

Plazmin: indogena proteinaza mlijeka

Samir Kalit, Jasmina Lukač Havranek, Vlatka Čubrić Ćurik

Revijalni prikaz – Review

UDK: 637.336

Sažetak

U radu su opisane važnije osobine plazmina kao značajne indogene proteinaze mlijeka, njegova koncentracija, način mjerenja koncentracije i njegove aktivnosti u mlijeku. Također su navedeni čimbenici koji utječu na njegovu koncentraciju i aktivnost. Od svih čimbenika na povećanu plazminsku aktivnost u mlijeku najviše utječu kasna laktacija i mastitis, odnosno povećan broj somatskih stanica (BSS). U mlijeku s visokim BSS povećava se indogena proteoliza, osobito u sistemu plazmin i plazminogen.

Objašnjeno je specifično hidrolitičko djelovanje plazmina tijekom primarne proteolize pojedinih kazeniških frakcija u mlijeku. Plazmin najintenzivnije razgrađuje β -CN, a puno manje α_{s1} -CN i α_{s2} -CN, a gotovo uopće ne razgrađuje κ -CN.

Aktivacija plazminogena u plazmin složen je biokemijski proces uvjetovan odnosom aktivatora i inhibitora u mlijeku, a može se značajno povećati u mlijeku s visokim BSS. U mliječnom serumu nalazimo veći broj inhibitora plazmina od kojih je β -laktoglobulin najvažniji nakon njegove toplinske denaturacije. Inhibitorno na aktivnost plazmina djeluje dodavanje aprotinina i sojinog tripsin inhibitora u mlijeko.

Od svih karakteristika plazmina najznačajnija je termostabilnost na temperature pasterizacije, pa čak i sterilizacije. Objasnjeno je mehanizam toplinske inaktivacije plazmina stvaranjem kovalentnih disulfidnih veza između molekula plazmina i denaturiranih bjelančevina mliječnog seruma (prvenstveno β -laktoglobulina). Kratka pasterizacija inaktivira termolabilne inhibitore plazminogen aktivatora i inhibitore plazmina što povećava plazminsku aktivnost, dok primjena viših temperatura i produženo trajanje toplinske obrade mlijeka inaktivira plazmin.

Ključne riječi: plazmin, primarna proteoliza, somatske stanice, termo stabilnost

Uvod

Plazmin je najvažniji prirodni proteolitički enzim mlijeka (Andrews, 1983.). Osim u kravljem mlijeku nalazimo ga i u mlijeku ovaca, koza i žena (Alichanidis i sur., 1986.). Plazmin je alkalna proteinaza krvnog seruma vrlo visokog afiniteta prema fibrinu (Karlson, 1988.). U krvnom serumu plazmin i plazminogen vezani su za fibrinogen i fibrin (Saksela, 1985., citirano prema Politis i sur., 1993.). Plazmin pripada skupini enzima sličnih tripsinu. On može hidrolizirati veliki broj vrsta proteina mlijeka, a visoko je specifičan prema lizinu (Grufferty i Fox, 1988.). Plazmin hidrolizira polipeptidni lanac iza arginina ili lizina (Andrews, 1983.; Andrews i Alichanidis, 1983.; Aaltonen i sur., 1988.; Grufferty i Fox, 1988.). Njegova optimalna pH aktivnost je između 7 i 8 (Grufferty i Fox, 1986.), odnosno 8,45 (Verdi i Barbano, 1991.), a stabilan je pri rasponu pH vrijednosti od 1,5 do 9 (Chen i Ledford, 1971.). Optimalna temperatura djelovanja plazmina je 37°C, ali je potvrđeno da djeluje i na temperaturi hladnjaka (Schaar, 1985.). Pohranom mlijeka na 4°C kroz 5 dana povećat će se količina topljivog kazeina kao posljedica proteolitičke aktivnosti enzima mlijeka (Barbano i sur., 1991.). Donnelly i Barry (1983.) utvrdili su da je proteolitička aktivnost 20 puta manja na temperaturi od 4°C nego pri tjelesnoj temperaturi. Oko 80% enzima u mlijeku nalazi se u obliku zimogena-plazminogena koji tijekom skladištenja postepeno prelazi u plazmin pod utjecajem aktivatora (Koricka-Dahl i sur., 1983.; Richardson, 1983.; Aaltonen, 1988.). Utvrđena je pozitivna korelacija između količine plazmina i plazminogena ($r = 0,528$) (Benslimane i sur., 1990.). Omjer između plazmina i plazminogena za skupno mlijeko u prosjeku je između 4,9 i 5,6 (Banslimane i sur., 1990.). Najvećim je dijelom (80-95%) plazmin vezan za micelle kazeina preko lizinskih ostataka β -CN, pri čemu se zna da je β -CN bogat tom aminokiselinom (Dulley, 1972.; Korycka-Dahl i sur., 1983.). Plazmin ostaje vezan za izoelektrički precipitirani kazein, zatim na kazein zgrušan sirilom ili na micelarni kazein izdvojen centrifugiranjem (Grufferty i Fox, 1988.). Manji dio plazmina vezan je za proteinski dio membrana kuglica mliječne masti (Korycka-Dahl, 1983.; Grufferty i Fox, 1988.). Plazmin i plazminogen vjerojatno su u ekvilibriju između kazeina i mliječnog seruma.

