Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (1-13)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Оценка и определяне на селеновия дефицит в хранителната верига на овце и крави отглеждани в ендемични планински региони на Средните Родопи

Борислав Блажев[1], Любомир Ангелов[2*]

[1]Централна лаборатория за химични изпитвания и контрол, бул. „Никола Мушанов" 120, 1330 София, България
[2] Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. „Черни връх" 53, 1407 София, България
**E-mail: luboangelov@abv.bg*

Evaluation and determination of selenium deficiency in the food chain of sheep and cow reared in the endemic mountain regions of Middle Rhodope

Borislav Blazhev[1], Ljubomir Angelow[2*]

[1]Central Laboratory for Chemical Testing and Control, 120 Nikola Mushanov Blvd., 1330 Sofia, Bulgaria
[2] Institute of Cryobiology and Food Technologies, 53 Cherni vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Селеновият дефицит в почвите и в перманентния тревостой беше установен, както и нерегламентираното снабдяване на преживните животни със селен, поради сезонната динамика през периода на пашата, както и ниските нива на биоакумулиране на този съществен неорганичен компонент в храните за животни. Настоящото проучване за концентрациите на селена по цялата хранителната верига се разглеждат в детайли и се отчитат данните от почвата към хранителните продукти. Изследването е фокусирано върху недостатъчното предлагане на селен и последствията от него върху Se-съдържание в сурово мляко и бяло саламурено сирене от овце и краве мляко, разпространено в ендемичните райони. Ниските концентрации на

SUMMARY

Selenium deficiency of soils and natural pasture vegetation, as well as an irregular supply of trace-levels of selenium to ruminants due to the seasonal dynamics during the pasture period, a low bio-accumulation rates of selenium in feedstuffs have been established.

The present study for selenium concentrations in the food chain is reviewed in details and the transfer from soil to foodstuffs of selenium are reported.

The investigation had been focused on the insufficient selenium supply and related consequences on the Se-content in raw milk and white brine cheese of sheep and cow spread in the endemic areas. The low selenium concentrations in the plant species during the lactation

селен в растителните видове по време на кърмене (април-юни), се отразяват негативно на Se-концентрация в овче и краве мляко. Предложени са препоръки за селенови добавки.

Ключови думи: селен, дефицит, хранителна верига, овче мляко, Средни Родопи

(April-June) reflected negatively on the Se-concentration in the ewe's and cow's milk. Recommendations for selenium supplementations are proposed.

Key words: selenium, deficiency, food chain, ewe's milk, Middle Rhodope Mountain

УВОД

От гледна точка на храненето наличието на селен в храните остава от голямо значение, защото много фактори влияят на неговия трансфер по екологична верига. Недостигът на селен се отразява на експресията и функцията на селенопротеини, които участват в изграждането на органи и тъкани, което води до проява на болест на Кешан Кашин – Бек заболяване.

Съдържанието на селен в зърнени храни и зеленчуци като цяло зависи от съдържанието на селен в почвата , както и на геохимичните и характеристики (Johnson et al., 2010; Mehdi et al., 2013). Потенциалното снабдяване със селен на почвата може да бъде повлияно от фактори , които влияят на образуване на различни форми на селена и разтворимостта на селеновите съединения (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Като цяло в кисели, глинести почви и почви с високо съдържание на органични вещества доминират селениди и селенови сулфиди, които са малко по-мобилни и затова са трудно достъпни за растенията.

INTRODUCTION

From the nutrition point of view the selenium availability in foodstuffs remains of great concern because a lot of factors affect its transfer along of the ecological chain. Selenium deficiency affects the expression and function of selenoproteins and has been involved in the degeneration of organs and tissues, leading to the manifestation of Keshan and Kashin-Beck diseases.

The selenium content of grains and vegetables generally depends on the selenium content of the soil, as well as on its geochemical characteristics (Johnson et al., 2010; Mehdi et al., 2013). The potential supply of selenium in soil can be influenced by factors which influence selenium speciation and solubility of selenium compounds (Kabata-Pendias and Pendias 1992).

In general in acid, clay soils and soils with high organic matter the Se-content dominate in form of selenides and selenium sulfides which are slightly mobile and therefore hardly available to plants.

В алкални почви присъстват основно селенати. Те са лесно разтворими и с висока мобилност, и съответно са лесно усвоими от растенията. Разтворимостта на селена в повечето почви е поскоро недостатъчна и следователно много земеделски площи произвеждат фураж с ниско съдържание на селен.

Усвояването на селен от растенията зависи на първо място от pH на почвата, редокси потенциала и съдържанието на вода. Растенията могат да бъдат класифицирани като – селенови акумулатори или неакумулатори, в зависимост от способността им да усвоят и да натрупват селен (Terry et al., 2000; Broadley et al., 2006).

По време на пашата преживните животни са подложени на колебания в разпределението и усвояването на селен чрез пасищната растителност. Това може да доведе до появата на различни нарушения, нарушаващи здравето и продуктивността на животните – ниска млечност, недостатъчно съдържание на селен в мляко и млечните продукти (Angelow et al., 2004; Makaveeva et al., 2004).

Данните за формите на селен в животински храни са ограничени, а съдържанието на селен в рани от животински източници варира в зависимост от режима на хранене на животните (Mehdi et al., 2013). Когато животните се суплементират с

In alkaline soils selenates are present. They are easily soluble and highly mobile, respectively available to plants.

The solubility of selenium in most soils is rather low, therefore many agricultural areas produce forage with low selenium content.

The uptake of selenium by plants depends at first on soil pH, redox potential and water content.

Plants may be classified as selenium accumulators or non-accumulators, depending on their ability to assimilate and accumulate selenium (Terry et al., 2000; Broadley et al., 2006).

During the grazing period ruminants are subjected to variations in the selenium supply through meadow vegetation.

Thus any disturbances may occur leading to impaired animal health and production traits – low milk production, insufficient content of selenium in milk and dairy products (Angelow et al., 2004; Makaveeva et al., 2004).

Data on the forms of selenium in animal foods are limited, and the selenium content of foods from animal sources varies according to the diet of the animals (Mehdi et al., 2013). When inorganic selenium is given to animals, selenocysteine is the

неорганичен селен основното образувано съединение е селеноцистеин. Когато животните консумират селен-съдържащи храни от растителен произход, се формира растителния селенометионин, на мястото на метионин (Rayman et al., 2008).

Въпреки че водата може да съдържа селен, предимно като селенат, неговото съдържание обикновено е много ниско и не допринася значително за приема на селен (WHO, 2011).

Към момента натриев селенат, натриев хидроген селенит, натриев селенит, L-селенометионин и обогатени със селен дрожди са разрешени за добавяне към храните (Regulation (EC) №1925/2006) и хранителните добавки (Directive 2002/46/EC). Съдържанието на селен в детските и преходни храни също подлежи на регулация (Commission Directive 2006/141/EC).

В действителност биоакумулирането на селен по хранителната верига, се влияе от взаимосвързани действия на такива фактори, като геоложки формации, киселинност на почвата, съдържанието на органични вещества в почвата, вегетационен стадий на растителността и специфични за отделните видове трансфер (Johnsson 1992; Zablocky 1990; Thornton et al. 1985). С оглед на посочените фактори за всяка конкретна селскостопанска област е необходи-

main seleno-compound formed. When animals consume selenium-containing foods of plant origin, protein-containing selenomethionine will also be formed from the incorporation of plant-derived selenomethionine in place of methionine (Rayman et al., 2008).

Although water may contain selenium, predominantly as selenate, its content is typically low and does not significantly contribute to selenium intake (WHO, 2011).

Currently, sodium selenate, sodium hydrogen selenite, sodium selenite, L-selenomethionine and selenium-enriched yeast may be added to food (Regulation (EC) №1925/2006) and food supplements (Directive 2002/46/EC). The selenium content of infant and follow-on formulae is regulated (Commission Directive 2006/141/EC).

In fact the bioaccumulation of selenium along the food chain is influenced of interrelated action of such factors as geological formations, soil acidity, soil organic matter content, vegetation stage of plants and species-specific uptake (Johnsson 1992; Zablocky 1990; Thornton et al. 1985).

In view of mentioned considerations data on each particular agriculture area is needed to modify the selenium

мо да се модифицира предлагането на селен за животните и човешкото хранене.

Целта на настоящото проучване е да се сравни предлагането на селен от пасища, разположени на различна надморска височина в някои планински райони на Южна България и да се даде оценка на предлагането на селен на овце, отглеждани в изследваните ендемични райони.

supply for animal and human nutrition.

The aim of present study was to compare the selenium offer of pastures situated at different altitudes in some mountainous regions in South Bulgaria and to give the estimation on the selenium offer of sheep, raised in the investigated endemic areas.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Предмет на изследването беше регион в близост до село Смилян в Средните Родопи. Средните проби от тревната растителност от 10 (5 + 5) стандартни площадки (2x2 m), разположени на две надморски височини са събрани в 2 повторения (Фиг. 1). За оценка на ефекта от етапа на вегетация тази процедура се извършва веднъж месечно по време на паша (от май до юли). В изследването на динамиката на селена в сурово мляко и сирене са включени най- разпространените породи в изследваната област – Каракачански овце, Родопски Цигай и Аборигенна (Средно-Родопска порода). Данните бяха сравнени с типичните концентрации на Se в краве мляко, получени в областта . Получени са и данни за бяло саламурено сирене и кашкавал, произведени в региона по типични домашни рецепти.

MATERIAL AND METHODS

The subject of investigation was a region near Smilyan village in the Middle Rhodope Mountain. Average samples of pasture grass from 10 (5 + 5) standard plots (2x2 m) situated at two levels of altitude were collected in 2 replications (Fig. 1). For assessment the effect of vegetation stage this procedure was performed once monthly during the grazing period (from May to July). In the experiment research on the dynamics of selenium in the raw milk and cheese was involved the most popular breeds in the investigated area – Karakachan sheep, Rhodope Zygay and Aborigen (Middle Rhodope breed).

Data was compared with the typical Se-content in cow's milk received in the area. Studied are derived from white brine cheese and yellow cheese produced in the region with a homemade recipe.

Съдържанието на селен е определено с използване на Атомно-абсорбционна техника с хидридно генериране Varian AAS-HG и Mac спектрометрия с индуктивно-свързана плазма AGILENT ICP-MS. Всички резултати са изразени като средна стойност±средно стандартно отклонение и сравнени статистически чрез Т-тест.

The selenium content was determined using Varian AAS-HG and AGILENT ICP-MS analysis.

All results were expressed as mean ± standard deviation and compared through standard t-test procedure.

