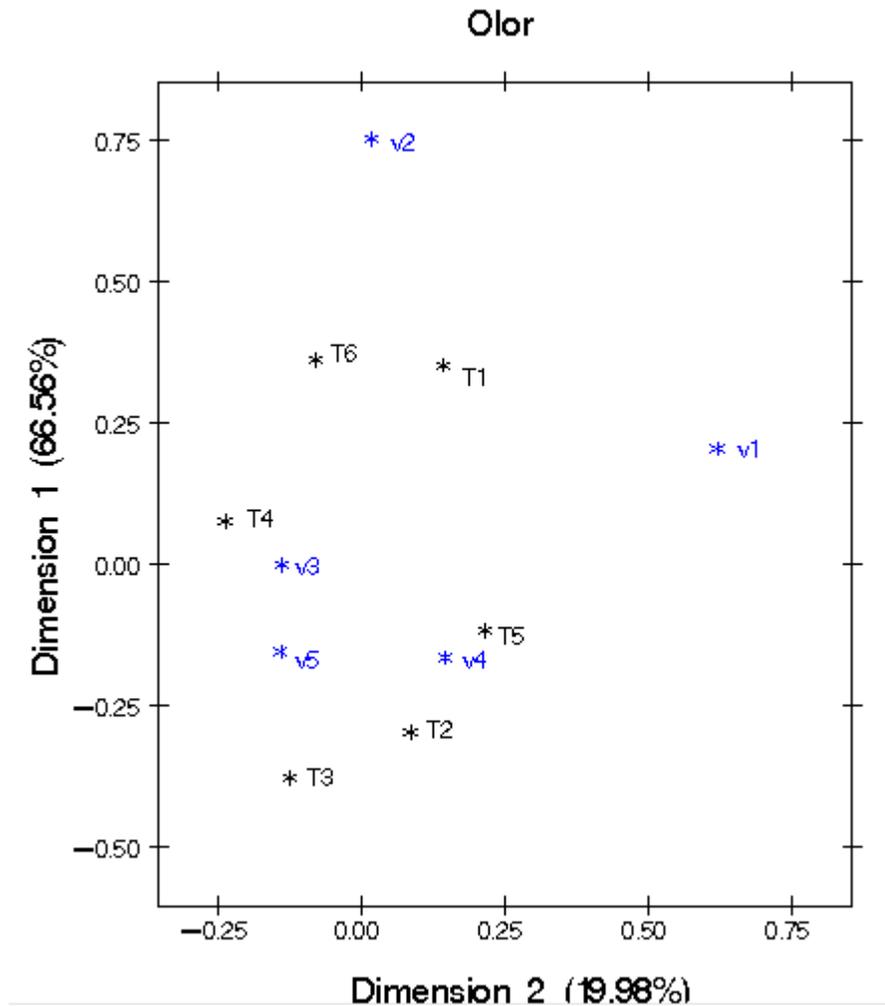


Figura 1. Análisis de correspondencia para la categoría olor de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl<sub>2</sub>; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.

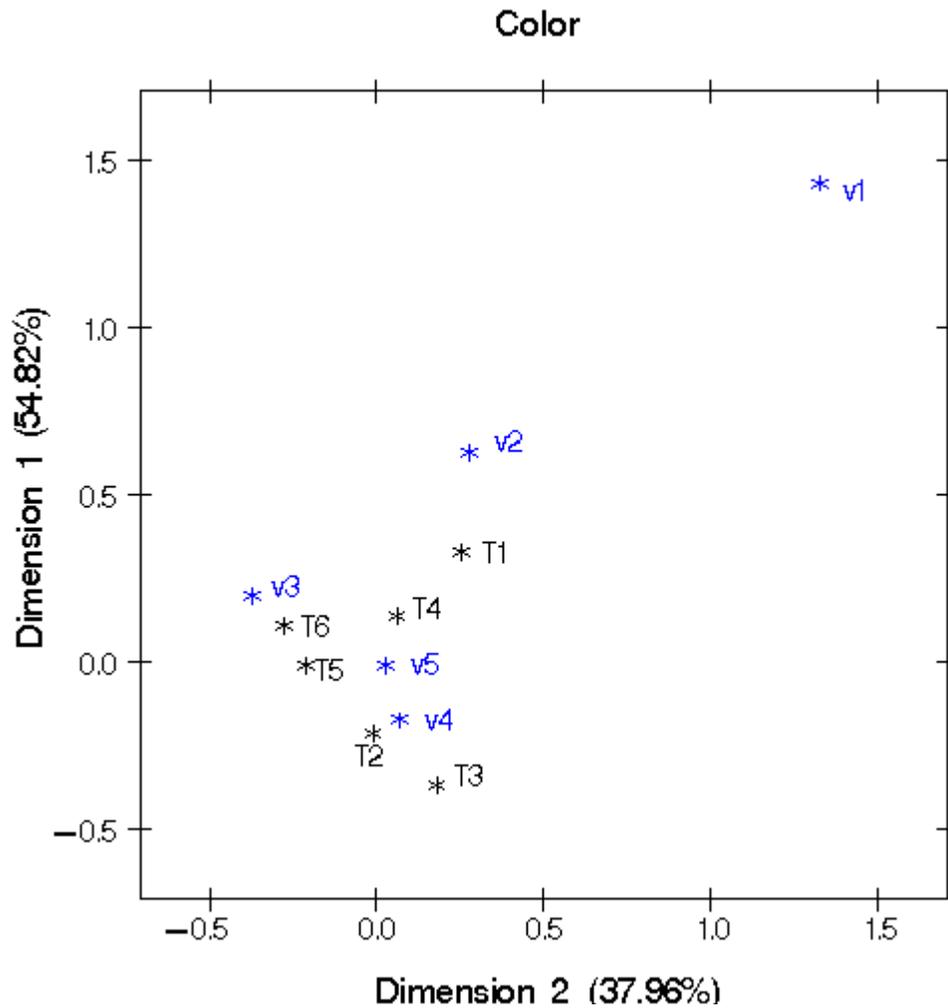


Figura 2. Análisis de correspondencia para la categoría color de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl<sub>2</sub>; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.

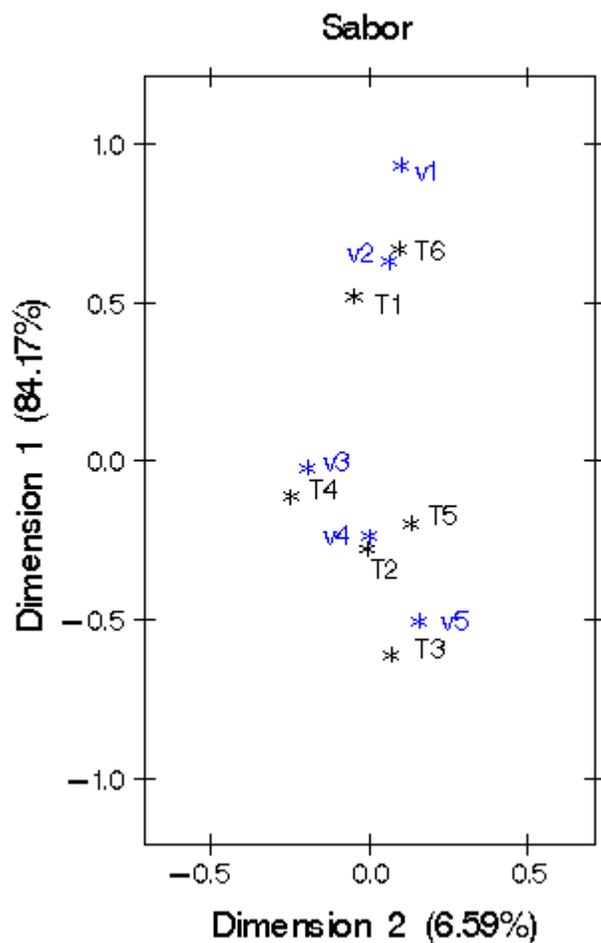


Figura 3. Análisis de correspondencia para la categoría sabor de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl<sub>2</sub>; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.

ponde al nivel 3 (ni me gusta ni me disgusta) y los tratamientos 1 (Control) y 6 (0.1 %  $\text{CaCl}_2$ ) corresponden al nivel 2 (me gusta poco), aunque también el nivel 1 (no me gusta) corresponde al T6 (0.1 %  $\text{CaCl}_2$ ), debido a que 10 personas lo clasificaron como “no me gusta”.

El análisis de correspondencia de textura se presenta en la Figura 4, en donde se observa que el T2 (1 % de NaCl) corresponde al nivel 5 (me gusta mucho), los tratamientos 4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] y 5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] corresponden al nivel 4 (me gusta); y el T4 [1 %, (1:1) NaCl/KCl] al igual que el 1 (control) corresponden al nivel 3 (ni me gusta ni me disgusta).

En cuanto a la apariencia general, se puede ver el análisis de correspondencia en la Figura 5, donde T2 (1 % NaCl) y T5 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] corresponden al nivel 5 (me gusta mucho), por su parte el T1 (control) corresponde tanto al nivel 2 (me gusta poco) como al nivel 3 (ni me gusta ni me disgusta) y el T3 (1.5 % NaCl) corresponde al nivel 4 (me gusta) ya que 31 panelistas lo colocaron en esa categoría.

Además, se realizó una gráfica radial (Gráfica 1) en donde se aprecia de manera general los valores promedios por tratamiento; en esta se aprecia que los parámetros color, apariencia general y olor obtuvieron valores similares en todos los tratamientos. También se observan diferencias entre T1 (control) y T6 (0.01 %  $\text{CaCl}_2$ ), sobre todo en los parámetros de sabor y textura (que obtuvieron valores bajos).

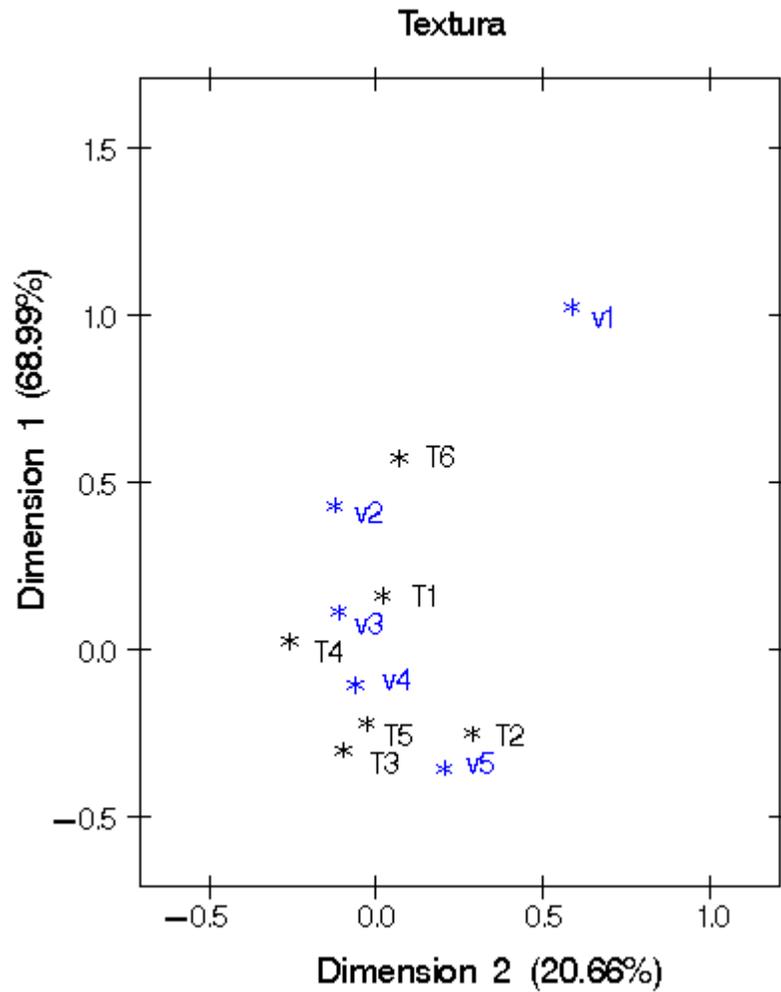


Figura 4. Análisis de correspondencia para la categoría textura de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl<sub>2</sub>; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.

