Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 1-9
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Проследяване на някои качествени и биохимични показатели на кефир от козе мляко при съхранение

Илиана Начева*, Мария Донева, Петя Методиева, Камелия Логиновска

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх" № 53, 1407 София, България
**E-mail: Iliana_nacheva@abv.bg*

Tracing some quality and biochemical parameters of kefir from goat milk during storage

Iliana Nacheva*, Maria Doneva, Petya Metodieva, Kamelia Loginovska

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

РЕЗЮМЕ

От изходната суровина - козе мляко е получен ферментационнен продукт (кефир), който е охарактеризиран по основни качествени показатели. Според получените данни от органолептичната оценка, съхранението на кефира при температура 4°C е препоръчително до 14 ден. След втората седмица, продуктът запазва до голяма степен своите полезни и благоприятни за човешкия организъм качества. Установените данни за физикохимичния и биохимичен състав на получения от козе мляко ферментирал продукт (кефир) го характеризират като 100 % натурален продукт с многостранни здравословни ефекти.

Проведени са електрофоретични изследвания, които установяват промени в казеиновите и суроватъчните фракции на прясно и ферментирало козе мляко и кефир при съхранение. Отчитат се основните казеинови фракции (α-казеин и β-казеин), както и β-лактоглобулин и α-лактоалбумин от суроватъчните белтъци.

Ключови думи: кефир,

SUMMARY

From raw material - goat milk is prepared a fermentation product (kefir), which was characterized by main quality indicators. According to the data obtained by organoleptic evaluation, storage of kefir at 4℃ is preferably up to 14 day.

After the second week, the product retains its largely useful and beneficial to the human body characteristics.

Data of physicochemical and biochemical composition resulting from goat milk fermented product (kefir) characterize it as a 100% natural product with multiple health effects.

Electrophoretic studies, which establish changes in casein and whey fractions of fresh and fermented goat milk and kefir during storage, were conducted.

The main casein fraction (α-casein and β-casein) and β-lactoglobulin and α-lactoalbumin of whey proteins.

Key words: kefir, quality

качествени показатели, биохимични показатели, съхранение, козе мляко

parameters, biochemical parameters, storage, goat milk

УВОД

Млякото и млечните продукти са едни от най-добре възприетите и масово консумирани храни. За получаването им се използват ферментационни технологии с участието на различни млечнокисели бактерии, като така се увеличава диетичния им потенциал. Ферментиралите млека са една изключително подходяща форма за усвояване на хранителните субстанции в млякото от една страна и за въздействие на здравословните свойства на млечнокиселите бактерии върху различни функции на организма от друга (Slacanac et al., 2010*).*

Кефирът е традиционна напитка, резултат от две ферментации с кефирни зърна – млечнокисела и алкохолна. Кефирната гъба е с неправилна форма, състояща се от зърна, вариращи по размер от 1 до 6 mm в диаметър. Те се състоят от казеин и гелообразни колонии от микроорганизми, които се развиват в симбиоза. Кефирът се счита за функционална храна и ползите от неговата консумацията са многобройни (Guzel-Seydim et al., 2011). Освен високата хранителна стойност на напитката като източник на протеини и калций е установено, че кефирът притежава антибактериални, имуностимулиращи, антимутагенни и антиканцерогенни ефекти (Garrote et al., 1998; De Moreno et al., 2007).

Козето мляко е хранителен продукт с доказани лечебни качества, но възможностите за включването му като компонент в продукти с функционално предназначение имат ограничен характер и не са достатъчно изследвани. Ето защо, интересът ни е насочен към създаване на продукт на основата на козе мляко, ферментиран със симбиотични асоциации от млечнокисели бактерии и дрожди в кефирните зърна.

Цел на настоящата разработка *е*

INTRODUCTION

Milk and dairy products are one of the most accepted and widely consumed foods. They are obtained using fermentation technology involving various lactic acid bacteria, thereby increasing their dietary potential.

Fermented milks are a particularly suitable form for absorption of nutrient substances in the milk on the one hand and to influence the health of the lactic acid bacteria on the various functions of the organism from another (Slacanac et al., 2010*).*

Kefir is a traditional drink, the result of two fermentations with kefir grains - lactic acid and alcohol. Kefir fungus is of irregular shape, consisting of grains ranging in size from 1 to 6 mm in diameter. They consist of casein and gelatinous colonies of microorganisms that grow in symbiosis. Kefir is considered a functional food and the benefits of its consumption are numerous (Guzel-Seydim et al., 2011).

Besides the high nutritional value of the beverage as a source of protein and calcium it is also known that kefir has antibacterial, immune-stimulating, antimutagenic and anticarcinogenic effects (Garrote et al., 1998 De Moreno et al., 2007).

Goat's milk is a food product with proven healing qualities, but the possibilities for its inclusion as a component in products with an functional purpose are limited and are not sufficiently investigated. Therefore, our interest is focused on creating a product based on goats milk fermented with symbiotic associations of lactic acid bacteria and yeast in the kefir grains.

The aim of the present

изследване на основните физикохимични показатели на кефир от козе мляко и проследяване на промяната в казеиновите и суроватъчните му фракции при съхранение.

development is the research of the basic physicochemical parameters of kefir from goat's milk, and tracking the changes in the casein and whey fractions during storage.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използвано е козе прясно мляко и стартерна култура от кефирни зърна (2%), които предварително се активират в стерилно обезмаслено мляко при 25°C в продължение на 24 часа. Готовата стартерна култура се инокулира в пастьоризираното козе мляко и се инкубира статично при 25°C в продължение на 24 часа до получаване на ферментирал продукт с pH 4,6-4,8 и 90-100°T.

Органолептична оценка: по показателите външен вид и консистенция, цвят, вкус и аромат.

Физикохимични анализи: сухо вещество, % – влагомерна везна „Sartorius"; активна киселинност (pH) – определя се с pH-метър "Hanna"; титруема киселинност (по Тьорнер); съдържанието на общ белтък % (БДС 9374-82); съдържанието на мазнини % (БДС 8549-74); обща пепел (БДС 9373-80); съдържание на лактоза (тегловен метод).

Енергийна стойност – на 100 g продукт (kcal/kJ)

Биохимични изследвания – Електрофореза в полиакриламиден гел – SDS-PAGE (по Laemmli, 1971) за определяне на белтъчните казеинови и суроватъчни фракции със събирателен гел – 6.0% и разделителен – 10%. Електрофорезата е проведена при сила на тока 30 mA и начално напрежение 110 V за около 3,5 часа. След приключване на електрофорезата гелът се оцветява с разтвор на Coomassie brilliant blue G – 250 за 20-30 минути, след което се промива и се дензитометрира на дензитометър "ERI – 10 " на фирма "Carl Zeiss – Jena".

Статистическа обработка

Резултатите са обработени с помощта на програмен продукт MS Office Excel.

MATERIAL AND METHODS

It is used goat milk and starter culture of kefir grains (2%), which was pre-activated in sterile skim milk at 25 ° C for 24 hours.

The starter culture was inoculated in pasteurized goat milk and incubated statically at 25 ° C for 24 h to obtain the fermented product to pH 4,6-4,8 and 90-100^0T.

Organoleptic evaluation – Indicators appearance and texture, color, taste and aroma.

Physiochemical analysis – dry substance, %, active acidity (pH) – pH-meter "Hanna" of a sample filtrate; titratable acidity – Thorner.total proteins - % (BDS 9374-82); total lipids - % (BDS 8549-74); total ash (BDS 9373-80); lactose (weight method).

Energy value – 100 g product (kcal/kJ)

Biochemical research – electrophoresis in polyacrylamide gel – SDS-PAGE (by Laemmli, 1971) with gathering gel – 6.0% and dividing – 10%.

The electrophoresis runs with current intensity 30 mA and initial voltage 110V for around 3,5h. After finishing of the process the gel is colored with a solution of Coomassie brilliant blue G – 250 for 20-30 min. The coloring intensity of the obtained zones is determined on density meter "ERI - 10 "of company "Carl Zeiss – Jena ".

Statistical analysis

The results were processed using the software MS Office Excel.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Органолептичната оценка е важен фактор за вкусовата възприемчивост на готовия продукт. Основните показатели на млечнокиселите продукти в това число и на кефира са външен вид и консистенция, цвят, вкус и аромат (Meilgaard et al., 2007).

Резултатите от сензорната оценка на пробите кефир от 1, 7 и 14 ден са представени в Таблица 1. Процесът на съхранение на кефира завършва до 21 ден, но органолептичните показатели рязко се променят след 14 ден.

RESULTS AND DISCUSSION

The organoleptic evaluation is an important key factor for the taste receptivity of the finished product. The main indicators of lactic acid products including kefir are appearance, texture, color, taste and aroma (Meilgaard et al., 2007).

The results of the sensory assessment of samples from kefir 1,7 and 14th day are given in Table 1. The process of storage of kefir ends to the 21st day, but the organoleptic parameters abruptly change after the 14th day.

Таблица1. Органолептична оценка на кефир (n= 7)
Table 1. Organoleptic evaluation of kefir (n = 7)

Дни Days	Външен вид Appearance	Консистенция Consistence	Цвят Colour	Вкус Taste	Аромат Flavour	Обща оценка Overall evaluation
1 ден day	9± 0,11	9± 0,02	9± 0,03	9± 0,01	9± 0,04	9.0± 0,02
7 ден day	9± 0,02	8± 0,21	9± 0,12	8± 0,02	8± 0,02	8.4± 0,12
14 ден day	7± 0,04	7± 0,02	8± 0,06	6± 0,11	7± 0,11	7.0± 0,10
21 ден day	5± 0,12	4± 0,09	5± 0,01	4± 0,02	4± 0,24	4.4± 0,13

Според извършената органолептична оценка полученият кефир покрива нормативните показатели за качествен ферментирал продукт. Външният му вид е хомогенен, а консистенцията е течна с умерена вискозност. Цветът варира от бял до леко кремав или жълтеникав оттенък. Продуктът има чист млечнокисел и освежаващ вкус и аромат с привкус на дрожди. Според получените данни, съхранението на кефира при температура 4^0C е препоръчително до 14 ден. След втората седмица, продуктът запазва до голяма степен своите полезни и благоприятни за човешкия организъм качества, но по отношение вкусовите показатели те намаляват до 50%.

В Таблица 2 са представени основните физикохимични параметри на кефир, след ферментация (22 часа) и в процеса на съхранение до 21 ден.

According to this organoleptic assessment, the obtained kefir covers the normative indicators of a quality fermented product. Its appearance is homogenous and the consistency-liquid with a moderate viscosity. The colour varies from white to slightly creamy or with a yellowish hue. The product has a pure lactic acid taste and a refreshing flavor with a hint of yeast. According to the data obtained, it's desirable to keep the kefir at 4C to the 14^{th} day. After the second week, the product retains a large portion of its useful and beneficial to the human body characteristics, but the taste indicators are reduced to 50%.

Table 2 presents the basic physicochemical parameters of kefir, after fermentation (22 hours) and in the process of storage up to 21^{st} day.

Таблица 2. Физикохимични показатели на прясно козе мляко и кефир (n=5)
Table 2. Physicochemical indicators of fresh goat's milk and kefir (n =5)

Показатели Indicators	Прясно козе мляко Fresh goat milk	Кефир / Kefir			
		Съхранение (дни) / Storage (days)			
		1 ден/day	7 ден/day	14 ден/day	21 ден/day
Сухо вещество, % Dry substance %	12.21 ± 0,02	12,20± 0,04	12,21± 0,12	12,17± 0,02	10,65± 0,11
Общ белтък, % Total protein %	3,53 ± 0,04	3,41± 0,11	3,39± 0,04	3,37± 0,04	3,09± 0,12
Общи липиди, % Total lipids %	4,05 ± 0,01	3,47± 0,01	3,45± 0,11	3,42± 0,04	3,36± 0,02
Лактоза, % Lactose %	4,63 ± 0,10	2,98± 0,12	2,95± 0,01	2,96± 0,08	2,94± 0,04
Активна киселинност Active acidity (pH)	6,8 ± 0,12	4,6± 0,02	4,7± 0,15	4,6± 0,12	4,7± 0,01
Титруема киселинност, Titratable acidity (^oT)	19 ± 0,11	95± 0,04	95± 0,04	94± 0,01	97± 0,07
Енергийна стойност / 100 g продукт (kcal/ kJ) Energy value 100 g product (kcal/ kJ)	71,12/297,57	58,47/264,64	58,08/243,01	57,77/241,71	56,02/234,39

Количеството сухо вещество в кефир след ферментация е 12.20%. В периода на съхранение (до 21 ден) съдържанието на сухо вещество намалява с 1,55%, по-рязко изразено след 14-тия ден на съхранение. Данните показват, че процесът на ферментация не повлиява съществено съдържанието на сухо вещество в изходното мляко.

Съдържание на протеин в изследвания кефир след ферментация е 3,41% и е близко по стойност до количеството протеин в изходното козе мляко (3,53%). В процеса на съхранение до 21 ден не се наблюдават значими колебания в стойностите на протеина, като общото му количество намалява едва с 0,32%.

Получените данни показват, че съдържанието на общи липиди след ферментацията в получения кефир също се понижава незначително (с 0,58%), спрямо изходното козе мляко. Това вероятно се дължи на действието на липазите, продуцирани от кефирните зърна, по време на ферментацията.

В процеса на съхранение (до 21 ден), количеството на общите липиди

The amount of dry matter in the kefir after fermentation is 12.20%. In the period of storage (to the 21st day) the dry matter content decreased to 1.55%, more sharply pronounced after the 14th day of storage. The data shows that the fermentation process does not significantly affect the dry matter content in the source material - milk.

Protein content in the kefir after fermentation is 3.41% and is close in value to the amount of protein in the starting goats milk (3.53%). In the process of storing up to the 21st day, there were no significant alterations in the values of the protein, as evident by the total amount being reduced only by 0.32%.

The data obtained also shows that the content of the total lipids after the fermentation in the kefir are lowered slightly (to 0.58%) from the starting goat milk. This is probably due to the action of the lipases produced by kefir grains, during fermentation.

In the process of storage (to the 21st day), the amount of the total lipids

намалява, като това е по-силно изразено след 14-тия ден на съхранение и е свързано на развитието на плесени, които са основните липолитични агенти във ферментиралите млека. Общо съдържанието на липиди през периода на съхранение намалява с 0,11%.

Лактозата се консумира от микроорганизмите по време на ферментацията и нивото ú в готовия продукт след 24 часа намалява значително (с 36%) в сравнение с първоначалното ú количество в млякото. Изследванията по време на съхранение обаче показват, че количеството на лактозата остава практически постоянно. Активната киселинност на изходното мляко (6, 8) намалява с 2,2 единици по време на процеса ферментация. В последващия период на съхранение след 24 час до 21 ден, стойностите на PH не се различават значително. Това може да се обясни с факта, че популацията на млечнокиселите бактерии намалява с течение на времето, поради което кефира не променя своята киселинност. Освен това нивото на лактоза остава практически постоянно по време на съхранение, тъй като в голямата си част тя е усвоена от бактериите в културата. Сравнително постоянното pH на кефира при съхранение може да се дължи и на наличието на дрожди.

По отношение на титруемата киселинност се наблюдава значително нарастване по време на ферментация – от 19 до 95 единици, след което в процеса на съхранение до 14 ден се запазват почти константни стойности и леко повишение до 21 ден.

На базата на химичния състав е изчислена енергийната стойност на изходното козе прясно мляко (71,12 kcal) и получения от него кефир (58,47 kcal). В периода на съхранение на кефира до 21 ден, се установява редукция в стойността на показателя с 15,1 kcal, което е резултат от дейността на микроорганизмите и общо намаленото съдържание на протеини, липиди и лактоза.

decreases, this being more expressed after 14th day of storage and is linked to the development of molds, which are themain lipolytic agents in fermented milk. The total content of lipids during storage decreased by 0.11%.

The lactose is consumed by the microorganisms during fermentation and its level in the finished product after 24 hours decreased significantly (by 36%).

Studies during storage, however, show that the amount of lactose remains practically constant.

The active acidity of the starting milk (6, 8) decreases by 2.2 units during the fermentation process. In the next period of storage after 24 hours to the 21st day pH values did not differ significantly. This can be explained by the fact that the population of lactic acid bacteria decreases over time, wherefore the kefir does not change its acidity.

Furthermore, the level of lactose remains virtually constant during storage, as much of it is absorbed by bacteria in culture. The relatively constant pH of the Kefir when stored may be due to the presence of yeast.

In terms of titratable acidity there is a significant increase during fermentation - from 19 to 95 units, then in the course of storage to the 14th day it holds almost constant values and increases slightly until the 21st day.

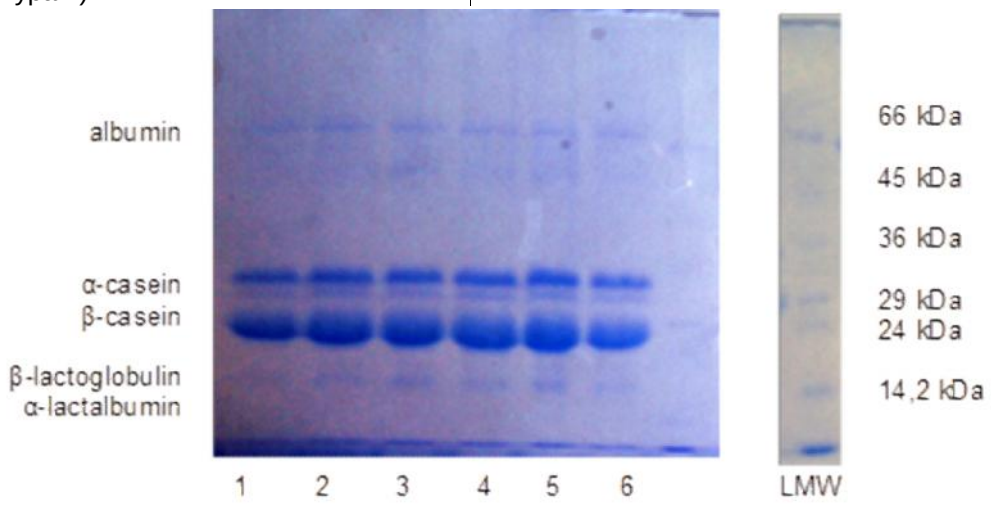
On the basis of the chemical composition,the energy value of the output goat milk is calculated to be (71,12 kcal) and the resulting kefir (58,47 kcal). During the storage of the Kefir prior to the 21st day a reduction is established in the value of the indicator with 15,1 kcal, which is a result of the action of microorganisms and a total reduced content of proteins, lipids and lactose.

Казеинът е главният белтъчен компонент в млякото и съставлява 75-80% от млечните протеини. В различните видове мляко се съдържа в различно количество. Козето мляко съдържа средно 2,4% казеин, кравето мляко – 2,7% казеин, а овчето – 5,34%. Суроватъчните белтъци съставляват около 20% от общите белтъци. Те са хетерогенни, като се установяват четири фракции – β-лактоглобулин (48,9%), α-лактоалбумин (28,8%), имуноглобулини (19,7%) и суроватъчен албумин (2,6%).

В хода на експеримента са сравнени електрофоретичните профили на прясно козе мляко, козе кисело мляко (2 % млечно-кисела закваска) и кефир от козе мляко при различен срок на съхранение – 1, 7, 13 и 19 дни. Прясното и кисело мляко са използвани в качеството на контролни образци (Фигура 1).

Casein is the major protein component in the milk and makes up 75 to 80% of milk proteins. In different types of milk casein is present in different amounts. Goat's milk contains an average of 2.4% casein, bovine milk – 2.7% and sheep's milk – 5.34%. Whey proteins make up about 20% of the total protein count. They are heterogeneous, and are established in four fractions – β-lactoglobulin (48,9%), α-lactoalbumin (28.8%) of immunoglobulins (19.7%) and whey albumin (2.6%).

In the course of the experiment the electrophoretic profiles of fresh goat's milk, goat yogurt (2% lactic acid ferment) and kefir from goat's milk in different storage time were compared - 1, 7, 13 and 19 days. Milk and yogurt are used in quality control samples (Figure 1).



Фиг. 1. SDS – PAGE на млечни протеини
1- прясно козе мляко; 2- козе кисело мляко – 1 ден; 3- кефир от козе мляко – 1 ден ; 4- кефир от козе мляко – 7 ден; 5 - кефир от козе мляко – 14 ден; 6- кефир от козе мляко – 21 ден; LMW - протеинов маркер

Fig. 1. SDS – PAGE of milk proteins
1 - fresh coat milk; 2- goat yogurt – 1 day; 3 - kefir from goat milk – 1 day ; 4 - kefir from goat milk – 7 day; 5 - kefir from goat milk – 14 day; 6 - kefir from goat milk – 21 day; LMW – protein marker

Резултатите от SDS – PAGE показват сходна картина на казеиновите и суроватъчни фракции при прясното (1) и киселото мляко след 1 ден съхранение (2). При всички проби се отчитат две големи протеинови фракции в рамките на 25- 35 kDa, които отговарят на основните казеинови фракции (α-казеин и β-казеин). Според различни източници молекулната маса на казеиновите белтъци при козето мляко е в посочените граници. Според Greppi et al. (2008), казеиновите фракции в козето мляко са в количества съответно 10 g/l за α-казеин и 11 g/l за β-казеин. От суроватъчните белтъци отчетливо се проявяват β-лактоглобулин и α-лактоалбумин (молекулна маса 14,2 kDa). Наблюдава се и фракция с молекулна маса около 67 kDa, която най-вероятно съответства на серумния албумин и следи от протеин с молекулна маса около 87 kDa.

Пробите от кефир от козе мляко след престой от 1 до 14 дни (3,4 и 5) имат сходен електрофоретичен профил. При проба 6 (кефир след 21 дневно съхранение) се наблюдава намален интензитет на ивиците на суроватъчните белтъци.

The results of SDS - PAGE showed a similar picture of the casein and whey fractions of fresh milk (1), and yogurt after 1 day of storage (2). In all samples are recorded two major protein fractions within 25-35 kDa, corresponding to the main casein fractions (α-casein and β-casein).

According to varied sources, the molecular weight of the casein proteins in the goats milk is within known limits. According to Greppi, Roncada and Fortin (2008), casein fractions in goat's milk are in amounts of respectively 10 g/l for α-casein and 11 g/l of β-casein. In whey proteins are observed β-lactoglobulin and α-lactoalbumin (molecular weight of 14,2 kDa). A fraction with a molecular mass of about 67 kDa is also spotted, which probably corresponds to serum albumin and traces of protein with a molecular mass of about 87 kDa.

