



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL Y
CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE QUESOS ARTESANALES DE
OCOSINGO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Mario Emilio Mendez Feria

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: GILES GOMEZ MARTHA
VOCAL: PROFESOR: QUIRASCO BARUCH MARFICARMEN (ASESORA)
SECRETARIO: PROFESOR: MINA CETINA ALEIDA
1er. SUPLENTE: PROFESOR: BEAZ RIVERA JESUS ANTONIO
2° SUPLENTE: PROFESOR: JUAREZ ARROYO ELSI IDELI

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. EDIFICIO E, LABORATORIO 312. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL **PROYECTO DGAPA PAPIIT IN229319**: “ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DEL QUESO BOLA DE OCOSINGO: DESCRIPCIÓN POLIFÁSICA Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO” Y POR EL PAIP FQ CON LA CLAVE **5000-9102**.

ASESOR DEL TEMA: _____
Dra. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
M.C CINDY A. ESTRADA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE (S): _____
MARIO EMILIO MENDEZ FERIA

Índice

1. Resumen...	1
2. Introducción...	2
2.1 Planteamiento del problema	2
2.2 Justificación.....	2
3. Hipótesis de trabajo...	3
4. Objetivos.....	3
4.1 Objetivo general... ..	3
4.2 Objetivos específicos.....	3
5. Marco teórico.....	4
5.1 Queso.....	4
5.2 Queso bola de Ocosingo.....	5
5.3 Proceso de elaboración del queso bola de Ocosingo.....	8
5.4 Sistema de producción lechera de doble propósito... ..	11
5.5 Comercialización del queso bola de Ocosingo.....	13
5.6 Microbiología de la leche cruda	14
5.7 Bacterias ácido lácticas.....	17
6 Metodología.....	19
6.1 Cuenta de mesófilos aerobios... ..	19
6.2 Cuenta de bacterias ácido lácticas... ..	19
6.3 Cuenta de mohos y levaduras... ..	19
6.4 Cuantificación de <i>E. coli</i> y coliformes totales.....	20
6.5 Cuantificación de <i>S. aureus</i>	20
6.6 Determinación de proteína.....	20
6.7 Contenido de grasa	21
6.8 Humedad.....	21
6.9 Ceniza	22

6.10 Carbohidratos...	22
6.11 Análisis estadístico.....	22
7.Resultados y discusión	23
7.1 Análisis microbiológico.....	23
7.2 Análisis químico proximal.....	27
7.3 Comparación de normas actuales.....	36
8.Conclusiones.....	38
9. Perspectivas.....	39
10. Bibliografía.....	40
11. Anexo 1.....	46
12. Anexo 2.....	48
13. Anexo 3.....	54

1. Resumen

El propósito de este proyecto fue realizar la caracterización química, fisicoquímica y el análisis de calidad microbiológica de los quesos de cuatro productores de queso Bola de Ocosingo: Laltic, Regional, La Peña y Queshil, analizando dos piezas de cada productor. Se realizó un análisis químico proximal para determinar la cantidad de grasa, proteína, carbohidratos, cenizas y humedad que contenía cada pieza, tanto para el centro del queso como para la corteza. Se llevó a cabo un análisis estadístico para definir si había diferencia significativa entre las unidades de estudio de cada productor y entre productores. Se encontró que sí existen diferencias estadísticamente significativas para todos los macro componentes, entre productores, así como entre los quesos de cada productor, saliéndose estos de las Reglas de Uso del queso bola de Ocosingo.

El análisis de calidad microbiológica se realizó únicamente del centro del queso y se descubrió que contiene una alta cuenta de mesófilos aerobios y de levaduras, esto debido a que el queso se elabora con leche cruda. Se realizó una cuenta de bacterias ácido lácticas (BAL) y, para la mayoría de los productores, se corroboró que la alta cuenta de mesófilos aerobios se debía a la presencia de las BAL. Respecto a la presencia de microorganismos patógenos, no se encontró crecimiento de *E. coli* en los quesos de ningún productor, aunque si hubo presencia de coliformes totales en uno de los productos de dos de los queseros. De igual forma, *S. aureus* estuvo presente en dos quesos de los cuatro productores analizados, lo que indicaría prácticas sanitarias deficientes, mientras que los demás quesos tuvieron una buena calidad microbiológica.

2. Introducción

2.1 Planteamiento del problema

El queso bola de Ocosingo es un queso doble crema, cubierto por un doble forro que consiste en una corteza de caseína muy consistente que encierra la pasta del queso doble crema. Su elaboración es completamente artesanal. Un distintivo de estos quesos es la utilización de leche cruda en su proceso de elaboración sin que posteriormente su consumo represente un riesgo a la salud. Por la misma razón, se busca saber la calidad microbiológica de estos quesos, conocer su proceso de elaboración y las características de su composición que le permiten tener propiedades únicas dentro de los quesos mexicanos.

2.2 Justificación

A pesar de que estos quesos ya cuentan con una Marca Colectiva y se ha comercializado desde hace años, no hay reportes suficientes sobre su composición físicoquímica, microbiológica y características nutricionales. Analizar y publicar sus propiedades tanto químicas como microbiológicas contribuirá a la difusión de este producto artesanal mexicano tanto nacionalmente como internacionalmente, ante todo, si se demuestra que, a pesar de ser un producto elaborado con leche cruda, éste no representa un riesgo a la salud del consumidor. Por el contrario, es un producto con un sabor único de la región, con grandes bondades nutricionales y gustativas.

3. Hipótesis de trabajo

La calidad microbiológica del queso bola de Ocosingo será aceptable debido al proceso de fermentación que ocurre durante la maduración, el cual contribuirá a inhibir bacterias patógenas gracias a la acidez producida durante dicho proceso.

Los resultados del análisis de calidad microbiológica y composicional serán similares para todos los productores, así como para los lotes de cada artesano de queso bola de Ocosingo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Realizar un análisis de calidad microbiológica y un análisis químico proximal de dos piezas de cuatro productores de queso bola de Ocosingo.

• 4.2 Objetivos específicos

- Realizar pruebas microbiológicas a dos piezas de cuatro productores de queso bola de Ocosingo y determinar si su calidad es aceptable.
- Realizar un análisis químico proximal a dos piezas de cuatro productores de queso bola de Ocosingo y comparar la composición química entre productores y entre piezas.
- Realizar una comparación de las normas que aplican para los quesos en general y para los artesanales, así como analizar el proyecto de norma para el queso bola de Ocosingo.

5. Marco Teórico

5.1 Queso

Queso es el nombre genérico de un grupo de productos alimenticios a base de leche, producidos en una amplia gama de sabores y formas en todo el mundo. Aunque el objetivo principal de la fabricación de queso es conservar los principales componentes de la leche, el queso ha evolucionado para convertirse en un alimento de alta cocina con cualidades epícuras, además de ser altamente nutritivo (Fox et al., 2017). Sandine y Elliker (1970) sugirieron que hay más de 1000 variedades de queso. Walter y Hargrove (1972) describieron más de 400 variedades y enumeraron los nombres de otras 400, mientras que Burkhalter (1981) clasificó 510 variedades (aunque algunas se enumeran más de una vez).

En México, se elaboran una gran variedad de quesos artesanales genuinos distribuidos en diversas regiones del país. De acuerdo con Villegas (2010), los quesos mexicanos genuinos son aquéllos que se elaboran a partir de leche fluida de vaca o cabra, con el mínimo de aditivos, incorporando solamente los permitidos por las normas vigentes, por ejemplo, cuajo, cloruro de calcio y sal; además tienen una fuerte raíz histórica y se elaboran en gran parte del territorio nacional, algunos son regionales y otros meramente locales.

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche. Se obtiene mediante coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de

caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso (CODEX STAN 283-1978).

Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión (CODEX STAN 283-1978).

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, el queso se define como aquellos productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

La misma norma define a los quesos madurados como aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso, se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

5.2 Queso bola de Ocosingo

El queso bola de Ocosingo es un queso conocido en Chiapas, pero no en el resto del país y del mundo (Figura 1). Es un producto artesanal y representa una parte de la gran diversidad cultural que existe en México. La elaboración de este queso es una actividad importante para pequeños y medianos productores de leche en Ocosingo, Chiapas. Su

elaboración tiene un gran valor económico para la región por su capacidad de generar y mantener empleos.



Figura 1. Queso bola de Ocosingo de rancho Laltic

La producción de queso en Ocosingo es el resultado de un proceso complejo de colonización del territorio, de ahí que se considere un producto identitario, relacionado con las actividades sociales y productivas de la población mestiza, en las que sobresale la labor de la mujer, resaltando su papel en la economía familiar (Agudelo y Cesín, 2013).

Entre los quesos genuinos mexicanos se tiene el Queso Bola de Ocosingo, que es un elemento de identidad regional en el Estado de Chiapas, ya que posee características propias que lo diferencian de otros quesos, por ser elaborado a partir de un proceso artesanal.

El queso bola de Ocosingo es un queso muy original y único dentro de los quesos mexicanos debido a su proceso de elaboración y su forma de presentación. Es una bola dura de diámetro entre 8 y 12 cm, y con un peso entre 500 y 1000g (Cervantes et al., 2013). Consiste en una corteza de caseína muy consistente que encierra la pasta del queso doble crema. La que se caracteriza por ser relativamente blanca, o amarillo marfil, blanda, acida y aromática, de grandes atributos sensoriales. Se compone de una bola de queso de

doble crema forrado, después de 21 días de maduración, con una capa de queso elaborada de leche descremada hasta el punto de “quesillo (Pimentel et al., 2012). El queso bola se elabora en Ocosingo, el municipio más grande del estado de Chiapas. Lo fabrican unos cuantos queseros artesanales, cuyo conocimiento técnico ha pasado por tradición oral y practica de generación en generación (Cervantes et al., 2013).

Se elaboró por primera vez en 1927, en el rancho “Laltic”, ubicado a las afueras de la población de Ocosingo (Figura 1). Sin embargo, parecen existir datos más antiguos que nos llevan a la Finca San Antonino la Valdiviana, municipio de Cintalapa, Chiapas. Pero son muy pocos los datos que existen en Cintalapa referente a la elaboración de este queso (López et al., 2015). Otro rastro más antiguo del Queso Bola en el estado de Chiapas probablemente fue por Doña Ana María Espinoza de Corzo, en Villaflores, Chiapas, quien vivió a mediados del Siglo XIX y falleció en 1933 (Pimentel, 2012). A pesar de todo esto, se tiene que investigar y aclarar el origen real de este queso artesanal, dado a que muchos de los productores se disputan en quien fue el creador original.

El municipio de Ocosingo, Chiapas se localiza al extremo del estado (Figura 2). Limita al norte con el municipio de Palenque, al este y al sur con la Republica de Guatemala y al oeste de los municipios de Chilón y Tenejapa, Oxchuc y Altamirano. Su extensión territorial es de 10,691 km², que representan 14.36% de la superficie estatal; cuenta con una población total de 200,00 habitantes aproximadamente (Villegas et al., 2013).



Figura 2 Localización geográfica de Ocosingo (Villegas et al., 2013).

5.3 Proceso de elaboración del queso bola de Ocosingo

Su producción se ha dado en espacios rurales aislados y bajo condiciones de rezago tecnológico, lo que evita su producción masiva en el contexto del mercado global (Pomeón, 2007; Cervantes *et al.*, 2013).

La elaboración se puede dividir en dos etapas (Figura 3): la hechura de la pasta, por cuajo mixto (cuajo y acidez natural), y la confección del forro, a partir de leche descremada. Del queso bola de Ocosingo se puede consumir tanto el centro(untado, tajado o desmenuzado) como la corteza, tras calentarla, asarla o freírla (Cervantes et al., 2013).