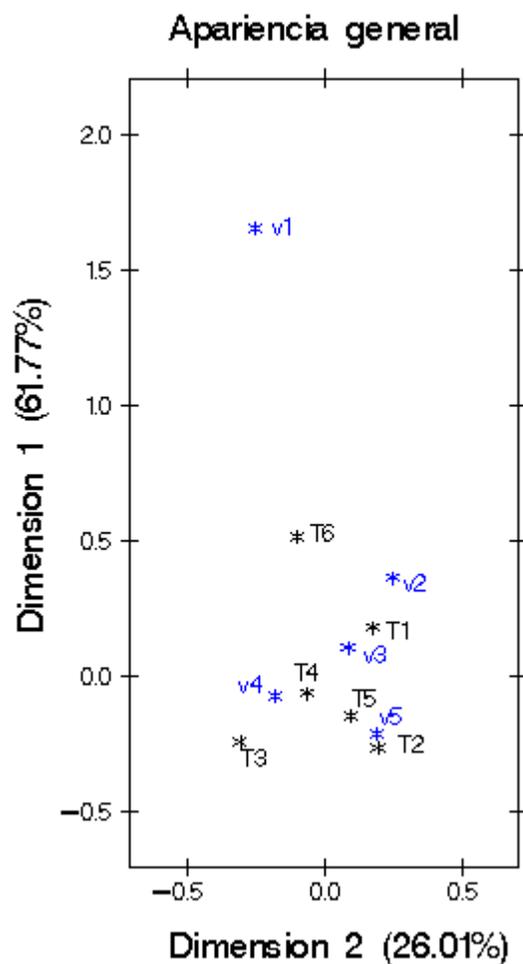
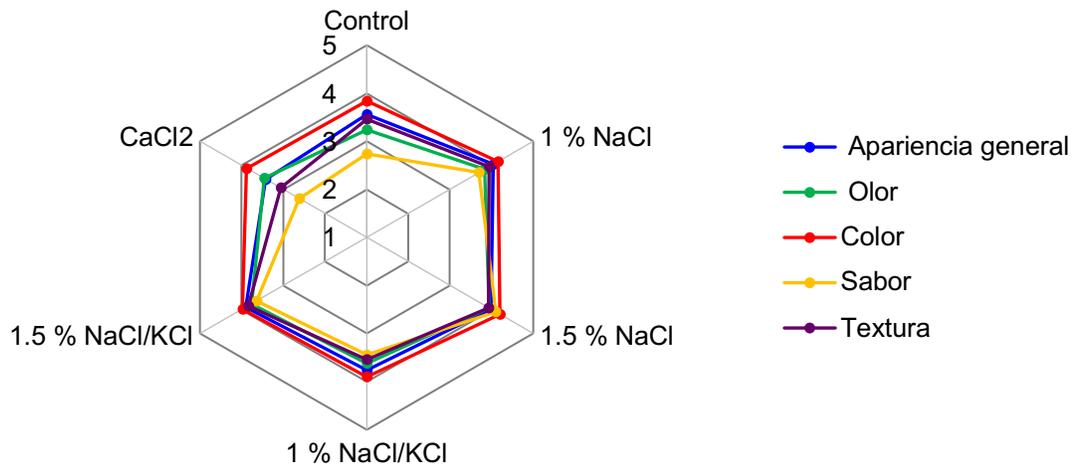


Figura 5. Análisis de correspondencia para la categoría apariencia general de la evaluación sensorial de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales. T1: Control; T2: 1 % NaCl; T3: 1.5 % NaCl; T4: 1 %, (1:1) NaCl/KCl; T5: 1.5 %, (1:1) NaCl/KCl; T6: 0.1 % CaCl<sub>2</sub>; v1: no me gusta; v2: me gusta poco; v3: ni me gusta ni me disgusta; v4: me gusta; v5: me gusta mucho.



Gráfica 1. Valores promedio de los parámetros de evaluación sensorial por tratamiento de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales.

Por otra parte, la evaluación sensorial se analizó con la prueba de Chi-cuadrada, esta prueba estadística indica si la aceptación organoléptica de los tratamientos de requesón dependió del contenido de sal añadida. Los parámetros afectados significativamente ( $P < 0.05$ ) por los tratamientos fueron olor, sabor, textura y apariencia general. Únicamente el color no fue estadísticamente diferente ( $P > 0.05$ ), lo que concuerda con las pruebas instrumentales, ya que la diferencia de color entre los tratamientos no es visible para el ojo humano. Los valores de Chi-cuadrada se pueden observar en el Cuadro 9.

De manera general, el requesón del T3 (1.5 % de NaCl) fue el más aceptado por su sabor, mientras que los menos aceptados fueron el requesón sin sal (control) y el T6 (0.1 % de  $\text{CaCl}_2$ ). El requesón del T3 fue el que más gusto a los panelistas, probablemente a que en nuestra cultura se tiene por costumbre consumir alimentos “salados”, misma razón por la cual quizás no gustó el requesón sin sal (control). El producto con 0.1 % de  $\text{CaCl}_2$  fue poco aceptado, tal vez por el sabor otorgado por el cloruro del calcio, una sal que se consume con poca frecuencia y a la cual no está acostumbrado nuestro paladar.

Cuadro 9. Valores de Chi-cuadrada y su significancia para evaluar el efecto de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, sobre las variables organolépticas y apariencia general

Variable	Valor de Chi-cuadrada	Probabilidad de error ( <i>P-value</i> )
Olor	37.9713	0.0089
Color	29.2008	0.0839
Sabor	72.0909	< 0.0001
Textura	40.2362	0.0047
Apariencia general	35.4581	0.0178

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Agregar sal al suero durante el proceso térmico para elaborar requesón no aumenta (estadísticamente) el rendimiento del mismo, los principales factores que influyeron sobre el rendimiento fueron la temperatura y la acidificación del suero. Sin embargo, usar la combinación de sales al 1 % (1:1) de NaCl y KCl incrementa ligeramente el rendimiento y se puede ver reflejado en la ganancia mensual de la venta de requesón. Además, se recomienda el uso de esta combinación de sales para disminuir el consumo de sodio en este producto lácteo.

## LITERATURA CITADA

- AOAC Official Method 926.08. 1998. Moisture in cheese. Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> edition, vol II. Food composition, additives, natural contaminants. Maryland, USA.
- AOAC Official Method 935.42. 1998. Ash of cheese. Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> edition, vol II. Food composition, additives, natural contaminants. Maryland, USA.
- AOAC Official Method 989.05. 1998. Fat in milk. Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> edition, vol II. Food composition, additives, natural contaminants. Maryland, USA.
- AOAC Official Method 991.20. 1998. Nitrogen (total) in milk. Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> edition, vol. II. Food composition, additives, natural contaminants. Maryland, USA.
- Bintsis, T., A. S. Angelidis y L. Psoni. 2008. Modern laboratory practices – Analysis of dairy products. En *Advanced Dairy Science and Technology*. T. J. Britz y R. K. Robinson, eds. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Reino Unido.
- Brighenti, M., S. Govindasamy-Lucey, K. Lim, K. Nelson y J. A. Lucey. 2008. Characterization of the rheological, textural, and sensory properties of samples of commercial US cream cheese with different fat contents. *J. Dairy Sci.* 91:4501-4517.
- Grummer, J. y T. C. Schoenfuss. 2011. Determining salt concentrations for equivalent water activity in reduced-sodium cheese by use of a model system. *J. Dairy Sci.* 94:4360-4365.
- Inda, C. A. E. 2000. Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad en la industria de la quesería. 1a ed. Editorial GTZ. Saltillo, Coahuila, México.
- Intrago-Sampedro M. F. y M. G. Merizalde-Avilés. 2013. Efecto del tipo de leche y contenido de sal en las características físico-químicas y sensoriales del requesón. Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.
- Ju, Z. Y. y A. Kilara. 1998. Gelation of hydrolysates of a whey protein isolate induced by heat, proteases, salts and acid. *Int. Dairy J.* 8:303-309.
- Londoño-Ospina, M. 2006. Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en nutrición humana.* 16:11-20.

- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA1-1993. Bienes y servicios. Quesos de suero. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud. México.
- Ortiz-Araque, L. C., M. Darré, C. M. Ortiz, J. F. Massolo y A. R. Vicente. 2017. Quality and yield of Ricotta cheese as affected by milk fat content and coagulant type. *Int. J. Dairy Technol.* 70:340-346.
- Pastorino, A. J., C. L. Hansen y D. J. McMahon. 2003. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. *J. Dairy Sci.* 86:60-69.
- Ramírez-López, C. y J. F. Vélez-Ruiz. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 6:131-148.
- Rashid, A. A., N. Huma, T. Zahoor y M. Asgher. 2017. Optimization of pH, temperature and CaCl<sub>2</sub> concentrations for Ricotta cheese production from buffalo cheese whey using response surface methodology. *J. Dairy Res.* 84:109-116.
- Ruiz-Marroquín, J. Á. 2006. Efecto de la acidez sobre las características sensoriales, físico-químicas y rendimiento del requesón de lactosuero de queso crema. Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.
- Sieber, R., U. Bütikofer, C. Egger, R. Portmann, B. Walther y D. Wechsler. 2010. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci. Technol.* 90:47-73.
- Vargas-Uscategui, R., A. Arenas-Clavijo y J. S. Ramírez-Navas. 2017. Efecto del proceso de acidificación sobre el color de queso cottage. *Agron. Mesoam.* 28:677-690.
- Villarruel-López, A., J. Castro-Rosas, C. A. Gómez-Aldapa, K. Nuño, M. R. Torres-Vitela, N. E. Martínez-González y L. E. Garay-Martínez. 2016. Indicator microorganisms, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, Staphylococcal enterotoxin, and physicochemical parameters in requesón cheese. *Afr. J. Food Sci.* 10:178-184.
- Wendin, K., M. Langton, L. Caous y G. Hall. 2000. Dynamic analyses of sensory and microstructural properties of cream cheese. *Food Chem.* 71:363-378.

**ESTUDIO II. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIPO DE EMPAQUE SOBRE  
LAS ACTIVIDADES INHIBITORIA DE LA ECA Y ANTIOXIDANTE *IN VITRO*  
EN EL REQUESÓN**

## RESUMEN

Se elaboraron cuatro tratamientos de requesón, control (sin adición de sal), 1 % NaCl, 1.5 % NaCl, y 1.5 % (1:1) NaCl/KCl y se empacaron en bolsa de polietileno (Ziploc<sup>®</sup>, México) y al vacío. Se evaluó proteólisis, concentración peptídica, actividad inhibitoria de la ECA y actividad antioxidante (ABTS y DPPH) a través del tiempo a los días 1, 7 y 14 (muestras destructivas). El diseño de experimentos fue completamente al azar con tres repeticiones, y se consideró un arreglo de tratamientos factorial que incluyó los cuatro factores de sal, dos niveles de empaque y tres días. Se realizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) y se calcularon las diferencias de medias mediante la prueba de Tukey utilizando un valor de  $\alpha = 0.05$ . Se realizó un análisis de correlación entre pares de variables. Se observó que la actividad antioxidante por ABTS mostró valores más altos que con la técnica DPPH, sobretodo en los tratamientos con mayor contenido de sal, T3 (1.5 % NaCl) y T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl]. La actividad antioxidante encontrada en el requesón de este estudio mostró valores más bajos en comparación con la reportada para quesos madurados, pero fue similar en comparación con quesos frescos como el cottage en estudios previos. La proteólisis del requesón se mantuvo constante a través del tiempo en ambos tipos de empaque en los tratamientos que tenían sal, T2 (1 % NaCl), T3 (1.5 % NaCl) y T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl], debido a que la sal disminuye el grado de proteólisis. La concentración peptídica, en general, aumentó en todos los tratamientos al día 7 y disminuyó al día 14 ( $P < 0.05$ ), este comportamiento se observó con los dos tipos de empaque. La actividad inhibitoria de la ECA aumentó de manera significativa del día 1 al 14 ( $P < 0.05$ ).

## ABSTRACT

Four curd cheese treatments [control (no salt addition), 1 % NaCl, 1.5 % NaCl, and 1.5 % (1:1) NaCl/KCl] were prepared and packed in a polyethylene bag (Ziploc<sup>®</sup>, México) and vacuum. Proteolysis, peptide concentration, ACE inhibitory activity and antioxidant activity (DPPH and ABTS) were evaluated over time at days 1, 7 and 14 (destructive samples). Experimental design was completely randomized with three repetitions, and it was considered a factorial treatment arrangement that included the four salt factors, two packing levels and three days. A multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed and mean differences were calculated using Tukey test a value of  $\alpha = 0.05$ . A correlation analysis of the variables was also performed. It was observed that antioxidant activity by ABTS showed higher values than DPPH technique, especially in treatments with higher salt content like T3 (1.5 NaCl) and T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl]. The antioxidant activity found in curd cheese in this study showed lower values compared to those reported for mature cheeses but was similar compared to fresh cheeses such a cottage cheese in previous studies. Curd cheese proteolysis remained constant over time in both types of packaging in treatments that had salt, T2 (1 % NaCl), T3 (1.5 % NaCl) y T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl], because salt decreases proteolysis degree. In general, peptide concentration increased in all treatments at day 7 and decreases at day 14 ( $P < 0.05$ ), this behavior was observed with both packages. ACE inhibitory activity increased significantly from day 1 to 14 ( $P < 0.05$ ).

