

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Μελέτη του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου και των
ρεολογικών ιδιοτήτων στο γάλα δύο ελληνικών φυλών
προβάτου**

ΠΑΤΟΥΝΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Εξεταστική Επιτροπή:

**Μπιζέλης, Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής
Μασσούρας, Θ. Επίκουρος Καθηγητής
Κουτσούλη, Π. Λέκτορας**

Αθήνα, Μάιος 2013

*Για τους γονείς μου, χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει τίποτα, και για τον παππού μου
που έφυγε από κοντά μας'*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε μία από της πιο δύσκολες περιόδους που έχω περάσει. Η επιστημονική μου κατάρτιση εμπλουτίστηκε, αποκτώντας περισσότερες γνώσεις και γνωρίζοντας αξιόλογους ανθρώπους, καταξιωμένους στο χώρο, οι οποίοι ο καθένας με τον δικό του ξεχωριστό του τρόπο με βοήθησαν να φέρω εις πέρας την προσπάθειά μου. Θεωρώ λοιπόν χρέος μου να ευχαριστήσω τον καθένα τους, και πιο συγκεκριμένα τους:

- κ. Πολίτη Ιωάννη για την υπομονή που έδειξε, και την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά την διάρκεια συγγραφής της παρούσας εργασίας.
- κ. Κουτσούλη Παναγιώτα για την βοήθεια που μου πρόσφερε απλόχερα, την υπομονή και επιμονή που έδειξε και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την διόρθωση της παρούσας διατριβής.
- κ. Μπιζέλη Ιωσήφ για τις καίριες παρατηρήσεις του και τη πολύτιμη βοήθεια του κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.
- κ. Μασσούρα Θεόφιλο για τα εύστοχα σχόλια, βοήθεια και συμβουλές κατά την διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διατριβής

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του τμήματος Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιέργειών γιατί από την πρώτη μέρα με αγκάλιασαν και με έκανα να αισθάνομαι σαν να είμαι χρόνια μέλος της οικογένειάς τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Γαλακτοκομίας για την φιλοξενία του κατά τη διάρκεια του πειράματος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ευγενία Μπινιάρη για την βοήθεια που μου πρόσφερε στην ολοκλήρωση του πειράματος για την μελέτη μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Ευγενία Τσιμπούρη για την βοήθεια της αλλά και για τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε κατά τη συλλογή των δειγμάτων και την πραγμαματοποίηση των αναλύσεων του πειράματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη.	1
B	Abstract.	3
Γ	Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.	5
1	Σύστημα Πλασμίνης-Πλασμινογόνου.	5
2	Παράγοντες που επηρεάζουν το σύστημα Πλασμίνης-Πλασμινογόνου.	10
2.1	Στάδιο Γαλακτικής Περιόδου.	10
2.2	Υγιεινή Κατάσταση του Μαστού.	12
2.3	Φυλή.	13
Δ	Πειραματικό Μέρος.	14
1	Υλικά και Μέθοδοι.	14
2	Προσδιορισμός των Ενζυμικών Ενεργοτήτων του Συστήματος Πλασμίνης-Πλασμινογόνου.	15
3	Προσδιορισμός Ρεολογικών Παραμέτρων.	17
3.1	Αρχή της Μεθόδου.	19
3.2	Πειραματική Διαδικασία.	21
3.3	Ερμηνεία Αποτελεσμάτων.	21
4	Στατιστική Επεξεργασία.	23
5	Αποτελέσματα και Σχολιασμός.	24
5.1	Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ενζυμικές ιδιότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΓ/ΠΛ.	24
5.2	Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ρεολογικές παραμέτρους.	26
5.3	Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και στη χημική σύσταση του γάλακτος.	28

5.4	Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στις ενζυμικές ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΛ+ΠΓ, ΠΓ/ΠΛ.	29
5.5	Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στις ρεολογικές παραμέτρους.	30
5.6	Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και στη χημική σύσταση του γάλακτος.	31
5.7	Επίδραση της φυλής στις ενζυμικές ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΛ+ΠΓ, ΠΓ/ΠΛ.	32
5.8	Επίδραση της φυλής στις ρεολογικές παραμέτρους.	33
5.9	Επίδραση της φυλής στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και στη χημική σύσταση του γάλακτος.	34
5.10	Συσχέτιση μεταξύ ρεολογικών παραμέτρων και ενζυμικών ενεργοτήτων των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΛ+ΠΓ, ΠΓ/ΠΛ.	36
E	Συμπεράσματα.	38
Z	Βιβλιογραφία.	40

Μελέτη του συστήματος πλασμίνης- πλασμινογόνου και των ρεολογικών ιδιοτήτων στο γάλα δύο ελληνικών φυλών προβάτου

ΠΑΤΟΥΝΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

*Τμήμα Ζωικής Επιστήμης και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο
Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55,
email:gpatounas@hotmail.com*

Περίληψη

Ο σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου και των ρεολογικών ιδιοτήτων στο γάλα δύο Ελληνικών φυλών προβάτων. Χρησιμοποιήθηκαν 30 (τριάντα) πρόβατα από τις εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Από αυτά 15 (δεκαπέντε) ήταν της Καραγκούνικης φυλής και 15 (δεκαπέντε) της φυλής Χίου. Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν ανά 3 εβδομάδες. Στα δείγματα προσδιορίστηκαν οι ενζυμικές ενεργότητες της πλασμίνης και του πλασμινογόνου καθώς επίσης και οι ρεολογικές παράμετροι του γάλακτος (r -χρόνος πήξης, K_{20} -ρυθμός σκλήρυνσης του πήγματος, A_{30} -τελική συνεκτικότητα του πήγματος). Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν τα εξής:

Πρώτον, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου επηρεάζει σημαντικά τις ενζυμικές ενεργότητες της πλασμίνης και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Συγκεκριμένα τα επίπεδα της πλασμίνης και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ήταν χαμηλότερα μετά τον 5^ο μήνα της γαλακτικής περιόδου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των προηγούμενων μηνών. Περαιτέρω, διαπιστώθηκε ότι η γαλακτική περίοδος επηρέασε σημαντικά όλες τις ρεολογικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση του r (χρόνου πήξης) και του A_{30} (τελική συνεκτικότητα του πήγματος) στο τελικό στάδιο της γαλακτικής περιόδου (μετά τον 5^ο μήνα).

Δεύτερον, η υγιεινή κατάσταση του μαστού επηρέασε σημαντικά την ενζυμική ενεργότητα της πλασμίνης και του πλασμινογόνου. Συγκεκριμένα γάλα με σωματικά κύτταρα άνω των 300.000 είχε κατά 22% υψηλότερα επίπεδα πλασμίνης και κατά 10% χαμηλότερα πλασμινογόνου απ' ότι το γάλα με σωματικά κύτταρα κάτω των 300.000.

Τέλος, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση του K_{20} και του A_{30} ενώ, δεν προέκυψαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην ενεργότητα του συστήματος πλασμίνης-πλασμινογόνου και των ρεολογικών ιδιοτήτων.

Abstract

The purpose of the postgraduate project was the study of the plasmin-plasminogen system and the rheological properties of milk from two Greek breeds of sheep. In this study, 30 sheep from the Experimental Station of Agricultural University of Athens campus were used, 15 (fifteen) of which came from the Karagouniko breed and 15 (fifteen) from the Chios breed. Samples were collected at 3-week intervals. In these samples, the activities of plasmin and plasminogen as well as the rheological parameters of milk (r - clotting time, K_{20} curd firming time, A_{30} final curd consistency) are specified. The findings lead to the following conclusions:

Firstly, the lactation period greatly affects both plasmin activity and the plasminogen activator. More specifically, plasmin and plasminogen activator levels were lower after the 5th month of the lactation period compared to the corresponding rates of earlier months. Furthermore, the lactation period was found to have greatly affected all rheological parameters. More specifically, there was found to be a decrease in r (milk coagulation time, time in minutes from the addition of rennet to milk to the beginning of coagulation), K_{20} (curd firming time, time in minutes from the beginning of coagulation to the moment the width of the diagram is 20 mm) and A_{30} (firmness of the curd, width of the diagram in mm, 30 minutes after the addition of rennet) in the final stage of the lactation period (ie. after the 5th month).

Secondly, the hygienic condition of udders greatly affected the activities of plasmin and plasminogen. Specifically, milk containing over 300.000 body cells had 22% higher levels of plasmin and 10% less plasminogen than milk containing less than 300.000 body cells.

In conclusion, it was found a negative correlation between K_{20} and A_{30} , furthermore, no significant correlations between the activity of the

plasmin-plasminogen system and the rheological properties of milk emerged.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

Εισαγωγή

Στο γάλα περιέχονται πολλά ενδογενή ένζυμα με ποικίλες ενεργότητες. Μεταξύ αυτών είναι η πλασμίνη, ένα ένζυμο με πολύ μεγάλη τεχνολογική σημασία, καθώς συμβάλλει στην πρωτεόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος και των προϊόντων του. Το πλέον προτιμώμενο υπόστρωμα για την πλασμίνη στο γάλα είναι η β-καζεΐνη. Η διάσπαση τριών ευαίσθητων δεσμών οδηγεί στο σχηματισμό των γ1-, γ2-, γ3-καζεϊνών που παραμένουν στο καζεϊνικό κλάσμα και των πρωτεοζών-πεπτονών που μετακινούνται στον ορό. Ο έλεγχος της ενεργότητας της πλασμίνης έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας του γάλακτος, με αντίκτυπο στην ποιότητα των προϊόντων και τη μείωση του κόστους επεξεργασίας. Λόγω της μεγάλης σημασίας της πλασμίνης για το γάλα και τα προϊόντα του, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα οι παράγοντες που σχετίζονται με την ενεργότητα της ιδιαίτερα στο αγελαδινό και αίγαιο γάλα, ενώ τέτοιες έρευνες είναι ελάχιστες για το πρόβειο γάλα.