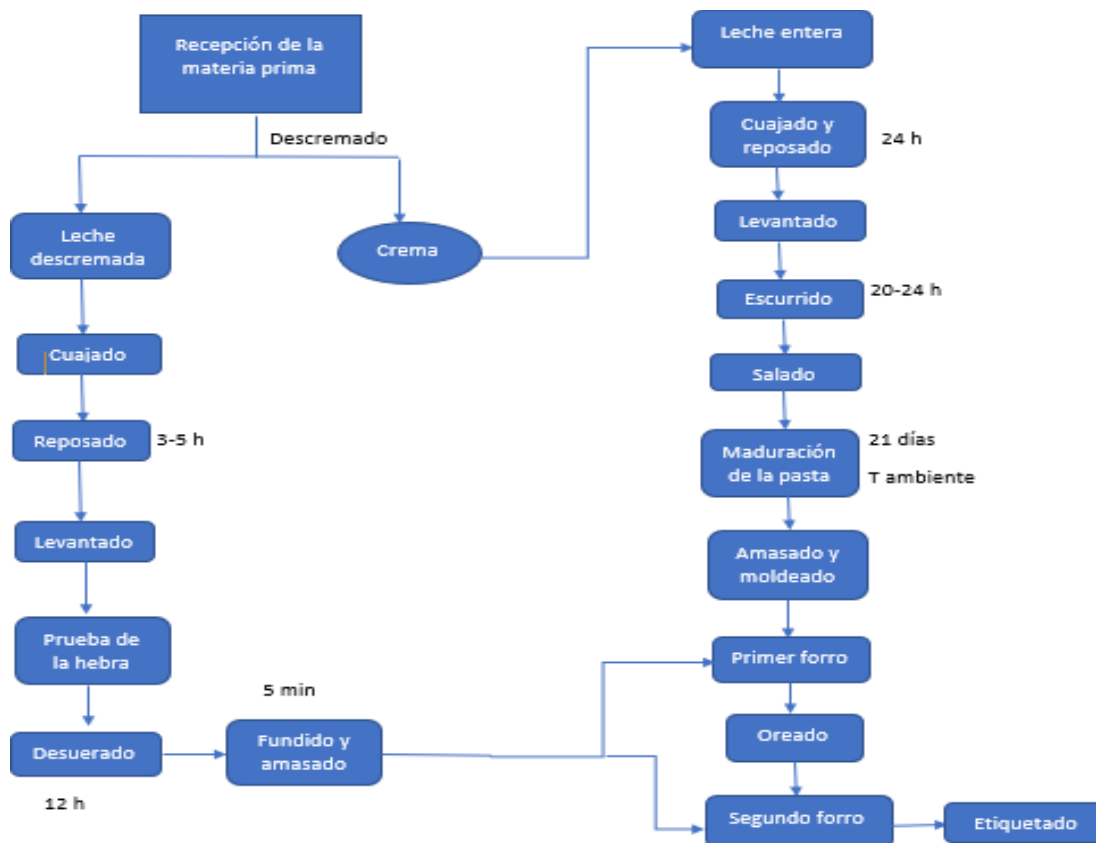


Figura 3. Proceso de elaboración del centro y corteza del queso bola de Ocosingo

Resumen del proceso de elaboración del queso bola de Ocosingo:

Recepción y colado: La leche cruda es recibida y se cuela en lienzos de algodón de trama fina.

Elaboración del núcleo.

Cuajado y reposado: Antes de la adición del cuajo, se agregan 4 kg de crema/100 L de leche, con la finalidad de obtener el centro doble crema. Se agrega una dosis de 2.5-5 mL de cuajo líquido puro de ternera 1:10,000 por cada 100 L de leche y se deja reposar la leche durante 24 h, aproximadamente.

Cortado: Se hace un corte en la cuajada para la expulsión del lactosuero. El tamaño del corte dependerá de las características finales deseadas el queso.

Levantado o bolseado: Se coloca la cuajada en una bolsa o manta de algodón.

Escurrido: Se deja escurrir el suero durante 20-24 h.

Salado: Después del escurrido, se incorpora sal en proporción de 3-4 % (m/m) y se cambia la manta.

Madurado de la pasta: La masa se deja reposar para que madure en un lapso de varios días, cambiando la manta cada tercer día. Durante cada cambio de manta, se vuelve a amasar la pasta. La maduración debe durar al menos 21 días a temperatura ambiente.

Moldeado a mano: Se forman porciones de 400 g o 1000 g. Se compactan y se les da forma casi esférica. Las piezas se forran con dos sucesivas capas de cuajada hilada y caliente, elaborada con la leche completamente descremada. Este material, rico en caseína, al enfriarse y orearse se endurece y funciona como empaque protector.

Elaboración de la corteza de caseína.

Descremado mecánico: Se realiza un descremado de la leche con la finalidad de obtener la crema necesaria para utilizarla en el aumento del % de grasa del centro del queso.

Cuajado: Se agregaron 10 mL de cuajo/ 100 L de leche. Se agrega la leche y se agita para incorporarla totalmente.

Reposado: La leche se tapa y se deja reposando de 3-5 h.

Levantado: Se coloca la cuajada en una bolsa o manta de algodón para eliminar el lactosuero necesario.

Prueba de la hebra: Se toma una porción de la pasta formada hasta este punto del proceso. Esta pasta es estirada con las manos y se observa el punto de estirado, con la finalidad de saber si se ha desarrollado la suficiente acidez. Una prueba positiva se observa al estirar la pasta sin que se fragmente fácilmente.

Desuerado: La pasta se coloca en prensas donde se ejerce una presión suficiente para desuerarla.

Fundido y amasado: La cuajada se corta en porciones de 10 cm si la prueba de la hebra fue positiva. Se agrega a agua hirviendo, se mantiene en esas condiciones 5 min y se amasa hasta que quede con una apariencia de masa elástica, lisa y brillante. Con esa masa se elaboran las dos capas que cubren el núcleo.

5.4 Sistema de producción lechera de doble propósito

El queso bola de Ocosingo es un queso elaborado con leche cruda de vaca de doble propósito (cruza de Cebú y Pardo Suizo). Los sistemas de doble propósito constituyen el principal sistema de producción bovino en las regiones tropicales y subtropicales de México; se utilizan razas Cebuinas y sus cruza con Suizo, Holstein y Simmental (Figura 4). Este tipo de ganado tiene una gran importancia como productores de alimentos de alta calidad nutritiva. La ganadería de doble propósito es la producción simultánea, armónica y sostenible de carne y leche en una sola unidad económica: la vaca. El manejo de los animales se efectúa de forma extensiva, sustentando su alimentación en el pastoreo con un mínimo de suplementación alimenticia, en pastizales naturales o en praderas establecidas y, ocasionalmente, el empleo de subproductos agrícolas (gramíneas en monocultivo). Cuenta con instalaciones adaptadas, empleado para su construcción material de la región (Cervantes et al., 2013; Bacab et al., 2013). Sin embargo, el desarrollo vegetativo es limitado por las condiciones climáticas, en particular durante el periodo de sequía (entre noviembre y mayo) del año, lo que repercute de manera directa en la variación estacional de la producción animal de leche y carne (Mohammed et al., 2015).



Figura 4. Vacas en libre pastoreo. Rancho Laltic, Ocosingo Chiapas

La ordeña se realiza, por lo general, en forma manual; las prácticas de medicina productiva y reproductiva, el mejoramiento genético, y el manejo de los recursos forrajeros tienen un gran margen para ser mejorados. Se caracteriza por el ordeño estacional del 10% de los vientres recién paridos que muestran un mayor temperamento lechero. Este tipo de ganadería presenta una alta estacionalidad, observando grandes picos de producción en la época de lluvias (Peralta y Lastra, 199).

El ganado bovino de doble propósito y sus ventajas:

- Rentabilidad como criador de tiempo completo o ingresos de jubilación.
- Produce una alta recuperación de la inversión con el apropiado manejo administrativo de salud y de alimentación.
- Aprovechamiento total del animal, creando una industria, subproductos de leche y carne.
- La carne de bovino es similar en sabor y color a la del porcino, y su contenido de colesterol es menor al de éste.

La leche y la carne son los principales productos, sin embargo, se obtienen ingresos adicionales por la venta de pie de cría y derivados de leche (queso, crema, yogurt, dulces, cajeta) y carne (embutidos) (Vázquez et al., 2003).

5.5 Comercialización del queso bola de Ocosingo

El queso circula por canales de comercialización muy específicos, ya que se produce en pequeñas cantidades y depende de la estacionalidad, debido a la variación en la disponibilidad de leche a lo largo del año. Así, se vende por encargo o pedido de clientes del propio estado, pero también de otras entidades federativas, enviándose por paquetería y reglas concertadas de compra en los que prima la confianza de proveedores y clientes. Los queseros cuentan también con sus propios puntos de venta dentro del municipio y, algunos, en ciudades importantes de Chiapas (Figura 5). Asimismo, los productores aprovechan la realización de ferias ganaderas, queseras y comerciales en distintos municipios de ciudades chiapanecas o fuera del estado, a lo largo del año (Villegas et al., 2013).



Figura 5. Tienda del rancho Laltic

En un intento por promocionar el queso y vincularlo al turismo, el gobierno municipal diseñó la Ruta del queso Bola de Ocosingo (Figura 6). El proyecto quedó en una propuesta que no ha avanzado a nivel práctico (Agudelo y Cesín, 2013). Adicionalmente, se diseñó La Ruta del Cacao, la cual integra recursos turísticos de los estados de Chiapas y Tabasco, considerando parte del trayecto de la Ruta del queso Bola.



Figura 6. Tienda del rancho Queshil.

5.6 Microbiología de la leche cruda

La microbiota de leche cruda es muy diversa y puede estar compuesta por bacterias de descomposición, microorganismos patógenos e incluso bacterias con una importancia tecnológica significativa (Montel et al., 2014; Perin et al., 2017). La leche recién ordeñada proveniente de una vaca sana tiene una carga microbiana que varía entre 300 y 1500 UFC/mL, según Arrieta (2011), es después del ordeño cuando aumenta el recuento microbiano (Figura 7). A pesar de aumentar la presencia de los microorganismos, estos no se desarrollan en gran proporción durante las primeras horas que siguen al ordeño, ya que la leche fresca tiene un poder bacteriostático que inhibe el desarrollo en ese lapso, dependiendo claro está, de la temperatura; así por ejemplo, una leche muy limpia (1,000 UFC/ mL) a 20°C retarda el desarrollo bacteriano de 10 a 15 horas, pero con leches muy contaminadas en las mismas condiciones puede durar no más de 2 o 3 horas (Arrieta,

2011). La leche con recuentos de bacterias mesofílicas superiores a 5.0 log UFC / mL indica mala calidad higiénica durante el ordeño y la producción, mientras que los recuentos inferiores a 3.0 log UFC / mL indican buenas prácticas de producción (Perin, L et al., 2017).