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, se clasifican en: hipertensión, enfermedades cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca y cardiopatías. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial. Se calcula que en 2015 fallecieron 17.7 millones de personas (31 % de todas las muertes registradas en el mundo), los países de ingresos bajos y medios representaron tres cuartas partes de este porcentaje (OMS, 2017). En los países industrializados, el 35 % de la mortalidad de la población se debe a la hipertensión o alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales (Mulero-Cánovas *et al.*, 2011).

Una manera de controlar las enfermedades cardiovasculares es la prevención, por lo tanto, es importante cuidar el sobrepeso y la obesidad, evitar el consumo de tabaco, disminuir el consumo de alcohol y realizar actividad física (Hsieh *et al.*, 2015; OMS, 2017). También es importante disminuir el consumo de sodio, las dietas con alto contenido de este mineral están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar hipertensión (González de la Cruz y Rodríguez-Arias, 1998; FDA, 2018). Así mismo, algunos investigadores recomiendan que además de reducir el consumo de sal es importante aumentar la ingesta de potasio para disminuir la hipertensión (Adrogué y Madias, 2007; Monckeberg, 2012; Hsieh *et al.*, 2015).

Dentro de los medicamentos que se consumen para controlar la hipertensión se encuentran el Captopril™, Enalapril™ y Lisinopril™ que actúan

inhibiendo a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Tavares y Malcata, 2012; Ahtesh *et al.*, 2016). La ECA forma parte del sistema renina-angiotensina que regula la presión arterial periférica, la ECA cataliza la conversión de angiotensina I a angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor, provocando la contracción de los vasos sanguíneos y por lo tanto aumentando la presión arterial (Sieber *et al.*, 2010).

Investigaciones de más de 20 años han demostrado que existen alimentos que contienen péptidos con actividad antihipertensiva, y muchos péptidos inhibidores de la ECA se han aislado de productos lácteos (Madureira *et al.*, 2010; Mulero Cánovas *et al.*, 2011) incluyendo el LS (Alvarado y Guerra, 2010). Entre estos destacan los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, los cuales se han encontrado en yogurt, leches fermentadas y quesos (Nakamura *et al.*, 1995; Donkor *et al.*, 2007; Sieber *et al.*, 2010; Domínguez-González *et al.*, 2014; Gleeson *et al.*, 2015; Ahtesh *et al.*, 2016; Elkhtab *et al.*, 2017). Estos péptidos resisten a las enzimas digestivas y de esta manera son capaces de ejercer esta actividad (Donkor *et al.*, 2007). En general, los péptidos cortos (< 3 kDa) poseen mejor actividad inhibitoria de la ECA (Alvarado y Guerra, 2010). Estudios en humanos comprueban que el consumo de estos péptidos no causa efectos secundarios en comparación con los medicamentos (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2016).

Por otra parte, se han encontrado péptidos en PLS con actividad antioxidante, siendo la lactoferrina y  $\beta$ -LG las proteínas que influyen en mayor medida en las propiedades antioxidantes de la leche (Cichosz *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo es uno de los principales factores responsables de iniciar o desarrollar enfermedades degenerativas incluyendo las enfermedades cardiovasculares (Hsieh *et al.*, 2015). En las últimas décadas, se han buscado péptidos derivados del LS que eliminen los radicales libres y se ha encontrado que los péptidos que presentan alta capacidad antioxidante son aquellos que contienen histidina, lisina y tirosina, así como los aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina) (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008; Alvarado y Guerra, 2010; Shahidi y Zhong, 2010; Ricci-Cabello *et al.*, 2012; Cichosz *et al.*, 2017).

Martín del Campo *et al.* (2019) encontraron péptidos (por hidrólisis enzimática a 52 °C y pH de 8.2) con actividad antioxidante y antihipertensiva en LS proveniente de queso panela.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue observar el efecto que ejerce el tipo de empaque y el tipo y concentración de sal en la proteólisis, actividad ECA inhibitoria y actividad antioxidante e inhibición de la ECA en el requesón a través de su vida en anaquel.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación de las Muestras**

Para esta segunda etapa experimental se seleccionaron cuatro formulaciones de requesón con los diferentes tratamientos de sal del estudio I que fueron: control (sin sal), 1 % de NaCl, 1.5 % de NaCl y 1.5 % de NaCl/KCl, estos últimos en relación 1:1, la selección de los tratamientos se basó en el grado de aceptación por parte de los panelistas en la evaluación sensorial. El requesón se realizó de la misma manera descrita en el Estudio I. Se emplearon dos tipos de empaque, bolsa de polietileno de baja densidad (Ziploc®) y vacío (bolsa de polietileno y poliamida). La concentración de péptidos, proteólisis y las actividades antioxidante (ABTS y DPPH) y ECA inhibitoria se evaluaron a través del tiempo, a los días 1, 7 y 14. Para las primeras tres técnicas se utilizó el extracto soluble en agua (WSE, water soluble extract) de los tratamientos, y para la actividad inhibitoria de la ECA se utilizaron los liofilizados de los WSE. Los análisis de las muestras se realizaron por triplicado.

### **Preparación del Extracto Soluble en Agua (WSE)**

El wse se obtuvo con base a la metodología descrita por Torres-Llanez *et al.* (2011). Se tomaron 30 g de muestra de requesón y se mezclaron con 100 ml de agua destilada, se homogenizó en licuadora (Oster®) durante 1 min, posteriormente se centrifugó a 20 000 g a 4 °C por 30 min, el sobrenadante se filtró (Whatman No. 42). Las muestras filtradas se conservaron en congelación a -20 °C hasta su análisis.

## **Actividad Antioxidante**

**ABTS.** La técnica de ABTS se modificó ligeramente de la metodología descrita por Thaipong *et al.* (2006). La formación del radical ABTS<sup>•+</sup> se realizó mediante la reacción de persulfato de potasio y ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico); se preparó la solución stock con 0.0194 g de ABTS (Sigma-Aldrich, Canadá) y 0.0033 g de persulfato de potasio (Sigma-Aldrich, E. U. A), se disolvieron en 5 ml de agua destilada, el recipiente que contiene el reactivo se cubrió con papel aluminio y se almacenó de 12 a 16 h a temperatura ambiente (solución madre). Posteriormente, se tomó 1 ml de la solución madre de ABTS y se diluyó con 60 ml de metanol (solución de trabajo), se leyó en el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón) a 734 nm para lograr una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  unidades. Se tomaron 150  $\mu$ L del extracto acuoso de cada muestra y se añadió 2900  $\mu$ L de la solución de trabajo ABTS, las muestras con el reactivo se dejaron en reposo por dos horas en la oscuridad antes de tomar la lectura en el espectrofotómetro a la misma longitud de onda mencionada con anterioridad.

Se utilizó Trolox (( $\pm$ )-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetra-methylchromane-2-carboxylic; Sigma-Aldrich, Rusia) para elaborar la curva estándar. Los resultados se expresaron en  $\mu$ M equivalentes Trolox (TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity), la curva de calibración se observa en el Apéndice 2.

**DPPH.** La actividad antioxidante por DPPH siguió la metodología especificada por Thaipong *et al.* (2006). Se preparó la solución stock que consistió en 24 mg del reactivo DPPH (Sigma-Aldrich, Alemania) disuelto en 100 ml de metanol, se guardó en congelación a -20 °C. La solución de trabajo se

obtuvo mezclando 10 ml de la solución stock y 45 ml de metanol para conseguir una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  unidades a 515 nm en el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón). De los extractos solubles en agua se tomaron 150  $\mu$ L (muestra) y se mezclaron con 2900  $\mu$ L de solución de trabajo de DPPH, se dejaron por 24 h en la oscuridad antes de tomar la lectura a 515 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ M equivalentes Trolox (TEAC). La curva de calibración se observa en el Apéndice 3.

### **Proteólisis**

Se siguió la metodología de Church *et al.* (1983). Se pesaron 0.5 g de dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma-Aldrich) y se disolvieron en 2.5 ml de agua destilada, para obtener una solución al 20 %. Además, se preparó otra solución de tetraborato de sodio (Sigma-Aldrich) 100 mM, por lo que se pesaron 0.953 g del reactivo y se diluyeron en 25 ml de agua destilada. Por último, se preparó una solución con 0.04 g de OPA (Sigma-Aldrich) más 1 ml de metanol y 100  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich); las dos primeras soluciones se añadieron a la última y se aforó a 50 ml. La solución se guardó en un recipiente ámbar y se dejó reposar una noche en la oscuridad.

La preparación de la muestra fue la siguiente: se pesaron 2.5 g de requesón y se mezclaron con 5 ml de ácido tricloroacético (solución al 0.75 %), se filtró con papel filtro Whatman No. 42. Finalmente se mezclaron 1 ml de la solución anteriormente preparada y 50  $\mu$ L del filtrado de la muestra, se agitó y se incubó por 2 min, se tomó la lectura a 340 nm en el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón).

## **Concentración Peptídica**

Se realizó por el método de Bradford (1976), para esto se utilizaron 2.5 g de muestra de requesón y se añadieron 5 ml de ácido tricloroacético (J. T. Baker) al 0.75 %, la mezcla se homogenizó en un mortero de porcelana y posteriormente se filtró (Whatman No. 42). De los filtrados se tomaron 0.1 ml y se mezclaron con 1 ml del reactivo Bradford (Sigma-Aldrich), se agitaron y se reposaron en la oscuridad por 5 min, se tomó la lectura de las muestras a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón). Para la curva de calibración se prepararon estándares de albúmina bovina (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 0 – 70 µg/mL. Con la ecuación resultante ( $y = 0.0067x + 0.5423$ ) con un valor de  $R^2 = 0.9902$  se calculó la concentración de proteína de las muestras de requesón. La curva de calibración se muestra en el Apéndice 4.

## **Actividad Inhibitoria de la ECA**

La actividad inhibitoria de la ECA se analizó con ligeras modificaciones por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) conforme a lo descrito por Pritchard *et al.* (2010) y Ghassem *et al.* (2011). Se diluyó una unidad de la ECA (Sigma-Aldrich) en 10 ml de Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 50 mM (pH = 7.5) con NaCl 0.3 M para obtener una concentración de 100 mU/mL. Se congelaron alícuotas de 1 mL a -20 °C hasta su uso.

Las muestras de los filtrados liofilizados se resuspendieron en agua tridestilada hasta alcanzar una concentración de 50 mg/mL. A continuación, se tomaron 50 µL de los filtrados liofilizados resuspendidos de cada muestra (o 50 µL de agua tridestilada para la muestra control) y se les adicionó 200 µL de la

solución de Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL, Sigma-Aldrich) 2.5 mM (se pesaron 0.1073 g de HHL y se aforó en 10 mL con agua destilada). Se incubó a 37 °C por 10 min. Posteriormente, a cada una de las muestras se adicionaron 10 µL de ECA (100 mU/mL) y se incubaron nuevamente a 37 °C por 30 min con agitación constante. La reacción se detuvo con la adición de 250 µL de HCl 1 M. A continuación, la solución se filtró (filtros de nylon Whatman 30 mm/0.20 µm) y se inyectaron 5 µL de muestra en el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) acoplado con un detector UV – visible (Shimadzu). Se usó una columna Discovery® C18 de 25 cm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula (SUPELCO® Analytical), la cual fue eluída con agua-metanol 50 – 50 % (v/v) acidificada con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Alcrich) a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min y una absorbancia de 228 nm. La evaluación de la inhibición de la ECA se basó en la comparación entre la concentración de ácido hipúrico (HA, Sigma-Aldrich) en presencia y ausencia (muestra control) del inhibidor. A cada pico de HA obtenido se le determinó el área bajo la curva.

