Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 4, 2016, (1-16)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Акумулационен капацитет на йода в почвите и перманентния тревостой в различни райони на Средните Родопи и отражението върху йодното съдържание на овчето и кравето мляко, бялото саламурено сирене и кашкавала

Любомир Ангелов[1*], Борислав Блажев[2], Хубертус Вагнер[3]

[1] Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. „Черни връх“ 53, 1407 София, България
[2]Централна лаборатория за химични изпитвания и контрол, бул. „Никола Мушанов” 120, 1330 София, България
[3] Федерален институт по хранене и хранителни продукти, 95326 Кулмбах, Германия
**E-mail: luboangelov@abv.bg*

Iodine accumulation capacity of soils and permanent pasture in different areas of Middle Rhodope mountain and reflection on the iodine content in the sheep and cow raw milk, white brined cheese and yellow cheese

Ljubomir Angelow[1], Borislav Blazhev[2], Hubertus Wagner[3]

[1]Institute of Cryobiology and Food Technologies, 53, Cherni vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria
[2] Central laboratory for chemical testing and control, 120 Nikola Mushanov Blvd., 1330 Sofia, Bulgaria
[3] Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, E.-C. Baumann Str. 20, 95326 Kulmbach, Germany

РЕЗЮМЕ

Проучването върху обезпечаването на преживните животни по време на паша с йод разкрива несъответствия по отношение на потребностите. В началото на пасишния период съдържанието йод на трева не превишава 50% от нуждите за овце и крави. Този ефект е очевиден за региона на Средните Родопи. С напредване на вегетацията от май до юни се увеличава съдържанието на йод в ливадна растителност. Значителен спад в съдържанието на йод се достига през юли (0.08-0.12mg/kg СВ - минимум), независимо от надморската височина. Тези нива са в рамките на диапазона на пределната

SUMMARY

The study on the iodine supply to ruminants during the grazing period revealed its irregular pattern.

At the beginning of the pasture period the iodine content of grass exceeded up to 50% the needs of sheep and cow. This effect is more evident in the Middle Rhodope region. With advance of meadow vegetation from May to June increased the iodine content in grass (1000m asl.). Significant decline in the iodine content was found reaching its minimum in July (0.08-0.12 mg/kg DM) regardless of the altitude. These levels are within the marginal and chronic

обезпеченост и наличие на хроничен дефицит, с което се покриват от 30 до 40% от нуждите на организма. Естествено нарушения баланс на йодното предлагане засяга не само фауната в двата региона, но и съдържанието на йод в сурово мляко и млечни продукти. Това налага използването на допълнителни количества природни протектори като йод, селен и цинк в храненето на преживни животни по време на пашата, които са много важни за здравето и продължителността на живота на животните, които се отглеждат в ендемични планинските региони.

Ключови думи: йод, дефицит, почви, растения, краве и овче мляко, сирена, Средни Родопи

deficiency range and provide for 30 to 40% of the organism needs.

The naturally upset balance of iodine offer affects not only the fauna in both regions, but as well the iodine content in the raw milk and dairy products.

The necessitates of additional amounts of natural protectors as iodine, selenium and zinc in the nutrition of ruminants during the grazing period are very important for health and life expectance for the animals reared in endemic mountain regions.

Key words: iodine, deficiency, soils, plants, cow and ewe's milk, cheese, Rhodope Mountain

УВОД

Историята на йода започна с появата на живота и животните и продължава с праисторическия човек, чието развитие е започнало преди около 3,5 милиона и исторически приключва за 10,000-30,000 години.

Елементът е открит през 1811 г. от Courtois по време на почистване на "Kelp Pfannen" с гореща серниста киселина в кафяви водорасли. Davy and Gay-Lussac през 1814 г. идентифицират новия елемент и го нарекли "йод" (виолетови кристали). Есенциалитета и токсичността на йода са били постулирани през 1820 г. (Coindet). Предизвиканите от йодния дефицит аномалии на щитовидната жлеза зачестяват в определени региони на света. Те обикновено се наблюдава при животните и хората в планински район и континентални местообитания.

INTRODUCTION

The history of iodine started with the beginning of animal life and continues with prehistoric man, whose development started about 3.5 million and historical ending of 10,000-30,000 years.

The element was discovered in 1811 by Courtois during cleaning of "Kelppfannen" 'with hot sulphurous acid in the brown alga. Davy and Gay-Lussac in 1814 identified the new element and named it "iode" (violet crystals).

The necessity of life and toxicity of iodine were in 1820 accepted (Coindet). The iodine deficiency induced thyroid abnormalities became more frequent in certain regions of the world. They usually occurred in the livestock and people in mountain region and continental habitats.

Първото контролирано проучване при болните от гуша семейства се провежда през 1831 г. с сол – 100-500 mg I/kg храна.

Като част на хормоните на щитовидната жлеза – тироксин (T4) и трийодтиронин (T3) йода повлиява косвено много метаболитни процеси (протеин и синтез на мазнини) в организма. Както първичния така и вторичния йоден дефицит водят до недостатъчно производство на хормони в щитовидната жлеза и появата на гуша. Според данни на WHO от йоден недостиг страда почти една трета от населението на Земята (Anderson et al., 2005). Йодът се транспортира по хранителната верига от почвата, флора, фауна и хората чрез водата и въздуха. Земната кора на дълбочина 16 km съдържа около 200 μg йод/kg (Falbe и Regitz, 1989). В природата йодът се съдържа главно в минералите Bruggenit - $Ca(IO_3)_2.H_2O$, Iodargyrite - Ag, Iodembolit Ag (Cl, Br, I), Lautarit - $(CaIO_3)_2$ и Marshit-меден йодид. Съдържанието на йод от скалите варира от 0.01 до 6.0 mg/kg. Шистите могат да съдържат най-много органична материя, включително и пясъчник, варовик и доломит съдържат йод от 0.5 - 3.0 mg/kg а гранита и гнайса (0.2-0.5 mg/kg). В различните слоеве на земята се акумулират 0.1-10.0 mg I/kg. средно се съдържат около 2.8 mg I/kg (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Йодът в

The first controlled study in craw sick families took place in 1831 with 100-500 mg I/kg food salt.

As part of the thyroid hormones thyroxine (T4) and triiodthyronine (T3) affects the iodine indirectly many metabolic processes (protein and fat syntheses) of the organism. Both primary and secondary iodine deficiency leads to inadequate thyroid hormone production and goitre. According to WHO data worldwide about a third of population suffer from iodine deficiency (Anderson et al., 2005).

The iodine is transported in the food chain from soil, flora, fauna and humans via water and air. It is subject to a constant cycle. The 16 km thick crust contains about 200 μg J/kg (Falbe and Regitz, 1989). In nature, the iodine occurs mainly in the minerals Bruggenit - $Ca(IO_3)_2.H_2O$, Iodargyrit - AgI, Iodembolit Ag (Cl, Br, I), Lautarit - $(CaIO3)_2$ and Marshit - CuI. The iodine content in the rock varies from 0.01 to 6.0 mg/kg. The slate formation with high level of organic matter contained much iodine, as well as the sandstone, limestone and dolomite are abundant of iodine 0.5 - 3.0 mg I/kg than the granite and gneiss (0.2-0.5 mg/kg). The different surface of the Earth occur 0.1-10.0 mg I/kg. They contain on average most 2.8 mg I/kg (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). The iodine in the weathered

изветрели скали е свързан в по-малка степен с органичното вещество и слайда и се отмива чрез водата в реките и океаните. Той се фиксира там в морските организми (водорасли, морски организми, морски дарове). От друга страна, елементът е летлив при ниски температури и напуска океаните под формата на дийодметан (фотоокисление на органичен йод във въздуха) и достига с въздуха и дъжда отново крайбрежията на континента. Морската вода е значително богата на йод (50 μg/l), за разлика от питейната вода в непосредствена близост до брега (8-10 μg/l). В различни изолирани и планински региони в света, осигуряването на овцете с неорганични нутриенти през периода на лактацията е тясно свързан с различните фактори на околната среда, играещи ключова роля в трансфера на основни хранителни вещества по хранителната верига "почва-растение-животнински организъм-млечни продукти (Abel et al., 1997; Angelow, 2001; Angelow et al., 1996; Anke et al., 1999; Anynim, 1997). Въпреки това, голям брой от популацията при различните породи овце, показва добра приспособимост към климата и качество на фуража, което прави овцете много по-широко използвани с генетично по-голям потенциал.

Целта на това проучване е да се определи разпределе-

rocks is bound to a minor extent with the organic substance and the slide and engages with the water in the rivers and the oceans. It focuses there in marine organisms (algae, seaweed, seafood). On the other hand, the element is volatile at low temperatures and leaves the oceans in form of diiodomethane (photooxidation of organic iodine in the air) and achieved with the air and the rain again the coasts of continents.

Sea water is significant iodine reached (50 μg/l) as the drinking water in immediate vicinity of the coast (8-10 μg/l).

In different rural and mountain regions in the world, the guarantee of sheep nutrition with inorganic nutrients during the lactation period is closely related to the different environmental factors, playing a key role in the transfer of essential nutrients through the food chain “soil-plant-animal organism-milk products” (Abel et al., 1997; Angelow, 2001; Angelow et al., 1996; Anke et al., 1999; Anynim, 1997).

However, the large population size of different sheep breeds, their wide adaptability to climates and forage quality, make sheep much more widely accepted and genetically of greater potential.

The aim of this study was to determine the distribution of trace

нието на микроелемента йод по цялата хранителна верига, както и промените на съдържанието на йод в овче и краве мляко и млечните продукти (бяло саламурено сирене, кашкавал) през пасищния период.

element iodine in the entire food chain as well as the changes of iodine content in the ewe's and cow milk and dairy products (white brined cheese, yellow cheese) during the pasture period,

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Почвените, растителни, млечни проби и сирене бяха събрани през 2013 г. и 2014 г. по време на пасищния период (май-юли). Пробите от растителен произход (1 g) се варят в ерленмайерова колба с 250 ml 0,5% разтвор на NH3 в продължение на 20 минути, след това се довежда до определен обем от 200 ml. Пробите се филтруват преди измерването. За определяне на йод в млякото и сиренето, се взема 1 g сухо вещество и се разтваря в 10 ml - 0,07 N разтвор TMAH и 2 мин се хомогенизира с Ultraturax.

Пробите се разреждат до 25 ml и се измерват директно с помощта ICP-MS спрямо Te (телур) като вътрешен стандарт. Пробите от кашкавал се смесват с 4 ml H2O + 1 ml на 25% разтвор TMAH и се разлагат в продължение на 3 часа при 90°C. След охлаждане, следва центрофугиране на пробата в продължение 20 min (4000 об./min) и се прехвърлят в 25 ml мерителни колби. Анализът на пробите се извършва чрез ICP-MS (AGILENT-7500c).

MATERIAL AND METHODS

The soils, plants, milk and cheese samples were collected in 2013 and 2014 during the pasture period (May-July). The plant samples (1 g) are boiled in an Erlenmeyer flask with 250 ml of 0.5% NH_3 solution for 20 minutes and then bring to the certain volume of 200 ml. The samples are filtered prior to measurement. For determination of iodine in the milk and cheese, one gram (1g) dry substance had been taken and in 10 ml - 0,07 n TMAH solution was dissolved and 2 min by ultraturax homogenized.

The samples are diluted to 25 ml and directly measured by ICP-MS using Te as an internal standard. The yellow cheese samples were mixed with 4 ml H_2O + 1ml of 25% TMAH solution and digested for 3 hours at 90^0C.

After cooling, the sample 20 minutes centrifugation (4000 rev. / min) and in 25 ml volumetric flasks are transferred. The analysis of samples is carried out by ICP-MS (Agilent-7500c).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Концентрацията на йода в почвените проби варира от 350 до 450 µg/kg (Таблица 1). Киселият характер на почвите при двете надморски височини гарантира един нисък трансферен фактор от почвата в растението /0,22-0,31/, изхождайки от ниската запасеност с йод на изследваните почвени проби.

RESULTS AND DISCUSSION

The concentration of iodine in the soil samples ranged from 350 to 450 µg/kg (Table 1). The acidic soils at two altitudes ensure a low transfer factor of iodine from soil to plant /0.22 to 0.31/ considering that, there is a low iodine preservation of soil samples.

Таблица 1. Съдържание на йод в почвите, ливадната трева и коефициентите на транфер за района на с. Смилян (Средни Родопи)
Table 1. Iodine content in soils, pasture grass and transfer factor in the region of v. Smiljan (Middle Rhodope Mountain)

район / region	проби samples	надморска височина altitude	йод iodine µg/kg
Смилян, 2013 почви / soils	**(n=3)**	**1000m**	400±50
Смилян, 2013 растителни / plants	**(n=3)**	**1000m**	125±49
фактор на трансфер/transfer factor			**0.31**
Смилян, 2013 почви / soils	**(n=3)**	**1200m**	400±50
Смилян, 2013 растителни / plants	**(n=3)**	**1200m**	89±50
фактор на трансфер/transfer factor			**0.22**

Промяната на киселинността на почвата и геоложката структура на района влияе негативно върху трансфера на йода в ливадната трева. Тревните асоциации на 1200m акумулират с 18,8% по-малко йод в сравнение с тези на 1000 m. Детайлното проучване на Anke et al. (1993) демонстрира нагледно ролята на геоложките формации върху трансфера на йода в различни индикаторни растения (Таблица 2).

