

IMPACTO DE LA MASTITIS SUBCLINICA SOBRE LA PRODUCCION DE QUESOS DUROS.

**Carlos N. Corbellini⁽¹⁾; Eduardo J. Garbarino⁽¹⁾; Mauricio E. Benzaquen⁽¹⁾;
Pedro Serrano⁽¹⁾; Graciela Musset⁽²⁾.**

(1) - Proyecto Lechero, E.E.A. INTA Pergamino, Pcia. Buenos Aires, Argentina.

(2) - CITIL, INTI, San Martín, Pcia. Buenos Aires, Argentina

Introducción:

Está bien establecido que la reacción inflamatoria con que responde la glándula mamaria bovina a la agresión bacteriana (mastitis clínica y/o subclínica) provoca cambios en la composición química y celular de la leche, lo que afecta a los procesos industriales, a la calidad organoléptica y la sobrevida de los productos lácteos (1,2,3). El recuento de células somáticas (SCC/ml) en leche cruda, ha demostrado ser un parámetro confiable del grado de respuesta inflamatoria de los cuartos mamarios infectados (2) y está fuertemente correlacionado tanto con el nivel de producción (4) como con la calidad de la leche producida (5,12). En especial, en la producción de quesos, la actividad lipolítica y proteolítica, debidas tanto a las bacterias como a los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), son responsables de los menores rendimientos industriales (mayor % de humedad, pérdida de sólidos totales en el suero, alargamiento del tiempo de coagulación, necesidad de mayor concentración de starters, etc.), así como de alteraciones en textura, sabor, aromas y sobrevida durante la maduración (6,7,8,12).

Los cuartos mamarios sanos suelen tener recuentos entre 50×10^3 y 200×10^3 SCC/ml (9), con algunas variaciones de acuerdo a número de lactancias, momento de la lactancia, condiciones ambientales y otros factores estresantes (10,11). En la leche proveniente de cuartos con mastitis, la proporción de PMN como % del total de SCC/ml se incrementa notablemente, pasando del 40-45 % en leches con 200×10^3 SCC/ml al 90-95 % en leches con 1000×10^3 (11). La función específica de los PMN es la de destruir a las bacterias que puedan invadir la glándula mamaria y remover los desechos producidos en el foco de infección. Las armas que tienen para eso los PMN son principalmente enzimas (proteasas, lipasas, etc.) que se incorporan a la leche (13,14). Además, y debido al daño producido a los alvéolos mamarios durante la infección, hay pasaje de componentes del plasma sanguíneo a la leche. Este plasma contiene también, además de otros componentes indeseables en la leche, enzimas proteolíticas (o sus precursores) y lipolíticas, las cuales desnaturalizan las caseínas y son causantes de proteólisis y lipólisis (13). En especial la plasmina, una enzima proteolítica existente en el plasma sanguíneo como su precursor (plasminógeno) pasa a la leche y allí se activa, causando un daño extenso a diversas fracciones de la caseína (14). La plasmina es altamente perjudicial en el procesamiento de los productos lácteos,

ya que al ser termoestable, resiste a la pasteurización industrial (15) e incluso a los procedimientos de ultra-rápida temperatura (UHT) (16). Por lo tanto, la plasmina continuará dañando a la proteína láctea durante la elaboración y almacenamiento de los productos lácteos, como ha sido demostrado (17). Pero no solamente la plasmina es la responsable de la actividad proteolítica que se produce en los cuartos mastíticos. El hecho de que esa actividad está directamente ligada al incremento en el SCC/ml (y en especial al incremento de PMN) (6,18,26), indica que la proteólisis no-plasmínica adquiere mayor relevancia a medida que es mas severa y crónica la reacción inflamatoria (19,20). Se ha propuesto (21) la existencia de por lo menos tres proteasas asociadas con los PMN: la catepsina D, que tiene una especificidad similar a la de la quimiotripsina sobre la alfa κ -1-cn, liberando alfa κ -1-1'-cn, polipéptidos no identificados y aminoácidos libres; la catepsina B, también de sobre la alfa κ -1-cn, produciendo alfa κ -1-1'-cn y la elastasa, con acción mas general sobre el caseinato de Ca^{++} (beta-cn, especialmente), produciendo gamma-cn, alfa κ -1-1'-cn y alfa κ -1-11'-cn, péptidos y aminoácidos libres. En cualquier caso, una disminución de la Caseína Total (CT) y en especial de las fracciones alfa κ -1-cn y beta-cn, componentes estructurales principales de los quesos, pueden contribuir a los efectos negativos del alto SCC/ml en la leche cruda sobre los rendimientos, calidad composicional, alteraciones en la maduración y menor sobrevivencia durante el almacenamiento de los productos lácteos.