El porcentaje de inhibición de la ECA se determinó por la altura del pico de ácido hipúrico en la muestra control (ECA, HHL), en la muestra que contiene un inhibidor (ECA, HHL y péptido) y en la muestra sin la ECA (HHL, péptido), mediante la siguiente fórmula. Se promediaron los valores de tres determinaciones de cada concentración para calcular el porcentaje de inhibición de la ECA como se describe a continuación:

$$\text{Inhibición de la ECA (\%)} = \frac{(\text{control} - \text{muestra con inhibidor})}{(\text{control} - \text{muestra sin ECA})} * 100$$

## Análisis Estadístico

El diseño experimental contempló un arreglo de tratamientos factorial, considerando los factores nivel de sal (s), que fueron 4 (requesón sin sal – control, requesón con 1 % de NaCl, 1.5 % de NaCl y 1.5 % de NaCl/KCl), dos niveles de empaque (E) (bolsa de polietileno y empaque al vacío) y día (d; 1, 7 y 14 días de almacenamiento) en un diseño completamente al azar bajo el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + s_i + E_j + d_k + sE_{ij} + sd_{ik} + Ed_{jk} + sEd_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

$y_{ijkl}$  = es la variable de respuesta medida en la observación  $l$  del nivel de sal  $i$ , empaque  $j$  y día  $k$

$\mu$  = media general

$s_i$  = efecto del nivel de sal  $i$

$E_j$  = efecto del empaque  $j$

$d_k$  = efecto del día  $k$

$sE_{ij}$  = efecto de la interacción del nivel de sal  $i$  y el empaque  $j$

$sd_{ik}$  = efecto de la interacción del nivel de sal  $i$  y el día  $k$

$Ed_{jk}$  = efecto de la interacción del empaque  $j$  y el día  $k$

$sEd_{ijk}$  = efecto de la triple interacción del nivel de sal  $i$ , empaque  $j$  y día  $k$

$\epsilon_{ijkl}$  = error experimental asociado a la observación  $l$  del nivel de sal  $i$ , empaque  $j$  y día  $k$ .

El análisis se realizó mediante un Análisis de la Varianza, Univariado (ANOVA) y Multivariado (MANOVA) utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Correlaciones

El Cuadro 10 muestra los coeficientes de correlación de las variables concentración peptídica, proteólisis, DPPH, ABTS y actividad inhibitoria de la ECA para los cuatro tratamientos de requesón. Cabe mencionar que solo se discutirán las correlaciones que fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

En el T1 (control) se observaron dos correlaciones inversamente proporcionales, la primera de ellas se encontró entre las variables proteólisis y concentración peptídica con un factor de 0.827 ( $P < 0.05$ ), esto significa que la proteólisis en el requesón control aumentó de tal forma que los péptidos se separaron hasta quedar aminoácidos. La segunda correlación se presentó entre proteólisis y actividad antioxidante (método DPPH) con un valor de 0.525 ( $P < 0.05$ ), mientras aumentó la proteólisis, la capacidad antioxidante por el método DPPH disminuyó, estos resultados tienen que ver con primera correlación, se cree que al aumentar la proteólisis los péptidos que tenían capacidad antioxidante se degradan y por lo tanto pierden su actividad. Las variables capacidad antioxidante (método ABTS) y la actividad inhibitoria de la ECA no presentaron correlación con las demás variables ( $P > 0.05$ ).

En el T2 (1 % NaCl) solo hubo una correlación (0.848) estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), dándose esta entre las variables concentración peptídica y actividad inhibitoria de la ECA, lo que significa que a mayor cantidad de péptidos mayor fue la actividad inhibitoria de la ECA.

Cuadro 10. Coeficientes de correlación y valores de P de las variables concentración peptídica, proteólisis, actividad antioxidante (métodos DPPH y ABTS) y actividad inhibitoria de la ECA de los tratamientos de quesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales

Variables	Concentración peptídica	Proteólisis	DPPH	ABTS
T1 (Control)				
Proteólisis	-0.827 <.000	1		
DPPH	0.4056 0.094	-0.525 0.025	1	
ABTS	-0.058 0.817	0.155 0.539	-0.104 0.679	1
Actividad inhibitoria de la ECA	0.355 0.148	0.014 0.955	-0.431 0.074	0.090 0.722
T2 (1 % NaCl)				
Proteólisis	-0.443 0.065	1		
DPPH	-0.429 0.076	-0.050 0.843	1	
ABTS	0.303 0.222	-0.394 0.106	0.064 0.801	1
Actividad inhibitoria de la ECA	0.848 <.000	-0.106 0.67	-0.374 0.126	0.090 0.721

Continuación del Cuadro 10

Variables	Concentración peptídica	Proteólisis	DPPH	ABTS
T3 (1.5 % NaCl)				
Proteólisis	0.135 0.593	1		
DPPH	-0.230 0.356	-0.343 0.163	1	
ABTS	-0.285 0.250	-0.279 0.260	0.179 0.476	1
Actividad inhibitoria de la ECA	0.301 0.223	0.049 0.844	-0.511 0.030	-0.391 0.108
T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl]				
Proteólisis	-0.438 0.068	1		
DPPH	-0.004 0.985	-0.153 0.546	1	
ABTS	-0.318 0.197	0.327 0.184	-0.008 0.9719	1
Actividad inhibitoria de la ECA	-0.125 0.620	0.485 0.041	-0.411 0.089	0.464 0.051

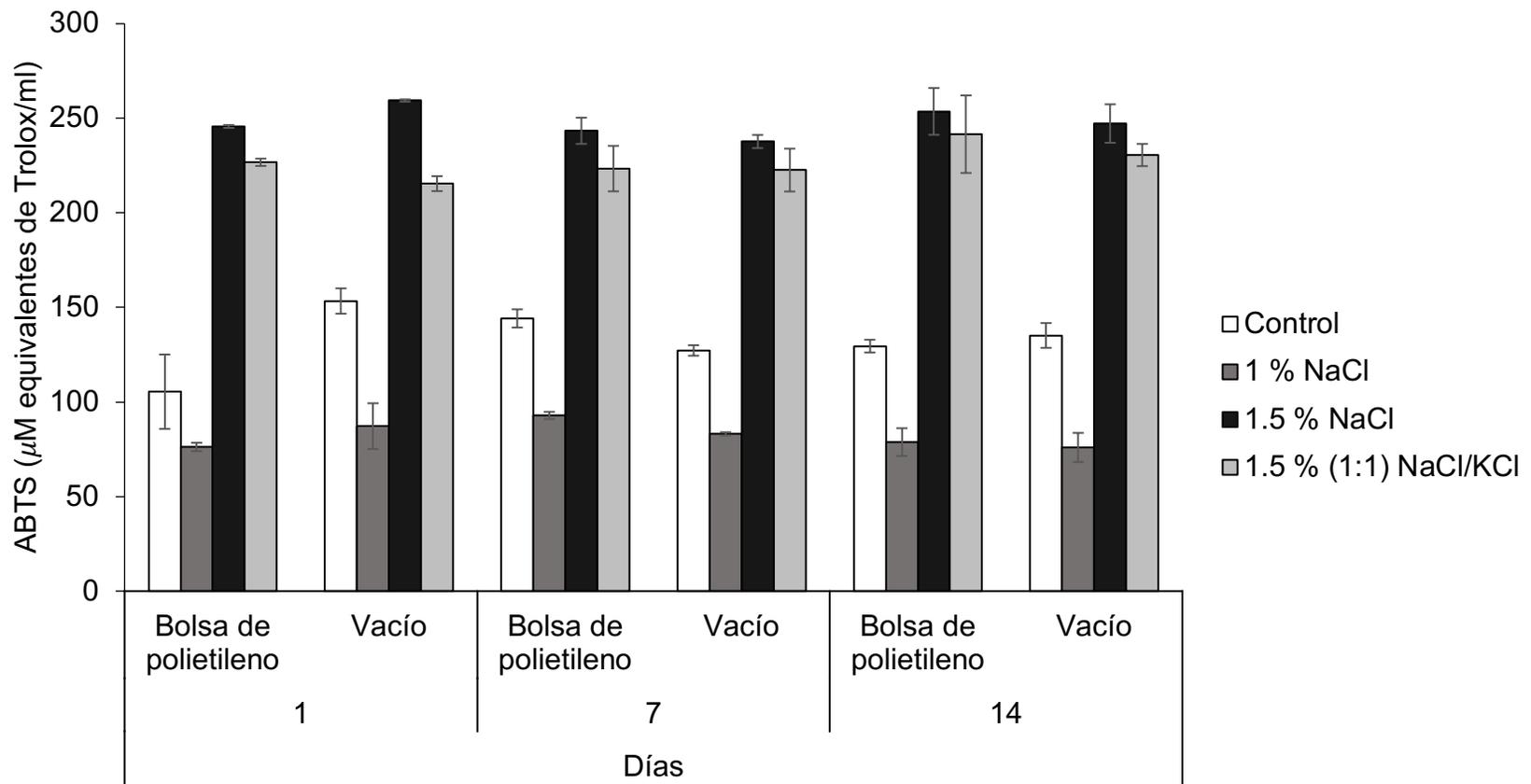
En el T3 (1.5 % NaCl) se observó una correlación indirecta entre la actividad inhibitoria de la ECA y DPPH ( $P < 0.05$ ), es decir, mientras la capacidad antioxidante (método DPPH) aumenta, la actividad inhibitoria de la ECA disminuye, posiblemente lo anterior se debe a que había mayor cantidad de péptidos con actividad antioxidante que con actividad inhibitoria de la ECA en el requesón con ese tipo de sal.

Para el T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl] solo se encontraron dos correlaciones significativas directamente proporcionales, las correlaciones fueron entre la actividad inhibitoria de la ECA y proteólisis con un valor de 0.485 ( $P < 0.05$ ) y entre la actividad inhibitoria de la ECA y capacidad antioxidante (método ABTS) con un factor de correlación de 0.464 ( $P < 0.05$ ). Estos resultados significan que, a mayor grado de proteólisis, mayor es la actividad inhibitoria de la ECA, de la misma forma ocurrió entre la actividad antioxidante y la actividad inhibitoria de la ECA, fueron directamente proporcionales.

### **Capacidad Antioxidante**

La capacidad antioxidante se midió a través de dos técnicas, ABTS y DPPH. El análisis mostró diferencia significativa para la triple interacción en el método ABTS, por lo que afectan los tres factores: tratamiento, empaque y día. En el Apéndice 5 se encuentran los valores de capacidad antioxidante por la técnica ABTS con las desviaciones estándar de las 3 repeticiones, los resultados también se pueden observar en la Gráfica 2.

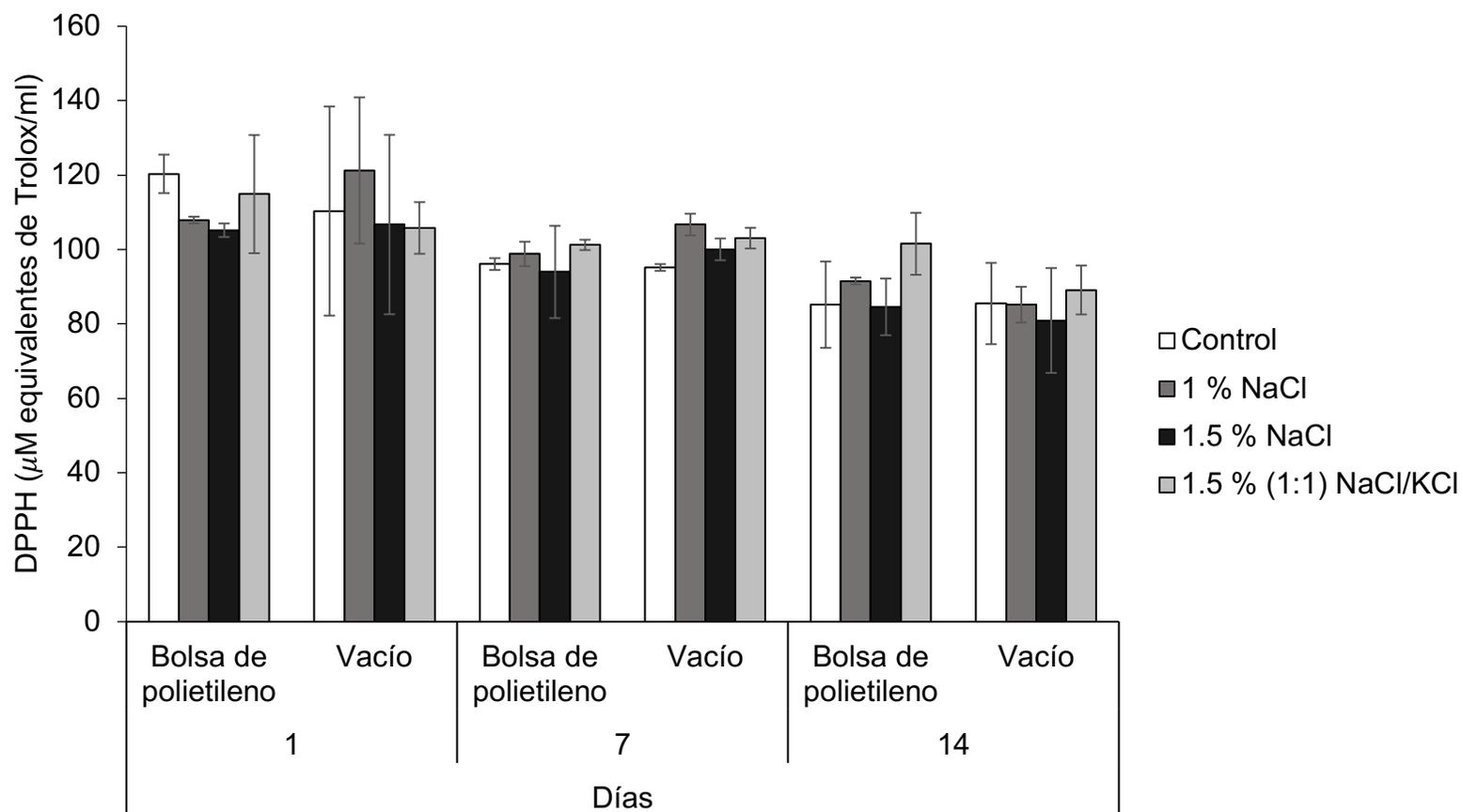
De manera general, los valores más bajos de actividad antioxidante por el método ABTS los presentaron el T1 (control) y el T2 (1 % NaCl), sin diferencia