1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ-ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ

Το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου ή σύστημα πλασμίνης-πλασμινογόνου είναι ένα χρονικά ελεγχόμενο, πολλαπλών χρήσεων, ενζυμικό σύστημα. Η κύρια πρωτεΐνη του συστήματος είναι το πλασμινογόνο. Το πλασμινογόνο είναι ένα προένζυμο (ζυμογόνο) το οποίο δύναται να μετατραπεί στο ενεργό ένζυμο πλασμίνη, μέσω της δράσης των δύο ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (ΕΠ), τύπου ουροκινάσης (ΕΠ-Ο) και ιστικού τύπου (ΕΠ-Ι). Η πλασμίνη ανήκει σε μία ευρύτερη ομάδα ενζύμων που ονομάζονται πρωτεϊνάσες τύπου σερίνης. Το ανενεργό ζυμογόνο πλασμινογόνο μετατρέπεται σε ενεργό ένζυμο της πλασμίνης μέσω της διάσπασης του πρωτεϊνικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων αργινίνης560 και βαλίνης561 στον άνθρωπο (Robbins et al., 1967, Sottrup-Jensen et al., 1975) και του δεσμού αργινίνης557 και ισολευκίνης558 στα

βοοειδή (Schaller et al., 1985). Οι δύο ανωτέρω ΕΠ (ΕΠ-Ο και ΕΠ-Ι) είναι προϊόντα δύο διαφορετικών γονιδίων. Το γονίδιο του πλασμινογόνου στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 στη θέση 6q26 (NCBI Gene ID: 5340), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 9 (NCBI Gene ID:280897). Το γονίδιο αποτελείται και στους δύο οργανισμούς από 19 εξόνια και 17 ιντρόνια. Το μετάγραφο του γονιδίου στον άνθρωπο αποτελείται από 2759 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 2433 νουκλεοτίδια (Murray et al., 1978). Στα βοοειδή το μετάγραφο αποτελείται από 2770 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 2439 νουκλεοτίδια (Berglund et al., 1995).

Η πλασμίνη (ΠΛ) είναι μια πρωτεάση τύπου σερίνης, η οποία βρίσκεται στο γάλα μαζί με την ανενεργό της μορφή, το πλασμινογόνο (ΠΓ) (Politis et al.;1989, Politis, 1996). Η πλασμίνη και το πλασμινογόνο εισέρχονται στο γάλα, κυρίως από το αίμα, μέσω του τοιχώματος των γαλακτικών κυττάρων και συνδέονται με το κλάσμα της καζεΐνης του γάλακτος. Παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε pH 7,5-8,0 και σε θερμοκρασία 37°C αλλά είναι σταθερή και ενεργή σε σχετικά ευρεία περιοχή pH, όπως φαίνεται από την δραστηριότητα της σε διάφορα τυριά (Bastian and Brown, 1996).

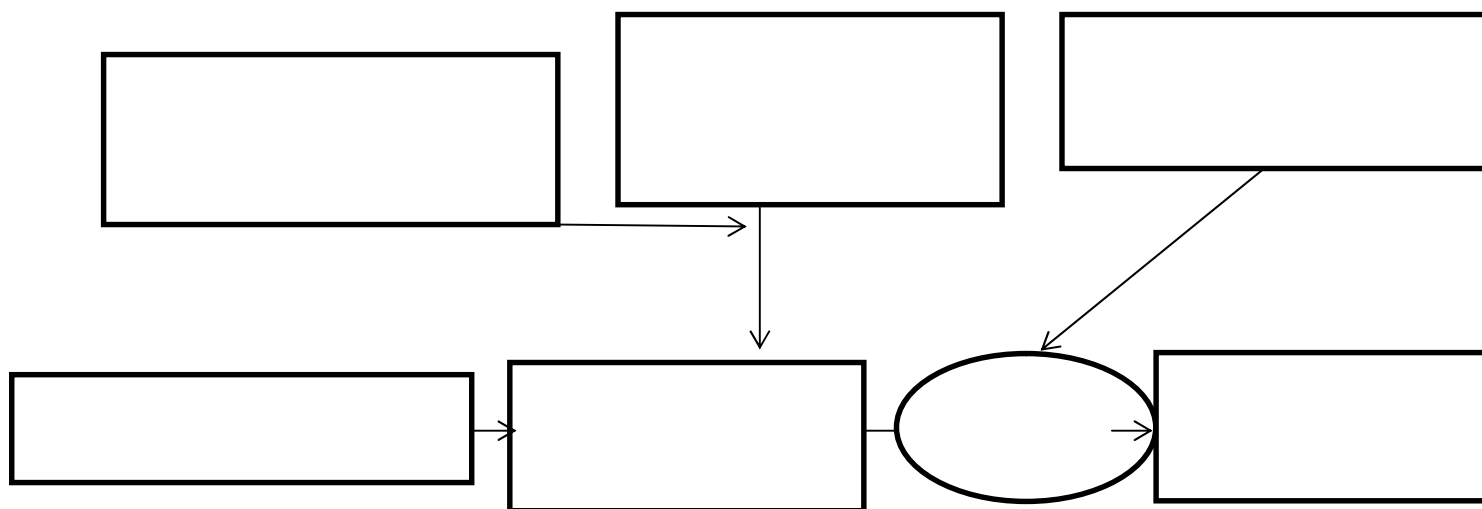
Το πλασμινογόνο απαντάται ως μια γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας και αποτελείται στον άνθρωπο από 791 αμινοξέα και κατά 2% από υδατάνθρακες ενώ στα βοοειδή αποτελείται από 786 αμινοξέα. Το μόριο του πλασμινογόνου αποτελείται από έξι δομικές περιοχές (Henkin et al., 1991, Ponting et al., 1992). Το αμινοτελικό άκρο του μορίου αποτελείται από 5 δομές τύπου kringle, με τις οποίες το πλασμινογόνο προσδένεται στο ινωδογόνο του πλάσματος, αλλά και σε διάφορα κύτταρα. Οι δομές τύπου kringle δίνουν την ικανότητα στο πλασμινογόνο να λαμβάνει διαφορετικές δομές στο χώρο. Το ενεργό κέντρο παρουσιάζει ομοιότητες με τα ενεργά κέντρα άλλων πρωτεϊνών τύπου σερίνης (Bachmann et al., 1994).

Είναι χαρακτηριστική η σταθερότητά της πλασμίνης στη θέρμανση, καθώς για την αδρανοποίηση της στο γάλα απαιτούνται πολύ έντονες συνθήκες θέρμανσης, π.χ. 73°C για 40 min (Walstra et al., 2006).

Η ενεργότητα της πλασμίνης στο γάλα ελέγχεται από ένα σύστημα ενεργοποιητών ενζύμων και αναστολέων όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Η μετατροπή του ΠΓ σε ΠΛ και επομένως και η υδρόλυση της καζεΐνης μπορεί να επιβραδυνθεί από τη δράση των αναστολέων των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (PAIs). Οι αναστολείς της πλασμίνης (PIs) και οι αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου βρίσκονται κυρίως στον ορό του γάλακτος και η ενεργότητά τους επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του pH και τη θερμική επεξεργασία. Οι αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και οι αναστολείς της πλασμίνης είναι γενικά πιο θερμικά ασταθείς από τα άλλα ένζυμα αυτού του συστήματος. Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (PAs), θεωρούνται ακόμη πιο σταθεροί στη θέρμανση σε σχέση με τη ΠΛ και το ΠΓ και επιβιώνουν της παστερίωσης, σε αντίθεση με τους αναστολείς τους (PAIs). Ως εκ τούτου, οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της ΠΛ στο γάλα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει είτε ευεργετική είτε επιζήμια πρωτεόλυση στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η πλασμίνη δεν υδρολύει τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος. Στη πραγματικότητα, οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος δρουν ανασταλτικά στην ενεργότητα της πλασμίνης. Η β-γαλακτογλοβουλίνη Α, η α-λακταλβουμίνη και η αλβουμίνη του ορού (BSA) σε συγκεντρώσεις των 0,2-1 mg/ml ανέστειλαν τη δραστηριότητα της πλασμίνης και του πλασμινογόνου κατά 18 και 54%, 1,9 και 20%, 25 και 63% αντίστοιχα, ενώ η β-γαλακτογλοβουλίνη Β δεν είχε καμία ανασταλτική δράση (Politis et al., 1993).

Τα επίπεδα της ΠΛ και του ΠΓ μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (αυξανόμενα προς το τέλος της), τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου (υψηλότερα σε μεγαλύτερης ηλικίας αγελάδες), και την υγιεινή κατάσταση του μαστού (Politis et al., 1989, Bastian et al., 1991c). Η αυξημένη ενεργότητα της πλασμίνης στο μαστιτικό γάλα και στο τέλος της γαλακτικής περιόδου έχει αποδοθεί στο αυξημένο επίπεδο των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Politis et al., 1989).



Εικόνα 1.1 Σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου (Richardson, 1983a)

Η μετατροπή του ΠΓ σε ΠΛ γίνεται με την μεσολάβηση δύο ειδών ενεργοποιητών (ΕΠ) ιστικού τύπου (ΕΠ-Ι) και τύπου ουροκινάσης (ΕΠ-Ο) (Bastian and Brown, 1996). Οι ΕΠ-Ι και ΕΠ-Ο είναι όπως και η πλασμίνη, πρωτεάσες της σερίνης και βρίσκονται στους ιστούς των μαστών των βοοειδών και στο γάλα. Ο ΕΠ-Ι εμφανίζεται στις καζεϊνικές μικέλλες ως ένα σύμπλοκο με τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1), ενώ ο (ΕΠ-Ο) βρίσκεται στα σωματικά κύτταρα, (Politis et al., 1991; Lu and Nielsen, 1993b; Heegaard et al., 1994a; White et al., 1995). Οι ΕΠ-Ι και ΕΠ-Ο ενεργοποιούν τη μετατροπή του PG σε PL διασπώντας το δεσμό Arg557-Ile558 στο PG όταν το γάλα βρίσκεται στον μαστό πριν από την άμελξη αλλά και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του γάλακτος. Η πλασμίνη αυτοκαταλύει και διασπά το δεσμό Lys77-Arg78 και παράγεται Arg-PG.

Η διάσπαση του ΠΓ από την ΠΛ στο δεσμό Lys-Arg προκαλεί την απελευθέρωση του προενεργού πεπτιδίου και αλλάζει τη διαμόρφωση του

πλασμινογόνου με αποτέλεσμα την εύκολη ενεργοποίησή του. (Driessen and Van Der Waals, 1978, Scharr, 1985, Alichanidis et al., 1986).

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου σχετίζονται με τα σωματικά κύτταρα (S.C.C.) και μάλιστα έχει αναφερθεί σύνδεση των ΕΠ-I με τις καζεϊνικές μικέλλες και των ΕΠ-O με τα σωματικά κύτταρα (Heegaard et al., 1994b, White et al., 1995). Η δραστηριότητα του ΕΠ-I ενισχύεται σημαντικά από το ινώδες (Karlan et al., 1987) και οι δραστηριότητες και των δύο ενεργοποιητών, ΕΠ-I και ΕΠ-O, αυξάνουν παρουσία των πρωτεϊνών του γάλακτος και ειδικά της α_{s1} -καζεΐνης. (Markus et al., 1993; Politis et al., 1995a). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αμυλορίδη αναστέλλει τη δραστηριότητα του ΕΠ-O, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην δραστηριότητα του ΕΠ-I (Heegaard et al., 1994b). Ο ΕΠ-O προκαλεί εντονότερη ενεργοποίηση και έχει μεγαλύτερη σταθερότητα στη θέρμανση σε σχέση με τον ΕΠ-I (Ismail et al., 2006; Prado et al., 2007).