Фиг. 1. Метод на стандартни площадки за вземане на проби
Fig. 1. Method of standard sampling plots

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследваните опитни площадки са с изключително ниско pH (4,27± 0,25), което влияе неблагоприятно върху биологичната усвоямеост на азот (N), фосфор (P) и калий (K) по хранителната верига “почва-растение” Всички пасища са изключително бедни на азот. Сумата от усвоимите форми на азот – амонячен и нитратен ($\Sigma = NO_3\text{-}N + NH_4\text{-}N$) в почвата е < 25 mg/kg. Имайки в предвид, че при pH 4,0-4,5 развитието на азотфиксиращите

RESULTS AND DISCUSSION

The soil samples from standard plots showed very low acidity – pH (4,27±0,25), which adversely affect the biological assimilation of nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) in the food chain "soil-plant system". All pastures were extremely poor in nitrogen. The amount of absorbable forms of nitrogen – ammoniacal and nitrate ($\Sigma = NO3\text{-}N + NH4\text{-}N$) in the soil was< 25 mg/kg. Considering that with levels of pH 4,0-4,5

бактерии е силно редуцирано, то очаквано в по-киселите почви съдържанието на азот е значително под необходимото за добра почвена запасеност. Типичните за региона индикаторни видове и липсата на основни и вторични макро- и микроелементи определя ботаническото разнообразие

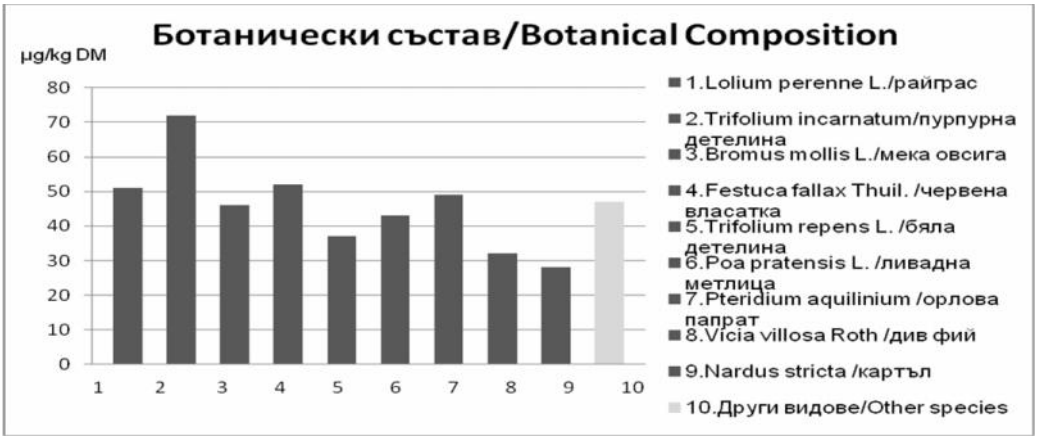
development of nitrogen-fixing bacteria is greatly reduced, it was expected that in the acidic soil nitrogen content is substantially below the required good soil that the availability. Typical of the region botanical species and lack of basic and secondary macro and micro nutrients determined botanical diversity.

Таблица 1. Ботанически състав на пасищата в изследвания регион
Table 1. Botanical composition of the pastures in the investigated region

№	Botanical composition Ботанически състав	% content % съдържание
1	*Trifolium incarnatum/пурпурна детелина*	30,21%
2	*Lolium perenne* L./ *райграс*	5,45%
3	*Bromus mollis* L./ *мека овсига*	5,55%
4	*Festuca fallax Thuil. / червена власатка*	0,60%
5	*Trifolium repens* L. / *бяла детелина*	3,26%
6	*Poa pratensis* L. / *ливадна метлица*	9,73%
7	*Pteridium aquilinium / орлова папрат*	1,68%
8	*Vicia villosa Roth / див фий*	2,28%
9	*Nardus stricta / картъл*	13,18%
10	*Other plant species / други видове*	28,05%
	total / общо	100%

Растителните проби от естествените пасища са събрани мужду 800 и 1100 m надморска височина в 2 повторения (Таблица 1). Естественият тревостой в този участък се състои главно от житни треви – 75%, бобови растения – 8% и разнотревие 17%, като дела на *Nardus stricta* L. достига 13%, докато при култивираните пасища съдържанието на картъл е минимално /1,4%/.

Average samples of pasture grass were collected at two levels of altitude (800 and 1100m) in 2 replications (Table 1). The natural composition in this area consists mainly of cereals – 75%; legumes – 8% and different grass species 17% from witch *Nardus stricta* L. reaches 13%, while in the cultivated pastures it's content is minimal /1.4%/.



Фиг. 2. Съдържание на селен в различни растителни видове
Fig. 2. Selenium content in different plant species

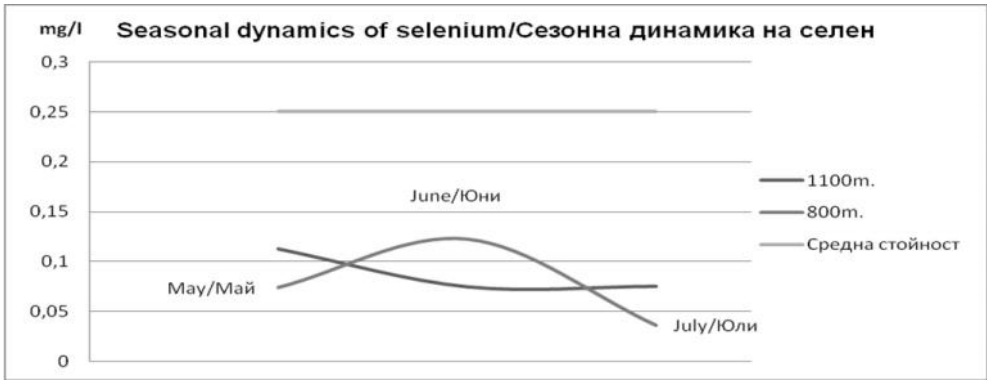
Наблюдава се силно изразен дефицит на селен при всички индикаторни видове като концетрациите са около и под критичните 30µg/kg СВ. Изследването на ливадната трева съдържаща всички характерни за района индикаторни растения показва че няма вид, който да може да компенсира ниското предлагане на селен, така че средното ниво на елемента в перманенгния тревостой е около 10-15% от необходимите потребности за животинския организъм (Фиг. 2).

И при двете надморски височини (800 и 1100m) концентрациите на селен са много под средните концентрации (0,25 mg/kg), и сезонната динамика зависи главно от геоложките климатичните особености на региона през изследвания период (Фиг. 3).

There is a pronounced deficit in all species close and below the critical 30 µg/kg DM.

The study of meadow grass containing all typical of the region indicator plants shows that there is no species which can compensate the low supply of selenium, so that the average level of the element is about 10-15% of the necessary needs of the animal organism (Fig. 2).

Selenium transfer during whole period is stable and depends mainly by geochemical characteristics of soil (Table 2). There are no bioaccumulation species among botanical species in the area that would have affected selenium concentrations in the food chain "soil-plant".



Фиг. 3. Сезонна динамика на селен в ливадна трева в зависимост от надморската височина

Fig. 3. Seasonal dynamics of selenium in meadow grass depending on the levels of altitude

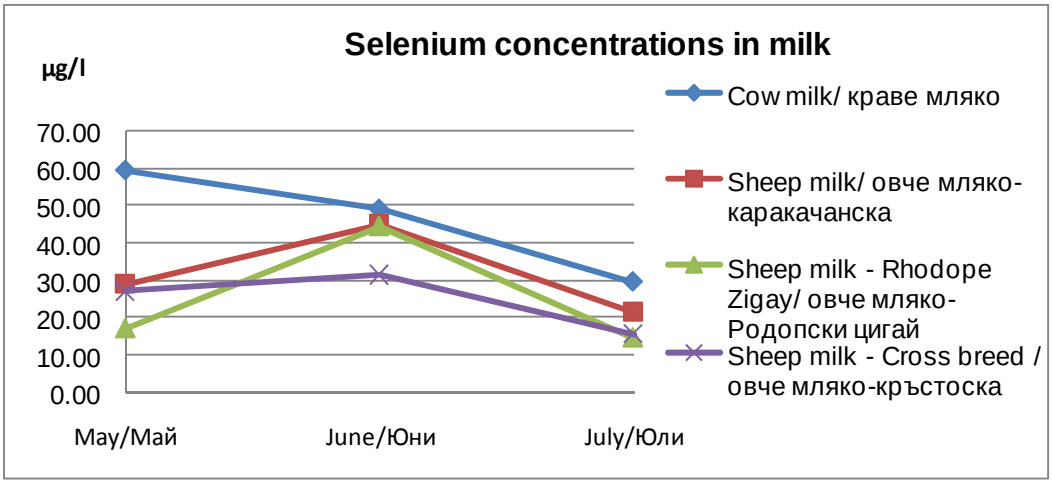
Трансфера на селен през целия период е устойчив и зависи основно от геохимическите характеристики на почвата (Таблица 2). Сред ботаническите видове няма открити селенови биоакумулатори, които да повлияят на трансфера на селен по веригата „почва-растение".

At both levels of altitude (800 and 1100m) selenium concentrations were far below normal average concentrations (0.25mg/kg), and seasonal dynamics depends mainly from geological and climatic conditions during the investigated period (Fig. 3).

Таблица 2. Коефициенти на трансфер за селен за различни надморски височини от две последователни години (2013/2014)

Table 2. Transfer factors for selenium for different altitude from two consecutive years (2013/2014)

Район/Проба/Година/Надморска височина **Area/Sample/Year/Altitude**	**Селен, µg/kg** **Selenium, µg/kg**
Смилян/почви/2013 (n=3) 1100m Smylian/soils/2013 (n=3) 1100m	200±25
Смилян/растения/2013 (n=3) 1100m Smylian/plants/2013 (n=3) 1100m	30.3±6.7
Transfer factor / Коефициент на трансфер	**0.15**
Смилян/почви/2013 (n=3) 800m Smylian/soil/2013 (n=3) 800m	207±25
Смилян/растения/2013 (n=3) 800m Smylian/plants/2013 (n=3) 800m	29.7±23.2
Transfer factor / Коефициент на трансфер	**0.15**
Смилян/почви/2014 (n=5) 800-1100m Smylian/soil/2014 (n=5) 800-1100m	140.48±70.18
Смилян/растения/2014 (n=5) 800-1100m Smylian/plants/2014 (n=5) 800-1100m	28.25±0.54
Transfer factor/ Коефициент на трансфер	**0.20**



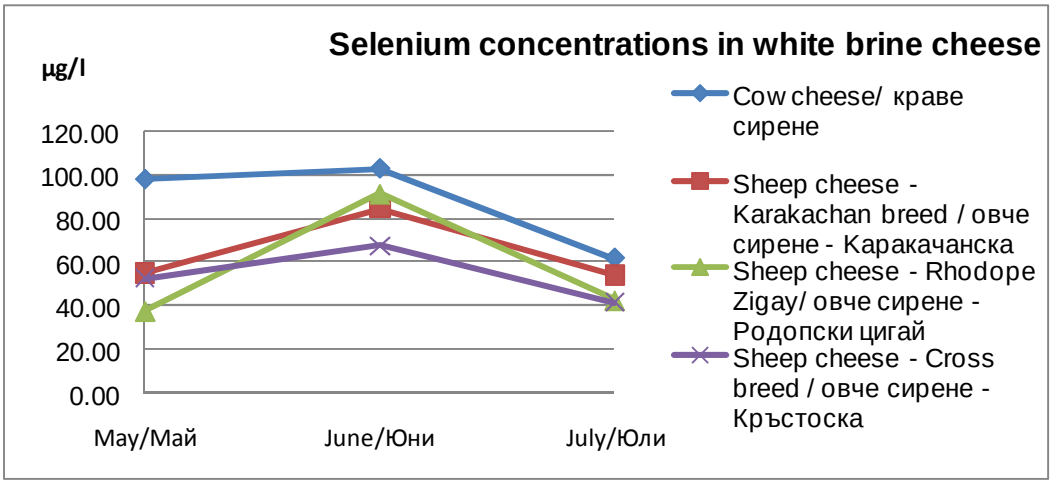
Фиг. 4. Концентрации на селен в сурово мляко от различни породи овце през изследвания период (Май-Юли)
Fig. 4. Selenium concentrations in raw milk from different sheep breeds during the investigated period (May-June)

Критични нива на дефицит от около 20-30 µg/l се наблюдават в млечните проби. С напредване на лактацията концентрациите продължават да намаляват. Липсата на достатъчно селен във всички изследвани млека от всички породи овце и динамиката на селена са индентични и подобни на тези наблюдавани в кравето мляко (Фиг. 4). Значителните дефицити на йод в тревната растителност и синергистичните му връзки със селена имат значително влияние върху нивата на селен в овчите млека. По-доброто състояние на концентрациите на селен в кравето мляко се дължи на предлагане на концентрирани фуражи съдържащи балансирани нива на селен, целящи постигане на по-висока млечност.