Gráfica 2. Capacidad antioxidante por la técnica ABTS a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío. La concentración está expresada en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox.

estadísticamente significativa entre ellos ( $P>0.05$ ), y los más altos se encontraron en los tratamientos 3 (1.5 % NaCl) y 4 [1.5 %, (1:1) NaCl/KCl] sin diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ). El T2 (1% NaCl) presentó valores entre 75.95 – 92.87  $\mu\text{M}$  TEAC, que cabe mencionar fueron más bajos que el T1 (control). Por su parte, el T3 (1.5 % NaCl) mostró los valores más altos, los cuales se encontraron entre 237.74 – 259.41  $\mu\text{M}$  TEAC, no mostraron diferencias significativas entre los tipos de empaque a través del tiempo ( $P>0.05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) de los tratamientos en el tipo de empaque al mismo día, a excepción del T1 (control) al día 1, el resultado en bolsa de polietileno fue de 105.43  $\mu\text{M}$  TEAC y el valor del empaque al vacío fue de 153.38  $\mu\text{M}$  TEAC.

Con la técnica de DPPH se observaron resultados distintos. Solo el factor día mostró significancia ( $P<0.05$ ) en el análisis estadístico multivariado. De forma general, se observó una disminución en la concentración respecto al tiempo de almacenamiento sin importar el tipo de empaque (Gráfica 3) los datos se encuentran en el Apéndice 6. Como ocurrió con la técnica de ABTS, por la técnica DPPH tampoco influyó el tipo de empaque en los tratamientos durante el mismo día, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ). Los valores encontrados de la concentración de DPPH van desde 80.94 – 121.24  $\mu\text{M}$  TEAC, el primer valor corresponde al T3 (1.5 % NaCl) empacado al vacío al día 14 y el segundo valor es del T2 (1 % NaCl) empacado al vacío al día 1.



Gráfica 3. Capacidad antioxidante por la técnica DPPH a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío. La concentración está expresada en µM equivalentes de Trolox.

Es importante señalar que no se encontró literatura sobre actividad antioxidante en requesón obtenida por medio de estas dos técnicas. Sin embargo, se pudo observar que en diversos artículos los investigadores que han utilizado las dos técnicas para medir capacidad antioxidante en otros productos (DPPH y ABTS) han encontrado diferencias entre estas, tal es el caso de Floegel *et al.* (2011) quienes mencionaron que la capacidad antioxidante determinada por la técnica ABTS fue significativamente más alta comparada con la técnica DPPH en productos como frutas, vegetales y bebidas.

Por su parte, Abadía-García *et al.* (2013) determinaron actividad antioxidante en queso cottage por los métodos ABTS y DPPH, los valores de ABTS fueron mayores que los reportados por la técnica DPPH, por ejemplo, para el tratamiento control (queso cottage sin cultivo probiótico) el valor de DPPH al día 14 fue de aproximadamente 25  $\mu\text{M}$  TEAC y para ABTS fue de 300  $\mu\text{M}$  TEAC. El mismo efecto se observó en el presente estudio, el tratamiento control tuvo un valor inferior en DPPH que en ABTS (85.18  $\mu\text{M}$  TEAC y 129.54  $\mu\text{M}$  TEAC, respectivamente) en empaque de polietileno al día 14. Las diferencias entre los dos métodos pudieron ser debido a la desigualdad entre las estructuras del radical que pueden reaccionar de distinta manera dependiendo de los péptidos presentes en el extracto acuoso.

En leches fermentadas se han encontrado valores de actividad antioxidante entre 0.1 y 0.26  $\mu\text{g}$  equivalentes de Trolox con la técnica ABTS (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

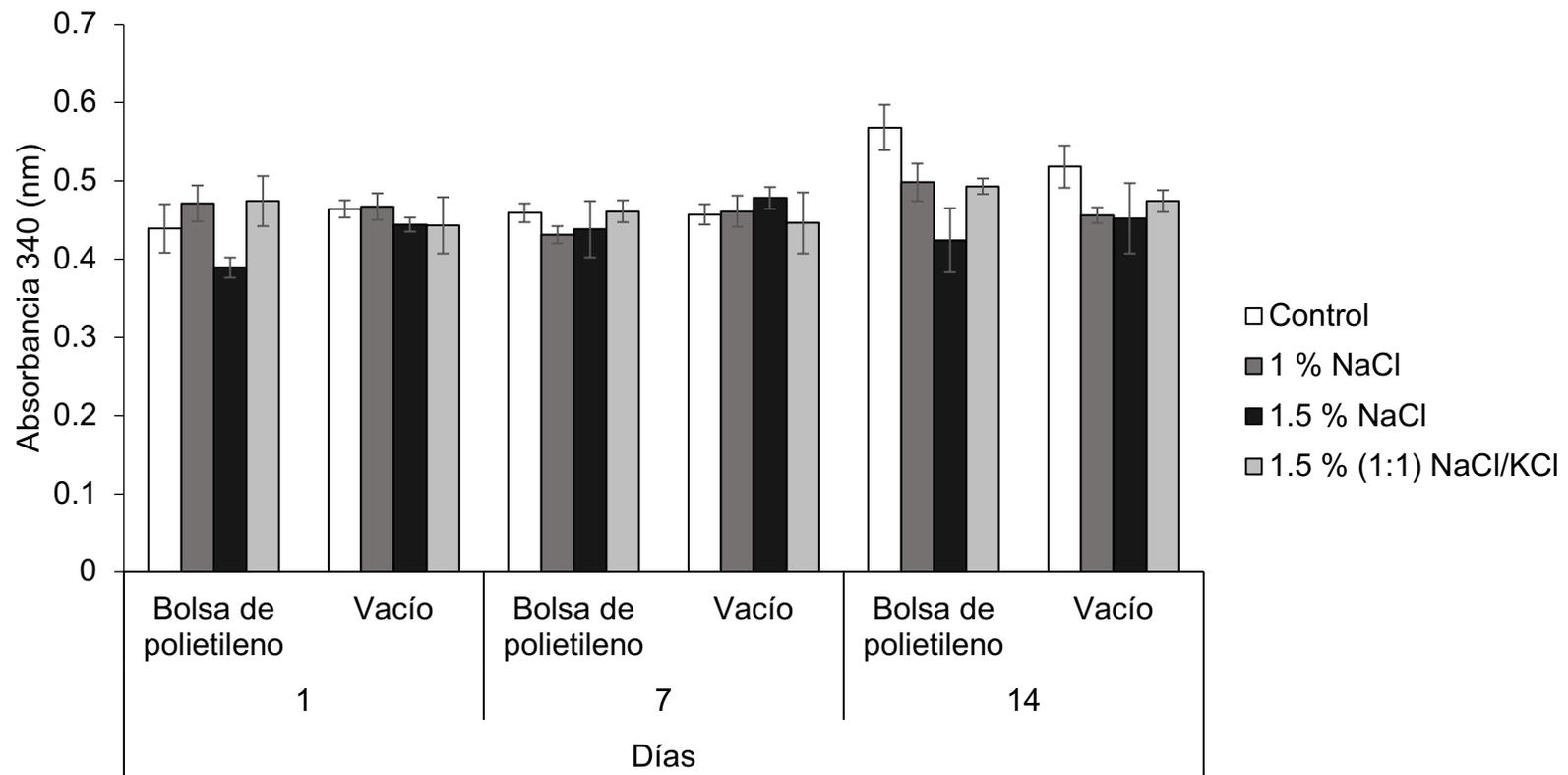
En quesos se han reportado valores de DPPH alrededor de 600  $\mu\text{M/g}$  TEAC para queso madurado bajo en grasa, al día cero (Rashidinejad *et al.*, 2013). Por su parte, Revilla *et al.* (2016) analizaron la actividad antioxidante de 224 quesos elaborados con distintos tipos de leche (vaca, cabra y oveja) de hasta 6 meses de maduración. Para los quesos de leche de vaca reportaron un valor promedio de actividad antioxidante de 7046  $\mu\text{mol}$  de Trolox/mg de queso, este valor es superior a los datos reportados en requesón del presente trabajo, sin embargo, las diferencias pudieron deberse a que la actividad antioxidante en los quesos depende del tiempo de maduración y va incrementando con la proteólisis.

Por lo tanto, como el requesón se considera un queso fresco no se observó el mismo comportamiento. Además, el tipo de proteína también influyó en los resultados, ya que los quesos contienen péptidos con actividad antioxidante proveniente de las caseínas que es la principal proteína de los quesos, por lo que la concentración de actividad antioxidante en quesos es mayor que en el requesón.

Por otra parte, se sabe que el empaque al vacío ayuda a minimizar las reacciones de oxidación por la falta de oxígeno (Zhou *et al.*, 2010), sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los tipos de empaque ( $P > 0.05$ ).

### **Proteólisis**

Los resultados de proteólisis se pueden observar en la Gráfica 4 y en el Apéndice 7. En general los valores para proteólisis fueron similares, se encontraron entre 0.389 y 0.568 nm. Sólo fueron significativas las dobles interacciones ( $P < 0.05$ ) tratamiento/empaque, tratamiento/día y empaque/día. Los



Gráfica 4. Grado de proteólisis a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío.

tratamientos 2 (1 % NaCl), 3 (1.5 % NaCl), y 4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl], permanecieron constantes a través del tiempo con los dos tipos de empaque. Realizando una comparación entre el tratamiento control (T1) con el resto de los tratamientos que contenían sales, se observó que la sal influyó en la proteólisis positivamente, de manera que se mantuvo constante a través de los días en los tratamientos 2, 3 y 4, independientemente del tipo de empaque.

En los quesos, los altos niveles de sal (10 %) disminuyen la velocidad y/o el grado de proteólisis y también el contenido de sal afecta la actividad enzimática, debido a la alta fuerza iónica ejercida por la sal que reduce las fuerzas de atracción entre la enzima y la caseína (Fox y Walley, 1971). Probablemente ocurre el mismo efecto con las proteínas del lactosuero.

Particularmente en este proyecto, se cree que la proteólisis en el requesón se debió a las enzimas provenientes en el suero que se obtuvo de la elaboración de queso tipo Chihuahua que pudieron resistir el proceso de producción de requesón, como las proteinasas, las cuales pueden resistir temperaturas de hasta 150 °C (Britz y Robinson, 2008). Generalmente el cultivo mesofílico que se usa para elaborar queso Chihuahua contiene *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*. Kamau *et al.* (2010) mencionan que las células microbianas contienen proteinasas las cuales son capaces de descomponer las proteínas en péptidos.