El objetivo de este trabajo fué el de evaluar el impacto del SCC/ml en leche cruda de vacas sin infección mamaria y de vacas crónicamente infectadas por *Staphylococcus aureus* con diferentes grados de reacción inflamatoria, sobre el contenido de Grasa Butirosa Total (GBT), Lactosa, Proteína Total (PT), Caseína Total (CT) y sus fracciones (gamma-cn; kappa-cn; alfa κ -1-cn; alfa κ -1-1'-cn; alfa κ -1-11'-cn, Péptidos Libres (PepL), Sólidos Totales (ST), Tiempo de Coagulación de la Cuajada (TCC) y Tiempo de Cocción del Grano (TCG), así como los rendimientos (Kg masa/100 lts. leche cruda) en la elaboración de queso duro tipo Sardo (de acuerdo a definición del Código Alimentario Nacional de la Rep. Argentina, con su modificación MERCOSUR, 1995).

Materiales y Métodos:

Se elaboraron en condiciones estandarizadas 18 partidas de 100-150 lts cada una de leche sin pausterizar de vacas sanas o infectadas en forma subclínica crónica por *Staphylococcus aureus*. En todos los casos, las vacas, mantenidas en un sistema pastoril reforzado, tuvieron un ingreso promedio de MS constituido por 1/3 de pastoreo directo de praderas base rye-grass y trébol rojo y/o verdes de invierno, 1/3 de silaje de maíz y 1/3 de concentrado (mezcla de maíz molido, expeller de girasol y/o harina de soja, semilla de algodón y núcleo vitamínico-mineral). Las partidas de leche oscilaron entre 142×10^3 SCC/ml y 1770×10^3 SCC/ml y con cada una de ellas se procesaron para obtener queso duro tipo Sardo durante tres días seguidos, en elaboraciones por duplicado. La carga bacteriana de la leche cruda no fué estadísticamente diferente entre partidas

para bacterias aerobias totales (TPC/ml) (10 a 20×10^3 UFC/ml), para coliformes (*E. coli* osciló entre 40 y 200 UFC/ml) ni para bacterias psicotrónica (< 1000 UFC/ml al Test de Preincubación) ni para bacterias esporuladas (< 400 UFC/ml), pero sí varió la carga bacteriana de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus ssp. coagulasa negativos*. De cada partida se obtuvieron muestras de leche cruda al momento de ingresar a la tina quesera (a cielo abierto y con agitación automática y temperatura programable), de la cuajada luego del corte y cocido del grano, del suero centrifugado y de los quesos a los $+ 30$ y $+ 60$ días de maduración en cámara a $16-18$ °C. Sobre las muestras refrigeradas a $4-5$ °C, dentro de las $24-48$ hrs. se efectuaron las siguientes determinaciones:

- 1- Sólidos Totales, Grasa Butirosa Total, Lactosa y Proteína Total, por Milkoscan (Foss Electric, Dinamarca), según norma FIL-IDF 141:91.
- 2- SCC/ml por Fossomatic 90 (Foss Electric, Dinamarca), de acuerdo a norma FIL-IDF 148 A: 95.
- 3- TPC, bacterias termodúricas (esporuladas) y psicotrónicas por recuento en placa, con pausterización previa o incubación previa, de acuerdo a Doc. FIL-IDF 256:91 y normas Fil-IDF 1008:9 y FIL-IDF 161:92 (viables/UFC).
- 4- Caseína Total por técnica descripta por Haenlein et al., 1973.
- 5- Las determinaciones de las fracciones de caseína se efectuaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-Page), con la siguiente composición del gel: Running Gel con 12.5 % de Poliacrilamida y Stacking Gel conteniendo 4.2 % de poliacrilamida, corriendo estándares de beta-cn, kappa-cn y alfa-cn. Se confirmaron estas fracciones y se determinaron las otras por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (22), luego de precipitación con HCl hasta pH 4.4 y centrifugación a 2000 rpm por 20 min. La columna HPLC se rellenó con Prontosil 300 A-C8 (5 micrómetros de poro), siendo el largo de la columna 150 mm. La fase móvil consistió en dos solventes: Sol A (ACN 100 :H₂O 900 :TFA 1 %) y Sol B (ACN 900 :H₂O 10 : TFA 1 %), con flujo 1 ml/min y detección a 214 nm. Los estándares de caseínas se diluyeron a razón de 0.015 de cn/500 microl. de buffer (6.6 Urea, 10 mM de dithierythritol y 10 mM de imidazol, siendo los volúmenes de inyección de 20 microl. En quesos, la separación del N caseínico del N soluble en agua, se obtuvo por suspensión de 10 gr de queso en 50 ml de H₂O destilada, incubación en baño maría a 40 °C, homogeneización con Stomacher por 120 min, centrifugación a 2000 rpm por 20 min y filtración por papel 595. Por razones de sentido práctico, sólo en las muestras de leche cruda (y sus quesos resultantes) inferiores a las 400×10^3 SCC/ml se determinaron las diferentes fracciones de las caseínas.

La cantidad de starter (Flora Danica, Chr. Hansen Lab.) fué el mismo por cada 100 lts de leche cruda, sin corregir por SCC/ml. La temperatura de maduración de la leche se fijó en un primer período de 33 °C y otro de 55 °C. Se cronometró el tiempo total de calentamiento, definiéndose el total (tiempo de coagulación + cocción del grano) como Tiempo de Vapor. El rendimiento quesero

fué definido por el peso de la cuajada obtenida cada 100 lts. de leche después del desuerado de acuerdo a técnica de Vernet et al., 1989.

Se definió como parámetro de comparación de la degradación de las diferentes fracciones de la caseína un Índice de Proteólisis (IP) como:

$$IP = (\alpha_{s1-I}-cn + \alpha_{s1-II})-cn + \text{Péptidos Libres} + N \text{ soluble proteico} / (\gamma\text{-cn} + \kappa\text{-cn} + \beta\text{-cn}).$$
 Las muestras de quesos en maduración a los +30 y +60 días de elaborados se tomaron de acuerdo a los APHA Standard Methods e.d. (1992) y normas AOAC e.d. (1990).

Para las comparaciones estadísticas, se realizó análisis de regresión y análisis de varianza seguido por Test de Duncan, a través del programa Statistic Versión 3.5 (Analytical Software, St.Paul, MN, USA). Para los análisis de regresión, los valores del SCC/ml fueron convertidos al score lineal (SL), de acuerdo con la fórmula:

$$SL = \text{Log}_2 (SCC/100) + 3.$$

Resultados y Discusión:

Como se muestra en Gráfico 1, a medida que se incrementa el SCC/ml en leche cruda disminuye en forma lineal el contenido de extracto seco total (ST) ($p < 0.05$ a regresión lineal) así como el contenido de GBT, sin modificaciones estadísticamente significativas en la concentración de PT. Esto concuerda con lo informado anteriormente por distintos autores (1,2,5,11,22). Mas dramáticos fueron los cambios de composición en las cuajadas provenientes de leches con número creciente de células somáticas, verificándose una estadísticamente significativa ($p < 0.05$) reducción tanto en los sólidos totales como en la grasa y proteína total retenidos en el coágulo. Esto se acompañó de una pérdida creciente de estos componentes en el suero luego de la centrifugación de la masa, especialmente en el contenido de GBT. Estos resultados concuerdan totalmente con los obtenidos por Politis et al. (7). El aspecto a destacar es que las alteraciones en la calidad composicional de la leche cruda y su impacto sobre la composición de los productos de fermentación de ella derivados, ya comienzan con SCC/ml mayores a 100 o 150×10^3 .