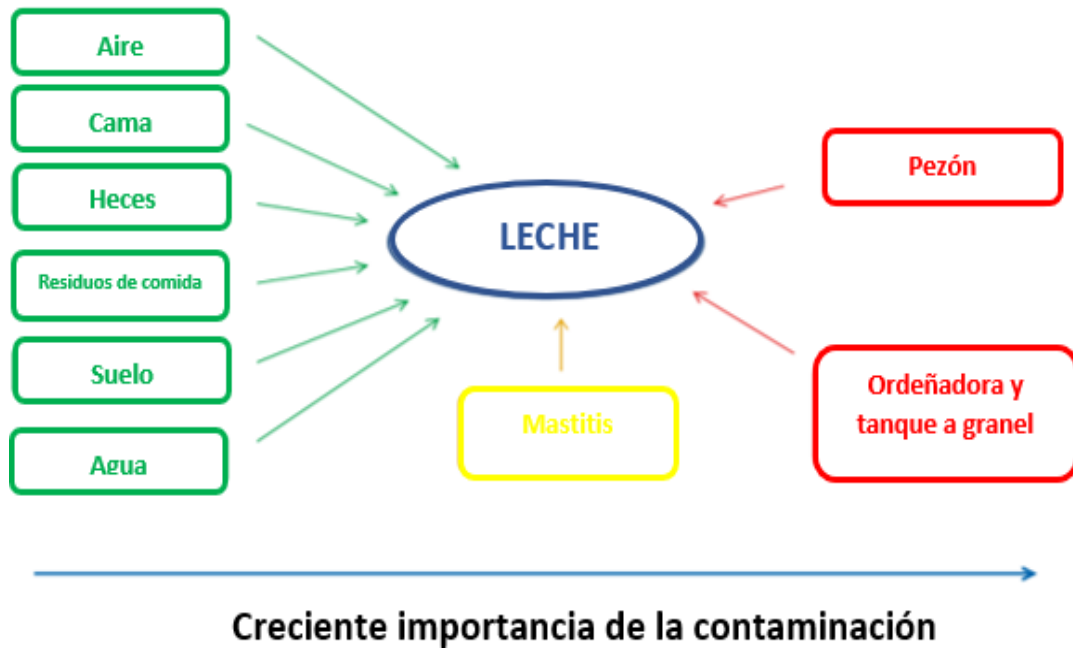


Figura 7. Fuentes de contaminación de la leche cruda (Fox et al., 2017).

Es muy importante tener cuidados en la higiene de la leche, desde el momento del ordeño, teniendo en cuenta que hay microorganismos que se desarrollan a bajas temperaturas (psicrófilos) preferentemente entre 2 y 15°C, que actualmente se consideran uno de los principales problemas relacionados con la contaminación microbiana de la leche cruda (Perin, L et al., 2017) y los que desarrollan entre los 15 y 35°C (mesófilos). La calidad de la leche cruda conforma tres aspectos bien definidos: composición fisicoquímica, cualidades microbiológicas y cualidades organolépticas. La leche es un alimento completo y también es un medio de cultivo para el crecimiento de una variedad de microorganismos, que pueden alterar su composición y características organolépticas (Shirai et al., 1996). Los microorganismos especialmente las bacterias y hongos, realizan distintas y complejas reacciones bioquímicas, donde participan variados tipos de

enzimas. Las principales alteraciones implican la acidificación causada por microorganismos sacarolíticos y proteólisis y lipólisis, debido a la acción de enzimas bacterianas (proteasa y lipasa) (Junior et al., 2018).

En la proteólisis microbiana, la acción de las enzimas proteolíticas y proteinasas provoca la llamada coagulación dulce de la leche, caracterizada especialmente por la formación de compuestos como aminos y de desprendimientos gaseosos, dando a la leche un olor desagradable. En la sacarolisis, la lactosa se degrada en glucosa y galactosa, luego por fermentación se produce ácido láctico (Arrieta, 2011). En la lipólisis, distintas bacterias y hongos provocan la descomposición de la grasa degradándola. Las lipasas hidrolizan los fosfolípidos de la membrana del glóbulo graso al aumentar el potencial lipolítico de los triglicéridos. La acción de las enzimas lipolíticas sobre los triglicéridos resulta en la liberación de ácidos grasos libres, lo que resulta en la liberación de altas concentraciones de ácido butírico y caproico. La presencia de ácidos grasos libres causa un sabor rancio en la leche y los productos lácteos (Capodifoglio et al., 2016). De igual manera otros tipos de bacterias pueden producir gases, como las coliformes y *Clostridium butyricum*, que es una bacteria anaeróbica cuyo efecto puede observarse en la maduración del queso ocasionando hinchamiento. *Klebsiella pneumoniae* provoca generación de compuestos gomosos. *Aeromonas hydrophila* (antes *Pseudomonas ichthyosmia*) provoca un típico olor y sabor a pescado debido a la formación de trimetilamina que se genera por el ataque a la lecitina (Arrieta, 2011).

Las fuentes de contaminación de la leche están resumidas en la Figura 7. Los materiales como el aire (que pueden transportar bacterias provenientes del suelo con excrementos, que contaminan con *Salmonella* y *Escherichia coli*), la paja, las heces, los residuos de alimentación, el suelo, el agua utilizada para lavar los pezones de las vacas y los residuos de agua que quedan en el equipo de ordeño, la mastitis, las superficies de los pezones y el equipo de ordeño y almacenamiento de leche a granel son las principales fuentes de contaminación, siendo los más importantes en la contaminación la ordeñadora y los tanques de almacenamiento del ordeño. Las ubres extremadamente sucias pueden contaminar la leche con hasta 10^5 UFC / mL (Fox et al., 2017).

5.4 Bacterias ácido lácticas

Entre los alimentos de origen animal, la leche, se considera una de las mejores condiciones para el desarrollo de microorganismos y, en la leche cruda, existe una gran variedad; que tienen relevancia en la inocuidad y las características finales del queso. La leche es una fuente rica de nutrientes para las bacterias que forman parte de su microbiota natural y para bacterias contaminantes que crecen bien en condiciones ambientales. Se debe a factores como el pH, la alta actividad del agua y una cantidad significativa de nutrientes. De esta forma, los microorganismos encuentran en la leche condiciones favorables para su multiplicación (Perin, L et al., 2017). Las bacterias contaminantes utilizan el carbohidrato de la leche, lactosa como fuente de energía. La actividad principal de estos microorganismos es la fermentación, proceso de producción de energía por el cual la célula microbiana produce diversas sustancias, por ejemplo, el ácido láctico como subproducto, y de igual manera metabolitos primarios que alteran el sabor, la apariencia y la estructura de la leche (Montel et al., 2014). Estas bacterias son ahora conocidas como bacterias del ácido láctico (BAL). Las BAL son un grupo de bacterias Gram-positivas, ácidos tolerantes que tienen similitudes metabólicas y fisiológicas, relacionadas filogenéticamente. Son microorganismos que no forman esporas, inmóviles, cocos o bacilos, catalasa, reductasa y oxidasa negativos. Son anaerobios facultativos, carecen del ciclo de Krebs, por lo que la generación de ATP ocurre mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato (Drider et al., 2016; Vandamme et al., 1994; Savodongo et al., 2006). Sin embargo, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno y pueden crecer en su presencia, por lo que se les conoce como anaerobios tolerantes (Madigan et al., 2004). Generalmente se encuentran en plantas y productos lácteos en descomposición produciendo ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos (Drider et al., 2016).

Los géneros básicos que comprenden las BAL incluyen los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*,

aunque recientes revisiones taxonómicas han propuesto la inclusión de otros géneros, como *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*. *Lactobacillus*, *Carnobacterium* son bacilos, así como alguna especie de *Weissella* que son cocobacilos, mientras que el resto de géneros son cocos (Drider et al., 2016).

En general se consideran beneficiosas para la salud humana y se han estudiado ampliamente. Estos organismos se utilizan en la fabricación y conservación de alimentos. El crecimiento bacteriano y la producción de ácido suelen ocurrir en la leche durante el almacenamiento. Por ejemplo, en la producción de leches fermentadas, cuando se produce una suficiente cantidad de ácido en la leche, las proteínas de la leche, caseínas, coagulan a temperatura ambiente (21°C) en la región de sus puntos isoeléctricos (aproximadamente pH 4.6) para formar un gel donde la grasa y las fases acuosas de la leche quedan atrapadas (Fox et al., 2017).

Las BAL se pueden dividir en dos categorías: homofermentativas y heterofermentativas.

Las BAL homofermentativas producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa. Estas bacterias poseen las enzimas aldolasas y hexosas isomerasas, utilizando la vía Embden -Meyerhof-Parnas, produciendo 2 moléculas de lactato por molécula de glucosa. Todos los representantes de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* son homofermentativos (Jay, 2005).

Las BAL heterofermentativas en cambio poseen la enzima fosfoacetolasa, la cual convierte hexosas a pentosas por las vías de la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas fosfato, produciendo cantidades equimolares de lactato y cantidades significantes de productos como acetato, etanol o CO₂. Todas las especies de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* son heterofermentativas (Jay, 2005).

Las bacterias del ácido láctico (LAB) producen diversas sustancias antimicrobianas durante la fermentación, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono; también pueden producir diacetilo, sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular y bacteriocinas (Cotter et al., 2005). Estos compuestos antimicrobianos específicos actúan como bioconservadores en los alimentos, con registros que datan de

aproximadamente 6000 AC (De Vuyst y Vandamme, 1994). El género *Lactobacillus* es conocido por la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, como bacteriocinas y/o la producción de peptidoglucano hidrolasas (PGHs) (Lortal y Chapot-Chartier 2005).

6. Metodología

Se analizaron ocho quesos: dos piezas de cuatro productores diferentes, Laltic, Queshil, La Peña y Regional. Se realizó un análisis químico proximal del centro y el forro del queso, llevando a cabo 3 repeticiones tanto para el análisis composicional como para el microbiológico. No se sabe con certitud si las dos piezas son del mismo lote.

6.1 Mesófilos aerobios: Se realizó por triplicado. Se siguió la metodología según la (Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994): Se pesaron en condiciones de asepsia 10 gramos de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 2 min/300rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-6} (esto para tratar de estandarizar el proceso dado que algunos productores resultaban tener más carga microbiana que otro). De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se colocó 1 mL en cajas Petri, se adiciono agar cuenta estándar (BioPro) y se incubo a 37°C por 24-48 h.

6.2 Bacterias ácido lácticas: Se realizó por triplicado. Se pesaron en condiciones de asepsia 10 gramos de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizo 2 min/300 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-6} . De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se colocó 1 mL en cajas Petri, se adiciono caldo MRS(BioPro) y se incubo a 37°C por 48 h.

6.3 Mohos y levaduras: Se realizó por triplicado. Se siguió la metodología según la (Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994): Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 2 min/300 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-5} . De la dilución de 10^{-4} y 10^{-5} , se colocó 1 mL en cajas Petri, se adiciono agar papa dextrosa (BioPro) acidificado con ácido tartárico 10%(m/v) y se incubo a 28°C por 3-5 días.

6.4 *Escherichia coli* y coliformes totales: (Manual Petrifilm EC 3M): Se realizó por triplicado. Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 2 min/300 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-6} . De la dilución de 10^{-3} se colocó 1 mL en el centro de la película inferior y se bajó la película superior, evitando la formación de burbujas. Se colocó el dispersor sobre el inóculo y se presionó suavemente para distribuirlo sobre toda el área circular. Se retiró el dispersor y se esperó hasta que solidificó el gel. Cada placa se incubó cara arriba a $37^{\circ}\text{C}/24$ h.

6.5 *Staphylococcus aureus*: (Manual Staph Express 3M): Se realizó por triplicado. Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 2 min/300 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-6} . De la dilución 10^{-3} se colocó 1 mL en el centro de la película inferior y se bajó la película superior evitando la formación de burbujas. Se colocó el dispersor sobre el inóculo y se presionó suavemente para distribuirlo sobre toda el área circular. Se retiró el dispersor y se esperó hasta que se solidificó el agar. Cada placa se incubó arriba a $37^{\circ}\text{C}/24$ h. Contar colonias rojo-violetas como *S. aureus*.