Critical deficit levels around 20-30 µg/l were observed in all milk samples. With the progress of lactation concentrations continue to decrease.

The lack of enough selenium in all studied breeds and trends are identical or similar to those in cow's milk (Fig. 4). Significant deficiency of selenium in grass composition and their mutual synergistic relationships with iodine have a significant impact on the readings of selenium in sheep milk.

Better provision in cow's milk is due to additional supplementation with concentrated feed contained balanced levels of selenium, to maintain a high milk yield.



Фиг. 5. Концентрации на селен в бяло саламурено сирене приготвено от мляко от различни породи овце през изследвания период (Май-Юли)
Fig. 5. Selenium concentrations variation in white brine cheese from different sheep breed's milk and caw's milk during the investigated period (May-June)

Нивата на селен в млечните продукти от краве и овче мляко варират в интервала 40-100µg/kg. Концентрациите на селен са стабилни и постоянни във всички изследвани продукти при различните породи (Фиг. 5). Дефицитът породен от липса на достатъчно селен в млякото се задържа и при млечните продукти през целия изследван период. Трансферните фактори по веригата „растения-мляко" и „мляко-млечен продукт" са в интервала 1-2 и остават постоянни през изследваните периоди и условия.

A concentration of selenium in cow and sheep products ranges from 40-100µg/kg. Concentrations of selenium are stable and consistent in all products of the different breeds (Fig. 5).

Deficit caused by the lack of selenium in the milk are retained in the products obtained during the entire investigated pasture period. Transfer factors in the food chain "plant-milk" and "milk-milk products" are in the range 1-2 and remain constant during investigated periods and conditions.

ИЗВОДИ

Изследването на селеновото предлагане и разпределението на селена в тревната растителност при храненето за овцемайки, отглеждани в района на

CONCLUSIONS

The study on the selenium supply through pasture vegetation to ewes reared in the Middle Rhodope area revealed its irregular pattern.

Средните Родопи, разкрива значителни диспропорции. Те са създадени от сезонните вариации в съдържанието Se в ливадна растителност и нисък трансфер на селен от почвата в пасищната растителност при 800 и 1100 m надморска височина. Този ефект основно се определя от геоложките структури (гнайс, сиенитни) и ниско pH на почвата. Дефицитът на селен е все по-ясно изразен с напредването на вегетацията. Нива на Se в края на пасищния период са само от 15 до 20% от минималните хранителни нужди на овцете. Това е основната причина при овце и агнета, отглеждани в региона на Средните Родопи да се наблюдава хроничен недостиг на селен.

It was established by seasonal variations in the Se content of meadow vegetation in the range of low selenium transfer from soil to pastures at 800 and 1100 m of altitude.

This effect was primary determined from the spread geological structures (gneiss, syenite) and low pH of soils. The insufficient selenium availability becoming more pronounced with the advance of vegetation amounted by the end of grazing period only from 15 to 20 % of minimal nutritional needs of sheep. It was the main reason for sheep and lamb reared in the region to develop a chronic selenium deficiency.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Angelow L., Petrova I., Makaveeva M.** Ecology and Future, *Bulgarian Journal of Ecological Science*, 2004, 3, 16-19.
2. **Broadley MR, White PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkesford MJ, McGrath SP, Zhao FJ, Breward N, Harriman M and Tucker M**. Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2006, 65, 169-181.
3. **Commission Directive 2006/141/EC** of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. OJ L 401, 30.12.2006, p. 1.
4. **Directive 2002/46/EC** of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. OJ L 183, 12.7.2002, p. 51.
5. **Johnson CC, Fordyce FM and Rayman MP** Symposium on 'Geographical and geological influences on nutrition': Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2010, 69, 119-132.
6. **Johnsson L.** In: *Ph.D. Thesis*, 1992, Uppsala
7. **Kabata-Pendias, A., Pendias, H.** Selenium, In: Trace Elements in Soils and Plants, 2nd Edition, 1992, CRC. Press. Ins. 217-225
8. **Makaveeva M., Petrova I., Angelow L.** Ecology and Future, *Bulg. J. Ecol. Sci.,* 2004, 3, 11-15.

9. **Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L and Dufrasne I**. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 2013, 18, 3292-3311.
10. **Rayman MP, Infante HG and Sargent M**. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100, 238-253.
11. **Regulation (EC) No 1925/2006** of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods. OJ L 404, 30.12.2006, p. 26.
12. **Terry N, Zayed AM, De Souza MP and Tarun AS**, Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, 51, 401-432.
13. **Thornton I., Smith C., Van Dorst S.** In: C.F. Mills, I. Bremmer, J.K. Chesters, (eds.), Trace Elements in Man and Animals, 1985, England, 853
14. **WHO (World Health Organization)**. Selenium in Drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for Drinking-water Quality. WHO/HSE/WSH/10.01/14, 2011, 22 pp.
15. **Zablocky Z.** In: *Ph.D. Thesis*, 1990, Szczecin.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (14-27)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Възможности за увеличаване на плодовитостта при овце от Тракийска тънкорунна порода чрез прилагане на различни хормонални методи

Недка Димова

Земеделски институт, 6000 Стара Загора, България
E-mail: ned_dimova@abv.bg

Possibilities to increase reproductive performance in sheep of Thracian merino breed by applying various hormonal methods

Nedka Dimova

Agricultural Institute, 6000 Stara Zagora, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Целта на настоящето изследване е да се проучат на възможностите за увеличаване на броя родени агнета от овце-майки от породата Тракийска тънкорунна чрез прилагане на различни методи на хормонална стимулация.

При първия опит с интравагинални тампони Sincro-part и инжектиране на PMSG в доза 500 UI, бяха третирани 271бр. овце, а нетретираните бяха 370 броя.

При вторият опит на 90 броя бяха поставени импланти Melovine, а втората група от нетретирани животни бяха 277 броя.

Контролирани бяха следните показатели: брой осеменени, заплодени, оагнени и абортирали овце, брой родени агнета, заплодяемост и плодовитост.

При третираните с вагинални тампони овце заплодяемостта е е с 0,16% по-висока незначително от тази на нетретираните първата година, и по-ниска втора и трета година, съответно с 10,21% и 10,48%.

Прогестероновите тампони уве-

SUMMARY

The aim of the present study is to investigate possibilities for increasing the number of the lambs born by ewes from the Thracian Merino breed by applying various methods of hormonal stimulation.

The first experiment was carried out with 271 ewes treated with intravaginal sponges Sincro-part and injection of 500 UI PMSG, and 370 untreated ewes.

In the second experiment, the first group of 90 ewes were placed implants Melovine, a second group of untreated animals were 277 animals.

The following parameters were monitored: number of artificially inseminated animals, number of ewes that gave birth to lambs, number of abortions, number of lambs born, fertillity and prolificacy.

Fertillity of treated with sponges ewes is slightly higher than that of the untreated with 0,16% the first year and lower the second and third year, respectively 10,21% and 10,48%.

Progesterone sponges increase

личават плодовитостта и през трите проучвани години с 18,14%, 36,16% и 13,37%. Заплодяемостта на третираните с импланти овце е по-ниска с 49,81% първата година и с 33,43% през втората година. Мелатониновите импланти увеличават плодовитостта със 17,18% и с 4,52%.

Плодовитостта се увеличава средно със 7,36 % след прилагане на тампони и с 12,18 % при използване на импланти в сравнение с нетретираните животни.

Третираните с интравагинални тампони овце са с 34,19% по-висока заплодяемост, но с 12,31 % по-ниска плодовитост в сравнение с тези с мелатонинови импланти.

Ключови думи: овце-майки, заплодяемост, плодовитост, мелатонин, интравагинални тампони

prolificacy with respectively 18,14%, 36,16% and 13,37% respectively. Fertillity of the ewes treated with implants is lower by 49,81% the first year and by 33,43% in the second year. Implants increase prolificacy by 17,18% and 4,52%.

Prolificacy is increased by an average of 7,36% using the intravaginal sponges and to 12.18% when using implants compared with untreated animals.

Treated with intravaginal sponges sheep are 34,19% higher prolificacy, but with 12,31% lower fertility compared to treatment with melatonin implants.

Key words: ewes, fertility, prolificacy, melatonin, intravaginal sponges

УВОД

Основният фактор, определящ икономическата ефективност в овцевъдството, независимо от продуктивното направление е плодовитостта. За да се постигнат добри финасови резултати е необходим ефективен репродуктивен мениджмънт. Основен елемент от репродуктивния мениджмънт в овцевъдството е синхронизацията на еструса на овцете.

В овцевъдството се прилагат два вида методи за синхронизация на еструса и запложданията и увеличаване на плодовитостта: нехормонални и хормонални.

Хормоналното третиране дава възможност да се планира периода на оагване съобразно възможностите за най-добра

INTRODUCTION

The main factor affecting the economic effectiveness in sheep breeding, regardless of the production aspect, is reproduction performance. In order to achieve satisfactory financial results, effective reproductive management is needed. A major element of reproductive management in sheep breeding is estrus synchronization.

In sheep breeding, two methods are used for estrous synchronization for timed artificial insemination and fertility boosting: natural (non-hormonal) and hormonal.

Hormonal treatment allows planning the lambing time considering the possibilities for profitable realization of the lambs

реализация на агнетата за месо и разплод.

Познати са три вида хормонални метода за синхронизиране на еструса: чрез методи базиращи се на действието на прогестерона или негови синтетични аналози, например прогестагени; чрез регресия на жълтото тяло с простагландин F2α или негови синтетични аналози; чрез използване на мелатонин за индуциране на естрално поведение при анестрални овце (Методиев и сътр., 2010).

Използването на интравагинални тампони и мелатонинови импланти е широко разпространена практика при различни породи овце (Caja et al. (2008) при Манчега и Лакон, Lopez and Inskeep (1991) при Чурра и Талаверна, Padeanu et al. (2012) при Цигайски овце).

В нашата страна през последните години Ралчев и сътр. (2011), Metodiev and Raicheva (2011), Славова и сътр. (2012) и Slavova et al. (2013) проучват ефекта от интравагинални тампони при породите Ил дьо Франс и Тракийска тънкорунна, а Бонев, (2012) изпитва импланти „Melovine“ при Ил дьо Франс и различни млечни кръстоски.

Целта на настоящето изследване е да се проучат на възможностите за увеличаване на броя родени агнета от овцемайки от породата Тракийска тънкорунна чрез прилагане на

used for meat and breeding.

There are known three types of hormonal methods for estrus synchronization, by methods based on the action of progesterone or its synthetic analogues, such as progestogens; by regression of the corpus luteum with prostaglandin F2α or its synthetic analogues; by use of melatonin for induction of oestrus in sheep (Metodiev et al., 2010).

The use of intravaginal sponges and melatonin implants is widespread practice in different breeds of sheep (Caja et al. (2008) in Manchega and Lacaune, Lopez and Inskeep (1991) in Churra and Talavera, Padeanu et al. (2012) in Tzigai sheep).

In our country in recent years Raltchev et al. (2011), Metodiev and Raicheva (2011), Slavova et al. (2012) and Slavova et al. (2013) investigated the effect of intravaginal sponges in Ile de France and Thracian Merino breeds and Bonev (2012) tested implants "Melovine" in Ile de France and various dairy ewes crosses.