Taj je ekvilibrij pod utjecajem temperature (Schaar, 1985.). Tretiranje mlijeka s lizinu sličnom ϵ -aminokapronskom kiselinom (EACA) ili nekom drugom kiselinom izazvat će bitne konformacijske promjene koje uzrokuju oslobađanje plazmina i plazminogena iz kazeinske micela pri čemu oni prelaze u mliječni serum (Dupont i Grappin, 1998.). Proteolitički enzimi psihrotrofnih mikroorganizama svojom aktivnošću uvjetuju odvajanje plazminogena od kazeinskih micela u mliječni serum (Fajardo-Lira i Nielsen, 1998.).

Plazmin je molekula sastavljena od dva lanca: teškog lanca (lanac A) molekulske mase oko 60.000 Da i lakog lanca (lanac B) molekulske mase oko 25.000 Da povezanih disulfidnim vezom. Proteolitičku aktivnost posjeduje laki lanac (Gruffery i Fox, 1988.).

Koncentracija plazminogena/plazmina u mlijeku

Prosječna koncentracija plazmina u kravljem mlijeku iznosi 0,21 mg/L, a plazminogena 0,94 mg/L (Politis i sur., 1989.). Koncentracija plazmina izražava se kao plazminska aktivnost mjerena kroz razgradnju različitih supstrata kao što je β -kazein koji razgradnjom prelazi u γ_1 -, γ_2 -, γ_3 -kazein što je moguće izmjeriti PEGE elektroforezom (Kalit i sur., 2002.) ili razgradnjom nefluorescentnog N-sukcinil-L-alanil-L-fenilalanil-7-amido-4-metil kumarin koji razgradnjom daje fluorescentni spoj kumarina čija se koncentracija mjeri intenzitetom fluorescencije (Richardson, 1981.).

Veći broj čimbenika kao što su sezona, broj laktacije, stadij laktacije, dnevne varijacije, teljenje, hranidba, pasmina i kemijski sastav mlijeka utječu na koncentraciju plazmina i njegova prekursora plazminogena (Schaar, 1985.; Aaltonen i sur., 1988.; Grufferty i Fox, 1988.; Politis i sur., 1989.). Aaltonen i sur. (1988.) utvrdili su slabu negativnu korelaciju između koncentracije plazmina i količine mlijeka ($r = -0,283$), a pozitivnu korelaciju između stadija laktacije i plazminske aktivnosti ($r = 0,389$). U prvih 5 mjeseci laktacije plazminska aktivnost se ne mijenja. Nakon toga perioda stadij laktacije utječe na plazminsku aktivnost, osobito u devetom i desetom mjesecu (Politis i Ng-Kwai-Hang, 1989.; Politis i sur., 1989.; Bastian i sur., 1991.). Koncentracija plazminogena i plazmina na kraju laktacije je povećana (Bastian i sur., 1991.), što se tumači povećanjem permeabilnosti epitelnih stanica mliječne žlijezde, čime se povećava ulijevanje tog enzima iz mlijeka u krv (Korycka-Dahl i sur., 1983.; Saeman i sur., 1988.). Druga

teorija tvrdi da koncentracija ovih enzima raste u mlijeku kao posljedica smanjenja sinteze mlijeka, a ulijevanje plazminogena i plazmina u mlijeko ostaje isto tijekom cijele laktacije (Schaar i Funke, 1986.; Politis i Ng-Kwai-Hang, 1989.). Krave hranjene sijenom imaju veću plazminsku aktivnost od krava hranjenih silažom. Iako je utvrđen vrlo mali utjecaj pasmine na količinu plazmina u mlijeku (Aaltonen i sur., 1988.; Bastian i sur., 1991.), Richardson (1983.) je zaključio da mlijeko frizijske pasmine ima veću koncentraciju plazmina i plazminogena negoli mlijeko ayrshire pasmine. U odnosu na pasminu individualne razlike u koncentraciji ovog enzima su izraženije, pa mogu iznositi 65-68% (Aaltonen i sur., 1988.). Mlijeko s više kazeina ima manju plazminsku aktivnost, dok mlijeko s više proteina ima veću plazminsku aktivnost (Aaltonen i sur., 1988.). Količina plazmina značajno se povećava u krava nakon treće laktacije, a osobito u ljetnom i jesenskom razdoblju (Richardson, 1983.-b; Politis i Ng-Kwai-Hang, 1989.). U ljetnim mjesecima količina plazmina tri puta je veća u odnosu na zimu (Richardson, 1983.). Starije krave imaju veću koncentraciju plazmina.

Od svih čimbenika koji utječu na plazminsku aktivnost, broj somatskih stanica (BSS) u mlijeku ima najveći utjecaj (Schaar, 1985.; Aaltonen i sur., 1988.; Barbano, 1989., Politis i sur., 1989.; Barbano i sur., 1991.). U mlijeku s visokim brojem somatskih stanica povećava se indogena proteoliza, osobito u sistemu plazmin i plazminogen (Andrews, 1983.-b; Ballou i sur., 1995.). Tako se količina plazminogena povećava za 21%, a plazmina za 82% (Schaar i Funke, 1986.). Kod BSS do 1,000.000 stanica/mL smatra se da je plazmin dominantan endogeni proteolitički enzim mlijeka (Saeman i sur., 1988.; Barbano, 1989.). Početna plazminska aktivnost mlijeka s visokim BSS dva puta je veća u odnosu na mlijeko s niskim BSS (Kennedy i Kelly, 1997.). Politis i Ng-Kwai-Hang (1989.) uspoređivali su utjecaj različitog BSS na koncentraciju plazmina. Povećanje BSS sa 100.000 na 1,300.000 stanica/mL povećava plazminsku aktivnost za 2,3 puta. Spomenuti su autori utvrdili visoku korelaciju između BSS i plazminske aktivnosti ($r = 0,62$). Koncentracija plazmina i plazminogena linearno se povećava s porastom BSS. Svako povećanje BSS za 250.000 stanica/mL uvjetuje porast koncentracije plazmina za 0,03 mg/L (Politis i sur., 1989.). Nakon namjernog izazivanja upale vimena krava, maksimalno povećanje proteolitičke aktivnosti mlijeka događa se nešto prije maksimalnog povećanja BSS (Andrews, 1983.-b). Značajno najveću količinu plazmina i