Samples from kefir from goat's milk after a period of 1 to 14 days (3,4 and 5) have a similar electrophoretic profile. In sample 6 (kefir after 21 days of storage) there can be noticed a decreased intensity of the bands of the whey proteins.

ИЗВОДИ

След анализ на получените данни е установено, че съхранението на кефира до 14 ден при температура 4°C запазва в най-висока степен органолептичните му качества и вкусова възприемчивост.

Промените във физикохимичния състав на кефира и биохимичните параметри на казеиновите и суроватъчните му фракции по време на съхранение съответстват на настъпващите протеолитични процеси предизвикани от наличните микроорганизми и дрожди. Резултатите от проведените анализи характеризират получения кефир от козе мляко като натурален продукт с многостранни здравословни ефекти.

CONCLUSIONS

After analyzing the data obtained it was found that storing kefir for 14 days at a temperature of 4 ° C retains in the highest level its organoleptic qualities and flavor perception.

Changes in the physico-chemical composition of the kefir and the biochemical parameters of the casein and whey fractions during storage match occuring proteolytic processes caused by the present microorganisms and yeast. The results of the analysis characterize the obtained kefir from goat's milk as a natural product with multitude health effects.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **De Moreno de LeBlanc, A., C. Matar, E. Farnworth, G**. **Perdigón,** 2007. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of Dairy Science*, 90, pp. 1920–1928.
2. **Garrote, G., A. Abraham and G. De Antoni,** 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65, pp. 149–154.
3. **Guzel-Seydim, Z.B., T. Kok-Tas, A.K.Greene, A.C.Seydim,** 2011. Review: Functional properties of kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, pp. 261–268.
4. **Meilgaard, M., G. Civille and B. Carr,** 2007. Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition, *CRC Press, 2007. Taylor and Francis Group*, USA.
5. **Slacanac, V., R. Bozanic, J.Hardi, J.Rezessyne Szabo, M. Lucan & V.Krstanovic,** 2010. Nutritional and therapeutic value of fermented milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 171–189.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 10-17
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Изследване въздействието на различни температурни режими върху основни физикохимични показатели на ферментирали пробиотични продукти от козе мляко

Мария Донева, Петя Методиева, Илиана Начева*, Камелия Логиновска

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх" № 53, 1407 София, България
**E-mail: Iliana_nacheva@abv.bg*

Study of the effects of different temperature regimes on basic physical and chemical parameters of fermented probiotic products from goat milk

Maria Doneva, Petya Metodieva, Iliana Nacheva*, Kamelia Loginovska

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

РЕЗЮМЕ

Основните изисквания към пробиотиците като хранителен и диетичен продукт са свързани преди всичко с вкуса, консистенцията, трайността и микробното им съдържание. Продължителното съхранение предизвиква неизбежни промени в състава на пробиотичните продукти. В настоящото изследване е проследено въздействието на три температурни режима (5, 10 и 15°C) върху показателите – органолептична оценка, активна и титруема киселинност, общ белтък и синерезис при съхранение на ферментирали пробиотични продукти от козе мляко. Получените експериментални резултати определят оптималните условия за получаване на пробиотични продукти със добра вкусова възприемчивост, максимално запазени качествени показатели и висока биологична стойност.

Ключови думи: пробиотични продукти, физикохимични показатели, съхранение, козе мляко

SUMMARY

The basic requirements for probiotics as nutritional and dietary product related primarily to the taste, texture, durability and microbial content.

Prolonged storage causes inevitable changes in the composition of the probiotic products. In the present study is detected the effect at three temperature regimes (5, 10 and 15°C) on the parameters – organoleptic assessment, active and titratable acidity, total protein and syneresis of fermented products of probiotic goat milk during storage.

The obtained experimental results define the optimal conditions for receiving probiotic products with good flavor receptivity, maximum reserved qualitative parameters and high biological value.

Keywords: probiotic products, physicochemical parameters, storage, goat milk

УВОД

Пробиотиците са съвременни форми на имуностимулиращи продукти и заемат все по-значимо място в диетиката и хранителната профилактика. Основните изисквания към пробиотиците като хранителен и диетичен продукт са свързани преди всичко с вкуса, консистенцията, трайността и микробното им съдържание (Champagne, 2005). При продължително съхранение, промените в състава на пробиотичните продукти са неизбежни (López et al., 2014). Ето защо, в последните години усилията на учени и производители са насочени към изучаване на факторите, чрез които може да се повлияе положително върху качеството на крайния продукт при съхранение (Miteva et al., 2005).

Целта на настоящото изследвани е базирано на хипотезата, че чрез вариране и контролиране на технологичните показатели – температурен режим и продължителност на съхранение могат да бъдат създадени оптимални условия за получаване на пробиотични продукти с добра вкусова възприемчивост, запазени качествени показатели и висока биологична стойност.

INTRODUCTION

The probiotics are contemporary forms of immune products and take up more significant place in the dietary and nutritional prophylaxis. The basic requirements to probiotics as a nutrient and dietary product are chiefly linked with the taste, consistency, durability and their microbial content (Champagne, 2005).

During prolonged storage, changes in the composition of the probiotic products are inevitable (López et al., 2014). That's why, in recent years the efforts of scientists and manufacturers are directed to studying the factors that could be used to positively affect the quality of the finished product during storage (Miteva et al., 2005).

The aim of the present study is based on the hypothesis that by fluctuation and controlling of technological indicators- temperature mode and duration of storage can be created optimal conditions for the receipt of probiotic products with good flavor receptivity, reserved quality indicators and high biological value.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В изследването е използвано прясно козе мляко с pH – 6 .70 и °T=18, пастьоризирано при 93°C-95°C за 15 минути и охладено до 45-46°C. Оптималната температура за протичане на ферментационния процес е 44±2°C.

За получаване на пробиотичните продукти са използвани лиофилизирани щамове *Lactobacillus bulgaricus* 1381, *Streptococcus thermophilus* 1374, *Lactobacillus casei* 1014 и *Bifidobacterium longum 1714,* осигурени от колекциите на ИКХТ. Микроорганизмите са съчетани в три пробиотични комбинации, съ-държащи класическа закваска за кисело мляко обогатени с щамове млечнокисели бактерии в следното съотношение:

Вариант 1 – *L. bulgaricus: Str. thermophilus, 1:3*

MATERIAL AND METHODS

The study used fresh goat's milk with a pH – 6.70 and t = 18 °, pasteurized at 93 ºC -95ºC for 15 minutes and cooled to 45-46ºC. The optimal temperature for the fermentation process was 44 ± 2ºC.

For receiving the probiotic products are used lyophilized strains *Lactobacillus bulgaricus* 1381, *Streptococcus thermophilus* 1374, *Lactobacillus casei* 1014 and *Bifidobacterium longum* 1714 provided by the collections of ICFT. Microorganisms are combined in three probiotic combinations containing classic starter for yogurt enriched with lactic acid bacteria strains in the following proportion:

Variant 1 – *L. bulgaricus: Str. thermophilus*, 1:3

Вариант 2 – *L. bulgaricus: Str. thermophilus: L. casei, 1:3:1*

Вариант 3 – *L.bulgaricus: Str. thermophilus: B. bifidum,1:3:1*

Органолептичен анализ е извършен по показателите – цвят, повърхност, консистенция и структура, вкус и аромат (по 9-балната Хедонична скала).

Физикохимични анализи: водно съдържание (БДС 1109-89); активна киселинност (pH) – потенциометрично; титруема киселинност (°Т), (БДС 1111-80); съдържание на общ белтък – метод на Келдал (БДС 6231-73); обща пепел (БДС 9373-80); синерезис на пробиотичните продукти – прилага се филтрационен метод чрез измерване на количеството отделена течност (cm^3), което се определя при филтриране на 100 cm^3 мляко.

Статистическа обработка

Получените резултати са обработени статистически с MS Office Excel.

Variant 2 – *L. bulgaricus: Str. thermophilus: L. casei,* 1:3:1

Variant 3 – *L.bulgaricus: Str. thermophilus: B. bifidum*,1:3:1

Organoleptic analysis is carried out on indicators – color, surface, texture and structure, taste and aroma (in a 9-ball Hedonic scale).

Physicochemical analysis: water content (BDS 1109-89); Active acidity (pH) – potentiometric; titratable acidity (°T), (BS 1111-80); total protein content – method of Kjeldahl method (BDS 6231-73); common ash (BDS 9373-80); syneresis of probiotic products-apply filtration method by measuring the quantity of separated liquid (cm^3), which is defined in filter 100 ml milk.

Statistical analysis

The results were processed using the software MS Office Excel.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Органолептичната оценка е извършена по 9 балната Хедонична скала по показателите вкус, текстура, цвят и аромат. Изследваните проби са съхранявани различен период от време (1, 7, 14 и 21дни) при температури 5, 10 и 15°С.

Резултатите от сензорния анализ показват, че непосредствено след коагулация и трите варианта запазват своите първоначални органолептични характеристики (Таблица 1). При температура на съхранение 5°С и 10°С тези показатели остават високи до 14-ия ден. По-съществена промяна настъпва в периода след 2-рата седмица, като до последния 21 ден на съхранение те са годни за консумация. При температура 15°С органолептичната оценка се понижава след 7-мия ден и към 21-ия ден на съхранение вкуса, аромата и консистенцията на вариантите са под нивото за добра вкусова възприемчивост.

RESULTS AND DISCUSSION

The organoleptic evaluation is done by the 9 grade hedonic scale on indicators in taste, texture, color and aroma. The studied samples are kept for different periods of time (1, 7, 14 and 21 days) at temperatures of 5, 10 and 15ºC.

The results of the sensory analysis show that immediately after coagulation, the three options retain their original organoleptic characteristics. At a storage temperature of 5ºC and 10ºC, these indicators remain high until the 14th day.

A more substantial change occurs in the period after the second week, as they are edible until the 21st day of storage.

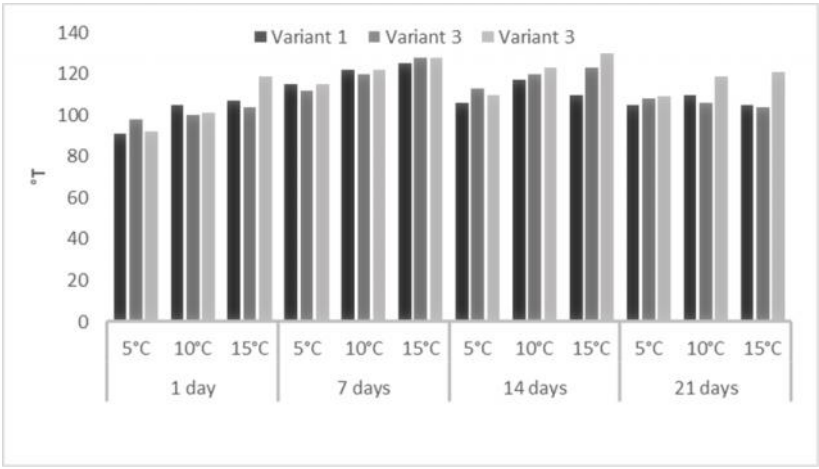
At a temperature of 15 ºC organoleptic rate is decreasing after the 7th and around the 21st day of storage the flavor, aroma and texture of the variants are below the level of good flavor receptivity

Таблица 1. Органолептични показатели на пробиотичните продукти
Table 1. Organoleptic indicators of probiotic products

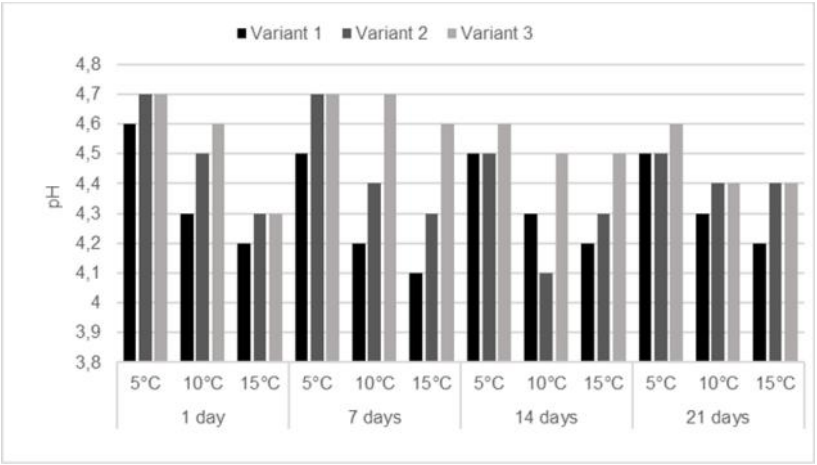
Показатели Indicators		Вариант 1/Variant 1			Вариант 2/Variant 2			Вариант3/Variant 3		
		5 °C	10°C	15 °C	5 °C	10°C	15 °C	5 °C	10°C	15 °C
Вкус Taste	1 ден/day	8,20	8,00	8,40	8,40	8,20	8,20	8,80	8,80	8,80
	7 дни/days	7,20	7,40	7,60	7,60	7,20	6,80	8,20	8,20	8,20
	14 дни/days	7,00	6,20	4,80	6,80	6,00	4,60	6,80	6,60	5,20
	21 дни/days	6,80	5,20	3,40	6,80	5,00	2,80	6,60	6,60	3,80
Консистенция Consistence	1 ден/day	8,60	8,40	8,40	8,60	8,80	9,00	8,60	8,60	8,60
	7 дни/days	7,40	7,20	4,80	7,20	7,00	5,60	7,60	7,40	6,20
	14 дни/days	7,20	6,40	3,40	7,00	6,20	3,40	7,00	6,80	4,00
	21 дни/days	5,60	4,00	2,00	5,80	4,20	2,20	5,80	5,60	2,20
Цвят Color	1 ден/day	8,80	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
	7 дни/days	8,60	8,60	8,60	8,80	8,60	9,00	9,00	9,00	9,00
	14 дни/days	7,80	7,80	7,80	8,00	8,00	8,60	8,80	8,40	8,20
	21 дни/days	5,80	6,80	6,60	6,80	6,80	6,60	6,60	6,40	5,80
Аромат Aroma	1 ден/day	8,20	8,60	7,80	8,00	8,00	8,20	8,20	8,20	7,80
	7 дни/days	7,60	6,40	6,20	7,80	6,60	6,20	7,80	7,80	6,80
	14 дни/days	6,80	4,80	4,00	7,00	5,40	3,80	7,80	7,80	3,20
	21 дни/days	5,60	3,60	2,20	6,00	4,00	2,00	6,80	6,40	2,00

Проведени са физикохимични изследвания за установяване на промени в активната и титруема киселинност, съдържанието на протеин и синерезиса при температури 5, 10 и 15 °C и период на съхранение от 24 h до 21 дни на пробиотичните варианти (Фигура 1 и 2).

Physicochemical studies were done for establishment of the changes in the active and titratable acidity, protein content and syneresis at temperatures of 5, 10 and 15ºC and storage period of 24 h to 21 days of the probiotic variants (Figure 1 and 2).



Фиг. 1. Титруема киселинност на вариантни проби
Fig. 1. Titratable acidity of the variant samples



Фиг. 2. Активна киселинност на вариантните проби
Fig. 2. Active acidity of the variant samples

В периода от 1-ви до 7-ми ден не се установяват значими разлики в данните за общата титруема киселинност между 1 и 2 вариант. При 5°C активната киселинност на вариант 1 се понижава с 0,4 единици, а при вариант 2 – с 0,3. При вариант 3 за същия изследван период общата титруема киселинност се повишава слабо: от 115°T при 5°C достига до 128°T при 15°C, а активната киселинност /pH/ се променя незначително и се запазва сравнително висока – 4,6-4,7.

Съществена разлика между трите варианта се установява на 14-ия ден от съхранението. При 1 вариант се наблюдава понижаване на киселинността в приблизително еднаква степен при изследваните температурни режими. При 2 вариант се установяват по-малки различия при температура на съхранение 5 и 10°C, но при 15°C, се наблюдава понижаване на общата титруема киселинност и съответно пови-шаване на активната киселинност. При 3 вариант през периода 7 до 14 дни, киселинността се повишава незначително, но на 21-ия ден се установява намаление, което е по-силно изразено при температура 10-15°C, в сравнение с предишните два варианта.

In the period from 1st to 7th day aren't any significant differences in data on total titratable acidity between the 1st and 2nd variant. At temperature of 5 ºC the active acidity of the variant 1 decreases with 0,4 units, and in variant 2 – с 0,3. In variant 3 for the same reference period the total titratable acidity slightly increases: from 115 °T at 5ºC goes up to 128°T at 15°C and the active acidity /pH/ changes inconsiderably and remains relatively high – 4,6-4,7.

On the 14th day of storage is ascertained substantial differences between the three variants. In the first variant is observed decreasing of the acidity in approximately degree in the examined temperature regimes. In the second variant are established smaller differences in the temperatures storage of 5°C and 10°C, but at 15°C is observed reducing of the total titratable acidity and so increasing of the active acidity.

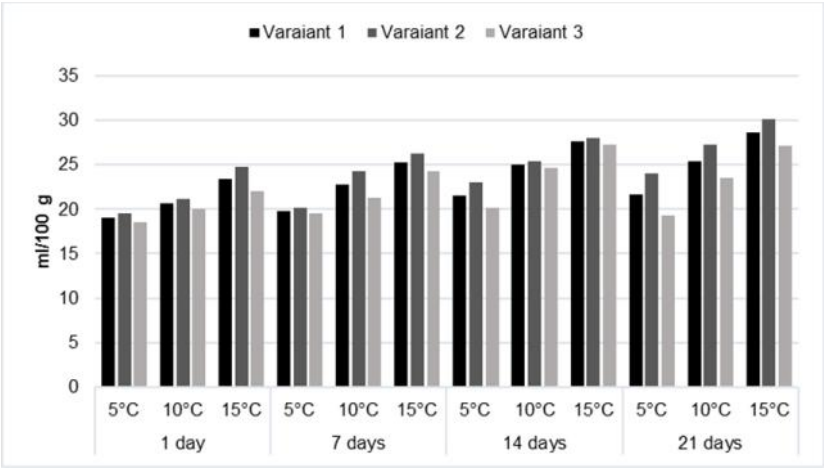
In the third variant through the period 7 to 14 days, the acidity slightly raises, but on the 21st day is stated decrease, which is expressed strongly at temperatures 10-15°C, in comparison with the previous 2 variants.

Вероятно след 14-ия ден на съхранение протичат ензимни процеси, по-активни при температура 10-15°C за трите варианта, които са причина киселинността да се понижава на 21-ия ден (Mortazavian et al., 2007).

Температурата и времето на съхранение, при еднакви други условия, имат пряко въздействие върху синерезиса (Фигура 3).

Probably after the 14th day of storage enzymatic processes function more active at a temperature of 10-15ºC for the three options, which are the reason of acidity decrease on the 21st day (Mortazavian, A. M et al., 2007).

The temperature and period of storage, under the same conditions, have a direct impact on syneresis (Figure 3).



Фиг. 3. Синерезис на вариантните проби след ферментация и при съхранение
Fig. 3. Syneresis of the variant samples after fermentation and during storage

Синерезисът за 24 часа се повишава: при вариант 1 от 19 ml при 5°C на 23.4 ml при 15°C, при вариант 2 – от 19.5 ml на 24.8 ml а при вариант 3 – от 18.5 ml на 22 ml. С повишаване на температурата на съхранение на 10°C и 15°C, синерезисните свойства на коагулума се повишават. Най-силно изразен синерезис се наблюдава при коагулума на вариант 2, следван от вариант 1 и най-слабо изразен е при вариант 3.

С увеличаване срока на съхранение до 14 дни, синерезисът на коагулума се повишава по-значително при вариант 2, следван от вариант 1, без съществени промени във вариант 3.

The syneresis for 24h increases: in variant 1 of 19 ml at 5°C to 23,4 ml at 15°C, in variant 2 – from 19,5 ml to 22 ml and in variant 3 – from 18,5 to 22 ml. By increasing the storage temperature to 10°C and 15°C, the syneresis properties of the coagulum raises. The most pronounced syneresis is observed in the coagulum in the second variant, followed by the first variant and least pronounced in the third variant.

By augmentation of the storage period to 14 days, the synersis of the coagulum raises more significantly in the second variant followed by the first variant.

На 21-ия ден синерезисът намалява забележимо при първите два варианта, което се съпътства с понижаването на киселинността. Това потвърждава становището, че в резултат на протичащи ензимни процеси, хидратационните свойства на коагулума се повишават.

По време на продължително съхранение на млечнокиселите продукти се получава ферментативен разпад на белтъците (протеолиза) в резултат от действието на отделените от млечнокиселите бактерии ензими. Хидролизата на млечния протеин се осъществява по-интензивно в първите часове след завършване на ферментационния процес и първите дни от срока на съхранение (Tripathi et al., 2014).

Различните видове млечнокисели бактерии имат различна протеолитична активност. Млечнокиселите пръчици се характеризират с по-висока степен на хидролиза на млечния протеин (16-30% за казеина) в сравнение с коките (9-17%). При комбиниране на различни щамове млечникисели бактерии сумарната протеолитична активност зависи от симбиотичните отношения помежду им. Получените резултати от промяната на протеина в процеса на съхранение са представени в Таблица 2.

On the 21st day the syneresis decreases noticeably in the first two variants, which are accompanied by reducing the acidity. This confirms that as a result of the ongoing enzymatic processes, the hydration properties of the coagulum increase.

During the long-term storage of lactic acid products is obtained fermentative degradation of proteins (proteolysis) as a result of the action of the lactic acid bacteria enzymes. The hydrolysis of milk protein is implemented more intensively in the first hours after completion of the fermentation process and the first days of the storage period (Tripathi, M.K. et al., 2014).

The various types of lactic bacteria have different proteolytic activity. Lactic acid bacteria ate characterized by a higher degree of hydrolysis milk protein (16-30% of casein) compared to the cocci (9-17%). When combining different strains of lactic acid bacteria the total proteolytic activity depends on the symbiotic relationship between them. The acquired results from the change of the protein during storage are presented in Table 2.