6.6 Determinación de proteína (Kjeldhal AOAC) Se realizó por triplicado. Se pesaron 0.2 g de queso en balanza analítica (poner el nombre). En un tubo Kjeldahl junto con una pastilla digestora se agregaron 10 mL de H_2SO_4 concentrado y se sometió a digestión hasta obtener una coloración verde transparente sin turbiedad. El tubo se colocó en un destilador al que se le agregaron aproximadamente 50 mL de NaOH 40% (m/v), se destiló y se recolectó en 50 mL de ácido bórico 4% (m/v) con 10 gotas de verde de bromocresol 0.1% (m/v). El nitrógeno amoniacal se tituló con HCl 0.1 N. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \left(\frac{\text{mL HCL gastados} \times \text{Normalidad HCL} \times 0.014 \text{ meq}}{\text{gramos de muestra}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.38$$

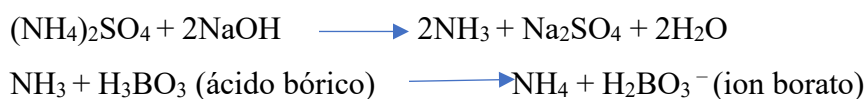
En los productos lácteos, el contenido de proteína es de 6.38 veces el contenido, es decir, las proteínas presentan alrededor del 16% de Nitrógeno.

Digestión:

Catalizadores



Neutralización y Destilación:



Titulación:



6.7 Determinación de grasa (NMX-F-710-COFOCALEC-2014): Se pesaron 3 g de queso en balanza analítica /Denver Instrument TP-214 24850587). Se colocaron en un butirómetro para queso y se añadieron 15 mL de H₂SO₄ (266.7 mL (sol 98%)) y se colocaron en un baño (Oaklon Stable Temp., 175001-00) a 65° C/ 1 h. Se agregó 1 mL de alcohol isoamílico (grado analítico). Se agitó y adicionó H₂SO₄ hasta ³/₄ de la columna graduada. Se colocó en el baño por 10 min. Se mezcló y centrifugó (Garver, Manufacturing Co., Modelo 424G) a 350 rpm/ 5 min. Se incubó 10 min y se observó la lectura.

6.8 Humedad (Procedimiento de Nielsen, 2003): Los pesa filtros utilizados se pusieron a peso constante en estufa (Riossa modelo: H-48) a 100° C por 3 h. Se pesaron 3 g de queso en la balanza analítica (poner nombre). Las muestras fueron colocadas en la estufa con vacío

(Lab-Line Instruments, Inc. 29380) a 65° C durante 12 h. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{\text{peso muestra húmeda (g)} - \text{peso muestra seca (g)}}{\text{peso muestra húmeda (g)}} \right) \times 100$$

6.9 Cenizas (NMX-F-701-COFOCALEC-2016): Se pusieron los crisoles a peso constante en estufa (Riossa modelo: H-48) a 100° por 3 h. Se pesaron 3 g de queso en balanza analítica (poner nombre) y se carbonizaron. Los crisoles se introdujeron en una mufla (poner mufla) por 8 h. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\text{Cenizas (\%)} = \left(\frac{\text{peso cenizas (g)}}{\text{peso muestra (g)}} \right) \times 100$$

6.10 Carbohidratos: El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia, considerando los resultados obtenidos de humedad, cenizas, grasa y proteína.

6.11 Análisis estadístico Se utilizó el método de Fisher para distinguir entre grupos estadísticamente diferentes para los productores, utilizando un $\alpha = 0.05$

7. Resultados y Discusión

a) Análisis microbiológico

En la tabla 1 se encuentran el promedio de los análisis microbiológicos de calidad de las dos bolas del queso bola de Ocosingo.

Tabla 1. Resultados de análisis de calidad microbiológica de los 4 productores.

Productor	Bola	Mesófilos aerobios UFC/g	BAL UFC/g	Mohos UFC/g	Levaduras UFC/g	<i>S. aureus</i> UFC/g	Coliformes totales UFC/g	<i>E. Coli</i> UFC/g
Laltic	1	74x10 ⁴	95x10 ⁴	<10	26x10 ⁵	<10	<10	<10
	2	67x10 ⁴	10x10 ⁵	<10	19x10 ⁵	<10	<10	<10
Regional	1	69x10 ⁴	45x10 ⁴	<10	<10	<10	<10	<10
	2	65x10 ⁴	36x10 ⁴	<10	17x10 ⁴	60x10 ² "VE"	1x10 ³ "VE"	<10
La Peña	1	11x10 ⁴	42x10 ²	<10	12x10 ³	2x10 ¹ "VE"	30x10 ²	<10
	2	95x10 ³	18x10 ²	<10	30x10 ¹	<10	<10	<10
Queshil	1	23x10 ⁵	NA	<10	34x10 ⁵	<10	<10	<10
	2	84x10 ⁴	NA	<10	47x10 ⁵	<10	<10	<10
NOM-243-SSA1-2014		-		500	500	≤100	≤100	100

VE: valor estimado, ya que el conteo no entra dentro de lo establecido en el Manual Staph Express 3M y Manual Petrifilm EC 3M.

La cuenta de mesófilos aerobios y levaduras resulto ser muy elevada para todos los quesos de cada uno de los diferentes productores, y no entran dentro de lo establecido de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010. No obstante, cabe mencionar que esta norma está dirigida a quesos industrializados en los cuales se utiliza leche pasteurizada. Dado a que la leche empleada para la elaboración de este queso es leche cruda, se esperaría un resultado alto, ya que se encuentra la microbiota nativa de la leche, pero, también se puede atribuir a las condiciones higiénicas a las que se esté llevando a cabo el proceso.

La cuenta de coliformes totales para una pieza de queso de la Regional y para otra de La Peña resultaron ser altas y se salen de la NOM-243-SSA1-2010. La fuente de contaminación más significativa es por el contacto de la leche con las manos de los obreros o la misma persona que se encarga del ordeño de las vacas. También podríamos pensar que los pezones de las vacas no estaban adecuadamente desinfectados o que, al ser vacas de libre pastoreo, y que la infraestructura del establecimiento no es necesariamente la adecuada, las ubres puedan estar en contacto con materia fecal. A pesar de que la contaminación de la leche por coliformes totales no necesariamente indica que el producto tuvo contacto con heces, para esto es necesario la evidencia de presencia de *E. coli* (Jay, 2012) la cual no se obtuvo. Sin embargo, la presencia de coliformes totales sí nos estaría indicando posiblemente la presencia de algún otro microorganismo enteropatógeno. El resultado obtenido en el productor La Regional, es con un valor estimado ya que las cuentas de unidades formadoras de colonias no entran dentro de lo establecido en el Manual Petrifilm EC 3M por ser muy pocas.

Staphylococcus aureus es un microorganismo importante presente en vacas lecheras con mastitis y también puede contaminar el producto durante el manejo de leche cruda o productos lácteos que involucran a manipuladores de alimentos que portan el patógeno en la piel, las fosas nasales, así como en el tracto nasofaríngeo, cabello y piel sin causar daños aparentes. Esta bacteria también puede encontrarse en el aire, polvo, superficies y agua (Cavicchioli et al., 2015; Camacho et al., 2019). La FDA estipula que para que un alimento provoque intoxicación se requieren 10^5 UFC/g, sin embargo, aunque las cuentas que se obtuvieron fueron de 60×10^2 para Regional y 2×10^1 para La Peña, estos productores deberán reducir la carga de esta bacteria, cuidando la higiene durante el proceso para evitar posibles intoxicaciones. El resultado obtenido para este microorganismo es con un valor estimado ya que las cuentas de unidades formadoras de colonias no entran dentro de lo establecido del Manual Staph Express 3M por haber menos de lo recomendando.

El único parámetro que el queso bola cumple según la NOM- 243-SSA1-2010 para todos los productores y sus unidades de estudio es la cuenta de *E. coli*, en la cual se reporta ausencia.

Los quesos de los productores Laltic y Queshil resultaron ser las unidades de estudio con mejor calidad microbiológica debido a que se obtuvieron valores <10 UNIDADES para la

cuenta de mohos, *Escherichia coli*, coliformes totales y *Staphylococcus aureus*, lo cual nos estaría hablando de buenas prácticas de manufactura por parte de estos productores y por consiguiente un cumplimiento con la NOM- 243-SSA1-2010.

Por otra parte, se hizo una cuenta de bacterias ácido lácticas para ver si estas coinciden con la cuenta de mesófilos aerobios, y de esta forma corroborar que la razón de tener una cuenta tan elevada de mesófilos es por la microbiota nativa de la leche, la cual la mayoría corresponderían a bacterias ácido lácticas.

Podemos apreciar que, para el productor La Regional, se obtuvo una cuenta del orden de 10^4 tanto en mesófilos aerobios como en bacterias ácido lácticas, lo que nos corroboraría lo antes mencionado. Por otra parte, el productor La Peña podemos observar que en mesófilos aerobios se obtuvo tanto para el queso 1 como para el 2, un orden de 10^4 , lo que nos indica que parte de esa cuenta de mesófilos aerobios no corresponde exclusivamente a bacterias ácido lácticas, hay un orden de 10^2 de bacterias mesofílicas que no son BAL. Los principales géneros de bacterias mesofílicas que pueden estar presentes en la leche, diferentes a las BAL, son *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, entre otros (Jay, 2012). Esto se puede ver perfectamente reflejado en la cuenta de *S. aureus*, donde sí existe presencia de esta bacteria. En otro estudio (Verdier-Metz et al. 2009), se encontró un vínculo entre las prácticas de ordeño y la diversidad bacteriana en la leche cruda. Las leches del grupo A se caracterizaron por una mayoría de corinebacterias y micrococos y un alto nivel de higiene del ordeño. Las leches de los grupos B y C tenían prácticas de higiene menos intensivas, estando las leches del grupo B dominadas por bacterias gramnegativas y el organismo iniciador, *Lactococcus lactis* y las leches del grupo C de *Leuc. mesenteroides*, que pueden estar presentes en algunos cultivos iniciadores mixtos y *Brevibacterium*, que es un organismo de maduración de la superficie del queso.

Algo que cabe mencionar y tendrá también mucha importancia en el producto final, es la gran cantidad de levaduras que se tiene en el queso. Durante la fermentación del queso, algunas levaduras, como *D. hansenii*, *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica*, son beneficiosas para mejorar las características organolépticas y nutricionales del queso al liberar proteasas, lipasas o β -galactosidasas para convertir proteínas, lípidos y lactosa de la leche en moléculas

pequeñas (aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos; Akpınar et al., 2011; Golić et al., 2013; Cardoso et al., 2015). *Y. lipolytica*, *K. lactis* y *D. hansenii* también contribuyen al sabor único del queso al producir altas concentraciones de metilcetonas, ácido butanoico, aldehídos de cadena ramificada, acetaldehído, etanol y ésteres de ácido acético. (Atanassova et al., 2016; Juan et al., 2016).

Durante el proceso de producción y obtención de la leche cruda, así como de la elaboración del queso bola de Ocosingo, deben practicarse buenas prácticas de higiene de acuerdo con lo establecido en la Norma Mexicana NMX-F-730-COFOCALEC-2015 y en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, que aseguren productos inocuos y aptos para el consumo humano.

Con excepción de los queseros La Peña y Regional, donde hubo crecimiento de *S. aureus*, se puede considerar que la calidad microbiológica de los demás quesos es buena; ya que, aunque se obtuvo una cuenta alta de mesófilos aerobios, ésta se atribuye en su mayoría a las BAL. La maduración nos permitirá obtener un producto final más seguro debido al ácido generado por las BAL durante dicho proceso. También podemos inferir que el empaque natural del queso (forro) nos ayudará a que se lleve a cabo el proceso de maduración de una mejor manera, al evitar que el centro quede expuesto a la intemperie y pueda contaminarse.