Fue también estadísticamente significativo el impacto negativo de altos SCC/ml sobre la concentración de caseínas totales y, consecuentemente, la relación inversa entre el contenido en Caseína Total (CT) y los rendimientos de cuajada cada 100 lts de leche cruda (Gráfico 2). Así, la disminución de la concentración de CT en leche cruda en relación al aumento del SCC/ml demostró ajustarse moderadamente bien ($r^2=0.60$, $p < 0.05$) a una ecuación de regresión lineal, donde $TC = - 0.0006 \text{ SCC} + 2.52$. Esta relación mejoró ($r^2 = 0.82$, $p < 0.01$) cuando se utilizó la conversión logarítmica del SCC/ml, es decir el score lineal. Así, para leches con 150×10^3 SCC/ml,

la concentración esperada de CT es de 2.62 gr/lit de leche, es decir el 81 % del total del N proteico presente. Para SCC/ml de 750×10^3 , la concentración esperable de caseínas totales es de 2.07 gr/lit, es decir aproximadamente sólo el 65 % del total del N proteico de la leche cruda.

En Gráfico 3, se muestra la relación negativa entre el SCC/ml en leche cruda y los rendimientos de kg masa/100 lts de leche. En este caso, nuevamente el uso del score lineal (SCS) mejoró la correlación ($r^2 = 0.51$, $p < 0.01$), de acuerdo a la expresión : kg masa/100 lts de leche = $12.6627 - 0.63026 \times \text{SCS}$. La ecuación de la regresión lineal sin conversión logarítmica del SCC/ml, fue de: kg masa/100 lts de leche = $-0.0012 \text{ SCC/ml} + 10.117$, con un r^2 de sólo 0.31 pero aún estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Al analizar con mayor detalle los datos, descomponiendo la regresión en diversos segmentos a lo largo del rango del SCC/ml estudiado, se verificó que, en forma relativa, la pérdida de rendimiento es proporcionalmente mayor cuando el SCC/ml aumenta de 150×10^3 a 350×10^3 que cuando se analizó la pendiente de la relación en rangos de SCC/ml de 400×10^3 a 1000×10^3 . Desde el punto de vista práctico, lo importante es que la diferencia en rendimiento de masa si se procesan leches con Scc/ml de 200×10^3 o 750×10^3 es de 0.7 a 0.9 kg menos por cada 100 lts de leche cruda industrializada. Esto constituye una pérdida industrial importante, que debería ser contemplada en una política de bonificaciones o castigos por calidad.

La textura, firmeza, aromas y sabores de los quesos en buena medida dependen de la calidad química, incluyendo relación N no proteico/N proteico, ácidos grasos libres, etc.(6,8,17). En especial la firmeza del coágulo y su capacidad de retener a los sólidos totales, depende de la concentración relativa de las distintas fracciones proteicas en general y de las caseínas en particular. En la leche bovina normal, las fracciones beta-cn, kappa-cn y especialmente las alfa s_{1-} cn son las que están en mayor concentración en la micelia de caseinato de Ca^{++} y fosfatos excretada por el borde apical de la célula alveolar mamaria (24,25). En general, se considera que otras fracciones como las alfa s_{1-I} -cn y alfa s_{1-II} -cn son productos de degradación post-secreción y lo mismo parece establecido para la fracción gamma-cn, especialmente esta última como producto de degradación de la beta-cn por acción de la plasmina (20,25,26), aunque este último punto no está demasiado claro. En nuestro ensayo (Gráfico 4), en leches con recuentos intermedios, que en muchos casos se consideran "normales", es decir SCC/ml de 353×10^3 , en promedio del "pool" de leche analizado, se verificó un significativo ($p < 0.05$) aumento en la concentración de kappa-cn y de péptidos libres, mientras que en la cuajada y sobre todo durante el proceso de maduración de los quesos, se observó un moderado incremento en las fracciones alfa s_{1-I} y alfa s_{1-II} de las caseínas y, especialmente en los quesos, un significativo ($p < 0.05$) incremento de la fracción gamma-cn y, sobre todo, en los péptidos libres. No se analizó la concentración de aminoácidos libres ni de N soluble no proteico, pero probablemente también estuvieron aumentados, como ha sido señalado en otros trabajos (13, 26). Así, surgió la idea de comparar un Índice de Proteólisis (IP), a lo largo del rango de SCC/ml estudiado por electroforesis y HLPC (es decir entre 153×10^3 y