Таблица 2. Съдържание на протеин във вариантните образци след ферментация и при съхранение при T=5°C
Table 2. Protein content in variant samples after fermentation and during storage at T = 5° C

Време/дни Time/days	Протеин/ Protein (g/100g)		
	Вариант 1/Variant 1	Вариант 2/Variant 2	Вариант 3/Variant 3
1 ден/day	3,20±0,02	3,20±0,03	3,20±0,02
7 дни/days	2,72±0,01	2,50±0,01	2,40±0,02
14 дни/days	2,69±0,02	2,35±0,01	2,30±0,05
21 дни/days	2,66±0,04	2,30±0,02	2,24±0,04

Във Вариант 1, в който е използвана стандартна закваска за кисело мляко установеният протеин в края на срока на съхранение е 2,66 g/100g, което показва по-слаба хидролиза на казеина. Във вариантите 2 и 3, към които

In the first variant, in which is used a standard yogurt starter the established protein at the end of the storage period is 2,66/100g, which indicates more mild hydrolysis of casein. In the second and third variants, to which are added

са добавени допълнително млечнокисели пръчковидни бактерии *L. casei* и *B.bifidum*, отличаващи се с по-висока протеолитична активност, белтъчно съдържание в края на срока на съхранение е по-ниско (съответно 2,30 g/100g и 2,24 g/100g). При температура 5^0C и в трите варианта се наблюдава ускорена протеолиза непосредствено след завършване на ферментационния процес и в първите няколко дни на съхранение. Това е посилно изразено във варианти 2 и 3 където количеството на млечнокиселите пръчици превишава броя на стрептококите. След 7-мия ден на съхранение и в трите варианта темпът на протеолиза се забавя и почти се преустановява към 21-я ден.

additional lactic acid bacteria *L. casei* and *B.bifidum*, distinguished by higher proteolytic activity, protein content at the end of the storage period is lower.

At temperature of 50°C in all the three variants is observed accelerated proteolysis immediately after completion of the fermentation process and in the first few days of storage. This is better expressed in the second and third variant, where the amount of lactic acid bacteria exceeds the number of streptococci. After the seventh day of storage in the three options the rate of proteolysis slows down and almost suspended at the 21st day.

ИЗВОДИ

В настоящото изследване е направена оценка на влиянието на три температурни режима на съхранение (5, 10 и 15°C) и срок на съхранение (от 24 h до 28 дни) върху показателите – органолептична оценка, активна и титруема киселинност, общ белтък и синерезис при съхранение на ферментирали пробиотични продукти от козе мляко. Получените експериментални резултати определят оптималните условия за получаване на пробиотични продукти със добра вкусова възприемчивост, запазени качествени показатели и висока биологична стойност.

CONCLUSIONS

In the present study has been made assessment of the effects of three temperature regimes (5, 10 and 15°C) and storage period (24h to 28 days) on indicators – organoleptic evaluation, active and titratable acidity, total protein and syneresis during storage of fermented probiotic products from goat milk.

The obtained experimental results determine the optimal conditions for derivation of probiotic products with good flavor receptivity, reserved quality indicators, and a high biological value.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Champagne, C., D. Roy and N. Gardner**, 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*.,45: 61-84.
2. **Miteva, D., E. Tsvetkova and R. Nikolova**, 2005 Using specific technologies to create safe food products, In: *Proceedings of the 1-st International Food and Nutrition congress – Istanbul*.
3. **Mortazavian, A., M. Ehsani, S. Mousavi, S. Sohrabvandi, J. Reinheimer**, 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt. International Journal of Dairy Technology, 59, 123-127.
4. **Tripathi, M. and S. Giri**, 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*, 225-241
5. **López, E., E.Palou and A. López-Malo**, 2014. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97: 2578-2589.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 18-29 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Електрофоретичен профил на окрехкотено пуешко и биволско месо

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

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх" № 53, 1407 София, България
**E-mail: svetla.diankova@ikht.bg*

The electrophoretic patterns of turkey and buffalo meat

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

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

РЕЗЮМЕ

От цялата гама качествени показатели на месото, консуматорите определят крехкостта като един от най-важните фактори. През последните години третирането с екзогенни протеолитични ензими се превръща в много популярен метод за окрехкотяване на месо. Целта на това проучване е оценяване потенциалния ефект от прилагане на растителните протеази бромелаин и папаин върху електрофоретичния профил на пуешко и биволско месо. Експериментирано е с проби сурово пуешко и биволско месо при три варианта концентрации на ензимните разтвори (50 U/ml, 100 U/ml и 200 U/ml) и три варианта продължителност на обработка (24h, 48h, 72h). Проведена е електрофореза в полиакриламиден гел (SDS-PAGE) на контролните и на окрехкотените месни проби. При всички варианти обработени с ензим се установява промяна във вида и броя на протеиновите ивици спрямо контролите. Отчита се разцепване на високомолекулните протеини, което от своя страна води до увели-

SUMMARY

Of all range quality indicators of meat, consumers define tenderness as one of the most important factors. In recent years, treatment with exogenous proteolytic enzymes are becoming a very popular method of meat tenderization.

The aim of this study is to assesses the potential impact of the application of plant proteases bromelain and papain on the electrophoretic patterns of turkey and buffalo meat. Experiments are conducted with samples of raw turkey and buffalo meat at three variants concentrations of enzyme solution (50U/ml 100U/ml and 200 U/ml) and in three different times of treatment (24h, 48h, 72h). Electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE) is performed with the control samples and tenderized meat samples. In all enzyme treated samples establishes a change in the type and number of protein bands relative to controls.

A cleavage of high molecular weight proteins is observed, which leads to

чаване броя на фракциите с по-висока електрофоретична подвижност.

Ключови думи: окрехкотяване, електрофоретичен профил, пуешко месо, биволско месо

increase the fractions with higher electrophoretic mobility.

Key words: tenderization, electrophoretic patterns, turkey meat, buffalo meat

УВОД

Крехкостта се счита за една от най-важните органолептични характеристики на месото (Lawrie, 1991).

Има няколко фактора, които определят крехкостта на месото, като дължина на саркомерите, цялост на миофибрилите и цялост на съединителната тъкан, която допринася за жилавостта на месото. Жилавостта може да се раздели на актимиозинова жилавост, която се дължи на промени в миофибрилните протеини, и основна жилавост, която се дължи на съединителната тъкан (Chen et al., 2006).

Приносът на съединителната тъкан за жилавостта на месото е в зависимост от количеството, вида и междумолекулните напречни връзки на колагена. Той е основният компонент на съединителната тъкан и представлява около 80% от нея (Light et al., 1985; Bertran et al., 1992; Gelse et al., 2003).

Най-разпространеният колаген тип I в структурно отношение е хетеротример, който се състои от две идентични α-1 вериги и една α-2 верига ($[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$). Поради образуването на напречни връзки между молекулите на колагена, месото на възрастни животни е значително по-жилаво.

Намаляването на жилавостта на месото при зреене „post mortem“ или чрез допълнително третиране е процес, при който настъпват промени в актомиозиновия комплекс и в съединителната тъкан и се определя като окрехкотяване.

Един от методите за окрехкотяване на месо е чрез екзогенни протеази – растителни и микробиални. Протеолитични ензими, извлечени от растения като папаин, бромелаин, фицин и др.

INTRODUCTION

Tenderness is considered to be one of the most important organoleptic characteristics of meat (Lawrie, 1991).

There are several factors that determine meat tenderness: sarcomere length; myofibril integrity and connective tissue integrity.

Actomyosin toughness is attributable to changes in myofibrillar proteins, whereas background toughness is due to the connective tissue (Chen et al. 2006).

The contribution of connective tissue to the secondary toughness of meat is dependent on the quantity, type and intermolecular cross-links of collagen. It is the main component of connective tissue and represents about 80% of it (Bertran et al., 1992; Light et al., 1985; Gelse et al., 2003).

The most common type I collagen is structurally heterotrimer triple-helical molecule consisting of two identical chains - α-1 chain and α-2 chain ($[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$). Due to the formation of cross-links between collagen molecules, meat of adult animals becomes harder.

Reducing the toughness of the meat in "post mortem" or by additional treatment with ensemble that changes occur in actomyosin complex and connective tissue is defined as tenderization.

One of the methods for tenderization is the application of exogenous proteases - of plant and microbial origin. Proteolytic enzymes derived from plants such as papain,

са широко използвани като месни окрехкотители в повечето части на света (Sunantha and Saroat, 2011).

Растителните протеази въздействат както върху фибриларните протеини на съединителната тъкан – колаген и еластин, така и върху мускулните влакна, докато микробиалните протеази въздействат преди всичко върху мускулните влакна и само ограничено върху съединителната тъкан.

Докладвано е, че тиолови протеази като папаин и бромелаин, успешно окрехкотяват говеждо месо чрез хидролиза на съединителната тъкан (Ionescu et al., 2008).

Растителните протеази проявяват хидролитична активност и към миофибриларните протеини. (Wada et al., 2002; Naveena et al., 2004). Ето защо при окрехкотяване с протеолитични ензими е необходимо да се установи оптимално количество ензим, за да се постигне частична хидролиза с минимална загуба на белтък (Doneva et al., 2015).

Широко използван метод за изследване механизма на окрехкотяване и степента на хидролитично разграждане на месните проби е SDS–полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) (Ha et al., 2012; Rawdkuen and Benjakul, 2012).

Настоящето проучване оценява потенциалния ефект от прилагане на растителните протеази бромелаин и папаин върху електрофоретичния профил на пуешко и биволско месо.

bromelain, ficin, etc. have been widely used as meat tenderizers in most parts of the world (Sunantha and Saroat, 2011).

Plant proteases affect on fibrillar proteins of the connective tissue – collagen and elastin and on the muscle fibers as well, while microbial proteases act primarily on muscle fibers and only limited on the connective tissue.

It has been reported that thiol proteases such as papain and bromelain, successfully tenderizing beef meat by hydrolysis of connective tissue (Ionescu et al., 2008).

Plant proteases also exhibit hydrolytic activity to myofibrillar proteins. (Wada et al. 2002; Naveena et al. 2004). Therefore, when tenderizing with proteolytic enzymes is necessary to establish the optimum amount of enzyme to achieve partial hydrolysis with minimal loss of protein (Doneva et al., 2015).

A widely used method for studying the mechanism of tenderization and extent of hydrolytic digestion of meat samples is SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (Ha et al., 2012; Rawdkuen and Benjakul, 2012).

This study assesses the potential effects of the application of plant proteases bromelain and papain on the electrophoretic patterns of turkey and buffalo meat.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Материали

Месо от пуйка *(Meleagris gallopavo*) и бивол *(Bubalus bubalis)* – порода Българска Мурра.

Съединителна тъкан от пуешко и биволско месо.

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

Методи

Ензимна обработка на проби от месо и съединителна тъкан - пробите

MATERIAL AND METHODS

Materials

Meat of turkey (*Meleagris gallopavo*) and buffalo (Bubalus bubalis) - breed Bulgarian Murrah.

Connective tissue of turkey and buffalo meat.

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

Methods

Enzymatic processing of samples – the meat or connective tissue samples

се третират с бромелаин или папаин при вариране на концентрацията на ензимите и времетраенето на процеса.

Ензимни разтвори

От двата ензима се приготвят разтвори със следната казеинолитична активност – I (50 U/ml), II (100 U/ml), III (200 U/ml), чрез разтваряне в разтворител, съдържащ 0,9% NaCl, натриев хидрогенкарбонат и лимонена киселина. Активната киселинност на ензимните разтвори е pH 6,30. Пробите се третират със съответните разтвори на бромелаин и папаин при 4°C в продължение на 24, 48 и 72 часа. Успоредно с опитните варианти се залагат контроли за всеки час от обработката, като месото се поставя в марината, в която липсва разтворен ензим.

Полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)

SDS-PAGE се провежда съгласно метода на Laemmli (1970).

Полиакриламиден гел – 6% събирателен и 10 % разделителен. Електролитен буфер: Tris – глицин, pH 8,5 с 0,1 % SDS. Електрофорезата се провежда при сила на тока – 25 mA. Гелът се оцветява с 0,1% Coomassie blue (30-40 min), а зоните от гела, в които липсват ивици протеин се обезцветяват за 24h.

ware treated with bromelain or papain with alternating enzyme concentration and duration of the process.

Enzyme solutions

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

The samples were treated with bromelain and papain solutions at 4ºC for 24, 48 and 72 hrs. Alongside the samples, controls were assigned every full hour of treatment, in which the meat was placed inside enzyme-free marinade.

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE).

SDS–PAGE was performed with the method outlined by Laemmli (1970).

Polyacrylamide gel - 6% stacking and 10 % separating gel. Electrolyte buffer: Tris – glycine, pH 8,5 with 0,1 % SDS. Electrophoresis was conducted at 25 mA. The gel is then dyed with 0,1% Coomassie blue (30-40 min), whereas the gel zones lacking protein bands, was destained for 24 h.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

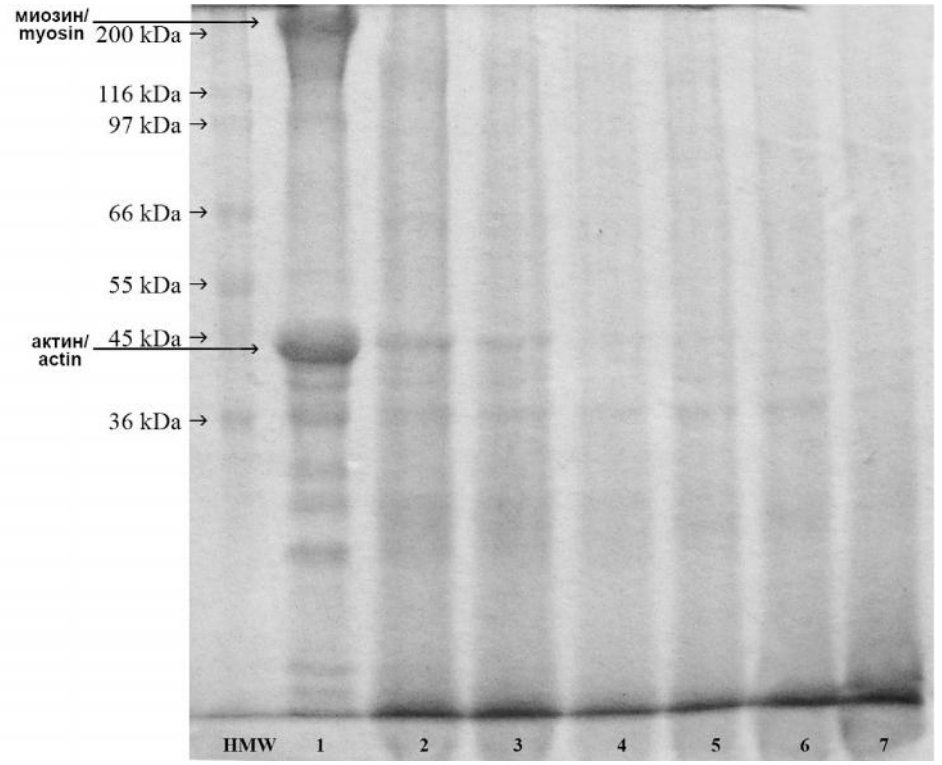
Подобряването крехкостта на месо от растителни цистеинови протеази се постига чрез частична хидролиза на миофибрилните протеини и нарушаването на мускулната фибрилна структура. Миофибрилата е основната функционална единица в мускулната тъкан и се състои от съкратителни белтъци – актин и миозин. Миозинът е двигателен белтък, който изгражда миозиновите филаменти. Миозин тежка верига е с молекулна маса около 200 kDa. Актинът е глобуларен белтък с молекулна маса около 45 kDa.

На Фигура 1 е представен резултатът от електрофореза в полиакриламиден гел на проби пуешко месо след обработка с ензимите бромелаин и папаин.

RESULTS AND DISCUSSION

Improving meat tenderness from plant cysteine proteases is achieved by partial hydrolysis of myofibrillar proteins and disruption of muscle fibril structure. The myofibril is the main functional unit in the muscle tissue and is composed of contractile proteins - actin and myosin. Myosin is a motor protein that builds myosin filaments. Myosin heavy chain has a molecular weight of about 200 kDa. Actin is a globular protein with a molecular weight of about 45 kDa.

Figure 1 shows the result of polyacrylamide gel electrophoresis of turkey meat samples after treatment with the enzymes bromelain and papain.



Фиг. 1. SDS-PAGE на пуешко месо след третиране с различни концентрации протеолитични ензими, продължителност за 24 h: HMW – протеинов маркер; 2 – контрола; 3 – вариант I бромелаин; 4 – вариант II бромелаин; 5– вариант III бромелаин; 6 – вариант I папин; 7 – вариант II папаин; 8 – вариант III папаин

Fig. 1. SDS-PAGE of turkey meat after treatment with different concentrations of proteolytic enzymes, for 24 h: HMW – protein marker; 2 – control; 3 – variant I bromelain; 4 – variant II bromelain; 5 – variant III bromelain; 6 – variant I papain; 7 – variant II papain; 8 – variant III papain

При контролната проба се наблюдават две интензивни ивици, които съответстват на белтъците миозин и актин. При опитните варианти се отчита разцепване на високомолекулните протеини до по-ниско молекулни структури, което от своя страна води до увеличаване броя на фракциите с по-висока електрофоретична подвижност.

От проведения електрофоретичен анализ на пуешко месо се отчитат разлики в броя на белтъчните фракции между отделните варианти обработка в зависимост, както от използвания ензим, така и от неговата концентра-

In the control sample, two intensive bands corresponding to the myosin and actin proteins are observed. At experimental variants is recorded reduction of high molecular weight proteins to a lower molecular structure, which leads to an increased number of fractions with higher electrophoretic mobility.

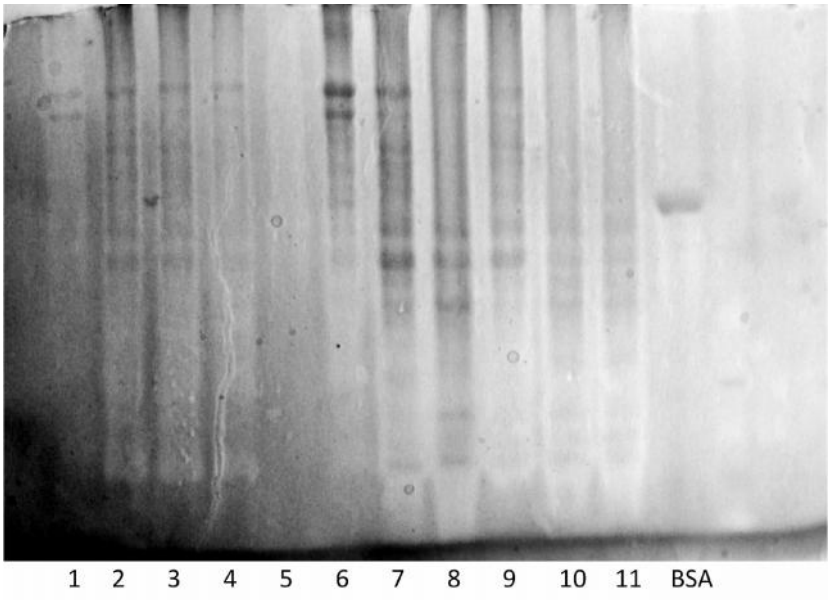
In the results of the electrophoretic analysis of turkey meat differences been observed in the number of protein fractions between different variants depending both on the enzyme used and its concentration.

ция. По-умерена степен на хидролиза се наблюдава при ензима бромелаин (вариант I – 50 U/ml). При най-високата концентрация и за двата ензима - вариант III – 200 U/ml, настъпва почти пълна хидролиза на месните протеини и това влошава както външния вид така и вкусовите качества на месото.

Колаген тип I е основен градивен елемент в съединителната тъкан и сухожилията и е основния причинител на жилавостта на месото. Окрехкотяването с протеолитични ензими цели частично разграждане на този вид тъкан при на запазване на мускулните влакна.

A lower degree of hydrolysis was observed at the enzyme bromelain (variant I - 50 U/ml). At the highest concentration of both enzyme - variant III - 200 U/ml, almost complete hydrolysis of meat proteins occurs and this worsens the appearance and taste of the meat.

Collagen type I is the basic building block of connective tissue and tendons, and the main cause of the toughness of the meat. Tenderizing with proteolytic enzymes purposes partial digestion of this type of tissue at the retention of muscle fibers.



Фиг. 2. SDS-PAGE на проби от пуешки сухожилия след третиране с протеолитични ензими (бромелаин или папаин) за 24 и 96 h: 1 до 11 – различни варианти на обработка (1 – Контрола 24 h; 2 – вариант I бромелаин 24 h; 3 – вариант II бромелаин 24 h; 4 – вариант III бромелаин 24 h; 5 – Контрола 96 h; 6 – вариант I бромелаин 96 h; 7 – вариант II бромелаин 96 h; 8- вариант III бромелаин 96 h; 9 – вариант I папаин 96 h; 10 – вариант II папаин 96 h; 11– вариант III папаин 96 h, BSA – стандарт – говежди серумен албумин

Fig. 2. SDS-PAGE of turkey tendons samples post proteolytic enzyme treatment (bromelain or papain) for 24 and 96 h: 1 – Control 24 h; 2 – variant I bromelain 24 h; 3 – variant II bromelain 24 h; 4 – variant III bromelain 24 h; 5 – control 96 h; 6 – variant I bromelain 96 h; 7 – variant II bromelain 96 h; 8 – variant III bromelain 96 h; 9 – variant I papain 96 h; 10 – variant II papain 96 h; 11 – variant III papain 96 h, BSA – standard – bovine serum albumin

На Фигура 2 е представена снимка от проведен електрофоретичен анализ на проби от пуешки сухожилия след третиране с ензимите бромелаин и папаин.

На контролната проба се наблюдава характерната картина за колагенови проби. Отчитат се две фракции с висока молекулна маса, които най-вероятно съответстват на тропоколагеновата молекула при колаген тип I (димери и тримери).

Доказано е, че електрофоретичната подвижност на колагеновите вериги е по-ниска от тази на глобуларни протеини с подобни молекулни тегла. Също така колаген α-2 верига има по-висока електрофоретична подвижност от колаген α-1 верига (Furthmayr and Timpl, 1971), което се дължи на малка разлика (6 kDa) в молекулното тегло между двете вериги (Sykes and Bailey, 1971).

При опитните варианти се наблюдават фракции с по-ниска молекулна маса. При пробите, третирани с бромелаин се отчита присъствие на по-малък брой фракции и с по-малка степен на разпадане, докато при папаина, особено при висока концентрация и дълготрайно третиране има почти пълно разграждане на съединителната тъкан. Хидролизата в толкова голяма степен води до загуба на белтък и влошаване на органолептичните качества на пуешко месо.

Аналогични експерименти за третиране с протеолитични ензими са проведени и с биволско месо. Промените в жилавостта на биволско месо при зреене и допълнително третиране се определят от промените в актомиозиновия комплекс и в съединителната тъкан. Контролните и опитни варианти биволско месо, след обработка с ензимни разтвори тип марината, съдържащи бромелаин или папаин, се изследваха чрез PAGE електрофореза (Фигура 3 и 4).