Como un experimento preliminar en esta misma investigación, se realizó un análisis microbiológico al requesón para la determinación de BAL y no se encontraron presentes, debido a que estas bacterias no resistieron el proceso

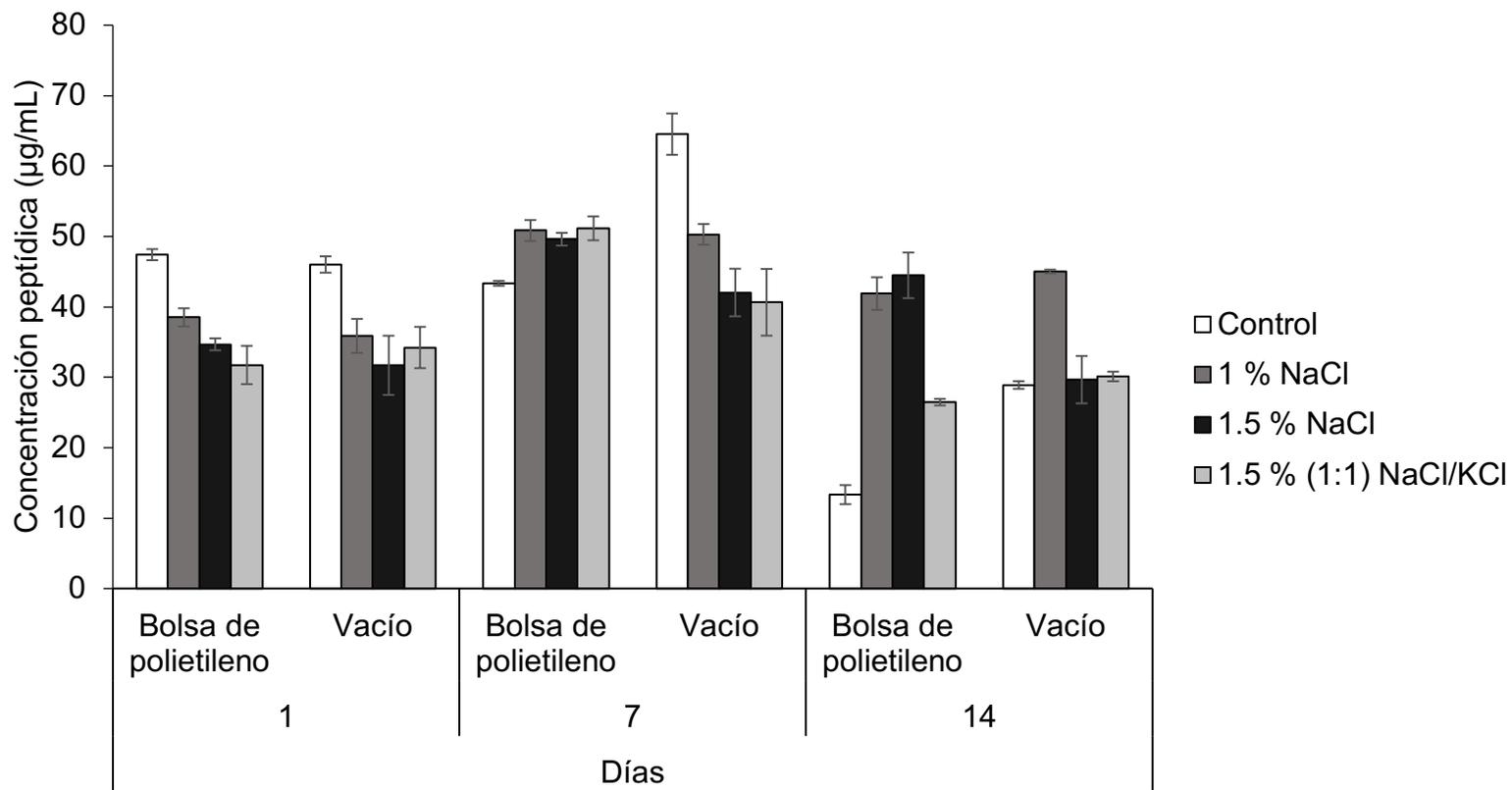
térmico para la elaboración del requesón, por lo que se descartó la idea de que las BAL influyeron sobre la proteólisis. Sin embargo, se reconoce que las enzimas derivadas de la elaboración del queso Chihuahua pueden permanecer en el suero y soportar temperaturas de calentamiento, por lo tanto, estas enzimas pudieron ocasionar la proteólisis en el requesón.

Además, debido a la proteólisis se forman péptidos pequeños y aminoácidos libres que sirven como sustrato para varias reacciones generadoras de sabor como la descarboxilación, desaminación y desulfuración, en especial la generación de grandes cantidades de péptidos hidrofóbicos puede conducir al sabor amargo (Fox y McSweeney, 1998; Singh y Cadwallader, 2008), por lo tanto, el requesón presenta sabor amargo después de 15 días de almacenamiento en refrigeración.

### **Concentración Peptídica**

Los resultados de concentración peptídica se muestran en la Gráfica 5 y el apéndice 8. En el T1 (control) empacado en bolsa de polietileno se observó una disminución drástica al día 14, de una concentración inicial de 47.42 a 13.34  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Por su parte, este mismo tratamiento, pero empacado al vacío mostró comportamiento distinto, el día 1 tuvo una concentración de 46.02, al día 7 se incrementó a 64.53 (no mostró diferencia estadísticamente significativa,  $P > 0.05$ ) finalmente al día 14 disminuyó a 28.91, mostrando diferencia significativa a través del tiempo ( $P < 0.05$ ).

El T2 (1 % NaCl) también mostró un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) al día 7 con los dos tipos de empaque y posteriormente la concentración de péptidos



Gráfica 5. Concentración peptídica por el método Bradford a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío.

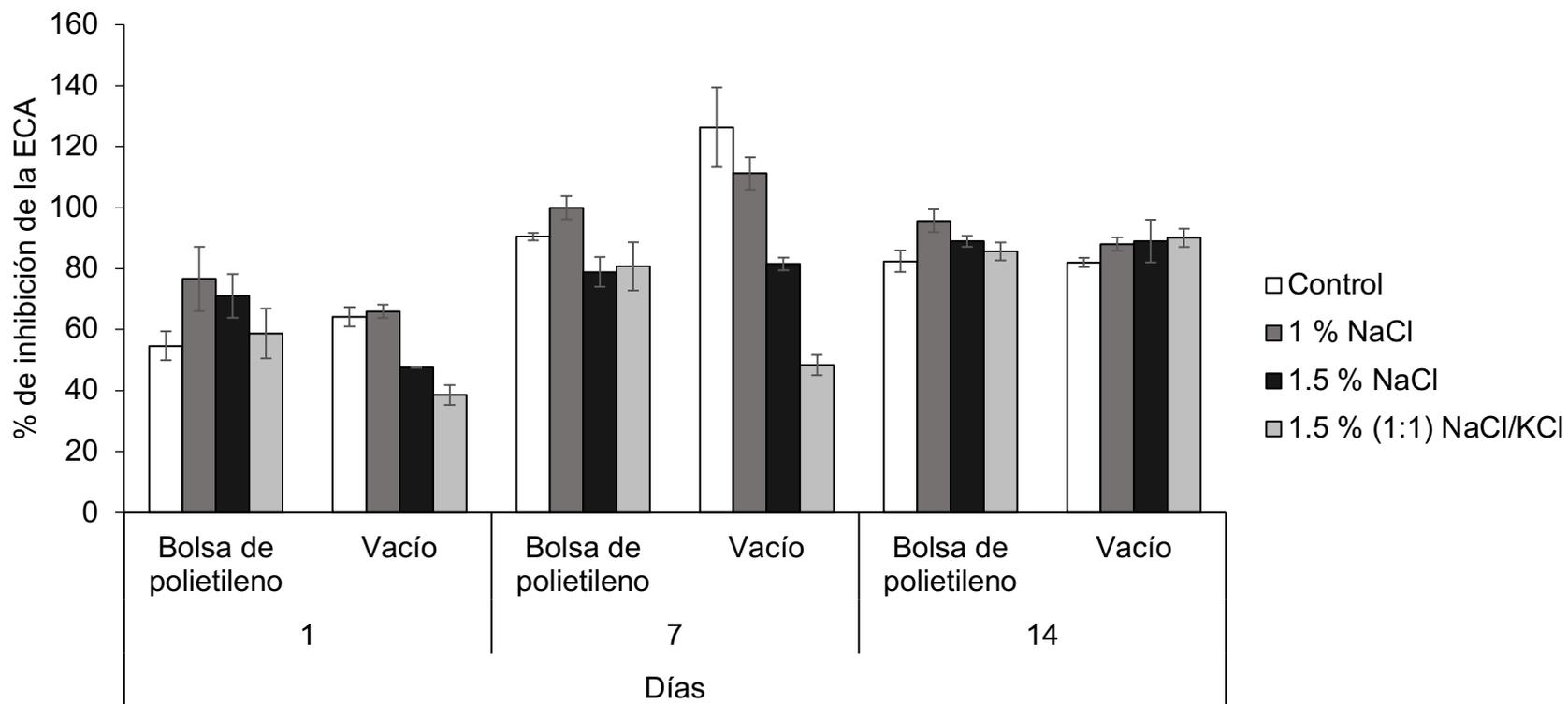
disminuyó al día 14, aunque la diferencia no fue significativa ( $P>0.05$ ) del día 7 al día 14 con el empaque al vacío.

En el T3 (1.5 % NaCl) en bolsa de polietileno, al día 7 la concentración peptídica aumentó de 34.68  $\mu\text{g}$  a 49.61  $\mu\text{g}$  de manera significativa ( $P<0.05$ ) y al día 14 disminuyó a 44.48  $\mu\text{g}$  sin diferencia significativa ( $P>0.05$ ). Este mismo tratamiento empacado al vacío aumentó del día 1 al día 7, de 31.70  $\mu\text{g}$  a 42.04  $\mu\text{g}$  de manera significativa ( $P<0.05$ ) pero al día 14 bajó a 29.66  $\mu\text{g}$ , mostrando diferencia significativa con el día 7 ( $P<0.05$ ), pero no con el día 1.

El mismo comportamiento se vio en el T4 [1 % (1:1) NaCl/KCl] en ambos empaques. Con la bolsa de polietileno al día 1, la concentración de proteína fue de 31.75  $\mu\text{g}$  y al día 7, 51.15  $\mu\text{g}$ , mostrando diferencia estadística ( $P<0.05$ ) y al día 14 disminuyó a 26.47  $\mu\text{g}$ , siendo estadísticamente diferente al día 7 ( $P<0.05$ ). El T4 empacado al vacío aumento del día 1 de 34.23  $\mu\text{g}$ , al día 7 a 40.65  $\mu\text{g}$  pero no mostró diferencia estadística ( $P>0.05$ ), finalmente al día 14 disminuyó significativamente a 30.11  $\mu\text{g}$  ( $P<0.05$ ) con el día 7, pero no con la concentración del día 1.

### **Actividad Inhibitoria de la ECA**

La Gráfica 6 y el Apéndice 9 muestran los resultados del porcentaje de inhibición de la ECA. La triple interacción fue estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ), por lo que influyeron los tres factores: el contenido y tipo de sal (tratamiento), el tipo de empaque y los días de almacenamiento del requesón.



Gráfica 6. Porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina a través del tiempo de los tratamientos de requesón elaborado con suero dulce de leche de vaca adicionado con sales, empacado en bolsa de polietileno y al vacío.

El T1 (control) en empaque de polietileno al día 1 tuvo un porcentaje de inhibición de la ECA de 54.70, al día 7 aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) a 90.46 %, al día 14 disminuyó a 82.43 %, pero no fue significativo ( $P > 0.05$ ). El T1 con empaque al vacío, al día 1 presentó un porcentaje de inhibición de la ECA de 64.21, al día 7 aumentó a 126.37 % de manera significativa ( $P < 0.05$ ) y al día 14 disminuyó a 82.02 % ( $P < 0.05$ ).

El T2 (1 % NaCl) en bolsa de polietileno al día 1 tuvo un valor de inhibición de la ECA de 76.58 %, al día 7 aumentó a 99.96 % ( $P < 0.05$ ) y al día 14 disminuyó ligeramente a 95.70 %, sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). El empaque al vacío tuvo el mismo comportamiento, al día 1 el valor de inhibición de la ECA fue de 66.00 %, al día 7 aumentó a 111.19 % y al día 14 disminuyó 88.04 %, los tres valores mostraron diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

En los tratamientos 3 y 4 (1.5 % NaCl y 1.5 % NaCl/KCl), con los dos tipos de empaque, el porcentaje de inhibición de la ECA aumentó respecto al tiempo.

El porcentaje de inhibición de la ECA en el T3 (1.5 % NaCl) empacado al vacío aumentó respecto al tiempo de 47.52 %, a 81.53 % y a 89.04 %, el valor del día 1 mostró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con los días 7 y 14.

Finalmente, el T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl] empacado en bolsa de polietileno, al día 1 mostró 58.73 % de inhibición de la ECA, al día 7 aumentó a 80.74 % y al día 14 aumentó a 85.64 %; solo hubo diferencia ( $P < 0.05$ ) del día 1 con los días 7 y 14. Con el empaque al vacío el T4 mostró un valor de inhibición de la ECA de

38.56 %, al día 7 aumentó a 48.37 % y al día 14 aumentó a 90.08 %, este último valor fue estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) a los días 1 y 7.

Donkor *et al.* (2007) analizaron muestras de yogurt con probióticos y obtuvieron el mismo comportamiento no lineal respecto al tiempo en el porcentaje de inhibición de la ECA, en comparación con los resultados de este estudio.