Οι δεσμοί της λυσίνης και σε μικρότερο βαθμό, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις συμμετέχουν στη δέσμευση των ΠΛ και ΠΓ, στις καζεϊνικές μικέλλες (Baer et al., 1994). Παρόμοιος φαίνεται ότι είναι και ο μηχανισμός πρόσδεσης του ΕΠ-O στις καζεϊνικές μικέλλες (Politis et al., 1995a). Η θερμοκρασία αποθήκευσης του γάλακτος, το pH, η ιοντική ισχύς, η υδρόλυση της καζεΐνης από την ΠΛ και η δράση των μικροβιακών πρωτεασών σχετίζονται με την αποδέσμευση της ΠΛ από τις καζεϊνικές μικέλλες. Ιδιαίτερα, το pH επηρεάζει σαφώς την αποσύνδεση της ΠΛ από τις καζεϊνικές μικέλλες του φρέσκου γάλακτος, σε pH 4,6-4,7 (Richardson and Elston, 1984; Grufferty and Fox, 1988b). Αυτή η επίδραση του pH εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, τα υψηλότερα επίπεδα της ΠΛ στον όξινο ορό του γάλακτος (44μg/g πρωτεΐνης) σε σχέση με το μη όξινο (4μg/g πρωτεΐνης). Η μεταφορά της ενεργότητας της ΠΛ από την καζεΐνη στο κλάσμα ορού του γάλακτος, με διάφορους μηχανισμούς, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα των προϊόντων που περιέχουν πρωτεΐνη ορού γάλακτος ως λειτουργικό συστατικό.

Η ενεργότητα της ΠΛ ή των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου μπορεί να ανασταλεί από τους αναστολείς της πλασμίνης (PIs) ή από τους αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (PAIs), αντίστοιχα (Precetti et al., 1997). Σε αντίθεση με την ΠΛ, ΠΓ και των ενεργοποιητών

του πλασμινογόνου τα οποία είναι συνδεδεμένα με τις καζεϊνικές μικέλλες, οι αναστολείς βρίσκονται στο κλάσμα του ορού του γάλακτος (Reimerdes et al., 1976). Δύο αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου έχουν απομονωθεί από αγελαδινό γάλα (Precetti et al., 1997). Ο αναστολέας_1 και η α_2 αντιπλασμίνη είναι πρωτεΐνες ευαίσθητες στη θερμική επεξεργασία.

Στο φρέσκο γάλα, το ΠΓ είναι η κυρίαρχη μορφή, όπου η συγκέντρωσή του είναι 2-20 φορές (Bastian and Brown, 1996; Richardson and Pearce, 1981) ή 2-30 φορές μεγαλύτερη από αυτή της ΠΛ (0,8-2,8 μg/mL ΠΓ και 0,1-0,7 μg/mL ΠΛ), (Ozen et al., 2003). Ως εκ τούτου, οποιαδήποτε πιθανή ενεργοποίηση του ΠΓ θα μπορούσε να συμβάλλει σημαντικά στην ενεργότητα της ΠΛ στο γάλα και τα προϊόντα του.

2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ-ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ

Από τους διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν το σύστημα πλασμίνης- πλασμινογόνου έχουν περισσότερο μελετηθεί οι παράγοντες που σχετίζονται με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, την υγιεινή κατάσταση του μαστού και τη φυλή.

2.1 Στάδιο γαλακτικής περιόδου

Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα στην πλειοψηφία τους αφορούν το αγελαδινό γάλα

Ο Politis και οι συνεργάτες (1989), παρείχαν στοιχεία που δείχνουν ότι η αυξημένη μετατροπή του ΠΓ σε ΠΛ συσχετίζεται με την σταδιακή

υποστροφή του μαστού (φθίνουσα φάση γαλουχίας). Η πλασμίνη μπορεί να είναι ένας δείκτης για την σταδιακή υποστροφή. Το γάλα που λαμβάνεται κατά την διάρκεια των πρώτων 5 -6 μηνών της γαλακτικής περιόδου περιέχει χαμηλές ποσότητες των ΠΛ και ΠΓ, και αύξηση της πλασμίνης και του πλασμινογόνου στα τέλη της γαλακτικής περιόδου. Ωστόσο η αναλογία ΠΓ:ΠΛ, ένας δείκτης που είναι ανεξάρτητος από τις μεταβολές στην ποσότητα του γάλακτος, μειώνεται κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και δείχνει αυξημένη μετατροπή της ΠΓ σε ΠΛ κατά το τέλος της γαλακτικής περιόδου.

Ο Theodorou και οι συνεργάτες του (2007) μελέτησαν την επίδραση της γαλακτικής περιόδου στο σύστημα πλασμίνης-πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα. Από την μελέτη αυτή προέκυψαν τα εξής.

Κατά την αρχή (1ος και 2ος μήνας μετά τον τοκετό), και το μέσον της γαλακτικής περιόδου (3ος και 4ος μήνας), δεν βρέθηκαν διαφορές στις ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ και ΕΠ, στην αναλογία ΠΓ:ΠΛ και στο άθροισμα ΠΛ+ΠΓ.

Κατά το τέλος της γαλακτικής περιόδου (5ος και 6ος μήνας) το γάλα παρουσίασε χαμηλότερη ενεργότητα ΠΓ και ΕΠ σε σχέση με την αρχή και το μέσον της γαλακτικής περιόδου. Επιπλέον, η αναλογία ΠΓ:ΠΛ ήταν χαμηλότερη στο τέλος σε σχέση με την αρχή και το μέσον της γαλακτικής περιόδου. Η αλλαγή στην αναλογία ΠΓ:ΠΛ δείχνει επιτάχυνση της μετατροπής του ΠΓ σε ΠΛ προς το τέλος της γαλακτικής περιόδου. Το άθροισμα των ΠΓ+ΠΛ ήταν μικρότερο στο γάλα, προς το τέλος σε σύγκριση με το γάλα στην αρχή της γαλακτικής περιόδου.

Ο Gilmore και οι συνεργάτες του (1995) διαπίστωσαν ότι το γάλα στο τέλος της γαλακτικής περιόδου περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ενεργοποιητή πλασμινογόνου (ΕΠ) απ' ό,τι το γάλα στην αρχή της γαλακτικής περιόδου. Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου επηρεάζει επίσης και το σύστημα πλασμίνης-πλασμινογόνου (ΠΛ-ΠΓ), αλλά τα αποτελέσματα είναι αμφίβολα και όχι τόσο σαφή.

Ο Albenzio και οι συνεργάτες του (2004-2005) αναφέρουν ότι παρατήρησαν υψηλότερες δραστηριότητες του ΠΛ και ΠΓ στις αρχές της

γαλακτικής περιόδου σε δείγμα γάλακτος από προβατίνες της φυλής Comisana.

Εν αντιθέσει ο Bianchi και οι συνεργάτες (2004) υποστηρίζουν ότι το τέλος της γαλακτικής περιόδου συσχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ΠΛ και ΕΠ στο γάλα, σε δείγμα γάλακτος από πρόβατα της Σαρδηνίας.

2.2 Υγιεινή κατάσταση του μαστού

Οι μελέτες που έχουν γίνει ως τώρα μας δείχνουν την τάση αύξησης των ενεργοτήτων της πλασμίνης, πλασμινογόνου και ενεργοποιητή πλασμινογόνου στο γάλα ζώων με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων.

Ο Theodorou και οι συνεργάτες του (2007) μελέτησαν επίσης την επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στο σύστημα πλασμίνης-πλασμινογόνου. Από την μελέτη αυτή αναφέρουν, ότι στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (>300.000 κύτταρα/mL) υπήρξε η μεγαλύτερη ενεργότητα ΠΛ, ΠΓ και ΕΠ σε σύγκριση με το γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (<300.000 κύτταρα/mL). Η αναλογία ΠΓ:ΠΛ ήταν μικρότερη, και το άθροισμα του ΠΓ+ΠΛ ήταν μεγαλύτερο στο δείγμα γάλακτος με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα γάλακτος με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων.

Ο Leitner και οι συνεργάτες του (2004) αναφέρουν ότι το σύστημα ΠΛ-ΠΓ σε πρόβειο γάλα επηρεάζεται από την κατάσταση της υγείας του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, η δραστηριότητα των ΠΛ και ΕΠ ήταν μεγαλύτερη κατά 74 και 139% αντίστοιχα σε μολυσμένους και μη μολυσμένους μαστικούς αδένες.

Ο Bianchi και οι συνεργάτες του (2004) αναφέρουν ότι τα αυξημένα σωματικά κύτταρα (S.C.C.) συσχετίστηκαν με αυξημένη ενεργότητα της ΠΛ (18%) και μείωση της δραστηριότητας του ΕΠ (23%), ενώ η δραστηριότητα του ΠΓ δεν παρουσίασε αλλαγές με την μεταβολή των σωματικών κυττάρων.

Ο Albenzio και οι συνεργάτες (2004) αναφέρουν ότι παρατήρησαν αυξημένη δραστηριότητα της ΠΛ για δείγματα γάλακτος με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων ($>1.000.000/\text{mL}$) σε σύγκριση με αυτές, με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων ($<500.000/\text{mL}$) καθ' όλη τη γαλακτική περίοδο. Επιπλέον, υπήρξε μία αύξηση της δραστηριότητας του ΠΓ, σε δείγματα γάλακτος με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων εν συγκρίσει με αυτά με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων και αυτό παρατηρήθηκε στα δείγματα από τα μέσα της γαλακτικής περιόδου (110^η έως 130^η ημέρα της γαλακτικής περιόδου).

2.3 Φυλή

Υπάρχουν σχετικά λίγες εργασίες που έχουν μελετήσει τον τρόπο που η φυλή επηρεάζει τα επίπεδα ενεργότητας των ΠΓ, ΠΛ και ΕΠ.

Ο Theodorou και οι συνεργάτες του (2007) μελέτησαν 3 Ελληνικές φυλές (Ορεινό Ηπείρου, Χίου, και βελτιωμένο Ορεινό Ηπείρου) ως προς την ενεργότητα της ΠΛ και του ΕΠ σε αυτές. Βρήκαν ότι το ΠΓ είχε χαμηλότερη ενεργότητα στο Ορεινό Ηπείρου σε σχέση με τις άλλες δύο φυλές, ενώ και ο λόγος ΠΓ/ΠΛ, βρέθηκε χαμηλότερος. Επίσης, βρέθηκε ότι το ΠΛ+ΠΓ ήταν σημαντικά χαμηλότερο στο Ορεινό Ηπείρου σε σχέση με το Χιώτικο.

Ο Albenzio και οι συνεργάτες του (2011) μελέτησαν τη φυλή Comisana, και βρήκαν ότι η ΠΛ είναι χαμηλότερη στο γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (S.C.C.)