7.1 Resultados Análisis químico proximal

Los resultados de **humedad, grasa y proteína** se compararán con las Reglas de Uso del queso bola de Ocosingo ya que es un documento con la finalidad de darle un valor agregado a los productos y apoyarlos en su desarrollo y comercialización. Todo esto a fin de que se logre tener un producto más homogéneo, que cumpla con los parámetros del proyecto de norma que se está elaborando titulado “PROY-NMX-F-767-CPFPCALEC-2019 SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTOS-LACTEOS-QUESO BOLA DE OCOSINGO-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA”.

Los resultados de **cenizas y grasa en la corteza** se compararán con el trabajo de López et al., 2015, ya que se trabajó con la misma matriz alimentaria y se analizaron los mismos parámetros.

Se utilizó el método de Fisher para distinguir entre grupos estadísticamente diferentes para los productores, utilizando un $\alpha= 0.05$ (Los conceptos estadísticos, así como las ANOVAS, se encuentran en el anexo). Las letras *a* y *b* nos indican la diferencia estadísticamente significativa entre las unidades de ensayo de cada productor, y las letras en mayúscula en el super índice nos muestran la diferencia entre productores. Una misma letra tanto para productores como entre los quesos significa que no es diferente estadísticamente. Los valores de los promedios y desviaciones estándar se encuentran en el anexo.

Resultados de Humedad

Los resultados de **humedad** se muestran en la Tabla 2. Para el centro del queso se obtuvieron valores entre 29 y 40%, ya que este producto no es un queso fresco. El tiempo de maduración de cada una de las muestras, es un factor determinante en la disminución de la humedad (Osorio et al., 2004). Algunos lotes se pueden dejar madurar más tiempo que otros y el proceso de maduración puede variar, así como las condiciones de temperatura y de este modo influenciar significativamente tanto entre unidades de ensayo de cada quesero, como

entre los mismos productores. Por otra parte, el proceso de elaboración también puede contribuir importantemente, debido a que diferencias en el cortado de la cuajada, tiempos de desuerado o el prensado podrían arrojar diferencias significativas entre los quesos, y aún más si se utiliza en algunos lotes y en otros no éste último (Hernández Briones, 2007).

Valores muy bajos de humedad como en el caso de La Peña nos puede indicar que otros macro componentes podrían concentrarse, como por ejemplo grasa, proteína o cenizas, y valores más altos como en el caso del queso Queshil podría hacer el efecto contrario, diluirlos.

Cabe mencionar que se esperaba que la corteza de los quesos bola tuviera una cantidad de humedad menor a la del centro ya que esta está más expuesta al medio ambiente, sin embargo, esto no se vio reflejado en los resultados. Lo más probable es que al momento de hacer el tratamiento de la muestra para la determinación, las cortezas, al ser algunas extremadamente rígidas, no se pudieron cortar muy bien y por consecuencia no se tuvo un tamaño de partícula homogéneo y el agua pudo haber quedado atrapada, por lo que el valor reportado está sobreestimado.

Claramente se puede observar en la tabla 2 cómo si se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los productores y entre las unidades de ensayo de cada queso.

El productor de quesos Laltic es el único en donde ambas de sus unidades de ensayo, tanto para el centro como para la corteza entran dentro de los parámetros de Reglas de Uso del queso bola de Ocosingo, no obstante, la bola del centro del queso Queshil también se puede considerar dentro de lo establecido. Por otro lado, solamente la corteza de la bola 2 del productor La Peña entra dentro de lo establecido.

Los resultados crudos de humedad se encuentran en el anexo 1. Se tienen los análisis para la determinación de humedad, donde los productores obtuvieron un coeficiente de variación mayor a 5 para la corteza 1 y 2. Se requiere hacer más repeticiones con el fin de obtener un coeficiente de variación menor a 5.

Tabla 2. Determinación de Humedad.

Muestra	(%) Humedad			
	Bola 1	Bola 2	Bola 1	Bola 2
Productor	centro	centro	Corteza	corteza
Laltic	38.75± 0.25 ^C <i>a</i>	39.64± 1.34 ^C <i>a</i>	35.27± 0.29 ^D <i>a</i>	36.75± 1.91 ^C <i>a</i>
Regional	35.57± 1.03 ^D <i>a</i>	36.03± 1.20 ^D <i>a</i>	41.51± 1.99 ^C <i>a</i>	41.77± 0.49 ^D <i>a</i>
La Peña	30.57± 0.38 ^E <i>a</i>	29.63± 0.60 ^E <i>a</i>	39.39± 0.96 ^C <i>a</i>	37.35± 1.04 ^C <i>a</i>
Queshil	37.85± 0.69 ^C <i>a</i>	44.17± 0.74 ^F <i>b</i>	43.99± 0.68 ^E <i>a</i>	48.17± 1.13 ^E <i>a</i>
Reglas de uso del queso bola de Ocosingo	38-40%		34-38%	

Se utilizo el método de Fisher para distinguir entre grupos estadísticamente diferentes utilizando un $\alpha = 0.05$. Las letras *a* y *b* nos indican la diferencia estadísticamente significativa entre las unidades de ensayo de cada productor, y las letras en mayúscula en el super índice nos muestran la diferencia entre productores.

Resultados de Grasa

Los resultados de la determinación de **grasa** en los quesos se muestran en la Tabla 3. El elevado porcentaje de grasa en el centro del queso es debido a que se le añade crema a la leche previa al cuajado con la finalidad de que se obtenga un producto doble crema. Por otro lado, la leche descremada se usará para la elaboración de la corteza y se vería reflejado en el bajo porcentaje de grasa de ésta.

La grasa se comporta más como un fluido y confiere viscosidad en lugar de elasticidad o rigidez al queso. Además, la grasa líquida actúa como lubricante sobre las superficies de fractura de la matriz de caseína y, por lo tanto, reduce la tensión necesaria para fracturar la matriz (Visser 1991). La dureza es atribuida a la excesiva formación de enlaces proteína - proteína que reduce la retención de agua traducido en un incremento de la dureza de la muestra, como puede observarse en quesos elaborados con una reducción de su contenido graso (Bhaskaracharya y Shah, 2001); la reducción del contenido graso entonces incrementa la dureza del queso (Awad et al., 2005). Lo anterior podría explicar porque el centro es más suave que la corteza. De igual forma la adición de cuajo influirá en la red proteínica que atrapará a la grasa en la segunda etapa de la cuajada (IDF.2007).

Cabe destacar que el alto contenido de grasa registrado en el productor La Peña, puede ser por lo antes mencionado en la determinación de humedad: al haber menos humedad se pueden concentrar los otros macro componentes, al igual de que durante el proceso le hayan agregado demasiada crema a la leche. También de la misma forma, el alto contenido de grasa puede influir en que se diluya otro macro componente como la proteína y por consiguiente nos dé un valor más bajo en ésta.

El alto contenido de grasa de la corteza, que sale de las especificaciones, se puede explicar por un deficiente proceso de descremado.

El productor Regional es el único donde ambas de sus unidades de ensayo, para el núcleo, entran en lo especificado en las Reglas de Uso del queso Bola de Ocosingo, mientras que el productor Queshil solamente entra la bola 1. Los resultados para el centro de ambas unidades de estudio del productor La Peña se salieron de la escala del butirómetro de queso por lo cual se utilizó un valor estimado.

Todos los productores tuvieron diferencia estadísticamente significativa menos los de la corteza de la bola 2 de los productores La Peña y Queshil (tabla 2).

Los resultados crudos de grasa se encuentran en el anexo 1. Se tienen los análisis para la determinación de grasa, donde los productores Laltic y La Peña obtuvieron un coeficiente de variación mayor a 5 para la corteza 1 y 2. Se requiere hacer más repeticiones con el fin de obtener un coeficiente de variación menor.

Tabla 3. Determinación de Grasa.

Muestra	(%) Grasa			
	Bola 1	Bola 2	Bola 1	Bola 2
Productor	Centro	centro	corteza	corteza
Laltic	31.83± 0.76 ^C <i>a</i>	30.17± 0.76 ^C <i>a</i>	2.75± 0.35 ^C <i>a</i>	3.0 ^D <i>a</i>
Regional	35.33± 1.26 ^D <i>a</i>	33.83± 0.29 ^D <i>a</i>	10.0 ^D	9.0 ^E
La Peña	42.67± 0.58 ^E <i>a</i>	42.33± 0.58 ^E <i>a</i>	2.25± 0.35 ^C <i>a</i>	2.25± 0.35 ^C <i>a</i>
Queshil	33.67± 0.29 ^F <i>a</i>	28.50± 1.32 ^F <i>b</i>	1.0 ^F	2.0 ^C
Reglas de uso queso bola de Ocosingo/ (López et al., 2015)	33-36%		1.5±1.0	

Se utilizó el método de Fisher para distinguir entre grupos estadísticamente diferentes utilizando un $\alpha = 0.05$. Las letras *a* y *b* nos indican la diferencia estadísticamente significativa entre las unidades de ensayo de cada productor, y las letras en mayúscula en el super índice nos muestran la diferencia entre productores.

Resultados de Proteína

Los resultados de la determinación del contenido de **proteína** se muestran en la Tabla 4. El contenido de proteína está determinado por la composición de la leche utilizada, la raza del ganado y la alimentación a la que está expuesto (Fox et al., 2010). Por otra parte, la cantidad de proteína y suavidad del producto final, están directamente relacionadas con el tiempo de maduración donde tiene lugar la proteólisis, que nos producirá compuestos que contribuirán a las características sensoriales del queso debido a los ácidos orgánicos, alcoholes y aldehídos obtenidos de la degradación de péptidos. La leche contiene enzimas proteolíticas endógenas como plasmina, lipoproteína lipasas (en leche cruda) fosfatasas ácidas y xantina oxidasa que están asociadas con micelas de caseína o presentes en la membrana del glóbulo de grasa y se pueden incorporar en el cuajo (Fox et al., 2017). La corteza presentará una mayor cantidad de proteína debido a la pérdida de humedad durante la maduración, a que está más expuesta al medio ambiente y a que se elabora con leche descremada, por consiguiente, ésta se concentra aún más. También un factor que cabría mencionar sería que durante el cuajado puede haber una pérdida de proteína debido a la primera fase del cuajado, donde se separa la paracaseína del macro péptido de caseína, el cual es soluble y se va al suero. Esta, en combinación con un proceso determinado de fermentación (método apropiado de deshidratación) resulta en una masa que pierde proteínas solubles y obviamente agua (Hinrichs, 2001).

En el caso del quesero La Peña se puede observar lo que se discutía en el análisis de grasa: al haber una mayor cantidad de grasa, se diluyó la cantidad de proteína, o se le puede atribuir a pérdidas durante el proceso.

La corteza es probable que no se haya secado adecuadamente entre lotes y productores, así como que no se haya llevado un proceso de descremado adecuado. Del mismo modo puede influir el tiempo que se deja actuar a la renina durante el cuajado, se tiene que tomar el tiempo exacto para cada uno de los diferentes lotes, para que de este modo haya una mejor homogeneidad en los resultados.

En la tabla 3 se puede observar como si se encontró diferencia estadísticamente significativa entre productores como entre unidades de estudio de cada quesero.

El centro de la bola 2 y la corteza de ésta, del productor Qeshil entran dentro de los parámetros establecidos de las Reglas de Uso del queso Bola de Ocosingo, mientras que, para la corteza del productor Regional ambas de sus unidades de ensayo entran dentro de lo establecido.