Change the acidity of the soil and geological structure of the area affects negatively the transfer of iodine in the meadow grass. Investigated grass associations located at 1200m accumulate with 18.8% less iodine than the grass samples up to 1000 m.. The detailed study of Anke et al. (1993) demonstrates the role of geological formations on the transfer of iodine in different indicator plants (Table 2).

Таблица 2. Съдържание на йод във флората в зависимост от геоложкия произход на районите
Table 2. Iodine content of the flora dependent on the geological origin of the living areas

геоложки формации **geological formation**	**относителни %** **relative %**
алувиум (alluvial deposits)	**100**
дилувиум (diluvial sand)	**95**
филит (phyllite)	**92**
сиенит (syenite)	**87**
льос (loess)	**83**
гнайс (gneiss)	**80**
шифер (slate)	**73**
пясъчник (new red sandstone)	**71**
паровик (muschelkalk)	**65**
койпер (keuper)	**61**
гранит (granite)	**54**

Концентрацията на йода за по-голяма прегледност е представена в относителни проценти. Анализираните количествата за йода в пшеницата, ръжта, люцерната и червената детелина са най-високи върху алувиалните геоложки формации, при което те получават относителна стойност 100 (всички останали стойности са релативирани спрямо алувиума). Дилувиалните и филитни геоложки структури осигуряват от 5 до 7% помалко усвоим за растенията йод, в сравнение с алувиалните геоложки формации. Междинно заема лъоса, гнайса и шифера. Триасовите геоложки формации (пясъчник, варовик, койпер) трансферират минимални количества от йод в растителността. Гранитните структури осигуряват на растенията най-малко йод (54%) в сравнение с алувиума. Съществено влияние върху транспорта на йода в ливад-

The concentration of iodine for greater clarity is represented in relative percentage.

Quantitatively analyzed for iodine in wheat, rye, alfalfa and red clover are highest on alluvial geological formations, in which they receive relative value 100 (all other values are weakening against alluvial deposits).

Diluvial sand and phyllites geological structures provide from 5 to 7 % less biologically available iodine for plants, compared with alluvial geological formations. Intermediate place take the loess, gneiss and slate. Triassic geological formations (sandstone, limestone, keuper) transfer small amounts of iodine vegetation. Granite structures provide the plants, at least iodine (54%) compared to alluvial deposits. Significant impact on the transport of iodine in the meadow vegetation

ната растителност може да окаже и концентрацията на елемента в дъждовната вода. С отдалечаване от морските басейни нивото му намалява 10-15 пъти (10 μg/l до 0.8 μg/l). Чрез валежите обаче става едно допълнително отмиване на J от повърхностно активния почвен слой (високата мобилност на J^-) и чрез подпочвените води се отлага в наносната част на реките.

Постоянният трансфер на йод върху алувиалнодилувиалните геоложки структури е предпоставка за относително по-високия акумулационен капацитет на ливадната трева от крайречните пасища. Пасищната растителност в райони разположени върху горски почви съдържа до 0,25 mg I/kg СВ. С помощта на подбрани индикаторни растения е възможно да се прецизира трансфера на йода при различните тревни асоциации (Таблица 3)

can have a concentration of elements in rainwater.

By moving away from sea water the iodine level decreased 10-15 times (10 μg/l to 0.8 μg/l). Through the rain however becomes an additional washing of iodine from surface active soil layer (high mobility of J^-) and by groundwater deposits in the alluvial part of the rivers.

The permanent transfer of iodine on alluvial-diluvial sand geological structures is a prerequisite for a relatively high accumulation capacity of meadow grass from the riverside pastures. Pasture vegetation in areas located on forest soils contain up to 0,25 mg I/kg DM. Using the selected indicator plants it is possible to adjust the transfer of iodine at different grass associations (Table 3)

Таблица 3. Съдържание на йод в някой индикаторни растения и ливадната трева през пасищния период (30.04. – 30.06.)
Table 3: Iodine content in some indicator plants and meadow grass during the pasture period (30.04. – 30.06.)

Индикаторни растения	***Indicator plants***	***йод / iodine*** (μg/kg DM)
див фий	*Victa vilosa Roth.*	*255,0*
бяла детелина	*Trifolium repens L.*	*161,3*
червена детелина /април/	*Trifolium pratense* /April/	*120,0*
червена детелина /юни/	*Trifolium pratense* /June/	*85,5*
пасищен райграс	*Lolium perenne*	*87,5*
ежова главица	*Dactilus glomerata*	*75,0*
ливадна власатка	*Festuca pratensis*	*67,5*
червена власатка	*Festuca rubra L.*	*57,4*
ливадна трева	*mixed pasture grass*	*68.9*
потребност	***requirement***	***250.0***

Съдържанието на йод във

The iodine content of the

флората подлежина минимални отклонения, които варират от 57,4 до 87,7 μg/kg СВ в пасищния райграс, ежова главица, ливадна власатка и червена власатка. Голямото вариране в съдържанието на йода в растителността при бобови растения се дължи на геоложкия произход на пасищата, разстоянието до морето или на йодната концентрация на валежите, възрастта на растителните видове. Дивият фий и бялата детелина акумулират два пъти повече йод в сравнение с ливадната трева и други индикаторни растения. С напредване на вегетацията намалява значително съдържанието на йода в червена детелина от 120 до 85,5 μg/kg СВ.

Проучването върху йодното съдържание на ливадна трева върху изследваните парцели показва динамичните промени в нивата на елемента, в зависимост от надморската височина и вегетационния стадии на различни тревни съобщества (Таблица 4).

flora is subject to minimal variations, ranging from 57.4 to 87.7 μg/kg DM in *Lolium perenne, Dactilus glomerata, Festuca pratensis and Festuca rubra L.*. The large variation in the iodine content of the vegetation of the legume is caused by the geological origin of the site, the marine distance or the iodine concentration of precipitations, plant age and plant species. *Victa vilosa Roth.* and *Trifolium repens L.* accumulated twice more iodine in comparison to mixed grass and the other indicator plants. With advance of vegetation decreased significantly the I-content in *Trifolium pratense* from 120 to 85,5 μg/kg DM.

The study on iodine content in meadow grass on the investigated plots shows the dynamic changes in the levels of element, depending on the altitude and the vegetation stages of different grass associations (Table 4).

Таблица 4: Сезонна динамика на микроелемента йод в ливадната растителност в зависимост от надморската височина и сезона (с. Смилян, Средни Родопи) (μg/kg СВ)

Table 4: Seasonal dynamics of trace elements iodine in the meadow vegetation depending on altitude and season (v. Smiljan, Middle Rhodopes) (μg/kg DM)

н.в. / Altitude	30.04.	30.05.	30.06.
800 m	148 ± 18	105 ± 15	65 ± 11
1000 m	70 ± 17	125 ± 49	36 ± 2
1200 m	134 ± 33	89 ± 50	86 ± 10

С напредване на вегетационния стадии, при тревните асоциации растящи до 800 m надморска височина се наблюдава

With advance of vegetation stage, the plants species that grow up to 800 m asl, a continuous reduction in the iodine concentration

непрекъснато намаляване концентрацията на йода. Подобни закономерности бяха намерени при растителните съобщества намиращи се на 1200 m н.в. Съдържанието на йод намалява през май с 33% (89µg/kg СВ) и остава почти без промяна до края на изследвания период. Изключение в това проучване е съдържанието на йод в тревата в зоната за изпитване на 1000 m н.в. Растителността е бедна на йод в сравнение с другите местоположения. Спад в концентрацията на йода настъпва след 30 май.

За да се оцени приноса на всеки един фураж, свързан с общото предлагане на йод, бяха включени 14 зърнени продукти и 3 сено проби (Таблица 5).

had been showed. The same principles were found in the plant communities that present at 1200 m. The iodine content decreased in May by 33% (89µg/kg DM) and remained almost unchanged until the end of the investigated period. As an exception to the rule, was the iodine content in the grass at the test area (plot-2) at 1000 m above sea level. At the beginning of grazing period, the vegetation is poorer an iodine, than the other locations. A decrease of iodine concentration occurred after May 30.

To assess the contribution of each feedstuff, connected to the total iodine supply were 14 grain products and 3 hay samples included (Table5).

Tabelle 5: Съдържание на йод в подбрани фуражни смески и храни («g/kg СВ)
Table 5. Iodine content in selected animal feed, fodder and feedstuffs(«g/kg DM)

Nr.	Fodder and feedstuffs	weight of sample	measuring units	volume	iodine content	iodine content
		g	l (µg/l)	ml	µg/kg	mg/kg
1	сено-1/ hay-1	1,003	0,4338	200	86,76	0,087
2	сено-2/ hay -2	1,000	0,4439	200	88,78	0,088
3	сено-3/ hay -3	1,000	0,3901	200	78,02	0,078
4	третикале / treticale	1,000	0,5789	200	115,78	0,12
5	слънч./sunflower meal	1,000	0,6777	200	135,54	0,14
6	пелети /pellet product	1,000	3,0700	200	614,00	**0,61**
7	смеска /feed mixture	1,000	5,8640	200	1172,80	**1,17**
8	зърно/grain concentrate	1,000	0,7124	200	142,48	0,14
9	зърно/grain concentrate	1,000	0,8628	200	172,56	0,17
10	кон.фураж / fodder	1,000	2,2420	200	448,40	0,48
11	кон.фураж / fodder	1,000	2,0720	200	414,40	0,41
12	кон.фураж / fodder	1,000	3,7770	200	755,40	0,76
13	кон.фураж / fodder	1,000	2,4670	200	493,40	0,49
14	морска сол / sea salt	0,100	**1,081**	100	1081,00	**1,08**
15	каменна сол / rock salt	0,100	0,0409	100	40,90	0,041
16	техн. сол / VIA- salt	0,100	0,0170	100	17,00	0,017
17	йодирана сол/iodized salt	0,100	**17,08**	100	17080,00	**17,08**

Съдържанията на йод в някои от използваните фуражи и концентратни смески варира между 100-1200 µg/kg /тритикале 115 µg/kg, пелети 614 µg/kg, комбиниран фураж 1172 µg/kg, концентратни смески с добавка 414-755 µg/kg/. Използването на морска и каменна сол в комбинираните фуражи променя значително съдържанието на йод /каменна сол 41 µg/kg, морска сол 1080 µg/kg/ в крайния продукт.

Съдържанието на йод в кравето и овчето мляко в изследвания район зависи изцяло от сезона и ботаническия състав на пасища. Концентрацията на йода в млечните проби варира в широки граници (Таблица 6).

The iodine content in the selected animal feed, fodder and ffeedstuffs as well as in different concentrate mixtures used in livestock, ranges between 100-1200 µg/kg (triticale 115 µg/kg, pellet 614 µg/kg, feed mixture 1172 µg/kg, full concentrate mixtures 414 - 755 µg/kg). The use of sea and rock salt in compound feed significantly change the content of iodine (rock salt 41 µg/kg, sea salt 1080 µg/kg) in the commercial products.

The iodine content in the cow and ewe's milk in the research area depends entirely on the season and botanical composition of the pastures. The concentration of iodine in the milk samples varied widely (Table 6).

Таблица 6. Влияние на сезоната динамика върху съдържанието на йод в кравето и овчето мляко
Table 6. Influence of seasonal dynamics on the iodine content in cow's and ewe's milk

Мляко / Milk		Smiljan 2014			
		I-серия I-series	II-серия II-series	III-серия III-series	1-60 ден 1^{st} - 60^{th} day
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Родопско говедо Rhodopian cattle	x	**118**	**49**	**33**	**67,7 ± 45,1**
	s	45	17	4	
Каракачанска порода Karakachan sheep	x	**95**	**87**	**152**	**111,3 ± 35,4**
	s	3	4	2	
Родопски Цигай Rhodope Tsigay	x	**88**	**85**	**144**	**105,7 ± 33,1**
	s	4	1	2	
Средно-Родопска овца Middle-Rhodope breed	x	**336**	**64**	**129**	**176,5 ± 142**
	s	8,4	0,5	3,4	
Кръстоски Cross breed	x	**111**	**73**	**110**	**94,0 ± 21,7**
	s	2,7	6,6	24,8	

С напредване на лактационния период съдържанието на йод в кравето мляко намалява стъпаловидно от 118 µg/l (01.05.) до 49 µg/l през юни (01.06.) и достига най-ниската си стойност в началото на юли - 33 µg/l. В условията на хроничен йоден дефицит средното съдържание на йод в кравето мляко е три пъти по-ниско (Хср.=67,7±45,1 µg/l) в сравнение с референтните стойности (200-250 µg/l).

При различните породи овце промените в концентрацията на йода в млякото варират в широки граници. В зависимост от вида на пашата и фазата на вегетация на тревните асоциации, средното нивото на йода в млякото варира от 94,0 до 176 µg/l. Само в млякото на Средно-Родопската овца през май са установени оптимални стойности на йода – 336 µg/l.