The aim of the present study is to investigate possibilities for increasing the number of the lambs born by mother ewes from the Thracian Merino breed by applying various methods of hormonal

различни методи на хормонална стимулация.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Проучване на ефекта от комбинираното прилагане на SYNCRO-PART гъбички и SYNCRO-PART PMSG.

Първият експеримент бе проведен с овце от породата Тракийска тънкорунна овцевъдната ферма на ЗИ-Стара Загора през 3 стопански години – 2009, 2010 и 2012г. Животните бяха разделени на две групи. Първата група животни бе третирана с хормонални препарати през месеците април-май. Използвана бе следната хормонална схема: поставяне на тампони за овце Sincro-part (30mg флурогестон ацетат), отстраняване на тампоните след 12 дни и инжектиране на Sincro-part (PMSG) в доза 500 UI, изкуствено осеменяване на 50-55-я час.

Втората група бе осеменена през юли-август, без използване на хормонални препарати.

Групите бяха сформирани на база интервала от предходното агнене и отбиване на агнетата, т.е. първата група овце са се оагнили през ноември-декември, а втората – през януари и февруари. С интравагинални тампони бяха третирани 271бр. овце, а нетретираните животни, включени в опита бяха

stimulation.

MATERIAL AND METHODS

1. Studying the effect from the combined applications of SYNCRO-PART sponges and SYNCRO-PART PMSG.

The first experiment was carried out in the sheep farm at the Agricultural Institute of Stara Zagora with ewes from the Thracian Merino breed for a period of 3 farming years – 2009, 2010 и 2012. The animals were assigned into two groups. The first group of animals was treated with hormonal preparations during April and May. The following hormonal treatment scheme was used: inserting intravaginal sponges Sincro-part (30mg flurogestone acetate-FGA) into the ewes, taking the sponges out after 12 days and administering PMSG injection in a dose of 500UI, artificial insemination on the 50^{th}-55^{th} hour.

The second group of animals was artificially inseminated during the months of July and August without the use of any hormonal preparations.

The groups were set up in accordance with the time interval between the previous lambing and weaning of the lambs. This means that the ewes from the first group gave birth in November and December, and those from the second group-in January and February. Treated with intravaginal sponges were 271 ewes and the

370 броя.

2. Проучване на ефекта от прилагането на мелатонинови импланти Melovine (CEVA ANIM. HEALTH).

Вторият експеримент бе проведен с овце от породата Тракийска тънкорунна в овцевъдната ферма на ЗИ-Стара Загора през 2 стопански години – 2011 и 2013г.

През месец февруари бяха поставени импланти на овцете-майки и на кочовете в и през март-април животните бяха осеменени изкуствено (I-ва група) – 90 броя. През месец май бяха осеменени нетретираните животни (II-ра група) – 277 броя.

Проследена бе заплодяемостта и плодовитостта през отделните стопански години. Контролирани бяха следните показатели: брой осеменени, заплодени, оагнени и абортирали овце, брой родени агнета (живо родени, мъртво родени и недоносени) и биологична плодовитост.

untreated animals included in the trial were 370.

2. Studying the effect from the application of melatonin implants Melovine (CEVA ANIM. HEALTH).

The second experiment was carried out in the sheep farm at the Agricultural Institute of Stara Zagora with ewes from the Thracian Merino breed for a period of 2 farming years – 2011 and 2013.

In February there were placed implants ewes and rams into and through March-April animals were artificially inseminated (Group I) – 90. In May they were inseminated untreated animals (Group II) – 277.

Both fertillity and prolificacy were observed over the reported farming years. The following parameters were monitored: number of artificially inseminated animals, number of ewes that gave birth to lambs, number of abortions, number of lambs born (live born, stillborn) and fertillity and prolificacy.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Заплодяемостта при породата Тракийска тънкорунна след прилагане на хормонална стимулация с тампони и PMSG е представена на Таблица 1.

През първата година заплодяемостта при опитната група е 63,00%, през втората година – 77,08%, а през третата

RESULTS AND DISCUSSION

Fertillity in the breed Thracian Merino after administration of hormonal stimulation pads and PMSG is presented in Table 1.

The concepted ewes from the trial group represent 63,00% during the first year, 77,08% during the second year, and a lower

година е по-ниска - 69,33%.

При овцете от контролната група тя е съответно 62,84%, 87,29% и 79,81 %. Получените резултати са близки до установената от Славова и сътр. (2013) заплодяемост на овце от същата порода – 72,92% при третираните животни и 83,58% при нетретираните.
При опитната група с тампони заплодяемостта е незначително по-висока от тази на контролната група с 0,16% първата година, и по-ниска втора и трета година, съответно с 10,21% и 10,48%.

През първата година са се оагнили 63,00% от опитните животни и 60,13% от контролните, а през втората съответно 76,04%, и 84,75%.

През третата година от първата група са се оагнили 69,33% от третираните овце, и 79,81% от нетретираните животни.

percentage, i.e. 69,33% during the third year. In the ewes from the control group, fertillity is 62,84% during the first year, and 87,29% and 79,81% during the following years. The obtained results are similar in ewes from the same breed quoted by Slavova et al. 2013, i.e. 72,92% in the animals treated and 83,58% in the animals untreated. During the first year, fertillity in the animals from the trial group for which tampons were used, is insignificantly higher than that of the control group with 0,16%, and during the second and the third year, it decreases by 10,21% and respectively 10,48% in the animals treated.

During the first year, 63,00% of the trial animals and 60,13% of the control animals gave birth to lambs. During the second year this rate is respectively 76,04% and 84,75%. During the third year, 69,33% of the animals from the first group and 79,81% of the animals from the second group gave birth to lambs.

Таблица 1. Заплодяемост при породата Тракийска тънкорунна –хормонална стимулация с тампони
Table 1. Fertillity of Thracian Merino – hormonal stimulation with intravaginal sponges

Признаци Traits	I година / I year				II година / II year				III година / III year			
	Опитна Experimental		Контролна Control		Опитна Experimental		Контролна Control		Опитна Experimental		Контролна Control	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Осеменени Inseminated	100	100	148	100	96	100	118	100	75	100	104	100
Заплодени Mated	63	63,00	93	62,84	74	77,08	103	87,29	52	69,33	84	80,77
Оагнени Lambed ewes	63	63,00	89	60,13	73	76,04	100	84,75	52	69,33	83	79,81
Абортирали Aborted	0	0	4	2,71	1	1,04	3	2,54	0	0	1	0,96

Плодовитостта е отразена в Таблица 2. При опитната група тя е 142,86%, 156,16% и 151,92% за трите проучвани години, а при контролната група е значително по-ниска – 124,72%, 120,00%, и 138,55%.

Прилаганата хормонална стимулация с прогестеронови тампони увеличава плодовитостта при овцете-майки от породата Тракийска тънкорунна и през трите проучвани години с 18,14%, 36,16% и 13,37%, съответно.

Славова и сътр. (2012) и Slavova et al. (2013) установяват по-висока плодовитост при същата порода с 37,26% и с 42,97%.

The reproduction performance is presented in Table 2. Prollificacy of experimental group is 142,86; 156,16 and 151,92% for the three years studied. In the control group, productivity is significantly lower, i.e. 124,72%, 120,00% and 138,55%.

The applied hormonal stimulation on the basis of progesterone sponges results in increased prollificacy in ewes from the Thracian Merino breed during all three studied years (increase by 18,14%; 36,16% and 13,37% respectively). Prollificacy is higher after hormone stimulation of animals from the same breed also according to the studies of Slavova et al. (2012) (increase by 37,26%) and Slavova et al. (2013) (increase by 42,97%)

Таблица 2. Плодовитост при породата Тракийска тънкорунна –хормонална стимулация с тампони
Table 2. Reproductive performance of Thracian Merino – hormonal stimulation with intravaginal sponges

Признаци Traits	I година/ I year				II година/ II year				III година/ III year			
	Опитна Experimental		Контролна Control		Опитна Experimental		Контролна Control		Опитна Experimental		Контролна Control	
	n	%	n	**%**	n	%	n	**%**	n	%	n	**%**
Родени агнета Born lambs	90	100	111	100	114	100	120	100	79	100	115	100
Живо родени Live borns	86	95,55	96	86,49	108	94,74	114	95,00	76	96,20	104	90,43
Мъртво родени Still borns	4	4,44	15	131,51	6	5,26	6	5,00	3	3,8	11	9,57
Плодовитост Prolificacy	-	142,86	-	124,72	-	156,16	-	120,00	-	151,92	-	138,55

На Таблица 3. са представени резултатите след прилаганата хормонална стимулация с мелатонинови импланти при овце от породата Тракийска тънкорунна.

Table 3 shows the results after applying hormonal stimulation with melatonine implants in animals from the Thracian Merino breed.

Заплодяемостта при опитната група е 31,67% през първата и 43,33% през втората година, а при контролната група тя е значително по-висока – 81,48% и 76,76%.

Третираните с импланти овце са със значително по-ниска заплодяемост от тази на контролните животни, като през първата година разликата е 49,81%, а през втората - 33,43%.

Fertillity in the trial group is 31,67% during the the first year and 43,33% during the second year. In the control group, the percent of concepted ewes is significantly higher, i.e. representing 81,48% and 76,76%.

The animals into which implants were inserted, show significantly lower fertillity than that of the control animals. During the first year the difference is 49,81% and during the second year - 33,43%.

Таблица 3. Заплодяемост при породата Тракийска тънкорунна –хормонална стимулация с импланти
Table 3. Fertillity of Thracian Merino-hormonal stimulation with implants

Признаци Traits	I година/ I year				II година/ II year			
	Опитна Experimental		Контролна Control		Опитна Experimental		Контролна Control	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Осеменени Inseminated	60	100	135	100	30	100	142	100
Заплодени Mated	19	31,67	110	81,48	13	43,33	109	76,76
Оагнени Lambed ewes	19	31,67	110	81,48	13	43,33	109	76,76
Абортирали Aborted	0	0	0	0	0	0	0	0

Влиянието на мелатониновите импланти върху плодовитостта и броя родени агнета са представени на Таблица 4. Плодовитостта на овцете от опитната група през първата и втората година е съответно 152,63% и 138,46%, а при контролната група – 135,45% и 133,94%.

Хормоналната стимулация с мелатонинови импланти води до повишаване на плодови-

Effect of implants on reproduction performance is shown on Table 4. Prollificacy of the animals from the experimental group during the first and the second year is respectively 152,63% and 138,46%, and 135,45% and 133,94% in the animals from the control group.

Hormonal stimulation with melatonine implants results in increased prollificacy by 17,18%

тостта с 17,18% през първата година и с 4,52% през втората година.

Подобни са резултатите при мета-анализи на Palacin et al. (2011), които установяват, че мелатониновите импланти увеличават плодовитостта с 10,0% при порода Мерино.

during the first year and 4,52% during the second year.

Similar are the results from the meta-analyses carried out by Palacin et al. (2011), stating that the melatonine implants increase prollificacy by 10,0% in the Merino sheep breed.

Таблица 4. Плодовитост при породата Тракийска тънкорунна –хормонална стимулация с импланти
Table 4. Reproductive performance of Thracian Merino-hormonal stimulation with implants

Признаци Traits	I година/ I year				II година/ II year			
	Опитна Experimental		Контролна Control		Опитна Experimental		Контролна Control	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Родени агнета Born lambs	29	100	149	100	18	100	146	100
Живо родени Live borns	29	100	146	97,99	17	94,44	145	99,32
Мъртво родени Still borns	0	0	3	2,01	1	5,56	1	0,68
Плодовитост Prolificacy	-	152,63	-	135,45	-	138,46	-	133,94

На Фигура 1 е отразена заплодяемостта при двата метода на хормонална стимулация. Заплодяемостта на овцете средно за трите години след прилагане на вагинални тампони е 69,74%, а тази на контролната група е 75,68%. Опитната група е с 5,94% по-ниска заплодяемост от тази на контролната група.