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 30 προβατίνες, 15 από την Καραγκούνικη φυλή και 15 από τη φυλή Χίου. Τα ζώα στεγάζονται στους χώρους του Κτηνοτροφείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μετά τον απογαλακτισμό (45 ημέρες μετά τον τοκετό), οι προβατίνες αρμέγονται δύο φορές την ημέρα στις 06:00 το πρωί και στις 15:00 το απόγευμα με αμελκτική μηχανή. Από κάθε προβατίνα ελήφθησαν ατομικά δείγματα γάλακτος σε φιαλίδια τα οποία στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε 2 μέρη. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις της χημικής σύστασης του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη, ολικά στερεά, στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους) και την εκτίμηση των ρεολογικών παραμέτρων (τ , K_{20} και A_{30}) ενώ το δεύτερο μέρος καταψύχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C για να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας των παραμέτρων του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου του γάλακτος (πλασμίνη, πλασμινογόνο και ενεργοποιητής του πλασμινογόνου).

Τα δείγματα γάλακτος αναλύθηκαν για λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη με την υπέρυθρη μέθοδο χρησιμοποιώντας συσκευή Milkoscan 133 (Foss Electric, Hillerød, Δανία) βαθμονομημένη με βάση τη μέθοδο μέτρησης λίπους Mojonnier, τη μέθοδο Kjeldahl για την πρωτεΐνη, καθώς και την πολωσιμετρική μέθοδο για τη λακτόζη σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους (Association of Official Analytical Chemists, 1980). Ο αριθμός σωματικών κυττάρων προσδιορίστηκε με τη συσκευή Fossomatic (Foss Electric, Hillerød, Δανία). Για τον προσδιορισμό των ρεολογικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Formagraph (Foss Electric, Hillerød, Δανία).

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ **ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ** **ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ - ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ**

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της πλασμίνης (ΠΛ), του πλασμινογόνου (ΠΓ) και των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (ΕΠ) έγινε με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Politis et al. (1989), Politis and Ng Kwai Hang (1989) και White et al. (1995) με μικρές τροποποιήσεις στους όγκους και τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων ουσιών.

Ο προσδιορισμός των επιμέρους ενζυμικών ενεργοτήτων έγινε σε εκχυλίσματα των δειγμάτων γάλακτος, τα οποία προετοιμάστηκαν ως εξής : 1050 μl γάλακτος αναμίχθηκαν με 350 μl 0,4 M ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) κιτρικό τρινάτριο και μετά από φυγοκέντρηση 27000 x g για 20 min, το υπερκείμενο καταψύχθηκε στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ έως την πραγματοποίηση των προσδιορισμών.

Ο προσδιορισμός των ενζυμικών ενεργοτήτων βασίστηκε στην υδρόλυση του χρωμογόνου υποστρώματος D-Val-Leu-Lys-p-nitrotrinitilide (V7127 Sigma Aldrich Co.), η οποία είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση p-νιτροανιλίνης και τη μεταβολή της απορρόφησης του δείγματος των αντιδρώντων στα 405 nm (A405).

Για κάθε ένα από τα τρία ένζυμα, ακολουθήθηκε διαφορετικός σχεδιασμός των δοκιμών:

(Α) Η ενεργότητα της ΠΛ προσδιορίστηκε στα εκχυλίσματα του γάλακτος, χωρίς άλλη προσθήκη: 12 μl εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 168 μl mM Tris buffer (pH 7,4) που περιέχει 100 mM NaCl και 0.6 mM του χρωμογόνου υποστρώματος D-Val-Leu-Lys-p-nitrotrinitilide (V7127 Sigma

Aldrich Co.), και προστέθηκαν 20 μl H₂O και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 405 nm κατά τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C. Ως μία μονάδα (U)PL ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που προκαλεί αλλαγή στην απορρόφηση στα 405 nm κατά 0,1 σε 60 min.

(B) Η ενεργότητα του ΠΓ προσδιορίστηκε στα εκχυλίσματα του γάλακτος αφού προστέθηκε εξωγενώς ενεργοποιητής (ουροκινάση) για την μετατροπή του ΠΓ σε ενεργή ΠΛ : 12 μl εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 168 μl 50 mM Tris buffer (pH 7,4) που περιείχε 100 mM NaCl και 0.6 mM του χρωμογόνου υποστρώματος και προστέθηκαν 20 μl ουροκινάση 150 Plough Units (U0633 Sigma Aldrich Co) με 20 μl H₂O . Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 405 nm. Το αποτέλεσμα αυτής της δοκιμής ήταν η μέτρηση ενεργότητας που οφείλεται στο πλασμινογόνο και την πλασμίνη (ΠΓ+ΠΛ). Η ενεργότητα του ΠΓ προσδιορίστηκε ως η διαφορά μεταξύ (B) και (A) .

(B) Η ενεργότητα των ΕΠ προσδιορίστηκε στα εκχυλίσματα του γάλακτος αφού προστέθηκε ΠΓ. Ο προσδιορισμός βασίστηκε στη μετατροπή του εξωγενούς προστιθέμενου ΠΓ και ΠΛ από τους ενδογενείς ενεργοποιητές : 12 μl εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 168 μl 50 mM Tris buffer (pH 7,4) που περιείχε 100 mM NaCl και 0.6 mM του χρωμογόνου υποστρώματος και προστέθηκαν 20 μl πλασμινογόνο (P9156, Sigma Aldrich Co.) και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 405 nm. Η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν σε φασματοφωτόμετρο U-3010 Hitachi, το οποίο βρισκόταν στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για τους υπολογισμούς ελήφθη υπόψη το γραμμικό τμήμα της καμπύλης απορρόφηση/χρόνος. Οι ενεργότητες εκφράστηκαν ως U/ml γάλακτος. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε μικρόπλακες 96 θέσεων (βοθρίων)

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΕΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Η ικανότητα πήξης του γάλακτος είναι από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την παρασκευή τυριού. Γενικά, για την παρατήρηση των φάσεων της πήξης του γάλακτος μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα όργανα, τα οποία παράγουν ένα ίχνος, η ερμηνεία του οποίου μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τρεις παραμέτρους: το χρόνο πήξης « t », το ρυθμό σκλήρυνσης « K_{20} », και την τελική συνεκτικότητα του πήγματος « A_{30} », (Zannoni, M., Annibaldi, S., 1981).

Τα γάλατα ομαδοποιήθηκαν σε 8 τύπους σύμφωνα με την ικανότητα πήξης τους. Κάθε τύπος χαρακτηρίστηκε από τον χρόνο πήξης t , το ρυθμό σκλήρυνσης του πήγματος K_{20} εκφρασμένο σε χρόνο (λεπτά) από το αρχικό στάδιο της πήξης μέχρι το άνοιγμα του ίχνους να φτάσει τα 20mm, την συνεκτικότητα του πήγματος A_{30} μετρημένη σαν το άνοιγμα που καταγράφεται 30 λεπτά μετά την προσθήκη της πυτιάς (Zannoni, and Annibaldi, 1981).

Το 1980 η δανέζικη εταιρεία Foss Electric προτείνει ένα καινούριο όργανο για την παρακολούθηση της πήκτικης ικανότητας του γάλακτος, το Formagraph.

Το όργανο αυτό αποτελείται από μία συσκευή προετοιμασίας των δειγμάτων στην οποία το γάλα θερμαίνεται στους 35°C ώστε να προστεθεί στη συνέχεια η πυτιά, από μία συσκευή μέτρησης στην οποία χαλύβδινα εκκρεμή μετράνε την μεταβολή στην συνεκτικότητα των πηγμάτων και από ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό όπου γίνεται η καταγραφή των σημάτων και η επεξεργασία τους (Zannoni, and Annibaldi, 1981).

Το Formagraph έχει την δυνατότητα να αναλύει ταυτόχρονα μέχρι και 10 δείγματα, δίχως να χρειάζεται συνεχή παρακολούθηση, προσδιορίζοντας το t (χρόνος πήξης του γάλακτος σε min), το K_{20} (χρόνος σε min που απαιτείται για να σκληρύνει το πήγμα μέχρι το εύρος της διακλάδωσης του βραχίονα 20mm) και το A_{30} (η τελική ευρύτητα της διακλάδωσης του βραχίονα σε mm, σε 30min από τη στιγμή προσθήκης

της πυτιάς, ισοδυναμεί με την τελική συνεκτικότητα του πήγματος (McMahon and Brown 1982). Το K_{20} είναι ουσιαστικά ο ρυθμός σκλήρυνσης του τυροπήγματος και προσδιορίζει το χρόνο στον οποίο έχει επιτευχθεί συνεκτικότητα κατάλληλη για τη διαίρεση του (McMahon and Brown, 1982, Okigbo et al., (1985)).

Ο χρόνος πήξης (r) εξαρτάται από τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και μάλιστα αυξάνεται κατά τη διάρκεια της. Εξαρτάται επίσης από την τιτλοδοτούμενη οξύτητα και τον αριθμό σωματικών κυττάρων. Αύξηση της τιτλοδοτούμενης οξύτητας μειώνει το r . Αύξηση των σωματικών κυττάρων έχει σαν συνέπεια την επιμήκυνση του χρόνου πήξης (Zannoni and Annibaldi, 1981). Ακόμα είναι αντιστρόφως ανάλογος από τη συγκέντρωση της πυτιάς (McMahon and Brown, 1982).

Το K_{20} εξαρτάται από την τιτλοδοτούμενη οξύτητα και τον χρόνο πήξης (r), ενώ δεν εξαρτάται από τη διάρκεια γαλακτικής περιόδου και τον αριθμό σωματικών κυττάρων. Αύξηση της τιτλοδοτούμενης οξύτητας μειώνει τις τιμές του K_{20} (Zannoni and Annibaldi, 1981).

Το r συσχετίζεται περισσότερο με μετρήσεις pH, ενώ το K_{20} με μετρήσεις της τιτλοδοτούμενης οξύτητας (Zannoni and Annibaldi, 1981).

Για να πάρουμε μετρήσεις που να είναι κοντά στο βέλτιστο πρέπει το γάλα να προέρχεται από ζώα τα οποία δε βρίσκονται σε πολύ προχωρημένο στάδιο της γαλακτικής περιόδου, να μην έχει μεγάλο αριθμό σωματικών κυττάρων και αν είναι δυνατόν να προσδιορίζεται η οξύτητα του (Zannoni and Annibaldi, 1981).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως για τον προσδιορισμό των ρεολογικών ιδιοτήτων χρησιμοποιήθηκε το Formagraph το οποίο αποτελείται από: τη συσκευή μέτρησης, τη συσκευή προθέρμανσης, δύο αλουμιένιες πλάκες στις οποίες εισάγουμε το γάλα, δύο πλαστικές πλάκες για τον καθαρισμό του οργάνου και ειδικά ατσάλινα κουταλάκια για την προσθήκη πυτιάς, επίσης χρησιμοποιήθηκαν: διάλυμα υγρής πυτιάς αποτελούμενη από χυμοσίνη της εταιρίας TEXEL, σιφόνια των 10 ml, μικροπιπέτες χωρητικότητας έως 1000μl, διάλυμα KOH κανονικότητας

1,4N για τον καθαρισμό του οργάνου και διάλυμα αιθανόλης 70% για τον καθαρισμό του οργάνου.