Figure 2 shows a photograph of an electrophoretic analysis of samples of turkey tendons after treatment with the enzymes bromelain and papain.

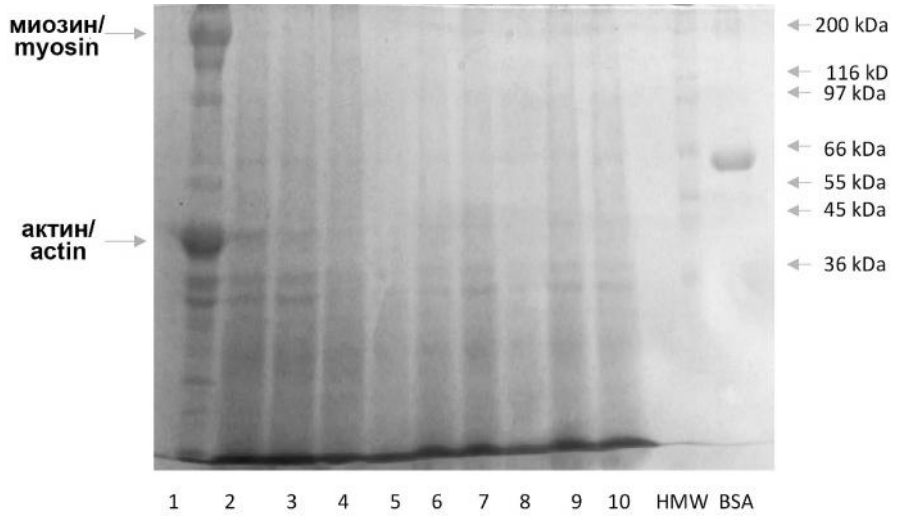
The control sample demonstrates the typical visual representation of collagen. Two high-molecule weight fractions have been observed. They most likely resemble the tropocollagen molecule in collagen type I (dimers and trimers).

It has been proven that the electrophoretic mobility of the collagen chains is lower than that of globular proteins with similar molecular weights. In addition, collagen α-2 chain has a higher electrophoretic mobility than collagen α-1 chain, due to a small difference (6 kDa) in the molecular weight between the two chains (Furthmayr & Timpl, 1971; Sykes & Bailey, 1971).

Fractions with lower molecule weight are observed in the experimental variants. The samples treated with bromelain are noted to possess a smaller amount of fractions and a lower breakdown rate, whereas the papain samples, particularly the high-concentrated ones, undergo complete digestion of the connective tissue. Such intense hydrolysis leads to protein loss and deterioration of the organoleptic qualities of the turkey meat.

Similar experiments for treatment with proteolytic enzymes have been conducted with buffalo meat. Changes in the toughness of buffalo meat in the aging and further treatment are determined by changes in actomyosin complex and connective tissue.

The control and experimental samples of buffalo meat after treatment with an enzyme solution type marinade containing bromelain or papain, are examined by PAGE electrophoresis (Figure 3 and 4).



Фиг. 3. SDS-PAGE на биволско месо третирано с различни концентрации разтвор на бромелаин, продължителност от 24 до 72 h: 1 – контрола; 2 – вариант I , 24 h; 3 – вариант II, 24 h; 4 – вариант III, 24 h; 5 – вариант III, 48 h; 6 – вариант II, 48 h; 7 -вариант I , 48 h; 8 – вариант III, 72 h; 9 – вариант II, 72 h; 10 – вариант I, 72 h; HMW – протеинов маркер; BSA – стандарт – говежди серумен албумин

Fig. 3. SDS-PAGE of buffalo meat treated with various concentrations of bromelain solution, duration of 24 to 72 h: 1 – control; 2 – variant I, 24 h; 3 – variant II, 24 h; 4 – variant III, 24 h; 5 – variant III, 48 h; 6 – variant II, 48 h; 7 – variant I, 48 h; 8 – variant III, 72 h; 9 – variant II, 72 h; 10 – variant I, 72 h; HMW – protein marker; BSA – standard – bovine serum albumin

Степента на протеолиза на месните белтъци се влияе от следните фактори – вид на ензима, концентрация на ензимния разтвор и време на третиране.

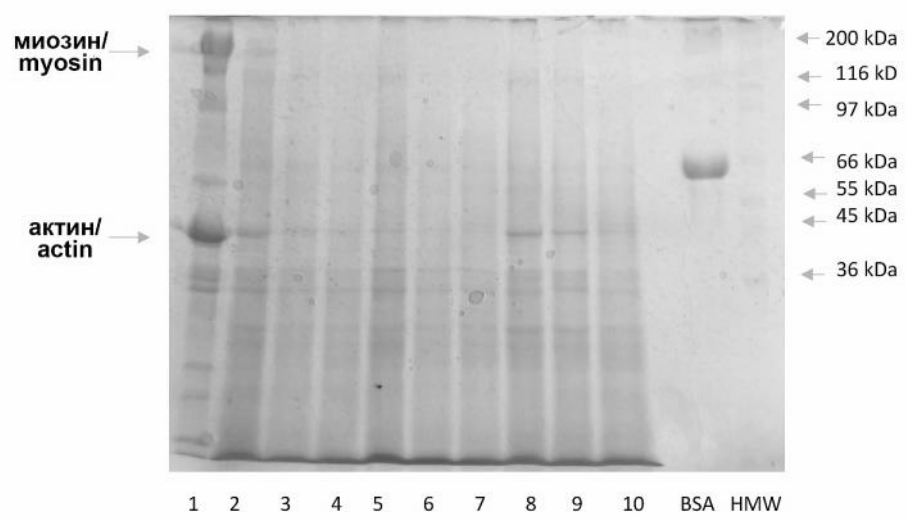
При всички варианти обработени с ензим се установява промяна във вида и броя на протеиновите ивици спрямо контролите. Отчита се разцепване на високомолекулните протеини, които преминават като нискомолекулни, което от своя страна води до увеличаване броя на фракциите с повисока електрофоретична подвижност.

С повишаване на концентрацията и продължителността на обработка се намалява интензитета на ивиците на тежките миозинови вериги в опитните варианти в сравнение с контролата. Причината е в частичното разграждане на миофибриларните протеини и съответно увеличаване на нискомолекулните пептиди.

The rate of hydrolysis of meat proteins is contingent on several factors – enzyme type, enzyme concentration in the solution and treatment duration.

In all variants treated with enzyme is established a change in the type and number of protein bands relative to control samples. Cleavage of high molecular weight proteins is observed. They are converted to low molecular weight, which leads to increasing the number of fractions with higher electrophoretic mobility.

By increasing the concentration and duration of treatment is reduced intensity of bands of heavy myosin chain in the experimental variants, compared to the control. The reason is the partial breaking of myofibrillar proteins and consequently the increase of the low molecular peptides.



Фиг. 4. SDS-PAGE на биволско месо, третирано с различни концентрации разтвор на папаин, продължителност от 24 до 72 h: 1 – контрола; 2 – вариант I , 24 h; 3 – вариант II, 24 h; 4– вариант III, 24 h; 5 – вариант I, 48 h; 6– вариант II, 24 h; 7 –- вариант III, 48 h; 8 – вариант I , 72 h; 9 – вариант II, 72 h; 10– вариант III, 72 h; BSA – стандарт – говежди серумен албумин; HMW – протеинов маркер

Fig. 4. SDS-PAGE of buffalo meat treated with various concentrations of papain solution, duration of 24 to 72 h: 1 – control; 2 – variant I, 24 h; 3 – variant II, 24 h; 4 – variant III, 24 h; 5 – variant I, 48 h; 6 – variant II, 24 h; 7 – variant III, 48 h; 8 – variant I, 72 h; 9 – variant II, 72 h; 10 – variant III, 72 h; BSA – standard – bovine serum albumin; HMW – protein marker

Хидролизата на белтъчните фракции е по-силно изразена при обработката с ензима бромелаин. Това показва по-висок афинитет на този ензим спрямо месните проби от биволско месо в сравение с пуешкото месо. При обработката с високи концентрации бромелаин се отчита силно изразена активност към миофибриларните протеини, което може да доведе до нарушаване структурата на месото и влошаване на неговите сензорни характеристики. При обработката на биволско месо с ензима папаин се установява по-умерена хидролиза и по-висока степен на запазване на органолептичните качества на месото след окрехкотяване.

За установяване на въздействието на използваните ензимни разтвори върху съединителната тъкан в месото, бе направен опит с третиране

Hydrolysis of the protein fractions is more pronounced when the treatment is with the enzyme bromelain. This indicates a higher affinity for this enzyme relative to meat samples from buffalo meat compared to turkey meat. In the treatment with high concentrations of bromelain is reported pronounced activity towards myofibrillar proteins, which can lead to distortions structure of the meat and the deterioration of its sensory attributes. When processing buffalo meat with the enzyme papain it has been reported a mild hydrolysis and a higher degree preservation of organoleptic qualities of the meat after tenderization.

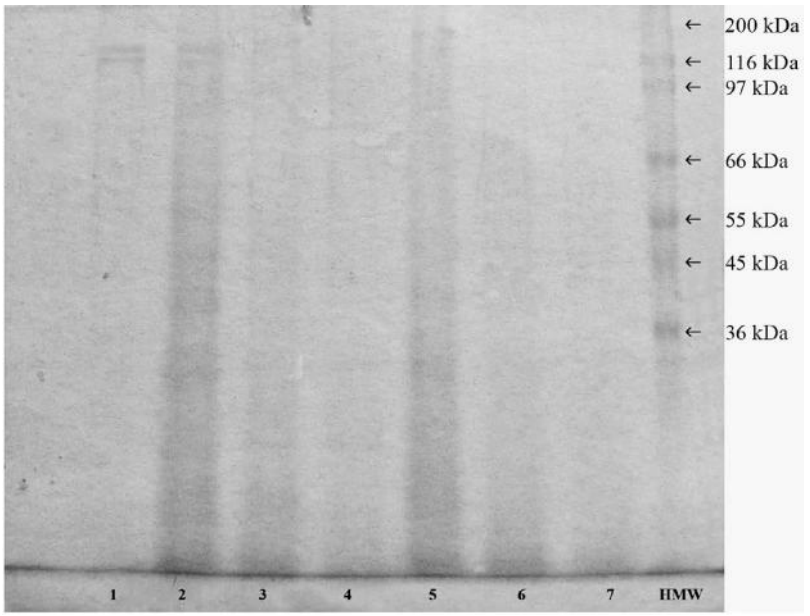
To establish the effects of the used enzyme solutions on the connective tissue in the meat, an experiment is performed with treatment of samples of

на проби от биволски сухожилия. Колаген тип I в биволските сухожилия е свързан в здрави влакна, които имат съществено значение за жилавостта на месото. Третирането с протеолитични ензими води до дезорганизация и дезинтеграция на структурните елементи на колагена, като разхлабва и разрушава междумолекулните връзки.

На Фигура 5 е представена снимка на електрофореза в полиакриламиден гел на проби от биволски сухожилия след третиране с ензимите бромелаин и папаин.

buffalo tendons. Collagen type I in buffalo tendons is attached to strong fibers, which are essential for the toughness of the meat. Treatment with proteolytic enzymes leads to disorderly and disintegration of the structural elements of collagen as loosens and breaks the intermolecular bonds.

Figure 5 shows a picture of polyacrylamide gel electrophoresis of samples from bovine tendon after treatment with the enzymes bromelain and papain.



Фиг. 5. SDS-PAGE на проби от биволски сухожилия след третиране с различни концентрации протеолитични ензими, продължителност за 96 h: 1– контрола; 2 – вариант I бромелаин; 3 – вариант II бромелаин; 4 – вариант III бромелаин; 5 – вариант I папин; 6 – вариант II, папаин; 7 – вариант III, папаин ; HMW – протеинов маркер

Fig. 5. SDS-PAGE of samples from bovine tendons after treatment with different concentrations of proteolytic enzymes duration of 96 h: 1 – control; 2 – variant I bromelain; 3 – variant II bromelain; 4 – variant III bromelain; 5 – variant I papain; 6 – variant II, papain; 7 – variant III, papain; HMW – protein marker

При контролната проба се наблюдава една слаба β- фракция (около 200 kDa) и две α – ивици, които съответстват на разделените полипептидни вериги от тройната спирала на

In the control sample is observed a weak β- fraction (about 200 kDa) and two α-bands, which correspond to the separated polypeptide chains of the triple helix of tropocollagen. This is a

тропоколагена. Това е характерна електрофоретична картина за колаген тип I (Zhang et al., 2005).

При опитните варианти се установява, че и двете растителни протеази хидролизират колагеновите белтъци. Отчита се зависимост между степента на хидролиза и концентрацията на съответния ензим. След третиране на съединителна тъкан с концентрации на ензим от 200 U/ml се наблюдава почти пълно разграждане на колагеновите вериги и съответно се отчитат по-голям брой фракции от тези отчетени в контролната проба.

characteristic electrophoretic pattern of collagen type I (Zhang et al., 2005).

In experimental variants is found that both plant proteases hydrolyze collagen proteins. The correlation between the degree of hydrolysis and the concentration of the enzyme is observed. Almost complete digestion of the collagen chains is observed after treatment with enzyme concentrations of 200 U/ml and respectively a larger number of fractions are measured compared to the control sample.

ИЗВОДИ

Експериментирано е с проби сурово пуешко и биволско месо при три варианта концентрации на ензимните разтвори (50 U/ml, 100 U/ml и 200 U/ml) и три варианта продължителност на обработка (24h, 48h, 72h). Проведена е електрофореза в полиакриламиден гел (SDS-PAGE) на контролните и на окрехкотените месни проби.

Електрофоретичният анализ на проби от пуешко месо и сухожилия след ензимна хидролиза показа, че при пробите третирани с бромелаин се отчита присъствие на по-малък брой фракции и с по-малка степен на разпадане, докато при папаина, особено при висока концентрация и дълготрайно третиране има почти пълно разграждане на белтъчните фракции.

При пробите от биволско месо папаинът е по-подходящ за окрехкотяване, защото е с по-нисък афинитет спрямо месните проби. И двете експериментирани протеази хидролизират колагеновите белтъци. Отчита се зависимост между степента на хидролиза и концентрацията на съответния ензим.

CONCLUSIONS

Experiments are conducted with samples of raw turkey and buffalo meat at three variants concentrations of enzyme solution (50U/ml 100U/ml and 200 U/ml) and in three different times of treatment (24h, 48h, 72h). Electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE) is performed with the control samples and tenderized meat samples.

Electrophoretic analysis of samples of turkey meat and tendons after enzymatic hydrolysis showed that the samples treated with bromelain present a smaller number of fractions with a lesser degree of degradation, whereas papain, especially at high concentration, and long-term treatment has almost complete breaking the protein fractions.

In samples from buffalo meat papain is more suitable for tenderization because it is of lower affinity against the meat samples. Both experimented proteases hydrolyzed collagen proteins. There is correlation between the degree of hydrolysis and the concentration of the enzyme.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Beltran, J., M. Bonnet and A**.**Ouali**, 1992. Comparative action of cathepsins B and L on intramuscular collagen as assessed by differential scanning calorimetry. *Meat science*, 32(3), 299-306.

2. **Chen Q., G. He, Y. Lao, H. Ni**, 2006. Effects of elastase from a Bacillus strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98, 624–629.
3. **Doneva, M., D. Miteva, S. Dyankova, I. Nacheva, P. Metodieva, K**. **Dimov**, 2015. Efficiency of plant proteases bromelain and papain on turkey meat tenderness. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 31(3), 407-413.
4. **Furthmayr, H. and R. Timpl**, 1971. Characterisation of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 41, 510-516.
5. **Gelse, K., E. Pöschl and T. Aigner**, 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55.(12), 1531-1546.
6. **Ha, M., A. E. D. A. Bekhit, A. Carne, D. L. Hopkins**, 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 134(1), 95-105.
7. **Ionescu, A., I. Aprodu and G**. **Pascaru**, 2008. Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI—Food Technology*, New Series, 9-16.
8. **Laemmli U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
9. **Lawrie R. A.,** 1991.Meat Science, 5th Ed, Pergamon Press Ltd, Oxford, UK,
10. **Light, N., A. E. Champion, C. Voyle, A. J. Bailey**, 1985. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. *Meat science*, 13(3), 137-149.
11. **Naveena, B. M., S. K. Mendiratta, A. S. R. Anjaneyulu**, 2004. Tenderisation of buffalo meat using plant proteases from Cucumis trigonus Roxb (Kachri) and Zingiber officinale roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science*, 68, 363–369.
12. **Qihe, C., H. Guoqing, J. Yingchun, N. Hui**, 2006. Effects of elastase from a Bacillus strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98(4), 624-629.
13. **Rawdkuen, S. and S. Benjakul**, 2012. Biochemical and microstructural characteristics of meat samples treated with different plant proteases. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14088-14095.
14. **Sunantha K. and R. Saroat**, 2011. Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. *Food and Nutrition Sciences*, 393-401.
15. **Sykes, B. C. and A. J**. **Bailey**, 1971. Molecular weight heterogeneity of the alpha-chain sub-units of collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, № 43,340-345.
16. **Wada M, T. Suzuki, Y. Yaguti, T**. **Hasegawa**, 2002. The effect of pressure treatments with kiwi fruit protease on adult cattle semitendinosus muscle. *Food Chem*., 78, 167-171.
17. **Zhang Z., G. Li and Bi**. **Shi**, 2005. Physiochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limited split wastes. *J Soc Leath Tech Ch*., 90(1), 23-28.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 30-39 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Установяване на радиопротективен ефект на лиофилизирани храни при опитни животни, подложени на радиационен стрес

Илиана Начева[1] Красимир Димов[1], Даниела Митева[1]*, Пламен Петрунов[2]

[1]Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх" № 53, 1407 София, България
[2]Военно Медицинска Академия, бул. „Георги Софийски“ № 3, 1606 София, България
**E-mail: dani_pm@abv.bg*

Establishment of radioprotective effect of lyophilized foods in experimental animals exposed to radiation stress

Iliana Nacheva[1], Krasimir Dimov[1], Daniela Miteva[1]*, Plamen Petrunov[2]

[1]Institute of Cryobiology and Food Technology, 53 Cherni Vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria
[2]Military Medical Academy, 3 Georgi Sofiiski Blvd., 1606 Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Здравето на човешкия организъм зависи от веществата, които приемаме с храната – освен полезните вещества и елементи с нея поемаме токсини, канцерогени и други вредни субстанции. Балансираното и здравословно хранене укрепва съпротивителните сили на организма и помага за по-бързото преодоляване на заболяванията.

Авторите представят научни резултати свързани с разработване на лиофилизирани храни на основата на пуешко и биволско месо за специализирано хранене. В рецептурите на новите храни са включени зеленчукови, плодови и зърнени компоненти. Използвани са допълнителни хранителни съставки с оглед на обогатяване на познанията в областта на диетите с противолъчев ефект.

SUMMARY

The health of the human organism depends on the substances accepted by food – except nutrients and elements we take toxins, carcinogens and other harmful substances. A balanced and healthy diet enhances the body's resistance and helps to more quickly overcome the disease.

The authors present scientific results related to the development of lyophilized foods based on turkey and buffalo meat for specialized nutrition. The new food recipes include vegetable, fruit and cereal components.

The research used additional nutrients in order to enrich the knowledge for radioprotective diets.

Обект на това изследване са полово зрели мишки подложени на целотелесно външно облъчване с доза от 2,25 Gy гама лъчи от източник Cs^{137} при мощност на дозата 1,78 Gy/min. Анализирано е радиопротективното действие на получените серии хранителни продукти върху опитни животни при различни режими на хранене – лечебно (след облъчване) и профилактично (през целия период на изследване). Изследвани са показателите тегло и левкоцити в кръвта. Доказано е положителното въздействие на храненето с разработените специализирани храни върху общия жизнен статус на опитни животни подложени на радиационен стрес с ниски дози на радиация.

Ключови думи: пуешко, биволско месо, опитни животни, специализирано хранене гама-облъчване

The object of this study were sexually mature mice exposed to whole body external radiation a dose of 2,25 Gy gamma rays from a source Cs137 in a dose 1,78 Gy/min. It has been analyzed the radioprotective effect of resulting series of food on experimental animals at different diets – medical (after irradiation) and preventive (throughout the study period).

The parameters weight and leukocytes in the blood were studied. It has been shown the positive effect of the feeding with the specialized foods on overall life status of experimental animals exposed to radiation stress with low doses of radiation.

Keywords: turkey, buffalo meat, experimental animals, specialized nutrition gamma irradiation

УВОД

Целенасоченото използване на хранителни продукти и на специални добавки към тях предоставя редица възможности за намаляване на радиационните увреждания на организма. Радиозащитният ефект е разгледан от редица учени на различните нива на метаболизма – храносмилане в червата, клетъчно и субклетъчно равнище. Има предложена концепция за радиозащитно хранене, базираща се на вещества със синергично (включително антиканцерогенно) действие (Velev et al., 2002, Doneva, 2005). Установено е, че диетите с повишено съдържание (до 60%) на растителни мазнини засилват радиорезистентността на организма. Различни млечни, хлебни, месни, рибни продукти и напитки с определени добавки (пектин, вит. A, B_1, B_6, C и др.) ускоряват извеждането на радионуклиди и тежки метали. Доказан е добрият декорпориращ ефект на антоциановите препарати (Velev et al.,2002). Налага се изводът, че използването на различни хранителни продукти в диетата на

INTRODUCTION

Targeted usage of some foods, as well as foods with special ingredients, provides a number of options for reducing the radiation damage in organisms.

Many scientists are studying the radioprotective effect on various levels of metabolism - intestinal digestion, cellular and sub-cellular. A concept of radioprotective feeding based on substances with synergistic impact, including anticarcinogenic action, is also proposed (Velev at al., 2002, Doneva, 2005). It is found that diets with enhanced content (up to 60%) of vegetable fats strengthen the radioresistance of organisms. Various dairy, bakery, meat and fish products and beverages with special additives (pectin, vitamins A, B_1, B_6, C, etc.) accelerate the removal of radionucleotides and heavy metals. A good decorporative effect of anti-cyanide formulations is also proven (Velev at al., 2002). It is clear that the usage of various nutrition products into the diets of radio-damaged organisms is a complicated

лъчево поразените е сложен проблем и че полученият ефект зависи от множество фактори. Необходими са целенасочени експериментални проучвания и клинични изпитания, съобразени със сложната патогенеза на радиационните поражения (Miteva et al., 2008). Една от възможностите за намаляване на радиационните поражения е създаването на храни с противолъчев ефект. В радиологията отдавна са установени основните механизми на увреждащото действие на външното и вътрешното облъчване от радионуклиди. Създадени са мощни химически средства за профилактика на лъчевите поражения и за декорпорация на поети по различен път радиоактивни изотопи. Тези средства обаче се отличават с висока степен на токсичност, което изключва тяхното масово и многократно приложение при хора. Това насочва усилията ни към изучаване на биологичната радиозащита и в частност на храненето, като възможен фактор за намаляване инкорпорацията на радионуклиди и степента на лъчево увреждане (Hadjiiski et al.,1993; Miteva et al., 2005).