plazminogena nalazimo u mlijeku s visokim BSS na kraju laktacije (Auld i sur., 1996.). Iako je nepoznat mehanizam prijenosa plazmina i plazminogena iz krvi u mlijeko, smatra se da oštećeno epitelno staničje vimena s povećanom permeabilnošću membrana omogućuju pasivni prolaz ovog enzima tijekom upalno-patogenog procesa (Andrews, 1983.-b; Schaar i Funke, 1986.; Politis i sur., 1989.; Zecconi, 1995.). Stoga je općenito veća proteolitička aktivnost mlijeka s visokim BSS u odnosu na mlijeko s niskim BSS (Kelly i Foley, 1997.; Auld i sur., 1996.).

Količina proteoza-peptona dobar je indikator proteolize u mastitičnom mlijeku. Utvrđena je visoka korelacija između količine proteoza-peptona i BSS od $r = 0,87$. Od velikog broja proteoza-peptona u mlijeku najvažniji je fragment PP1 (f 29-107). Ovaj se fragment značajno i linearno povećava u mlijeku s visokim BSS. Drugi značajan proteoza-pepton je PP5 (f 1-105/7). Treći razgradni produkt jest PP3. Njegova se količina ne povećava značajno tijekom proteolize, pa se ne smatra značajnim pokazateljem plazminske aktivnosti (Le Roux i sur., 1995.).

Postotak intaktnog kazeina u post-infektivnom razdoblju ne vraća se na pred-infekcijsku razinu nakon eliminacije patogena (Saeman i sur., 1988.).

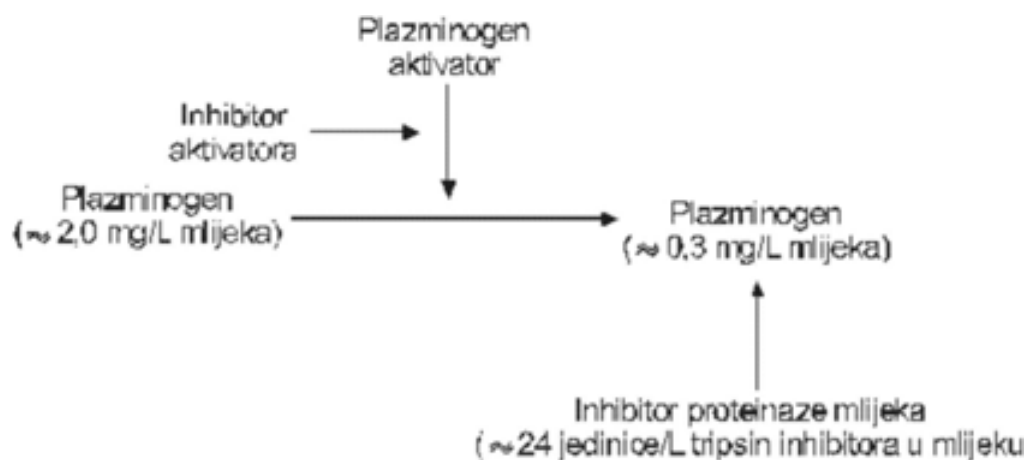
Proteolitički enzimi somatskih stanica nemaju specifično hidrolitička svojstva. Produkti hidrolize tih enzima daju polipeptide različite dužine i aminokiselinskog sastava (Andrews, 1983.-b; Saeman i sur., 1988.; Verdi i Barbano, 1988.; Verdi i Barbano, 1991.). Njihova je aktivnost neznatna u usporedbi s plazminom. Izolirani krvni leukociti dodani mlijeku dobre bakteriološke kakvoće nisu bitno utjecali na razgradnju proteina mlijeka nakon njihova razbijanja homogenizacijom (Grieve i Kitchen, 1985.). Za razliku od njih, plazmin ima specifično hidrolitičko djelovanje, jer cijepa polipeptidni lanac molekule kazeina na mjestu ostatka lizina i daje prilično ujednačene polipeptide (produkte primarne proteolize) (Verdi i Barbano, 1988.; Barbano, 1989.). Proučavanjem utjecaja proteolitičke aktivnosti plazmina na kazein utvrđeno je da najveći dio polipeptida iz kazeina u mlijeku nastaje razgradnjom β -CN (Noomen, 1975.; Ali i sur., 1980.; Donnelly i Barry, 1983.), a tek neznatni dio potječe od α_{s1} -CN i α_{s2} -CN i κ -CN (Eigel, 1977.; Andrews i Alichanidis, 1983.). Ne postoji značajna korelacija između koncentracije plazmina i stupnja proteolize κ -CN (Eigel, 1977.; Grieve i Kitchen, 1985.; Politis i Kn-Kwai-Hang, 1989.; Barbano i sur.,