3.1 Αρχή της μεθόδου

Το γάλα θερμαίνεται στους 35°C στους ειδικούς υποδοχείς μιας μεταλλικής πλάκας. Αφού προστεθεί η πυτιά, καταγράφονται οι κινήσεις της πλάκας και τα σήματα ερμηνεύονται από ειδικό λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή για την μέτρηση των ρεολογικών παραμέτρων.

Ο μηχανισμός της πήξης του γάλακτος με πυτιά, η οποία αποτελεί ένζυμο που λαμβάνεται από το στομάχι των θηλαστικών, έχει ως εξής: Η καζεΐνη δεν είναι ομοιογενής ουσία και αποτελείται από διάφορα κλάσματα, από τα οποία τα $\alpha s1$ -, $\alpha s2$ -, β - και κ - είναι τα πιο σημαντικά. Τα τρία πρώτα κλάσματα είναι ευαίσθητα σε ιόντα ασβεστίου σε αντίθεση με την κ -καζεΐνη που είναι ανθεκτική. Η τελευταία ενεργεί ως προστατευτικό κολλοειδές και προφυλάσσει από καταβύθιση τα ευαίσθητα στο ασβέστιο κλάσματα. Υπό την επίδραση της πυτιάς η κ - καζεΐνη διασπάται σε δύο μέρη, την παρά- κ -καζεΐνη που είναι αδιάλυτη και σε ένα γλυκομακροπεπτίδιο που είναι διαλυτό και έτσι χάνει την προστατευτική της δράση έναντι των άλλων κλασμάτων.

ρεννίνη

κ - καζεΐνη \rightarrow παρα- κ - καζεΐνη + γλυκομακροπεπτίδιο

Ca ++

Παρα- κ - καζεΐνη \rightarrow Παρά- κ - καζεϊνικό διασβέστιο

Σήμερα γίνεται δεκτό ότι η πήξη του γάλακτος γίνεται σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη, που καλείται ενζυματική, η ρεννίνη δρα επιλεκτικά πάνω στο μόριο της κ - καζεΐνης στη θέση 106 και υδρολύει το

δεσμό φαινυλανανίνη-μεθειονίνη, οπότε παράγεται παρά-κ- καζεΐνη (αδιάλυτη) και ένα γλυκομακροπεπτίδιο (διαλυτό). Η υδρόλυση έχει υψηλή αρχική ταχύτητα και τελειώνει σε λίγα λεπτά ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Κατά τη δεύτερη, τη μη ενζυματική, επέρχεται η κροκίδωση των μικελλών παρουσία ιόντων ασβεστίου. Εάν η θερμοκρασία είναι χαμηλή, κάτω των 20°C, η πήξη του γάλακτος γίνεται με βραδύτατο ρυθμό.

Υλικά

- I) Σιφόνια των 10 mL
- II) Σιφόνιο των 2 mL (παρασκευή πυτιάς)
- III) Ογκομετρική φιάλη των 100 mL (παρασκευή πυτιάς)
- IV) Κωνική φιάλη (παρασκευή ΚΟΗ)
- V) Μικροπιπέτα του 1 mL + tips

Αντιδραστήρια

- I) ΚΟΗ 1,4 N, καθαρότητας 85%
- II) Αιθυλική αλκοόλη 95%

3.2 Πειραματική διαδικασία

Από κάθε δείγμα γάλακτος εισάγεται ποσότητα 10 mL στις ειδικές υποδοχές της πλάκας. Η μεταλλική πλάκα θερμαίνεται στους 35°C και έπειτα τοποθετείται η πυτιά σε ποσότητα 200 μ L σε κάθε υποδοχή που περιέχει το δείγμα. Η πυτιά που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε υγρή μορφή με δύναμη 1:15.000 και παρασκευάστηκε με αραίωση με νερό με περιεκτικότητα του διαλύματος σε πυτιά 1,6% v/v.

Ειδικά ατσάλινα εκκρεμή εισχωρούν στα δείγματα και η πλάκα κινείται οριζόντια με μια παλινδρομική κίνηση από δεξιά προς τα αριστερά, συνολικής έκτασης 1,4 mm και συχνότητας 15 sec.

Όταν αρχίζει η πήξη του γάλακτος η κίνηση της πλάκας μεταδίδεται στα εκκρεμή και τα σήματα επεξεργάζονται από το λογισμικό. Η όλη διαδικασία διαρκεί 30 min.

Τέλος, αφού επεξεργαστούν όλα τα δείγματα ακολουθεί ο καθαρισμός των πλακών. Αφαιρούνται τα πήγματα από τους υποδοχείς της πλάκας και καθαρίζονται με σαπουνόνερο. Έπειτα οι υποδοχείς πληρώνονται με διάλυμα KOH 1,4 N, που παρασκευάζεται, και διατηρείται σ' αυτούς για 5 min. Ακολουθεί η προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης στους υποδοχείς και διατήρηση της για 10 min. Τα διαλύματα αυτά προστίθενται για τον πλήρη καθαρισμό των υποδοχέων. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν για την επόμενη χρήση τους.

3.3 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

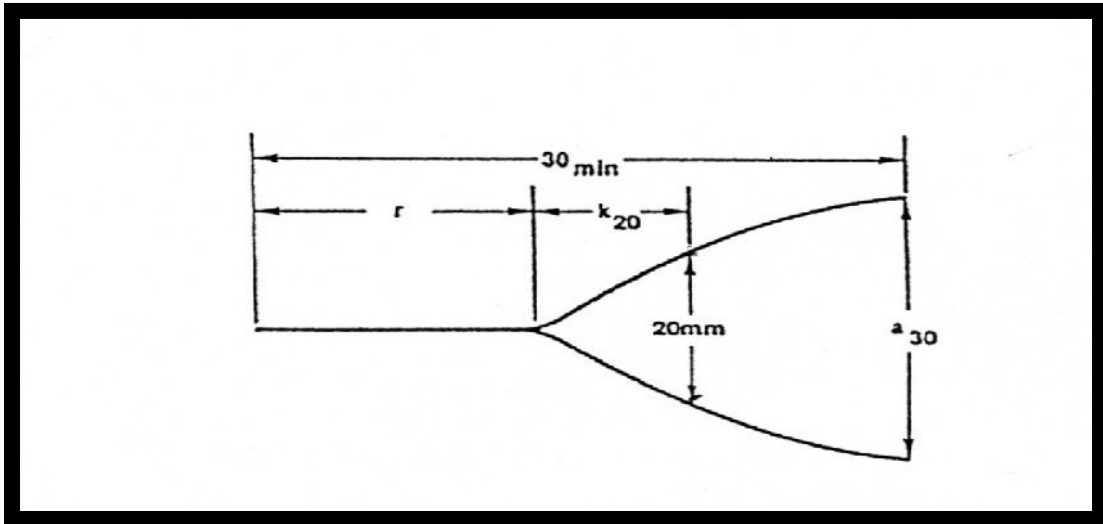
Το σήμα που λαμβάνει το όργανο από τη διαδικασία, μεταφράζεται από το πρόγραμμα ως μια ευθεία γραμμή που σε κάποιο σημείο σχηματίζει μια διακλάδωση όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2.

Τρεις είναι οι ρεολογικές παράμετροι της πήξης του γάλακτος με πυτιά που υπολογίζονται:

α) Ο χρόνος που μεσολαβεί από την προσθήκη της πυτιάς μέχρι την έναρξη σχηματισμού του πήγματος ή η περίοδος της ενζυματικής φάσης, r (min).

β) Ο χρόνος που απαιτείται για την σκλήρυνση του πήγματος, όταν το εύρος της διακλάδωσης του βραχίονα γίνεται 20 mm, k_{20} (min).

γ) Το τελικό εύρος A_{30} (mm) της διακλάδωσης του βραχίονα, από τη στιγμή της προσθήκης της πυτιάς μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας μετά από 30 min, σημείο το οποίο δείχνει την τελική συνεκτικότητα του πήγματος.



Εικόνα 1.2. Έκφραση αποτελέσματος με το FormaWin32 στο Formagraph που απεικονίζει τις τρεις ρεολογικές παραμέτρους.

4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για τη στατιστική ανάλυση των υπό μελέτη μεταβλητών κατ' αρχήν έγινε έλεγχος καλής προσαρμογής των δεδομένων στην κανονική κατανομή καθώς και έλεγχος της ομοιογένειας των διακυμάνσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω ελέγχου τα δεδομένα απέκλιναν από την κανονική κατανομή σε ορισμένες μεταβλητές λόγω της παρουσίας ακραίων τιμών. Μετά την αφαίρεση των τιμών αυτών τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν προς ανάλυση με βάση ένα μικτό γραμμικό πρότυπο για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ανά ζώο με βαθμό αυτοσυσχέτισης 1^{ου} βαθμού για τα κατάλοιπα. Στο πρότυπο ως σταθεροί παράγοντες θεωρήθηκαν η φυλή (με 2 επίπεδα, 1=Καραγκούνικη και 2=Χίου), το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (με 3 επίπεδα, 1=αρχή: από 45 έως 100 ημέρες από τον απογαλακτισμό, 2= μέσον: από 101 έως 145 ημέρες μετά τον απογαλακτισμό και 3=τέλος: από τις 146 ημέρες και μετά έως τέλος της γαλακτικής περιόδου 165 ημέρες.) και ο αριθμός των σωματικών κυττάρων (με 2 επίπεδα, 1= αριθμός σωματικών κυττάρων / ml γάλακτος <από 300.000 και 2= > από 300.000). Η επίδραση του ζώου εντός της φυλής θεωρήθηκε ως τυχαία επίδραση. Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson υπολογίστηκε στα ζεύγη των παραμέτρων που μελετήθηκαν. Για τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 13.0.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ενζυμικές ενεργότητες της Πλασμίνης, Πλασμινογόνου, λόγου Πλασμινογόνου Πλασμίνης και του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου.