Los datos crudos de proteína se encuentran en el anexo 1. Se tienen los análisis para la determinación, donde se pueden destacar los productores Laltic para el centro de ambas unidades de estudio y el centro de la bola 2 del productor La Peña. Se recomienda realizar más repeticiones con el fin de obtener un coeficiente de variación menor. De igual manera se sugiere desengrasar las muestras con la finalidad de que no interfiera la grasa en la determinación de proteína.

Tabla 4. Determinación de Proteína.

Muestra	(%) Proteína			
	Bola 1	Bola 2	Bola 1	Bola 2
Productor	centro	centro	corteza	corteza
Laltic	24.51± 1.78 ^C <i>a</i>	25.97± 1.81 ^C <i>a</i>	50.13± 0.5 ^C <i>b</i>	52.1 ^D <i>a</i>
Regional	26.57± 0.78 ^C <i>a</i>	26.67± 0.92 ^C <i>a</i>	39.0± 0.1 ^D <i>b</i>	41.73± 0.23 ^C <i>a</i>
La Peña	20.97± 1.05 ^E <i>a</i>	22.58± 1.59 ^D <i>a</i>	46.3 ^E <i>a</i>	46.77± 0.38 ^E <i>a</i>
Qeshil	23.72± 2.33 ^C <i>a</i>	23.24± 0.25 ^D <i>a</i>	44.8± 1.14 ^F <i>a</i>	41.0± 0.67 ^C <i>a</i>
Reglas de uso queso bola de Ocosingo	23-25%		38-42%	

Se utilizo el método de Fisher para distinguir entre grupos estadísticamente diferentes utilizando un $\alpha=0.05$. Las letras *a* y *b* nos indican la diferencia estadísticamente significativa entre las unidades de ensayo de cada productor, y las letras en mayúscula en el super índice nos muestran la diferencia entre productores.

Resultados de cenizas

El contenido de **cenizas** se muestra en la tabla 5. El contenido de cenizas está estrechamente relacionado a la cantidad de cloruro de sodio que se utiliza en el proceso de salado, debido a que es el que se añade con mayor concentración. No obstante, el porcentaje de cenizas en los quesos no solamente considera el cloruro de sodio, sino también los minerales provenientes de la leche que se encuentran en forma coloidal asociados a las micelas de caseínas, los cuales son los fosfatos, calcio y magnesio entre otros. Se puede notar que la corteza contiene mayor cantidad de cenizas que el centro, puesto que la proporción de los minerales que quedan en el queso, sobre todo el calcio, es más baja cuanto mayor acidez haya en la pasta (Alaís, 1985); ya que, en el proceso de elaboración, el centro se deja acidificar más tiempo que la corteza. Por otra parte, la deshidratación juega un papel importante dado a que hay una concentración de dichos minerales. De acuerdo al estudio realizado por López et al., 2015 el queso 2 del productor Regional es el único que entra dentro de los parámetros establecidos para el centro.

En la Tabla 5 se puede observar como si se encontró diferencia estadísticamente significativa entre productores, como entre unidades de estudio de cada quesero.

Debido a que se trata de un proceso artesanal, no estandarizado, se pueden explicar las diferencias entre productores y entre las unidades de ensayo de cada productor. Sin embargo, durante el proceso de salado se agrega una cantidad de 2-3% (m/m) y la mayoría de los núcleos de los quesos tienen esta cantidad.

Los datos crudos de cenizas se encuentran en el Anexo 1. Se tienen los análisis de la determinación, para el centro², se recomienda hacer más repeticiones para reducir el coeficiente de variación en el productor La Peña, y con esto tener un resultado más confiable.

Tabla 5. Determinación de cenizas.

Muestra	(%) Cenizas			
	Bola 1	Bola 2	Bola 1	Bola 2
Productor	centro	centro	corteza	corteza
Laltic	2.75± 0.08 ^C <i>b</i>	3.10± 0.02 ^C <i>a</i>	5.40± 0.10 ^D <i>b</i>	6.17± 0.18 ^C <i>a</i>
Regional	2.38± 0.13 ^C <i>b</i>	2.87± 0.02 ^C <i>a</i>	4.76± 0.16 ^E <i>a</i>	4.86± 0.05 ^D <i>a</i>
La Peña	3.11± 0.57 ^{CD} <i>a</i>	3.49± 0.24 ^D <i>a</i>	6.30± 0.06 ^C <i>b</i>	6.93± 0.26 ^E <i>a</i>
Queshil	3.40± 0.18 ^D <i>a</i>	2.99± 0.13 ^C <i>b</i>	6.26± 0.18 ^C <i>a</i>	5.44± 0.03 ^F <i>b</i>
(López et al.,2015)	2.8± 0.6		5.3± 0.9	

Se utilizó el método de Fisher para distinguir entre grupos estadísticamente diferentes utilizando un $\alpha = 0.05$. Las letras *a* y *b* nos indican la diferencia estadísticamente significativa entre las unidades de ensayo de cada productor, y las letras en mayúscula en el super índice nos muestran la diferencia entre productores.

Resultados de Carbohidratos

Los resultados de **carbohidratos** se muestran en la Tabla 6. La determinación de carbohidratos se hizo por la diferencia con respecto al contenido de humedad, grasa, proteínas y cenizas. La lactosa es el carbohidrato más abundante e importante en la leche. La lactosa tiene un papel fundamental durante la maduración, ya que las bacterias ácido lácticas ocupan este carbohidrato como fuente de carbono para producir ácido láctico. La mayor parte de la lactosa se pierde durante el desuerado, por consiguiente lo poco que queda de este carbohidrato es aprovechado por las bacterias ácido lácticas. Esto explicaría el bajo contenido que se obtuvo.

Se puede apreciar una diferencia muy marcada entre los productores y las unidades de ensayo de cada quesero. Esta diferencia se puede explicar debido a que se tienen tiempos de maduración distintos entre lotes como entre productores.

Tabla 6. Determinación de carbohidratos.

Muestra	(%) Carbohidratos			
	Bola 1	Bola 2	Bola 1	Bola 2
Productor	centro	centro	corteza	corteza
Laltic	2.16	1.12	6.35	3.12
Regional	0.15	0.60	3.70	2.39
La Peña	2.68	1.96	6.20	7.41
Queshil	1.37	1.10	4.24	2.79

Resumen

Tabla 7 Resultados promedio de todas las determinaciones del análisis químico proximal.

Muestra	Humedad		Grasa		Proteína		Cenizas		Carbohidratos	
	Centro	Corteza	Centro	Corteza	Bola	Corteza	Bola	Corteza	Bola	Corteza
Laltic	39.20	36.01	31	2.88	25.24	51.12	2.93	5.79	1.64	4.74
Regional	35.8	41.64	34.58	9.5	26.62	40.37	2.63	4.81	0.38	3.05
La Peña	30.1	38.37	42.5	2.25	21.78	46.54	3.3	6.62	2.32	6.81
Qeshil	41.01	46.08	31.09	1.5	23.48	42.9	3.2	5.85	1.24	3.52
Reglas de Uso/ López et al., 2015	38-40%	34-38%	33-36%	1.5±1.0	23-25%	38-42%	2.8±0.6	5.3±0.9		

Para poder obtener un producto más homogéneo se les recomienda lo siguiente a los queseros:

- Cuidar la cantidad de sal y cuajo añadido.
- Tener precaución tiempos de agitación de la leche mientras se vierte el cuajo, y procurar que ésta sea lo más homogénea, así mismo de la maduración y el desuerado, ya que esto repercutirá fuertemente en la composición del queso.
- Se recomendaría usar una forma más precisa para la medición de los volúmenes de la leche, cuajo y cantidad de sal utilizados.
- Por otra parte, se recomienda tener un mejor control en el proceso de descremado. El productor La Peña tendrá que cuidar esto y agregarle menos crema a la leche.

COMPARACIÓN ENTRE LAS NORMAS RELACIONADAS CON ESTE PRODUCTO

Se comparó la “NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba”, que está vigente, con la NOM 243 que está en proceso de revisión. Se puede denotar que la modificada está más completa y actualizada, haciendo énfasis en puntos que la actual norma vigente no hace alusión, como por ejemplo uno muy importante que es el manejo de la leche cruda, algo que ha estado muy ausente en las actuales normas relacionadas a productos lácteos. Se sigue la misma estructura y forma que la norma vigente, sin embargo, la nueva norma se desglosa de una forma más clara y específica. Para la norma modificada se puede señalar que le hace falta una introducción, en el punto de términos y definiciones se puede apreciar que se ha actualizado más, teniendo más de estos, así como modificado ligeramente los ya preexistentes a los que se estipulaban en la NOM 243 vigente. Del mismo modo se han agregado referencias normativas en la nueva norma, como la NOM-181-SFCI.2010, NOM-222-SCFI/SAGARPA-201 y NOM-223-SCFI/SAGARPA-201. La clasificación parece ser más extensa y detallada en la nueva NOM 243 respecto a los quesos, como para la mayoría de los otros productos, y se tienen muchos más ejemplos de estos para cada clasificación. Las disposiciones sanitarias en la norma 243 modificada son mucho más precisas, pudiendo notar que se han separado en “disposiciones sanitarias para establecimientos y especificaciones sanitarias”, teniendo dentro de esta última una mayor especificidad y expansión. Detallan con mucha precisión y perfectamente el manejo de la leche cruda desde la ordeña y el manejo de ésta, hasta el transporte y centros de acopio, haciendo énfasis en las condiciones para cada una de estas especificaciones.

El PROYECTO DE NORMA MEXICANA PROY-NMX-F-767-COFOCALEC-2019 SISTEMA PRODUCTO LECHE - ALIMENTOS – LACTEOS – QUESO BOLA DE OCOSINGO –DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y METODOS DE PRUEBA reúne ciertos criterios de la NOM-243-SSA1-2010 como el objetivo y campo de aplicación, especificaciones sanitarias y de carácter fisicoquímico. Del mismo modo nos plasma los términos y definiciones, referencias normativas, muestreo, métodos de prueba y etiquetado que la NOM-243-SSA1-2010, tanto la que está vigente como la modificada. Sin embargo,

con el fin de que este proyecto de norma mexicana este más completa se recomendaría hacer lo siguiente:

- En el apartado de términos y definiciones, se recomienda agregar la definición de leche, queso y queso madurado según la NOM-243-SSA1-2010 y el CODEX STAN A-6-1978, Rev. 1-1999, así como también la definición de renina o cuajo.
- En clasificaciones y especificaciones, sería recomendable mencionar la leche bronca.
- En el punto de especificaciones, podrían separarse las especificaciones generales en donde se redacte el proceso de elaboración, así como después plasmar las fisicoquímicas, químicas y sanitarias respectivamente, poniendo los valores de a_w , pH y acidez en las fisicoquímicas, la composición química del queso en las especificaciones químicas y, en las sanitarias, las buenas prácticas de manufactura junto con las especificaciones microbiológicas las cuales ya están plasmadas de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010. En ingredientes permitidos, se podría permitir el uso de cloruro de calcio y poner las especificaciones del uso de éste. Por otra parte, el valor de cenizas tanto para el forro como para el centro del queso se recomendaría añadirlo junto a la cantidad de proteína, húmeda y grasa, así como en la NMX-F-092- 1970. CALIDAD PARA QUESOS PROCESADOS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS, aunque esta norma mexicana este dirigida para quesos procesados. Ahí mismo en las especificaciones de los ingredientes permitidos durante el proceso, se pueden plasmar las diferentes enzimas que se pueden emplear para cuajar la leche con un formato de tabla.
- En los métodos de prueba, debe contener el método para la cuantificación de cenizas según la NMX-F-701-COFOCALEC-2016.
- Se pueden agregar a este proyecto de norma los métodos de prueba para ver la calidad de la leche bronca, como son inhibidores y oxidantes, como también incluir la prueba de estabilidad al alcohol.
- En la sección de etiquetado, es recomendable que la etiqueta plasme el contenido el porcentaje de cenizas %m/m. Es sugerible que se indique la fecha de caducidad, lote y fecha de envasado (día/mes).