1991.). β -CN se 2 do 3 puta brže razgrađuje u usporedbi s α_{s1} -CN (Noomen, 1975.). C-terminalni fragmenti β -CN nastali djelovanjem plazmina su γ_1 -(β -CN f 29-205), γ_2 -(β -CN f 106-209) i γ_3 -(β -CN f 108-209), a odgovarajući N-terminalni fragmenti su proteoze-peptoni PP8 brzi (β -CN f 1-28), PP8 spori (β -CN f 29-105/107) i PP5 (β -CN f 1-105). Plazmin razgrađuje α_{s2} -CN u mlijeku, ali još nisu identificirani peptidi koji pri tom nastaju. Smatra se da barem neki od njih pripadaju skupini proteoza peptona. U vrlo malom opsegu moguća je razgradnja α_{s1} -CN u mlijeku pri čemu nastaje malo istraženi λ -CN i nedefinirani proteoza peptoni (Fox i McSweeney, 1998.).

Tijekom proteolize nastaju mnogi međuspojevi koji nisu konačni produkti proteolize (različiti proteoza-peptoni), a to ovisi o vremenu trajanja proteolize. Postoji linearno signifikantna povezanost između plazminske aktivnosti i količine proteoza-peptona u mlijeku pojedinih krava (Schaar, 1985.). Sirovi proteoza peptoni, nastali proteolizom, sastoje se od barem 38 pojedinačnih proteoza-peptona. Od 38 proteoza-peptona barem 25 nastaje djelovanjem prirodne alkalne proteinaze mlijeka (Grufferty i Fox, 1988.). Količina proteoza-peptona PP8 (brzi) linearno se povećava, što je dokaz da je ovaj spoj konačni produkt razgradnje β -CN. Suprotno tome koncentracija proteoza-peptona PP5 ne raste linearno, a to potvrđuje da ovaj fragment nije stabilan nakon hidrolize. Od ukupne količine proteoza-peptona koji nastaju u mlijeku djelovanjem plazmina inkubacijom na 37°C kroz 7 dana, oko 52% potječe od β -CN, 29% od α_{s1} -CN, 9% od α_{s2} -CN i 4% od κ -CN. Ostalih 6% nije se moglo točno pripisati ni jednoj frakciji kazeina. Dakle, pri spomenutim uvjetima dolazi do povećanja količine proteoza-peptona u mliječnom serumu sa 2,5 mg/mL na 11,1 mg/mL seruma. U pasteuriziranom mlijeku te su vrijednosti i veće (15,5 mg/mL). No daljnjom inkubacijom mlijeka dolazi do laganog pada količine proteoza-peptona, što se tumači njihovom hidrolizom na još manje dijelove (Andrews i Alichanidis, 1983.). Apsolutno povećanje količine razgradnih produkata proteoza-peptona jednako je apsolutnom padu količine intaktnog α_s -CN i β -CN (Verdi i sur., 1987.). Od ukupne količine proteoza-peptona samo 23% nastaje kao posljedica post-sekretorne razgradnje kazeina u uvjetima pohrane na 5°C kroz 3 dana, dok ostali produkti nastaju još u samom vimenu (Schaar, 1985.). Kod mastitičnog mlijeka, produženom inkubacijom na 37°C, prestaje razgradnja α_{s1} -CN ostavljajući znatan dio ovoga proteina nerazgrađenog, dok se razgradnja β -CN nastavlja (Andrews, 1983.).

Aktivacija plazminogena

Aktivacija plazminogena u plazmin složen je biokemijski proces uvjetovan odnosom aktivatora i inhibitora u mlijeku. Plazminski sustav sastoji se od plazmina, plazminogena, inhibitora plazmina, aktivatora plazminogena i inhibitora aktivatora plazminogena (Richardson, 1983.; Fox i Law, 1991.).



Slika 1: Odnos između prirodne proteinaze i njenih inhibitora u kravljem mlijeku. U zagradama su vrijednosti koncentracije plazmina i plazminogena u mlijeku (Richardson, 1983.).

Fig. 1: Relationship between natural proteinase and its inhibitors in cow's milk. Plasmin and plasminogen concentrations are mentioned in brackets (Richardson, 1983.).

Ovaj enzimatski sustav krvlju dopijeva u mlijeko (Grufferty i Fox, 1988.; Fang i sur.,1996.). Aktivatori plazminogena vezani su za kazeinske micelle (Deharveng i Nielsen, 1991.), dok se inhibitori nalaze u mliječnom serumu (Korycka-Dahl i sur.,1983.). Za aktiviranje plazminogena u plazmin postoje dvije najvažnije skupine aktivatora: urokinazni i tkivni tip aktivatora (Fang i sur.,1996.).

Visok broj somatskih stanica (BSS) i aktivacija plazminogena

Mlijeko mastičnih krava bogato je tkivnim tipom aktivatora, dok je urokinaznog tipa manje (Zecconi, 1995., Kelly i Foley, 1997.). Aktivatori plazminogena u mlijeku mastičnih krava nalaze se vezani za somatske stanice. Ti aktivatori djelomično su termo-stabilni, te ih UHT postupak samo djelomično inaktivira (Kelly i Foley, 1997.). Za razliku od somatskih stanica (leukocita) mlijeka mastičnih krava, leukociti izdvojeni iz krvi goveda, te umjetno dodani u mlijeko niskog BSS, neće imati aktivatorski učinak na plazminogen (Verdi i Barbano, 1991.; Fang i sur., 1996.). To pokazuje, da je pobuđivanje aktivatora plazmina i proteolize vezano za upalno-patogene procese koji se odvijaju tijekom infekcije što podrazumijeva interakciju endotelnih stanica i leukocita (Fang i sur., 1996.).