Η επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ενζυμικές ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΠΓ/ΠΛ και ΕΠ παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η γαλακτική περίοδος χωρίστηκε σε 3 στάδια όπου 1=αρχή: από 45 έως 100 ημέρες από τον απογαλακτισμό, 2= μέσον: από 101 έως 145 ημέρες μετά τον απογαλακτισμό και 3=τέλος: από τις 146 ημέρες και μετά έως τέλος της γαλακτικής περιόδου 165 ημέρες. Στην πλασμίνη κατά το πρώτο και δεύτερο στάδιο της γαλακτικής περιόδου έχουμε μία μικρή αύξηση, αλλά κατά το τρίτο στάδιο παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωσή της σε επίπεδο $p < 0,001$. Στο πλασμινογόνο δεν έχουμε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα τρία στάδια της γαλακτικής περιόδου. Στον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου παρατηρείται μείωση ανάμεσα στα τρία στάδια με στατιστικά σημαντική αυτή κατά το τρίτο στάδιο της γαλακτικής περιόδου σε σχέση με τα δύο πρώτα με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,001$. Στο άθροισμα ΠΛ+ΠΓ παρατηρείται μείωση με στατιστικά σημαντική την μείωση στο τρίτο στάδιο της γαλακτικής περιόδου με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$ και τέλος στον λόγο ΠΓ/ΠΛ παρατηρείται μικρή αύξηση ανάμεσα στο πρώτο και δεύτερο στάδιο και έπειτα στατιστικά σημαντική μείωση στο τρίτο στάδιο της γαλακτικής περιόδου με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,01$.

Πίνακας 1. Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ενζυμικές ενεργότητες της πλασμίνης (ΠΛ), του πλασμινογόνου (ΠΓ), του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (ΕΠ), στο λόγο ΠΓ/ΠΛ και στο άθροισμα ΠΛ+ΠΓ.

Στάδιο γαλακτικής περιόδου				
Ενζυμικές Ενεργότητες	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	Σημαντικότητα
(ΠΛ) U/ml	8,27±0,42 ^a	8,47±0,37 ^a	7,41±0,34 ^b	***
(ΠΓ) U/ml	7,02±0,43	6,89±0,38	6,21±0,37	NS
(ΕΠ) U/ml	13,42±0,79 ^a	13,31±0,71 ^a	11,68±0,69 ^b	***
(ΠΛ) + (ΠΓ) U/ml	14,92±0,76 ^a	14,88±0,66 ^a	13,56±0,65 ^b	*
(ΠΓ) / (ΠΛ) U/ml	0,99±0,03 ^a	1,00±0,03 ^a	0,92±0,02 ^b	**

Όπου α, β διαφορετικοί εκθέτες στη σειρά που δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***.

Στην ενζυμική ενεργότητα της πλασμίνης από τον πίνακα 1 βλέπουμε ότι βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, αναλυτικότερα παρατηρείται μείωση των τιμών στο τελευταίο διάστημα της γαλακτικής περιόδου μετά τις 145 ημέρες από τον απογαλακτισμό. Οι τιμές της ενζυμικής ενεργότητας του πλασμινογόνου δεν διέφεραν στατιστικά, παρατηρούμε όμως ότι μειώνονταν από την αρχή προς το τέλος της γαλακτικής περιόδου. Στην ενζυμική ενεργότητα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωσή του στο τελευταίο διάστημα της γαλακτικής περιόδου μετά τις 145 ημέρες από τον απογαλακτισμό. Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στο άθροισμα PL+PG όπως και στον λόγο PG/PL στο τελευταίο στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Εμείς βρήκαμε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά που βρήκαν οι Politis et al. (1995), οι Gilmore et al. (1995) και οι Bianchi et al. (2004) αλλά έρχονται σε συμφωνία με αυτά που βρήκαν οι Theodorou et al. (2007) και οι Albenzio et al. (2004), όπου και αυτοί

βρήκαν χαμηλότερες ενζυμικές ενεργότητες κατά το τέλος της γαλακτικής περιόδου.

5.2 Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ρεολογικές παραμέτρους

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι τιμές των ρεολογικών παραμέτρων στη διάρκεια των σταδίων της γαλακτικής περιόδου. Παρατηρούμε ότι ο χρόνος πήξης (τ) του γάλακτος μειώνεται ως το τρίτο στάδιο της γαλακτικής περιόδου με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 3^{ου} και 1^{ου}, 2^{ου} σταδίου της γαλακτικής περιόδου με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$, ενώ ο ρυθμός σκλήρυνσης του πήγματος (K_{20}) αυξάνεται κατά το 2^ο στάδιο της γαλακτικής περιόδου και έπειτα ακολουθεί πτωτική πορεία, στο δεύτερο στάδιο παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα άλλα δύο στάδια, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,001$ και τέλος η τελική συνεκτικότητα του πήγματος (A_{30}) είναι υψηλότερη κατά το 1^ο στάδιο της γαλακτικής περιόδου και μετά ακολουθεί μία πτώση κατά το 2^ο και 3^ο στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ 1^{ου} και 2^{ου}, 3^{ου} σταδίου γαλακτικής περιόδου με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,001$.

Πίνακας 2. Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στις ρεολογικές παραμέτρους r , K_{20} και A_{30} .

ΣΤΑΔΙΟ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ				
Παράμετροι	1^ο	2^ο	3^ο	Σημαντικότητα -α
r	13,28±0,7 7 ^α	11,51±0,61 ^{αβ}	10,97±0,52 ^β	*
K₂₀	2,35±0,28 α	3,58±0,24 ^β	3,01±0,23 ^{αβ}	***
A₃₀	44,9±1,91 α	33,48±1,63 ^β	34,06±1,48 ^β	***
Όπου ^{α, β} διαφορετικοί εκθέτες στη σειρά που δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$.				

Σημαντικές ήταν οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στις ρεολογικές παραμέτρους. Η τιμή του r του χρόνου πήξης μειώθηκε και η μείωση αυτή από την αρχή σε σχέση με το τέλος της γαλακτικής περιόδου ήταν σημαντική. Η παράμετρος K_{20} η οποία εκφράζει το ρυθμό σκλήρυνσης του πήγματος αυξήθηκε σημαντικά κατά το μέσον της γαλακτικής περιόδου. Η παράμετρος A_{30} η οποία αντιπροσωπεύει την τελική συνεκτικότητα του πήγματος μειώθηκε κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και μάλιστα αυτή η μείωση κατά το μέσον της γαλακτικής περιόδου ήταν σημαντική σε σχέση με την αρχή της γαλακτικής περιόδου.

Παρατηρείται ότι έχουμε σταδιακά μείωση των τιμών των ρεολογικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου με στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η τελική συνεκτικότητα έχει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές στην αρχή της γαλακτικής περιόδου. Στο δεύτερο και τρίτο στάδιο οι τιμές της συνεκτικότητας μειώνονται χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου της γαλακτικής περιόδου.

5.3 Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται πως επηρεάζεται η ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και η χημική σύσταση του γάλακτος κατά τα στάδια της γαλακτικής περιόδου. Στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή υπάρχει μείωση η οποία ήταν αναμενόμενη. Στο λίπος, λακτόζη και ολικά στερεά παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 1^{ης} και 3^{ης} γαλακτικής περιόδου, ενώ στην πρωτεΐνη και στο στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) δεν παρουσιάζεται καμμία στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τη γαλακτική περίοδο.

Πίνακας 3. Επίδραση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Στάδιο γαλακτικής περιόδου				
Χημική Σύσταση	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	Σημαντικότητα
Ημερήσια γαλακτοπαραγωγή	1881,90 +120,14 ^a	1674,36 +114,88 ^b	1257,96 +112,12 ^γ	***
Λίπος	5,20±0,20 ^a	4,77±0,19 ^b	4,84±0,18 ^b	**
Πρωτεΐνη	5,11±0,07	5,01±0,07	5,07±0,07	NS
Λακτόζη	5,39±0,06 ^a	5,49±0,05 ^b	5,36±0,05 ^a	**
Ολικά στερεά	16,49±0,23 ^a	16,1±0,22 ^b	16,09±0,21 ^b	*
Σ.Υ.Α.Λ	11,29±0,08	11,31±0,08	11,23±0,07	NS

Όπου ^{a, β, γ} διαφορετικοί εκθέτες στη σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***.

5.4 Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στις ενζυμικές ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΛ+ΠΓ και ΠΓ/ΠΛ

Η επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού, όπως αυτή εκφράζεται από τη συγκέντρωση των σωματικών κυττάρων στο γάλα, στην ενεργότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, όπως επίσης και στο λόγο PG/PL, καθώς και στο άθροισμα των ενεργοτήτων PL+PG παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν σε 2 ομάδες: σε μία με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (>300.000 κύτταρα/ml) και σε μία ομάδα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (<300.000 κύτταρα/ml). Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,001$) στην πλασμίνη, καθώς έχουμε αύξηση της στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (>3000.000). Στο πλασμινογόνο αντίθετα παρατηρείται πτώση στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (>300.000) η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p<0,05$). Στον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου παρατηρείται αύξηση, στατιστικά σημαντική ($p<0,001$) στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (>300.000) σε σχέση με το γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (<300.000). Στο άθροισμα ΠΛ+ΠΓ δεν έχουμε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ στον λόγο ΠΓ/ΠΛ έχουμε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$).

Πίνακας 4. Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στις ενζυμικές ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΛ+ΠΓ, ΠΓ/ΠΛ.

Υγιεινή κατάσταση του μαστού			
Ενζυμικές Ενεργότητες	<300.000	>300.000	Σημαντικότητα
ΠΛ U/ml	7,18 \pm 0,31	8,92 \pm 0,46	***
ΠΓ U/ml	7,11 \pm 0,31	6,30 \pm 0,44	*
ΕΠ U/ml	10,72 \pm 0,63	14,89 \pm 0,83	***
ΠΛ+ΠΓ U/ml	14,08 \pm 0,55	14,84 \pm 0,77	NS
ΠΓ/ΠΛ U/ml	1,02 \pm 0,02	0,92 \pm 0,04	*

Όπου ^{αβ} διαφορετικοί εκθέτες στη σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p<0,05$ *, $p<0,01$ ** , $p<0,001$ ***.

Το γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερες τιμές στις ενεργότητας πλασμίνης και ενεργοποιητή πλασμινογόνου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του γάλακτος με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων. Επιπλέον οι ενεργότητες του πλασμινογόνου αλλά και του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνη ήταν στατιστικά χαμηλότερες στο γάλα με υψηλά σωματικά κύτταρα σε σύγκριση με τις ενεργότητες στο γάλα με χαμηλά σωματικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τους Albenzio et al. (2005) και σε μερική συμφωνία με τους Theodorou et al. (2007), αφού βρήκε αύξηση στην ενζυμική ενεργότητα των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ σε γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων. Σε πλήρη αντίθεση έρχονται με τους Leitner et al. (2004) όπου βρήκε αυξημένη δραστηριότητα της ενζυμικής ενεργότητας των ΠΛ και ΕΠ σε γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων σε σύγκριση με γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων. Σύμφωνα με το παραπάνω αποτέλεσμα η αύξηση της ενεργότητας της πλασμίνης στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του γάλακτος με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται στους δύο παρακάτω μηχανισμούς. Πρώτον, στην αυξημένη εισροή πρωτεϊνών του αίματος (πλασμίνη) στο γάλα των προβατίνων από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων, που τεκμαίρεται από το υψηλότερο άθροισμα της πλασμίνης, και δεύτερον, τον αυξημένο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, λόγω του χαμηλότερου λόγου ΠΓ/ΠΛ που παρατηρείται στην ομάδα αυτή.