8. Conclusiones

- La calidad microbiológica de los quesos es aceptable; sin embargo, dos de los productores deberán mejorar sus prácticas higiénicas, debido a la presencia de microorganismos indeseables como *S. aureus* y coliformes totales.
- En los casos analizados, excepto uno, la alta cantidad de mesófilos aerobios presentes en los quesos bola de Ocosingo se pueden atribuir a las bacterias ácido lácticas.
- Respecto a la composición química, uno de los quesos se sale de lo que se denomina queso bola de Ocosingo, porque la corteza y el centro son más húmedos de lo establecido en las Reglas de Uso, lo que ocasiona que la concentración de grasa sea menor y, además, a mayor humedad se permitiría crecimiento microbiano que podría disminuir la vida de anaquel del producto.
- Debido a que son productos de elaboración artesanal, la composición química de la mayoría de ellos es diferente entre productores y piezas.
- El proyecto de NOM 243, actualmente en revisión, está más completo y actualizado, debido a que contiene más alimentos, especificaciones para cada alimentos y pruebas de calidad.
- La NMX-F-767-COFOCALEC-2019 SISTEMA PRODUCTO LECHE - ALIMENTOS – LACTEOS – QUESO BOLA DE OCOSINGO – DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y METODOS DE PRUEBA ayudará a obtener productos más estandarizados, que cumplan las especificaciones de calidad e inocuidad de este alimento en particular.

9. Perspectivas

- Aislar e identificar las bacterias ácido lácticas, y levaduras de los diferentes productores de quesos bola de Ocosingo analizados, y de este modo observar si éstas producen compuestos con una aplicación biotecnológica útil.
- Realizar un análisis microbiológico y proximal a la leche con la que se elabora el queso bola de Ocosingo
- Realizar el análisis químico proximal de los quesos Bola de Ocosingo en diferentes épocas del año.
- Realizar evaluación de potencial probiótico de los diferentes productores de queso Bola de Ocosingo, con pruebas de resistencia a diferentes antibióticos y de adherencia a las células y/o mucus intestinal.
- Realizar un análisis sensorial más extenso y detallado de todos los productores de queso Bola de Ocosingo, con jueces entrenados con el fin de comprender mejor las características sensoriales de estos queso artesanales.

10. Bibliografía

1. Agudelo, M, y Alfredo Cesín. 2013. Evaluación socioeconómica de los productores de queso Bola de Ocosingo, Chiapas. *In*: Beatriz Cavallotti, Benito Ramírez, Alfredo Cesín, Gustavo Rojo, y Carlos Marcof (coord). Seguridad Alimentaria y Producción Ganadera en Unidades Campesinas. México. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 173-184.
2. Akpınar, O., Uçar, F., and Yalçın, H. T. (2011). Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of *Yarrowia lipolytica* strains isolated and identified from different cheeses in Turkey. *Ann. Microbiol.* 61, 907–915.
3. Alaís, C. (1985). Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Reverté. México. 877p.
4. Arrieta, L. 2011. *Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
5. Atanassova, M. R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I. C., Garabal, J. I., and Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 53, 172–181.
6. Awad, S., Hassan, A. N., Muthukumarappan, K. (2005) Application of Exopolysaccharide-Producing Cultures in Reduced Fat Cheddar Cheese: Texture and Melting Properties. *Journal of Dairy Science*, 88, 4204-4213.
7. Bacab, H. M., Madera, N. B., Solorio, F. J., Vera, F. y Marrufo, D. F. (2013). Los sistemas silvopastoriles intensivos con *Leucaena leucocephala*: una opción para la ganadería tropical. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(3), 67-81.

8. Baird-Parker, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 12-19. Wehr and Frank (ed.). 2004.
9. BD Diagnostic Systems Europe, 2003. *INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR BD Baird-Parker Agar*. [En línea] (Actualizado en 2006). Disponible en: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255084.pdf> [Ultimo acceso 01 de noviembre de 2020].
10. Bhaskaracharya, R. K., Shah, N. P. (2001) Texture and microstructure of skim milk mozzarella cheeses made using fat replacers. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 56, 9-14
11. Burkhalter G (1981) Catalogue of Cheese, Bulletin 141. International Dairy Federation, Brussels
12. Camacho, Mata, A. 2019. Caracterización química y microbiológica de quesos Bola de Ocosingo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Capodifoglio, E., Vidal, A.M.C., Lima, J.A.S., Bortoletto, F., D'Abreu, L.F., Gonçalves, A.C.S., et al., 2016. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *J. Dairy Sci.* 99, 5214-5223.
14. Cardoso, V. M., Borelli, B. M., Lara, C. A., Soares, M. A., Pataro, C., Bodevan, E. C., et al. (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Res. Int.* 69, 331–340.
15. Cavicchioli, V., Scatamburlo, T., Yamazi, A., Pieri, F., Nero, L., 2015. Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. *J. Dairy Sci.* 98, 8386-8390
16. Cavicchioli, V., Scatamburlo, T., Yamazi, A., Pieri, F., Nero, L., 2015. Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. *J. Dairy Sci.* 98, 8386-8390

17. Cervantes, F., Villegas, A., Cesin, A. y Espinoza, A. 2013. *Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse*. 2° edición. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.
18. CODEX Standard 283-1978. Norma general del CODEX para el queso.
19. Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3, 777-788
20. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS - Fundamentos y Aplicaciones. Por DRIDER, Djamel RIVERA, Victor Manuel, 2016, Alfaomega, p. 35.
21. De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (pp. 91-142). Springer US.
22. Drider, D., Rivera, V., 2016. *Bacterias ácido lácticas, fundamentos y aplicaciones*. México D.F: Alfaomega.
23. Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., McSweeney, P., 2017. *Fundamentals of Cheese Science. Segunda edicion. New York: Springer, 392-393*.
24. Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., et al. (2013). Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 294–300. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032
25. Hernández- Briones, V. 2007. Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. UNAM
26. HINRICHS, J. 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*. 11, 495-503.
27. IDF, 2007, Coagulation of milk processes and characteristics. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 420:1-28.
28. J. Visser. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese P. Walstra (Ed.), *Rheological and Fracture Properties of Cheese*, International Dairy Federation, Brussels, Belgium (1991), pp. 49-61.
29. Jay, J.M., 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media, New York.

30. Jay, J.M., 2012. *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media, New York
31. Juan, B., Zamora, A., Quevedo, J. M., and Trujillo, A.-J. (2016). Proteolysis of cheese made from goat milk treated by ultra high pressure homogenisation. *LWT* 69, 17–23.
32. Jucapodinior, J.R., de Oliveira, A., Silva, F. de G., Tamanini, R., de Oliveira, A., Beloti, V., 2018. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J. Dairy Sci.* 101, 7583.
33. Júnior, J.R., de Oliveira, A., Silva, F. de G., Tamanini, R., de Oliveira, A., Beloti, V., 2018. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J. Dairy Sci.* 101, 75-83.
34. López, M., Vargas, A., Ortiz, H., 2016. Alimentos emblemáticos y turismo. La vinculación del queso bola de Ocosingo con la oferta turística regional. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 13(1).
35. López, R., Hernandez, A., Villegas, A. y Santos, A. 2015. Caracterización socio técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2, 345-353.
36. Lortal, S. y Chapot-Chartier, M. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 857-871.
37. Madigan, M; Maetinko, J; Parker, j. (2004). *Biología de los Microorganismos*.
38. Mohammed, M. A. H., Aguilar, P. C. F., Ayala, B. A. J., Bottini, L. M. B., Solorio, S. F. J., Ku, V. J. C. (2015). Evaluation of milk composition and fresh soft cheese from an intensive silvopastoral system in the tropics. *Dairy Science and Technology*, 96, 159-172.
39. Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., et al., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136-154.
40. NMX-F-710-COFOCALEC-2014. Sistema Producto Leche- Alimentos- Lácteos- Determinación de grasa en quesos- Método de prueba.
41. NMX-F-710-COFOCALEC-2016. Sistema producto leche- alimentos-lácteos- Determinación de cenizas en quesos- método de prueba.

42. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
43. NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
44. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba
45. NOM-F-68-S-1980. Determinación de Proteínas.
46. Osorio, J., Ciro, H y Mejía, L. 2004. Caracterización textural y fisicoquímica del queso EDAM. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 57, 2269-2278.
47. Peralta, M. y Lastra, I. 1999. Programa de producción de leche y de sustitución de las importaciones. En: *Dinámica del Sistema lechero mexicano en el marco regional y global*. Ciudad de México: UAM.
48. Perin, L.M., Sardaro, M.L.S., Nero, L.A., Neviani, E., Gatti, M., 2017. *Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and-independent methods*. *Food Microbiol.* 65, 160169.
49. Pimentel, T. C., Castellanos, R. A., Abarca, A. M. León, V H. (2012). Queso de Bola, Chiapaneca tradición. Desde Ocosingo a Cintalapa, pasando por Villaflores.
50. Pomeon T. M. F. (2011). De la retórica a la práctica del patrimonio: Procesos de calificación de los quesos tradicionales mexicanos. Centro de Investigaciones Económicas Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM), Chapingo, Texcoco, Estado de México. pp. 35-36.
51. Ramírez, Alfredo Cesín, Gustavo Rojo, y Carlos Marcof (coord). Seguridad Alimentaria y Producción Ganadera en Unidades Campesinas. México. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 173-184.
52. Sandine WE, Elliker PR (1970) Microbially induced flavors and fermented foods: flavor in fermented dairy products. *J Agric Food Chem* 18:557–566.
53. Savadogo, A., Ouattara, C., Vaháosle, I., Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria —minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5 (9), 678-683.
54. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS - Fundamentos y Aplicaciones. Por DRIDER, Djamel RIVERA, Victor Manuel, 2016, Alfaomega, p. 38.

55. Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47,125-137.
56. Standard methods for the examination of dairy products, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. Bowers and Hucker. 1935.Tech. Bull. 228. NY State Agar. Exp. Sta.
57. Vanderzant, C., and D.F. Splittstoesser(eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of food*, 3 ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
58. Verdier-Metz I, Michel V, Delbes C et al (2009) Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol* 26:305–310.
59. Verdier-Metz I, Michel V, Delbes C et al (2009) Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol* 26:305–310
60. Villegas, A. (2010). La maduración en los quesos artesanales mexicanos. En: La leche y los quesos artesanales en México. (Coord Cervantes E. F y Villegas de Gante, A.). Porrúa. México. Pp. 156.
61. Villegas, Abraham, Armando Santos, y Arturo Hernández. 2013. Caracterización Socio-Técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. México. 105 p.
62. Vázquez, C y Cruz, V. 2003. Manejo del ganado bovino de doble propósito (raza pardo suizo), bajo el sistema pastoreo semi-intensivo para impulsar el desarrollo regional en el estado de Puebla. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
63. Walter HE, Hargrove RC (1972) *Cheeses of the World*. Dover Publications Inc., New York

11. ANEXO 1

BOLA 1

	Humedad	Grasa	Proteína	Cenizas
Laltic	38.52	31	25.38	2.82
	39.01	32.5	22.46	2.66
	38.70	32	25.69	2.75
Promedio	38.75	31.83	24.51	2.75
D. estándar	0.25	0.76	1.78	0.08
CV	0.64	2.40	7.28	2.89
Regional	34.38	36.5	26.75	2.24
	36.21	35.5	25.72	2.41
	36.11	34	27.25	2.48
Promedio	35.57	35.33	26.57	2.38
D. estándar	1.03	1.26	0.78	0.13
CV	2.89	3.56	2.94	5.37
La Peña	30.55	43	20.25	3.50
	30.97	42	20.49	3.38
	30.20	43	22.18	2.46
Promedio	30.57	42.67	20.97	3.11
D. estándar	0.38	0.58	1.05	0.57
CV	1.26	1.35	5.01	18.31
Queshil	37.66	33.5	25.17	3.31
	38.61	33.5	21.03	3.29
	37.27	34	24.96	3.61
Promedio	37.85	33.67	23.72	3.40
D. estándar	0.69	0.29	2.33	0.18
CV	1.82	0.86	9.83	5.21

BOLA 2

	Humedad	Grasa	Proteína	Cenizas
Laltic	40.79	31.00	24.99	3.08
	39.95	29.50	24.86	3.12
	38.17	30.00	28.06	3.12
Promedio	39.64	30.17	25.97	3.10
D. estándar	1.34	0.76	1.81	0.02
CV	3.38	2.53	6.98	0.79
Regional	37.40	34.00	25.65	2.87
	35.55	34.00	27.46	2.89
	35.15	33.50	26.90	2.84

Promedio	36.03	33.83	26.67	2.87
D. estándar	1.20	0.29	0.92	0.02
CV	3.33	0.85	3.46	0.86
La Peña	29.02	43.00	21.82	3.56
	29.66	42.00	21.52	3.70
	30.22	42.00	24.41	3.22
Promedio	29.63	42.33	22.58	3.49
D. estándar	0.60	0.58	1.59	0.24
CV	2.03	1.36	7.05	6.98
Queshil	43.32	29.00	23.52	2.95
	44.66	27.00	23.19	3.14
	44.54	29.50	23.02	2.88
Promedio	44.17	28.50	23.24	2.99
D. estándar	0.74	1.32	0.25	0.13
CV	1.68	4.64	1.09	4.48

CORTEZA 1

	Humedad	Grasa	Proteína	Cenizas
Laltic	35.36	2.5	49.79	5.34
	35.50	3	50.46	5.35
	34.94			5.52
Promedio	35.27	2.75	50.13	5.40
D. estándar	0.29	0.35	0.47	0.10
CV	0.83	12.86	0.94	1.90
Regional	42.43	10	39.04	4.75
	42.87	10	38.91	4.61
	39.22			4.92
Promedio	41.51	10.00	38.98	4.76
D. estándar	1.99	0	0.09	0.16
CV	4.80	0	0.24	3.29
La Peña	39.69	2.00	46.32	6.27
	38.32	2.50	46.25	6.26
	40.16			6.37
Promedio	39.39	2.25	46.29	6.30
D. estándar	0.96	0.35	0.05	0.06
CV	2.43	15.71	0.11	0.98
Queshil	43.38	1	43.97	6.32
	43.87	1	45.59	6.40
	44.73			6.06
Promedio	43.99	1	44.78	6.26
D. estándar	0.68	0	1.14	0.18
CV	1.55	0	2.55	2.84

CORTEZA 2

	Humedad	Grasa	Proteína	Cenizas
Laltic	35.19	3	52.11	6.02
	36.19	3	52.13	6.11
	38.88			6.36
Promedio	36.75	3	52.12	6.16
D. estándar	1.91	0	0.01	0.18
CV	5.19	0	0.02	2.86
Regional	42.20	9	41.92	4.81
	41.88	9	41.54	4.88
	41.23			4.91
Promedio	41.77	9.00	41.73	4.87
D. estándar	0.49	0	0.28	0.05
CV	1.18	0	0.66	1.05
La Peña	37.21	2.5	46.50	6.77
	36.39	2	47.03	6.78
	38.45			7.23
Promedio	37.35	2.25	46.77	6.93
D. estándar	1.04	0.35	0.38	0.26
CV	2.78	15.71	0.80	3.79
Queshil	49.09	2	41.46	5.41
	48.50	2	40.52	5.44
	46.91			5.46
Promedio	48.17	2.00	40.99	5.44
D. estándar	1.13	0	0.67	0.03
CV	2.34	0	1.63	0.46

12. ANEXO 2

Concepto estadístico

Fisher LSD

La prueba de Fisher de la menor diferencia significativa es un método de comparación múltiple creado en 1935 por Fisher y se desarrolla en dos etapas. En la primera se realiza una ANOVA y si la hipótesis nula es rechazada se puede realizar la prueba de Fisher. La segunda etapa consta de probar los contrastes individuales entre los grupos usando un nivel de confianza de 0.05%, Por esto se ha planteado que la prueba tiene un gran poder para detectar diferencias verdaderas (Maxwell et al, 2014).

					Análisis de varianza de un factor					STD error	1.01926172		
Corteza 2	Laltic	Regional	La Peña	Queshil							T critica	2.31	
		35.19	42.2	37.21	49.09						LSD	2.35449456	
		36.19	41.88	36.39	48.5	RESUMEN							
		38.88	41.23	38.45	46.91	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil									
	Laltic				Laltic	3	110.26	36.7533333	3.64203333				
	Regional	5.01666667			Regional	3	125.31	41.77	0.2443				
	La Peña	0.59666667	-4.42		La Peña	3	112.05	37.35	1.0756				
	Queshil	11.4133333	6.39666667	10.8166667	Queshil	3	144.5	48.1666667	1.27143333				
					ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil	Origen de las variaciones	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	F	Probabilidad	lor crítico par
	Laltic				Entre grupos	249.930867	3	83.3102889	53.4608621			1.2299E-05	4.06618055
	Regional	4.92186314			Dentro de lo	12.4667333	8	1.55834167					
	La Peña	0.58539103	-4.33647211										
	Queshil	11.1976474	6.2757843	10.6122564	Total	262.3976	11						
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil									
	Laltic												
	Regional	SIG											
	La Peña	NOSIG	SIG										
	Queshil	SIG	SIG	SIG									

GRASA BOLA 1 Y BOLA 2

					Análisis de varianza de un factor					STD error	0.52830442		
BOLA 1	Laltic	Regional	La Peña	Queshil								T critica	2.31
		31	35.5	43	33.5							LSD	1.2203832
		32.5	34	42	33.5	RESUMEN							
		32	35.33	43	34	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil									
	Laltic				Laltic	3	95.5	31.8333333	0.58333333				
	Regional	3.11			Regional	3	104.83	34.9433333	0.67463333				
	La Peña	10.8333333	7.72333333		La Peña	3	128	42.6666667	0.33333333				
	Queshil	1.83333333	-1.27666667	-9	Queshil	3	101	33.6666667	0.08333333				
					ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil	Origen de las variaciones	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	F	Probabilidad	lor crítico par
	Laltic				Entre grupos	204.505558	3	68.1685194	162.826138			1.6483E-07	4.06618055
	Regional	5.88675754			Dentro de lo	3.34926667	8	0.41865833					
	La Peña	20.5058542	14.6190967										
	Queshil	3.47022148	-2.41653605	-17.0356327	Total	207.854825	11						
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil									
	Laltic												
	Regional	SIG											
	La Peña	SIG	SIG										
	Queshil	SIG	SIG	SIG									

					Análisis de varianza de un factor					STD error	0.6770032		
BOLA 2	Laltic	Regional	La Peña	Queshil								T critica	2.31
		31	34	43	29							LSD	1.56387739
		29.5	34	42	27	RESUMEN							
		30	33.5	42	29.5	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil									
	Laltic				Laltic	3	90.5	30.1666667	0.58333333				
	Regional	3.66666667			Regional	3	101.5	33.8333333	0.08333333				
	La Peña	12.1666667	8.5		La Peña	3	127	42.3333333	0.33333333				
	Queshil	-1.66666667	-5.33333333	-13.8333333	Queshil	3	85.5	28.5	1.75				
					ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil	Origen de las variaciones	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	F	Probabilidad	lor crítico par
	Laltic				Entre grupos	342.229167	3	114.076389	165.929293			1.5305E-07	4.06618055
	Regional	5.4160256			Dentro de lo	5.5	8	0.6875					
	La Peña	17.9713577	12.553321										
	Queshil	-2.46182982	-7.87785542	-20.4331875	Total	347.729167	11						
	Laltic	Regional	La Peña	Queshil									
	Laltic												
	Regional	SIG											
	La Peña	SIG	SIG										
	Queshil	SIG	SIG	SIG									

GRASA CORTEZA 1 Y 2

CORTEZA 2	Laltic	Regional	La Peña	Qeshil	Análisis de varianza de un factor				STD error	0.14433757	
	3	9	2.5	2					T critica	2.77644511	
	3	9	2	2		RESUMEN			LSD	0.40074533	
						<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
	Laltic	Regional	La peña	Qeshil	Laltic	2	6	3	0		
	Laltic				Regional	2	18	9	0		
	Regional	6			La Peña	2	4.5	2.25	0.125		
	La peña	-0.75	-6.75		Qeshil	2	4	2	0		
	Qeshil	-1	-7	-0.25							
					ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Laltic	Regional	La peña	Qeshil	<i>Origen de las variaca de cuadrados de libertio de los cua</i>			<i>F</i>	<i>Probabilidad/or crítico para F</i>		
	Laltic				Entre grupos	66.09375	3	22.03125	705	6.6771E-06	6.59138212
	Regional	41.5692194			Dentro de lo	0.125	4	0.03125			
	La peña	-5.19615242	-46.7653718								
	Qeshil	-6.92820323	-48.4974226	-1.73205081	Total	66.21875	7				
	Laltic	Regional	La peña	Qeshil							
	Laltic										
	Regional	SIG									
	La peña	SIG	SIG								
	Qeshil	SIG	SIG	NOSIG							
CORTEZA 1	Laltic	Regional	La Peña	Qeshil	Análisis de varianza de un factor				STD error	0.20412415	
	2.5	10	2	1					T critica	2.77644511	
	3	10	2.5	1		RESUMEN			LSD	0.56673948	
						<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
	Laltic	Regional	La peña	Qeshil	Laltic	2	5.5	2.75	0.125		
	Laltic				Regional	2	20	10	0		
	Regional	7.25			La Peña	2	4.5	2.25	0.125		
	La peña	-0.5	-7.75		Qeshil	2	2	1	0		
	Qeshil	-1.75	-9	-1.25							
					ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Laltic	Regional	La peña	Qeshil	<i>Origen de las variaca de cuadrados de libertio de los cua</i>			<i>F</i>	<i>Probabilidad/or crítico para F</i>		
	Laltic				Entre grupos	99.25	3	33.0833333	529.333333	1.1827E-05	6.59138212
	Regional	35.5176013			Dentro de lo	0.25	4	0.0625			
	La peña	-2.44948974	-37.967091								
	Qeshil	-8.5732141	-44.0908154	-6.12372436	Total	99.5	7				
	Laltic	Regional	La peña	Qeshil							
	Laltic										
	Regional	SIG									
	La peña	NOSIG	SIG								
	Qeshil	SIG	SIG	SIG							

13.Anexo 3

$$\frac{98g H_2SO_4}{100g Ac conc} \times \frac{1.84g Ac conc}{1 mL Ac conc} = \frac{1.80g Ac conc}{1 mL Ac conc}$$

$$\frac{62.63g H_2SO_4}{100g Ac conc} \times \frac{1.53g Ac conc}{1 mL Ac conc} = \frac{0.96g H_2SO_4}{1mL}$$

$$\frac{500 mL \times 0.96 g H_2SO_4}{1.80 g H_2SO_4/mL} = 266.7 mL (sol 98%) que se usaron para preparar el acido de la determinacion de grasa.$$