Kod mlijeka s visokim BSS veća je koncentracija plazminogena i plazmina, dok je njihov omjer niži u odnosu na mlijeko s niskim BSS, što ukazuje na značajnu ulogu leukocita u procesu ubrzanja aktivacije (Verdi i Barbano, 1991.). Omjer između plazminogena i plazmina pokazatelj je aktivacije plazminogena u plazmin. Do 250.000 BSS/mL taj je omjer 4,7, a kad BSS prelazi 1.000.000 stanica/mL on iznosi 4,0 (Politis i sur., 1989.). BSS od 500.000 stanica/mL uzrokuje značajnu konverziju plazminogena u plazmin u vimenu prije mužnje (Verdi i Barbano, 1991.; Zachos i sur., 1992.). Mlijeko s 1.000.000 BSS/mL ima 8 puta veću konverziju plazminogena u plazmin (Zachos i sur., 1992.). Dodavanje plazminogena u sterilizirano mlijeko s visokim BSS povećava gelifikaciju mlijeka u odnosu na mlijeko s niskim BSS (Kelly i Foley, 1997.). Titracija urokinazom pokazala je da za aktiviranje plazminogena treba manje urokinaze mlijeku mastičnih negoli mlijeku zdravih krava (Fang i Sandholm, 1995.). Pri kraju laktacije plazminogen se intenzivnije aktivira u plazmin (Richardson, 1983.-a; Aaltonen i sur., 1988.; Bastian i sur., 1991.) kao posljedica povećanog BSS, razlike u vrsti somatskih stanica, te prisustva infektivnih agensa (Zachos i sur., 1992.). Smatra se, da pri aktivaciji plazminogena važnu ulogu imaju polimorfonuklearni leukociti. Oni otpuštaju aktivatore plazminogena (Andrews, 1983.-a; Politis i sur., 1989.; Verdi i Barbano, 1991.). Politis i sur., (1989.) smatraju da je povećana koncentracija plazmina u mlijeku mastičnih krava posljedica prekomjernog ulijevanja plazminogena u mlijeko, a manje zbog pretvorbe plazminogena u plazmin.

Ni jedno sredstvo koagulacije mlijeka (ispitani su renin teladi, enzimi proteolize *Mucor pusillus*, *M. miehei* i *Endothia parasitica*) ne prevodi plazminogen u plazmin (Verdi i Barbano, 1991.-a).

Inhibicija plazmina

U mliječnom serumu nalazimo prirodne inhibitore plazmina kao što su α_1 -antitripsin, α_2 -makroglobulin, tripsin inhibitor kolostruma, α_2 -antiplazmin i CI-inhibitor (Richardson, 1983.; Grufferty i Fox, 1988.). Uloga tih inhibitora jest prevencija samorazgradnje tkiva u vimenu (Buzalski i Sandholm, 1981., citirano prema Alichanidis i sur., 1996.).

Na aktivnost plazmina inhibitorno djeluju sirutkini proteini (proteini mliječnog seruma), prvenstveno α -laktalbumin, β -laktoglobulin i albumin krvnog seruma goveda (BSA) u koncentracijama koje nalazimo u normalnom mlijeku (Alichanidis i sur., 1986.; Politis i sur., 1993.). Od svih sirutkinih proteina β -laktoglobulin ima najjači inhibitorski učinak, ali tek nakon temperaturne denaturacije (Rollema i Poll, 1986.). Struktura i konformacija β -laktoglobulina ima presudnu ulogu na inhibiciju plazminogena (Bastian i Brown, 1992.). Različite pH vrijednosti mlijeka nemaju utjecaja na inhibitorski učinak β -laktoglobulina (Politis i sur., 1993.). Utvrđeno je, da A-genetska varijanta β -laktoglobulina ima nekoliko puta veći inhibitorski učinak nego genetska varijanta B (Politis i sur., 1993.). BSA, čija se količina značajno povećava tijekom mastitisa, predstavlja vrlo jak inhibitor aktivnosti plazmina i plazminogena u mlijeku (Politis i sur., 1993.). Točan mehanizam načina na koji sirutkine bjelančevine inhibiraju proteolitičku aktivnost plazmina nije razjašnjen, ali se zna da sve sirutkine bjelančevine sadrže u svom aminokiselinskom sastavu nekoliko ostataka cisteina i slobodne sulfhidrilne grupe koje u tom mehanizmu vjerojatno imaju određenu ulogu (Politis i sur., 1993.).

Najjači inhibitorski učinak na plazmin imaju aprotinin i sojin tripsin inhibitor u količini od 5×10^{-3} M u mlijeku (Andrews, 1983.; Grufferty i Fox, 1986.). Plazmin može inhibirati dodavanje 6-aminoheksano kiseline (Fox i Law, 1991.; Farkye i Fox, 1991.).