5.5 Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στις ρεολογικές ιδιότητες του γάλακτος

Κατά την παρούσα έρευνα δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στις ρεολογικές ιδιότητες του γάλακτος με χαμηλά σωματικά κύτταρα (<300.000 κύτταρα/ml) εν συγκρίσει με το γάλα με

υψηλά σωματικά κύτταρα (>300.000 κύτταρα/ml) , όπως βλέπουμε στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στις ρεολογικές ιδιότητες του γάλακτος.

Υγιεινή κατάσταση του μαστού			
Ρεολογικές ιδιότητες	<300.000	>300.000	Σημαντικότητα
r	<i>11,92\pm0,39</i>	<i>11,92\pm0,78</i>	<i>NS</i>
K₂₀	<i>3,14\pm0,17</i>	<i>2,82\pm0,28</i>	<i>NS</i>
A₃₀	<i>36,48\pm1,27</i>	<i>38,48\pm2,13</i>	<i>NS</i>

5.6 Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος

Ακόμη δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στη χημική σύσταση του γάλακτος με χαμηλά σωματικά κύτταρα (<300.000 κύτταρα/ml) εν συγκρίσει με το γάλα με υψηλά σωματικά κύτταρα (>300.000 κύτταρα/ml), η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι στην τιμή της λακτόζης, η οποία είναι χαμηλότερη στο γάλα με υψηλά σωματικά κύτταρα σε σύγκριση με το γάλα με χαμηλά σωματικά κύτταρα όπως βλέπουμε στον Πίνακα 6 .

Πίνακας 6. Επίδραση της υγιεινής κατάστασης του μαστού στη χημική σύσταση του γάλακτος.

Υγιεινή κατάσταση του μαστού			
Χημική Σύσταση	<300.000	>300.000	Σημαντικότητα
Ημερήσια γαλακτο- παραγωγή	<i>1637,04 +104,28</i>	<i>1572,44 +125,42</i>	<i>NS</i>
Λίπος	<i>4,84+0,17</i>	<i>5,04+0,22</i>	<i>NS</i>
Πρωτεΐνη	<i>5,02+0,06</i>	<i>5,11+0,08</i>	<i>NS</i>
Λακτόζη	<i>5,48+0,05</i>	<i>5,34+0,06</i>	<i>*</i>
Ολικά στερεά	<i>16,17+0,20</i>	<i>16,28+0,25</i>	<i>NS</i>
Σ.Υ.Α.Λ	<i>11,30+0,06</i>	<i>11,26+0,09</i>	<i>NS</i>

5.7 Επίδραση της Φυλής στις ενζυμικές ενεργότητες των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ, ΠΛ+ΠΓ, ΠΓ/ΠΛ.

Η επίδραση της φυλής στην ενεργότητα της πλασμίνης, πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, όπως επίσης και στο λόγο πλασμινογόνο/πλασμίνη, καθώς και στο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου παρουσιάζεται στον Πίνακα 7. Παρατηρείται ότι δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο φυλών όσον αφορά τις ενζυμικές ενεργότητες του συστήματος πλασμίνης-πλασμινογόνου σε σχέση με τις ενζυμικές ενεργότητες τις οποίες εξετάζουμε. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά που βρήκαν οι Theodorou et al. (2007) και οι Albenzio et al. (2004), οι οποίοι βρήκαν σημαντικές διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα των ΠΛ, ΠΓ, ΕΠ.

Πίνακας 6. Επίδραση της φυλής στις ενζυμικές ενεργότητες των πλασμίνης, πλασμινογόνου, ενεργοποιητή πλασμινογόνου, πλασμίνη+πλασμινογόνο και πλασμινογόνο/πλασμίνη.

Φυλή			
Ενζυμικές Ενεργότητες	Καραγκούνικη	Χίου	Σημαντικότητα
ΠΑ U/ml	<i>7,75\pm0,43</i>	<i>8,35\pm0,46</i>	<i>NS</i>
ΠΓ U/ml	<i>6,72\pm0,43</i>	<i>6,69\pm0,46</i>	<i>NS</i>
ΕΠ U/ml	<i>12,63\pm0,89</i>	<i>13,58\pm0,93</i>	<i>NS</i>
ΠΑ+ΠΓ U/ml	<i>14,20\pm0,76</i>	<i>14,71\pm0,81</i>	<i>NS</i>
ΠΓ/ΠΑ U/ml	<i>1,00\pm0,02</i>	<i>0,94\pm0,03</i>	<i>NS</i>

5.8 Επίδραση της Φυλής στις ρεολογικές ιδιότητες του γάλακτος.

Η επίδραση της φυλής στις ρεολογικές ιδιότητες παρουσιάζεται στον Πίνακα 7. Στο t παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στο χρόνο πήξης του γάλακτος με υψηλότερο αυτόν της Καραγκούνικης φυλής σε σχέση με της φυλής Χίου, στο K_{20} παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στον ρυθμό σκλήρυνσης του πήγματος στη φυλή Χίου ενώ στο A_{30} παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$) στην τελική συνεκτικότητα του πηγματος με υψηλότερη αυτή της Καραγκούνικης φυλής.

Πίνακας 7. Επίδραση της φυλής στις ρεολογικές ιδιότητες του γάλακτος.

Φυλή			
Ρεολογικές ιδιότητες	Καραγκούνικη	Χίου	Σημαντικότητα
r	<i>12,63_{±0,46}</i>	<i>11,21_{±0,61}</i>	*
K₂₀	<i>2,60_{±0,23}</i>	<i>3,36_{±0,26}</i>	*
A₃₀	<i>42,08_{±1,70}</i>	<i>32,89_{±1,92}</i>	**
Όπου ^{α, β} διαφορετικοί εκθέτες στη σειρά που δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.			

5.9 Επίδραση της Φυλής στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή και στη χημική σύσταση του γάλακτος

Η επίδραση της φυλής στη συγκέντρωση των κύριων συστατικών του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη, ολικά στερεά, ΣΥΑΛ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Η ημερήσια γαλακτοπαραγωγή ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη στις προβατίνες της Καραγκούνικης φυλής σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των προβατίνων της φυλής Χίου. Επιπλέον παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερες τιμές στην πρωτεΐνη και στο στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) στο γάλα των προβατίνων της φυλής Χίου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στο γάλα των προβατίνων της Καραγκούνικης φυλής.

Πίνακας 8. Επίδραση της φυλής στη γαλακτοπαραγωγή και στη σύσταση του γάλακτος.

Φυλή			
	Καραγκούνικη	Χίου	Σημαντικότητα
Ημερήσια γαλακτοπαραγωγή	<i>1329,91 ±145,80</i>	<i>1879,57 ±150,83</i>	<i>*</i>
Λίπος	<i>5,13±0,23</i>	<i>4,74±0,24</i>	<i>NS</i>
Πρωτεΐνη	<i>5,29±0,08</i>	<i>4,83±0,08</i>	<i>***</i>
Λακτόζη	<i>5,36±0,06</i>	<i>5,46±0,07</i>	<i>NS</i>
Ολικά στερεά	<i>16,62±0,28</i>	<i>15,83±0,29</i>	<i>NS</i>
Σ.Υ.Α.Λ	<i>11,44±0,09</i>	<i>11,11±0,10</i>	<i>*</i>
Όπου στατιστικώς σημαντικές διαφορές εμφανίζονται σε επίπεδο $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$.			

5.10 Συσχέτιση μεταξύ των ρεολογικών παραμέτρων και ενζυμικών ενεργοτήτων των πλασμίνη, πλασμινογόνου, ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, λόγου πλασμινογόνου – πλασμίνης και άθροισματος πλασμίνης - πλασμινογόνου

Πίνακας 8. Συσχέτιση ενεργοτήτων των ενζύμων πλασμίνης, πλασμινογόνου και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνη και άθροισμα πλασμινογόνου πλασμίνης με τις πηκτικές ιδιότητες r, A₃₀, K₂₀.

		r	K ₂₀	A ₃₀	ΠΛ	ΕΠ	ΠΓ	ΠΓ/ΠΛ	ΠΓ+ΠΛ
r	r _p	1	0,051 NS	0,102 NS	0,098 NS	0,069 NS	-0,123 NS	-0,135 NS	-0,011 NS
	N		93	97	87	87	87	83	87
K₂₀	r _p	1	-0,630 (**)	0,241 (*)	0,170 NS	0,239 (*)	-0,040 NS	0,262 (*)	
	N		97	87	87	87	83	87	
A₃₀	r _p			1	0,026 NS	-0,086 NS	0,053 NS	0,153 NS	0,044 NS
	N				92	92	92	88	92
ΠΛ	r _p				1	0,517 (**)	0,638 (**)	0,015 NS	0,902 (**)
	N					92	92	88	92
ΕΠ	r _p					1	0,302 (**)	0,247 (*)	0,452 (**)
	N						92	88	92
ΠΓ	r _p						1	0,505 (**)	0,907 (**)
	N							88	92
ΠΓ/ΠΛ	r _p							1	0,288 (**)
	N								88
ΠΓ+ΠΛ	r _p								1
	N								92

r_p: Συντελεστής συσχέτισης (Pearson Correlation), *p<0.05, **: p<0 0.01, NS: μη σημαντική συσχέτιση, N: αριθμός παρατηρήσεων

Από τον Πίνακα 8 παρατηρούμε πως ο χρόνος πήξης (r) δεν συσχετίζεται με καμία μεταβλητή. Ο ρυθμός σκλήρυνσης (K_{20}) συσχετίζεται αρνητικά με την τελική συνεκτικότητα του πήγματος (A_{30}), (-0,630**) , και θετικά με την πλασμίνη (ΠΛ), (0,241*) , με το πλασμινογόνο (ΠΓ), (0,239*), και με το άθροισμα ΠΛ+ΠΓ (0,262*). Η πλασμίνη (ΠΛ) συσχετίζεται με τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (ΕΠ), (0,517**), με το πλασμινογόνο (ΠΓ), (0,683***) και με το άθροισμα ΠΛ+ΠΓ (0,902**). Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (ΕΠ) σχετίζεται θετικά με το πλασμινογόνο (ΠΓ), (0,302**), με τον λόγο ΠΓ/ΠΛ (0,247**) και με το άθροισμα ΠΓ+ΠΛ (0,452***).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε

Συμπεράσματα

- Με την παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εκτίμησης των ενζυμικών ενεργοτήτων της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου σε δύο καθαρόαιμες ελληνικές φυλές προβάτων καθώς και των ρεολογικών παραμέτρων που σχετίζονται με την πηκτικότητα του γάλακτος στη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου.
- Οι ενζυμικές ενεργότητες της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου δεν διαφοροποιήθηκαν στις δύο φυλές που μελετήθηκαν.
- Κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου η ενζυμική ενεργότητα της πλασμίνης διαφοροποιήθηκε κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτικής περιόδου και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή της. Η ενεργότητα του πλασμινογόνου δεν μεταβλήθηκε σημαντικά αν και παρουσιάστηκε τάση μείωσης της.
- Οι ενζυμικές ενεργότητες στο σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου διαφοροποιήθηκαν σημαντικά σε σχέση με την υγιεινή κατάσταση του μαστού. Συγκεκριμένα η ενζυμική ενεργότητα της πλασμίνης αυξήθηκε σημαντικά στο γάλα με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων, ενώ η ενζυμική ενεργότητα του πλασμινογόνου μειώθηκε.
- Οι δύο φυλές διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ως προς τις ρεολογικές παραμέτρους. Οι τιμές του χρόνου πήξης t και της παράμετρου A_{30} που καθορίζει την τελική συνεκτικότητα του πηγματος ήταν σημαντικά μικρότερες στη φυλή Χίου σε σχέση με την Καραγκούνικη. Οι τιμές του K_{20} που εκφράζει το ρυθμό σκλήρυνσης του πηγματος ήταν μεγαλύτερες στη φυλή Χίου.