375×10^3). Mientras que en leche cruda la diferencia no fué estadísticamente significativa (0.03 en leche con 158.6×10^3 SCC/ml vs. 0.04 en leches con 353×10^3 SCC/ml), tanto en la cuajada como en los quesos (y especialmente mas evidente a medida que se prolongaba el tiempo de estacionamiento), el IP se incrementó en forma significativa ($p < 0.05$). Así, en cuajadas elaboradas con leches de 158.6×10^3 SCC/ml, el IP fué de 0.91 vs. 1.19 en cuajadas de leches de 353×10^3 SCC/ml, mientras que durante el proceso de maduración de los quesos, aquellos provenientes de leches de 158.6×10^3 SCC/ml, el IP fué de 0.45 a los +30 días post-elaboración y de 0.49 a los +60 días. En los quesos provenientes de leches con SCC/ml de 353×10^3 SCC/ml, los IP fueron de 0.51 a los +30 días y de 0.63 a los +60 días. El IP creado es diferente al informado por otros autores, basados o en sólo la acción de la plasmina (7), midiendo la concentración de tilosina libre o correlacionando otras fracciones de las caseínas (gamma-cn/Caseína Total, por ejemplo)(20,26).

El otro punto importante con respecto a las pérdidas industriales está dado por el tiempo de calentamiento (gasto energético), tanto para lograr la coagulación como la cocción del grano a las características deseadas. Como se vé en Gráfico 5, trabajando con "pooles" de leche de SCC/ml de 158.6×10^3 , 353×10^3 , 785×10^3 o 1423×10^3 , lo que se definió como Tiempo Total de Vapor, fué de 16.23; 21.68; 32.14 y 40.10 min., respectivamente, es decir, procesar leches con mas de 750×10^3 SCC/ml, implica duplicar el costo energético con respecto a la industrialización de leches con menos de 200×10^3 SCC/ml

Agradecimientos:

- Al personal del tambo y fábrica de la Escuela Agrotécnica M.C. y M. Inchausti, Universidad Nacional de La Plata, Valdez, Pdo. 25 de Mayo, Pcia. Buenos Aires.
- Al Ing. Agr. Marcos Saubidet, de Laboratorio LACLE.
- A los Dres. F. Pantozzi y G. Vigo, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Referencias:

- 1- Schalm, O.W.; Carrol, E.J.; Jain, N.C. - 1971 - Bovine Mastitis, Lea&Febiger, Philadelphia, PA, USA.
- 2- Kitchen, B.J. - 1981 - Review of the progress of dairy science. Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests, J. Dairy Res., 48: 167-188.