При технологичния процес за производството на бяло саламурено сирене се използват различни видове сол (морска, каменна, техническа), които променят в значителна степен концентрацията на йода в млечните продукти (Таблица 7).

With advance of lactation period the iodine content in cow's milk decreased from 118 µg/l (01.05.) to 49 µg/l in June (01.06.) and reached its lowest value in July - 33 µg/l. In conditions of chronic iodine deficiency the average content of iodine in cow milk is three times lower (x=67,7±45,1 µg/l) in comparison with the reference values (200-250 µg/l).

The changes in the concentration of iodine in the milk, varied within wide limits in different sheep breeds. Depending on the type of grazing and vegetation phase of grass associations, the average level of iodine in milk fluctuates from 94.0 to 176 µg/l. Only in the milk of Middle-Rhodope sheep an optimal levels of iodine had been established - 336 µg/l (in May).

In the process for the production of white brined cheese using various types of salt (sea, stone, technical) that change significantly the concentration of iodine in the milk products (Table 7).

Таблица 7. Съдържание на йод в бялото саламурено сирене при пасищното отглеждане на крави и овче в различни планински райони
Table 7. Iodine content in the white brined cheese in pasture breeding of cows and sheep in different mountain areas

Сирене / White brined cheese		Smiljan 2014			
		I-серия I-series	II-серия II-series	III-серия III-series	1-60 ден 1st - 60th day
		µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Родопско говедо	x	1342	587	42	**657,0**
Rhodopian cattle	s	11	56	5,7	
Каракачанска	x	1263	490	60	**622,1**
Karakachan sheep	s	1396	478	46	
Родопски Цигай	x	1278	531	97	**632,6**
Rhodope Tsigay	s	1225	545	121	
Средно-Родопска	x	1563	573	300	**826,5**
Middle-Rhodope breed	s	1559	533	432	
Кръстоски	x	1409	484	334	**779,5**
Cross breed	s	1541	470	441	

Данните показват, че в кравите и овчите сирена съдържанието на йод достига средни стойности от 622,1 до 779,5 µg/kg. При някой от кравите сирената произведени през месеците май и юни са установени до стойности от 1350 до 1500 µg I /kg. Този факт променя до голяма степен представените на Таблица 8 трансферни фактори, вариращи при отделните породи от 4,68 до 9,73.

Data show, that in cows and sheep cheese the iodine content reaches an average from 622.1 to 779,5 µg/kg. In some of the cheese samples produced in the months of May and June were set values from 1350 to 1500 µg I/kg. This fact changes largely represented at the Table. 8 transfer factors ranging from individual breeds from 4.68 to 9.73.

Таблица 8. Трансферен фактор на елемента йод от млякото в сиренето
Table 8. Transfer factor of the element iodine from milk to cheese

Порода / Breed	Smiljan 2014		
	мляко milk	сирене white cheese	тр. фактор transfer factor
	µg/l	µg/kg	-
Родопско говедо Rhodopian cattle	**67,7**	**657,0**	**9,73**
Каракачанска Karakachan sheep	**111,3**	**622,1**	**5,59**
Родопски Цигай Rhodope Tsigay	**105,7**	**632,6**	**5,98**
Средно-Родопска Middle-Rhodope breed	**176,5**	**826,5**	**4,68**
Кръстоски Cross breed	**94,0**	**779,5**	**8,29**

Влагането на нерегламентирани количества от сол води до екстремно високите концентрации на йода в сиренето, при което трансферния фактор достига двукратно по-високи стойности (TF=15-20).

При кашкавала произведен от краве мляко, коефициентите на трансфер са по-ниски от тези при сирената, поради по-малкото количество сол, използвана в хода на технологичния процес (Таблица 9).

The addition of a non-regulated quantities of salt leads to extremely high concentrations of iodine in the cheese, wherein the transfer factor reaches twice as high values (TF = 15-20).

For the yellow cheese, made from cow milk, the transfer factors are lower than those of white brined cheese due to the smaller quantity of salt, used in the course of the process (Table 9).

Таблица 9. Трансферен фактор на елемента йод от млякото в кашкавала
Table 9. Transfer factor of the element iodine from milk to yellow cheese

мляко /milk		кашкавал / yellow cheese		тр. фактор/ transfer factor
67,7 µg/l	→ → →	**895** ±167 **µg/kg** пармезан / Parmesan		**13,22**
		324 ± 17 **µg/kg** гауда / Gauda	→ → →	**4,78**
		372 ± 39 **µg/kg** балкан **/** Balkan		**5,59**

Според WHO/UNICEF (2007), стабилизиране йода в солта е била извършена в 40 европейски страни, което е задължително в 13 страни,

According to WHO/UNICEF (2007), iodine fortification of salt has been implemented in 40 European countries, being mandatory in 13 countries,

доброволно в 16 и не е регулиран в останалите страни; количеството на добавен йод варира 10-75 mg/kg сол с приоритет на стойностите в границите на 15-30 mg/kg.

В зависимост от консумацията на млечни продукти (сирена и кашкавали) е възможно в значителна степен да се подобри йодния баланс при човека. При интерпретацията на получените резултати следва, че при дневна консумация на 100 мл мляко се приемат от 6,7 – 17,5 µg йод, на 50 грама сирене от 31 до 41 µg йод и на 25 г. кашкавал, съответно от 8,0 до 22 µg йод.

Изхождайки от дневната потребност на организма (150-200 µg I/ден), е видно че чрез млякото и млечните продукти се консумират от 45 до 80 µg I/ден, което представлява от 25 до 45% от дневните потребности.

voluntary in 16 and not regulated in the remaining countries; the amount of iodine added varies from 10 to 75 mg/kg salt with a majority of values in the range 15–30 mg/kg.

Depending on the consumption of dairy products (white brined cheese, yellow cheese) it is possible to significantly improve the iodine balance in humans. The interpretation of the results follows that with a daily consumption of 100 ml milk accepted by 6,7 - 17,5 µg iodine, 50g cheese from 31 to 41 µg iodine and 25g yellow cheese from 8.0 to 22 µg iodine, respectively.

Based on the daily requirement of the body needs (150-200 µg I/day), it is clear that by milk and milk products are consumed by 45 to 80 µg I/day, which represents 25 to 45% of daily needs.

ИЗВОДИ

Проведеното изследване проследява трансфера на йода от почвите през растенията до млякото и млечните продукти при използването различни породи овце – Каракачанска, Родопски Цигай, Средно-Родопска и Кръстоска. Концентрацията на йод в тревостоя на двата района са малко под средните нива, което се дължи на геоложки обусловени фактори. Направена е сравнителна оценка на кравето и овчето мляко в зависимост от сезонната динамика. Значител-

CONCLUSIONS

The survey follows the transfer of iodine from the soil by plants to milk and dairy products using different breeds of sheep – Karakachan, Rhodope Tsigay, Middle-Rhodope breed and Rhodope Cross breed. The concentration of iodine in the grass composition of both areas are slightly below average levels due to geological factors determined. A comparative evaluation of cow and sheep milk, depending on the seasonal dynamics had been done. Significantly lower were the

но по-ниски са нивата на йода в кравето мляко в сравнение с овчите млека, дължащо се на различния режим на хранене на дребните и едри преживни животни.

Производството и консумацията на произведените в района сирена и кашкавали по традиционни рецепти включващи използване на голямо количество йодирана сол значително изкривява нормалните за продуктите концентрации на йод. Това частично компенсира дефицита на йод при изходните суровини, което налага да се калкулира средната консумация на съответните продукти. За района на Средните Родопи е необходимо разработване на специален тип мултифункционален премикс с по-високо съдържание на йод, както и възможно най-ранно протектиране на животинския организъм.

levels of iodine in cow's milk compared with the sheep milk, due to differences in diet of small and other (cattle) ruminants.

The production and consumption of white brined cheese and yellow cheese produced according to traditional recipes, involving the use of large amounts of iodized salt significantly distorts the normal products concentrations of iodine. This partially offset the deficit of iodine in raw materials, which have to calculate the average consumption of the products. It is necessary for the region of the Middle Rhodopes develop a special type of multi premix with a high content of iodine, as well as early protection of animal organism.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Abel H., Flachowski G., Jeroch H., Molnar S.** Nutztierernährung. Potentiale-Verantwortung-Perspektiven, Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart, 1997.
2. **Anderson M., Takkouche B., Egli I., Allen HE, de Benjoist** Curent global iodine status and progress over the last decade towards the elimination of iodine deficiency. Bulletin of World Health Organization, 2005, 83, 518-525.
3. **Angelow L.** Forschungsbericht, Bonn, 2001, 1-34.
4. **Angelow L., Boeser T, Loesch E.** 2. Jenaer Forum – Mengen und Spurenelemente in der Ernaehrung, 1996, 117-128
5. **Anke M., Meissner D., Mills C. E.** Trace Element in Man and Animals – TEMA 8, 1993, Iodine in the food chain, 1049-1053.
6. **Anke M., Dorn W., Müller R.** Sächsische Landesanstallt für Landwirtschaft, Pauselius Verlag, Leipzig, 1999, 20-35.
7. **Anynim** DGL-Futterwerttabellen, Wiederkäuer, Uni-Hohenheim, Deutschland, 1997.
8. **Falbe and Regitz**, (Hrsg.): Römpp Chemielexikon. 7. Auflage, Bd. 4 M, 1989
9. **Kabata-Pendias A. and Pendias H.** Trace Elements in Soils and Plants, 3rd edn. CRC Press, Boca Ration, 2001, 126-128.
10. **WHO/UNICEF** (World Health Organization / United Nations Children's Fund), Iodine deficiency in Europe. A continuing public health problem, 2007, 86 pp.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 4, 2016, (17-27)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Качествена характеристика на мастната фракция и оценка съдържанието на транс мастните киселини при различни видове кашкавали

Любомир Ангелов[1], Силвия Иванова[1]*, Цонка Оджакова[2]

[1]Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. „Черни връх“ 53, 1407 София, България
[2]Опитна станция по животновъдство и земеделие-Смолян, ул. „Невястата“ 35 4700 Смолян, България

**E-mail: sylvia_iv@abv.bg*

Qualitative characteristic of the fat fraction and assessment of content on the trans fatty acid in different kind of yellow cheese

Lujbomir Angelov[1], Silviya Ivanova[1]*, Tzonka Odjakova[2]

[1]Institute of Cryobiology and Food Technology, Agricultural Academy, 53 Cherni vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria
[2] Experimental Station of Stockbreeding and Agriculture-Smolyan, 35 Nevyastata Str., 4700 Smolyan, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Естествените източници на транс- изомерите на мастни киселини е преди всичко млечната мазнина и други мазнини от животински произход. Изследването е проведено с три различни вида кашкавал – Пармезан, Гауда и Балкан, произведен от краве мляко. Различните технологични условия на приготвяне на кашкавалите създават условия за протеолитични реакции, които водят до промяна в мастнокиселинния състав на продукта. Пармезанът се характеризира с най-високо общо съдържание на транс мастни киселини – 1,87 g/100g мазнина, омега-3 (0,69 g/100g мазнина) и омега-6 (2,36 g/100g мазнина) мастни киселини и CLA- 0,20 g/100g мазнина.

SUMMARY

Natural sources of *trans* isomers of fatty acids are primarily the milk fat and other fats from animal origin. The study was conducted with three different types yellow cheese – Parmesan, Gouda and Balkan produced from cow's milk.

Another technological condition of preparing the yellow cheese creates conditions for proteolytic reactions that lead to changes in fatty acid composition.

The Parmesan is characterized by the highest total content of trans fatty acids – 1.87 g/100g fat, an omega-3 (0.69 g/100g fat) and omega-6 (2,36 g/100g fat) fatty acids and CLA- 0.20 g/100g fat.

За качествената оценка на мастната фракция са включени показателите липиден превантивен скор, атерогенен и тромбогенен индекс и съотношението между хипер- и хипохолестеролемични мастни киселини. Липидният превантивен скор е най-висок при кашкавал Пармезан – 63,39 g/100g продукт, атерогенен и тромбогенен индекс при Пармезан, съответно 3,36 и 3,82. Изследваните кашкавали се характеризират като хранителен продукт с ниско съдържание на транс мастни киселини (от 0,42 до 0,52 g/100g млечен продукт) и високо съдържание на наситени мастни киселини (от 18,32 до 21,50 g/100g млечен продукт).

Ключови думи: кашкавал, транс мастни киселини, CLA, омега-3, омега-6

For qualitative assessment of the fat fraction indicators as lipid preventive score atherogenic and thrombogenic index and the ratio between hyper and hypocholesterolemic fatty acids have been included. Lipid preventive score is the lowest in the Parmesan yellow cheese– 63.39 g/100g product, atherogenic and thrombogenic index in Parmesan, respectively 3.36 and 3.82. The analysed yellow cheeses were characterized as foodstuffs with a low content of trans fatty acids (from 0.42 to 0.52 g/100g product) and with a high content of saturated fatty acids (from 18.32 to 21.50 g/100g product).