Los valores más altos de inhibición de la ECA se encontraron en los tratamientos 1 y 2; el T1 (control) con un porcentaje de inhibición de 126.37 % y el T2 (1 % NaCl) con 111.19 % ( $P > 0.05$ ), ambos al día 7 de vida en anaquel y empacado al vacío. Los valores más bajos del porcentaje de inhibición se encontraron en los tratamientos 3 (1.5 % NaCl) y 4 (1.5 % NaCl/KCl 1:1); T3 con un valor de 47.5 % y el T4 con 38.5 %, ambos al día 1 y empacados al vacío ( $P > 0.05$ ).

A la fecha, existe poca información sobre la actividad inhibitoria de la ECA en requesón. Madureira *et al.* (2012) evaluaron este parámetro en requesón, solo que inocularon cultivos lácteos al recuperar el producto y encontraron que los tratamientos con las cepas de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium animalis* a los 21 días mostraron la mayor actividad inhibitoria de la ECA con valores de  $IC_{50}$  de 103.0  $\mu\text{g/mL}$  y 141.0  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Lassissi *et al.* (2014), realizaron bebidas a base de soya-aislado de proteína de suero, utilizando diferentes fracciones de proteína de suero (< 5 kDa, 5 – 10 kDa, 10 – 50 kDa, > 50 kDa), encontrando que el porcentaje de inhibición de la ECA en la bebida que tenía combinación de proteína no fraccionada de

soya-suero fue mayor (40.2 % de inhibición de la ECA) que en el resto de las bebidas que tenían las proteínas fraccionadas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El requesón de leche de vaca presentó péptidos con actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina. El tipo de empaque, ya sea en bolsa de polietileno o vacío, no afectó las variables de respuesta analizadas (concentración peptídica, proteólisis, DPPH, ABTS y porcentaje de inhibición de la ECA) en el requesón. Los tratamientos con mayor contenido de sal, T3 (1.5 % NaCl) y T4 [1.5 % (1:1) NaCl/KCl]) afectaron de manera positiva la actividad antioxidante ABTS.

Se recomienda realizar estudios posteriores que exploren el aislamiento e identificación de los péptidos que se encuentran presentes en el requesón de manera que se pueda evaluar su actividad antioxidante y/o ECA inhibitoria. Así mismo, se recomienda analizar las enzimas presentes en el requesón para conocer el efecto sobre la proteólisis de las proteínas séricas.

## LITERATURA CITADA

- Abadía-García, L., A. Cardador, S. T. Martín del Campo, S. M. Arvízu. E. Castaño-Tostado, C. Regalado-González, B. García-Almendarez, S. L. Amaya-Llano. 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. *Int. Dairy J.* 33:191-197.
- Adrogué, H. J. y N. E. Madias. 2007. Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N. Engl. J. Med.* 356:1966-1978.
- Ahtesh, F., L. Stojanovska, N. Shah y V. K. Mishra. 2016. Effect of Flavourzyme® on angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides formed in skim milk and whey protein concentrate during fermentation by *Lactobacillus helveticus*. *J. Food Sci.* 81:135-143.
- Aihara, K., O. Kajimoto, H. Hirata, R. Takahashi y Y. Nakamura. 2005. Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J. Am. Coll. Nutr.* 24:257-265.
- Alvarado, C. y M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An. Venez. Nutr.* 23:42-49.
- Beltrán-Barrientos, L. M., H. S. García, M. J. Torres-Llanez, A. F. González-Córdova, A. Hernández-Mendoza y B. Vallejo-Cordoba. 2016. Safety of milk-derived bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 69:1-7.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Britz, T. y R. Robinson. 2008. *Advanced dairy science and technology*. 1a ed. Editorial Blackwell Publishing Ltd. Singapur.
- Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter y G. L. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219-1227.
- Cichosz, G., H. Cieczot, A. Ambroziak y M. M. Bielecka. 2017. Natural antioxidants in milk and dairy products *Int. J. Dairy Technol.* 70:165-178.
- Domínguez-González, K. N., A. E. Cruz-Guerrero, H. González-Márquez, L. C. Gómez-Ruiz, M. García-Garibay y G. M. Rodríguez-Serrano. 2014. El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Rev. Argent. Microbiol.* 46:58-65.

- Donkor, O. N., A. Henriksson, T. K. Singh, T. Vasiljevic y N. P. Shah. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* 17:1321-1331.
- Elkhtab, E., M. El-Alfy, M. Shenana, A. Mohamed y A. E. Yousef. 2017. New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures. *J. Dairy Sci.* 100:1-13.
- FDA. 2018. Food facts from the U. S. Sodium in your diet: use the nutrition facts label and reduce your intake. Food and Drug Administration. En: <http://www.fda.gov/educationresourcelibrary> Consultado el 21 de Junio de 2018.
- Floegel, A., D. O. Kim, S. J. Chung, S. I. Koo y O. K. Chun. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 24:1043-1048.
- Fox, P. F. y P. L. H. McSweeney. 1998. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1a ed. Editorial Blackie Academic & Professional. Londres.
- Fox, P. F. y B. F. Walley. 1971. Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. *J. Dairy Res.* 38:165–170.
- Gleeson, J. P., J. Heade, S. M. Ryan y D. J. Brayden. 2015. Stability, toxicity and intestinal permeation enhancement of two food-derived antihypertensive tripeptides, Ile-Pro-Pro and Leu-Lys-Pro. *Peptides.* 71:1-7.
- Ghassem, M., K. Arihara, A. S. Babji., M. Said y S. Ibrahim. 2011. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS. *Food Chem.* 129:1770-1777.
- González de la Cruz, O. y O. Rodríguez-Arias. 1998. Hipertensión arterial. *MEDISAN.* 2:38-43.
- Hafeez, Z., C. Cakir-Kiefer, E. Roux, C. Perrin, L. Miclo y A. Dary-Mourtot. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res. Int.* 63:71-80.
- Hernández-Ledesma, B., B. Miralles, L. Amigo, M. Ramos e I. Recio. 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J. Sci. Food Agric.* 85:1041-1048.
- Hernández-Ledesma, B., I. Recio y L. Amigo. 2008.  $\beta$ -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids.* 35:257-265.

- Hsieh, C., B. Hernández-Ledesma, S. Fernández-Tomé, V. Weinborn, D. Barile y J. M. Leite Nobrega de Moura Bell. 2015. Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: effects against the 21st century disorders. *Biomed. Res. Int.* 2015:1-16.
- Kamau, S. M., R. R. Lu, W. Chen, X. M. Liu, F. W. Tian, Y. Shen y T. Gao. 2010. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Rev. Int.* 26:386-401.
- Lassissi, T., N. Hettiarachchy, S. Rayaprolu, A. Kannan y M. Davis. 2014. Functional properties and Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of soy-whey protein and fractions. *Food Res. Int.* 64:598-602.
- Madureira, A. R., T. Tavares, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado y F. X. Malcata. 2010. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 93:437-455.
- Madureira, A. R., J. C. Soares, M. Amorim, T. Tavares, A. M. Gomes, M. M. Pintado y F. X. Malcata. 2012. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. *J. Sci. Food Agric.* 93:1458-1465.
- Martín del Campo., S. T., P. C. Martínez-Basilio, J. C. Sepúlveda-Álvarez, S. E. Gutiérrez-Melchor, K. D. Galindo-Peña, A. K. Lara-Domínguez y A. Cardador-Martínez. 2019. Production of antioxidant and ACEI peptides from cheese whey discarded from Mexican white cheese production. *Antioxidants.* 8:158-167.
- Monckeberg, F. 2012. La sal es indispensable para la vida, ¿pero cuánta? *Rev. Chil. Nutr.* 39:192-195
- Nakamura, Y., N. Yamamoto, K. Sakai y T. Takano. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-Converting enzyme. *J. Dairy Sci.* 78:1253-1257.
- OMS. 2017. Enfermedades cardiovasculares. En: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) Consultado el 28 de Marzo de 2019.
- Pritchard, S. R., M. Philips y K. Kailasapathy. 2010. Identification of bioactive peptides in comercial Cheddar cheese. *Food Res. Int.* 43:1545-1548.
- Rashidinejad, A., E. Birch, D. Sun-Waterhouse y D. Everett. 2013. Effect of catechin on the phenolic content and antioxidant properties of low-fat cheese. *Int. J. Food Sci. Tech.* 48:2448-2455.

- Revilla, I., M. I. González-Martín, A. M. Vivar-Quintana, M. A. Blanco-López, I. A. Lobos-Ortega y J. M. Hernández-Hierro. 2016. Antioxidant capacity of different cheeses: affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 99:1-9.
- Ricci-Cabello, I., M. Olalla y R. Artacho. 2012. Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutr. Rev.* 70:241-255.
- Shahidi, F. y Y. Zhong. 2010. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112:930-940.
- Singh, T. K. y K. R. Cadwallader. 2008. Cheese. En *Dairy Processing and Quality Assurance*. Chandan, R. C., A. Kilara y N. P. Shah, eds. Wiley-Blackwell, Iowa, E. U. A.
- Tavares, T. G y F. X. Malcata. 2012. The *Portuguese paradox*: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? *Food Chem.* 131:727-729.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos y D. Hawkins Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19:669-675.
- Torres-Llanez, M. J., A. F. González-Córdova, A. Hernandez-Mendoza, H. S. Garcia y B. Vallejo-Cordoba. 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 94:3794-3800.
- Zhou, G. H., X. L. Xu y Y. Liu. 2010. Preservation technologies for fresh meat – a review. *Meat Sci.* 86:119-128.

## APÉNDICE 1

### Formato de evaluación de sensorial, prueba de aceptación de los tratamientos de requesón

---

Fecha: \_\_\_\_\_  
Sexo: F \_\_\_ M \_\_\_  
Edad: \_\_\_\_\_

¿Con que frecuencia consume productos lácteos?

nunca \_\_\_\_\_ 2 a 3 veces por semana \_\_\_\_\_ todos los días \_\_\_\_\_

Pruebe las muestras de izquierda a derecha, e indique del 1 al 5 el nivel de agrado que mejor describa su reacción para cada uno de los atributos.

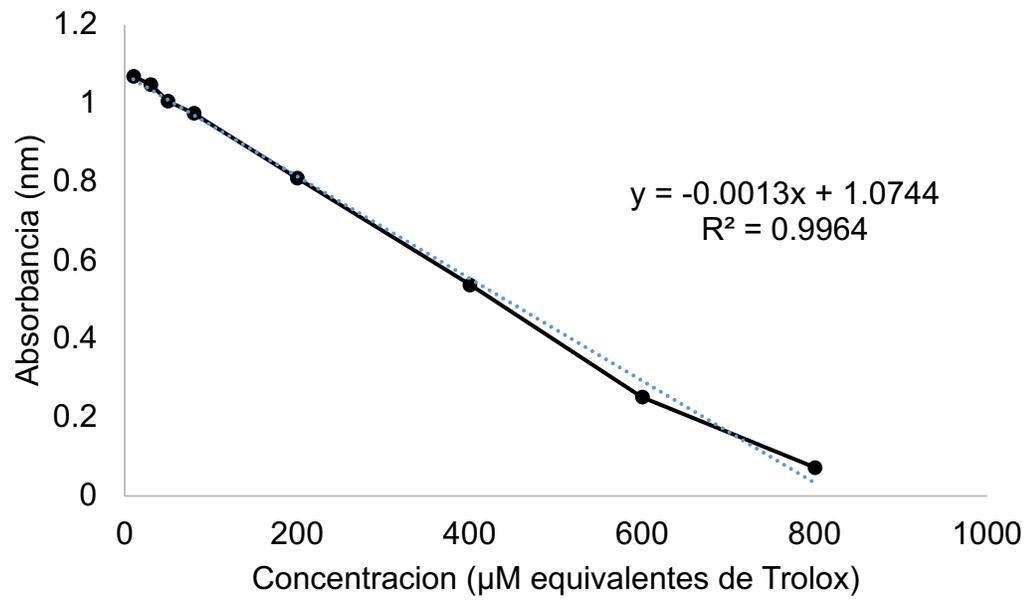
- 5 me gusta mucho
- 4 me gusta
- 3 ni me gusta ni me disgusta
- 2 me gusta poco
- 1 no me gusta

	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
Atributos	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Olor	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Color	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Sabor	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Textura	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Apariencia general	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Comentarios	_____					
	_____					
	_____					

---

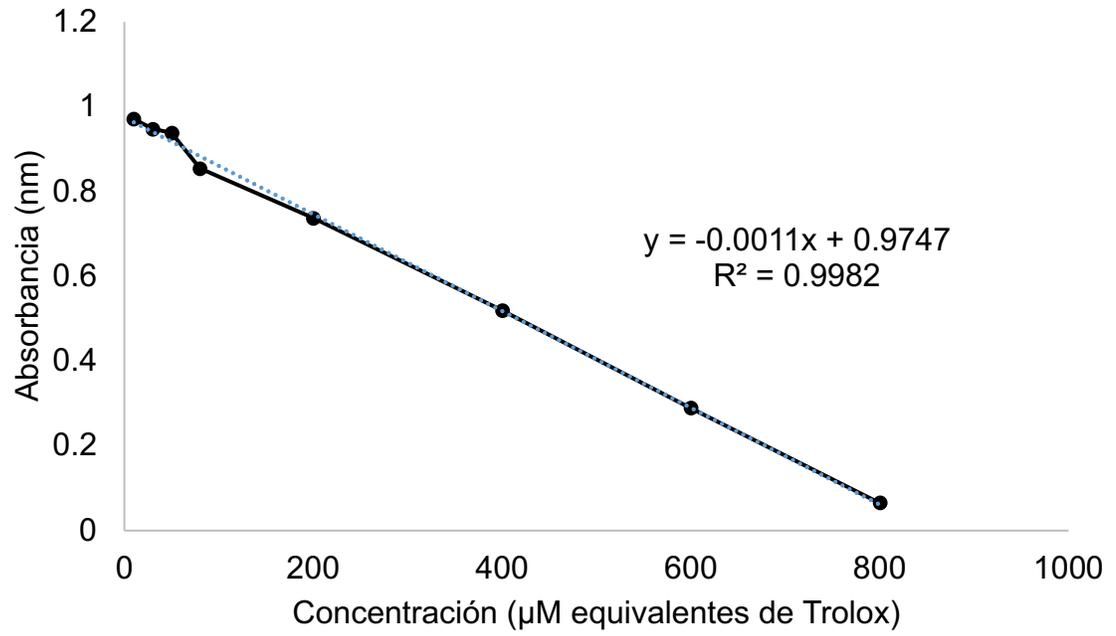
## APÉNDICE 2

Curva de calibración de ABTS



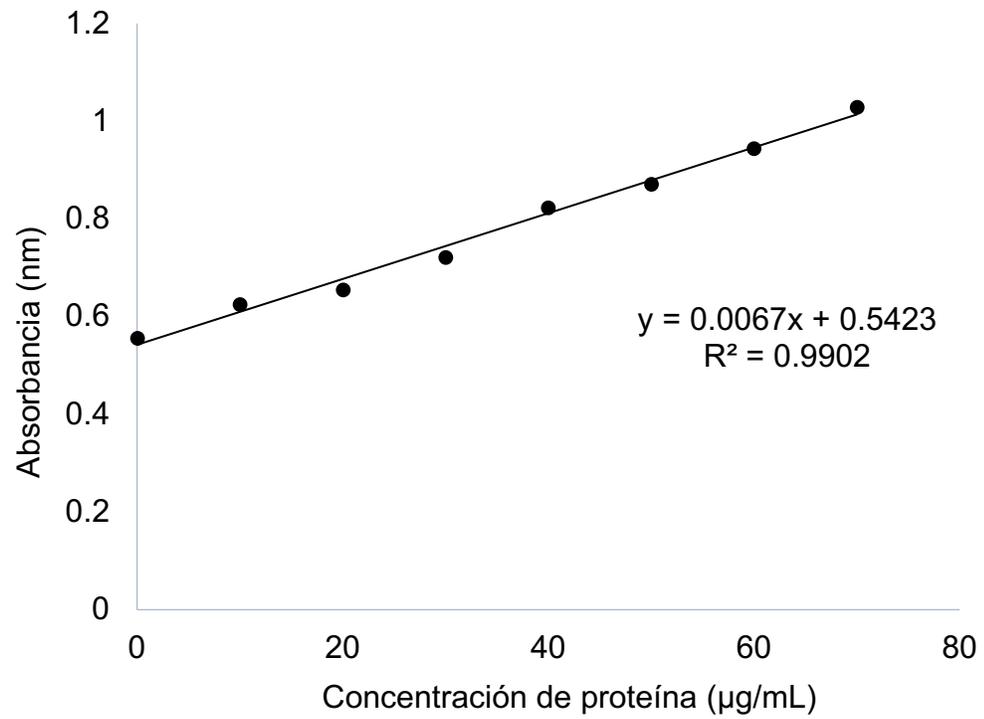
### APÉNDICE 3

Curva de calibración de DPPH



## APÉNDICE 4

Curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) para la determinación de proteína por el método Bradford



## APÉNDICE 5

Resultados de ABTS para los tratamientos de requesón ( $\mu\text{M}$  equivalentes Trolox). Medias de tres experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar

Días/ Tratamiento	Empaque	
	Bolsa de polietileno	Vacío
Día 1		
T1	105.43 $\pm$ 19.68 <sup>fg</sup>	153.38 $\pm$ 6.71 <sup>e</sup>
T2	76.20 $\pm$ 2.22 <sup>h</sup>	87.23 $\pm$ 12.09 <sup>gh</sup>
T3	245.69 $\pm$ 0.77 <sup>abc</sup>	259.41 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>
T4	226.72 $\pm$ 1.94 <sup>bcd</sup>	215.44 $\pm$ 3.95 <sup>d</sup>
Día 7		
T1	144.19 $\pm$ 4.80 <sup>e</sup>	127.23 $\pm$ 2.78 <sup>ef</sup>
T2	92.87 $\pm$ 1.93 <sup>gh</sup>	83.13 $\pm$ 0.88 <sup>gh</sup>
T3	243.38 $\pm$ 6.93 <sup>abc</sup>	237.74 $\pm$ 3.47 <sup>abcd</sup>
T4	223.39 $\pm$ 12.02 <sup>cd</sup>	222.62 $\pm$ 11.33 <sup>cd</sup>
Día 14		
T1	129.54 $\pm$ 3.36 <sup>ef</sup>	135.18 $\pm$ 6.54 <sup>e</sup>
T2	78.77 $\pm$ 7.34 <sup>gh</sup>	75.95 $\pm$ 7.70 <sup>h</sup>
T3	253.64 $\pm$ 12.36 <sup>ab</sup>	247.23 $\pm$ 10.18 <sup>abc</sup>
T4	241.59 $\pm$ 20.50 <sup>abcd</sup>	230.56 $\pm$ 5.88 <sup>bcd</sup>

<sup>a-h</sup>Valores con literales diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

## APÉNDICE 6

Resultados de DPPH para los tratamientos de requesón ( $\mu\text{M}$  equivalentes Trolox). Medias de tres experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar

Días/ Tratamiento	Empaque	
	Bolsa de polietileno	Vacío
Día 1		
T1	$120.33 \pm 5.17^a$	$110.33 \pm 28.09^{ab}$
T2	$107.91 \pm 0.91^{ab}$	$121.24 \pm 19.63^a$
T3	$105.18 \pm 1.82^{ab}$	$106.70 \pm 24.10^{ab}$
T4	$114.88 \pm 15.88^{ab}$	$105.79 \pm 6.94^{ab}$
Día 7		
T1	$96.09 \pm 1.58^{ab}$	$95.18 \pm 0.91^{ab}$
T2	$98.82 \pm 3.28^{ab}$	$106.70 \pm 2.93^{ab}$
T3	$93.97 \pm 12.41^{ab}$	$100.03 \pm 2.92^{ab}$
T4	$101.24 \pm 1.39^{ab}$	$103.06 \pm 2.78^{ab}$
Día 14		
T1	$85.18 \pm 11.61^b$	$85.48 \pm 10.92^b$
T2	$91.55 \pm 0.91^{ab}$	$85.18 \pm 4.81^b$
T3	$84.58 \pm 7.62^b$	$80.94 \pm 14.09^b$
T4	$101.54 \pm 8.33^{ab}$	$89.12 \pm 6.57^{ab}$

<sup>a-b</sup>Valores con literales diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

## APÉNDICE 7

Resultados de proteólisis para los tratamientos de requesón (absorbancia a 340 nm). Medias de tres experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar

Días/ Tratamientos	Empaque	
	Bolsa de polietileno	Vacío
Día 1		
T1	$0.439 \pm 0.031^{cd}$	$0.464 \pm 0.011^{bcd}$
T2	$0.471 \pm 0.023^{bc}$	$0.467 \pm 0.017^{bc}$
T3	$0.389 \pm 0.013^d$	$0.444 \pm 0.009^{bcd}$
T4	$0.474 \pm 0.032^{bc}$	$0.443 \pm 0.036^{bcd}$
Día 7		
T1	$0.459 \pm 0.012^{bcd}$	$0.457 \pm 0.013^{bcd}$
T2	$0.431 \pm 0.011^{cd}$	$0.461 \pm 0.020^{bcd}$
T3	$0.438 \pm 0.036^{cd}$	$0.478 \pm 0.014^{bc}$
T4	$0.461 \pm 0.014^{bcd}$	$0.446 \pm 0.039^{bcd}$
Día 14		
T1	$0.568 \pm 0.029^a$	$0.518 \pm 0.027^{ab}$
T2	$0.498 \pm 0.024^{abc}$	$0.456 \pm 0.010^{bcd}$
T3	$0.424 \pm 0.041^{cd}$	$0.452 \pm 0.045^{bcd}$
T4	$0.493 \pm 0.010^{abc}$	$0.474 \pm 0.014^{bc}$

<sup>a-d</sup>Valores con literales diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

## APÉNDICE 8

Proteína por método Bradford de los tratamientos de requesón, expresada como  $\mu\text{g}$  concentración de albúmina bovina. Medias de tres experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar

Días/ Tratamientos	Empaque	
	Bolsa de polietileno	Vacío
Día 1		
T1	$47.42 \pm 0.79^{\text{bcd}}$	$46.02 \pm 1.16^{\text{bcd}}$
T2	$38.51 \pm 1.29^{\text{efgh}}$	$35.88 \pm 2.41^{\text{fghi}}$
T3	$34.68 \pm 0.85^{\text{ghi}}$	$31.70 \pm 4.20^{\text{hij}}$
T4	$31.75 \pm 2.72^{\text{hij}}$	$34.23 \pm 2.93^{\text{ghi}}$
Día 7		
T1	$43.34 \pm 0.35^{\text{cde}}$	$64.53 \pm 2.94^{\text{a}}$
T2	$50.85 \pm 1.49^{\text{b}}$	$50.30 \pm 1.47^{\text{bc}}$
T3	$49.61 \pm 0.90^{\text{bc}}$	$42.04 \pm 3.38^{\text{def}}$
T4	$51.15 \pm 1.69^{\text{b}}$	$40.65 \pm 4.74^{\text{defg}}$
Día 14		
T1	$13.34 \pm 1.35^{\text{k}}$	$28.91 \pm 0.54^{\text{ij}}$
T2	$41.89 \pm 2.31^{\text{edf}}$	$45.03 \pm 0.26^{\text{bcde}}$
T3	$44.48 \pm 3.24^{\text{bcde}}$	$29.66 \pm 3.36^{\text{ij}}$
T4	$26.47 \pm 0.46^{\text{j}}$	$30.11 \pm 0.68^{\text{ij}}$

<sup>a-k</sup>Valores con literales diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

## APÉNDICE 9

Porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) de los tratamientos de requesón. Medias de tres experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar

Días/ Tratamientos	Empaque	
	Bolsa de polietileno	Vacío
Día 1		
T1	$54.70 \pm 4.75^{ijk}$	$64.21 \pm 3.18^{hij}$
T2	$76.58 \pm 10.55^{efgh}$	$66.00 \pm 2.18^{ghi}$
T3	$71.04 \pm 7.16^{fghi}$	$47.52 \pm 0.07^k$
T4	$58.73 \pm 8.19^{ij}$	$38.56 \pm 3.25^k$
Día 7		
T1	$90.46 \pm 1.24^{cde}$	$126.37 \pm 13.08^a$
T2	$99.96 \pm 3.78^{bc}$	$111.19 \pm 5.32^{ab}$
T3	$78.92 \pm 4.86^{defgh}$	$81.53 \pm 2.08^{defg}$
T4	$80.74 \pm 7.90^{defgh}$	$48.37 \pm 3.33^{jk}$
Día 14		
T1	$82.43 \pm 3.54^{defg}$	$82.02 \pm 1.51^{defg}$
T2	$95.70 \pm 3.73^{bcd}$	$88.04 \pm 2.20^{cde}$
T3	$88.94 \pm 1.81^{cde}$	$89.04 \pm 7.00^{cde}$
T4	$85.64 \pm 2.94^{cdef}$	$90.08 \pm 3.00^{cde}$

<sup>a-k</sup>Valores con literales diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).