Termostabilnost plazmina

Jedna od najvažnijih osobina plazmina njegova je stabilnost na djelovanje temperatura pasterizacije, pa čak i sterilizacije. Kod UHT mlijeka dolazi do razgradnje prvenstveno β -CN i α_{s1} -kazeinske frakcije djelovanjem plazmina, pri čemu se javlja sluzavost steriliziranog mlijeka. Pod elektronskim mikroskopom kazeinske micelle takvog mlijeka međusobno se spajaju končastim tvorevinama koje predstavljaju hidrolitičke produkte razgradnje kazeina (de Koning i sur., 1985.). Razlog termostabilnosti plazmina je u velikom broju disulfidnih veza u molekuli. Tako ljudski plazmin sadrži 24 S-S mostova. Te kovalentne veze povezuju mjesta u molekuli koji su relativno udaljeni u primarnoj strukturi, što je vjerojatno razlog stabilnosti prema ireverzibilnoj termičkoj denaturaciji (Rollema i Poll, 1986.). Kazein, na koji se plazmin veže u mlijeku, također ima zaštitnu ulogu, te štiti plazmin i plazminogen od toplinske denaturacije. Kazein djeluje kao zaštitni substrat od inaktivacije na temperaturama pasterizacije, dok na temperaturama sterilizacije nema takav učinak (Alichanidis i sur., 1986.). Za inaktiviranje 90% enzima mlijeka potrebna je toplinska obrada od gotovo 1,4 min na temperaturi od 140°C (Barbano, 1989.). Pad proteolitičke aktivnosti plazmina vjerojatno je posljedica denaturacije β -laktoglobulina pri čemu dolazi do izloženosti reaktivnih sulfhidrilnih grupa (-SH). One reverzibilno reagiraju sa S-S mostovima plazmina, te nastaje tiol-disulfidna interakcija (Grufferty i Fox, 1986.; Rollema i Poll, 1986.). Dodavanje L-cisteina u obrano mlijeko (2,9 mM) povećava inaktivaciju plazmina za oko 20 puta na temperaturi od 80°C (Rollema i Poll, 1986.). Za početak inaktivacije plazmina potrebna je temperatura veća od 70°C kako bi došlo do denaturacije β -laktoglobulina i narušavanje strukture plazmina (Rollema i Poll, 1986.). Kod kratke pasterizacije naglo hlađenje mlijeka uvjetuje ponovnu aktivaciju plazmina (Alichanidis i sur., 1986.). Kinetika inaktivacije plazmina i plazminogena nije ovisna o koncentraciji plazmina i njegova zimogena u mlijeku (Rollema i Poll, 1986.). Interakciju plazmina s proteinima mliječnog seruma moguće je blokirati pomoću oksidativnih spojeva kao što je kalijev jodat (KJO₃). Tretiranje mlijeka s KJO₃ prije UHT postupka uvjetuje vrlo intenzivnu proteolizu djelovanjem plazmina (Grufferty i Fox, 1988.; Kelly i Foley, 1997.). Ako se u mlijeko doda 0,1 mM KJO₃ prije UHT tretiranja doći će do znatne razgradnje kazeina tijekom skladištenja na 37°C kroz 6 dana (Kennedy i Kelly, 1997.). Primjenom drugih vrsta kemijskih

oksidansa, kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), kalijev permanganat ($KMnO_4$) ili kalijev bikromat ($K_2Cr_2O_7$), nije postignut zaštitni učinak, iako je njihov redoks potencijal viši (Kennedy i Kelly, 1997.). Produljenjem trajanja UHT smanjen je učinak dodavanja KJO_3 , što upućuje da taj oksidans vjerojatno inducira aktivnost enzima, a sam kemijski ne utječe na proteolizu. Ovaj oksidans utječe na oksidaciju SH grupa, što smanjuje formiranje disulfidnih veza između proteinske molekule plazmina i denaturiranih proteina β -laktoglobulina koji predstavlja najveći izvor slobodnih SH grupa u mlijeku (Grufferty i Fox, 1986.).

Plazmin je nešto stabilniji u mlijeku s visokim BSS kada se koriste niže temperature toplinske obrade ($63-90^\circ C$). Stoga će pasterizacija imati manji učinak inaktivacije plazmina u mlijeku s visokim BSS (Kennedy i Kelly, 1997.). Razlog može biti što mlijeko s visokim BSS sadrži znatno više aktivatora plazminogena koji su termorezistentni (Zachos i sur., 1992.).

Temperature pasterizacije pojačavaju hidrolitičku aktivnost plazmina (Fox i Law, 1991.). Proteolitičke promjene na α_{s1} -CN i β -CN bile su izraženije u pasteriziranom u odnosu na sirovo mlijeko (Andrews, 1983.). Nakon 7 dana inkubacije pasteriziranog mlijeka došlo je do razgradnje gotovo 90% β -CN i 60% α_{s1} -CN. Pasterizacijom se mijenja omjer između plazminogena i plazmina s 0,411 na 0,797. Aktivacija plazminogena u plazmin u pasteriziranom mlijeku vjerojatno je posljedica toplinske inaktivacije termolabilnih inhibitora plazminogen aktivatora i inhibitora plazmina (Fox i Law, 1991.). Aktivacija plazminogena u plazmin nastavlja se i nakon toplinske obrade djelovanjem plazminogen aktivatora (Dupont i Grappin, 1998.).