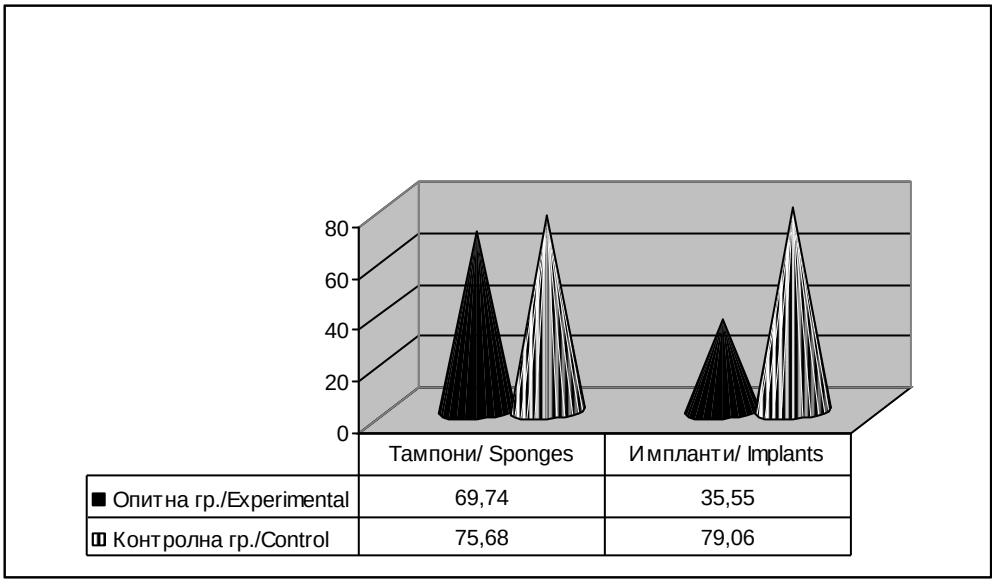
При животните третирани с мелатонинови импланти, средно за двете години заплодяемостта е 35,55%, а при нетретираните – 79,06%, като стойността на признака е с 43,51% по-ниска от тази на контролната група. Тре-

Figure 1 shows fertillity with the two methods of hormonal stimulation. The average fertillity for all three years after intravaginal sponges is 69,74%, and 75,68% for the control group animals. The experimental group animals show lower fertillity (decrease by 5,94%) in comparison with the control group animals.

For the animals treated with melatonine implants, the average fertillity for the two study years is 35,55% and for the untreated animals – 79,06%. The impregnation rate in the trial group animas is lower than that of the

тираните с интравагинални тампони овце са с 34,19% по-висока заплодяемост в сравнение с третираните с мелатонинови импланти животни.

control group by 43,51%. The animals treated with intravaginal sponges show higher fertillity (increase by 34,19%) in comparison with the animals treated with melatonine implants.



Фиг. 1. Заплодяемост на Тракийска тънкорунна порода след хормонална стимулация (%)
Fig. 1. Fertillity of Tracian Merino breed after hormonal stimulation (%)

На Фигура 2 е представен ефекта от двата метода за хормонална стимулация. Опитната група животни, третирани с вагинални тампони средно за трите години е с плодовитост 134,57%, а тези от контролната група с 127,21%. Плодовитостта е по-висока със 7,36% при опитната група.

Плодовитостта на овцете третирани с мелатонинови импланти средно за двете години е 146,88% а на контролната група 134,7%. Опитната група е с

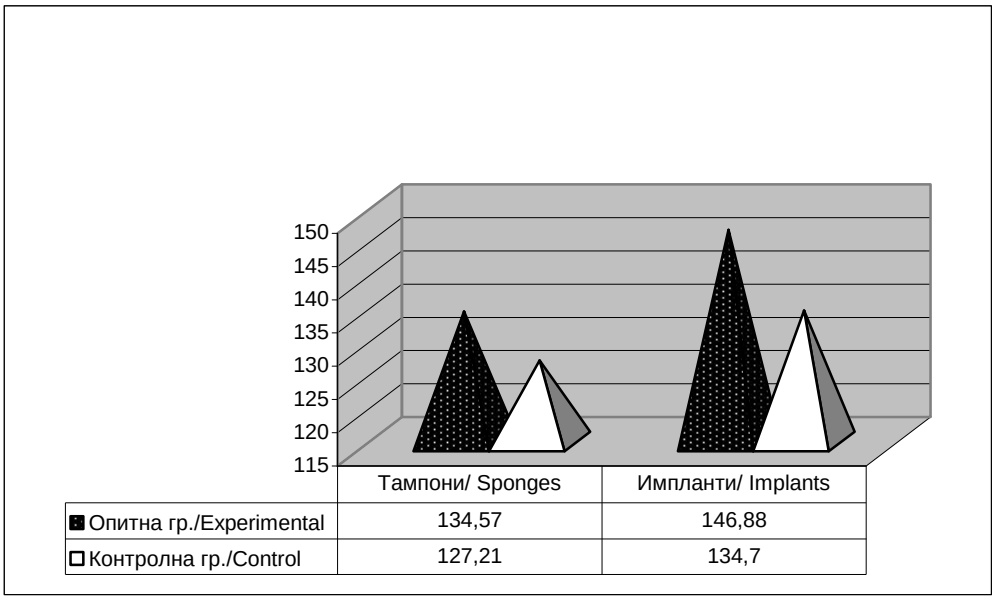
Figure 2 shows the effect from the two methods for hormonal stimulation. The animals from the experimental group treated with intravaginal sponges show average prollificacy for the tree years of 134,57%, and 127,21% for the control group animals. The trial group shows increased prollificacy by 7,36%.

The average prollificacy of the animals treated with melatonine implants for the two years is 146,88%, and that of the control group-134,7%. The trial

12,18% по-висока плодовитост от тази на контролната група.

Овцете, хормонално стимулирани с вагинални тампони, са с 12,31% по-ниска плодовитост от тези с мелатонинови импланти.

group shows increased prollificacy by 12,18% in comparison with that of the control group. Ewes, hormonally stimulated with intravaginal sponges, show lower prollificacy (decrease by 12,31%) than the animals treated with melatonine implants.



Фиг. 2. Плодовитост на Тракийска тънкорунна порода след хормонална стимулация (%)
Fig. 2. Prollificacy of Tracian Merino breed after hormonal stimulation (%)

Прилагането на хормонална стимулация води до увеличаване на плодовитостта при овцете от породата Тракийска тънкорунна. Заплодяемостта е по-висока след хормонална стимулация с прогестеронови тампони, но плодовитостта е по-висока при третираните овце с мелатонинови импланти.

The application of hormonal stimulation increase productivity in animals from the Thracian Merino breed. Fertillity is higher after hormonal stimulation with progesterone sponges, but prollificacy is higher in animals treated with melatonine implants.

ИЗВОДИ

При третираните с вагинални тампони овце заплодяемостта е незначително по-висока от тази на нетретираните с 0,16% първата година, и по-ниска втора и трета година, съответно с 10,21% и 10,48%.

Прогестероновите тампони увеличават плодовитостта при овцете-майки и през трите проучвани години, съответно с 18,14%, 36,16% и 13,37%.

Заплодяемостта на третираните с импланти овце е по-ниска с 49,81% първата година и с 33,43% през втората година. Мелатониновите импланти увеличават плодовитостта с 17,18% и с 4,52%.

Плодовитостта при тънкорунните животни се увеличава средно със 7,36 % при използване на тампони и с 12,18 % при използване на импланти в сравнение с неподложените на хормонална стимулация.

Третираните с интравагинални тампони овце са с 34,19% по-висока заплодяемост, но с 12,31 % по-ниска плодовитост в сравнение с третираните с мелатонинови импланти животни.

CONCLUSIONS

Fertillity of treated with intravaginal sponges ewes is slightly higher than that of the untreated with 0.16% in the first year and lower in the second and third year, respectively 10.21% and 10.48%.

Progesterone sponges increase prolificacy in ewes during the three years studied, respectively 18.14%, 36.16% and 13.37%.

Fertillity of the ewes treated with implants is lower by 49.81% the first year and by 33.43% in the second year. Melatonin implants increase prolificacy by 17.18% and 4.52%.

Prolificacy in animals fine fleece is increased by an average of 7.36% using the intravaginal progestone sponges and to 12.18% when using implants compared with untreated hormonal stimulation.

Treated with intravaginal sponges sheep are 34.19% higher prolificacy, but with 12.31% lower fertility compared to treatment with melatonin implants animals.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Бонев Г.** Контрол на репродукцията при овцете. Асистирана репродукция. Икономическа обосновка на методите, 2012, презентация.

2. **Методиев Н., Тодоров Н., Райчева Е.** Половоциклична дейност и използване на нехормонални методи за уплътняване на заплождането и

REFERENCES

1. **Bonev G.** Control of reproduction in sheep. Assisted reproduction. Economic motivation methods, 2012, *presentation*. (in Bulgarian)

2. **Caja G., Salama A. A. K., Carné S., Albanell E., Such X., Casals R.** Lactational and reproductive effects of

увеличаване на плодовитостта при овце от породата Ил дьо Франс. *Животновъдни науки*, 2010, № 3:15-23 с.

3. **Ралчев И., Методиев Н., Райчева Е.** Изпитване ефективността на схеми за индуциране на синхронен еструс при овце от породата Ил дьо Франс чрез прилагане на прогестагени и PMSG. *Сборник доклади от научна конференция "Традиции и съвременност във ветеринарната медицина", Лесотехнически университет,* 2011, София.

4. **Славова П., Димова Н., Лалева Ст., Попова Й.** Проучване връзката между ОТС и продуктивните признаци на овцете при стандартно запложданe и след прилагане на хормонална схема за индуциране на еструс и стимулиране на овулацията, *International scientific on-line journal "Science & Technologies", "Union of Scientists - Stara Zagora", Bulgaria,* 2012, Volume II, № 5 Animal studies & Veterinary medicine, 40-46 с.

5. **Caja G., Salama A. A. K., Carné S., Albanell E., Such X., Casals R.** Lactational and reproductive effects of melatonin in lactating dairy ewes mated during spring. *J. Anim. Sci.,* 2008, Vol. 86, E-Suppl. 2/J. Dairy Sci. Vol. 91, E-Suppl. 1.

6. **Lopez S. A., Inskeep E.K.** Response of ewes of mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. *Livestock Production Science, February,* 1991, Vol. 27, Issues 2-3, pp. 177-184.

7. **Metodiev N., Raicheva E.** Effect of the short-term progestagen treatments plus PMSG prior ram introduction on the estrus synchronization and the fertility of Ile de France ewes in the beginning of mating season. *Biotechnology in animal husbandry,* 2011, Book 2: 1157-1166.

8. **Pădeanu I., Voia S., Găvojdian D., Mircu C., Pascal C., Sauer Maria, Rău V., Frăţilă I.** Effect of Using Melatonin Implants on Postpartum melatonin in lactating dairy ewes mated during spring. *J. Anim. Sci*., 2008, Vol. 86, E-Suppl. 2/J. Dairy Sci. Vol. 91, E-Suppl. 1.

3. **Lopez S. A., Inskeep E.K.** Response of ewes of mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. *Livestock Production Science, February,* 1991, Vol. 27, Issues 2-3, pp. 177-184.

4. **Metodiev N., Raicheva E.** Effect of the short-term progestagen treatments plus PMSG prior ram introduction on the estrus synchronization and the fertility of Ile de France ewes in the beginning of mating season. *Biotechnology in animal husbandry,* 2011, Book 2: pp.1157-1166.

5. **Metodiev N., Todorov N. Raicheva E.** Sexual activity and use of non-hormonal methods for synhronization of fertility and increasing litter size of ewes of Ile-de-France breed. *Journal of Animal Science,* 2010, №3, pp. 15-23. (in Bulgarian)

6. **Pădeanu I., Voia S., Găvojdian D., Mircu C., Pascal C., Sauer Maria, Rău V., Frăţilă I.** Effect of Using Melatonin Implants on Postpartum Reproductive Indices in Tigaia Sheep Breed. *Animal Science and Biotechnologies*, 2012, 45 (2), pp. 462-465.

7. **Palacin I., Forcada F., Abecia J. A.** Meta-analysis of the efficacy of melatonin implants for improving reproductive performance in *sheep. Spanish* Journal of Agricultural Research, 2011, 9(3), pp. 730-743.

8. **Raltchev I. Metodiev N. Raicheva E.** Testing the effectiveness of schemes to induce synchronous oestrus in sheep breed Ile de France by applying progestogens and PMSG. *Proceedings of the conference "Traditions and Modernity in veterinary medicine," University of Forestry*, 2011, Sofia. (in Bulgarian)

9. **Slavova P., Dimova N., Laleva S., Popova Y**. Investigation of the relationship between body condition score and production performance in

Reproductive Indices in Tigaia Sheep Breed. *Animal Science and Biotechnologies,* 2012, 45 (2), pp.462-465.

9. **Palacin I., Forcada F., Abecia J. A.** Meta-analysis of the efficacy of melatonin implants for improving reproductive performance in sheep. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2011, 9(3), 730-743.

10. **Slavova, P., Laleva S., Popova Y.** Comparative study of fertility in a standard mating procedure and after hormonal treatment to induce oestrus and ovulation, *10th International Symposium „Modern Trends in Livestock production", Zemun- Belgrade, Serbia,* 2013, 2-4 October, pp. 952-958.

sheep with standart mating and after application of hormone scheme to induce oestrus and ovulation induction. *International scientific on-line journal "Science & Technologies", "Union of Scientists - Stara Zagora", Bulgaria,* 2012, Volume II, № 5 Animal studies & Veterinary medicine, pp. 40-46. (in Bulgarian)

10. **Slavova P., Laleva S., Popova Y.** Comparative study of fertility in a standard mating procedure and after hormonal treatment to induce oestrus and ovulation, *10th International Symposium „Modern Trends in Livestock production", Zemun- Belgrade, Serbia,* 2013, 2-4 October, pp. 952-958.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (28-41)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Окрехкотяващ ефект на растителни протеази бромелаин и папаин върху биволско месо

Мария Донева, Светла Дянкова*, Даниела Митева, Петя Методиева

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. Черни връх 53, 1407 София, България
**E-mail: svetla.diankova@ikht.bg*

Tenderization effect of plant proteases bromelain and papain on buffalo meat

Maria Doneva, Svetla Dyankova*, Daniela Miteva, Petya Metodieva

Institute of Cryobiology and Food Technologies, *53 Cherni Vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria*

РЕЗЮМЕ

Крехкостта е едно от най-важните вкусови качества на месото. Целта на настоящата разработка е проучване окрехкотяващия ефект на растителни протеази бромелаин и папаин върху биволско месо. Експериментите са проведени с проби сурово месо при 3 варианта концентрации на ензимните разтвори (50 U/ml, 100 U/ml и 200 U/ml) и 3 варианта продължителност на обработка (24h, 48h, 72h). При третиране с разтвори имащи 50 U/ml и 100U/ml казеинолитична активност, процентът на задържане на вода е по-висок, а степента на хидролиза по-ниска. Пробите биволско месо, обработени с папаин съхраняват консистенцията, свежия цвят и влага на месото, в сравнение с вариантите, окрехкотявани с бромелин. Установени са оптималните условия за процеса на хидролиза, при които се отчитат минимална загуба на белтък и запазване на органолептичните качества на месните проби.

Ключови думи: окрехкотяване, биволско месо, бромелаин, папаин

SUMMARY

Tenderness is one of the most important flavor characteristics of the meat. The aim of this study is to investigate tenderization effect of plant proteases bromelain and papain on buffalo meat. Experiments are conducted with samples of raw meat in 3 different concentration levels of the enzyme solutions (50U/ml 100U/ml and 200 U/ml) and in 3 different time periods (duration) of treatment (24 h, 48 h, 72h). Upon treatment with solutions of 50 U/ml and 100 U/ml caseinolytic activity, the water retention rate is higher, while the degree of hydrolysis is lower. The processing of buffalo meat with papain preserves higher level native texture, color and moisture of fresh meat compared to variants tenderized with bromelain. The optimal conditions for hydrolysis with minimal loss of protein and highest retention of organoleptic qualities of the meat samples are established.

Keywords: tenderization, buffalo meat, bromelain, papain

УВОД

Качеството на месото се определя като комбинация от сензорни и технологични характеристики, като крехкост, цвят, капацитет на задържане на вода и текстура (Istrati et al., 2014).

Крехкостта е един от най-важните фактори за потребителите. Тази характеристика повлиява вкусовото възприемане и удовлетвореност при консумацията на биволско месо (Brooks et al., 2000; Morgan et al., 1991). Крехкостта зависи от структурната цялост на миофибрилите и на съединителната тъкан, която обгражда мускулните влакна. Установено е, че при стареене на животните, биволското месо става по-жилаво, което в структурно отношение се дължи на образуването на множество напречни връзки между молекулите на колагена (Ionescu et al., 2008). През последните години се наблюдава засилен интерес и развитие на методите за производство на месо с повишена крехкост, като едновременно се запазват хранителните му качества (Koohmaraie, 1996; Georgieva & Nacheva, 2007).

Има различни химически и физически методи за обработка на месо, но използването на протеолитични ензими е един от най-популярните методи окрехкотяване (Naveena at al., 2004).

В месопреработката ензимите са интересни технологични инструменти, защото дават въз-

INTRODUCTION

The quality of the meat is defined as a combination of sensory and technological characteristics, such as color, tenderness, water-holding capacity and texture (Istrati et al., 2014).

Tenderness is one of most important meat texture attributes which affects the perception of buffalo meat, by the customers (Brooks et al., 2000; Morgan et al., 1991).

Fragility depends on the structural integrity of the myofibrils and of connective tissue which surrounds the muscle fibers. It has been found that in aged animals, buffalo meat becomes more resilient, which structurally is due to the formation of multiple cross links between collagen molecules (Ionescu et al., 2008).

In the recent years interest is the development of better methods to produce meat with improved tenderness whilst preserving its nutritional qualities (Koohmaraie, 1996; Georgieva & Nacheva, 2007).

There are various chemical and physical methods for meat processing, but the use of proteolytic enzymes is one of the most popular methods for tenderization (Naveena at al., 2004).

In the meat processing, enzymes are interesting technological tools because they

можност в модифицирани условия в особено сложни среди да се провежда целево протичане на високо специфични химични реакции. Източници на ензими за окрехкотяване с практическо значение са: естествените про-теолитични ензими в месото, ензими от микробен произход и ензими с растителен или животински произход.

Окрехкотяването на месото по време на следкланичното зрене до голяма степен се дължи на действието на ензими, които са ендогенни за мускулите. Поради протичане на процеса автолиза обаче, ензимите в мускулната тъкан се инхибират и бързо изчерпват своя капацитет. Ето защо протеолитичната хидролиза от ендогенните ензими в следкланичня период е с ограничена ефективност (Taylor et al. 1995).

Протеолитични ензими, извлечени от растения като папаин, бромелаин, фицин и др. са широко използвани като месни окрехкотители в повечето части на света (Sunantha and Saroat, 2011). Растителните протези се предпочитат пред ензимите от микробен произход главно поради безопасността, липса на патогенност и други неблагоприятни ефекти (Qihe et al. 2006).

Настоящето проучване е насочено към оценка на окрехкотяващия ефект на растителните протеази бромелаин и папаин върху сурово биволско месо и определяне на оптималните условия за процеса на хидролиза.

enabling the conduction of highly specific chemical reactions.

Sources of enzymes for tenderization with practical importance are: natural proteolytic enzymes in meat, enzymes of microbial origin and enzymes of vegetable or animal origin.

Meat tenderization in postmortem maturation is a result of endogenous enzyme activity in the muscles.

However, the ensuing biochemical process of autolysis causes enzyme inhibition.
Therefore, the proteolytic hydrolysis of the endogenous enzymes in the postmortem period is of reduced efficacy (Taylor et al. 1995).

Proteolytic enzymes derived from plants such as papain, bromelain, ficin, etc. have been widely used as meat tenderizers in most parts of the world (Sunantha and Saroat, 2011). Plant proteases are superior to bacterial derived enzymes mainly because of safety problems such as pathogenicity or other disadvantageous effects (Qihe et al. 2006).

The aim of presented study is evaluating the tenderization effect of the plant proteases bromelain and papain over raw buffalo meat and determining the optimal conditions for the process of hydrolysis.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Материали

Месо – *Biceps femoris* мускул от бивол, порода Българска Мурра.

Ензимни препарати – папаин (Merck), бромелин (Merck).

Методи

Ензимна обработка на проби от биволско месо – месните проби се третират с бромелаин или папаин при вариране на концентрацията на ензимите и времетраенето на процеса.

Ензимни разтвори

От двата ензима се приготвят разтвори със следната казеинолитична активност – I (50 U/ml), II (100 U/ml), III (200 U/ml), чрез разтваряне в разтворител, съдържащ 0,9% NaCl, натриев хидрогенкарбонат и лимонена киселина. Активната киселинност на ензимните разтвори е pH 6,30.

Измерване на капацитет за задържане на вода.

Проби от месо от 3-5 грама се избърсват с филтърна хартия за премахване на повърхностната вода и се претеглят с точност до mg. Тази стойност се отбелязва като тегло на сурово месо (начално тегло). Пробите се третират със съответните разтвори на бромелаин и папаин при 4°C в продължение на 24, 48 и 72 часа, след което повърхностната вода се отстранява с филтърна хартия. Успоредно с опитните варианти се залагат контроли за всеки час от обработката, като

MATERIAL AND METHODS

Materials

Meat – *Biceps femoris* buffalo muscle, breed Bulgarian Murrah.

Enzymes – papain (Merck), bromelain (Merck).

Methods

Enzymatic processing of buffalo meat samples – The meat samples are treated with bromelain or papain with alternating enzyme concentration and duration of the process.

Enzyme solutions

Both enzyme solutions are with the following caseinolytic activity – I (50U/ml), II (100U/ml), III (200U/ml). The enzymes are dissolved in a solvent containing 0,9% NaCl, sodium hydrogen carbonate and citric acid. The active acidity of the enzyme solutions is pH 6,30.

Measuring the Water Retention Capacities

Meat samples of 3-5 grams are wiped with filter-paper to remove surface water and to weigh accurately in milligrams. This value is noted as raw meat weight (starting weight). The samples are then treated with bromelain and papain solutions at 4ºC for 24, 48 and 72 hrs.

Then, the surface water is removed with filter-paper. Alongside the samples, controls are assigned every full hour of treatment, in which the meat is

месото се поставя в маринатата, в която липсва разтворен ензим. Претегля се обработеното месо и тази стойност е теглото след ензимно третиране (крайно тегло). Определя се процент за задържане на вода.

Ензимна активност

Казеинолитичната активност на протеазите папаин и бромелаин, се измерват с помощта на казеин като субстрат в 50 mM Tris / HCl буфер при pH 8.0 с 1 mM $CaCl_2$, съгласно метода от Chen et al. (2003). Една единица на ензимната активност се определя като количеството ензим, което освобождава 1µg тирозин от казеина за 1 min.

Количествено определяне на свободни аминокиселини – тест с нинхидрин (Murariu et al., 2003).

Проби от 2,0 g мускулна или съединителна тъкан се заливат с 40 ml от съответния ензимен разтвор и се инкубират на стайна температура в продължение на 72 часа, след което се определя концентрацията на свободните аминокиселини в разтворимите фракции след ензимната хидролиза.

Статистически анализ

Всички резултати са представени като средни стойности ±SD (стандартно отклонение) при най-малко три повторения за всяка проба. Статистически анализ се извършва чрез Т-тест. Резултатите се считат за достоверни при p<0,05. Всички статис-

placed inside enzyme-free marinade. The processed meat is weighed and is assigned value after enzyme treatment (final weight). A water retention percentage is determined.

Enzymatic activity

The caseinolytic activity of the proteases papain and bromelain is measured by the substrate casein in a 50mM Tris/ HCl buffer at pH 8.0 with 1mM $CaCl_2$, in accordance with Chen et al. (2003) method. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme needed to release 1 µg tyrosine from casein for 1 minute.

Quantity assessment of free amino acids – ninhydrin test (Murariu et al., 2003).

Samples of 2.0 g muscle or connective tissue are flooded with 40 ml of the enzyme solution and incubate at room temperature for 72 hours, then determine the concentration of free amino acids in soluble fractions after enzymatic hydrolysis.

Statistical analysis

All data are presented as means ±SD (standard deviation) for at least three replications for each prepared sample. Statistical analysis was performed using two-sample t-test. The results are considered to be significant when P<0,05. All statistical analyses

тически анализи се извършват с Excel 2013.

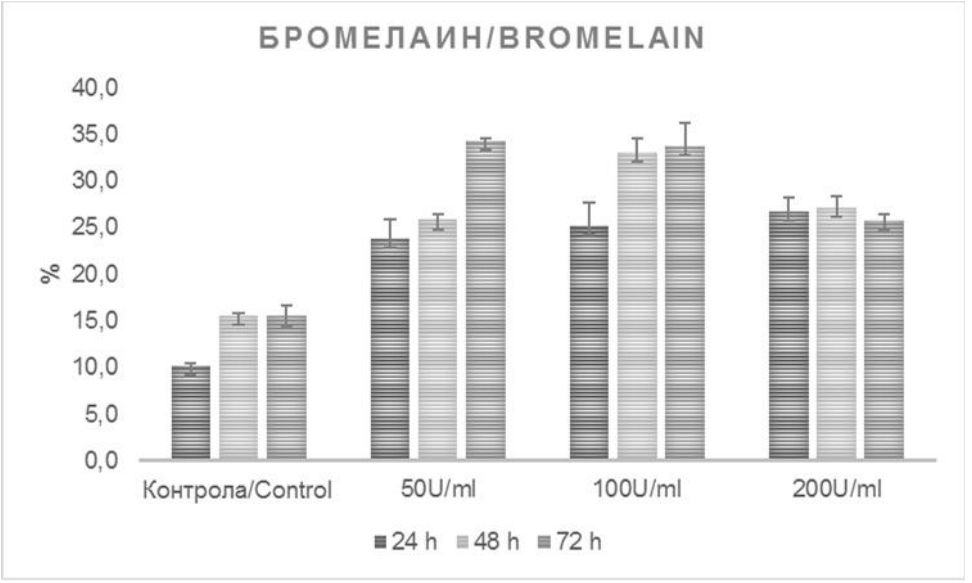
were performed using Excel 2013.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

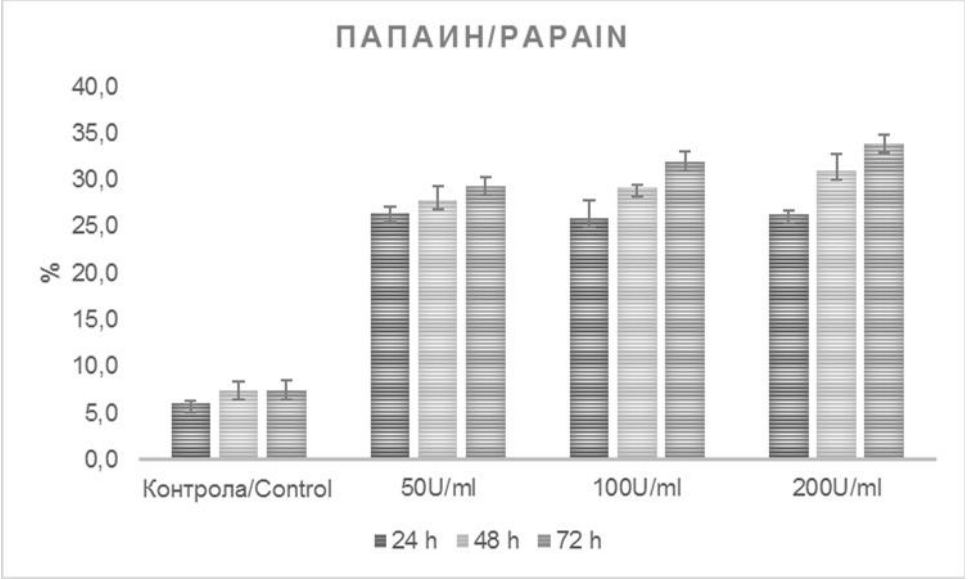
Запазването на сочен и свеж вид на биволското месо е важен показател за потребителите. Ето защо в нашето изследване беше проследена промяната в капацитета за задържане на вода на месо, инкубирано в ензимни разтвори тип марината. Отчетени бе теглото на контролните и опитни варианти обработени със съответните разтвори на бромелаин и папаин в продължение на 24, 48 и 72 часа. Въз основа на отчетните разлики в теглото, за всеки вариант обработка е изчислен капацитет за задържане на вода в проценти (Фиг. 1, 2)

RESULTS AND DISCUSSION

Preservation of juicy and fresh look of buffalo meat is an important indicator for consumers. Therefore, in our study had traced the change in capacity for water retention of the meat, incubated in enzyme solutions type of marinade. It was reported the weight of the control and experimental variants processed with corresponding solutions of bromelain and papain and left for the forthcoming 4°C for 24, 48 and 72 hours. Based on the accounting differences in the weight of each option is calculated processing capacity for water retention in percentages (Fig. 1, 2)



Фиг. 1. Капацитет за задържане на вода след обработка с бромелаин (±SD)
Fig. 1. Water retention capacity after bromelain processing (±SD)



Фиг. 2. Капацитет за задържане на вода след обработка с папаин (±SD)
Fig. 2. Water retention capacity after papain processing (±SD)

Посочените резултати показват, че при обработка с разтвори имащи 50 U/ml и 100 U/ml казеинолитична активност, процентът на задържане на вода нараства с увеличаване времето на третиране и концентрацията на ензима. При хидролиза с 200 U/ml, с нарастване времето на третиране с ензима бромелин се отчита намаляване на теглото на опитните варианти. Това се дължи на по-висока степен на хидролиза на месните протеини, съответно на желатинизиране на пробите и освобождаване на крайни пептиди и аминокиселини. По-лек е ефектът на ензима папаин. При тези опитни варианти се наблюдава повишаване на процента на задържане на вода, дори при най-висока концентрация на

The above results indicate that, under treatment with solutions having the 50 U/ml and 100 U/ml caseinolytic activity, the rate of water retention increases with increasing time of treatment and the concentration of the enzyme. Upon hydrolysis with 200 U/ml, with a rise time of treatment with the enzyme bromelain is reported weight loss of experimental variants. This is due to the higher degree of hydrolysis of meat proteins, respectively, of the gelatinization of samples and release the terminal peptides and amino acids. Lighter effect is observed with the enzyme papain. In these experimental variants have seen a rise in the percentage of water retention, even at the highest concentration of enzyme and working up to 72 hours. Also

ензима и обработка до 72 часа. Също така пробите окрехкотени с папаин имат по-свеж цвят и по-добър външен вид, в сравнение с пробите, третирани с бромелаин.

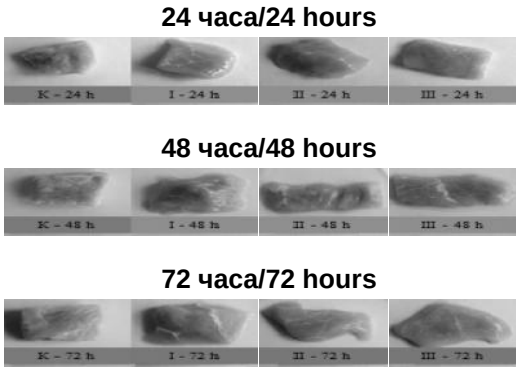
Бромелаинът и папаинът са растителни цистеинови ендопептидази. Бромелаинът е неспецифична протеаза, която атакува с повишен афинитет пептидните връзки между аминокиселините лизин и аргинин. Папаинът хидролизира пептидните връзки в белтъчните молекули, с изключение на тези, в чието изграждане участват аминокиселините пролин и глутаминова киселина с дисоциирана карбоксилна група.

Влиянието на ензимите при окрехкотяване върху външния вид на месото е важен фактор при избора на ензим и условия на обработка.

samples tenderized with papain have crisp color and better appearance, in comparison with the samples treated with the bromelain.

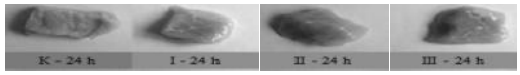
Bromelain and papain are vegetable cysteine endopeptidases. Bromelain is a non-specific protease, which attacks the peptide bonds between lysine and arginine in protein molecules with high affinity. Papain hydrolyzes the peptide bonds in protein molecules with the exception of those composed of amino acids proline and glutamic acid with a dissociated carboxyl group.

The influence of enzymes in tenderization on the appearance of the meat is an important factor in the choice of enzyme and conditions of processing.

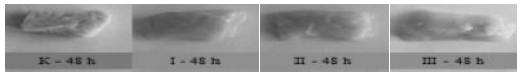


Фиг. 3. Контролни и опитни варианти месни проби обработени с бромелаин
Fig. 3. Control and experimental variants processed with bromelain

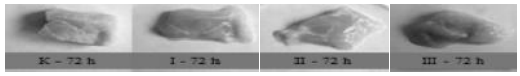
24 часа/24 hours



48 часа/48 hours



72 часа/72 hours



Фиг.4. Контролни и опитни варианти месни проби обработени с папаин
Fig. 4. Control and experimental variants processed with papain

От представения снимков материал на Фиг. 3 и 4 се вижда че месните проби обработени с 50 и 100 U/ml бромелаин и папаин до 24-тия час запазват своя цвят и свеж вид. На външен вид структурата на тези опитни варианти е подобна на контролните и се наблюдават подредени мускулни влакна. На някои от пробите от 48 и 72 час мускулните влакна започват да се деформират и разрушават, цвета избледнява, а повърхността на пробите става слузеста. Тази промяна във вида на месните проби е по-засилена при обработка с ензима бромелаин. Дисоциация на мускулните влакна в такава степен е нежелана, тъй като за потребителите добрият външен вид на продукта е от особено значение.

Степента на протеолитична активност на ензимите папаин и бромелаин върху месните протеини в проби сурово биволско месо беше определена чрез анализ на количеството свобод-

In the following visual materials (Fig.3 and 4) it is clear that the meat samples processed with 50 and 100 U/ml bromelain and papain for 24 hours retain their color and fresh look. In appearance, the structure of these experimental variants is similar to both control and monitor arranged muscle fibers. The samples from 48 and 72 hour especially muscle fibers start to deform and break down, the color fades and the surface of the samples it slimy. This change in the types of meat samples is more intense in the treatment with the enzyme bromelain. Dissociation of muscle fibers in such a degree is not desirable, since the appearance of the product is of particular importance for the consumers.

The degree of activity of proteolytic enzymes papain and bromelain on meat proteins in samples raw buffalo meat was determined by analyses of the amount of free amino acid in the

ни аминокиселини в реакционната течност. Анализът бе проведен след престой на месните проби за 72 часа във вариантите ензимни разтвори. Получените резултати са представени на Таблица 1.

reactive liquid. The analysis was carried out after a stay of the meat samples from 72 hours in enzymatic solutions. The results obtained are presented in Table 1.

Таблица 1. Съдържание на свободни аминокиселини в реакционната течност след ензимна хидролиза на проби месо (±SD)
Table 1. Free amino acid content in the reactive liquid after enzyme hydrolysis of samples meat (±SD)

Варианти Variants	Концентрация mg/ml Concentration mg/ml	
	Бромелаин Bromelain	Папаин Papain
Контрола / Control	1,040±0,060	1,040±0,060
I	1,900±0,130*	1,353±0,052**
II	2,170±0,082**	1,373±0,064**
III	2,430±0,030**	1,455±0,120**

[1] Статистически значими разлики спрямо контролната група при: *p<0,05; **p<0,01
[1] Significantly different from the control group at: *p<0,05; **p<0,01

Паралелно бе проведен тест за отчитане въздействието на изследваните протеази върху съединителна тъкан от биволско месо. Резултатите от анализа са посочени в Таблица 2.

Parallel test was held for research of proteases surveyed on the connective tissue of the buffalo meat. The results of the analysis are given in Table 2.

Таблица 2. Съдържание на свободни аминокиселини в реакционната течност след ензимна хидролиза на проби съединителна тъкан (±SD)
Table 2. Content of free amino acids in the reaction liquid after the enzymatic hydrolysis of samples connective tissue (±SD)

Варианти Variants	Концентрация mg/ml Concentration mg/ml	
	Бромелаин Bromelain	Папаин Papain
Контрола / Control	0,730±0,016	0,730±0,016
I	1,952±0,047**	1,762±0,024**
II	2,926±0,033**	2,382±0,076**
III	5,081±0,094**	3,944±0,230**

[1] Статистически значима разлика спрямо контролната група при: *p<0,05; **p<0,01
[1] Significantly different from the control group at: *p<0,05; **p<0,01

Анализът на резултатите от Таблица 1 и 2 показва, че като екзогенни ензими бромелаина и папаина имат протеолитична активност към месото като субстрат и хидролизират отделни компоненти от месните протеини. Също така тези растителни протеази показват и значителна хидролитична активност към съединителната тъкан, което води до по-ефективно окрехкотяване на биволското месо. По-високо количество свободни аминокиселини се отчита и в двата проведени експеримента при вариантите, обработвани с разтвори на бромелаин. Получените резултати са статистически значими ($P < 0,05$).

Това показва по-висок афинитет на този ензим спрямо месните проби от биволско месо, което е причина за разграждане на повече миофибриларни протеини и съответно по-високо съдържание на свободни аминокисилини в реакционната течност.

Хидролиза в такава степен е нежелана, тъй като това води до по-високо ниво на разрушаване на структурата на месото и мускулните влакна и съответно влошаване на неговата текстура. За да се постигне окрехкотяване, но без структурна деградация на биволското месо, обработката с ензимни разтвори тип маринатa трябва да бъде внимателно дозирана и проследявана.

Препоръчва се третирането на биволското месо да се

The analysis of the results from Table 1 and 2 shows that as exogenous enzymes bromelain and papain have proteolytic activity to the meat as a substrate and they hydrolyzing individual components of meat proteins.

Also these plant proteases show significant hydrolytic activity to the connective tissue, which leads to more effective tenderization.

A higher amount of free amino acids is reported in both conducted experiments in variants treated with solutions of bromelain.

The obtained results are statistically significant ($P < 0,05$).

It shows higher activity of this enzyme in relation to meat samples of buffalo meat, which is the reason for degradation of more myofibrillar proteins and therefore higher levels of free amino acids in the reaction liquid.

Hydrolysis in such an extent is non-desired, as this leads to a higher level of destruction of the structure of the meat and muscle fibers and therefore deterioration of its texture. In order to achieve tenderization, but without structural degradation of buffalo meat processing with enzyme solutions type marinade should be carefully dosed and monitored.

It is recommended that treatment of buffalo meat to be

извърши с ензима папаин при следните параметри: концентрация на ензима в мариноващия разтвор 50 U/ml, времетраене до 24 часа, при 4°C., последвано от термична обработка, при което се получава пълно инактивиране на ензимната компонента.

made with the enzyme papain in the following parameters: concentration of the enzyme in the marinating solution 50 U/ml, lasting up to 24 hours at 4°C, followed by heat treatment, in which case it gets full inactivation of the enzyme components.

ИЗВОДИ

Правилното определяне на времето и температурата на ензимна хидролиза, са условията за ефективно окрехкотяване на биволско месо. В проведените експерименти варирахме 3 концентрации на ензимните разтвори (50 U/ml, 100 U/ml и 200 U/ml и 3 варианта продължителност на обработка (24h, 48 h, 72 h).

При обработка на опитните варианти с разтвори имащи 50 U/ml и 100U/ml казеинолитична активност, процентът на задържане на вода нараства с увеличаване времето на третиране и концентрацията на ензима.

Анализът на съдържание на свободни аминокиселини показа, че и двата ензима (бромелаин и папаин) хидролизират белтъчните комплекси, присъстващи в месото (и съединителна тъкан). Обработката на биволско месо с ензима папаин, в по-висока степен съхранява консистенцията, свежият цвят и влага на месото, което прави този ензим подходящ за включването му в разтвори тип маринатата за подобряване крехкостта на биволско месо.

CONCLUSIONS

Proper timing and temperature of enzymatic hydrolysis, are the conditions for effective tenderization of buffalo meat. In the experiments been varied 3 concentrations of the enzyme solutions (50 U/ml 100 U/ml, and 200 U/ml and duration of treatment 3 options (24h, 48h, and 72h).

In processing test variants with solutions having the 50 U/ml 100U/ml caseinolytic activity, the rate of water retention increases with increasing time of treatment and the concentration of the enzyme.

The analysis of the content of free amino acids showed that both enzymes (bromelain and papain) hydrolyze protein complexes present in the meat (and connective tissue). The processing of buffalo meat with enzyme papain have better preservation ability, the fresh color and moisture of the meat, which makes this enzyme suitable for inclusion in the solutions type marinade to improve fragility of buffalo meat.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Георгиева Л., Начева И.** Биотехнологични аспекти на качеството и безопасността на храните, *Хранителна промишленост,* 2007, № 2, с. 36-39.
2. **Brooks J. C., Belew J. B., Griffin D. B., Gwartney B. L., Hale, D. S., Henning W. R., Johnson D. D.,Morgan J. B., Parish F. C., Reagan Jr. J. O., Savell J. W.** National beef tenderness survey- 1998. *Journal of Animal Science,* 2000, No. 78, pp. 852-1860.
3. **Chen X. L., Zhang Y. Z., Gao P. J., & Luan X. W.** Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic strain Pseudoaltermonas sp. SM9913. *Marine Biology*, 2003, No.143, pp. 989-993.
4. **Ionescu A., Aprodu I. & Pascaru, G.** Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI—Food Technology, New Series*, 2008, pp. 9-16.
5. **Istrati D., Vizireanu C. & Dima F.** Efficiency of different type of tenderization for improving technological properties of bovine Biceps femoris muscle. *Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science*, 2014, p. 42.
6. **Koohmaraie M.** Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation processes of meat. *Meat Science*, 1996, No. 43, pp. 193-201.
7. **Morgan J.B., Miller R.K., Mendez F.M., Hale D.S. and Savell J.W.** Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. *Journal of Animal Science*, 1991, No. 69, pp. 4469-4476.
8. **Murariu M. Irimia M., Aelenei N., Drochiou G.** Spectrophotometric assay of amino acids in biological materials. *Roum. Biotechnol. Lett.,* 2003, No. 6, p. 2.

REFERENCES

1. **Brooks J. C., Belew J. B., Griffin D. B., Gwartney B. L., Hale, D. S., Henning W. R., Johnson D. D.,Morgan J. B., Parish F. C., Reagan Jr. J. O., Savell J. W.** National beef tenderness survey- 1998. *Journal of Animal Science,* 2000, No. 78, pp. 852-1860.
2. **Chen X. L., Zhang Y. Z., Gao P. J., & Luan X. W.** Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic strain Pseudoaltermonas sp. SM9913. *Marine Biology*, 2003, No.143, pp. 989-993.
3. **Georgieva L. and Natcheva I.** Biotechnology aspects of quality and food safety. *Hranitelna promishlenost (Food Industry),* 2007, Issue 2, pp.36-39. (in Bulgarian)
4. **Ionescu A., Aprodu I. & Pascaru, G.** Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI—Food Technology, New Series*, 2008, pp. 9-16.
5. **Istrati D., Vizireanu C. & Dima F.** Efficiency of different type of tenderization for improving technological properties of bovine Biceps femoris muscle. *Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science*, 2014, p. 42.
6. **Koohmaraie M.** Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation processes of meat. *Meat Science*, 1996, No. 43, pp. 193-201.
7. **Morgan J.B., Miller R.K., Mendez F.M., Hale D.S. and Savell J.W.** Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. *Journal of Animal Science*, 1991, No. 69, pp. 4469-4476.
8. **Murariu M. Irimia M., Aelenei N., Drochiou G.** Spectrophotometric assay of amino acids in biological materials. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2003, No. 6, p. 2.

9. **Naveena B. M., Mendiratta S. K. & Anjaneyulu A. S. R.** Tenderization of buffalo meat using plant proteases from Cucumis trigonus Roxb (Kachri) and Zingiber officinale roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science*, 2004, No. 68(3), pp. 363-369.
10. **Qihe C., Guoqing H., Yingchun J. & Hui N.** Effects of elastase from a Bacillus strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 2006, No. 98(4), pp. 624-629.
11. **Sunantha K. & Saroat R.** Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. *Food and Nutrition Sciences*, 2011, pp. 393-401.
12. **Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M. and Goll D.E.** Is z-disk degradation responsible for postmortem tenderization. *J. Anim. Sci.* 1995, No. 73, pp. 1351-1367.
9. **Naveena B. M., Mendiratta S. K. & Anjaneyulu A. S. R.** Tenderization of buffalo meat using plant proteases from Cucumis trigonus Roxb (Kachri) and Zingiber officinale roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science*, 2004, No. 68(3), pp. 363-369.
10. **Qihe C., Guoqing H., Yingchun J. & Hui N.** Effects of elastase from a Bacillus strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 2006, No. 98(4), pp. 624-629.
11. **Sunantha K. & Saroat R.** Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. *Food and Nutrition Sciences*, 2011, pp. 393-401.
12. **Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M. and Goll D.E.** Is z-disk degradation responsible for postmortem tenderization. *J. Anim. Sci.* 1995, No. 73, pp. 1351-1367.