Целта на настоящото проучване е установяване на радиопротективен ефект на нови лиофилизирани храни на месна основа, чрез биологичен експеримент, проведен върху опитни животни (мишки).

problem and the gained effect depends on multitude of factors. Hence, there is a need for targeted experimental studies and clinical trials, consistent with the sophisticated pathogenesis of radiation damage (Miteva et al., 2008). The development of anti-radiation foods is one of the trends in reducing of radioactive damage.

In radiology long ago established the basic of damage produced by external and internal radiation of radionuclides. There are many powerful chemical resources developed for prevention of radiodamage, as well as for decorporation of radioisotopes taken by various ways.

These agents, however, are usually highly toxic, what excludes large-scaled and repetitive application to humans. This directs our efforts to the study of biological radioprotection and especially to the special feeding as a possible factor for lessening the incorporation of radionucleotides and the extent of radiodamage (Hadjiiski et al.,1993; Miteva et al., 2005).

The purpose of this study is to establish the radioprotective effect of new freeze-dried meat-based foods by using a biological experiment conducted on test animals (mice).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Специализирана храна

Разработени са рецептурни формули за получаване на лиофилизирани храни за клинично хранене на месна основа. В състава на новите храни са включени източници на градивни и енергийни елементи, както и на физиологично активни вещества от различен произход – биволско и пуешко месо, зеленчукови, зърнени компоненти, олиго- и полизахариди, аскорбинова киселина, натурални антиоксиданти, лецитини др.

Сублимационното сушене е осъ-ществено в сублимационна

MATERIAL AND METHODS

Specialized food

We have developed prescription formulas for production of freeze-dried meat-based foods for clinical nutrition. The composition of the novel foods includes sources of building and energy ingredients as well as physiologically active substances of various origin, namely buffalo and turkey meat, vegetable and grain components, oligo- and polysaccharides, ascorbic acid, natural antioxidants, lecithins, etc.

The freeze-drying is carried out in a sublimation system "Hochvakuum-TG –

инсталация на фирмата – “Hochvakuum-TG –16.50” с контактно нагряване на плочите и остатъчното налягане в сублиматора в диапазона на 10^{-1}–10^{-2}mmHg.

Облъчване: Приложено е целоте-лесно външно облъчване с доза от 2,25 Gy гама лъчи от източник ^{137}Cs при на опитните групи. Мощността на дозата, създавана от източниците е 1,78 Gy/min.

Биологичен експеримент

Извършени са серии от четири биологични експеримента за изследване въздействието на всяка една от използваните специализирани храни – 2 с пуешко месо и 2 с биволско месо (съответно със зърнено-зеленчукови и зърнено-плодови компоненти). Животните от всяка група са поставени при еднакви условия със неограничен достъп до храна и вода през денонощието.

Експериментите са проведени върху бели мишки BDF от мъжки пол, разделени в 3 експериментални групи по 5 броя в група:

1 гр: облъчени опитни животни – контрола, хранена с виварiумна храна (таблетирани дрожди и вода).

2 гр: облъчени опитни животни – облъчени и третирани с лечебно хранене (след облъчване).

3 гр: облъчени опитни животни – облъчени и третирани с профилактично хранене (преди и след облъчване).

Изследвани показатели:

1. Хематологични изследвания от периферна кръв: левкоцити, чрез хематологичен анализатор Phoenix NCC -1211.

2. Преживяемост – проследяване изменение на теглото и преживяемост на опитните животни.

Статистически методи:

Създаден е математически модел с помощта на метода на тегловните коефициенти за оценка на използваните специализирани храни с цел избор на най-подходящата от тях за приложение при клинично болни пациенти след лъчетерапия.

16.50" by contact heating of plates and residual pressure in the range of 10-1-10-2 (mmHg).

The radiation is applied like gamma rays with dose of 2,25 Gy from source ^{137}Cs like an external beam with over the whole bodies of the tested groups of mice. The dose power produced by the source is 1,78 Gy/min.

Biological experiment

Series of four biological experiments are done in order to study the effects of each used specialized food, namely 2 with turkey meat and 2 with buffalo meat (respectively, with grain-vegetable and grain-fruit ingredients).

The animals from all groups are placed in same conditions with unlimited access to food and water throughout the day.

The experiments are carried out with white mice BDF males, divided into 3 groups of 5 pieces per group:

I-st – irradiated animals; the control fed with vivarium meal (compressed yeast and water),

II-nd – irradiated animals treated with the curative feeding (after irradiation),

III-rd – irradiated animals treated with a prophylactic feeding (before and after irradiation).

Tested indicators:

1. Hematological analyses of peripheral blood: leukocytes by haematological analyzer Phoenix NCC-1211.

2. Survival – monitoring the weight change and the survival of tested animals.

Statistical Methods:

A mathematical model, based on the method of weighting factors, is developed for evaluation of the proposed special foods in order to choose the most appropriate of them for use in clinically ill patients after radiotherapy.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от извършените измервания на изследваните показатели са представени в таблици 1 и 2, изразени в проценти спрямо контролната група в динамика по дни на измерване.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the measurements of the test values are presented in Tables 1 and 2, expressed as a percentage relative to the control group in dynamics by days of measurement.

Таблица 1. Тегло на облъчени мишки при различни режими на хранене
Table 1. Weight of irradiated mice at different feeding modes

№	Вид храна Kind of food	Метод на приемане на храната Feeding mode	Изследван показател / Reference indicator Тегло (% спрямо контролата) / Weight (% in relation to the control)									
			1 дата 1 date T_1	2 дата 2 date T_2	3 дата 3 date T_3	4 дата 4 date T_4	5 дата 5 date T_5	6 дата 6 date T_6	7 дата 7 date T_7	8 дата 8 date T_8	9 дата 9 date T_9	Min T_{min}
1	Пуешко месо със зърнено - зеленчукови компоненти Turkey meat food with grain-vegetable ingredients	Профилактично Prophylactic	94,26	100,9	99,59	102,84						94,26
		Лечебно Curative	82,62	97,42	99,43	102,43						82,62
		Контрола Control	93,13	93,71	95,46	94,69						93,13
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	101,21	107,67	104,33	108,61						101,21
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	88,71	103,96	104,16	108,17						88,71
2	Пуешко месо със зърнено-плодови компоненти Turkey meat food with grain-fruit ingredients	Профилактично Prophylactic	88,36	98,87	101,85	99,47	101,19	99,59	103,20	103,52	105,15	88,36
		Лечебно Curative	97,42	87,56	97,67	104,94	102,00	102,42	104,13	106,36	103,88	87,56
		Контрола Control	92,57	96,29	94,01	95,54	95,26	93,35	94,71	94,57	97,53	92,57
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	95,45	102,68	108,34	104,11	106,23	106,68	108,96	109,46	107,81	95,45
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	105,24	90,93	103,89	109,84	107,08	109,72	109,95	112,47	106,51	94,59
3	Биволско месо със зърнено-зеленчукови компоненти Buffalo meat food with grain-vegetable ingredients	Профилактично Prophylactic	94,77	97,38	101,20	101,34	105,16	116,46				94,77
		Лечебно Curative	101,29	104,61	106,91	108,92	109,78	111,95				101,29
		Контрола Control	92,87	103,60	103,20	102,96	98,88	102,80				92,87
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	102,15	94,00	98,06	98,43	106,35	113,29				102,15
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	109,07	100,97	103,59	105,79	111,02	108,90				109,07
4	Биволско месо със зърнено - плодови компоненти Buffalo meat food with grain-fruit ingredients	Профилактично Prophylactic	103,09	101,97	102,32	110,21	112,30	114,85				101,97
		Лечебно Curative	108,29	107,09	114,96	113,08	123,50	120,60				107,09
		Контрола Control	92,87	103,60	103,20	102,96	98,88	102,80				92,87
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	111,00	98,43	99,15	107,04	113,57	111,72				109,80
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	116,60	103,37	111,40	109,83	124,90	117,32				115,31

Таблица 2. Левкоцити в кръвта на облъчени мишки при различни режими на хранене

Table 2. Leukocytes in the blood of irradiated mice with different feeding modes

№	Вид храна Kind of food	Метод на приемане на храната Feeding mode	Изследван показател / Reference indicator Левкоцити в кръвта (% спрямо контролата) Leukocytes in the blood (% in relation to the control)			
			1 дата L_1 1 date L_1	2 дата L_2 2 date L_2	3 дата L_3 3 date L_3	Min L_{min}
1	Пуешко месо със зърнено - зеленчукови компоненти Turkey meat food with grain-vegetable ingredients	Профилактично Prophylactic	32,15	56,54		32,15
		Лечебно Curative	34,96	51,17		34,96
		Контрола Control	46,22	29,65		29,65
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	69,56	190,69		108,43
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	75,64	172,58		117,91
2	Пуешко месо със зърнено-плодови компоненти Turkey meat food with grain-fruit ingredients	Профилактично Prophylactic	62,18	101,93	106,45	62,18
		Лечебно Curative	62,54	103,13	123,75	62,54
		Контрола Control	62,27	102,56	104,53	62,27
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	99,86	99,39	101,84	99,86
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	100,43	94,13	118,39	100,43
3	Биволско месо със зърнено-зеленчукови компоненти Buffalo meat with grain-vegetable ingredients	Профилактично Prophylactic	58,93	84,07		58,93
		Лечебно Curative	56,43	75,90		56,43
		Контрола Control	59,70	76,61		59,70
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	98,71	109,74		98,71
		Леч./кон. (%) Cur./contr. (%)	94,52	99,07		94,52
4	Биволско месо със зърнено - плодови компоненти Buffalo meat with grain-fruit ingredients	Профилактично Prophylactic	61,64	86,52		61,64
		Лечебно Curative	69,32	69,57		69,32
		Контрола Control	64,71	67,61		64,71
		Проф./кон. (%) Proph./contr. (%)	95,26	127,97		95,26

Чрез разработения математически модел е изследван възможният радиопротективен ефект на създадените хранителните концентрати на месна основа. Симулирано е хранене на пациенти, подложени на лъчева терапия чрез целотелесно гама облъчване на опитни животни с ниски дози радиация и хранени с разработените специализирани храни.

By the aid of this model, we examine possible radioprotective effects caused by the created meat-based food concentrates. We simulate the feeding of patients undergoing radiation therapy with the feeding of test animals exposed to whole body low dose gamma radiation and fed with the developed special foods.

Като основа за създаване на математическия модел са получените резултати от 4 биологични експеримента с опитни животни, хранени лечебно и профилактично със специализирани храни на месно-зърнено-зеленчукова и месно–зърнено-плодова основа. В хода на експеримента е изследвана промяната на показателите тегло и левкоцити в кръвта.

В състояние на радиационен стрес в организма се наблюдават характерни симптоми, свързани със загуба на тегло и промяна в кръвната картина, характиризираща се с намаляване на стойностите на левкоцитите, което влошават жизнения статус на обекта. Това е причината да приемем, че по-високите получени резултати от опитните измервания на изследваните показатели са по-благоприятни за постигане на поставената цел. Търсим максимума на целевата функция, която в най-общ вид има следния вид:

The input data of the mathematical model are results from the 4 biological experiments on tested animals, which are fed therapeutically and prophylactically with specialized food based on meat-grain-vegetable and meat-grain-fruit components. In the course of the experiments, we measured the changes in weight and blood leukocytes indicators.

In state of radiation stress, there are typical symptoms, namely weight loss and changes in blood count characterized by a decrease in the values of leukocytes, which worsen the living status of organism.

This is the reason to assume that the highest results, obtained from measuring of the tested indicators, are more favorable in achieving the objective. We seek the maximum of the target function that in general terms is:

$$X_i = f\ (t_{1.....}t_n, l_1.....l_n) \qquad [1],$$

където X_i е видът на използвания начин на хранене,

$t_{1.....}t_n$ са получените резултати от измерването на телесната маса на опитните екземпляри при различните дати на измерване,

$l_1.....l_n$ са стойностите на показателя левкоцити в кръвта на изследваните обекти при различни дати на измерване.

Върху така предложения базов модел, налагаме някои изисквания към изследваните променливи с цел по-реално оценяване на протичащите изменения във физиологичния статус на организма:

1. Приемаме, че концентрацията на левкоцити в кръвта е по-важна за жизнения статус на организма от другия изследван показател – теглото на мишките и затова в крайният вид на целевата функция, този показател ще участва с два пъти по-голяма тежест.

2. Най-ниските стойности на резултатите получени на съответ-

where Xi is the type of the used feeding mode,

$t_{1.....}t_n$ are the results obtained from the measurement of body weight of the test objects at different dates of measurement,

$l_1.....l_n$ are the values of leukocytes in the blood of test objects at different dates of measurement.

In order to assess the actual ongoing changes in the physiological status of organisms, we impose certain constraints over the model variables:

1. We assume that the concentration of leukocytes in the blood is more important for the life status, in comparison to the other index – the weight of the mice. Therefore, this indicator will contribute twice as much weight to the final expression of the target function.

2. The lowest values of the results obtained in a respective date are

ната дата са най-животозастрашаващи и по тази причина в крайният вид на целевата функция те ще учавствуват с 50% тежест, колкото и получените резултати от всички останали дати на измерване.

Стойностите на всеки показател са нормирани в проценти спрямо контролната група, хранена по обичайния начин. Направено е сравнение не само между хранителните добавки използвани при различните биологични експерименти, но и с контролната група, чийто резултат е 100.

При така наложените параметри, целевата функция добива следния окончателен вид:

the most life-threatening. So, these results will take part with 50% weight in the final form of the target function as much as the results from all other dates of measurement.

The values of each parameter are normalized as a percentage of the control group, fed by the usual manner. The comparison is made not only between the foods additives used in various biological experiments, but also with the control group, which result is assumed to be 100.

In so imposed parameters, the objective function yields the following final form:

$$X_i = \frac{1}{3}\left[\frac{Ti_{min} + \left(\frac{Ti_1 + ... + Ti_n}{n}\right)}{2}\right] + \frac{2}{3}\left[\frac{Li_{min} + \left(\frac{Li_1 + ... + Li_n}{n}\right)}{2}\right] \quad [2],$$

където X_i са различните използвани режими на хранене,

$Ti_1.....Ti_n$ са получените стойности за показателя тегло при съответния режим на хранене,

$Li_1.....Li_n$ са получените стойности за показателя левкоцити в кръвта при съответния режим на хранене

Ti_{min} и Li_{min} са минималните стойности на съответния показател.

В Таблица 3 са представени резултатите от стойностите на целевата функция в низходящ ред.

Комплексната оценка на направените сравнителни изследвания на използваните специализирани храни варира между 99,73 и 113,96, като в 7 от 8 случая е по-висока от контролната група, хранена с обичайна храна.

Най-висока комплексна оценка е получена при специализираната храна от пуешко месо на зърнено-зеленчукова основа, съответно 113,96 при профилактично хранене и 112,33 при лечебно хранене. Като цялостна

where X_i they used different diet regimes.

$Ti_1.....Ti_n$ are the values obtained for the indicator weight at the appropriate diet,

$Li_1.....Li_n$ are the values obtained for the indicator leukocytes in the blood at the appropriate diet,

Ti_{min} и Li_{min} the minimum values of the corresponding indicator.

In Table 3 are presented the results of the objective function value in descending order.

Complex assessment of comparative studies of specialized foods used ranged between 99.73 and 113.96, in 7 of 8 cases higher than the control group fed with regular food.

The highest complex assessment was obtained in the specialized feed of turkey meat on cereal-vegetable base, 113.96 in prophylactic meals and 112.33 in curative meals. As a complete assessment of the different types of

оценка за различните видове специализирани храни, според получените резултати пуешкото месо има лек превес над биволското. Използваната добавка на зърнено-зеленчукова основа дава по-добри резултати от тази на зърнено-плодова основа.

specialized foods, according to the results, turkey meat has a slight predominance over the buffalo.

The added cereal-vegetable additive gives better results than the cereal-fruit base

Таблица 3. Оценка на различните видове храни и режими на хранене при облъчени мишки
Table 3. Evaluation of different kind of foods and feeding modes in irradiated mice

№	Вид приемана храна и хранителен режим Kind of food and Feeding mode	Оценка Rating
1.	Храна от пуешко месо на зърнено –зеленчукова основа приемана профилактично като добавка през целия период Turkey meat food with grain-vegetable ingredients accepted preventive supplement all the time	113,96
2.	Храна от пуешко месо на зърнено –зеленчукова основа приемана лечебно като добавка след облъчване Turkey meat food with grain-vegetable ingredients accepted curative supplement after irradiation	112,33
3.	Храна от биволско месо на зърнено –плодова основа приемана лечебно като добавка след облъчване Buffalo meat food with grain-fruit ingredients accepted curative supplement after irradiation	108,91
4.	Храна от биволско месо на зърнено –плодова основа приемана профилактично като добавка през целия период Buffalo meat food with grain-fruit ingredients accepted preventive supplement all the time	105,06
5.	Храна от пуешко месо на зърнено –плодова основа, приемана лечебно като добавка след облъчване Turkey meat food with grain-fruit ingredients accepted curative supplement after irradiation	101,71
6.	Храна от биволско месо на зърнено –зеленчукова основа приемана профилактично като добавка през целия период Buffalo meat food with grain-vegetable ingredients accepted preventive supplement all the time	101,68
7.	Храна от пуешко месо на зърнено –плодова основа приемана профилактично като добавка през целия период Turkey meat with grain-fruit ingredients accepted preventive supplement all the time	100,24
8.	Контролна група, хранена с дрожди и вода Control group fed with yeast and water	100,00
9.	Храна от биволско месо на зърнено –зеленчукова основа приемана лечебно като добавка след облъчване Buffalo meat food with grain-vegetable ingredients accepted curative supplement after irradiation	99,73

ИЗВОДИ

1. Доказано е положителното въздействие на храненето с разработените специализирани храни на месна основа върху общия жизнен статус на опитни животни, подложени на радиационен стрес с ниски дози на радиация.
2. Не са установени съществени различия между групите опитни животни хранени профилактично със специализираната добавка през целия период на изследване и тези хранени лечебно след облъчване.
3. Съгласно приложения математически модел при разработената храна на основа на пуешко месо със зърнено-зеленчукови компоненти са получени най-добри резултати, което е основание тя да бъде приложена при възстановително хранене на пациенти подложени на лъчетерапия.
4. Доказан е радиопротективен ефект на новите продукти на месна основа при опитни животни. Получените положителни резултати могат да бъдат използвани при установяване на закономерностите на процеса на облъчване и приемането на храна от пациента.

CONCLUSIONS

1. The positive effects of feeding with the developed specialized meat based foods on the total life status of test animals, exposed to low dose radiation stress, is proven.

2. There are no significant differences between the groups of test animals fed with specialized prophylactic additives throughout the study period and those fed therapeutically after irradiation.

3. According to the applied mathematical model, the developed food of turkey meat with grain-vegetable components gives the best result. This food could be proposed for usage in restorative nutrition of patients undergoing radiotherapy.

4. Proven is the radioprotective effect of new meat products over test animals. The positive results gained in our study can be employed in ascertaining the regularities of the process of irradiation and the reception of food by the patients.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Doneva, M.**, 2005. Lyophilization – a reliable method for the preparation of stable enzyme product. *Food Industry*, 11, 16-20 (Bg) .
2. **Hadjiiski, L., M. Alyakov and E. Tsvetkova**, 1993. Opportunities to reduce radiation damage. *Food Industry*, 7, 23-24 (Bg).
3. **Miteva, D. Kr. Dimov and E. Tsvetkova**, 2008. The use of ionizing radiation in the food industry*. Izd. HVP*, 7, 51-53 (Bg).
4. **Miteva, D., E. Tsvetkova and R. Nikolova**, 2005. Using specific technologies to create safe food products. In: Proceedings of 1st international food and nutrition congress 15-18 June, Istanbul, 74-79.
5. **Velev, G., St. Ivancheva and R**. **Lazarov**, 2002. Radioprotective effect of polyphenols from red geranium (*Gerarium sanguineum*). *Rentgenology and Radiology*, 41(4), 301-307 (Bg).

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 40-48
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Специализирани храни на месна основа за възстановително хранене

Илиана Начева, Даниела Митева*, Красимир Димов

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх" № 53, 1407 София, България
**E-mail: dani_pm@abv.bg*

Specialized meat-based foods for reconvalescent nutrition

Iliana Nacheva, Daniela Miteva*, Krasimir Dimov

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

РЕЗЮМЕ

Диетичното хранене е основен момент в комплексното лечение на болните при стационарни условия. Поради недиагностицирано недохранване значителна част от хоспитализираните пациенти са изложени на допълнтиелен риск.

В настоящото изследване са представени четири варианта храни на месна основа за възстановително хранене, които са охарактеризирани по стандартни физикохимични и микробиологични методи. Разработените продукти са лиофилизирани и тествани върху експериментални животни. Въз основа на проведените анализи и биологични експерименти най-благоприятен ефект е установен при животните, хранени с концентрат от пуешко месо с включени коригенти на зърнено-зеленчукова основа. Получените данни дават основание на авторите да препоръчат новите продукти за възстановително хранене на пациенти в състояние на недохранвани поради здравословни, физически или психически причини.

Ключови думи: специализирани

SUMMARY

Dietary nutrition marked a milestone in the complex treatment of patients in stationary conditions. Because undiagnosed malnutrition significant proportion of hospitalized patients are exposed to additional risk.

In this study are presented four variants meat-based foods for reconvalescent nutrition that are characterized by standard physicochemical and microbiological methods. The developed products are freeze-dried and tested in experimental animals.Based on the conducted analyzes and biological experiments most beneficial effect was observed in animals fed a concentrate of turkey meat included grain and vegetable corrigents.

The received data suggest the authors to recommend new products for reconvalescent nutrition of patients in a state of malnutrition due health, physical or mental reasons.