Utjecaj toplinske obrade mlijeka na plazminsku aktivnost ovisi o visini i trajanju toplinske obrade. Proteolitičke promjene u siru proizvedenom od mlijeka termički obrađenog na $110^\circ C$ kroz 60 sekundi intenzivnije su nego u siru proizvedenom iz pasteriziranog mlijeka na $63^\circ C$ kroz 30 min (Lau i sur., 1991.). Plazminska aktivnost gotovo se ne mijenja termičkom obradom na $72^\circ C$ kroz 15, 30 ili 60 sekundi, te na $80^\circ C$ kroz 15 sekundi. Primjenom viših temperatura toplinske obrade, uz duže trajanje, povećava količinu nerazgrađenog β -CN s 20% na 75%, a α_s -CN s 10 na 45% kod sireva Cheddar zrelih 16 tjedana (Benfeldt i sur., 1997.).

PLASMIN: INDIGENOUS MILK PROTEINASE

Summary

The most important characteristic of plasmin, as significant indigenous milk proteinase, its concentration, concentration measuring procedure and activity of plasmin are described. The most important factors, which have an influence on concentration and plasmin activity in milk, are stage of lactation and mastitis (high somatic cell count – SCC). In high SCC milk indigenous proteinase activity increased, especially in plasmin and plasminogen system.

Specific hydrolytic activity of plasmin during primary proteolysis of some casein fractions is described. β -CN is most susceptible fraction, but α_{s1} -CN and α_{s2} -Cn are less susceptible to degradation by plasmin. Almost all fractions of κ -CN are resistant to degradation by plasmin.

Activation of plasminogen to plasmin is very complex biochemical process influenced by activators and inhibitors in milk, and can be increased in high SCC milk. There are many various types of inhibitors in milk serum and β -lactoglobulin is the most important after its thermal denaturation. Addition of aprotinin and soybean tripsin inhibitors in milk inhibits plasmin activity.

Most important characteristic of plasmin is its thermostability on pasteurisation and even sterilisation. Mechanism of thermal inactivation of plasmin with developing covalent disulphide interaction between molecule of plasmin and serum proteins (mostly β -laktoglobulin) is described. Thermo-sensitive inhibitors of plasminogen activators and inhibitors of plasmin are inactivated by short pasteurisation and therefore increase plasmin activity, while higher temperature and longer treatment time inactivate plasmin activity.

Key words: plasmin, primary proteolysis, somatic cell count, thermostability

Literatura

- AALTONEN, M. L., LEHTONEN, M., LEHDONKIVI, T., ANTILA, V. (1988.): Plasmin activity in milk. *Milchwissenschaft*, 43, 573-576.
- ALI, A.E., ANDREWS, A.T., CHEESEMAN, G.C. (1980.): Influence of elevated somatic cell count on casein distribution and cheese-making. *Journal of Dairy Research*, 47, 393-400.
- ALICHANIDIS, E., WRATHALL, J.H.M., ANDREWS, A.T. (1986.): Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. *Journal of Dairy Research*, 53, 259-269.
- ANDERSON, M., ANDREWS, A.T. (1977.): Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. *Journal of Dairy Research*, 44, 223-235.
- ANDREWS, A. T. (1983.): Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50, 45-55.
- ANDREWS, A.T. (1983.-B): Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin. *Journal of Dairy Research*, 50, 57-66.
- ANDREWS, A.T., ALICHANIDIS, E. (1983.): Proteolysis of casein and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 50, 275-290.
- AULDIST, M. J., COATS, S. J., SUTHERLAND, B. J., HARDMAN, J. F., MC DOWELL, G. H., ROGERS, G. L. (1996.): Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 377-386.
- BALLOU, L. U., PASQUINI, M., BREMEL, R. D. (1995.): Factors Affecting Herd Milk Composition and Milk Plasmin at Four Levels of Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 78, 2186-2195.
- BANSLIMANE, S., DOGNIN-BERGERET, M. J., BERDAGUE, J. L., GAUDEMER, Y. (1990.): Variation with season and lactation of plasmin and plasminogen concentrations in Montbeliard cow's milk. *Journal of Dairy Research*, 57, 423-435.
- BARBANO, D. M. (1989.): Milk Quality and Composition: Effect of Somatic Cells on Cheese Yield. CRD Annual Conference: *Cheese Research and Technology*, 17-21.
- BARBANO, D. M., RASMUSSEN, R. R., LYNCH, J. M. (1991.): Influence of Milk Somatic Cell Count and Milk Age on Cheese Yield. *Journal of Dairy Science*, 74, 369-388.
- BASTIAN, E.B. RODNEY, J.B., ERNSTROM, C.A. (1991.): Plasmin activity and milk coagulation. *Journal of Dairy Science*, 74, 3677-3685.
- BASTIAN, E.D., BROWN, R.J. (1992.): Inhibition of bovine plasmin by native and heat-denatured β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, suppl. 1 (Abstract), 75, 98.