- Σημαντικές μεταβολές των ρεολογικών παραμέτρων παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Η τιμή του χρόνου πήξης t μειώθηκε από την αρχή έως το τέλος της γαλακτικής περιόδου και η μείωση αυτή ήταν σημαντική. Η παράμετρος K_{20} η οποία εκφράζει το ρυθμό σκλήρυνσης του πήγματος αυξήθηκε σημαντικά κατά το μέσον της γαλακτικής περιόδου. Η παράμετρος A_{30} η οποία αντιπροσωπεύει την τελική συνεκτικότητα του πήγματος μειώθηκε κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και μάλιστα αυτή η μείωση κατά το μέσον της γαλακτικής περιόδου ήταν σημαντική σε σχέση με την αρχή της γαλακτικής περιόδου.
- Οι τιμές των ρεολογικών παραμέτρων δεν διαφοροποιήθηκαν σε σχέση με την υγιεινή κατάσταση του μαστού.
- Σημαντικές συσχετίσεις προέκυψαν με την παράμετρο K_{20} η οποία βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με την παράμετρο A_{30} ($r_{\text{pearson}} = -0,630$, $p < 0,005$) και θετικά αλλά με σχετικά μικρούς συντελεστές συσχέτισης με τις ενζυμικές ενεργότητες της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ζ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alichanidis, E., Wrathall, J. H. M., and Andrews, A. T. (1986). *Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen*. Journal of Dairy Research, 53, 259-265.
- Albenzio, M., Caroprese, M., Santillo, A., Marino, R., Taibi, L., and Sevi, A. (2004). *Effects of Somatic Cell Count and Stage of Lactation on the Plasmin. Activity and Cheese-Making Properties of Ewe Milk*. Journal of Dairy Science, 87, 533-542.
- Albenzio, M., Caroprese, M., Santillo, A., Marino, R., Muscio, A., Sevi, A. (2005). *Proteolytic patterns and plasmin activity in ewes' as affected by somatic cell count and stage of lactations*. Journal of Dairy Research, 72, 86-92.
- Albenzio, M., Santillo, A., Coroprese, M., Schena, L., Russo, D. E., Sevi, A. (2011). *Compositions, indigenous Proteolytic enzymes and coagulating behavior of ewe milk as affected by somatic cell count*. Journal of Dairy Research, 78, 385-391.
- Bachmann, F., (1994). *Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin*. In: Bloom, A.L., Forbes, C.D., Thomas, D.P., Tuddenham, E.G.D. (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone Edinburgh, pp. 575-613.
- Bastian, E. D., and Brown, R. J., (1996) *Plasmin in milk and dairy products: An update* International Dairy Journal, 6, 435-457.
- Bastian, E. D., Brown, R. J., and Ernstorn, C. A., (1991). *Plasmin activity and milk coagulation*. Journal of Dairy Science, 74, 3677-3685.
- Baer, A., Ryba, I., and Collin, J. C. (1994). *Binding of bovine Plasminogen to immobilized casein and its activation thereon*. International Dairy Journal, 4, 597-616.

- Berglund, L., Andersen, M.D., Petersen, T.E., (1995). *Cloning and characterization of the bovine plasminogen cDNA*. Int. Dairy J. 5, 593-603
- Bianchi, L., Bolla, A., Budelli, E., Caroli, A., Casoli, C., Pauselli, M., Duranti, E. (2004). *Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk*. Journal of Dairy Science, 87, 2401-2408.
- Driessen, F. M., and Van Der Waals, C. B., (1978). *Inactivation of native milk proteinase by heat treatment*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 32, 245-254.
- Gilmore, J. A., White, J. H., Zavizion, B., Politis, I. (1995). *Effects of stage of lactation and somatic cell count on plasminogen activator activity in bovine milk*. Journal of Dairy Research, 62, 141-145.
- Grufferty, M. B., and Fox, P. F. (1988b). *Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles*. N.Z. Journal of Dairy Science and Technology, 23, 153-163.
- Heegaard, C. W., Christensen, T., Rasmussen, M. D., Benfeldt, C., Jensen, N. J., Sejrsen, K., Petersen, T. E., and Andreasen, P. A. (1994b). *Plasminogen activators in bovine milk during mastitis, an inflammatory disease*. Fibrinolysis 8:22-30.
- Henkin, J., Marcotte, P., Yang, H.C., (1991). *The plasminogen-plasmin system*. Prog. Cardiovasc. Dis. 34, 135-164.
- Ismail, B., Choi, L. H., Were, L., and Nielsen, S. S., (2006). *Activity and nature of plasminogen activators associated with the casein micelle*. Journal of Dairy Science, 89, 3285-3288.
- Karlan, G., Clark, A. S., and Littlefield, B. A. (1987). *A highly sensitive chromogenic microtiter plate assay for plasminogen activators which quantitatively discriminates between the urokinase and tissue-type activators*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 142, 147-154.
- Leitner, G., Chaffer, M., Shamay, A., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Saran, A., Silanikove, N. (2004). *Changes in milk composition as*

- affected by subclinical mastitis in sheep.* Journal of Dairy Science, 87, 46-52.
- Lu, D. D., and Nielsen, S. S., (1993a). *Heat inactivation of native Plasminogen activators in bovine milk.* Journal of Food Science, 58, 1010-1012, 1016.
- Markus, G., Hitt, S., Harvey, S. R., and Tritsch, G. L., (1993). *Casein a powerful enhancer of the rate of plasminogen activation.* Fibrinolysis, 7, 2994-3001.
- McMahon, D.J., Brown, R.J., (1982). *Evaluation of Formagraph for Comparing Rennet Solutions,* Journal of Dairy Science, 65, 1639-1642.
- Murray, J.C., Buetow, K.H., Donovan, M., Hornung, S., Motulsky, A.G., Disteche, C., Dyer, K., Swisshelm, K., Anderson, J., Giblet, E., Sadler, E., Eddy, R., Shows, T.B., (1987). *Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27.* Am. J. Hum. Genet. 40, 338-350.
- Okigbo, L.M., Richardson, G.H., Brown R.J., Ernstrom, C.A., (1985). *Variation in Coagulation of Milk from Individual Cows,* Journal of Dairy Science, 68, 822-828.
- Politis, I., and Ng Kwai Hang, K. F. (1989). *Environmental Factors Affecting Plasmin Activity in Milk.* Journal of Dairy Science, 72, 1713-1718.
- Politis, I., White, J. H., Zavizion, B., Goldberg, J. J., Guo, M. R. and Kindstedt, P. (1995). *Effect of individual caseins on plasminogen activation by bovine urokinase-type and tissue-type Plasminogen activators.* Journal of Dairy Science, 78, 484-490.
- Politis, I., Zhao, S., McBride, B. W., Burton, J. H., and Turner, J. D. (1991) *Plasminogen activator production by bovine milk macrophages and blood monocytes.* American Journal of Veterinary Research, 52, 1208-1213.
- Politis, I., Zavizion, B., Barbano, D. M., and Gorewit, R. C. (1993). *Enzymatic assay for the combined determination of plasmin plus*

- plasminogen in milk: Revisited*. Journal of Dairy Science 76, 1260-1267.
- Politis, I. (1996). *Plasminogen activator system: Implications for mammary cell growth and involution*. Journal of Dairy Science, 79, 1097-1107.
- Ponting, C.P., Holland, S.K., Cederholm-Williams, S.A., Marshall, J.M., Brown, A.J., Spraggon, G., Blake, C.C., (1992). *The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution*. Biochim. Biophys. Acta 1159, 155-161.
- Prado, B. M., Ramos, O., Ismail, B., and Hayes, K. D. (2007). *Effect of thermal treatment of plasminogen activators in milk and in buffer system*. International Dairy Journal, 17, 1028-1033.
- Precetti, A. S., Oria, M. P., and Nielsen, S. S. (1997). *Presence in bovine milk of two protease inhibitors of the plasmin system*. Journal of Dairy Science, 80, 1490-1496.
- Reimerdes, E., Klostermeyer, H., and Sayk, E. (1976). *Milk proteinases*. Milchwissenschaft, 31, 329-334.
- Richardson, B. C., and Pearce, K. N. (1981). *The determination of PL in dairy products*. N.Z. Journal of Dairy Science and Technology, 16, 209-220.
- Richardson, B. C., and Elston, P. D. (1984). *Plasmin activity in commercial caseins and caseinates*. N.Z. Journal of Dairy Science and Technology, 19:63-67.
- Richardson, B. C., (1983). *The proteinases in bovine milk and the effect of pasteurization on their activity*. N.Z. Journal of Dairy Science and Technology, 18, 223-245.
- Scharr, J. (1985). *Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks*. Journal of Dairy Research, 52, 369-378.
- SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), version 13, SPSS Inc., Chicago, IL.
- Theodorou, G., Komninakis, A., Rogdakis, E., Politis, I.(2007) . *Factors affecting the plasmin-plasminogen system in milk obtained from three*

Greek dairy sheep breeds with major differences in milk production capacity. Journal of Dairy Science 92:4, 1330-1337.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., and Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2nd edn Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group, pp. 225-272, 421-445.

White, J. H., Zavizion, B., O'Hare, K., Gilmore, J., Guo, M. R., Kindstedt, P., and Politis, I.(1995). *Distribution of plasminogen activators in different fractions of bovine milk.* Journal of Dairy Research, 62, 115-122.

Zannoni, M., Annibaldi, S., (1981). *Standardization of the renneting ability of milk by Formagraph-I,* Scienza e Tecnica Latterio-Casearia, 32, 79-94.