Key words: specialized foods,

храни, лиофилизация, възстановително хранене, месо, биологичен експеримент

lyophilization, reconvalescent nutrition, meat, biological experiment

УВОД

Съвременните потребители са все по-информирани за строгата връзка между диетата и здравният статус и определят храната не само като средство за осигуряване на необходимите хранителни вещества, но и като начин за превенция на редица заболявания и поддържане на високо качество на живот. В отговор на потребителските очаквания в последното десетилетие месопроизводителите са насочили усилията си в създаването на здравословни и функционални месни продукти. Създаването на специализирани храни трябва да удовлетворява редица специфични изисквания: висока смилаемост на белтъчините; биологична пълноценност, съдържание на минерали, витамини и желязо в усвояема форма след термична обработка и лиофилизация (Doneva, 2005; Conte et al., 2011).

Целенасоченото използване на хранителни продукти и на специални добавки към тях предоставя редица възможности за намаляване на увреждания на организма подложен на редица стресови състояния като болести, физическо натоварване, недохранване и др.(Fernández et al., 2005; Mc Afee et al., 2010).

Актуална тенденция при производството на месни продукти е тяхната модификация чрез добавяне на различни полезни за здравето компоненти (зеленчуци, екстракти, влакна и др.) и ограничаване на вредните такива. Гарантирането на безопасността на месните продукти в потенциални индустриални приложения може да бъде постигнато посредством използване на добавки, повишаващи функционалните им качества, но след проучване на взаимодействието между тях (Schönfeldt et al., 2008).

Основна цел на изследването е създаване на специализирани храни на

INTRODUCTION

Modern consumers are becoming more informed about the strong link between diet and health status and define the food not only as a means of providing the necessary nutrients, but also as a way to prevent many diseases and maintaining a high quality of life.

In response to consumer expectations in the last decade meat producers have directed their efforts in creating a healthy and functional meat products.

The creation of specialized foods must meet a number of specific requirements: high digestibility of protein; biological value, content of minerals, vitamins and iron in absorbable form after the heat treatment and lyophilization (Doneva, 2005, Conte et al., 2011).

Targeted usage of some foods, as well as foods with special ingredients, provides a number of options to reduce damage to the body subjected to a number of stress conditions such as illness, exercise, malnutrition and the like. (Fernández et al., 2005; Mc Afee et al., 2010).

Current trend in the manufacture of meat products is their modification by adding various beneficial health components (vegetable extracts, fibers, etc.) and limit the harmful ones.

Ensuring the safety of the meat products to potential industrial applications can be achieved by the use of additives that increase the functional qualities but after a study of the interaction between them (Schönfeldt et al., 2008).

The main purpose of this study is to creation of specialized meat-based foods

месна основа, предназначени за възстановително хранене на пациенти в състояние на недохранване поради здравословни, физически или психически причини. За установяване на най-подходящата хранителна формула е проведен биологичен експеримент с опитни животни.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Физикохимични изследвания на новосъздадените лиофилизирани хранителни продукти на месна основа са извършени по следните показатели: остатъчно влагосъдържание след лиофилизация БДС 1109-89; съдържание на общ белтък – метод на Келдал (*БДС 9374:1982*); мазнини(%) – (ISO 1444:1996); обща пепел (%) – (ISO 1841-1:1996); активна киселинност (pH); титруема киселинност – титриметрично (°T); определяне на NaCl(%) – метод на Мор; определяне на витамин С (%) – метод на Мури; определяне на редуциращи захари – метод на Шоорл

Микробиологични изследвания – проведени са по БДС 6835-81

Провеждане на биологичен експеримент – Биологичните експерименти за оценка на специализирани месни храни са извършени върху клинично здрави експериментални животни – полово зрели мишки линии БДФ с тегло 20-22 g. Ефектите са оценявани спрямо контролни групи, получаващи обичайните храни. Извършени са изследвания върху броя на левкоцитите в кръвта чрез хематологичен анализатор Phoenix NCC -1211. Проследена е загубата на тегло на опитните животни от 2-ри до 16-и ден.

Лиофилизация – осъществена е чрез сублимационна инсталация на фирмата – “Hochvakuum-TG – 16.50” с контактно нагряване на плочите и остатъчното налягане в сублиматора в диапазона на 10^{-1}-10^{-2}mmHg.

for reconvalescent nutrition of patients in a state of malnutrition due to healthful, physical or mental reasons.

For establishing the most appropriate nutritional formula is carried out a biological experiment with animals.

MATERIAL AND METHODS

Physico-chemical studies of newly created freeze-dried meat foods were made on the following indicators: residual moisture content after lyophilization (BDS 1109-89), protein content (%) – Kjeldahl method (BS 9374: 1982); fat (%) – (ISO 1444: 1996); total ash (%) – (ISO 1841-1: 1996); active acidity (pH), titratable acidity– titrimetrically (°T); determination of NaCl (%) – method Moor; determination of vitamin C (%) – method of Muri; determination of reducing sugars– method of Schoorl

Microbiological studies – Have been conducted according BDS 6835-81

Conducting a biological experiment– Biological experiments for evaluating the specialized meats were conducted on clinically healthy experimental white mice BDF lines weighing 20-22g. The effects were evaluated against a control set groups receiving conventional foods.

Blood leukocyte counts were performed by a Phoenix NCC-1211 haematological analyzer. Trace is the weight loss of the test animals from the 2nd to the 16th day.

Lyophilization – was carried out by sublimation installation company – "Hochvakuum-TG – 16.50" by contact heating of the plates and the residual pressure in the sublimator in the range of 10^{-1}-10^{-2} mmHg.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изготвени са хранителни концентрати от пуешко и биволско месо на зърнено плодова и зърнено-зеленчукова основа. Рецептурните формули включват:

вариант 1 – лиофилизирана храна с пуешко месо на зърнено зеленчукова основа (пуешко месо, ориз, карфиол, тиквичка, червена чушка, сусамов тахан, ксантан);

вариант 2 – лиофилизирана храна с пуешко месо на зърнено плодова основа (пуешко месо, нахут, морков, сушени сини сливи, стафиди, тиквено семе, ксантан);

вариант 3 – лиофилизирана храна с биволско месо на зеленчукова основа (биволско месо, елда, слънчогледово семе, тиквички, чушки, карагенан);

вариант 4 – лиофилизирана храна с биволско месо на зърнено плодова основа (биволско месо, сушени сини сливи, стафиди, моркови, ленено масло, карагенан)

При формулиране на рецептурите на храните се очаква обединяване на хранителните, защитните и лечебни свойства на изходните суровини с доказан здравословен ефект.

Новите храни са лиофилизирани и охарактеризирани по стандартни физикохимични показатели, резултатите от които са представени в Таблица 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Food concentrates from turkey and buffalo meat with cereal, fruit, grain and vegetable ingredients have been prepared. Prescription formulas include:

variant 1 – lyophilized food with turkey meat of grain vegetable base (turkey meat, rice, cauliflower, zucchini, red bell pepper, tahini, xanthan);

variant 2 – lyophilized food with turkey meat of cereal fruit base (turkey meat, chick peas, carrots, prunes, raisins, pumpkin seed, xanthan);

variant 3 – a lyophilized food with buffalo meat vegetable-based (buffalo meat, buckwheat, sunflower seeds, zucchini, peppers, carrageenan);

variant 4 – lyophilized food with buffalo meat of cereal fruit-based (buffalo meat, prunes, raisins, carrots, linseed oil, carrageenan).

At formulating of the recipes of foods is expected unification nutritional, protective and healing properties of raw materials with proven health effect.

The new products are lyophilized and characterized by standard physiochemical indicators, the results of which are presented in Table 1.

Таблица 1. Физикохимични показатели на лиофилизираните опитни образци

Table 1. Physico-chemical indicators of lyophilized test samples

Показатели / Indicators	Вариант Variant 1	Вариант Variant 2	Вариант Variant 3	Вариант Variant 4
Общи липиди / Тотал lipids (%)	1.68	2.07	7.44	9.56
Общ белтък / Total proteins (%)	17.50	17.76	18.85	19.69
Обща пепел / Total ash (%)	1.59	3.34	3.56	3.36
Влагосъдържание / Humidity (%)	0.59	3.34	3.97	4.49
Активна киселинност/Active acidity (pH)	5.82	5.87	5.77	5.55
Обща киселинност(КЧ) / Total acidity	1.3464	0.6768	1.420	1.346
NaCl (%)	0.101	0.118	0.123	0.127
Витамин / Vit. C (%)	12.020	4.840	8.862	4.074
Редуциращи захари / Reducing sugars(%)	0.370	2.940	0.580	1.640
Енергийна стойност/100 g продукт Energy value/100 g product (kcal/ kJ	409.75/1 714.41	393.38/164 4.73	417.82/174 8.14	427.53/178 8.78

От получените данни, специализираните месни храни представляват хранителни концентрати с остатъчно влагосъдържание от 0,59 до 4,49%. По отношение на активната киселинност (pH) не се наблюдават значителни промени в стойностите на изследваните проби – те са в границите – 5.5-5.87, т.е. в стандартните норми за месо. Именно pH на средата влияе до голяма степен и върху ензимната и биохимичната активност в месните продукти, което е от значение за безвредността на същите. Данните за съдържанието на сол показват леко завишени стойности при суровото месо – 0.323-0.635% при норма 0.12-0.27% в 100гр продукт, докато при приготвените храни те са в стандартните норми – 0.12% (при норма 0.12-0.27% в 100гр продукт). Съдържанието на общи липиди намалява, което се дължи както на внесените растителни добавки в хранителните продукти, така и на включените хидроколоиди карагенан и ксантан. По-високото съдържание на витамин С в лиофилизираните храни се обуславя от добавените хранителни компоненти. Съдържанието на общ белтък е също в допустимите граници – 18-20%. Изтъкнатите положителни характеристики в качествения състав на новите функционални храни се допълват и от сравнително високото енергийно съдържание на 100g продукт, като основният носител на енергия е въглехидратно-белтъчният комплекс.

Показателите за общ брой аеробни мезофилни аеробни и психрофилни микроорганизми, както съдържанието на плесени и дрожди е в допустимите норми, спрямо изискванията на БДС 6835-81. Отсъствието на патогенни форми, доказва чистотата и годността за употреба на новите храни.

Включването на адитиви от растителен произход с доказани благоприятни ефекти върху човешкото здраве, води до повишаване на биологичната пълноценност на създадените специализирани храни на месна осно-

From the data obtained, the specialized meat food are feed concentrates with a residual moisture content of 0.59 to 4.49%. With respect to the active acidity (pH) no significant changes in the values of the test samples – they are in the range – 5.5-5.87, in the standard norms for meat.

Exactly pH affects largely on enzymatic and biochemical activity in meat products, which is important for the safety of the same. The data for the salt content showed slightly higher values for raw meat – 0.323-0.635% at a rate of 0:12 to 12:27% in 100 g product, while in prepared foods they are in the standard norms – 0.12% (at a rate of 0:12 to 12:27% in 100 g product).

The contents of total lipids decreases, which is due both to the imported herbal supplements in food products and the included hydrocolloids – carrageenan and xanthan. The higher content of vitamin C in the lyophilized foods is determined by the added nutrients.

The content of total protein is also within an acceptable range – 18-20%. Eminent positive characteristics in the qualitative composition of the new functional foods are supplemented by relatively high energy content per 100g product as the main carrier of energy is carbohydrate-protein complex.

Indicators of total aerobic mesophilic aerobic and psychrophilic microorganisms contents of molds and yeasts is in a admissible norms to BDS 6835-81. The lack of pathogenic forms proves the purity and suitability for use of novel foods.

The inclusion of additives of plant origin with proven beneficial effects on human health, increases the biological value of the specialized meat-based foods. Included nuts and oils from different plants contain significant

ва. Включените ядки и масла от различни растения съдържат значителни количества мастноразтворими ензими: А, Е, както и витамин С, които придават на храните антиоксидантни свойства. Тези качества са свързани с превенция от сърдечно-съдови заболявания, водят до регулиране на кръвното налягане, редуциране на телесните липиди и др.

Проведеният биологичен експеримент за изследване въздействието на 4 варианта храни върху броя на левкоцитите в кръвта и изменението на телесната маса на опитните образци. Целта е да бъде установен най-подходящият от тях за възстановително хранене на пациенти с недохранване.

Експериментите са проведени върху бели мишки BDF от мъжки пол, разделени на 5 групи по 5 мишки както следва:

1 гр: – контрола – мишки, хранени с вивариумна храна (таблетирани дрожди и вода)

2 гр: – мишки, хранени с функционална храна от пуешко месо на зърнено-зеленчукова основа

3 гр: – мишки, хранени с с функционална храна от пуешко месо на зърнено-плодова основа

4 гр – мишки, хранени с функционална храна от биволско месо на зърнено-зеленчукова основа

5 гр: – мишки, хранени с функционална храна от биволско месо на зърнено-плодова основа

Животните от опитните групи са хранени с посочената храна в продължение на 16 дни по 3 гр. дневно.

В Таблица 2 и 3 представени резултатите от измерванията на телесната маса и левкоцитите в кръвта на опитните животни по време на експеримента.

Данните са изразени в проценти спрямо контролната група, която се приема за 100%.

amounts of soluble enzymes: A, E, and vitamin C that give the food antioxidant properties.

These properties are related to the prevention of cardiovascular diseases, leading to the regulation of blood pressure, reduction in body lipids.

The conducted biological experiment is in order to study the effects of 4 food variants on the number of leukocytes in the blood and the change in body mass of the test specimens. The goal is to establish the most appropriate of them for restorative nutrition of malnourished patients.

The experiments are carried out with white mice BDF males, divided into 5 groups of 5 pieces per group:

I group – the control – mice, fed with vivarium meal (compressed yeast and water),

II group – mice, fed with functional turkey meat food with grain-vegetable ingredients.

III group – mice, fed with functional turkey meat food with grain-fruit ingredients.

IV group – mice, fed with functional buffalo meat food with grain-vegetable ingredients.

V group – mice, fed with functional buffalo meat food with grain-fruit ingredients.

The animals of the experimental groups were fed with the indicated feed for 16 days 3 g daily.

The results of measurements of body weight and leukocytes in the blood of test animals during the experiment are presented in Table 2 and 3.

Data are expressed as a percentage relative to the control group which was assumed to be 100%.

Таблица 2. Динамика на промените на телесната маса по време на експеримента
Table 2. Dynamics of changes in body weight during the experiment

№	Вид храна Kind of food	Относително изменение на теглото по дни на измерване (% спрямо контролата) Relative weight change in measuring days (% in relation to the control)							
		2 day	4 day	6 day	8 day	10 day	12 day	14 day	16 day
1.	Храна от пуешко месо на зърнено-зеленчукова основа Turkey meat food with grain-vegetable ingredients	104,20	105,03	107,76	103,95	109,54	110,68	113,31	111,74
2.	Храна от пуешко на зърнено-плодова основа Turkey meat food with grain-fruit ingredients	105,87	107,23	108,04	108,73	111,72	108,50	119,71	123,10
3.	Храна от биволско на зърнено-зеленчукова основа Buffalo meat food with grain-vegetable ingredients	86,98	88,84	91,46	89,89	92,75	93,44	92,60	103,95
4.	Храна от биволско на зърнено-плодова основа Buffalo meat food with grain-fruit ingredients	94,08	91,51	90,63	87,58	91,87	89,92	97,23	108,41

Получените резултати показват, че използването на храна на основата на пуешко месо влияе положително върху изменението на стойностите на телесната маса и при двата вида продукти – на зърнено-зеленчукова и зърнено-плодова онова. През целия период на изследване са констатирани по-високи стойности спрямо контролната група, хранена по обичайния начин, като разликите се увеличават с течение на времето. При храненето с биволско месо се забелязва обратната тенденция – констатираме по-ниски стойности на този показател почти през целия период на изследване и при двата вида използвани коригенти. С течение на времето разликите спрямо контролната група намаляват и в края на изследвания период и при двата вида храни на основа на биволско месо, констатираме по-високи стойности спрямо контролната група.

По-ниските нива на левкоцитите в кръвта при контролната група, най-вероятно се дължат на дефицит на витамини от групата B_{12} и някои микроелементи – най-вече мед и цинк, като следствие от начина на хранене и използваните хранителни добавки при опитните групи, които са с по-висока хранителна стойност.

The results obtained show that the use of turkey meat-based food has a positive effect on the change in body mass values for foods on cereal-vegetable and cereal- fruit-base.

Over the entire study period, higher values were observed compared to the control group fed in the usual way, with differences increasing over time.

During feeding with buffalo meat-based food the opposite trend is noticed - we find lower values of this indicator almost during the entire investigation period for both types of enhancers used.

Over time, differences in control group decrease and at the end of the study period in both types of buffalo meat-based food we found higher values relative to the control group.

Lower blood leukocyte levels in the comparator control group are most likely due to a deficiency of B_{12} vitamins and some trace elements - mainly copper and zinc - as a consequence of the diet and dietary supplements used in experimental groups, which have a higher nutritional value.

Таблица 3. Динамика на промените на левкоцитите в кръвта
Table 3. Dynamics of change of leukocytes in the blood

№	Вид храна Kind of food	Относително изменение на концентрацията на левкоцитите в кръвта по дни на измерване (% спрямо контролата) Relative leukocytes in the blood change in measuring days (% in relation to the control)		
		6 day	12 day	18 day
1.	Храна от пуешко месо на зърнено-зеленчукова основа Turkey meat food with grain-vegetable ingredients	114,52	117,66	129,34
2.	Храна от пуешко на зърнено-плодова основа Turkey meat food with grain-fruit ingredients	116,13	111,91	112,34
3.	Храна от биволско на зърнено-зеленчукова основа Buffalo meat food with grain-vegetable ingredients	118,21	121,09	132,58
4.	Храна от биволско на зърнено-плодова основа Buffalo meat food with grain-fruit ingredients	124,72	121,20	132,35

С цел да установим коя храна е най-подходяща за здравословно хранене направихме комплексна оценка на четирите вида използвани храни, като приемаме, че по-високите стойности на съответния показател са по-благоприятни за здравето на изследваните обекти. Намаленото количество на левкоцитите води до спад в имунната система и податливост на различни заболявания. Това практически означава понижение на броя на клетките, които се борят със заболяванията. Състоянието се нарича левкопения, която варира в зависимост от възрастта и пола на индивида. Това състояние представлява сериозна опасност за живота на организма. Тъй като считаме, че намаленото количество на левкоцити в кръвта е по-животозастрашаващо, приемаме, че в комлексната оценка, тежестта на този показател ще бъде с два пъти по-голяма тежест от изменението на теглото. След тези уточнения формулата за оценка на видовете храни приема следния вид:

In order to determine which food is best for healthy eating we made a comprehensive assessment the four types of food, assuming that the higher values of corresponding indicator are more favorable to the health of the studied objects. The reduced amount of leukocytes leads to a decrease in the immune system and susceptibility to various diseases. This practically means a decrease in the number of cells that fight the disease. The condition is called leucopenia, which varies depending on the age and gender of the individual.

This statement has a positive impact on the body's lifespan. Since we believe that the reduced amount of leukocytes in the blood is more life-threatening, we assume that the weighting of this indicator will be twice the weight of the weight change in the composite assessment. After these clarifications, the formula for the assessment of the types of food takes the following form:

$$X_i = \frac{1}{3}\left(\frac{T_{i1} + \ldots\ldots\ldots + T_{in}}{N}\right) + \frac{2}{3}\left(\frac{L_{i1} + \ldots\ldots\ldots\ldots + L_{in}}{N}\right)$$

където X_i са различните видове храна,
$Ti_1 \ldots\ldots Ti_n$ са получените стойности за показателя тегло при съответната храна,
$Li_1 \ldots\ldots Li_n$ са получените стойности

where X_i are the different kind of foods.
$Ti_1 \ldots\ldots Ti_n$ are the values obtained for the indicator weight of the respective food.

$Li_1 \ldots\ldots Li_n$ are the values obtained for

за показателя левкоцити в кръвта при съответната храна.

Данните, които използваме са от Таблица1 и 2 по-горе в текста. След заместване във формулата получаваме следните резултати, подредени по-низходящ ред:

1. Храна от пуешко месо на зърнено-зеленчукова основа – 116,43
2. Храна от биволско месо на зърнено- плодова основа - 115,36
3. Храна от биволско месо на зърнено-зеленчукова основа - 113,47
4. Храна от пуешко месо на зърнено-плодова основа - 112,84

the indicator leukocytes in the blood of the respective food.

The data we use are from Table 1 and 2 above in the text. After substituting in the formula we get the following results arranged in descending order:

1. Turkey meat food with grain-vegetable ingredients - 116.43
2. Buffalo meat food with grain-fruit ingredients - 115.36
3. Buffalo meat food with grain-vegetable ingredients - 113.47
4. Turkey meat food with grain-fruit ingredients -112.84

ИЗВОДИ

1. Използването на специална храна от пуешко месо се отразява благоприятно върху покачването на телесната маса на изследваните опитни мишки.
2. Установено е повишение на левкоцитите в кръвта при всички опитни групи спрямо контролната група, което е със статистически висок ранг на доказаност.
3. С най-висока комплексна оценка на изследваните показатели е храната на основа на пуешко месо със зърнено-зеленчукови добавки.

CONCLUSIONS

1. Using a special food from turkey meat have a positive effect on body weight increase of the studied mice.
2. It has been found an increase in the values of the leukocytes in the blood of all experimental groups compared with the control group, which is a statistically higher rank of proof.
3. The highest comprehensive evaluation of the investigated indicators is the turkey meat food with grain - vegetable additives.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Doneva, M.**, 2005. Freeze-drying - a reliable method for the preparation of stable enzyme product. *Food Processing Industry*, 11, 16-20 (Bg).
2. **Conte, A., M. Mastromatteo, F. Cozzolino, L. Lecce, M. Del Nobile**, 2011. Recipe optimization to produce functional food based on meat and fish. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, S4:001. doi:10.4172/2155-9600.S4-001
3. **Fernández, J., J. Ginés, L.Fernández, E.Sayas-Barberá, J. Pérez-Alvarez**, 2005. Meat Products as Functional Foods: A Review: concise reviews/hypotheses in food science. *Journal of food science*, 70(2), 43-48.
4. **Mc Afee, A., E. McSorley, G. Cuskelly, B. Moss, J. Wallace, M. Bonham, A. Fearon**, 2010. Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84, 1-13.
5. **Schönfeldt, H. and N. Gibson**, 2008**.** Changes in the nutrient quality of meat in an obesity context. *Meat Science*, 80, 20-27.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 49-64 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на сезона и фазата на лактация върху физикохимичния и мастнокиселинен състав на овче мляко при Каракачанската порода, отлеждана в района на Средните Родопи

Силвия Иванова[1], Любомир Ангелов[1]*, Димитър Гаджев[2]

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

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

Influence of season and stage of lactation on the physicochemical and fatty acid composition of ewe's milk in Karakachan breed rearing in the region of the Middle Rhodopes

Silviya Ivanova[1], Ljubomir Angelov[1]*, Dimitar Gadjev[2]

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

РЕЗЮМЕ

Целта на настоящото проучване е да се проследи в динамика състава на ливадната трева, физикохимичните и микробиологични показатели на овчето мляко и проследяване на мастно киселинен спектър в различните растителни и животински суровини.