- BENFELDT, C., SORENSEN, J., ELLEGARD, K.H., PETERSEN, T.E. (1997.): Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, **7**, 723-731.
- CHEN, J.H., LEDFORD, R.A. (1971.): Purification and characterization of milk protease. *Abstract. Journal of Dairy Science*, **54**, 763.
- DEHARVENG G., NIELSEN, S.S. (1991.): Partial purification and characterization of native plasminogen activators from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, **74**, 2060-2072.
- DE KONING, P.J., KAPER, J., ROLLEMA, H.S., DRIESSEN, F.M. (1985.): Age-thining and gelation in unconcentrated and concentrated UHT-sterilized skim milk. Effect of native milk proteinase. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **39**, 71-87.
- DONNELLY, W.J., BARRY, J.G. (1983.): Casein compositional studies. III. Changes in Irish milk for manufacturing and role of milk proteinase. *Journal of Dairy Research*, **50**, 433-441.
- DULLEY, J.R. (1972.): Bovine milk proteinases. *Journal of Dairy Research*, **39**: 1-9.
- DUPONT, D., GRAPPIN, R. (1998.): ELISA for differential quantitation of plasmin and plasminogen in cheese. *Journal of Dairy Research*, **65**, 643-651.
- EIGHEL, W.N. (1977.): Effect of bovine plasmin on α s1-B and κ -A Caseins. *Journal of Dairy Science*, **60**, 1399-1403.
- FAJARDO-LIRA, C.E., NIELSEN, S.S. (1998.): Effect of psychrotrophic microorganisms in the plasmin system in milk. *Journal of Dairy Science*, **81**, 901-908.
- FANG, W., SANDHOLM, M. (1995.): Inhibition of the proteinase activity in mastitic milk. *Journal of Dairy Research*, **62**, 61-68.
- FANG, W., VIKERPUUR, M., SANDHOLM, M. (1996.): Reconstitution of mastitic milk by adding blood plasma and leukocytes into low cell count milk. *Veterinary Research*, **27**, 33-44.
- FARKYE, N., FOX, P.F. (1991.): Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 786-788.
- FOX, P.F., LAW, J. (1991.): Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*, **5**, 239-262.
- FOX, P.F., MCSWEANEY, P.L.H. (1998.): Milk proteins. U: *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic and Professional. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 146-237.
- GRIEVE, P.A., KITCHEN, B.J. (1985.): Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *Journal of Dairy Research*, **52**, 101-112.

- GRUFFERTY M. B., FOX P. F. (1988.), Milk alkaline proteinase. *Journal of Dairy Research*, 55, 609-630.
- KALIT, S., HAVRANEK, J.L., KAPŠ, M. (2002.): Plasminogen activation and somatic cell count (SCC) in cheese milk: influence on Podravec cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 57: 380-382.
- KARLSON, P. (1988.): Posebne biokemijske funkcije nekih organa. U: Biokemija za studente biokemije i medicine. Školska knjiga, Zagreb, 335-370.
- KELLY, A. L., FOLEY, J. (1997.): Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. *International Dairy Journal*, 7, 411-420.
- KENNEDY, A., KELLY, A. L. (1997.): The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. *International Dairy Journal*, 7, 717-721.
- KOKYCKA-DAHL, M., RIBADEAU-DUMAS, B., CHENE, N., MARTAL, J. (1983.): Plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 66, 704-711.
- LAU, K.Y., BARBANO, D.M., RASMUSSEN, R.R. (1991.): Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, 74, 727-740.
- LE ROUX, Y., GIRARDET, J.M., HUMBERT, G., LAURENT, F., LINDEN, G. (1995.): Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell count. 2. Component PP3 and β -casein-1P (f 29-105 and f 29-107) of the proteose-peptone fraction. *Journal of Dairy Science*, 78, 1298-1305.
- NOOMEN, A. (1975.): Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 29, 153-161.
- POLITIS, I., NG-KWAI-HANG, K. F. (1989.): Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 72, 1713-1718.
- POLITIS, I., LACHANCE, E., BLOCK, E., TURNER, J. D. (1989.): Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. *Journal of Dairy Science*, 72, 900-906.
- POLITIS, I., ZAVIZION, B., BARBANO, D.M., GOREWIT, R.C. (1993.): Enzymatic assay for the combined determination of plasmin plus plasminogen in milk: revisited. *Journal of Dairy Science*, 76, 1260-1267.
- RICHARDSON, B.C. (1981.): Detection of plasmin in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16, 209-220.
- RICHARDSON, B.C. (1983.): The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 233-245.
- RICHARDSON, B.C. (1983.-A): Variation of the concentration of plasmin and plasminogen in bovine milk with lactation. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 247-252.

- ROLLEMA, H.S., POLL, J.K. (1986.): The alkaline milk proteinase system: kinetics and mechanism of heat-inactivation. *Milchwissenschaft*, 41, 536-540.
- SAEMAN, A.I., VERDI, R.J., GALTON, D.M., BARBANO, D.M. (1988.): Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 71, 505-512.
- SCHAAR, J. (1985.): Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. *Journal of Dairy Research*, 52, 369-378.
- SCHAAR, J., FUNKE, H. (1986.): Effect of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, anti-trypsin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Journal of Dairy Research*, 53, 515-528.
- 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 milk. *Journal of Dairy Science*, 70, 230-242.
- VERDI, R. J., BARBANO, D. M. (1988.): Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. *Journal of Dairy Science*, 7, 534-538.
- VERDI, R.J., BARBANO, D.M. (1991.): Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *Journal of Dairy Science*, 74, 2077-2081.
- VERDI, R.J., BARBANO, D.M. (1991.): Effect of coagulants, somatic cells enzymes and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. *Journal of Dairy Science*, 74, 772-782.
- ZACHOS T., POLITIS, I., GOREWIT, R.C., BARBANO, D.M. (1992.): Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. *Journal of Dairy Research*, 59, 461-467.
- ZECCONI, A. (1995.): Somatic cells and their significance for milk processing (Technology). *Cheese and SCC, Vienna*, 1-31.

Adresa autora – Author's address:

Mr. sc. Samir Kalit
Prof. dr. sc. Jasmina Lukač Havranek
Vlatka Čubrić Ćurik
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mljekarstvo
Svetošimunska 25, 10000 Zagreb

Primljeno – Received: 15.07.2002.

Prihvaćeno – Accepted: 20.11.2002.