Key words: yellow cheese, trans fatty acid, CLA, omega-3, omega-6

УВОД

Благодарение на негативните ефекти на някои наситени мастни киселини върху човешкото здраве, млечна мазнина има лоша репутация, тъй като тя се състои от 65% - 75% наситени мастни киселини. Въпреки това, обширни съвременни изследвания върху ефекта на мастните киселини върху здравето на човека показва, че само за няколко отделни мастни киселини са отговорни за негативните последици върху здравето на потребителите. Диетите, богати на наситени мастни киселини като лауринова (C12:0), миристинова (C14:0), палмитинова киселина (C16:0) и стеаринова киселина (C18:0), са силно свързани с повишен риск от атеросклероза, затлъстяване и коронарна болест на сърцето (Pilarczyk et al., 2015). Според индексите предложени от

INTRODUCTION

Due to the negative effects of some saturated fatty acids on human health, milk fat has a bad reputation because it consists of 65% - 75% saturated fatty acids.

However, extensive recent studies on the effect of fatty acids on human health shows that just a few fatty acids are responsible for the negative effects on the health of consumers.

Diets rich in saturated fatty acids such as lauric (C12: 0), myristic (C14: 0), palmitic acid (C16: 0) and stearic acid (C18: 0), are strongly associated with increased risk of atherosclerosis, obesity and coronary heart disease (Pilarczyk et al., 2015).

According to the index proposed by Ulbricht and Southgate (1991),

Ulbricht and Southgate (1991), лауриновата (C12:0), миристиновата (C14:0) и палмитинова киселина (C16:0) имат атерогенен характер, а миристинова (C14:0), палмитинова киселина (C16:0) и стеаринова киселина (C18:0), тромбогенен характер, докато омега- 3, омега- 6 и мононенаситените мастни киселини имат антиатерогенен и антитромбогенен характер. Rozbicka-Wieczorek et al. (2015) установяват при овче мляко от две породи атерогенен индекс – 1,35 и 1,45 и тромбогенен индекс – 1,63 до 1,67. Souza et al. (2015) установяват при краве мляко атерогенен индекс – 4,10 и тромбогенен индекс – 5,17. Съотношението между хипер- и хипохолестеролемични мастни киселини, установено от Fernandez et al. (2007) при Иберийската шунка под 2,5, което се определя като благоприятно спрямо останалите изследвани от тях видове шунка. Tonial et al. (2014), при два вида риба получава стойности за AI-0,55-0,60; TI- 0,82-0,87 и hH- 1,56-1,63.

Дневният прием на транс мастни киселини не трябва да надвишава 0,5% от енергийния прием. Според регулационната мярка на ЕС No 1924/2006 на ЕП и Съвета от 20 декември 2006 г., съдържанието на наситени мастни киселини и транс мастни киселини в твърди продукти не надвишава 1,5 g/100 g или 0,75 g/100 ml течност, като и в двата случая съдържанието на наситеlauric (C12: 0), myristic (C14: 0) and palmitic acid (C16: 0) are atherogenic and myristic (C14: 0), palmitic acid (C16: 0) and stearic acid (C18: 0) are thrombogenic, while the omega 3, omega 6 and monounsaturated fatty acids have anti- atherogenic and anti-thrombogenic.

Rozbicka-Wieczorek et al. (2015) found in sheep milk of two breed's atherogenic index from 1.35 to 1.45 and thrombogenic index from 1.63 to 1.67. Souza et al. (2015) found in cow's milk atherogenic index – 4.10 and thrombogenic index – 5.17.

The ratio of hyper- and hypocholesterolemic fatty acids found by Fernandez et al. (2007) in the Iberian ham below 2.5, which is defined as positive relative to the other researches of these hams. Tonial et al. (2014), at two fish species get values for AI-0.55 to 0.60; TI- 0.82-0,87 and hH-1,56-1,63.

The daily intake of trans fatty acids should not exceed 0.5% of energy intake. According to the regulation EU measure No 1924/2006 of the European Parliament and the Council on December 20, 2006, the content of saturated fatty acids and trans fatty acids in solid products does not exceed 1.5 g/100 g or 0.75 g/100 ml of liquid as in both cases the content of saturated fatty acids and

ни мастни киселини и транс мастни киселини не надвишава 10% от дневния енергиен прием и тези храни се означават като храни с ниско съдържание на НМК. Претенцията, че дадена храна не съдържа НМК, може да бъде обозначена само в случаите, когато съдържанието на НМК и ТМК не надвишава 0,1 g/100 g продукт или 0,1 g/100 ml течност (Regulation (EC) No 1924/2006).

Изследването е проведено с три различни вида кашкавал – Пармезан, Гауда и Балкан, произведен от краве мляко.

trans fatty acids does not exceed 10% of the daily energy intake and these foods are identified as foods with low content of SFA.

A claim that a food contains SFA, may be indicated only in cases where the content of SFA and TFA does not exceed 0,1 g/100 g of product or 0,1 g/100 ml of liquid (Regulation (EC) No 1924/2006).

The study was conducted with three different types of cheese– Parmesan, Gouda and Balkan produced from cow's milk.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са три различни вида кашкавал – пармезан (4 броя), гауда (4 броя) и балкан (4 броя) за мастнокиселинен състав и за установяване на съдържанието на транс мастни киселини, биологично активни и антиканцерогенни субстанции в мастната фракция. Екстракцията на общи липиди е извършена по метода на Roese-Gottlieb (A.O.A.C, 2000), посредством диетилов и петролеев етер и последващо метилиране с помощта на натриев метилат (CH_3ONa, Merck, Darmstadt) и сушене с $NaHSO_4.H_2O$. Метиловите естери на мастните киселини /FAME/ са анализирани с помощта на газов хроматограф Shimadzu-2010 (Kioto, Japan) снабден с пламъчно-йонизационен детектор и автоматична инжекционна система (AOC-2010i). Анализът

MATERIAL AND METHODS

There were examined three different types yellow cheese – parmesan (4 pieces), Gouda (4 pieces) and mountain (4 pieces) for fatty acid composition and establishing the content of trans fatty acids, bioactive and anti-cancer substances in the fat fraction. The extraction of the total lipids was done by the method of Roese-Gottlieb (A.O.A.C, 2000), with diethyl and petroleum ether and subsequent methylation with sodium methylate (CH3ONa, Merck, Darmstadt) and dried with $NaHSO_4.H_2O$.

The fatty acids methyl esters /FAME/ were analyzed with the aid of gas chromatograph Shimadzu-2010 (Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector and automatic injection system (AOC-2010i). The analysis was made on

е извършен на капилярна колона CP 7420 (100m x 0.25mm i.d.,0.2µm film, Varian Inc., Palo Alto, CA). За носещ газ е използван водород, а като make-up газ - азот. Програмиран е режим на пещта на четири стъпки – началната температура на колоната – 80ºC/ min, която се поддържа за 15 min, след което нараства с по 12ºC/ min до 170ºC и се поддържа за 20 min, следва ново повишаване с 4ºC/min до 186ºC за 19 min и до 220ºC с по 4ºC/min до приключване на процеса.

Качествената оценка на мастната фракция включва следните показатели: липиден превантивен скор, атерогенен и тромбогенен индекс (Ulbricht and Southgate, 1991), съотношението между хипер- и хипохолестеролемични мастни киселини, транс мастни киселини и количеството на наситените мастни киселини (Regulation (EC) No 1924/2006).

ЛПС= ОЛ +2х НМК- МНМК- 0,5 ПНМК

AI= 12:0+ 4×14:0 +16:0 /[ΣMUFAs+PUFA n6+PUFA n3]

TI=(14:0+16:0+18:0)/[0.5×ΣMUFAs+0.5×PUFA n6+3×PUFA n−3+PUFA n3/ PUFA n6]

h/H=(C18:1n-9+C18:1n-7+C18:2n-6+C18:3n-3+C18:3n-6+C20:3n-6+C20:4n-6+C20:5n-3+C22:4n-6+C22:5n-3+C22:6n-3)/(C14:0+C16:0)

Данните са обработени по методите на вариационната ста-

a capillary column CP7420 (100m x 0,25mm i.d., 0,2µm film, Varian Inc., Palo Alto, CA), with carrier gas-hydrogen and make-up gas - nitrogen.

Programmed mode is the furnace of four steps – the initial temperature of the column – 80ºC/min, which was maintained for 15 min, then increase at 12ºC/min to 170ºC and maintained for 20 min, then new increase at 4ºC/min to 186ºC for 19 min and to 220ºC at 4ºC/min till finishing the process.

The qualitative assessment of the fat fraction comprises the following parameters: lipid preventive score, atherogenic and thrombogenic index (Ulbricht and Southgate, 1991), the ratio between hyper- and hypocholesterolemic fatty acids, trans fatty acids and the amount of saturated fatty acids (Regulation (EC) No 1924/2006).

LPS= FAT +2x SFA- MUFA- 0,5 PUFA

AI= 12:0+ 4×14:0 +16:0 /[ΣMUFAs+PUFA n6+PUFA n3]

TI=(14:0+16:0+18:0)/[0.5×ΣMUFAs+0.5×PUFA n6+3×PUFA n−3+PUFA n3/ PUFA n6]

h/H=(C18:1n-9+C18:1n-7+C18:2n-6+C18:3n-3+C18:3n-6+C20:3n-6+C20:4n-6+C20:5n-3+C22:4n-6+C22:5n-3+C22:6n-3)/(C14:0+C16:0)

The obtained data were statistically processed with

тистика посредством статистическия пакет на компютърната програма EXCEL 2010. Достоверността на разликите между изследваните млека е установена чрез t-теста на Стюдент.

Statistica for Windows 2010 software. The credibility of the differences between the analyzed milk was established by t-test of Student.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследваните кашкавали се характеризират с пепелно съдържание от 3,81 до 5,38%. Пармезанът е с най-високо съдържание на белтък – 27,54% и мазнини – 28,05% (Таблица 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Studied yellow cheeses are characterized by ash content from 3.81 to 5.38 percent. The Parmezan has the highest content of protein – 27.54% and fat – 28.05% (Table 1).

Таблица 1. Физикохимичен състав на три вида кашкавали
Table 1. Physicochemical composition of three yellow cheeses

	Пармезан Parmesan		Гауда Gauda		Балкан Balkan	
	x	sd	x	sd	x	sd
Пепел, % Ash,%	5,38	0,38	4,01	0,08	3,81	0,04
Протеин, % Protein,%	27,54	0,46	25,98	0,82	26,00	0,81
Мазнина, % Fat, %	28,05	0,49	25,98	1,32	23,51	0,98

Мастнокиселинният състав е важна характеристика на маслената фракция за определяне на съдържанито на транс мастни киселини и биологичноактивни компоненти. От трите вида сирена наситените мастни киселини са в най-голямо количество при Гауда, докато мононенаситените и полиненаситените са в най-ниска концентрация. Общото съдържание на транс мастните киселини в изследваните кашка-вали варира от 1,67 до 1,87 g/100g мазнина. Омега-3 мастните киселини са в концен-

Fatty acid composition is an important feature of the oil fraction to determine the content of trans fatty acids and bioactive components. Of the three types of yellow cheese saturated fatty acids are most abundant in Gouda until monounsaturated and polyunsaturated are in the lowest concentration.

The total content of trans fatty acids in the analyzed cheeses ranges from 1,67 to 1,87 g/100g fat. Omega-3 fatty acids are in a concentration of less than

трация под 1 g/100g мазнина, докато омега-6 са в диапазона от 2,08 до 2,36 g/100g мазнина. Съотношението между двете групи мазнини е от 3,28 при гауда до 3,40 при Пармезан, следователно то е с нисък рисков фактор (фактор <5).

1 g/100g of fat, while omega-6 in the range from 2,08 to 2,36 g/100g fat. The ratio between the two groups fat is from 3.28 to 3.40 at Gouda in Parmesan, therefore it has a low risk factor (factor <5).

Таблица 2. Мастно киселинен състав на три вида кашкавал (g/100g мазнина)
Table 2. Fatty acids composition of three types yellow cheese (g/100g fat)

Мастна киселина Fatty acid	Пармезан Parmesan		Гауда Gauda		Балкан Balkan	
	x	sd	x	sd	x	sd
C12:0	3,58	0,07	3,90	0,06	4,00	0,03
C14:0	11,60	0,10	11,93	0,05	12,02	0,10
C16:0	34,71	0,16	35,00	0,28	34,52	0,18
C18:0	9,24	0,14	8,72	0,05	8,53	0,08
C18:1n-9	15,90	0,19	15,21	0,18	15,08	0,07
C-18:1t11	0,72	0,01	0,71	0,01	0,71	0,05
C18:2n-6	1,54	0,01	1,39	0,03	1,44	0,02
C18:3n-3	0,54	0,01	0,53	0,07	0,54	0,04
C18:3n-6	0,06	0,00	0,06	0,01	0,05	0,01
C20:3n-6	0,08	0,00	0,07	0,01	0,07	0,01
C20:4n-6	0,10	0,00	0,08	0,01	0,09	0,00
C20:5n-3	0,06	0,01	0,05	0,02	0,04	0,01
C22:4n-6	0,04	0,00	0,04	0,01	0,04	0,01
C22:5n-3	0,07	0,02	0,05	0,02	0,05	0,01
SFA	74,78	0,22	76,25	0,30	76,18	0,17
MUFA	21,96	0,18	20,81	0,11	20,85	0,09
PUFA	3,24	0,04	2,90	0,25	2,96	0,10
Σ C-18:1TFA	1,87	0,08	1,67	0,09	1,77	0,12
n-3	0,69	0,02	0,64	0,11	0,65	0,04
n-6	2,36	0,03	2,08	0,09	2,16	0,02
n-6/n-3	3,40	0,09	3,28	0,39	3,37	0,22
CLA 9c,11t	0,20	0,02	0,12	0,09	0,06	0,02
Σ CLA	0,54	0,02	0,45	0,08	0,45	0,05

Основните представители на наситените мастни киселини,

The main representatives of saturated fatty acids, which are

които имат отношение към храненето на човека са лауриновата (C12:0), миристиновата (C14:0) киселина, палмитинова (C16:0) и стеаринова киселина (C18:0). Кашкавалът Балкан е с най-високо съдържание на лауринова и миристинова киселина, съответно 4,00 и 12,02 g/100g мазнина, докато Гаудата съдържа най-много палмитинова (35,00 g/100g мазнина), а Пармезана – стеаринова (9,24 g/100g мазнина). Олеиновата киселина в изследваните образци е в най-висока концентрация при Пармезана – 15,90 и в най-ниска при кашкавал Балкан. Транс ваксеновата киселина е в сравнително еднакви количества и при трите вида кашкавал – 0,71-0,72 g/100g мазнина. Линоловата киселина в изследваните кашкавали е в диапазона от 1,39 до 1,54 g/100g мазнина (Таблица 2), докато съдържанието на алфа и гама линоленовата киселина е сравнително еднакво, независимо от технологичната обработка. Спрегната линолова киселина е в много ниски концентрации от 0,06 при кашкавал Балкан до 0,20 при кашкавал Пармезан в сравнение с краве мляко, в което варира от 0,24 до 0,45 g/100g мазнина (Иванова и сътр., 2012). Общото количество на CLA- изомери е най-високо при Пармезан – 0,540,24 до 0,45 g/100g мазнина, докато при Гауда и Балкан е 0,45 g/100g мазнина.

Качествената оценка на

relevant to human nutrition are lauric (C12: 0), myristic (C14: 0) acid, palmitic (C16: 0) and stearic acid (C18: 0).

The Balkan yellow cheese has the highest content of lauric and myristic acid, respectively 4,00 and 12,02 g/100g fat, while the Gauda contain most palmitic (35,00 g/100g fat) and Parmezan–stearic (9 24 g/100g fat).

Oleic acid in the studied samples in the highest concentration in Parmezan – 15.90 and the lowest at Balkan.

Trans vaccenic acid is in relatively equal amounts in all three types yellow cheese – 0,71-0,72 g/100g fat. Linoleic acid in analyzes yellow cheeses ranges from 1,39 to 1,54 g/100g fat (Table 2), while the content of the alpha and gamma linolenic acid is relatively uniform irrespective of the technological process.

CLA is in very low concentrations of 0.06 in Balkan cheese to 0.20 in Parmesan cheese compared to cow's milk, which varies from 0.24 to 0.45 g/100g fat (Ivanova et al., 2012).

The total amount of CLA- isomers is the highest in Parmesan – 0.54 g/100g of fat, while the Gouda and Balkan is 0.45 g/100g fat.

Qualitative assessment of

мастната фракция е направена въз основа на следните показатели: липиден превантивен скор, атерогенен и тромбогенен индекс и съотношението между хипер- и хипохолестеролемични мастни киселини (Таблица 3).

the fat fraction is based on the following indicators: lipid preventive score, atherogenic and thrombogenic index and the ratio between hyper- and hypocholesterolemic fatty acids (Table 3).

Таблица 3. Качествени показатели на мастната фракция три вида кашкавал
Table 3. Quality indicators of fat fraction composition of three types yellow cheese

Показател Indicator	Пармезан Parmesan		Гауда Gauda		Балкан Balkan	
	x	sd	x	sd	x	sd
LPS (g/ 100g product)	63,39	1,10	59,81	3,07	54,08	2,35
AI	3,36	0,04	3,65	0,05	3,64	0,04
TI	3,82	0,03	4,07	0,13	4,00	0,05
h/H	0,40	0,00	0,37	0,00	0,37	0,00
TFA (g/ 100g product)	0,52	0,03	0,43	0,02	0,42	0,01
SFA+TFA (g/ 100g product)	21,50	0,37	20,24	1,02	18,32	0,77

Липидният превантивен скор в различните видове кашкавал е от 54,08 до 63,39 g/100g продукт. Той е най-нисък при кашкавал Балкан- 54,08 g/ 100g продукт. Атерогенният индекс дава взаимовръзката между сумата на основните наситени мастни киселини и ненаситените мастни киселини, като първите се считат за про-атерогенни (благоприятстват адхезията на липиди в клетките на имунната и кръвоносната система), а вторите за анти атерогенни (инхибират агрегацията на плаки и намаляват нивата на естерифицирани мастни киселини, холестерол, и фосфо-липиди, като по

Lipid preventive score in different types of yellow cheese are from 54.08 to 63,39 g/100g product. It is the lowest in Balkan yellow cheese 54,08 g/100g product. The atherogenic index gives the relationship between the amount of the major saturated fatty acids and unsaturated fatty acids, the former is considered to be pro-atherogenic (favoring the adhesion of the lipids in the cells of the immune and circulatory system), and the second anti-atherogenic (inhibit platelet aggregation and reduce the levels of esterified fatty acids, cholesterol and phospholipids, and thereby preventing the occurrence of

този начин предотвратяват появата на микро- и макро-коронарни забо-лявания). Тромбогенният индекс дава тенденцията за образуване на съсиреци в кръвоносните съдове и се дефинира като съотношение между протромбогенните (наситени мастни киселини) и антитромбогенните (мононенаситените и полиненаситените омега-3 и омега-6 мастни киселини) мастни киселини киселини (Ghaeni et al., 2013). Атерогенният индекс е най-нисък при Пармезана – 3,36, докато при кашкавал Гауда – 3,65 и Балкан е 3,64. Тромбогенния индекс е най- нисък при Пармезан – 3,82 и най-висок при Гауда – 4,07. Изследваните кашкавали се характеризират като хранителен продукт с ниско съдържание на транс мастни киселини – 0,42 до 0,52 g/100g млечен продукт и високо съдържание на наситени мастни киселини от 18,32 до 21,50 g/100g млечен продукт.

micro- and macro- coronary diseases).

Thrombogenic index gives tendency form clots in blood vessels and is defined as the ratio between protrombogenic (saturated fatty acids) and antithrombogenic (monounsaturated and polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acid) fatty acids (Ghaeni et al., 2013).

The atherogenic index was lowest in Parmezan – 3.36, while in the Gauda – 3.65 and Balkan is 3.64. Thrombogenic index is the lowest in Parmezan – 3.82 and the highest in Gauda – 4.07. The analyzed yellow cheeses are characterized as a food product with a low content of trans fatty acids – 0,42 to 0,52 g/100g milk product and a high content of saturated fatty acids from 18.32 to 21,50 g/100g of milk product.

ИЗВОДИ

От изследваните кашкавали най-беден на биологичноактивни компоненти е кашкавал Балкан, докато Пармезана е най-богат, поради тази причина кашкавал Балкан може да се смята за кашкавал с ниско ниво на анти-атерогенна и антитромбогенна защита на човешкия организъм при неговата употреба. Кашкавалите се характеризират като

CONCLUSIONS

From studied yellow cheeses the most poor of biologically active components is Balkan as Parmesan is the most extensive, therefore Balkan can be considered for cheese with low levels of anti-atherogenic and antithrombotic protection of the human organism in its use. Yellow cheeses are characterized as a food product with a low content of

хранителен продукт с ниско съдържание на транс мастни киселини (от 0,42 до 0,52 g/100g млечен продукт) и високо съдържание на наситени мастни киселини (от 18,32 до 21,50 g/100g млечен продукт).

trans fatty acids (from 0,42 to 0,52 g/100g milk product) and a high content of saturated fatty acids (from 18.32 to 21,50 g/100g milk product).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **de Souza VM, Rocha Júnior V. R., Caldeira L. A., da Silva Antunes A. P., Ruas J. R. M., Souza C. F., de Aguiar A. C. R., Lanna D. P. D.** Physicochemical composition and fatty acid profile of milk from F1 Holstein x Zebu cows fed with increasing concentrations of urea. Ciências Agrárias, Londrina, 2015, 36, No. 6, pp. 4435-4446, DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4435
2. **Fernandez M., Ordonez J.A., Cambero I., Santos C., Pin C., de la Hoz L.** Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 2007, 101, pp. 107-112
3. **Ghaeni M., Ghahfarokhi K. N., Zaheri L.** Fatty acids profile, atherogenic (IA) and thrombogenic (IT) health lipid indices in *Leiognathusbindus* and *Upeneussulphureus. J. Marine Sci. Res. Dev.*, 2013, 3, No.4, pp.1-3
4. **Ivanova S., Odjakova Ts., Gadjev D., Angelov L.** Fatty acid composition of cow's milk of the Bulgarian Rhodopes Cattle Breed, during the transition from stable to pasture-stable rearing. *Journal of Mountain Agricultural on the Balkans*, 2012, 15, No. 5, pp. 1012-1023
5. **Pilarczyk R., Wójcik J., Sablik P., Czerniak P.** Fatty acid profile and health lipid indices in the raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from an organic farm. *South African Journal of Animal Science,* 2015, 45, No. 1, pp. 30-38.
6. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council, 20 December 2006: "On nutrition and health claims made on foods". Trans fatty acids and insulin resistance. Atherosclerosis Suppl., 2006, 7, pp.37-39.
7. **Rozbicka-Wieczorek A. J., Radzik-Rant A., Rant W., Kuczy´nska B. Czauderna M.** Characterization of the milk lipid fraction in non-dairy sheep breeds. *Archives Animal Breeding*, 2015, 58, pp. 395-401,
8. **Tonial I., de Olivera D.F., Coelho A. R., Matsushita M., Coro F.A.G., de Souza N.E., Visentainer J.V.** Quantification of essential fatty acids and assessment of the nutritional quality indexes of lipids in Tilapia Alevins and Juvenile Tilapia Fish (*Oreochromics niloticus*). *Journal of Food Research*, 2014, 3, No. 3, pp. 105-114
9. **Ulbricht TL, Southgate DA.** Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet,* 1991, 338, No. 8773, pp. 985-992.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 4, 2016, (28-35)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Синхронозация на естралния цикъл на кобили от породата Дунавски кон с цел прилагането на асистирани репродуктивни техники

Злати Шекеров[1*], Паулина Таушанова[1], Михаил Червенков[1], Росен Стефанов[1], Бойко Георгиев[1], Георги Йорданов[2]

[1]ИБИР-БАН, Цариградско шосе 73, 1113 София, България
[2]Национална асоциация по коневъдство

**E-mail: zlati_sh@abv.bg*

Synchronization of the oestrus cycle of Danube horse breed mares for the implementation of assisted reproductive techniques

Zlati Shekerov[1*], Paulina Taushanova[1], Mihail Chervenkov[1], Rossen Stefanov[1], Boyko Georgiev[1], Georgi Yordanov[2]

[1]IBIR-BAS, 73 Tsarigradsko Shosse, 1113 Sofia, Bulgaria
[2]National Association of Horse Breeding

РЕЗЮМЕ

С цел оптимизиране използването на репродуктивни биотехнологии при кобили от породата Дунавски кон бяха приложени две схеми за синхронизация на естралния цикъл. Една с използването на Regumate и простагландини и втора базирана на двукратно третиране през 14 дни с простагландини (Oestrophan). Получените резултати показват сходства с резултатите описани при други породи и дават предимство на схемата предвиждаща използването на Regumate и простагландини (Oestrophan) при тази порода.

Ключови думи: синхронизация, еструс, кобили, Дунавска порода

SUMMARY

In order to optimize the use of reproductive biotechnology in mares from Danube horse breed were implemented two schemes for synchronization of the oestrus cycle. One use of Regumate and prostaglandins and second based on two treatments in 14 days interval with prostaglandins (Oestrophan). The results show similarities with the results described in other breeds and favor a scheme providing for the use of Regumate and prostaglandins (Oestrophan) in this breed.

Key words: synchronization, estrus, mares Danube breed

УВОД

Популацията на породата Дунавски кон е сериозно намалена след затварянето на конезавод Клементина. Силно лимитираният брой на екземплярите поставени под селекционен контрол обуславя необходимостта от използването и оптимизирането на асистирани репродуктивни техники – изкуствено осеменяване със свежа и криоконсервирана семенна течност и ембриотрансфер, с цел запазване и увеличаване популацията на една от трите местни български породи коне. Ембриотрансферът е ценен метод в репродукцията при конете позволяващ получаването на повече приплоди от ценни в генетично отношение животни, такива, които не могат да износят плода до край или при кобили, използвани за работа (Reenskaug, 2014).В този случай синхронизацията на естралния цикъл на донора и реципиента е необходимо условие за успеха на ембриотрансфера Campbell (2014). Целта на това изследване е определянето на подходящият протокол за манипулация на естралния цикъл на кобили от породата Дунавски кон с цел синхронизация му.

INTRODUCTION

The population of the Danube horse breed is severely reduced after the closure of the stud Clementine. Highly limited number of specimens placed under selection control necessitates the use and optimization of assisted reproductive techniques, artificial insemination with fresh and cryopreserved semen and embryo transfer in order to preserve and higher population of one of the three local Bulgarian horse breeds.

Embryo transfer is a valuable method in equine reproduction and will produce more offspring from genetically valuable animals, those who can not carry a successful pregnancy, or in horses used for work (Reenskaug, 2014).

In this case synchronization oestrus cycle of the donor and recipient is a necessary condition for the success of embryotransfer Campbell (2014). The aim of this study is determining the appropriate protocol for manipulation of the oestrus cycle of Danube horse breed mares in order synchronization him.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използвани са кобили на възраст между 5 и 12 годишна възраст от породата Дунавски кон, разделени в 3 групи. Изследването е проведено в перио-

MATERIAL AND METHODS

Used mares aged between 5 and 12 years old Danube hose breed mares, divided into 3 groups. The survey was conducted between March to July, due to

да Март до Юли, поради големите индивидуални различия във времетраенето на еструса и влиянието на сезона върху овулацията Nagy (2000). Всички опитни животни са в репродуктивна възраст, раждали, без данни за трудно раждане. Кобилите са били клинично здрави, без изменения в анатомията на репродуктивния тракт. Направеният микробиологичен анализ не е установил наличието на патологична микрофлора. Кръвната картина, биохимичният анализ и хормоналният профил на включените в опита животни също са били в норма Резултатите от взетите проби от контролните животни са били в норма. Всички животни, включени в изследването са изхранвани с концентриран фураж и сено, отглеждани са в боксове, като им е било осигурено ежедневно движение в падок. Кобилите са разделени в две опитни групи включващи по 6 животни и една контролна група, включваща също 6 животни. Тъй като простагландини и прогестинови продукти се използват най-често независимо един от друг за синхронизация на естрания цикъл при други породи коне Sitzenstock (2013), и поради тези причини бяха избрани сходни схеми на третиране.

Кобилите от група 1 бяха подложени на третиране с Алтреногест (Regumate@) 14 ml per os в продължение на 14 дни. На 15-я ден от експеримента

large individual differences in the duration of estrus and the influence of the season on ovulation (Nagy, 2000).

All experimental animals are in reproductive age and without evidence of dystocia in previous gestations. The mares were healthy, with no changes in the anatomy of the reproductive tract. Incurred microbiological analysis did not detect abnormal microflora.

Blood count, biochemical analysis and hormonal profile included of the experimental animals also were in the norm. Results from samples taken from test animals were normal. All animals included in the study were fed with concentrated feed and hay grown in pens, as they were provided daily movement in the paddock.

The mares were divided into two experimental groups comprising 6 animals and a control group consisting of 6 animals.

Prostaglandins and progestin products are most often used independently of estrous cycle synchronization in other horse breeds (Sitzenstock, 2013), and for these reasons were selected similar treatment regimens.

The mares from group 1 were submitted to treatment with Altrenogest (Regumate @) 14 ml per os for 14 days. On 15th day of the experiment, animals of this

опитните животни от тази група са били третирани с Cloprostenol (Oestrofan@) 0,25 mg/ml, 1 ml i.m. Кобилите от опитна група 2 са били третирани с Cloprostenol (Oestrofan@)0,25 mg/ml, i.m. 1 ml в първият и 14-ият ден от експеримента. Кобилите от контролната група не са били подложени на манипулация на естралния цикъл.

След последното третиране както опитните, така и контролните животни са били подложени на ежедневен ехографски, трансректален контрол на естралния цикъл с цел проследяване на фоликулогенезата (Фиг. 1, 2, 3 и 4), и състоянието на ендометриума. Появата на признаци на еструс са били проследени и чрез жребец пробник.

group were treated with Cloprostenol (Oestrofan @) 0,25 mg/mL, 1 mL i.m. Mares from test group 2 were treated with Cloprostenol (Oestrofan @) 0,25 mg/ml, i.m. 1 ml at the 1st and 14th day of experiment. Mares in the control group were not subjected to manipulation of the oestrus cycle.

After the last treatment, the experimental and control animals were subjected to daily ultrasound, transrectal control of the oestrus cycle to track folliculogenesis(Fig. 1, 2, 3 and 4), and the condition of the endometrium. Signs of oestrus were monitored by test stallion also.

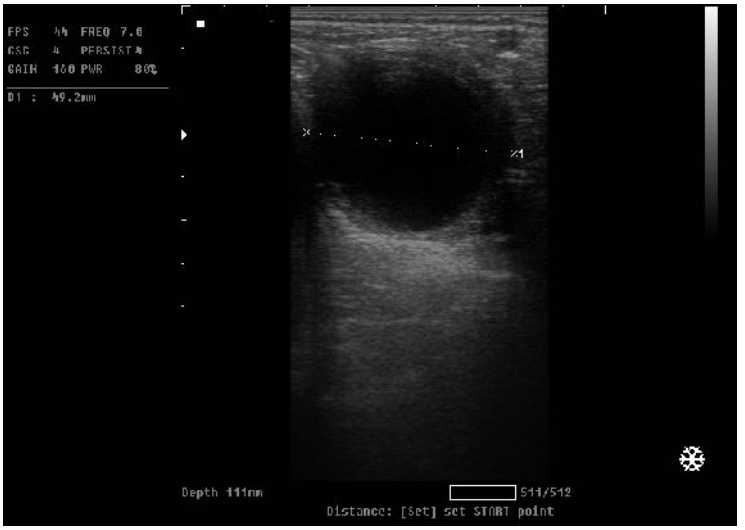
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Четири от кобилите включени в група 1, подложени на синхронизация са проявили признаци на еструс 4 дни след последното третиране. Едно от експерименталните животни е проявило признаци на еструс 5 дни след последното третиране и едно животно 6 дни след по-следното третиране. Това е установено чрез ехографски наблюдаван ендометриален едем и развитие на доминантен фоликул с размери над 35 mm, както и отваряне на цервикса. При две от кобилите от опитна група номер 1 се наблюдава развитие и овулация на два доминантни фоликула, което е рядкост при кобилите.

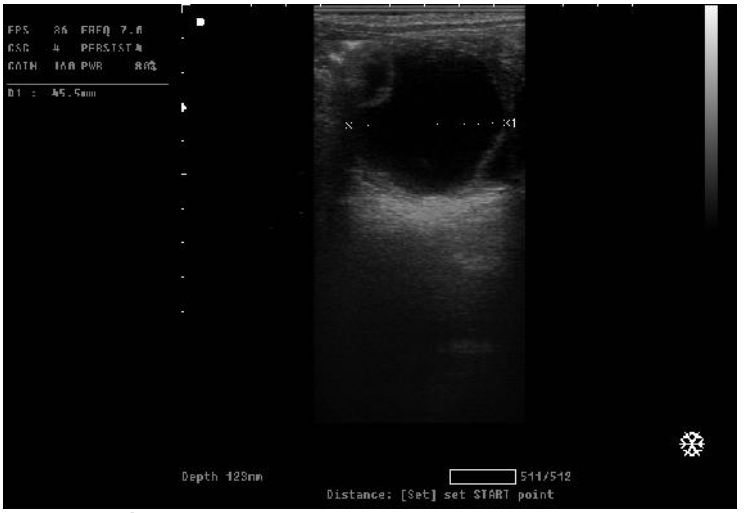
RESULTS AND DISCUSSION

Four mares included in group 1 undergoing synchronization have shown signs of oestrus 4 days following after the last treatment. One of the experimental animals showed signs of oestrus 5 days after the last treatment and one animal 6 days after the last manipulation of the oestrus cycle.

By ultrasonography has been observed endometrial edema, development of the dominant follicle size over 35 mm, and opening of the cervix. In two of the mares from the test group number 1 was observed development and ovulation of two dominant follicle, which is rare in mares.



Фиг. 1. Доминантен фоликул, опитна група 1 с размери 49.2 mm
Fig. 1. Dominant follicle test group 1 with dimensions of 49.2 mm

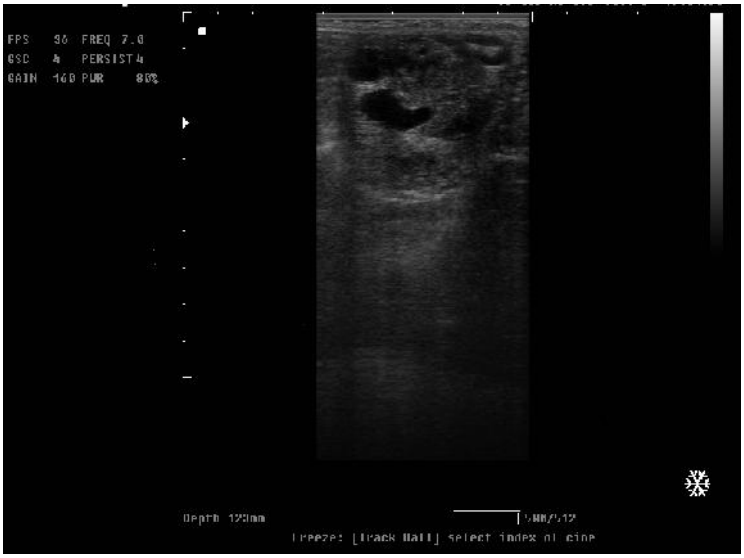


Фиг. 2. Доминантен фоликул, опитна група 1 с размери 45.5 mm
Fig. 2. Dominant follicle test group 1 with dimensions of 45.5 mm

Кобилите включени в експериментална група 2 и третирани двукратно с простагландини проявяват признаци на еструс, както следва: една кобила два дни след последното третиране, три животни проявяват признаци на еструс три дни след третирането и две животни са манифестирали еструс 5 дни след третитането .

The mares included in the experimental group 2 and treated twice with prostaglandins exhibit signs of estrus, as follows: a mare two days after the last treatment, three animals shown signs of oestrus three days after treatment and two animals manifested oestrus 5 days after treatment.

Фиг. 3. Доминантен предовулационен фоликул, опитна група 2, размери 49.5 mm
Fig. 3. Dominant pre-ovulatory follicle test group 2, size 49.5 mm



Фиг. 4. Доминантен фоликул в момент на овулация и формиране на жълто тяло, опитна група 2
Fig. 4. Dominant follicle at a time of ovulation and formation of the corpus luteum test group 2

Животните включени в контролната група са проявили признаци на еструс независимо едно от друго, в период от 25 дни, като не се наблюдава закономерност или синхрон

The animals included in the control group showed signs of oestrus independently of one another, in a period of 25 days, there was no pattern or synchronization between them.

между тях. Не са наблюдавани съществени различия в размера на фоликулите в сравнение с опитните групи.

Анализирайки получените данни, може да се приеме, че и двата начина за синхронизация на естралния цикъл на кобили от дадената порода показват сходни резултати с получените от други автори при други породи (Vanderwall, 2007; Riera, 2011). За разлика обаче от използването на подобни схеми и препарати при опитна група 1 има случаи на двойна овулация в един и същи яйчник в един естрален цикъл, без използването на препарати, индуциращи суперовулация (Squires, 2007; Roser, 2012).

Наблюдавана е по-добра синхронизация на естралния цикъл при животните от група 1, в сравнение с тези от група 2 и на тази база може да се приеме, че използването на Altrenogest в комбинация с простагландин е по-подходящо за използване при тази порода коне с цел синхронизацията на естралния цикъл, като подготовка за ембриотрансфер. Като недостатък на този протокол трябва да бъде изтъкната цената на хормоналните препарати използвани в него. Предимство е добрия синхрон на еструса, фундаментално условие за успешна трансплантация на ембриони и наблюдаваната двойна ипсилатерална овулация, което ще бъде подло-

There were no significant differences in the size of the follicles as compared with the test groups.

Analyzing the data obtained, it can be assumed that the two-way synchronization of oestrus cycle of mares given breed show similar results with those obtained by other authors in other breeds. (Vanderwall, 2007; Riera, 2011).

However, unlike the use of such schemes and preparations in the test group 1 there are cases of double ovulation in the same ovary in an oestrus cycle without the use of preparations inducing superovulation (Squires, 2007; Roser, 2012).

It was found better synchronization of oestrus cycle of the animals in Group 1 compared to Group 2, and on this basis it can be assumed that the use of Altrenogest in combination with a prostaglandin is more suitable for use in this horse breed for the purpose of synchronization of oestrus cycle in preparation for embryo-transfer. As disadvantage of this protocol should be highlighted cost of hormonal preparations used in it. Advantage is well synchronized estrus, fundamental condition for successful transplantation of embryos and observed double ipsilateral ovulation, which will be subjected to further research.

жено на по-задълбочени изследвания. Това би позволило създаването и колекцията на по-голям брой ембриони от ценни екземпляри от тази порода.

This would allow the creation and collection of a large number of valuable embryo specimens of this breed.

ИЗВОДИ

Настоящото изследване посочва, като по-подходящ за синхронизацията на естралния цикъл на кобилите от породата Дунавски кон протокол номер 1, предвиждащ използването на Алтреногест (Regumate@) и Cloprostenol (Oestrofan@). Въпреки по-високата му цена, той позволява повишаване успеваемостта на ембриотрансфера в тази порода, като освен това дава и възмойността на по-голям брой ембриони от ценни от генетична гледна точка кобили.

CONCLUSIONS

This study states as more suitable for the synchronization of oestrus cycle of mares breed horse Danube Protocol No. 1, which provides the use of Altrenogest (Regumate@) and Cloprostenol (Oestrofan@).

Despite its high price, it allows increasing the success rate of embryotransfer in this breed, also gives you the opportunity of a higher number of embryos of valuable genetic perspective mares.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Campbell M. L. H.** Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations, *Equine Veterinary Education*, 2014, vol. 26, 6, 322-327
2. **Janet F. Roser, Geraldine Meyers-Brown**, Superovulation in the Mare: A Work in Progress. *JEVS*, vol. 32, Issue 7, Pages 376-386.
3. **Nagy P., Guillaume D., Daels P.** Seasonality in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 60-61, 245-262.
4. **Reenskaug A.** Embryo transfer in Horses-Methods, Possibilities and Limitations, *PhD Thesis*, 2014, Faculty of Veterinary science, Budapest, Hungary
5. **Riera F.** Systematic approach to efficiency problems in an embryo transfer program. *In: Proceedings of the Annual Conference of the Society for the Study of Theriogenology*, 2011, Society for Theriogenology, Montgomery, Alabama.
6. **Sitzenstock F., Rathke I., Ytournel F., Simianer H.** The potential of embryo transfer in a german horse-breeding programme. *J. Anim. Breed. Genet.,* 2013, 130, 199-208.
7. **Squires E.L., McCue P.M.** Superovulation in mares. *Animal Reproduction Science,* May 2007, vol. 99, 1-2, 1-8.
8. **Vanderwall D.K. and Woods G.L.** Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: Current Therapy in Large Animal. *Theriogenology*, 2007, vol. 2, 211-218.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 4, 2016, (36-45)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Изкуствено осеменяване, получаване и преценка на ембриони при кобили от порода Дунавски кон

Злати Шекеров[1*], Паулина Таушанова[1], Михаил Червенков[1], Росен Стефанов[1], Георги Йорданов[2], Бойко Георгиев[1]

[1]ИБИР-БАН, Цариградско шосе 73, 1113 София, България
[2]Национална асоциация по коневъдство
**E-mail: zlati_sh@abv.bg*

Artificial insemination, receipt and assessment of embryos in Danube horse breed mares

Zlati Shekerov[1*], Paulina Taushanova[1], Mikhail Chervenkov[1], Rosen Stefanov[1], Georgi Yordanov[2], Boiko Georgiev[1]

[1]IBIR-BAN, 73 Tsarigradsko Shosse, 1113 Sofia, Bulgaria
[2]National Association of Horse Breeding

РЕЗЮМЕ

С настоящото изследване беше установено, че предварително манипулирани хормонално кобили с различни схеми за синхронизация на естралния цикъл – с използване на простагландини и комбинирано използване на прогестини и простагландини, запазват заплодяемостта при осеменяване с криоконсервирана семенна течност. Освен това беше установено и запазване на заплодяемостта при намаляване на осеменителната доза с 50% (400 млн.), но при съкращаване на периода на трансректално ехографско проследяване на овулацията от 2 на 1 час. Получените ембриони от така осеменените две групи опитни кобили са с добро качество и могат да бъдат използвани за целите на ембриотрансфера.

Ключови думи: кобили, изкуствено осеменяване, криоконсервирана семенна течност, ембриони

SUMMARY

This study proved that previously manipulated hormonal mares with different schemes for synchronization of oestrus cycle – using prostaglandins and combined use of progestins and prostaglandins, fecundity remains at insemination with cryopreserved semen. Furthermore it was found preserving fecundity in reducing the insemination dose by 50% (400 million), but with reduction of the period of transrectal ultrasound tracking ovulation of 2 for 1 hour.

The resulting embryos so inseminated two groups experimental mares are of good quality and can be used for the purposes of embryotransfers.

Key words: mare artificial insemination, cryopreserved semen, embryo

УВОД

Дунавската порода коне е

INTRODUCTION

Danube horse breed was

създадена в КЗ ”Клементина” България намиращ се край гр. Плевен. За разплод са били използвани жребци и кобили с различна породна принадлежност – Арабски, полукръвни, местни подобрени, Донски, Унгарски, полутежковозни и др. Стремежът бил да се съберат и поставят при добри условия на хранене и отглеждане определени групи коне с цел да се произвеждат по-едри жребци. През 1893 г. от Унгария са внесени коне от породите Нониус, Липицански, Рисаци, Англо-арабски, Шагия и др., а по-късно и незначителен брой чистокръвни коне от Франция. В продължение на 25 години е извършвано безсистемно кръстосване. Същинската работа по създаване на породата започва през 1924 г. в ново основаната секция на конезавода за нониуси. Първоначално били използвани различни методи на развъждане, а на по-късен етап като основен е използван метода на чистопородно развъждане с коне от породата Нониус, послужила за основа на племенното стадо. Към настоящия момент в страната са останали само 20 жребци под селекционен контрол и 85 кобили, това налага използването на асистирани репродуктивни техники за запазване и увеличаване на съществуващия генофонд.

С настоящето изследване си поставихме за цел да про-

created in CA "Clementine" Bulgaria is located near the town. Pleven. For breeding were used stallions and mares of different breeds belonging-Arab, half-local enhanced, Donskoy, Hungarian, polutezhkovozni and others.

The ambition was to collect and put in good conditions of feeding and breeding certain groups of horses in order to produce larger stallions. In 1893 Hungary imported horses from breeds Nonius, Lipitsanski, Risatsi, Anglo-Arabian, Shaggy and others, and later small number of thoroughbred horses from France.

For 25 years it was carried out unsystematic crossing. The actual work on the creation of the breed began in 1924 founded a new section of the horse farm for vernier.

They were originally used different methods of breeding, and later as the main method is used pure-bred breeding horses breed Nonius that formed the basis of tribal herd.

At present in the country are only 20 stallions under selection control and 85 mares this requires the use of assisted reproductive techniques to preserve and enhance the existing gene pool.

With this study we aim to investigate the possibilities for

учим възможностите за повишаване на заплодяемостта чрез ИО с криоконсервирана семенна течност и преценка на получените ембриони като предпоставка за успешен ембриотрансфер.

increasing the fecundity through IE with cryopreserved semen and assessing the resulting embryos as a prerequisite for successful embryo transfer.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В изследването бяха включени две групи по 6 опитни животни, отглеждани при еднакви условия, в периода март-юли, на възраст между 5 и 12 години, в отлично репродуктивно здраве.

Изкуственото осеменяване беше извършено с криоконсервирана семенна течност съхранявана в пайети от 0,5 ml, в съд с течен азот и размразена на водна баня непосредствено преди депозирането ú на температура от 37 ^{o}C, за интервал от 60 секунди. Стандартна осеменителна доза 800 млн сперматозоида в 2 ml, използван криопротектор Equipro one step® (Minitube, Germany). Осеменяването беше извършено до 2 часа след настъпилата овулация, установена чрез трансректално ехографско изследване извършено на всеки 2 часа. Тази схема е приложена при животните от експериментална група 1. При кобилите от експериментална група 2 интервалът на трансректално изследване беше намален на един час, като успоредно с това осеменителната доза беше сведена до 400 млн сперматозоида в 1 ml. Анализът на семенната течност беше

MATERIAL AND METHODS

The study included two groups of 6 experimental animals under identical conditions between March and July, between 5 and 12 years of age, in excellent reproductive health.

Artificial insemination was performed with cryopreserved semen stored in straws of 0.5 ml in a container of liquid nitrogen and thawed in a water bath immediately prior to depositing at a temperature of 37 °C, for an interval of 60 seconds.

Standard semen dose 800 million sperm in 2 ml used cryoprotectant Equipro one step®(Minitube, Germany). Insemination was carried out within 2 hours after the onset of ovulation established by transrectal ultrasound performed every 2 hours.

This scheme has been applied in animals from test group 1. In mares from test group 2 interval of transrectal study was reduced to one hour in parallel with semen dose reduced to 400 million sperm in 1 ml.

The analysis of the semen was made by CASA, NIKON Eclipse

направен чрез CASA, NIKON Eclipse 200. Семенната течност беше депозирана дълбоко в маточния рог. Всички опитни кобили бяха осеменени с криоконсервирана семенна течност от един жребец, за да се минимизират различията. Получаване на ембрионите бе извършено чрез маточна промивка с 2 l. Dulbecco's medium, посредством двупътен фолиев катетър. Ендометриалната промивка беше извършена 7 дни след осеменяването. След промивката, получената течност се филтрира през филтър с размер на порите от 75 микрона, с цел отделянето на ембриона от средата, като получените ембриони се преценяват относно стадий на развитие и качество. Животните от двете експериментални групи бяха подложени на манипулация на естралния цикъл, с цел синхронизация, в предходно изследване. Кобилите от група 1 са третирани с Altrenogest (Regumate®, MSD Animal Health) 14 ml, P.O., в продължение на 14 дни, след което на 15-и ден се третират с простагландини Oestrophan® (Bioveta) 0,25 mg/ml, 1 ml I.M. Кобилите от експериментална група 2 са третирани двукратно през 14 дни с Oestrophan® (Bioveta), 0,25 mg/ml, 1 ml I.M.

200. The semen was deposited deep into the uterine horn. All experimental mares were inseminated with cryopreserved semen from one and the same stallion in order to minimize the differences. Preparation of the embryos was accomplished by uterine lavage with 2 l.

Dulbecco's medium, by means of two-way Foley catheter. Endometrial flushing was performed seven days after insemination. After washing, the resulting liquid was filtered through a filter with a pore size of 75 microns, with the purpose of separating the embryo from the medium, and received embryos were evaluated for stage of development and quality. The animals of the test groups were subjected to the manipulation of the oestrus cycle, in order to synchronize, in a previous study. The mares from group 1 were treated with Altrenogest (Regumate®, MSD Animal Health) 14 ml, PO, for 14 days, after which a 15-day and were treated with prostaglandins Oestrophan® (Bioveta) 0,25 mg/ml, 1 ml IM Mares from test group 2 were treated twice in 14 days interval with Oestrophan® (Bioveta), 0,25 mg/ml, 1 ml I.M.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На Фигура 1 и 2 е представена спермограма от анализ на семенна течност на жребец

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 and 2 present data of semen analysis of a stallion from the Danube breed used for

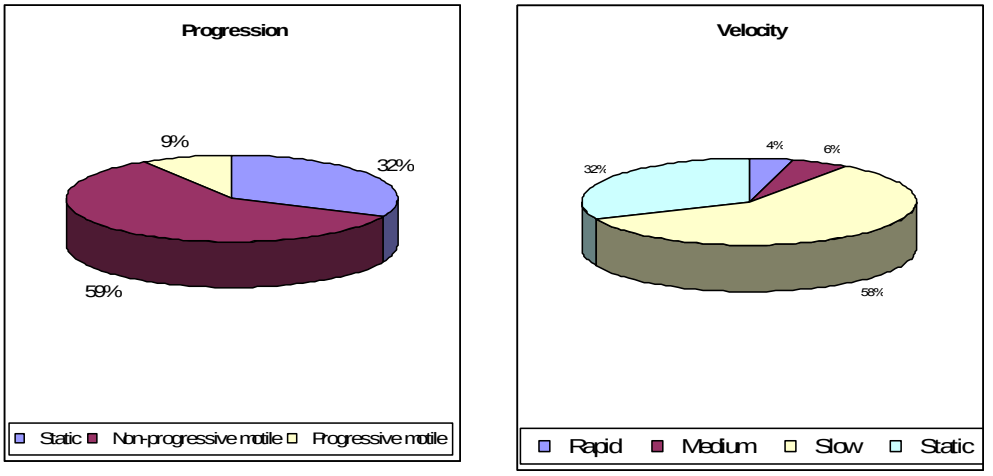
от Дунавска порода използван за осеменяване на опитните кобили от групи 1 и 2. От представената спермограма се вижда, че след размразяване семенната течност има обща подвижност на сперматозоидите 68%, като 59% са са непрогресивно подвижни, а 9% са праволинейно настъпателно движение. От общо подвижните сперматозоиди 4.1% са бързо подвижни, 5.6 % са средно подвижни и 58.7% са бавно подвижни, което се различава от данните посочени за други породи коне (Katila, 2001).

При морфологичния анализ на използваната семенна течност за осеменяване бяха установени 93% сперматозоиди с нормална морфология и само 7 % с отклонения – 3% в областта на главата и 4% в областта на опашката (Фигура 2).

insemination of experimental mares in groups 1 and 2.

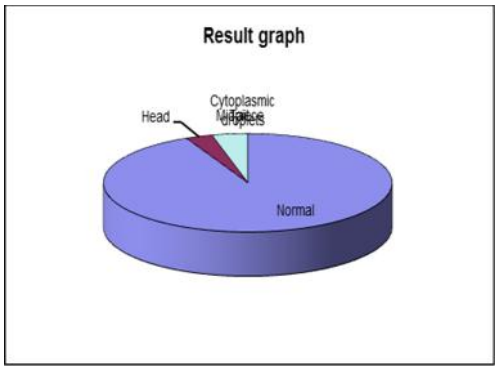
The documents semen analysis shows that after thawing semen has a total sperm motility 68% - 59% have been moved non-progressive, and 9% are straightforward offensive movement. Of the total motile sperm 4.1% are quickly removable, 5.6 average mobile and 58.7% are slow-moving, which differs from the data referred to other horse breeds. (Katila, 2001)

When the morphological analysis of sperm used for insemination were established 93% spermatozoa with normal morphology and only 7% with deviations – 3% in the sperm head and 4% in the sperm tail (Figure 2).



Фиг. 1. Спермограма на криоконсервирана семенна течност от Дунавски жребец използван за осеменяване на кобилите от двете опитни групи
Fig. 1. Spermogram of frozen semen from a Danube breed stallion used for insemination of mares from both test groups

MORPHOLOGY		
Normal	93	93,00
Head	3	3,00
Midpiece	0	0,00
Tail	4	4,00
COUNT CHANNEL		
Cytoplasmic droplets	0	0,00
Normal	93	93,00
Abnormal	7	7,00



Фиг. 2. Морфологичен анализ на криоконсервирана семенна течност от Дунавски жребец използван за осеменяване на кобилите от двете опитни групи
Fig. 2. Morphological analysis of frozen semen from a Danube breed stallion used for insemination of mares from both test groups

При опитните животни от група 1 и 2 бяха получени по 3 ембриона от всяка група. Този резултат сочи заплодяемост от 50 % и в някой случаи е подобен с данни, получени при други породи коне подложени на изкуствено осеменяване със замразена семенна течност (Barbacini, 2000; Squires et al., 2006). В тези случаи е особено важно кобилите да бъдат осеменени възможно най-близо до времето на овулация, като се счита,че оптималното време за това е около 12 часа преди овулацията или 6 часа след нея. Ако се използва само една доза семенна течност, както в настоящото изследване, добре е кобилите да се изследват ехографски на 6 часов интервал и да се осеменят колкото е възможно по-скоро след установяване на овулацията (Scherzer, 2011). Успоредно с то-

In experimental animals of group 1 and 2 were obtained 3 embryos from each group. This result suggests fecundity than 50% and is consistent with data obtained from other horse breeds have been artificially inseminated with frozen semen (Barbacini, 2000; Squires et al., 2006).

In such cases it is particularly important mares inseminated be as close as possible to the time of ovulation, it is considered that the optimum time for this is about 12 hours before ovulation or 6 hours after.

If only one dose of semen has been used, as in this study, it is good mares to be examined by ultrasound at 6 hour intervals and to carry out insemination as soon as possible after the establishment of ovulation (Scherzer, 2011).

ва беше установено, че независимо от намалената на половина осеменителната доза (400 млн) и скъсяване на трансректалния ехографски контрол на овулацията, заплодяемостта се запазва, както при опитна група номер 1 (Sieme, 2003). Полученият от нас резултат е в съответствие с изнесените от Veronesi et al. (2003), Metcalf and Tompson (2010), Newcombe et al. (2008), които са установили, че няма различия в заплодяемостта при кобили с индуциран еструс посредством третиране с простагландини, независимо от данните изнесени от Nielsen et al. (2008), че индуцираният по този начин еструс, води до редуциране на заплодяемостта. Получените ембриони и от двете групи кобили са преценени, като 4 от тях са на стадйи бластоцист, а два в стадйи ранен бластоцист, всички с изключение на един (получен от кобила от втора опитна група) са с добро качество.

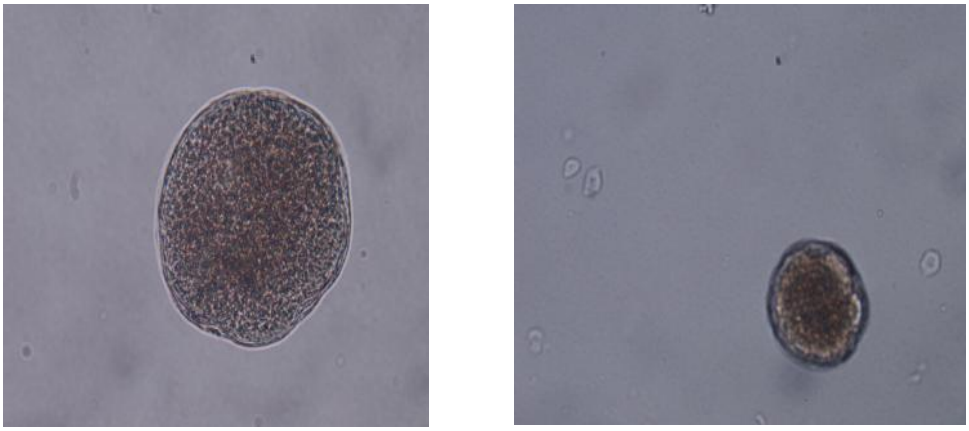
Независимо от различните схеми на третиране използвани за синхронизация на еструса при кобили от породата Дунавски кон, включени в двете експеримнтални групи, получените ембриони са с добро качество и могат да бъдат използвани за ембриотрансфер (Фигура 3 и 4).

It was also found that despite halved semen dose (400 million) and in parallel, shortening the transrectal ultrasound detection of ovulation, fecundity remains as in test group number 1 (Sieme, 2003).

Resulting from our result is in line with presented by Veronesi et al. (2003), Metcalf and Tompson (2010), Newcombe et al. (2008), which found that there were no differences in fecundity in mares with oestrus by treating with prostaglandins, regardless of data exported by Nielsen et al. (2008) to induce estrus thus, leads to a reduction of fecundity.

The resulting embryos in both groups were considered as 4 of them was on stage blastocyst, and two in stage early blastocyst, all but one (obtained from a mare by a second test group) are of good quality.

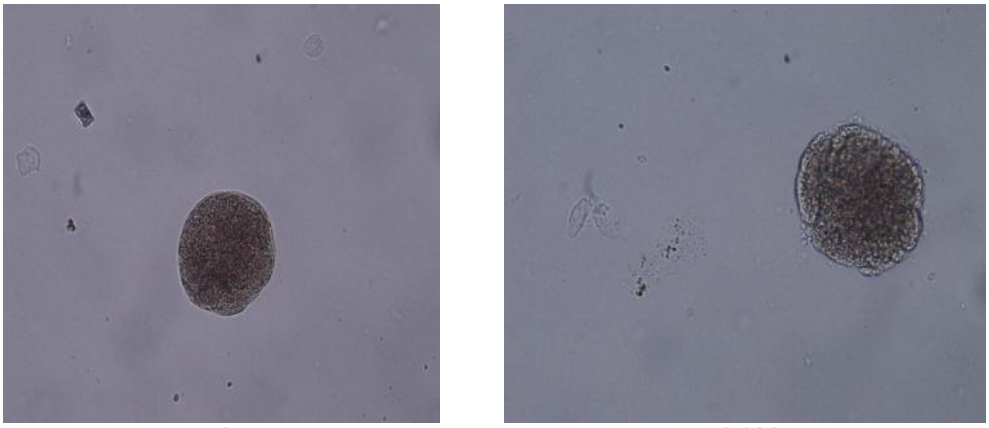
Despite the different treatment regimens used for synchronization of estrus in mares from Danube horse breed included in both test groups resulting embryos are of good quality and can be used for embryotransfer (Figure 3 and 4).



а) б) / b)

Фиг. 3. Ембрион от кобила от опитна група 1 а) стадий ранен бластоцист получен на 6-и ден след осеменяване, б) бластоцист, получен 7-и ден след осеменяване

Fig. 3. Embryos mare from test group 1 a) early blastocyst stage received on 6th day after insemination b) blastocyst derived on 7th day after insemination



а) б) / b)

Фиг. 4. Ембриони на кобили от опитна група 2, а) стадий ранен бластоцист получен на 6-и ден след осеменяване, б) бластоцист получен 7-и ден след осеменяване

Fig. 4. Embryos mares from test group 2 a) early blastocyst stage received on 6th day after insemination b) blastocyst derived on 7th day after insemination

Резултатите от това изследване показват, че при кобилите от породата Дунавски кон може с успех да бъде използвана криоконсервирана семенна течност, като това не се отра-

The results of this study show that mares from Danube horse breed can successfully be inseminated with cryopreserved sperm, as it does not affect the fecundity and did not affect the

зява на заплодяемостта и не повлиява негативно качеството на получените ембриони.

Тези резултати показват възможността за запазване на заплодяемостта при тази порода, намалявайки осеменителната доза при изкуственото осеменяване със замразена семенна течност, съчетано с пропорционално намален интервал на трансректално ехографско проследяване на овулацията, независимо от предходната манипулация на естралния цикъл с цел синхронизация посредством третиране с простагландини.

Тези резултати могат да бъдат обяснени със скъсяването на интервала овулация – осеменяване, като се постига осеменяване непосредствено след овулацията, което е причината за повишаване на заплодяемостта. Някои автори прилагат осеменяване преди и след овулация за да постигнат същият ефект (Vidament, 1997). Това ни позволява да оптимизираме наличните количества криоконсервирана семенна течност от генетично ценни разплодници, както за изкуствено осеменяване, така и за получаване на ембриони с цел трансплантация. Получените резултати от настоящото изследване показват добро качество на получените ембриони.

quality of the embryos.

These results indicate the possibility of keeping the fecundity in this breed, reducing semen dose in artificial insemination with frozen semen, combined with proportionately reduced interval transrectal ultrasound monitoring of ovulation, regardless of previous manipulation of the oestrus cycle with prostaglandins.

These results can be explained by the shortening of the interval ovulation – insemination, achieving insemination immediately after ovulation, which is the cause of increased fecundity.

Some authors apply insemination before and after ovulation to achieve the same effect (Vidament, 1997). This allows us to optimize our stocks cryopreserved semen from genetically valuable breeding sires, as well as artificial insemination and to obtain embryos for the purpose of transplantation. The results of this study indicate good quality of the resulting embryos.

ИЗВОДИ

Резултатите от това изследване ни позволяват да заключим,

CONCLUSIONS

The results of this study allow us to conclude that by reducing the

че чрез намаляване на интервала на трансректално ехографско проследяване на овулацията, водещо до осеменяване непосредствено след овулацията, ни позволява да увеличим заплодяемостта и/или да оптимизираме наличните количества криоконсервирана семенна течност от генетично ценни жребци. Оптимизирането на заплодяемостта по тази схема не води до влошаване качеството на получените ембриони.

range of transrectal ultrasound monitoring of ovulation leading to insemination immediately after ovulation, allows us to increase our fecundity and/or to optimize existing stocks cryopreserved semen from genetically valuable stallions. Optimizing fecundity of this scheme does not lead to deterioration in the quality of the embryos.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Barbacini S, Zavaglia C, Marchi V, Necchi D.** Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinary Journal*, 2000, 2:6.
2. **Katila T.** In Vitro evaluation of Frozen-thawed Stallion Semen: A Review. *Acta Vet. Scand*., 2001, 42(2); 199-217
3. **Metcalf E.S. and Thompson M.M.** The effect of PGF2α-induction of estrus on pregnancy rates in mares. *J. Equine Vet. Sci.,* 2010, 110, 237-244.
4. **Newcombe J., Jochle W., Cuervo-Argano J.** Effect of dose of cloprostenol in the interval to ovulation in the diestrus mare: a retrospective study. *J.Equine Vet. Sci.,* 2008, 28, 532-539.
5. **Nielsen J., Kofoed BockT., Ersboll A.** Factors associated with fertility in horses in a Danish equine practice after artificial insemination with frozen-thawed semen. *Anim.Reprod.Sci.,* 2008, 107, 336-337.
6. **Scherzer J.** Artificial Insemination and Embryo Transfer in Mares, Vet learn.com, *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 2011, vol. 33, №7, E1-E5.
7. **Sieme H., Schafer T., Stout T.A., Klug E., Waberski D.** The effects of different insemination regimens on fertility in mares. *Theriogenology*, 2003, vol.60, Issue 6, pages 1153-1164.
8. **Squiresp E.L., Barbacini S., Matthews P., Byers W., Schwenze K., Steiner J., Loomis P.R.** Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and froen semen. *Equine veterinary educ.,* 2006, 18, 96-99
9. **Veronesi M., Battocchio M., Faustini M., Gandini M., Cairoli F.** Relationship between pharmacological induction of oestrus and/or ovulation and twin pregnancy in the thoroughbred mares. *Domest.Anim. Endocrinol*., 2003, 25, 133-140.
10. **Vidament M., Dupere A.M., Julienne A., Noue P., Palmer E.** Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 1997, vol.48(6):907-917