Проведеното проучване върху мастнокиселинния състав на тревните асоциации в района на Средните Родопи в зависимост от сезона показва, че с напредване на вегетацията се променя концентрацията на основните групи мастни киселини, при което стъпаловидно нараства количеството на наси-

SUMMARY

The aim of this study was to trace the dynamics of the composition of meadow grass, physicochemical and microbiological indicators of ewe's milk and tracking fatty acid spectrum in various plant and animal materials.

Conducted research on the fatty acid composition of grass associations in the region of the Middle Rhodopes depending on the season shows that with increasing vegetation is changing the concentration of the main groups of fatty acids in which stepwise increases the amount of saturated by 14% and

тените с 14% и мононенаситени мастни к-ни с 78% (SFA и MUFA) за сметка на полиненаситените (PUFA). В динамиката са проследени промените на линоловата к-на (C18:2 cis9,12) α-линоленовата които се явяват субстрат за синтезата на CLA (антиканцерогенно действие) в търбуха на преживните животни. Направена е физикохимична и микробиологична оценка на млякото през периода май-юли и е проследен мастнокиселинния спектър на млечните проби. Получените млека са с много висока биологична стойност (високи нива на CLA, ω-3, ω-6, вакценово к-на). Овчето мляко от Каракачанската порода е важна суровина за производството на млечни продукти с повишена биологична стойност и храни с антиканцерогенно действие.

Ключови думи: ливадна трева, овче мляко, физикохимични показатели, мастнокиселинен състав, биологично активни субстанции, транс мастни киселини

monounsaturated fatty acids with 78% (SFA and MUFA) expense of polyunsaturated (PUFA). In the dynamics tracked changes linoleic acid (C18:2cis9,12) and α-linolenic which are appearing substrate for synthesis of CLA (anticancer action) in the rumen.

Assessment of physicochemical and microbiological parameters and fatty acid composition was made of milk in the period from May to July. The ewe's milk have very high biological value (higher levels of CLA, ω-3, ω-6 and vaccenic acid). Sheep's milk from Karakachan breed is an important raw material for production of dairy foods with high biological value and anticancerogenic effect.

Key words: pasture grass**,** ewe's milk, physicochemical composition, fatty acid profile, biological active substances, trans fatty acids

УВОД

Млякото и млечните продукти са неразделна част от човешкото хранене и заемат специално място в хранителния баланс, като съдържат в оптимално съотношение всички хранителни вещества, необходими за човешкото тяло. В сравнение с кравето, човешкото и козето мляко, овчето мляко ги превъзхожда по отношение съдържанието на млечен протеин, десет есенциални аминокиселини, мононенаситени мастни киселини и линоленова киселина, калций, магнезий, желязо, цинк, тиамин, рибофлавин, витамини B_6, B_{12}, D. Овчето мляко и неговите производни са от изключителен интерес за много Европейски страни. В повечето държа-ви от Северна и Западна Европа овцете се отглеждат главно за производство на месо. В Централна и Южна Европа доенето на овцете е в късна фаза на лактация и е изцяло ориентирано за производство на меки и твърди сирена.

INTRODUCTION

Milk and dairy products are an integral part of human nutrition and occupy a special place in the nutritional balance, containing in optimum proportion all nutrients necessary for the human body. Compared to cow's, human and goat's milk, the ewes milk is superior to content of milk protein, 10 essential amino acids, monounsaturated fatty acids and linoleic acid, calcium, magnesium, iron, zinc, thiamin, riboflavin, vitamins B_6, B_{12} and D.

The sheep milk and its derivatives are of great interest to many European countries. In most northern and western European countries the sheep are mainly reared for meat production. In Central and Southern Europe the milking of ewes is in the late lactation phase and is entirely orientated to produce white brined and yellow cheese.

Характеристиките на овчето мляко и млечни продукти зависят от голям брой фактори. Те са свързани както с химичните, биохимични и микробиологични свойства на суровините, така също и с прилаганите технологии за производство на млечни продукти. Други безспорно важни фактори са генетичните и физиологичните особености на животните. Породните различия силно влияят върху добива на мляко и продължителността на лактацията при овцете.

Производството на качествено овче мляко и млечни продукти с повишено съдържание на антиканцерогенни субстанции и биологично активни вещества зависи преди всичко от състава на пасищната растителност, ботаническото разнообразие и вегетационния стадий на отделните растителни видове, валежите и климатичните особенности на района (Angelow, 1995; Odjakova et al., 2001). Съществува взаимна връзка между ботаническия състав на пасищата и фенологичния стадии на отделните тревни асоциации върху промените в мастнокиселинния състав на ливадните фитоценози през отделните подпериоди при различна надморска височина на пасищата (Tsvetkova and Angelov 2010). Последните проучванията в Западните Родопи върху състава на ливадната трева от естествени и култивирани пасища в райони разположени между 1000 и 1200 m надморска височина, върху гранитни и гнайсови геоложки формации и с ниско pH на почвата (3.8-4.0) има отрицателно влияние върху ботаническото разнообразие на естествения тревостой. Растителните проби от естествените ливади съдържат основно *Nardus stricta*, а култивираните ливади са с преобладаващо участие на *Fastuca fallax, Lolium perenne* и *Poa pratensis*. Зелените фуражи, използвани при храненето на овцете, могат да допринесат за формиране на специфични биологично активни субстанции

Characteristics of ewe's milk and dairy products depend on a large number of factors. They are related both to the chemical, biochemical and microbiological properties of the raw materials, as well as to use of new technology for the production of dairy products. Other important factors, besides those mentioned, are the genetic and physiological features of the animals. Breed differences have a strong impact on milk yield and duration of lactation in sheep.

The production of ewe's milk and dairy products with quality and an increased content of anticancerogenic and biologically active substances depend primarily on the composition of the pasture vegetation, the botanical diversity and the vegetation stage of the individual plant species, the rainfall and the climatic characteristics of the area (Angelow, 1995; Odjakova et al., 2001). There is a correlation between the botanical composition of the pastures and the phenological stages of the individual grass associations on the changes in the fatty acid composition of meadow vegetation during the different sub-periods at different altitudes of the pasture areas (Tsvetkova and Angelov 2010).

Recent studies in the Western Rhodopes on the composition of meadow grass from natural and cultivated pastures in areas between 1000 and 1200 m above sea level, on granite and gneiss geological formations and with low pH level of soil (3.8-4.0) have a negative impact on the botanical diversity of permanent pastures.

The plant samples from the natural meadows contain mainly *Nardus stricta*, and the cultivated meadows are predominantly of *Fastuca fallax, Lolium perenne* and *Poa pratensis*. The fresh green grass used for feeding of sheep can contribute to the formation of specific biologically active substances in the final product as well as to influence positively

в крайния продукт, както и да повлияят в положителна посока на вкусовите и сензорни характеристики на получаваните млечни продукти (Pirreda et al., 2002; Cabiddu et. al., 2003b; Pirisi et al., 2004).

Получаването на нови данни за планинските райони с различна геоложка структура, надморска височина и ботанически състав на пасищната растителност, както и в различията при храненето на лактиращи овце, са важно условие за изясняване трансфера на мастните киселини и получаването на мляко и млечни продукти обогатени с различни биологично активни и антиканцерогенни субстанции (ω-3, ω-6, C18:1trans11 и CLA). Изследванията на редица учени са фокусирани не само върху режима на хранене на преживните животни, но и върху биохимичните промени в мастно-киселинните фракции на овчето мляко, както и значението им хуманното хранене (Tsvetkova and Angelow, 2013; Mihailova and Odjakova, 2006).

Съставът на овчето мляко варира в широки граници и зависи преди всичко от дажбата, през лактационния период, сезона, породата, географския регион и др. (Fegeros et al., 1995; Kafedjiev and Mihailova, 1998). С напредване на лактацията съдържанието на млечните мазнини в овчето мляко нараства достоверно в сравнение с кравето (Petrova et al., 1998; Petrova et al., 1999). В зависимост от породата, съставът му варира в доста широки граници: липиди 6-11%, белтък 4-7%, сухото вещество 17-21% и лактоза 4-6% (Dario et al., 1995; Path, 1995; Simos et al., 1996). Посочените по-горе фактори фокусират вниманието както на изследователи, така и на консуматори и производители, особено тези свързани с храненето на човека. Тяхната значимост се засилва особено при идентифициране качеството на млечните продукти (Cabiddu et al., 2003a; Mihailova at al., 2004; Mihailova, 2006) и връзката между качество и условията

the taste and sensory characteristics of the dairy products obtained (Pirreda et al., 2002; Cabiddu et al., 2003b; Pirisi et al., 2004).

Obtaining new data on the mountainous areas with different geological structure, altitude and botanical composition of pasture vegetation as well as the differences in the feeding regime of lactating sheep are an important condition for clarifying the transfer of fatty acids and the production of milk and dairy products enriched with various biologically active and anticancerogenic substances (ω-3, ω-6, C18:1trans11 and CLA). The research of a number of scientists focused not only on the diet of ruminants but also on the biochemical changes in the fatty acid fractions of sheep milk as well as their importance for the human nutrition (Tsvetkova and Angelow, 2013, Mihailova and Odjakova, 2006) .

The composition of ewe's milk varies widely and depends primarily on the ration, the lactation period, the season, the breed, the geographic region, etc. (Fegeros et al 1995, Kafedjiev and Mihailova, 1998). With advance of lactation, the milk fat content of sheep milk is growing significantly than cow's milk (Petrova et al., 1998, Petrova et al., 1999). In depend on the breed, its composition varies widely: lipids 6-11%, protein 4-7%, dry matter 17-21% and lactose 4-6% (Dario et al., 1995; Path, 1995; Simos Et al., 1996).

The factors mentioned above focus on the attention of researchers as well as consumers and producers, especially those related to human nutrition. Their importance is enhanced especially in identifying the quality of dairy products (Cabiddu et al., 2003a; Mihailova et al., 2004, Mihailova, 2006) and the relation between quality and the conditions of their production. In order to obtain high quality

на тяхното производство. За получаване на висококачествена животинска продукция (мляко и млечни продукти) с подобрени технологични показатели е необходимо да се познава не само хранителния режим (състава на диетите), но и физикохимичните показатели на млякото.

Целта на настоящото проучване е да се проследи в динамика ботаническия състава на ливадната трева, физикохимичните и микробиологичните показатели на овчето мляко и проследяване на мастнокиселинният спектър в наличните растителни и животински суровини.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Общ химичен и микробиологичен анализ на овче мляко от Каракачанската порода

Сборните млечните проби от 50 овце майки са събрани през периода май-юли (01.05. - 01.06. - 01.07.) и са изследвани за основните физико-химични (протеин, мазнини, лактоза, $T^{o}_{замр.}$, СБО и СВ) и микробиологични показатели (ОБМ, Somatic cell, CFU). Анализът е осъществен с помощта Milkoscan 133 B, A/S Foss Electric, Denmark и на автоматичен анализатор COMBIFOSS-5000 и BACTOSCAN-FC.

Мастнокиселинен анализ

Екстракцията на общи липиди при растителните проби е извършена по метода на Bligh & Dyer (1959) посредством хлороформ и метанол в съотношение 1:2 и последващо метилиране с ацетил хлорид. Екстракцията на общи липиди при млеката е извършена по метода на Roese-Gottlieb (1973), посредством диетилов и петролеев етер и последващо метилиране с помощта на натриев метилат (CH_3ONa, Merck, Darmstadt) и обезводняване с $NaHSO_4.H_2O$. Метиловите естери на мастните киселини (FAME) са анализирани с помощта на газов хроматограф Shimadzu-2010 (Kioto, Japan) снабден с

of animal products (milk and dairy products) with improved technological indicators, it is necessary to know not only the diet (composition of diets) but also the physicochemical parameter of the milk.

The aim of the present study is to investigate the dynamic of the botanical composition of meadow vegetation, the physicochemical and microbiological characteristics of ewe's milk and the traceability of the fatty acid spectrum in the plant associations and the raw materials of animal origin.

MATERIAL AND METHODS

Physico-chemical and microbiological analysis of ewe's milk

The bulk milk samples of 50 ewes were collected during the pasture period May-July (01.05. - 01.06. - 01.07.) and have been investigated for the main physico-chemical (protein, fat, lactose, FPD, SNF and DM) and microbiological parameters (TNM, Somatic cell, CFU). The analysis was performed using Milkoscan 133 B, A/S Foss Electric, Denmark and automatic analyzer COMBIFOSS-5000 and BACTOSCAN-FC.

Fatty acids analyses

The extraction of total lipids in plant samples was performed by Bligh & Dyer (1959) using chloroform and methanol in a ratio 1: 2 followed by methylation with acetyl chloride. The extraction of total lipids in the milk was carried out by Roese-Gottlieb (1973), by means of diethyl ether and petroleum ether and subsequent methylation with sodium methylate (CH_3ONa, Merck, Darmstadt) and dehydration with $NaHSO_4.H_2O$.

Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a Shimadzu-2010 gas chromatograph (Kioto, Japan) equipped with flame ionization detector and an

пламъчно-йонизационен детектор и автоматична инжекционна система (AOC-2010i). Анализът е извършен на капилярна колона CP7420 (100 m x 0.25 mm i.d., 0.2 m, 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 минути, следва ново повишаване с 4ºC/min до 186ºC за 19 минути и до 220ºC с по 4ºC/min до приключване на процеса.

automatic injection system (AOC-2010i).

The analysis was performed on capillary column CP7420 (100 m x 0.25 mm i.d., 0.2 m, Varian Inc., Palo Alto, CA). Hydrogen is used as carrier gas, and as make-up gas – nitrogen. Four-step furnace mode is programmed – the initial column temperature is 80ºC/min, maintained for 15 minutes, then increased by 12ºC/min to 170ºC and maintained for 20 minutes, followed by a new 4ºC/min increase to 186ºC for 19 minutes and up to 220ºC with 4ºC/min until the process is complete.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните от ботаническия състав на естествените пасища и ливади при различни надморски височини са представени на Таблица 1 и показват, че в състава на тревостоите преобладават житните треви.

RESULTS AND DISCUSSION

The data from the botanical composition of the natural pastures and meadows at different altitudes are presented in Table 1 and show that the grass associations are predominant in *Poaceae* family.

Таблица 1. Ботанически състав на естествени тревостои от ливади и пасища, %
Table 1. Botanical composition of natural meadow vegetation and pasture grass, %

Надморска височина, m Altitude, m	**Площадки** Plots	**Житни** Poaceae	**Бобови** Fabaceae	**Разнотревие** Various herbaceous
1100 m Ливади / Meadow	1	**73.68**	5.26	**21.06**
	2	50.00	8.82	41.18
	3	33.77	**23.38**	**42.85**
1530 m Пасиша / Grass	1	94.00	2.20	3.80
	2	86.49	**2.70**	**10.81**
	3	**95.12**	2.44	**2.44**

Относителният им дял в тревостоя от естествени ливади варира в диапазона от 33.77% до 73.68%. Дяловото участие на житните растения в тревостоя от естествените пасища определено е по-високо и се движи от 86.49% до 95.12%. Сред преобладаващите житни треви в тревостоите от естествени ливади са безосилеста овсига и червена власатка, докато от

Their relative share in the meadow grass ranges from 33.77% to 73.68%. The share of *Poaceae* family in the natural pasture grass is definitely higher and ranges from 86.49% to 95.12%.

Among the predominant *Poaceae* family in the natural meadow grasses are *Bromus inermis* and *Festuca rubra*, while from the natural meadow pastures are

естествени пасища ливадната метлица и бялата полевица.

Процентното участие на бобовите треви, представлявани от червената и бяла детелина, звездана и дивия фий е сравнително малко и се колебае между 5.26% и 23.53% при ливадите и съответно между 0% и 2.70% при пасищата. Делът на другите растителни видове в тревостоите от естествени ливади варира в границите от 21.06% до 42.85%.

Сезонът и надморската височина влияят не само върху нивото на протеина, но и върху състава на мазнините в тревостоя от изследваните опитни площадки (Таблица 2).

Poa pretensis and *Agrosis alba*.

The percentage of legumes represented by *Trifolium pratense* and *Trifolium repens* , *Lotus corniculatus* and *Vicia sativa* is comparatively small and fluctuated between 5.26% and 23.53% for meadow vegetation and 0% and 2.70% respectively for pasture grass. The share of other plant species in the grassland from natural meadows ranges from 21.06% to 42.85%.

The season and altitude affect not only the protein level but also the composition of fatty acids spectrum in the plant associations of the experimental sites (Table 2).

Таблица 2. Влияние на сезона и надморската височина върху мастнокиселинния състав на тревостоя в Средните Родопи (мест. Кайнадина), g/100g мазнина
Table 2. Influence of season and altitude on the fatty acid composition of pasture grass in the Middle Rhodope Mountain (area Kainadina), g/100 g fat

Групи мастни киселини Group fatty acids	**Ливадна трева май** Pasture grass May		**Ливадна трева юли** Pasture grass July		p	%
	x	sd	x	sd		
SFA	**22,70**	2,93	**25,89**	6,81	>0,05	**114**
MUFA	**6,83**	3,51	**12,17**	6,16	>0,05	**178**
PUFA	**70,33**	0,52	**61,88**	0,63	<0,001	**88**
Σ C-18:1trans-FA	**0,03**	0,01	**0,06**	0,07	>0,05	**200**
Σ C-18:1cis-FA	**6,46**	3,52	**11,52**	5,93	>0,05	**178**
Σ n-3	**49,78**	4,30	**33,83**	6,27	>0,05	**68**
Σ n-6	**20,51**	3,82	**28,05**	6,90	>0,05	**137**
Σn-6/Σn-3	**0,42**	0,11	**0,86**	0,36	>0,05	**205**
Branched FA	**0,20**	0,06	**0,08**	0,02	>0,05	**40**

Мастнокиселиният профил (g/100g мазнина) на ливадната трева показва, че в зависимост от сезона и с напредване на вегетацията се променя концентрацията на основните групи мастни киселини. Увеличава се стъпаловидно количеството на наситените ки-

The fatty acid profile (g/100g fat) of meadow grass shows that in depend on the season and with advance of vegetation, the concentration of the major fatty acid groups changes. The amount of saturated acids increased by 14% and monounsaturated fatty acids by 78%

селини с 14% и мононенаситени мастни киселини с 78% (SFA и MUFA) за сметка на полиненаситените (PUFA). Достоверно нарастват концентрациите на дълговерижните наситени киселини– арахидонова (C20:0) и лингоцеринова киселина (C24:0), докато останалите остават непроменени. При профила на MUFA единствено два от изомерите на олеиновата киселина (C18:1 cis9 и C18:1 cis11) нарастват високо достоверно. Концентрацията на основния изомер – C18:1cis9 достига стойности до 10.88 g/100g мазнина.

Особен интерес представлява динамиката в промените на линоловата (C18:2 cis9,12) и α-линоленовата киселина, които се явяват субстрат за синтезата на CLA (антиканцерогенно действие) в търбуха на преживните животни. Концентрацията на C18:2 нараства с 37% за периода май-юли и достига своя максимум от 27.83 g/100g мазнина. При α-линоленовата киселина се наблюдава спад в концентрацията и от 49.69 g/100g мазнина през май до 33.79 g/100g мазнина през юли. Определянето на мастнокиселинния спектър на тревните асоциации в началото и края на изследвания период, допринася за окончателна оценка, относно динамиката на мастните киселини в тревните асоциации на изследвания район.

Физикохимичния анализ на овчето мляко през пасищния период показва промените в основните параметри на изходните проби. Не са установени достоверни промени по отношение на количеството на мазнините, протеина и лактозата в млякото през дойния период (Таблица 3).

(SFA and MUFA) at the expense of polyunsaturated (PUFA).

Only the long-chain saturated acids – arachidonic (C20:0) and lignoceric acid (C24:0) increased reliably, while the other remain unchanged. In the MUFA profile, only two of the isomers of oleic acid (C18:1cis9 and C18:1cis11) increased high significant.

The concentration of the major isomer – C18:1cis9 reached a value of 10.88 g/100g fat.

Of particular interest is the dynamics of changes in linoleic (C18:2 cis9,12) and α-linolenic acid, which are a substrate for CLA synthesis (anticancerogenic activity) in the rumen of ruminants. The concentration of C18:2 increased by 37% in May-July and reached a maximum of 27.83 g/100g fat. In α-linolenic acid there was a decrease in the concentration and from 49.69 g/100g fat in May to 33.79 g/100g fat in July.

Determination of the fatty acid spectrum of the grass associations at the beginning and end of the study period contributes to the final assessment of the fatty acid dynamics in the grass associations of the studied area.

The physic-chemical analysis of ewe's milk during the pasture period showed the changes in the basic parameters of the milk samples. Insignificant changes in the fat, protein and lactose content in the milk during the lactation period were found (Table 3).

Таблица 3. Физикохимичен състав на овчето мляко (Каракачанска порода) през пасищния период (01.05 - 01.07.)
Table 3. Physicochemical composition of ewe's milk (Karakachan breed) during the grazing period (01.05 - 01.07.)

		Мазнина Fat %	**Протеин** Protein %	**Лактоза** Lactose %	**$T^{o}_{зам.}$** FP (-) ^{o}C	**СВ** DM %	**СБО** SNF %
01.05.	x	**7,86**	**6,65**	**4,67**	**0,57**	**19,85**	**12,44**
	sd	0,01	0,02	0,05	0,05	0,02	0,02
01.06.	x	**7,94**	**5,91**	**4,62**	**0,57**	**19,17**	**11,65**
	sd	1,07	0,08	0,04	0,05	0,95	0,13
01.07.	x	**7,85**	**6,05**	**4,54**	**0,58**	**19,13**	**11,70**
	sd	0,12	0,01	0,05	0,05	0,11	0,01

В хода на лактацията незначително намалява СВ и СБО в овчето мляко. Микробиологична оценка на сборните млечни проби показва, че съдържанието на соматични клетки в суровото овче мляко (Таблица 4) са в норма и са установени ниски стойности за месеците юни и юли, съответно 7.90 x 10^3 и 7.85 x 10^3.

In the course of lactation insignificantly decreased DM and SNF in ewe's milk. Microbiological assessment of the bulk milk samples show that the somatic cells content in raw ewe's milk (Table 4) was in the norm and a low values at 01. June and at 01.July, respectively 7.90 x 10^3 and 7.85 x 10^3 have been established.