- 3- Callieri, C.A.; Camuzzoni, O.; Corbellini, C.N. - 1989 - Calidad de composición, sanitaria e higiénica de la leche cruda, pp. 44-62, Actas 2das. Jornadas Internacionales de Calidad de Leche, ALMAST, Bs. As., Argentina.
- 4- De Graves, F.J.; Fetrow, J. - 1993 - Economics of mastitis and mastitis control, pp. 421-434, En: Uptake on Bovine Mastitis, The Vet. Clinics of N. America (Food Animal Practice), Ed. by K.L. Anderson, Vol 9(3), November 1993, W.B. Saunders Co., USA.
- 5- Auldist, M.J.; Coats, S.; Sutherland, B.J.; Mayes, J.J.; McDowell, G.H. - 1996 - Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle, Aust. J. Exp. Agric., 35: 427-436.
- 6- Barbano, D.M.; Rasmussen, R.R.; Lynch, J.M. - 1991 - Influence of milk somatic cell and milk age on cheese yield, J. Dairy Sci., 74: 369-388.
- 7- Politis, I.; Ng-Kwai-Hang, K.F. - 1988 - Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity, J. Dairy Sci., 71: 1720-1727.
- 8- Rogers, S.A.; Mitchell, G.E. - 1994 - The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk.6.Cheddar cheese and skim milk yoghurt, Aust. J. Dairy Technol., 49: 70-74.
- 9- Smith, K.L. - 1995 - Standars for somatic cells in milk: physiological and regulatory, IDF-FIL Mastitis Newsletter, 144/21: 7-9.
- 10- Williams, D.J.; Marschke, R.J.; Nottingham, S.M.; Kitchen, B.J. - 1991 - Effects of stage of lactation, number of lactations and dry period on N-acetyl-Beta-D-glucosaminidase levels and somatic cell count in bovine milk, Aust. J. Dairy Technol., 46: 43-45.
- 11- Heeschen, W.; Reichmuth, J. - 1995 - Mastitis:Influence on qualitative and hygienic properties of milk, S3, Book I, Proc. 3th. IDF Intern. Mastitis Seminar, Ed. by A. Saran and S. Soback, Tel-Aviv, Israel, 28 May-1 June, 1995.
- 12- de Rham, O.; Andrews, A. - 1982 - Qualitative and quantitative determination of proteolisis in mastitic milk, J. Dairy Res., 587-594.
- 13- Saeman, A.I.; Verdi, R.J.; Galton, D.M. - 1988 - Effects of mastitis on proteolytic activity in bovine milk, J. Dairy Sci., 71: 505-513.
- 14- Driessen, F.M.; van der Waals, C.B. - 1978 - Inactivation of native milk protease by heat treatment, Neth. Milk Dairy J., 23: 245-252.
- 15- de Koning, P.J.; Kaper, J.; Rollema, H.H. - 1985 - Age-thinning and gelation in unconcentrated and concentrated UHT-sterilized skim milk, Neth. Milk Dairy Dairy J., 30: 71-80.
- 16- Senyk, G.F.; Barbano, D.M.; Shipe, W.F. - 1985 - Proteolysis in milk associated with increased somatic cell counts, J. Dairy Sci., 68: 2189-2194.
- 17- Auldist, M.J.; Coats, S.; Sutherland, B.J.; Mayes, J.J.; McDowell, G.H. - 1996 - Effects of somatic cell count and stage of lactation in raw milk composition and the yield and quality of cheddar cheese, J. Dairy Res., 63: 269-280.

- 18- Verdi, R.J.; Barbano, D.M. - 1988 - Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases, *J. Dairy Sci.*, 71: 534-538.
- 19- Verdi, R.J.; Barbano, D.M.; Dellavalle, M.E.; Senyk, G.F. - 1987 - Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks, *J. Dairy Sci.*, 70: 230-242.
- 20- Kelly, A.; Sheeman, J.; Tiernan, D.; Shattock, A.; Paddy, J.; Foley, J. - 1995 - Bovine milk PMN content and its effects on cheese quality, Session 3, Book I, Proc. 3th. IDF Mastitis Seminar, Ed. by A. Saran and S. Soback, Tel-Aviv, Israel, 28 May-1 June, 1995.
- 21- Collin, J.C.; Kokelaar, A.; Rolet-Repecava, O.; Delacroix-Buchet, A. - 1991 - Determination of caseins in cow milk by electrophoresis and fast protein liquid chromatography (FPICR): Comparison of results, *Lait*, 71: 339-350.
- 22- King, J.O.L. - 1969 - The effects of the different bacterial infection causing mastitis on the yield and quality of cow's milk, *Br. Vet. J.*, 125: 57-62.
- 23- Zecconi, A. - 1996 - Somatic cells and their significance for milk processing technology, *IDF-FIL Mastitis Newsletter*, 96,21: 11-14.
- 24- Larson, B.L.; Jorgensen, G.N. - 1974 - Biosynthesis of the milk proteins, pp. 115-146, In: *Tome II, Lactation: A comprehensive treatise*, Ed. by B.L. Larson and V.R. Smith, Academic Press, Inc., NY, USA, 1974.
- 25- Jenness, R. - 1985 - Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrum, Chapter 5, pp. 164-197 In: *Lactation*, Ed. by B.L. Larson, The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- 26- Urech, E.; Puham, Z.; Shällibaum, M. - 1999 - Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis, *J. Dairy Sci.*, 82: 2402-2411.