Таблица 4. Микробиологична характеристика на овче мляко /Каракачанска порода/ през пасищния период (01.05 - 01.07.)
Table 4. Microbiological characteristics of sheep milk / Karakachanian breed / during the grassing period (01.05. - 01.07.)

Период Period		**Сом. клетки. x 10^3** Somatic cells x 10^3	**ОБМ x 10^3** TNM x 10^3	**Колиформи** CFU x 10^3
01.05.	**x**	**356**	**514**	**200**
	sd	62	188	62
01.06.	x	**7,90**	**5,90**	**4,60**
	sd	1,1	0,1	0,04
01.07.	**x**	**7,85**	**6,10**	**4,50**
	sd	0,1	0,01	0,1

Допустимите стойности за този показател са в границите от 300 x 10^3 до 1000 x 10^3. Данните за нивото на колиформите са в допустимите норми и варират в границите от 200 x 10^3 до

Allowable values for this indicator are in the range of 300 x 10^3 to 1000 x 10^3. The CFU level data was within the allowable range and varied from 200 x 10^3 to 4.50 x 10^3. The results obtained of

4.50 x 10^3. Получените резултати от микробиологичните проучвания са показателни за изключително ниското ниво на микроорганизми в млякото, което би позволило неговото директното използване при производството на млечни продукти като кисело мляко, сирене и кашкавал. По отношение съдържанието на соматични клетки в овчето мляко няма строги изисквания както при кравето мляко. През предвидения транзитен период, горната граница не трябва да надвишава 500.000 somatic cell/ml (Според EU Директива 92/46 и Регламент 953/2004 на EU Парламента).

Мастнокиселинният състав на овчето мляко е представен на Таблица 5. Наситените мастни киселини варират от 66.95 до 65.54 g/100g мазнина. Общото съдържание на нанаситени мастни киселини в млякото варира в много тесни граници. Подобни изводи могат да бъдат направени за съдържанието на мононенаситените и полиненаситените мастни киселини в млечните проби. Установените разлики са статистически недостоверни.

the microbiological studies are indicative of the extremely low level of microorganisms in the milk, which would allow its direct use in the production of dairy products such as yoghurt, cheese and yellow cheese.

Regarding somatic cell content in ewe's milk, there are no strict requirements for cow milk. During the transit period is foreseen, with the upper limit not exceeding <500,000 somatic cell/ml (According to EU Directive 92/46 and EU Regulation 953/2004).

The fatty acid composition of ewe's milk is presented in Table 5. Saturated fatty acids range from 66.95 to 65.54 g/100g fat. The total content of saturated fatty acids in the milk varied within very narrow limits. Similar conclusions can be made for the content of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the milk samples. The observed differences are statistically insignificant.

Таблица 5. Мастнокиселинен състав на сурово овче мляко през пасищния период, g/100g мазнина
Table 5. Fatty acid composition of raw ewe's milk during the grazing period (g/100g fat)

МК-профил FA-profile	**Май** May		**Юни** June		**Юли** July	
	x	sd	**x**	sd	**x**	sd
НМК / SFA	**66,74**	0,14	**66,95**	0,19	**65,54**	0,02
МНМК / MUFA	**25,28**	0,15	**25,66**	0,16	**26,15**	0,03
ПНМК / PUFA	**7,98**	0,02	**7,39**	0,03	**8,31**	0,05
Σ C-18:1trans-FA	**7,55**	0,10	**5,74**	0,11	**5,75**	0,06
C-18:1tr11	**4,21**	0,02	**3,14**	0,03	**2,75**	0,04
Σ CLA	**3,49**	0,03	**2,99**	0,02	**3,00**	0,04
C-16:0/C-18:1cis9	**1,41**	0,01	**1,33**	0,01	**1,35**	0,01
C-16:0/C-18:1 total	**0,97**	0,01	**1,02**	0,01	**1,05**	0,01
Σ n-3	**1,78**	0,05	**1,83**	0,00	**2,29**	0,04
Σ n-6	**3,43**	0,02	**3,13**	0,01	**3,72**	0,07
n-6/ n-3	**1,93**	0,06	**1,71**	0,01	**1,62**	0,06
Σ MCT (C-10>C-14)	**23,28**	0,01	**19,84**	0,18	**18,02**	0,02
Σ SCT (C-4>C-8)	**10,23**	0,10	**8,95**	0,12	**8,54**	0,07
CLA 9c,11t	**2,60**	0,08	**2,39**	0,01	**2,33**	0,01

Количеството на някои късо- и средноверижни мастни киселини (C6:0, C8:0, C10:0 и C12:0) намалява в хода на лактацията на овцете от 18.96 до 12.26 g/100g мазнина (Таблица 6).

The amount of some short- and medium chain fatty acids (C6:0, C8:0, C10:0 and C12:0) decreased in the course of lactation from 18.96 to 12.26 g/100g of fat (Table 6).

Таблица 6. Влияние на сезона върху съдържанието на наситени мастни киселини в овчето мляко в (g/100g мазнина)
Table 6. Influence of the season on the content of saturated fatty acids in ewe's milk (g/100g fat)

НМК SFA	**Май** May		**Юни** June		**Юли** July	
	x	sd	**x**	sd	**x**	sd
C-4:0	3,80	0,06	3,78	0,03	4,09	0,01
C-6:0	**3,33**	0,04	**2,83**	0,06	**2,57**	0,02
C-8:0	**3,03**	0,01	**2,30**	0,04	**1,87**	0,02
C-10:0	**8,43**	0,02	**6,36**	0,08	**5,03**	0,03
C-12:0	**4,17**	0,004	**3,20**	0,04	**2,79**	0,01
C-14:0	9,82	0,03	9,49	0,06	9,37	0,01
C-15iso	0,29	0,005	0,41	0,001	0,43	0,003
C-15aiso	0,64	0,002	0,70	0,001	0,70	0,01
C-15:0	1,13	0,005	1,29	0,01	1,47	0,005
C-16iso	0,27	0,004	0,30	0,001	0,30	0,01
C-16:0	**21,35**	0,07	**23,18**	0,02	**23,73**	0,04
C-17iso	0,39	0,003	0,52	0,003	0,51	0,004
C-17aiso	0,49	0,002	0,52	0,003	0,51	0,001
C-17:0	0,69	0,003	0,79	0,001	0,85	0,002
C-18:0	**7,90**	0,002	**10,11**	0,11	**10,14**	0,04
C-20:0	0,20	0,002	0,28	0,01	0,32	0,002
C-22:0	0,14	0,002	0,17	0,003	0,16	0,003

Тези изменения са породени от нарастване на съдържанието на дълговерижните C16:0 и C18:0 и понижаване концентрациите на хептановата, каприловата и каприновата киселина, което е установено с статистическа достоверност. При миристиновата киселина (C-14:0) в млякото се наблюдава тенденция към слабо понижение от 1-2%.

Детайлното разглеждане при разпределението на мононенаситените мастни киселини (MUFA) в млякото през отделните подпериоди показва, че общото им съдържание нараства

These changes are due to an increase in C4:0 content and a decrease of caproic, caprylic and capric acid content, which is statistically significant.

Myristic acid (C-14:0) in the milk tends to a slight decrease of 1-2%.

A detailed examination of the distribution of monounsaturated fatty acids (MUFA) in the milk during the different sub-periods shows that their total content increased insignificantly

незначително от 25.28 до 26.15 g/100g мазнина в края на периода. Тези изменения са породени от промените в концентрациите на ваксеновата и олеиновата киселини (Таблица 7).

from 25.28 to 26.15 g/100g fat at the end of the period. These changes are due to changes in the concentrations of vaccenic and oleic acids (Table 7).

Таблица 7. Влияние на сезона върху съдържанието на мононенаситените мастни киселини в овчето мляко (g/100g мазнина)
Table 7. Influence of the season on the content of monounsaturated fatty acids in ewe's milk (g/100g fat)

МНМК **MUFA**	**Май** May		**Юни** June		**Юли** July	
	x	sd	**x**	sd	**x**	sd
C-10:1	0,28	0,002	0,23	0,004	0,23	0,001
C-14:1	0,19	0,000	0,19	0,003	0,22	0,001
C-16:1	0,99	0,003	1,03	0,005	1,14	0,02
C-18:1tr4	**0,07**	0,003	**0,06**	0,001	**0,05**	0,02
C-18:1tr5	**0,03**	0,001	**0,03**	0,001	**0,07**	0,02
C-18:1tr6/7	**0,26**	0,018	**0,21**	0,026	**0,25**	0,05
C-18:1tr9	**0,33**	0,005	**0,26**	0,010	**0,28**	0,02
C-18:1tr10	**0,45**	0,005	**0,30**	0,014	**0,31**	0,01
C-18:1tr11	**4,21**	0,025	**3,14**	0,028	**2,75**	0,04
C-18:1tr12	**0,51**	0,002	**0,36**	0,013	**0,41**	0,02
C-18:1tr13	**0,67**	0,063	**0,47**	0,019	**0,53**	0,06
C-18:1tr15	**0,41**	0,004	**0,34**	0,008	**0,40**	0,02
C-18:1tr16	**0,67**	0,038	**0,59**	0,005	**0,70**	0,01
C-18:1cis9	**15,16**	0,025	**17,48**	0,116	**17,63**	0,07
C-18:1cis11	**0,45**	0,001	**0,47**	0,007	**0,51**	0,02
C-18:1cis12	**0,17**	0,008	**0,15**	0,038	**0,20**	0,06
C-18:1cis13	**0,21**	0,030	**0,17**	0,007	**0,24**	0,02
C-18:1cis15	**0,18**	0,002	**0,14**	0,003	**0,18**	0,03

От профила на MUFA най-богат е спектъра на cis- и trans-изомерите на олеиновата киселина (C18:1). Транс-изомерите на C18:1 при млеката намалява от 7.55 до 5.75 g/100g мазнина, докато цис-изомерите на C18:1 нарастват от 16.17 до 18.76 g/100g мазнина. Олеиновата киселина C18:1*cis*9 нараства от 15.16 до 17.63 g/100g мазнина. За науката интерес представлява съдържанието на trans- мастните киселини в млечните проби през лактацион-

The MUFA profile is the richest in the spectrum of cis- and trans-isomers of the oleic acid (C18:1). The trans-isomers of C18:1 in the milk decreased from 7.55 to 5.75 g/100g fat, while the cis-isomers of C18:1 increased from 16.17 to 18.76 g/100g fat. Oleic acid C18:1cis9 increased from 15.16 to 17.63 g/100g fat.

Scientifically, the trans-fatty acid content of the milk samples during the lactation period is of interest. Their concentration

ния период. Тяхната концентрацията при изследваните 10 изомера намалява стъпаловидно от май до юли. Особено място в това отношение заема ваксеновата киселина 18:1 trans11, която се явява като субстрат за синтезата на конюгираните линолови киселини в млечната жлеза под действието на ензима Δ9-десатураза. Тя намалява достоверно в млякото от 4.21 до 2.75 g/100g мазнина. Всички trans-изомери с изключение на C-18:1t11 се смятат за “нежелани”, поради наличие на канцерогенен ефект.

Полиненаситените мастни киселини (PUFA) заемат най-нисък дял от основните групи МК. Тяхното количество в овчето мляко варира от 7.98 g/100g мазнина през май до 7.39 g/100g мазнина през юни. В края на изследвания период са установени най-високите стойности от 8.31 g/100g мазнина.

Изомерите на линоловата киселина (C-18:2*cis*9,12; C-18:2*trans*9,12) намаляват по време на лактацията, α-линоленовата киселина през разглеждания период е сравнително ниска (0.17-0.13), а концентрацията на α-линоленовата киселина е сравнително постоянна величина и нараства през време на лактацията от 1.40 до 1.85 g/100g мазнина (Таблица 8).

Съдържанието на конюгираните мастни киселини (CLA) в изследваните млечни проби се влияе от сезона, респективно от качеството на ливадната трева (Таблица 8). Тяхното количество варира от 3.49 до 3.00 g/100g мазнина. От гледна точка на храненето значение имат само конфигурациите - cis9,trans11- и trans9, cis11 които представляват функционален хранителен компонент за предпазване от рак на дебелото черво и стомаха. Ненаситените дълговерижни мастни киселини заемат важно място в храненето на човека при лечение на коронарни и сърдечно-съдови заболявания (омега-3 и омега-6 мастни киселини).

in the 10 isomers studied decreased stepwise from May to July. A particular place in this regard is the vaccenic acid (C18:1trans11), which appears as a substrate for the synthesis of conjugated linoleic acids in the mammary gland by the action of the Δ9-desaturase enzyme. It decreased reliably in the milk from 4.21 to 2.75 g /100g fat. All trans-isomers except C-18:1t11 are considered as "undesirable", due to the presence of a carcinogenic effect.

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) occupy the lowest share of major fatty acid groups. Their amount in the ewe’s milk ranges from 7.98 g/100g fat in May to 7.39 g/100g fat in June. At the end of the investigated period the highest values of 8.31 g/100 g fat were found.

The linoleic acid isomers (C-18: 2cis9,12, C-18: 2trans9,12) decreased during the lactation, the α-linolenic acid was relatively low, over the considered period (0.17-0.13) and α-linolenic acid was relatively constant and increased during the lactation period from 1.40 to 1.85 g /100g fat (Table 8).

The content of conjugated fatty acids (CLA) in the studied milk samples is influenced by the season, respectively by the quality of meadow grass (Table 8). Their amount ranges from 3.49 to 3.00 g/100g fat. In terms of nutrition, only the configurations - cis9, trans11- and trans9,cis11 - which are important as functional nutritional component for prevention of colon and stomach cancer.

Unsaturated long-chain fatty acids occupy an important place in the human nutrition in the treatment of coronary and cardiovascular diseases (omega-3 and omega-6 fatty acids).

Таблица 8. Съдържание на полиненаситени мастни киселини в овчето мляко в зависимост от сезона (g/100g мазнина)
Table 8. Influence of the season on the content of polyunsaturated fatty acids in ewe's milk (g/100g fat)

ПНМК PUFA	**Май** May		**Юни** June		**Юли** July	
	x	sd	**x**	sd	**x**	sd
C-18:2tr9,12	0,78	0,096	0,61	0,003	0,72	0,014
C-18:2cis9;12	1,59	0,009	1,60	0,003	1,99	0,001
C-18:3cis6,9,12 (γ)	0,17	0,003	0,15	0,002	0,13	0,003
C-18:3cis9,12,15 (α)	1,40	0,050	1,42	0,001	1,85	0,003
C-18:4 c6,9,12,15	0,04	0,002	0,04	0,003	0,04	0,000
CLA-Z	0,02	0,001	0,02	0,000	0,03	0,007
CLA 9c,11t/8t,10c	**2,60**	0,078	**2,39**	0,002	**2,33**	0,001
CLA 11c,13t	0,04	0,007	0,03	0,009	0,02	0,008
CLA 10t,12c/11c,13t	0,05	0,012	0,01	0,003	0,01	0,001
CLA-11t,13c	0,12	0,007	0,12	0,000	0,13	0,003
CLAc9c11	0,11	0,009	0,10	0,009	0,12	0,038
CLAt11t13	0,05	0,054	0,08	0,005	0,08	0,003
CLAt9t11	0,46	0,011	0,20	0,004	0,24	0,003
C-20:4n6	0,13	0,005	0,13	0,003	0,15	0,002
C-20:5n3	0,11	0,002	0,12	0,003	0,13	0,004
C-22:5n3	0,16	0,01	0,17	0,011	0,17	0,021
C-22:6n3	0,06	0,007	0,08	0,021	0,10	0,017

Овчите млека са бедни на омега-3 мастни киселини. Тяхната концентрация на-раства от май до юли от 1.78 до 2.29 g/100g мазнина. Подобни зависимости са установени и при омега-6 мастните киселини – от 3.43 до 3.72 g/100g мазнина. Съотношението между двете групи мастни киселини варира от 1.93 до 1.62, което е указание че изслед-ваните млека са с нисък рисков фактор за здравето на човека (суровини и натурални храни, чийто фактор е <5 са с нисък рисков фактор).

Sheep milk is poor in omega-3 fatty acids. Their concentration increased from May to July from 1.78 to 2.29 g/100g fat. Similar dependencies were found in omega-6 fatty acids – from 3.43 to 3.72 g/100g fat. The ratio between two groups of fatty acids ranges from 1.93 to 1.62, indicating that the tested milk is a low risk factor for human health (raw materials and natural foods whose factor is <5 have a low risk factor).

ИЗВОДИ

Проведеното проучване върху мастнокиселинния състав на тревните асоциации в района на Средните Родопи показва, че с напредване на вегетацията се променя концентрацията

CONCLUSIONS

The study on the fatty acid composition of the grass associations in the region of the Middle Rhodopes showea that with advance of vegetation, the concentration of the major fatty acid

на основните групи мастни киселини, което води до стъпаловидно нарастване на количеството на наситените и мононенаситени мастни киселини с 14% респ. с 78% (SFA и MUFA) в сравнение с полиненаситените (PUFA). Проследени са в динамика промените на линоловата (C18:2cis9,12) и α-линоленовата киселина, които се явяват субстрат за синтезата на CLA (антиканцерогенно действие) в търбуха на преживните животни. Анализираните млека са с висока биологична стойност (високо съдържание на CLA, ω-3, ω-6 и ваксенова киселина). Овчето мляко от Каракачанската порода е важна суровина за производството на млечни продукти с повишена биологична стойност и храни с антиканцерогенно действие.

groups changes, resulting in a stepwise increase in the amount of saturated and monounsaturated fatty acids by 14% resp. 78% (SFA and MUFA) compared to polyunsaturated (PUFA). Dynamic changes in the linoleic (C18: 2 cis9,12) and alpha-linolenic acid, which are a substrate for CLA synthesis (anticancerogenic activity) in the rumen of ruminants, have been followed. Analyzed milk had a high biological value (high content of CLA, ω-3, ω-6 and vaccenic acid). Sheep's milk from the Karakachan breed is an important raw material for the production of dairy products with an increased biological value and foods with anticancerogenic action.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Angelow L.**, 1995. Spurenelementgehalt der Flora. Forschungsbericht, AvH-Stiftung, Bonn, Deutschland, pp. 1-28.

2. **Cabiddu A., M. Decandia, G. Molle, G. Pirna, M. Addis, S. Spada, A. Pirisi, G. Piredda**, 2003a. Effect of different pastures on CLA content in milk and sheep cheese. *Ital. J. Anim. Sci*., 2 (1), 518-520.

3. **Cabiddu A., G. Carta, G. Molle, M. Decandia, M. Addis, G. Piredda, A. Delogu, A. Pirisi, V. Lai, V. Cera, L. Taras, C. Lallai, S. Banni**, 2003b. Relationship between feeding regimen and content of conjugated linoleic acid in sheep milk and cheese, First Joint Seminar of sub-networks FAO-CIHEM on sheep and goat nutrition and mountain Mediterranein pastures, Spain, 2003, October 2-4

4. **Dario C, V. Laudadio, G. Bufano**, 1996. Caratterizzazione della pecora leccese. *Latte,* 20, 1266–1269.

5. **Fegeros K., G. Zervas, S. Stamouli, E. Apostolaki**, 1995. Nutritive Value of Dried Citrus Pulp and Its Effect on Milk Yield and Milk Composition of Lactating Ewes. *Journal of Dairy Science,* 5, 1116-1121.

6. **Kafedjiev V. and G. Mihailova**, 1998. Comparative study of yield, composition, properties and technological properties of milk of Zigay and Karakachan sheep breeds. III. Fatty acids composition of milk white brine sheep cheese. *Bulgarian Journal of Agricultural Science,* 4 (4), 505-510.

7. **Mihailova G.**, 2006. Biological value of fat in dairy cross breed sheep. *Agric. Sci.*, 3, 29-36. (Bg)

8. **Mihailova G., P. Moekel, V. Kafedjiev, G. Jahreis, Ts. Odjakova, L. Angelov**, 2004. Fatty acids in dairy products from ewe's milk. *Anim. Sci.,* 4, 38-46. (Bg)

9. **Mihailova G. and Ts. Odjakova**, 2006. Fatty acid profile of milk from sheep reared in the region of the central rodope mountains. *Ecology and Future*, 2, 21-24.

10. **Odjakova Tz., L. Angelow, P. Todorova, V. Kafedjiev, I. Petrova**, 2001. Seasonal dynamics of selenium in meadow grass from mountain and alpine pastures of the Rhodope and the Balkans. *Journal of Animal Scince*, 3, 221-225.

11. **Path J.**, 1995. Cheese making, Sheep Breed Coorp. Publ., Rio, WI, pp. 46-49
12. **Petrova N., L. Angelow, D. Todorova, D. Dochevski**, 1999. Influence of iodine and selenium deficiency on macro and trace element content of ewe's milk (Blackhead dairy breed). *Bulg. J. Agric. Sci.,* 5, 907-910.
13. **Petrova, N., D. Nedelchev, D. Todorova**, 1998. Milk yield and milk composition of the milk of Karakachan sheeps, *Animal Science*, 1, 86-92.
14. **Pirisi A., M. Addis, G. Piredda, M. Pes, S. Fures, S. Sprada, F. Tavera, S. Banni**, 2004. C18:2 9-cis, 11trans and its Precursors Concentration in intermediate and final products of the chesse making, IDF Symposiumon Cheese: Ripening, Characterization & Technology, 2004, March 21-25.
15. **Simos E. N., E. M. Nikolaou, P. E. Zoipoulos**, 1996. Yield, composition and certain physicochemical characteristics of milk of the Epirus mountain sheep breed. *Small Rumin. Res*., 20, 67-74.
16. **Tsvetkova V. and L. Angelow**, 2010. Influence of the season on the total lipids and fatty acid composition of grasses at the different altitudes in the region of the Middle Rhodopes. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 16, 478-753.
17. **Tsvetkova V. and L. Angelow**, 2013. Influence of botanical diversity in the natural and cultivated pastures on the lipid content and fatty acids composition of grass in the region of the Middle Rhodopes. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 19, 81-86.
18. **Bligh E., W. Dyer**, 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
19. **Piredda G., S. Banni, G. Carta, A. Pirisi, M. Addis, G. Molle**, 2002. Influenza dell'alimentazione al pascolo sui livelli di acido rumenico in latte e formaggio ovino. *Progress in Nutrition*, 4 (3), 231-235.
20. A.O.A.C, 17th edn, 2000 Official method 905.02 Fat in milk, Roese- Gottlieb Method, Reference Method 1973, 33.2.25
21. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin