Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (5), 1-9
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Ефективност от добавянето на биомаса от стрептомицети в дажбите за хранене на пилета

Игор Петку

Научно-практически биотехнологичен институт по зоотехника и ветеринарна медицина, Максимовка, Новоаненски район, Република Молдова

The Efficient Administration of Streptomyces Biomass in Chicken Nutrition Rations

Igor Petcu

The Scientific and Practical Institute of Biotechnologies in Zootechny and Veterinary Medicine, v. Maximovca, Anenii Noi district, Republic of *Moldova*
E-mail: petcu@rambler.ru

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Диетолозите трябва да използват фуражни добавки, съдържащи биологично активни вещества, които допринасят за по-високото усвояване на фуражите, доброто функциониране на организма и неговото здраве. Хранителните добавки за домашни птици се използват от няколко десетилетия и тяхната ефективност се проверява както с продуктивността, така и от тяхната икономическа производителност, която доказа теорията. В момента употребата им е насочена към използването на естествени продукти, като едновременно с това се елиминират биологично активни продукти от неорганичен произход, дори ако тяхната ефективност е значителна. Проучванията са насочени към изследване на въздействието от прилагане на биомаса от стрептомицети, използвани в хранителната дажба, като стимулатор на растежа с пробиотичен ефект при пилета от породата "Ломан Браун" специализирана в производството на яйца. Добавката на биомаса от стрептоми-

SUMMARY

Nutritionists need to use feed additives containing biologically active substances that contribute to higher assimilation of feed, the good functioning of the organism, and its health. In poultry feeding feed additives have been used for several decades and their efficiency has been verified both by their performance and by their economic efficiency that proved the truth.

Currently, their use is directed towards natural products, simultaneously eliminating biologically active products of inorganic origin, even if their efficiency is considerable. The research was aimed at investigating the effect of the administration of streptomyces biomass, used as a growth promoter with probiotic effect in the nutrition recipes for the feeding of the young poultry on the growth performance of Lohman Brown chickens, specialized for egg production.

Administration in the combined fodder recipes of streptomyces biomass in the

цети, в съотношение 0.1% в комбинираните фуражи, благоприятства за получаване на по-висок прираст с 10.7% и по-ниска консумация на фураж с 19.9% при пилетата от опитната група в сравнение с контролата.

Ключови думи: пилета, стрептомицети, пробиотици, наддаване на тегло, специфична консумация

proportion of 0.1% favored obtaining a higher weight gain of 10.7 % and lower specific consumption with 19.9 % in the chickens from the experimental group, compared to the chickens from the control group.

Key words: chickens, streptomyces biomass, probiotics, weight gain, specific consumption

УВОД

В световен мащаб, продуктите от домашни птици са завоювали много важно място сред храната от животински произход, поради хранителните им качества и намалените разходи в сравнение с други източници на животински протеин, но също така и поради широката гама от преработени птични продукти, които са високо ценени от съвременните хора.

Тъй като изхранването държи главния дял за производствените разходи в птицевъдството, диетолозите имат задачата да намерят нови начини за да ги намалят, с цел да се повиши икономическата ефективност в този отрасъл.

През последните десетилетия, в света се предприемат все повече изследвания за използването на биостимулиращи продукти, за да се увеличи растежът, развитието и подобряването на преработката на фуражите за пилета, както и да се запази тяхното здравословно състояние и получаване висококачествени продукти (Toderash, 2000).

Усилията понастоящем са насочени към получаване на най-естествените продукти. Във връзка с това, няколко добавки са премахнати от пазара, въпреки че тяхната икономическа ефективност е значителна (Rastenishina and Deliu, 2005).

Новото поколение добавки, използвани при храненето на домашни птици, включва стимулатори на растежа с растителен произход, а някои от тях са микробиологични продукти (Burtsev, 1998; Usatyj, 2001).

INTRODUCTION

Worldwide the poultry products have gained a very important position among the food of animal origin consumed by humans due to its nutritional qualities and reduced costs compared to other sources of animal protein, but also due to the wide range of processed poultry products that are highly appreciated by modern humans.

Because nutrition holds the majority share in the expenses of exploitation of poultry farming, nutritionists are tasked with finding new ways to reduce these costs to increase the economic efficiency in this zootechnical branch.

In recent decades more and more research has been undertaken worldwide on the use of biostimulatory products as feedstuffs in order to increase the growth, development and improvement of the conversion of feed to chickens, as well as to preserve their health condition and the aim of obtaining high quality products (Toderash, 2000).

Now, their use is directed to obtain the most natural products. In this respect a few additives have been removed from the market even though their economic efficiency is considerable (Rastenishina and Deliu, 2005).

The new generation of additives used in poultry nutrition includes growth promoters that have a plant origin, and some of them are microbiological products (Burtsev, 1998; Usatyj, 2001).

Добавка от биомаса със стрептомицети е с микробиологичен произход. Тя се произвежда в условията на нашата република. Биомасата се произвежда от прокариотни организми с характеристики, подобни на микроскопичните гъби, които произвеждат биологично активни вещества с бактерициден ефект, които намират приложение в зоотехническия сектор (Burtsev et al., 1994; Butrsev and Usatyj, 1996; Burtsev et al., 1996).

An additive of microbiological origin is streptomyces biomass that is produced under the conditions of our republic. The biomass is produced by prokaryotic organisms with characteristics similar to microscopic fungi, which produce biologically active substances and with bactericidal effect that find their use in the zootechnical sector (Burtsev et al., 1994; Butrsev and Usatyj, 1996; Burtsev et al., 1996).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е започнато, за да се определи ефективността на биомасата от стрептомицети върху растежа на хибридни пилета от порода "Ломан браун". Изследователските цели са:

- установяване на динамиката на телесното тегло при пилетата в експеримента;
- установяване на среднодневния прираст на пилетата в експеримента;
- определяне на специфичното потребление;
- наблюдение на поддържането на стадото.

Изследванията предприети по отношение на влиянието на биомасата от стрептомицети върху растежа на пилета от порода "Ломан браун", специализирани в производството на яйца, са организирани в поредица от експерименти в рамките на Научно-практически биотехнологичен институт по зоотехника и ветеринарна медицина.

Биологичният материал е взет от пилетата от посочения хибрид на еднодневна възраст.

Изследването е проведено върху 50 пилета от хибрид "Ломан браун", които са разпределени на случаен принцип в две партиди от по 25 пилета.

Изследването продължи 49 дни.

За да се установи ефективността на растеж, пилетата sa поставени по групи в клетки. Микроклиматът и хигиенните условия са осигурени съглас-

MATERIAL AND METHODS

The study was initiated to determine the efficiency of streptomyces biomass administration on the growth performance of Lohman Brown hybrid chickens, and as research objectives were:

- establishing the dynamics of body weight in the chickens in the experiment;
- establishing the average daily increase in the chicks in the experiment;
- determining the specific consumption;
- monitoring the maintenance of the herd.

The researches undertaken regarding the influence of the streptomycete biomass on the growth performance of the commercial chicken Lohman Brown specialized in egg production were organized in a series of experiments within the Scientific and Practical Institute of Biotechnologies in Zootechnics and Veterinary Medicine.

The biological material that was worked on was represented by the chickens of the nominated hybrid one day old.

The research was carried out on a lot of 50 chickens of the Lohman Brown commercial hybrid, which were randomly distributed in two batches of 25 chickens each.

The research duration lasted 49 days.

In order to establish the growth performance were created conditions by which the chickens were placed in batteries with cages. The microclimate and hygienic

но правилата, предвидени за тази категория и възможно най-близо до нормалните условия на експлоатация в птицевъдните ферми.

Разпределението на фуража се извърши ръчно и водата се подава в съдове с постоянно ниво.

Първичните данни, получени от проведеното изследване, са обработени чрез статистически методи, чрез електронно изчисление с определяне на критерия за автентичност.

Изследването е извършено по следния начин (Таблица 1).

conditions were ensured according to the rules provided for this category and as close as possible to the normal conditions of exploitation in the poultry units.

The feed distribution was done manually and the water was supplied in vessels with a constant level.

The primary data obtained from the research carried out were processed by biostatistical methods using the electronic calculation application with the determination of the criterion of authenticity.

The research was build according to the following scheme (Table 1).

Таблица 1. Експериментална схема
Table 1. Experience scheme

Групи Batches	Биологичен материал Biological material	Бр. глави Number of heads	Фуражна характеристика Feeding characteristics
Контролна Control group	Пилета на 1 ден chickens 1 day old	25	Комбиниран фураж Combined feed (CF)
Експериментална Experimental group	Пилета на 1 ден chickens 1 day old	25	CF + 0,1% стрептомицети streptomyces biomass

Нивата на енергия и протеини в рецептите за комбинирани фуражи, предоставяни на изследваните пилета се различават в зависимост от възрастта.

На пилетата е даден комбиниран фураж, който задоволява нуждите им от енергия и протеини, както и от други хранителни вещества, според възрастта.

Структурата на рецептите за хранене на пилетата в експеримента са представени в Таблици 2 и 3.

The energy and protein levels of the combined feed recipes provided to the studied chickens were also different according to age.

The chickens were given combined feed recipes that provided their energy and protein needs, as well as the other nutrients, according to age.

The structure of recipes for the feeding of the chickens in the experiment is presented in Tables 2 and 3.

Таблица 2. Хранителна схема и стойност на рецептата в експеримента (0-21 дни)
Table 2. Nutritive structure and value of the recipe from experiment (0-21 days)

Характеристика/Specification	Процентно участие/Inclusion rate %
Царевица/Corn	53,2
Пшеница/Wheat	10,0
Слънчогледов шрот/Sunflower groats	2,0
Соев шрот/Soy groats	27
Рибно брашно/Fish flour	3,0
Мазнини/Fat	1,0
Смеска/Premix	2,0
Монокалциев фосфат/Monocalcium phosphate	1,8
Общо/TOTAL	**100**
ME, kcal / kg feed	2835
Суров протеин/Crude protein,%	21,4
Целулоза/Cellulose,%	2,9

Таблица 3. Хранителна схема и стойност на рецептата в експеримента (22-49 days)
Table 3. Nutritive structure and value of the recipe from experiment (22-49 days)

Характеристика/Specification	Процентно участие/Inclusion rate %
Царевица/Corn	48,0
Пшеница/Wheat	20,0
Слънчогледов шрот/Sunflower groats	4,0
Соев шрот/Soy groats	20,0
Рибно брашно/Fish flour	3,0
Мазнини/Fat	1,0
Смески/Premix	2,0
Монокалциев фосфот/Monocalcium phosphate	2,0
Общо/TOTAL	**100**
ME, kcal / kg feed	2692
Суров протеин/Crude protein,%	19,3
Целулоза/Cellulose,%	3,2

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

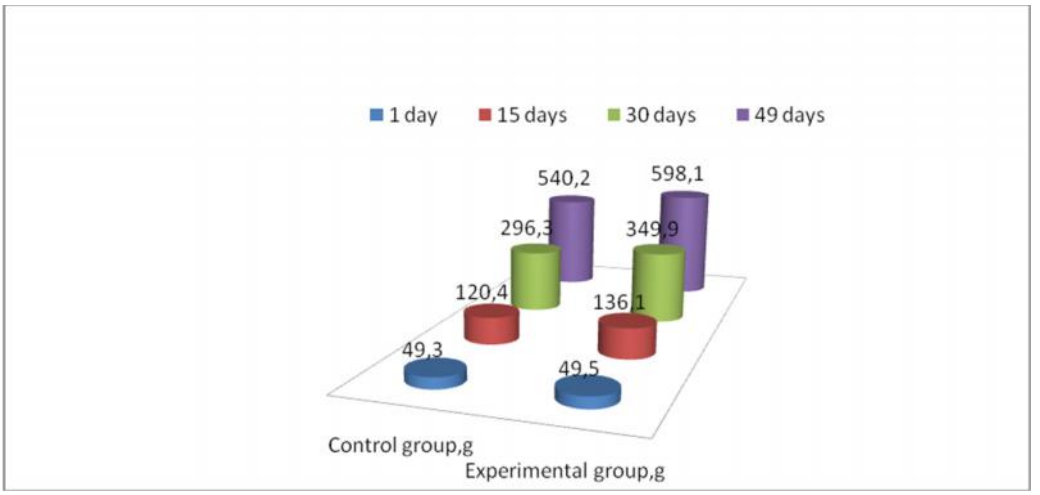
Една от основните цели на изследванията е подобряването на телесното тегло на пилетата, което показва степента на развитие на пилетата и е в корелация с количеството и качеството на приложените фуражи.

Динамиката в телесното тегло е по-голяма при пилета, на които е дадена биомаса от стрептомицети и нейното развитие е показано на Фигура 1.

RESULTS AND DISCUSSION

One of the basic objectives of the investigations is the evolution of the body weight of the chickens in the experiment, which indicates the degree of development of the chickens and is in correlation with the quantity and quality of the administered feeds.

What is related to the dynamics of body weight has been established that these were larger in the experimental group of chickens that are given biomass of streptomyces and its evolution is shown in Figure 1.



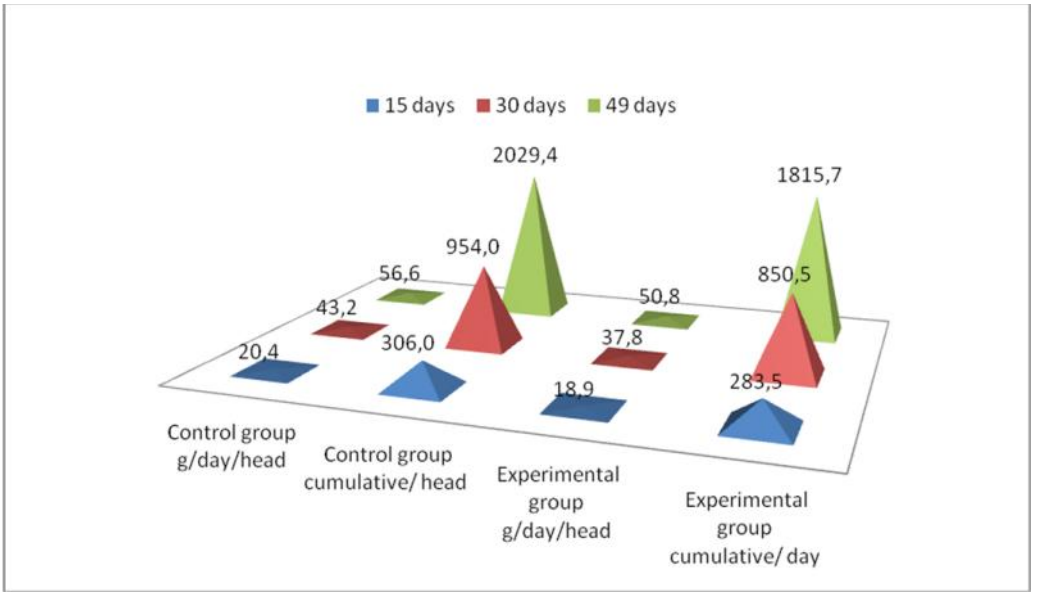
Фиг. 1. Покачване на телесното тегло на пилетата в експеримента
Fig. 1. Evolution of the body weight of the chickens in the experiment

От данните, представени на фигурата по-горе, и в резултат на претеглянето на пилетата в контролната и експерименталната група се установи, че телесното тегло се променя по различен начин и в двете групи. Телесното тегло на пилетата от контролната група на 15, 30 и на 49 дни, съответно е 120.4 g, 296.3 g и 540.2 g. При пилетата от експерименталната група, телесното тегло на 15 дни е 136.1 g, на 30 дни е 349.9 g, а на 49 дни телесното тегло достига 598.1 g.

Показател, който значително влияе върху ефективността в отглеждането на пилета, е консумацията на фураж, която също е оценена по различен начин в периода на изследванията, а стойностите му са показани на Фигура 2.

From the data presented in the figure above, and as a result of weighing the chickens in the control and experimental groups, it was established that body weight evolved differently in both groups. Thus, the body weight of the chickens from the control group constituted at 15, at 30 and at 49 days, respectively 120.4 g, 296.3 g and 540.2 g. In the chickens from the experimental group, the body weight at 15 days was 136.1 g, at 30 days it was 349.9 g, and at 49 days the body weight reached 598.1 g.

An indicator that significantly influences the efficiency of the grows of chickens is the consumption of feed, which also evaluated differently during the investigations, and its values are shown in Figure 2.



Фиг. 2. Промяна в консумацията на фуражи при пилетата в експеримента
Fig. 2. Evolution of feed consumption of chickens in the experiment

Резултатите, представени на тази фигура, показват, че средният дневен прием на фураж при пилета от контролната група на възраст от 15 дни е 20.4 g, на 30 дни е 43.2 g, а на 49 дни е 56.6 g. В експерименталната група,

The results presented in this figure show that the average of daily feed intake in the chickens from the control group at 15 days constituted 20.4 g, at 30 days it was 43.2 g, and at 49 days it amounted to 56.6 g. In the same context, in the chickens from the experimental group at 15, 30 and

при пилета на възраст от 15, 30 и 49 дни, средната дневна консумация на фураж е съответно 18.9 g, 37.8 g и 50.8 g. За изследвания период, пилетата от контролната група консумират 2029.4 g фураж, докато тези от експерименталната група консумират само 1815.7 g фураж, което представлява по-нисък разход на фураж с 10.5% в сравнение с контролната група.

Въз основа на резултатите, представени по-горе, са изчислени други показатели за изследването, и общите резултати от изследванията са представени по-долу (Таблица 4).

49 days, the average daily feed consumption was 18.9 g, 37.8 g and 50.8 g, respectively. Cumulated for the investigated period, the chickens from the control group consumed 2029.4 g of feed, while the chickens from the experimental group consumed only 1815.7 g of feed, which represents a lower feed consumption with 10.5% comparatively to the control group.

Based on the results presented above, the other indices proposed for the research were determined and the totalized results of the investigations are presented below (Table 4).

Таблица 4. Резултати от хранителния прием на биомаса от стрептомицети в пилешки фураж за кокошки

Table 4. Results of the feeding of streptomyces biomass in the chicken feed for hens

No група Nr. gr.	Групи/Batches	Телесно тегло на 49 дни Body weight at age 49 days		Дневен прираст Daily boost		Ръст на потребление Specific consumption rate		% експлоатация of maintenance
		g	%	g	%	kg	%	
1	Контролна/Control group	540,2± 5,1	100	10,0	100	4,13	100	100
2	Експериментална/Experimental group	598,1 ± 6,0*	110,7	11,2	112,0	3,31	80,1	100

Въз основа на данните, представени в таблицата по-горе, може да се направи заключение, че пилетата от експерименталната група отчитат разлика от плюс 10.7% в телесно тегло в сравнение с пилетата от контролната група.

Освен това, среднодневния прираст на пилетата от експерименталната група е с 12.0% повече в сравнение с пилетата от контролната група.

Резултатите от изследванията показват, че фуражите се консумират по-ефективно от пилетата от експерименталната група, при които показателите за специфичното потребление са по-ниски с 19.9% в сравнение с тези от контролната група.

Based on the data presented in the table above, we can mention that the chickens from the experimental group recorded a difference of plus 10.7% in body weight compared to the chickens from the control group.

We can also mention that the average daily increase in the chickens from the experimental group was 12.0% higher, compared to the chicks from the control group.

The results of the investigations show that the feed was consumed more efficiently by the chickens from the experimental group, in which the indices of specific consumption was lower with 19.9% compared to the chickens from the control group.

ИЗВОДИ

Въз основа на резултатите от изследванията са направени редица заключения, обобщени по-долу:

1. Пилетата от експеримента реагират значително на хранителен режим с биомаса от стрептомицети, която увеличава ефективността на растежа и същевременно понижава консумацията на фураж, което трябва да се вземе предвид от птицевъдите;

2. Пилетата в експеримента не са попадали в стресови ситуации и се адаптират добре към прилагания препарат;

3. Прилагането на биомаса от стрептомицети в комбинираните фуражи благоприятства за получаване на по-висок прираст с 10.7%, а консумацията на фураж е по-ниска с 19.9% при пилетата от експерименталната група в сравнение с тези от контролната група.

CONCLUSIONS

On the basis of the results of the investigations were drawn a number of conclusions the summary of which is presented below:

1. The chickens from the experiment responded significantly to the inclusion in the nutrition recipes of the streptomyces biomass, by increasing the growth performance while decreasing the consumption of feed, which needs to be taken into consideration by the poultry farmers;

2. The chickens in the experiment did not present stressful situations and are adapting well to the administered preparation;

3. The administration in the combined feed recipe of the streptomyces biomass favored a higher weight gain by 10.7% and a specific consumption lower by 19.9% in the chickens of the experimental group compared to the chickens of the control group.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Burtsev, S., A. Usatyj, T. Shirshov, E. Crepis, A. Kalkatiniuk and I. Syrbu, 1994. Characteristic of New Strains of Streptomyces - Active Producers of Lipids. *Bulletin of Academy of Sciences of Republic of Moldova, Biological and chemical sciences,* 5, pp. 21-24.

2. **Burtsev, S. and A. Usatyj**, 1994. Study on the Natural Variability of Streptomyces - Producers of Bioactive Substances. In: Theses of the international scientific conference "Current problems of genetics, biotechnology and breeding", Chisinau, pp. 58.

3. **Burtsev, S. and A. Usatyj**, 1996. Variability of Spontaneous Forms of Streptomyces sp. 36 Strain - Producing Bioactive Substances*. Bulletin of Academy of Sciences of Republic of Moldova, Biological and chemical sciences,* 1, pp. 18-20.

4. **Burtsev, S. and A. Usatyj**, 1996. Population heterogeneity of Streptomyces sp.36 - producer of substances with antibiotic properties.*Bulletin of Academy of Sciences of Republic of Moldova, Biological and chemical sciences,* 2, pp.18-23.

5. **Burtsev, S., I. Rastimeshina and E. Deliu**, 1996. Composition of Amino Acids and Nutritional Value of Protein Streptomyces sp. 36. In: The 3rd National Conference "Microorganisms and their metabolites in the national economy", 26-27 Sep. 1996, Chisinau, pp. 3.

6. Burtsev, S., A. Usatyj and T. Shirshov, 1996. The Action of the Streptomyces sp. 36 Metabolite Complex on Broiler Growth. In: The 3rd National Conference "Microorganisms and their metabolites in the national economy", 26-27 Sep 1996, Chisinau, pp. 69.

7. **Burtsev, S.**, 1998. Study on the Practical Use of Streptomyces sp. 36 Products in Poultry Farming. Stored at I.C.S.D.I.T.E., 1584-M98, pp. 7.

8. **Rastimeshina, I. and E. Deliu**, 2005. Composition of Amino Acids in Streptomyces sp. 36. *Bulletin of Academy of Sciences of Republic of Moldova. Biological and chemical sciences.* 2, pp. 64-68.
9. **Toderash, A.**, 2000. The Physiologic-biochemical and Biotechnological Peculiarities of Streptomyces Massasporeus 36 Strain as a Producer of Biologically Active Substances. Autoref. PhD thesis in biological sciences, pp. 21.
10. **Usatyj, A.**, 2001. The Efficiency of the Use of Microbial Preparations in Poultry Farming. *Express-information*, Chisinau, pp. 14.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (5), 10-27 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Традиционна косовска наденица: умишлена или неволна фалшификация с пилешко месо

Валдет Гжиновчи[1,2]*, Влора Зогежани[2], Дафина Мехметукай[2], Дрита Байрактари[2], Арменд Кана[2]

[1]Университет на Митровица, Факултет по хранителни технологии, 40000 Митровица, Косово
[2]Ветеринарна и хранителна лаборатория, Косовската агенция по храните и ветеринарство, 10000 Прищина, Косово

Traditional Kosovo Sausage: Intentional or Unintentional Adulteration with Chicken Meat

Valdet Gjinovci[1,2]*, Vlora Zogejani[2], Dafina Mehmetukaj[2], Drita Bajraktari[2], Armend Cana[2]

[1]University of Mitrovica, Faculty of Food Technology, 40000 Mitrovica, Kosovo
[2]Food and Veterinary Laboratory, Kosovo Food and Veterinary Agency, 10000 Prishtina, Kosovo
**E-mail: valdet.gjinovci@umib.net; valdetgjinovci@gmail.com*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Традиционната наденица в Косово се приготвя само от говеждо месо с добавка на сол, черен пипер, лук и естествена обвивка от говежди черва. Не съдържа слепващи вещества, пълнители и добавки. Наденицата е податлива мишена за фалшификация с частичната замяна на говеждото месо с по-евтини меса. Целта на настоящото изследване е да се установи фалшификацията на традиционната наденица чрез използване на PCR в реално време и определяне на мастно-киселинния профил с масова спектрометрия на газова хроматография (GC-MS). Подбрани са двадесет и два вида наденици от индустриални и малки производители, с етикет посочващ, че съдържат само телешко, директно от производствените обекти. Пробите са предоставени на лаборатория по ветеринарна експертиза и хра-

SUMMARY

Traditional sausage in Kosovo is made only from beef ground meat with addition of salt, pepper, onions and natural bovine intestine casing. It does not contain binders, fillers and extenders. Sausage is a susceptible target for fraudulent adulteration with the partial replacement of beef meat with cheaper meats. The aim of the present study was to identify meat species adulteration of traditional sausage by using real-time PCR and by determination of the fatty acid profile with Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Twenty-two sausages labelled as only beef were collected from industrial and small scale producers directly at the production site during September 2019 and submitted to the Kosovo Food and Veterinary Laboratory. Calibration curve

ните. Калибриращата крива на GC-MS метода за линолова и стеаринова киселина се извършва чрез смесване на смляно говеждо месо с 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 и 80% пилешко обезкостено месо.

Всички проби са отрицателни при PCR в реално време за свинско месо и месо от кон/магаре. Тринадесет от 22 проби (59%) са положителни за пилешката ДНК при PCR в реално време, но само 3 проби надвишават границата за количествено определяне на линолова киселина за пилешко месо чрез GC/MS, като индикация за съществено фалшифициране. Въз основа на официални проверки, всички производители на 13 положителни проби преработват пилешки продукти в едни и същи месни фабрики.

Настоящото проучване, базирано на силно чувствителен PCR метод и профил на мастните киселини изследвани чрез GC-MS, показва, че фалшифицирането на традиционните косовски колбаси с пилешко месо е често срещано, но в повечето случаи това може да бъде нежелана/инцидентна фалшификация поради преработката на пилешко и говеждо месо в едни и същи месни преработвателни фабрики.

Ключови думи: Косовска наденица, пилешки примеси, PCR, GC-MS, линолова киселина

of GC-MS method for linoleic and stearic acid is done by mixing beef ground meat with 7, 10, 20, 30, 50, 70 and 80% of chicken MDM.

All samples were negative on Real-time PCR for pork and horse/donkey. Thirteen out 22 samples (59%) were positive for chicken DNA on real-time PCR, but only 3 samples exceeded the quantification limit of linoleic acid for chicken meat on GC/MS, as an indication of substantial adulteration.

Based on official inspections, all producers of 13 positive samples process chicken products in the same meat plants.

Present study, based on highly sensitive PCR method and fatty acid profile by GC-MS, indicates that adulteration of traditional Kosovar sausages with chicken is common, but most commonly it could be unwanted/incidental adulteration due to the processing of chicken and beef meat in the same meat plants.

Key words: Kosovar sausage, chicken adulteration, PCR, GC-MS, linoleic acid

УВОД

Традиционният занаятчийски колбас „суджук“ в Косово се произвежда единствено от говеждо месо с добавка на съставки като сол, Алеппо пипер и лук, в естествена обвивка от говежди черва. Не съдържа слепващи вещества, пълнители и добавки. Опушва се в пушилня от една нощ до няколко дни. Обикновено не съдържа месо от други видове. Някои дребни семейни фирми наскоро се развиха в големи производители на традиционни колбаси. Въздействието на пазарната конкурентоспособност върху косовската месна промишленост, засили натиска върху цената и впоследствие се отрази върху

INTRODUCTION

Traditional artisanal sausage “suxhuk” in Kosovo is manufactured solely form the beef ground meat with addition of ingredients such as salt, Aleppo-style pepper and onions, in natural casing using bovine intestine. It does not contain binders, fillers and extenders. It is smoked in smokehouse depending from overnight to several days. Usually it does not contain meat from any other species. Some artisanal small-scale family businesses recently evolved on large-scale producers of traditional sausages. The impact of market competitiveness on Kosovo meat industry increased pressure on price and subsequently taking toll on

качеството. Преработените месни продукти са обект на измама при етикирането. Продажбата на по-евтини меса, като частични или пълни заместители на такива с висока стойност, като например заместване или смесване на говеждото месо с по-евтино свинско, конско или пилешко обезкостено месо като основа за пилешки салам е много разпространена (FSAI, March 2013; Pinto et al., 2015; Keyvan et al., 2017; Al-Qassab et al., 2019). Погрешното етикетиране е санкционирано от националните наредби на Косово за етикетиране, представяне и реклама и хранителни продукти - (MTI) - № 09/2013 (Министерство на търговията и промишлеността, 2013 г.), както и от европейския регламент (eu) № 1169/2011 на Европейския парламент и на Съвета от 25 октомври 2011 г. (EUROPEAN, 2011.). Освен умишлено фалшифициране, инцидентното фалшифициране по хранителната верига също представлява важен въпрос, който трябва да бъде разгледан. Много от дребните производители на традиционни колбаси произвеждат също пилешки салам или смесени говежди пилешки продукти. Някои производители нямат отделни линии и използват едни и същи помещения и оборудване. Това може да доведе до „кръстосано замърсяване“ с пилешко месо на продукти, обозначени като само говежди. Следователно има нужда от количествен анализ, за да се направи разлика между умишлено и неволно подправяне поради технологични грешки. Прилагането на разпоредбите за етикетиране изисква надеждни аналитични методи. Качественото откриване на недекларирано месо в продуктите е сравнително лесно чрез използване на различни методи като митохондриална или геномна ДНК или анализ на ДНК биочип (Ballin et al., 2009; Iwobi et al., 2011; Gecaj et al., 2018), което позволява едновременна обработка на много месни продукти, с много ниска граница на откриване, обикновено под 0,01%.

quality. Processed-meat products are highly susceptible targets for economically motivated fraudulent labelling. Selling cheaper meats as partial or total replacements for high-value ones, such as replacement/mixing of beef meat with cheaper pork, horse or chicken mechanically deboned meat (MDM) as basis for chicken salami has been very common (FSAI, March 2013; Pinto et al., 2015; Keyvan et al., 2017; Al-Qassab et al., 2019). Mislabelling is sanctioned by the Kosovo national regulation on labelling, presentation and advertising and food products - (MTI) - No. 09/2013 (Ministry of Trade and Industry, 2013), as well as European regulation (eu) no 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 (EUROPEAN, 2011).

Besides intentional adulteration, incidental adulteration along the food chain represents an important issue to be addressed. Many of small-scale producers of traditional sausage produce also chicken salami or mixed beef chicken products. Some producers do not have separate lines and they use the same premises and equipment.

This may result in “cross-contamination” of products labelled as only beef with chicken. Therefore, there is a need for quantitative analysis in order to discriminate between intentional and unintentional adulteration due to the technological mistakes. Enforcement of labelling regulations requires reliable analytical methods.

Qualitative detection of undeclared meat in products is relatively straightforward by using different methods like mitochondrial or genomic DNA, or DNA biochip analysis (Ballin et al., 2009; Iwobi et al., 2011; Gecaj et al., 2018) that allows simultaneous processing of many meat products, with very low limit of detection, usually below 0.01%. These methods have considerable

Тези методи имат значителни предимства в сравнение с други, базирани на протеинови фракции, като например хроматографски и имунологични техники (Vallejo-Cordoba et al., 2005; Kumaret al., 2013; Alikord, et al., 2017). Имунологичните методи се основават на антитела, изправени срещу устойчиви на топлина, специфични за вида, свързани с мускулите гликопротеини (ELISA), макар и с недостатъци по отношение на пробите с негодна храна, в които ДНК фрагментите все още могат да бъдат надеждно амплифицирани. Количественото определяне при обстоятелства, при които неизвестни месни части се използват в преработени меса е предизвикателство. Повечето техники, базирани на ДНК, са качествени. Количественото определяне въз основа на митохондриална ДНК е ненадеждно поради високата вариация, специфична за тъканите, но е описан количествен анализ на генома на различни видове в месото чрез капково-цифров PCR, базиран на геномна ДНК (Floren et al., 2015). Като алтернатива е определен профила на мастните киселини от различни видове животински мазнини въз основа на GC-MS метод. Съотношението между линолова и стеаринова киселина е един от най-важните показатели за смеската от пилешко и говеждо месо (Frank et al., 2002; Pop et al., 2010; Ahmad Nizar et al., 2013; Guntarti et al., 2019).

Целта на настоящето проучване е да се изследва въпросът за умишленото и неволно подправяне на традиционните косовски колбаси по отношение на неправилното етикетиране, като се използват едновременно два метода, качествен анализ чрез PCR в реално време и определяне на профила на мастните киселини чрез GC-MS.

advantages compared to methods based on protein fractions like electrophoretic, chromatographic and immunological techniques (Vallejo-Cordoba et al., 2005; Kumaret al., 2013; Alikord, et al., 2017).

Immunological methods are based on antibodies raised against heat-resistant, species-specific, muscle-related glycol-proteins (ELISA), albeit with shortcomings with regard to often highly denatured food samples in which DNA fragments may still be reliably amplified.

Quantification under circumstances were unknown meat parts are used in processed meats is challenging. Most DNA based techniques are qualitative.

Quantification based on mtDNA is unreliable due to the high tissue-specific variation, but genome/genome quantitative analysis of different species in meat using droplet digital PCR based on genomic DNA has been described (Floren et al., 2015).

Alternatively, determination of fatty acid profile from animal fat from different species based on GC-MS method has been used. The ratio between linoleic and stearic acid is one of the most important indicators of chicken-beef composition (Frank et al., 2002; Pop et al., 2010; Ahmad Nizar et al., 2013; Guntarti et al., 2019).

The aim of this study is to elaborate the issue of intentional and unintentional adulteration in traditional Kosovan sausage with regard to mislabelling by using simultaneously two methods, qualitative analysis by real-time PCR and determination of fatty acid profile by GC-MS.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Вземане на проби

Двадесет и две проби от 7 индустриални производители са събрани ди-

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Twenty-two samples from 7 industrial producers were collected

ректно на производствената площадка или на пазара от компетентните национални органи на страната през август и септември 2019 г. и са предадени на Косовската ветеринарна и хранителна лаборатория (KFVL) за тестване. Всички тези продукти са етикетирани като говеждо месо. Наличието на пилешко вещество не е декларирано в нито един от тях. Освен това са събрани 7 проби от традиционни колбаси от малък семеен бизнес. Малките предприятия произвеждат малко количество колбаси по традиционни методи само с говеждо месо и без да се преработва пилешко месо в техните цехове. Всяка проба, съдържаща 250 g, се разделя на две части, за молекулярно и химично тестване. Пробите се държат при 4°C до по-нататъшно тестване. Всички помещения на производителите са инспектирани от официални ветеринарни инспектори.

Седем проби от традиционни колбаси от малък семеен бизнес, тествани като отрицателни за пилешко вещество чрез PCR в реално време, са използвани като телешка субстанция за смесване с пилешко обезкостено месо в различни пропорции за валидиране на методите, както е показано в Таблица 2 и Фигури 1 и 2.

PCR в реално време

ДНК екстракцията се извършва чрез DNeay Mericon Food Kit Qiagen®, който използва модифициран метод на екстракция на цетилтриметиламониев бромид (CTAB). Екстракцията (с изключение на валидиращите проби) се извършва съгласно стандартния протокол на производителя (200 mg). Изходно количество от 200 mg проба е използвано в дублирани Eppendorf епруветки за да се получи достатъчно количество супернатант. Във всяка епруветка за микроцентрофуга се добавят по едно зърно от неръждаема стомана и 1 ml TLA буфер. Пробите са разтърсени от TissuLyser II Qiagen®, 30 трептения/сек за 30 секунди. За валидиране на проби, смесването се извърши в отделна среда

directly at the production site or in the market by the country's competent national authorities during August and September 2019 and submitted to the Kosovo Food and veterinary Laboratory (KFVL) for testing. All these products were labelled as a beef. The presence of chicken matter was not declared in any of these products. Additionally 7 samples of traditional sausages from small family businesses were collected.

These small businesses produce small amount of sausage based on traditional methods with only beef meat and no chicken meat processed in their plants. Each sample containing 250 g was divided in two parts, for molecular and chemistry testing each. Samples were kept at 4° C till further testing. All producer premises were inspected by official veterinary inspectors.

Seven samples of traditional sausages from small family businesses tested as negative for chicken matter by means of real-time PCR were used as a beef matrix for mixing with chicken MDM in different proportions for validation of methods as shown in Table 2 and Figures 1 and 2.

Real-time PCR

DNA extraction was performed by using DNeay Mericon Food Kit Qiagen® which uses modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction method. Extraction (excluding for validation samples) was performed according to the manufacturer's standard Protocol (200 mg). Starting amount 200 mg of sample was used in duplicate Eppendorf tubes in order to get sufficient amount of supernatant. One stainless steel bead and 1ml of tissue lysis buffer was added into each microcentrifuge tube.

Samples were ruptured by TissuLyser II Qiagen®, 30 oscillation/sec for 30 sec. For validation samples, mixing was performed in separate environment with

със стомахерни торбички. Използвано е общо количество от 10 g смес от проби (Фигура 2) и 50 ml TLA буфер, за да се запази същата пропорция на изходната проба и лизисния буфер. Трябва да се внимава за да се избегне кръстосано замърсяване с пилешко вещество. Смесването се осъществява като се започне от най-малкия до най-високия % пилешко вещество и след всяко смесване стомахерната машина се обеззаразява с РНК и ДНК обеззаразяващо средство, Thermo Scientific ™. След това се взема 1 ml смес, както е посочено в протокола за екстракция, като предварително се добавя 2,5 µl протеиназа К във всяка епруветка. Пробите се инкубират в термомесител с постоянно разклащане (1000 rpm) при 60°C в продължение на 30 минути. След инкубация, пробите се адаптират към стайна температура за 10 минути и след това за кратко върху лед след инкубацията. След това пробите се центрофугират в продължение на 5 минути при 2000 x g. 700 µl супернатант бе събран от двата дубликата на микроцентрофужните епруветки и е прехвърлени в 2 ml микроцентрофужни епруветки, съдържащи 500 µl хлороформ от фирма Fischer Chemicals. Получената смес се смесва чрез завихряне за 15 s и се центрофугира при 14 000 x g за 15 минути. След това се добавят 350 µl PB буфер и 350 µl от горната смеска в 2 ml микроцентрофужна епруветка, като се смесват старателно чрез завихряне. Сместа се прехвърля в QIAquick микроцентрофужна колона, поставена в 2 ml епруветка, центрофугира се при 16 100 x g за 1 min и преливащата течност се изхвърля. След това 500 µl буфер AW2 се поставя в QIAquick микроцентрофужната колонка, центрофугира се при 16,100 xg в продължение на 1 минута и преливащата течност се изхвърля. Етапът на центрофугиране се повтаря отново при 16,100 xg за 1 min, за да изсъхне мембраната. Микроцентрофуж-

stomacher bags by using total amount of 10 g of samples mixture (Figure 2) and 50 ml of lysis buffer in order to keep the same proportion of starting sample and lysis buffer. Care was taken in order to avoid cross-contamination with chicken matter, thus mixing was performed from smallest to highest % of chicken matter and after each mixing stomacher machine was decontaminated with RNase and DNA decontaminant, Thermo Scientific™.

Afterwards, 1ml of mixture was taken and preceded as indicated in extraction protocol by adding 2.5µl of proteinase K into each tube. Samples were incubated in thermomixer with constant shaking (1000 rpm) at 60°C for 30 min.

After incubation, samples were adapted to room temperature for 10 min and then briefly on ice after incubation.

Afterwards, samples were centrifuged for 5 min at 2000 x g. 700 µl of supernatant was collected from both duplicates of microcentrifuge tubes and was transferred into 2ml microcentrifuge tubes containing 500 µl of chloroform from Fischer Chemicals.

The resulting mixture was mixed by vortexing for 15 s and centrifuged at 14,000 x g for 15 min. Than into a fresh 2 ml microcentrifuge tube 350 µl of Buffer PB and 350 µl of the upper, aqueous phase were added and mixed thoroughly by vortexing. The mixture was transferred into the QIAquick spin column placed in a 2 ml collection tube, centrifuged at 16,100 x g for 1 min and the flow-through discarded.

Afterwards, 500 µl Buffer AW2 was applied into QIAquick spin column, centrifuged at 16,100 x g for 1 min and flow-through was discarded.

Centrifuging step was repeated again at 16,100 x g for 1 min to dry the membrane. The QIAquick spin columns were

ните QIAquick се прехвърлят в епруветки за микроцентрофугиране от 1,5 ml и 150 µl EB буфер се нанасят директно върху мембраната QIAquick. Инкубира се за 1 min при стайна температура (15-25°C C) и след това се центрофугира при 16,100 xg за 1 min, за да се елюира. Елюирането е готово за усилване надолу по веригата.

PCR амплификация в реално време се извършва с помощта на Qiagen Mericon® Chicken Kit Cat. № 292033, предназначен за откриване на пилешко вещество в храни и фуражи и Qiagen Mericon® Cattle Kit Cat. № 292023 за откриване на говеждо вещество. Mericon PCR анализите включват вътрешен контрол за регулиране на потенциалното инхибиране. Те може да открият до 10 копия на целева ДНК в реакция. PCR реакциите се провеждат в краен обем от 25 µl, като се използват 10 µl Mericon® Master Mix, 5 µl вода без нуклеаза за регулиране на обема и 10 µl проба, положителен контрол или вода без нуклеаза като отрицателен контрол. Цикличният профил се състои от първоначален етап на PCR активиране при 95°C за 5 минути, последван от 45 цикъла на денатурация при 95°C за 15 s, отгряване при 60°C за 23 s и удължаване при 72°C за 10 s. Амплификацията се извършва на Smartcycler II Cepheid®. Целта е отчетена на FAM™ и IPC на Cy3™.

PCR амплификация в реално време за качествено определяне на свинско и конско/магарешко ДНК се извършва с помощта на DNAnimal Screen Halal kit rom Eurofins® Cat No. 5422221210. Пробите и контролите се амплифицират в дубликати. PCR реакциите се провеждат в краен обем от 25 µl, като се използват 20 µl MasterMix (12,5 µl BasicMix + 7,5 µl OligoMix), 5 µl проба ДНК от всяка проба, 5 µl стабилизационен буфер за NTC и 5 µl положителен контрол ДНК gGSE-P-08.042. Цикличният профил се състои от първоначален етап на PCR активиране при

transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tubes and 150 µl Buffer EB was applied directly onto the QIAquick membrane.

Incubated for 1 min at room temperature (15-25°C), and then centrifuged at 16,100 x g for 1 min to elute. Elution was ready for downstream amplification.

Real-time PCR amplification was done by using Qiagen Mericon® Chicken Kit Cat. No 292033, designed for the detection of chicken mater in food and animal feed and Qiagen Mericon® Cattle Kit Cat. No 292023 for the detection of cattle matter. Mericon PCR Assays include an internal control to control potential inhibition. It can detect down to 10 copies of target DNA in a reaction.

PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl, by using 10 µl of Mericon® Master Mix, 5 µl of nuclease free water to adjust the volume and 10 µl of sample, positive control or nuclease free water as negative control. The cycling profile consisted of initial PCR activation step at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 23 s and extension at 72 °C for 10 s. Amplification is performed on Smartcycler II Cepheid®. Target was read at FAM™ and IPC at Cy3™.

Real-time PCR amplification for qualitative detection of pork and horse/donkey DNA was performed by using DNAnimal Screen Halal kit rom Eurofins® Cat no. 5422221210. Samples and controls were amplified in duplicates. PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl, by using 20 µl of MasterMix (12.5 µl BasicMix + 7.5 µl OligoMix), 5 µl of sample DNA from each sample, 5 µl of stabilization buffer for NTC and 5 µl of positive control DNA gGSE-P-08.042.

The cycling profile consisted of initial PCR activation step at 95 °C for 5 min, followed

95°C за 5 минути, последван от 45 цикъла на денатурация при 95°C за 15 s, отгряване при 60°C за 23 s и удължаване при 72°C за 10 s. Амплификацията се извършва на Smartcycler II Cepheid®. Резултатът за кон/магаре е отчетен при FAM™, резултатът от свинското при Cy3™ и IPC при Cy5™. Изчислението е направено съгласно инструкциите на производителя.

Газова хроматография-масспектрометрия (GC/MS)

Аналитичното определяне е извършено чрез използване на стандартна смес на мастни киселини (MIX FAME). Процедурата се основава на катализирана трансестерификация на мастни киселини, образуващи метилови естери (FAME-s) и модифицирана форма (Frank et al., 2002; Pop et al., 2010; Trbovic et al., 2017; Guntarti et al., 2019). Използвани са следните химикали: Хексан 99,9% от Honeywell Riedel-de-Haën™, метанол 99,9% CHROMASOLV™ от Honeywell Riedel-de-Haën™, етилацетат 99,7% CHROMASOLV™ Honeywell Riedel-de-Haën™, натриев метилат от Merk и Supelco® 37 Component FAME Смесете Sigma-Aldrich® като сертифициран референтен материал (CRM) в съответствие с ISO 17034 и ISO/IEC 17025.

Процедура на екстракция и дериватизация на мастни киселини

Пробите се хомогенизират с хомогенизатор Velp Scientifica ™ OV5. След хомогенизиране, проба от 500 mg се поставят в 15 ml конични епруветки и се смесват с 5 ml хексан 99,9%. След завихряне в продължение на 1 min, 1 ml натриев метоксид се добавя в 5.4M метанол и се разбърква в продължение на 1 min чрез завихряне. Естерификацията се извършва при стайна температура. След това 1 ml разтвор се прехвърля в 2 ml микроцентрофужна епруветка. Пробите се анализират в рамките на един час след естерификация.

Определянето на метиловите естери на мастните киселини (FAME) се извършва чрез (Agilent 5975C инертна

by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing at 60 °C for 90 s.

Amplification is performed on Smartcycler II Cepheid®. Horse/donkey target was read at FAM™, pork target at Cy3™ and IPC at Cy5™. Calculation was done according to manufacturer instructions.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

Analytic determination has been done by using MIX FAME-s fatty acid standard. Procedure is based on base catalyzed transesterification of fatty acids forming methyl esters (FAME-s) and modified from (Frank, et al., 2002) (Frank et al., 2002; Pop et al., 2010; Trbovic et al., 2017; Guntarti et al., 2019). The following chemicals were used: Hexane 99.9% form Honeywell Riedel-de-Haën™, Methanol 99.9% CHROMASOLV™ from Honeywell Riedel-de-Haën™, Ethyl acetate 99.7% CHROMASOLV™ Honeywell Riedel-de-Haën™, Sodium Methylate from Merk and Supelco® 37 Component FAME Mix Sigma-Aldrich® as a certified reference material (CRM) in accordance with ISO 17034 and ISO/IEC 17025.

Extraction procedure and derivatization of fatty acids

Samples were homogenized with Velp Scientifica™ OV5 homogenizer. After homogenization 500 mg of sample were placed into 15 ml conical tubes and mixed with 5ml of hexane 99.9%. After vortexing for 1 min, 1 ml of sodium methoxide in 5.4M methanol was added and mixed for 1 min by vortexing. Esterification was performed in room temperature. Afterwards, 1 ml of solution was transferred into 2 ml microcentrifuge tube. Samples were analysed within an hour after esterification.

Determination of FAMEs was performed by (Agilent 5975C inert XL Triple Axis MSD with 7890 GC) gas-liquid

XL Triple Axis MSD с 7890 GC) газотечна хроматография, снабдена с инертен източник на йонизация на електроните (EI) и капилярна DB-23 хроматографска колона (60m x 250um x 0.25um). Оперативната настройка на GC-MS е посочена в Таблица 1.

chromatography equipped with inert electron ionization (EI) source and capillary DB-23 chromatographic column (60m x 250um x 0.25um). The operational set up of GC-MS is shown in Table 1.

Таблица 1. Оперативната настройка на GC-MS
Table 1. The operational set up of GC-MS

Колона/Column	DB-23 60m x 250um x 0.25um
Температура на инжектор/Injector temperature	250°C
Газов носител/Carrier gas	Helium
Поток на газов носител/Carrier gas flow	1.2 mL/min
Съотношение/Split ratio	25:1
Програма на фурната/Oven Programe	50°C, 2.8 min 0°C
	25.0°C/min 200°C 0 min
	3.0°C/min 230°C 15 min
	Total run time: 33.8 min
Обем на впръскване/Injection volume	3.0 µL
Разредител/Diluent	Hexan
MS Характеристики/Parameters:	
Източник на йонизация/Ionisation source	EI
Електронна енергия/Electron energy	70 Ev
MS Източник/Source	230°C
MS Quad	150°C
SIM or SIR (Селективен монитор на йони/Selective Ion Monitoring) Характеристики/Parameters:	
Забавяне на разтворителя/Solvent delay	5.7 min

Хроматографските пикове в пробите са идентифицирани чрез сравняване на относителното време на задържане на пиковете на метиловите естери на мастните киселини (FAME) в смесен стандарт на Supelco 37 Component FAME (Supelco, Bellefonte, USA), който е базиран в библиотеката NIST.

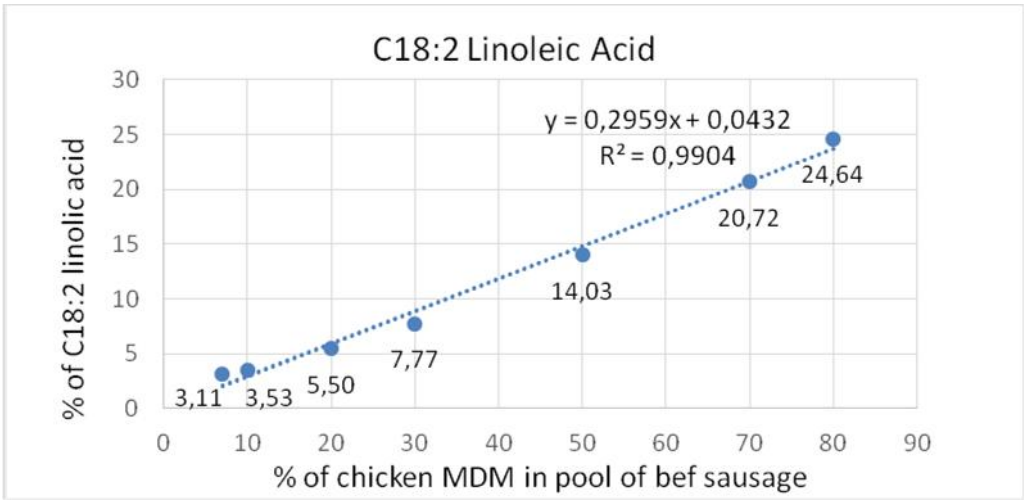
За кривата на валидиране чрез метода GC-MS са тествани седем вида телешки наденички като отрицателни за пилешко, свинско и конско/магарешко чрез PCR в реално време, като към тях са добавени 7, 10, 20, 30, 50, 70 и 80% пилешка кайма. Анализирани са чрез GC-MS (Таблица 2 и Фигура 1).

The chromatographic peaks in the samples were identified by comparing relative retention times of FAME peaks with peaks in Supelco 37 Component FAME mix standard (Supelco, Bellefonte, USA) which is based on NIST library.

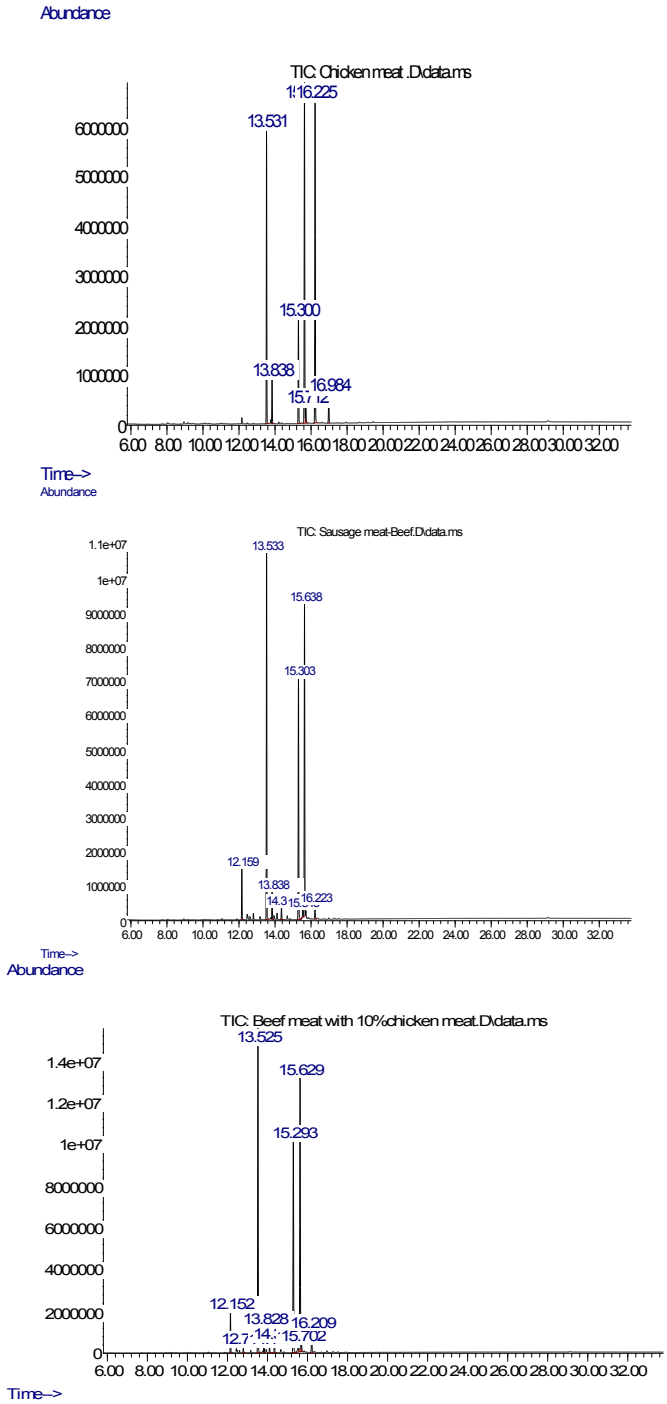
For the validation curve in GC-MS, pool of seven beef sausages tested as a negative for chicken, pork and horse/donkey by means of Real-time PCR was used as a matrix, spiked by 7, 10, 20, 30, 50, 70 and 80% of chicken MDM. Analyzed be means of GC-MS (Table 2 and Figure 1).

Таблица 2. Валидационна крива на линолова киселина
Table 2. Validation curve of linoleic acid

№	% на пилешка кайма в телешка наденица % of chicken MDM on beef sausage matrix	Средно от три измервания на концентрация на С 18:2 % Average of the three measurement of C18:2 concentration %
1	7.00	3.11
2	10.00	3.53
3	20.00	5.50
4	30.00	7.77
5	50.00	14.03
6	70.00	20.72
7	80.00	24.64
Корелационен коефициент/Correlation coefficient (R^2)		0.99
Наклон/Slope		0.2959
interslope		0.0432
Линеен диапазон/linearity range		0-80%
Стандартна грешка на отрез / SE of intercept		0.609
Стандартно отклонение на отрез / SD of intercept		0.1802031
STEYX		0.93
LOD		2.01
LOQ		**6.09**



Фиг. 1. Валидационна крива на линолова киселина
Fig. 1. Validation curve of linoleic acid



Фиг. 3. Хроматограми на профил на мастните киселини на пилешка кайма(А), говежда наденичка (В) и говежда наденичка с 10% пилешка кайма
Fig. 3. Chromatograms of chicken MDM fatty acid profile (A), beef sausage (B) and beef sausage with 10% of chicken MDM

Мастните киселини (C14:0; C15:0; C16:0; C16:1; C17:0; C18:0; C18:1c; C18:2 and C18:3n3) са изследвани чрез GC-MS метод в наденички от: само телешко, само пилешко, телешко с 10% пилешка кайма и телешко с 50% пилешка кайма (Таблица 3).

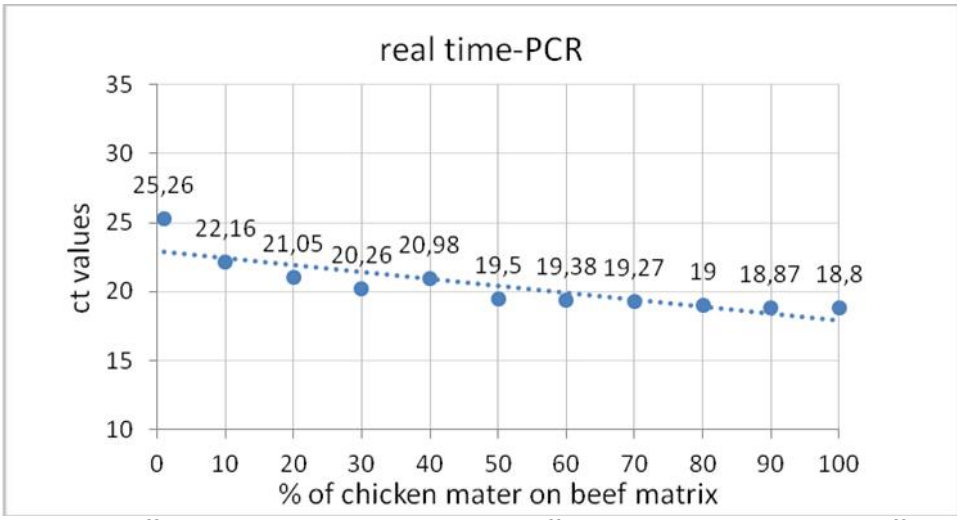
Fatty acid profile (C14:0; C15:0; C16:0; C16:1; C17:0; C18:0; C18:1c; C18:2 and C18:3n3) was measured by means of GC-MS for beef only, chicken only, beef sausage with 10% of chicken MDM and beef with 50% of chicken MDM (Table 3).

Таблица 3. Профил на мастните киселини на група от седем наденички само с говеждо месо, пилешка кайма, говежди наденички с 10% пилешка кайма и говежди наденички с 50% пилешка кайма
Table 3. Fatty acid profile of pool of seven beef only sausages, chicken MDM, beef sausage with 10% of chicken MDM and beef sausage with 50% of chicken MDM

№	Аналитично име Analytical name	Име – метил естер / Name– methyl ester	Група телешки наденички Pool of beef only sausage	Пилешка кайма Chicken MDM	Телешки наденички с 10% пилешка кайма Beef sausage with 10% of chiken MDM	Телешки наденички с 50% пилешка кайма Beef Sausage with 50% of chiken MDM	Retention Time (RT)
1	C14:0 Миристинова киселина Myristic acid	Метил тетрадеканоат / Methyl tetradecanoate,	3.37	0.33	3.09	2.12	12.15
2	C15:0 Пентадеканова киселина Pentadecanoic acid	Метилпентадеканоат или пентадеканова киселина Methyl pentadecanoate or pentadecanoic acid https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/ -collection=compounds&query_type=mf&query=C16H32O2&sort=mw&sort_dir=asc	0.51	0.06	0.48	0.32	12.79
3	C16:0 Палмитинова киселина Palmitic acid	Хексадеканова киселина / Hexadecanoic acid	30.89	18.24	29.48	25.73	13.52
4	C16:1 Палмитолеинова киселина Palmitoleic acid	9-хексадеканова киселина или метил хексадек-9еноат 9-Hexadecanoic acid or methyl hexadec-9enoate	2.71	3.37	2.68	2.93	13.82
5	C17:0 Хептадеканова киселина Heptadecanoic acid	Хептадеканова киселина Heptadecanoic acid	1.69	0.11	1.64	1.09	14.34
6	C18:0 Стеаринова киселина Stearic Acid	Октадеканова киселина Octadecanoic acid	24.22	8.21	24.62	19.39	15.29
7	C18:1c Олеинова киселина Oleic Acid	9- Октадеканова киселина 9-Octadecanoic acid (Z)	33.47	28.98	33.43	32.46	15.62
8	C18:2 Линолова киселина Linoleic acid	9, 12-Октадекадиенова киселина 9, 12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	2.06	36.73	3.46	14.03	16.20
9	C18:3n3 Линолова киселина Linolenic acid ALA	9,12,15-ZZZ-Октадекатриенова киселина 9,12,15-ZZZ-Octadecatrienoic acid	0.24	3.53	0.34	1.33	16.96

Седем вида телешки наденички, тествани като отрицателни за пилешко, свинско и конско/магарешко чрез PCR в реално време, са използвани като материал, към него са добавени 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100% пилешка кайма. Анализирани са чрез PCR в реално време за наличие на пилешка ДНК (Фигура 2).

Pool of seven beef sausages tested as a negative for chicken, pork and horse/donkey by means of Real-time PCR was used as a matrix, spiked by 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 80, 90 and 100% of chicken MDM. Analyzed be means of real-time PCR for the presence of chicken DNA (Figure 2).



Фиг. 2. Стойности на Ct, получени в серийни смески от пилешка кайма поставена в говежди колбаси

Fig. 2. Ct values obtained in serial mixtures of chicken MDM in pool of beef sausages as a matrix

РЕЗУЛТАТИ

Всички проби са отрицателни при PCR в реално време за свинско месо и месо от кон/магаре. Тринадесет от 22 проби (59%) са положителни за пилешка ДНК при PCR в реално време, но само 3 проби надвишават границата за количествено определяне на линолова киселина за пилешко месо чрез GC/MS (>6.09%) като индикация за съществено фалшифициране (Таблица 4) (ct стойности от 24.2; 19.44; и 19.7 при PCR в реално време и C18:2 с 17.18; 17.02 и 11.45% с GC-MS метод). Всички положителни проби от PCR в реално време, които не достигат границата на откриване (LOQ) на линоловата киселина имат средна ct стойност от 32.83 със стандартно отклонение от 4.80 и с

RESULTS

All samples were negative on Real-time PCR for pork and horse/donkey. Thirteen out 22 samples (59%) were positive for chicken DNA on real-time PCR, but only 3 samples exceeded the quantification limit of linoleic acid for chicken meat on GC/MS (>6.09%), as an indication of substantial adulteration (Table 4) (ct values of 24.2; 19.44; and 19.7 in Real-time PCR and C18:2 of 17.18; 17.02 and 11.45% with GC-MS).

All samples positive on real-time PCR that did not reach LOQ of the linoleic acid had a mean ct value of 32.83 with standard deviation of 4.80 and range between 26.88 to 39.96.

диапазон между 26.88 до 39.96. Тези проби имат средна стойност на C18:2 от 2.81% със стандартно отклонение от 0.31 и диапазон от 1.19 до 4.44%. Въз основа на официални проверки, всички производители на 13 положителни проби преработват пилешки продукти в едни и същи месни фабрики.

These samples had a C18:2 mean value of 2.81% with standard deviation of 0.31 and a range of 1.19 to 4.44%.

Based on official inspections, all producers of 13 positive samples process chicken products in the same meat plants.

Таблица 4. Резултат от PCR в реално време за пилешко, говеждо, свинско, конско/магарешко ДНК и профил на мастни киселини от GC-MS анализ на 22 наденички

Table 4. Result of real-time PCR for chicken, beef, pork, horse/donkey DNA and fatty acid profile with GC-MS of 22 sausages

	PCR в реално време real-time PCR					Профил на мастни киселини (GC-MS) Fatty acid profile (GC-MS)								
No	Пилешко (ct стойности) Chicken (ct values)		Конско/ Магарешко Horse/ Donkey	Свинско Pork	Говеждо Cattle	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1c	C18:2	C18:3n3
1	+	28.42	-	-	+	3.78	0.51	27.84	3.77	1.61	20.56	38.26	1.96	0.34
2	+	39.96	-	-	+	3.53	0.57	28.34	3.13	2.1	23.43	36.04	1.19	0.68
3	-	-	-	-	+	3.58	0.69	27.82	3.41	2.1	24.49	35.3	1.15	0.49
4	+	29.63	-	-	+	3.58	0.49	29.35	3.11	1.73	23.2	35.13	2.36	0.3
5	+	24.2	-	-	+	1.58	0.18	24.76	4.25	0.53	13.64	36.29	**17.18**	1.04
6	+	19.44	-	-	+	1.81	0.26	24.65	3.53	0.86	16.92	31.74	**17.02**	2.24
7	+	28.16	-	-	+	3.4	0.61	28.03	3.43	1.92	23.61	35.95	1.91	0.38
8	+	19.7	-	-	+	2.44	0.51	25.56	3.83	1.54	21.93	31.53	**11.45**	0.62
9	+	35.24	-	-	+	4.01	0.64	26.22	2.36	2.28	26.77	32.52	3.85	0.56
10	+	29.96	-	-	+	3.52	0.61	25.73	3.42	2	24	34.54	4.44	0.43
11	-	-	-	-	+	3.43	0.45	26.08	3.43	1.7	24.91	34.93	3.51	0.42
12	+	38.89	-	-	+	3.32	0.39	25.25	2.45	1.38	25.75	36.86	3.1	0.31
13	+	37.06	-	-	+	3.68	0.43	26.64	3.34	1.94	25.34	34.41	2.99	0.27
14	+	34.12	-	-	+	2.92	0.39	24.78	3	1.28	23.46	39.35	3.45	0.37
15	+	26.88	-	-	+	4.22	0.49	28.08	3.32	1.46	20.15	37.43	2.82	0.34
16	-	-	-	-	+	3	0.6	29.67	2.85	1.99	24.39	35.22	1.64	0.28
17	-	-	-	-	+	3.01	0.43	27.91	2.5	1.51	25.65	35.56	2.11	0.31
18	-	-	-	-	+	3.59	0.52	27.44	2.37	1.23	28.02	32.68	3.18	0.36
19	-	-	-	-	+	3.97	0.58	26.24	2.71	2.21	27.16	32.82	3.15	0.38
20	-	-	-	-	+	3.28	0.58	26.74	1.73	2.06	30.53	31.9	2.42	0.46
21	-	-	-	-	+	3.39	0.58	31.74	3.01	1.88	24.48	31.79	1.87	0.24
22	-	-	-	-	+	2.64	0.8	26.95	2.49	2.42	25.89	35.31	2.1	0.8

ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото проучване, базирано на силно чувствителен PCR метод и профил на мастните киселини изследвани чрез GC-MS, показва, че фалшифицирането на традиционните косовски наденички с пилешко месо е често срещано, но в повечето случаи това може да бъде нежелана/инцидентна фалшификация поради преработката на пилешко и говеждо месо в едни и същи месни преработвателни фабрики. Поради религиозните вярвания, фалшифицирането със свинско и конско, не беше установено, според очакванията. В тези случаи фалшифицирането с пилешко месо представлява важен въпрос, който трябва да се разгледа. Всъщност това е най-честото фалшифициране в повечето държави, където свинското месо не се консумира широко поради религиозните вярвания (Ayaz et al., 2006; Keyvan et al., 2017; Al-Qassab et al., 2019).

PCR в реално време е силно чувствителен метод за тестване на автентичността на месото. Може да бъде отличен избор да се идентифицира дори малко количество материал, особено когато става въпрос за преработка на месо от различни животински видове в едни и същи месопреработвателни заводи, при които случайното фалшифициране със следи от един вид месо или месни продукти от друг вид по време на обработката са възможни. Въпреки това, методът PCR в реално време приложен в настоящето проучване е необходим за определяне на качеството, но когато е необходимо количествено определяне, той има недостатъци. В случай на измамни дейности, икономическата печалба се постига обикновено, когато значително количество висококачествено месо се замени с по-евтино. Установихме, че GC-MS е полезен метод, когато се комбинира с PCR в реално време по отношение на традиционните косовски наденички.

Значителни вариации между пар-

DISCUSSION

Present study, based on highly sensitive PCR method and fatty acid profile by GC-MS, indicates that adulteration of traditional Kosovar beef sausages with chicken is common, but most commonly it could be unwanted/incidental adulteration due to the processing of chicken and beef meat in the same meat plants.

Due to the religious believes adulteration with pork and horse, as expected, was not found. In these cases, adulteration with chicken meat represent important issue to be addressed.

In fact, it is the most common adulteration in most countries where pork meat is not widely consumed due to the religious believes (Ayaz et al., 2006; Keyvan et al., 2017; Al-Qassab et al., 2019).

Real-time PCR is a highly sensitive method for meat authenticity testing. It can be an excellent choice to identify even a small amount of target, in particular when it comes to processing meat from different animal species in the same meat plants where the incidental adulteration with trace amounts of one type of meat or meat products with another during processing and handling is possible.

However, current method applied in this study is a Real-time PCR qualitative method and when quantification of target is needed, it has shortcomings.

In case of fraudulent activities, economic profit is achieved usually when considerable amount of high-value species meat is replaced with cheaper ones.

We found GC-MS as useful method when combined with Real-time PCR with regard to Kosovo traditional sausage.

Considerable variation between

тидите са често срещани, тъй като се очаква също вариране в съдържанието на мазнини между самите животни. Говеждото месо, при производството на колбаси, има високо съдържание на мазнини, като например обрязване на хълбоците или ребрата, както и обрезките на бузите и главата, докато постното месо от предните и задните части се продава отделно с по-висока цена. Съотношението между мазнини и крехко месо определя и свойствата на свързване на продукта с вода (Savic, 1985). Валидирането с телешка наденица вместо сурова кайма може да отрази най-добре състава на наденичките. Затова са използвани като материал седем различни наденички, тествани като отрицателни за ДНК на пилешко, конско и свинско месо. Описана е и промяна в общите и свободни мастни киселини по време на узряването на занаятчийски и индустриално произведени продукти (Franco et al., 2002). Косовската наденица обаче се опушва само за една нощ или само за няколко дни и е малко вероятно да се получи промяна в свободните мастни киселини.

По-голямата част от измамите може да останат неразкрити, тъй като те обикновено не представляват риск за безопасността на храните и често потребителите не забелязват никакъв проблем с качеството. Въздействието върху общественото здраве е от основно значение и главно по отношение на хранителните алергии. Докато алергичните реакции към птичи пера и яйца са често срещани, алергичните реакции към пилешкото месо , въпреки че се считат за редки, стават все по-очевидни (Zacharisen, 2006; Can et al., 2014; Wilson and Platts-Mills, 2019). Регламентите по отношение на етикетирането ясно посочват, че всички съставки трябва да бъдат изброени. Дори в случаите, когато в телешката наденица има само следа от пилешка ДНК, трябва да се декларира, че продуктът може да съдържа малко количество пилешко месо.

batches is common as also variation in fat content between the animals themselves is expected.

Principle ingredients from beef in sausage production are high fat meats such as flank or rib trimmings as well as cheek and head trimmings, while the lean meat from forequarters and hindquarters is sold separately with higher price. Fat-to-lean ratios determine also water binding properties of product (Savic, 1985).

Validation with beef sausage instead of raw minced meat as a matrix may reflect the best the composition of sausage. Therefore we used as a matrix the pool of seven different sausages tested as negative for chicken horse and pork DNA.

Also change in total and free fatty acids during the ripening of artisan and industrially manufactured products has been described (Franco et al., 2002). However, Kosovo sausage is smocked only overnight or just a few days and a change in free fatty acids it is unlikely to occur.

The vast majority of frauds may go undetected since they usually do not pose a food safety risk and often consummators do not notice any quality problem.

The impact on public health is of limited importance and mainly in terms of food allergies. While allergic reactions to poultry feathers and eggs are common, allergic reactions to chicken meat although considered rare, are becoming more evident (Zacharisen, 2006; Can et al., 2014; Wilson and Platts-Mills, 2019).

Regulations with regard to labelling clearly indicate that all ingredients should be listed.

Even in case where there is only trace of chicken DNA in beef sausage it must be declared that product may contain small amount of chicken meat.

ИЗВОДИ

Настоящото проучване, въз основа на високо чувствителен PCR тест в реално време и определянето на мастните киселини чрез GC-MS метод, посочва че фалшифицирането на традиционните наденички в Косово е често срещано. Въпреки че умишленото фалшифициране присъства често, в повечето случаи може да е неумишлено или случайно поради преработка на пилешко и телешко месо в същите преработвателни предприятия. Следователно, за да се предотврати този проблем, трябва да се осигури правилно етикиране в съответствие със съответните национални разпоредби.

CONCLUSIONS

Present study, based on highly sensitive real-time PCR method and the determination of fatty acid profile by GC-MS, indicates that adulteration of traditional Kosovar sausages with chicken is common.

Although intentional adulteration is present frequently, more often it could be an unwanted/incidental adulteration due to the processing of chicken and beef meat in the same meat plants.

Therefore, in order to overcome this problem, a proper labelling in line with the respective national regulation should be applied.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Ahmad Nizar, N.N., D.M. Hashim and J.M. Nazrim Marikkar**, 2013. Differentiation of Lard, Chicken Fat, Beef Fat and Mutton Fat by GCMS and EA-IRMS Techniques. *J Oleo Sci.,* 62(7), 459-464.
2. **Alikord, M.** et al., 2017. Species Identification and Animal Authentication in Meat Products: a review. Food Measure.
3. **Al-Qassab, T., A. Kamkar, A. Khanjari, P. Shayan**, 2019. Mislabeling in Cooked Sausage is a Seriously Increasingly Problem in Food Safety. *Iranian Journal of Veterinary Medicine,* 13(1), 101-113.
4. **Ayaz, Y., I. Erol and N.D. Ayaz**, 2006. Detection of Species in Meat and Meat Products Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Journal of Muscle Foods,* 17(2), 214-220.
5. **Ballin, N. Z., A.H. Karlson and F.K. Vogensen**, 2009. Species Determination - Can We Detect and Quantify Meat Adulteration?. *Meat Science,* 83(2), 165-174.
6. **Can, C., G. Ciplak and M. Yazicioglu**, 2014. Chicken Meat Anaphylaxis in a Child with No Allergies to Eggs or Feathers. *Iran J Pediatr.,* 24(6), 786-787.
7. **Floren, C.** et al., 2015. Species Identification and Quantification in Meat and Meat Products Using Droplet Digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry,* vol. 173, 1054-1058.
8. Food Safety Authority of Ireland - FSAI, 2013. Equine DNA & Mislabelling of Processed Beef Investigation, s.l.: Department of Agriculture, Food and Marine.
9. **Franco, I., A. Martinez, B. Prieto and J. Carballo**, 2002. Total and Free Fatty Acids Content during the Ripening of Artisan and Industrially. *Grasas y Aceites,* 53(4), 403-413.
10. **Frank, D., P. Sandra and P.L. Wylie**, 2002. Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Retention Time Locked Methods and Retention Time Databases, s.l.: Agilent Technologies.
11. **Gecaj, R., B. Berisha, F. Ajazi and S. Muji**, 2018. Detection of Ingredients in Salami and Sausages from Different Brands Sold in Kosovo Market by PCR. *Journal of Hygienic Engineering and Design,* vol. 22, 18-24.
12. **Guntarti, A., A. Kusbandari and M. Ahda**, 2019. Determining Fatty Acids and halal Authentication of Sausage. *Food Research,* 4(2), 496-499.

13. **Iwobi, A.N.** et al., 2011. Biochip Technology for the Detection of Animal Species in Meat Products. *Food Anal. Methods,* 4(3), 389-398.
14. **Keyvan, E.** et al., 2017. Identification of Meat Species in Different Types of Meat Products by PCR. *Ankara Üniv Vet Fak Derg,* vol. 64, 261-266.
15. **Kumar, A.** et al., 2013. Identification of Species Origin of Meat and Meat Products on the DNA Basis: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 55(10), 1340-1351.
16. **Pinto, A. D.** et al., 2015. Occurrence of Mislabeling in Meat Products Using DNA-based Assay. *J Food Sci Technol,* 52(4), 2479-2484.
17. **Pop, C.** et al., 2010. Determination of Free Fatty Acids in Sausage Meat. *Bulletin UASVM Agriculture,* 67(2), 373-377.
18. REGULATION (GOK), 2013. On Llabelling, Presentation and Advertising of Food Products. Ministry of Trade and Industry, No.09/2013. *Official Gazette of Republic of Kosova*. Pristina.
19. REGULATION (EU), 2011. Food Information to Consumers, European Parliament No.1169/2011. s.l.: *Official Journal of the European Union*. Brussel.
20. **Savic, I. V.**, 1985. Small-scale sausage production. *Official Journal Food and Agriculture Organisation - FAO.* Rome.
21. **Trbovic, D.** et al., 2017. Saturated Fatty Acids and Total Fat Daily Intake through Consumption of Processed Meat Products. *Meat technology,* 58(1), 16-25.
22. **Vallejo-Cordoba, B., A.F. González-Córdova, M.A. Mazorra-Manzano and R. Rodríguez-Ramírez**, 2005. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Meat Authenticity. *J Sep Sci.,* 28(9-10), 826-836.
23. **Wilson, J. M. and T. A. Platts-Mills**, 2019. Meat Allergy and Allergens. *Mol Immunol.,* vol. 100, 107-112.
24. **Zacharisen, M. C.**, 2006. Severe Allergy to Chicken Meat. *WMJ,* 105(5), 50-52.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (5), 28-35 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Оценка на технологичните свойства на мляко от крави с различни генотипове

Николай Марков[1]*, Силвия Иванова[2]

[1]*Институт по планинско животновъдство и земеделие, 5600 Троян, България*
[2] *Институт по криобиология и хранителни технологии, 1407 София, България*

Evaluation of the Technological Properties of Cow's Milk with Different Genotypes

Nikolay Markov[1]*, Silviya Ivanova[2]

[1]*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 5600 Troyan, Bulgaria*
[2]*Institute of Cryobiology and Food Technology, 1407 Sofia, Bulgaria*
**E-mail: ncm64@mail.bg*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Направен е физикохимичен анализ на мляко, получено от крави на първа лактация от следните породи: Симентал (I гр.) Монбелиард (II гр.) и Българско родопско говедо (III гр.). Групите са отглеждани при еднакви условия на хранене в района на ИПЖЗ-град Троян. Изследванията показаха, че по съдържание на сухо вещество, мазнини и белтък в млякото, говедата от породи Симентал и Монбелиард отстъпват на Българското родопско говедо. Органолептичната оценка не показа различия по на вкус, цвят и консистенция. Киселинността и плътността на млякото покрива утвърдените норми. Сухият безмаслен остатък (СБО) на представителките на трите породи показва стойности над 8 %, което е показател за добре извършвана селекция. Изследваното мляко може да се използва като изходна суровина за разработване на различни функционални продукти със здравословно действие.

Ключови думи: мляко, белтък, мазнини, крави, сух безмаслен остатък

SUMMARY

A physicochemical analysis of milk obtained from cows at the first lactation from following breeds was made: Simmental (I group), Montbeliarde (II group) and Bulgarian Rhodope Cattle (III group). The groups were bred under the same feeding conditions in the area of RIMSA-Troyan. Studies have shown that, in terms of fat, protein and dry matter content in milk, Simmental and Montbeliard Cattle were inferior to the Bulgarian Rhodope Cattle. The organoleptic evaluation showed no differences in taste, colour and texture.

The acidity and density of milk meets the established standards. The solids non-fat residue (SNF) of the representatives of the three breeds shows values above 8%, which was an indicator of well-performed selection.

Analysed milk can be used as a feedstock for the development of various functional health products.

Key words: milk, protein, fat, cows, solids non-fat residue

УВОД

Млякото е хранителен продукт с лесно усвоими и пълноценни съставки. Съдържа вода, протеини, мазнини, млечна захар, минерални вещества, ензими, витамини, хормони, имунни тела и др. Същевременно, то е един от най-рисковите продукти, защото се разваля лесно, поради краткия срок на съхранение. Най-масово използвано и преработвано е кравето мляко. Около 85 % от произведеното мляко по света е краве, а в някой страни този процент превишава 99% (Австрия, Великобритания, Дания, Канада, САЩ, Нидерландия, Япония). У нас кравето мляко обхваща 82-85% от общото производство (Peychevski and Chomakov, 1988; Dimitrov et al., 2008; Zahariev et al., 2017).

Качественият състав на кравето млякото е особено важен за технологията на производството на млечни продукти и деликатеси. Различните породи говеда имат разнообразен, качествен състав на млякото (Bauman and Grinari, 2003; Cabiddu et al., 2005; Mihailova and Odjakova, 2006; Marinova and Pashova, 2011; Rostova and Zhukov, 2012; Gosteva et al., 2017).

Според Castillo et al. (2013) отглеждането на преживни животни на свободна паша, при дажба богата на растителни екстракти подобрява качеството на млякото и месото и дава възможност да се получат продукти, отговарящи на концепцията за функционална храна и диетика на човека.

Hamiti et al. (2014) при изследване на краве мляко в пет различни района на Албания установили, че съдържанието средно на сух безмаслен остатък е 8,77%, на мазнини е 3,85 %, на протеини е 2,86 %, а плътността е 1,0289 kg/l и киселинността по Тьорнер е 17,37.

Wangdi et al. (2016) изследвали параметри на краве мляко през различни сезони от различни породи и получил следните резултати: сух безмаслен остатък от 8,35 до 8,61, мазнини от 4,80

INTRODUCTION

Milk is a food product with easily digestible and complete ingredients. It contains water, proteins, fats, milk sugar, minerals, enzymes, vitamins, hormones, immune bodies etc. At the same time, it is one of the most risky products because it spoils easily due to its short shelf life. The most widely used and processed is cow's milk. Cow's milk is about 85% of the production in the world, and in some countries this percentage exceeds 99% (Austria, Great Britain, Denmark, Canada, USA, Netherlands, Japan). In Bulgaria, cow's milk covers 82-85% of the total production (Peychevski and Chomakov, 1988; Dimitrov et al., 2008; Zahariev et al., 2017).

The quality composition of cow's milk is especially important for the technology of production of dairy products and delicacies. Different cattle breeds have a diverse, qualitative milk composition (Bauman and Grinari, 2003; Cabiddu et al., 2005; Mihailova and Odjakova, 2006; Marinova and Pashova, 2011; Rostova and Zhukov, 2012; Gosteva et al., 2017).

According to Castillo et al. (2013) the cultivation of ruminants on free grazing, with a ration rich in plant extracts improves the quality of milk and meat and makes it possible to obtain products that meet the concept of functional food and human diet.

Hamiti et al. (2014) in a study of cow's milk in five different regions of Albania found that the average content of dry fat-free residue was 8.77%, fat was 3.85%, protein was 2.86%, and the density was 1.0289 kg/l and the acidity according to Turner is 17.37.

Wangdi et al. (2016) studied the parameters of cow's milk in different seasons of different breeds and obtained the following results: dry fat free residue from 8.35 to 8.61, fat from 4.80 to 5.11%,

до 5,11%, протеини от 3,05 до 3,14, точка на замръзване от -0,52 до – 0,55.

Целта на нашето проучване беше да се изследват органолептичните (сензорни) качества и физико-химичния състав на млякото на крави на първа лактация от породите Симентал, Монбелиард и Българско родопско говедо отглеждани, пасищно в района на Средна Стара планина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването се проведе във фермата на Института по планинско животновъдство и земеделие-Троян през периода май-юни 2019 година с крави на първа лактация от породите Симентал, Монбелиард и Българско родопско говедо отглеждани пасищно. За оценка на качествения състав на изследваното мляко бяха сформирани по метода на аналозите три групи от по 6 крави: (I група) първотелки от породата Симентал, (II група) животни от породата Монбелиард и (III група) представители на породата, Българско родопско говедо. Кравите се отглеждаха пасищно, като получаваха допълнително по 4 kg концентриран фураж и вечер по 8 kg ливадно сено. Взети бяха индивидуални проби (3 серии по 6 броя) за органолептично (сензорно) изследване и оценка на физико-химичните показатели.

Органолептичната (сензорната) оценка е направена от 3 членна група, съгласно модифицирана 100 бална скала, по Marinova and Pashova (2011). Използвани са органолептични (сензорни) методи за определяне на показателите: вкус, мирис, цвят, външен вид и консистенция и състояние на опаковката за транспортиране на проби.

В пробите мляко анализирахме по физико-химични методи: вода, сухо вещество, сух безмаслен остатък, мазнини, протеини, плътност, pH, киселинност и температура на замръзване с помощта на апарата COMBIFOSS-5000 и стандартни методи.

protein from 3.05 to 3.14, freezing point from -0.52 to -0.55.

The aim of present study was to observe the organoleptic (sensory) properties and physicochemical composition of milk of first lactation of cows of ‘Simmental’, ‘Montbeliarde’ and ‘Bulgarian Rhodope cattle’ grazing in the region of the Central Balkan Mountain.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted on the farm of the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture - Troyan in the period May-June 2019 with ‘Simmental’, ‘Montbeliard’ and ‘Bulgarian Rhodope Cattle’ cow breeds in first lactation raised on pasture. To assess the quality composition of milk, three groups of 6 cows were formed by the method of analogues: (I group) first-calf heifers of ‘Simmental’ breed, (II group) animals of ‘Montbeliard’ breed and (III group) representatives of ‘Bulgarian Rhodope Cattle’.

The cows were grazing, receiving an additional 4 kg of concentrated fodder and 8 kg of meadow hay in the evening. Individual samples (3 series of 6 pieces) were taken for organoleptic (sensory) examination and evaluation of physicochemical parameters.

The organoleptic (sensory) assessment was made by a 3-member group, according to a modified 100-point scale, according to Marinova and Pashova (2011). Organoleptic (sensory) methods were used to determine the parameters: taste, smell, colour, appearance and consistency and condition of the package for transporting samples.

Physico-chemical methods were used to analyze: water, dry matter, dry non-fat residue, fats, proteins, density, pH, acidity and freezing point using the COMBIFOSS-5000 apparatus and standard methods.

Данните бяха обработени по методите на вариационната статистика, с помощта на програма „Statistica-2000“ и представени в таблици.

Data were processed by the methods of variation statistics, using the program "Statistica-2000" and presented in tables.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от органолептичната (сензорната) оценка на краве мляко получено от първотелки, отглеждани пасищно в условията на Средна Стара планина е представено в Таблица 1.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the organoleptic (sensory) evaluation of cow's milk obtained from first-calf feifers bred in the conditions of the Central Balkan Mountain are presented in Table 1.

Таблица 1. Резултати от органолептичната(сензорна) оценка на краве мляко по 100 бална, модифицирана скала, разработена от Marinova and Pashova (2011)

Table 1. Results of the organoleptic (sensory) evaluation of cow's milk on a 100-modified grading scale, developed by Marinova and Pashova (2011)

Показатели / Indicators	Бало-образуващи точки Scores	Породи / Breeds		
		Симентал Simmental (I група / group) n=6	Монбелиард Montbeliarde (II група / group) n=6	Българско родопско говедо Bulgarian Rhodope Cattle (III група /I group) n=6
Вкус / Taste	30	25,50	26,70	27,80
Мирис / Smell	25	24,50	24,70	24,90
Цвят / Colour	20	19,70	19,33	19,50
Външен вид и консистенция Appearance and consistency	10	9,50	9,50	10,00
Опаковки / Packages	15	15,00	15,00	15,00
Общ бал	100	94,20	95,23	97,20

В зависимост от общия брой точки и оценката за вкус и мирис е предложено, прясното краве мляко да се приема за стандартно по органолептични (сензорни) показатели, ако е получило бална оценка не по- малко от 70 точки, а за показателите вкус и мирис не по-малко от 39 точки.

Depending on the total number of points and the evaluation of taste and smell, it is suggested that fresh cow's milk to be considered as a standard in terms of organoleptic (sensory) indicators, if it has received a score of at least 70 points, and for the indicators of taste and smell not less than 39 points.

Изследваните породи покриват предложения стандарт с високи стойности. С най-висок бал е суровото, краве мляко от Българското родопско говедо с 97,20 точки, следвано от Монбелиард, с 95,23 точки и Симентал с 94,20 точки. Сравнените проби и на трите породи, крави имат слабо сладникъв вкус, без наличие на привкус. Цветът е характерен за вида, с кремав отенък. Консистенцията е еднородна течност без утайки и замърсявания. Опаковките за пренос са чисти и асептични.

The studied breeds cover the proposed standard with high values. The highest score is for the raw, cow's milk from 'Bulgarian Rhodope Cattle' with 97.20 points, followed by 'Montbeliarde' with 95.23 points and 'Simmental' with 94.20 points. Compared samples of all three cow breeds had a slightly sweet taste, without the presence of aftertaste. The colour is characteristic of the species, with a creamy tinge. The consistency is a homogeneous liquid without sediments and impurities. The transport packaging is clean and aseptic.

Получените от нас данни са близки по стойност и кореспондират с данните, получени от Slavchev et al. (2003) и Marinova and Pashova (2011).

Хранителната стойност на изследваните от нас крави млека и качеството на получените от тях, при преработка, млечни продукти са в пряка зависимост от количеството и съотношението на отделните съставки. Физико-химичния състав на сурово краве мляко на първотелките от породите Симентал, Монбелиард и Българско родопско говедо, отглеждани пасищно в района на Средна Стара планина е представен в Таблица 2.

Водата изпълнява роля на разтворител на органични и неорганични вещества в млякото и представлява среда в която се развиват разнообразни ензимни процеси. При изследваните от нас сурови млека, варира от 87,56 % до 87,93 %.

При различните видове мляко, сухото вещество се колебае в границите между 11 и 18 %. То е с най-високи стойности при животните от породата Българско родопско говедо 12,44 %, следвани от тези на породата Монбелиард 12,19 %, и с най-ниски стойности са животните от породата Симентал 12,07 %. Разликите са сравнително малки, съответно в порядъка на 0,25 % и 0,37 %(p<0,05).

Data obtained in the present study is close in value and correspond to one obtained by Slavchev et al. (2003) and Marinova and Pashova (2011).

The nutritional value of dairy cows studied and the quality of the dairy products obtained in the present experiment, during processing, are directly dependent on the quantity and the ratio of the individual ingredients. The physico-chemical composition of raw cow's milk of first-calf feifers of 'Simmental', 'Montbeliarde' and 'Bulgarian Rhodope cattle', raised on pasture in the region of the Central Balkan Mountain, is presented in Table 2.

Water acts as a solvent for organic and inorganic substances in milk and is an environment where various enzymatic processes develop. It varied from 87.56% to 87.93% in the raw milk studied in the present experiment.

In the different types of milk, the dry matter varied between 11 and 18%. The highest values are registered in milk of 'Bulgarian Rhodope Cattle' with 12.44%, followed by 'Montbeliarde' with 12.19%, and the lowest values were found in 'Simmental' with 12.07%. The differences are relatively small, in the order of 0.25% and 0.37%, respectively (p <0.05).

Таблица 2. Физико-химичен състав на сурово, краве мляко получено от първотелки отглеждани пасищно в района на Средна Стара планина
Table 2. Physico-chemical composition of raw cow's milk obtained from first-graders raised on pasture in the region of Sredna Stara Planina

Показатели / Indicators	Симентал Simmental n=6	Монбелиард Montbeliarde n=6	Българско родопско говедо Bulgarian Rhodope Cattle
Вода / Water %	87,93±0,04	87,81±0,03	87,56±0,04
Сухо вещество / Dry matter, %	12,07±0,06	12,19±0,27	12,44±0,04
Сух безмаслен остатък / Dry fat free residue,%	8,74±0,05	8,48±0,13	8,87±0,06
Масленост / Milk fat,%	3,69±0,04	4,04±0,09	4,71±0,06
Протеин / Protein,%	3,33±0,06	3,25±0,03	3,39±0,03
Плътност / Density, °A	31,90±0,46	30,63±0,14	33,44±0,36
Активна киселинност / Active acidity (pH)	6,44±0,48	6,53±0,05	6,57±0,09
Киселинност / Acidity, °T	18,00±2,58	17,4±0,39	17,7±0,49
Температура на замръзване / Freezing temperature, °C	-0,58 ±1,34	-0,56±1,63	-0,59±0,11

P<0, 05

Сухият безмаслен остатък е с най-високи стойности при първотелките от породата Българско родопско говедо 8,87 %, следвани от животните от породата Симентал 8,74 % и тези от породата Монбелиард 8,48 %. Показаните разлики са малки, съответно 0,13 % и 0,39%(p<0,05).

Млечната мазнина оказва влияние върху сухото вещество, тъй като под въздействието различни фактори показва колебание в широки граници. Тя се характеризира с лесна усвояемост от човешкия организъм. Мазнините на изследваното мляко са във вид на суспензия. Тук превъзходството е за представителите на Българското родопско говедо с 4,71% млечни мазнини, следвани от животните на от породата Монбелиард с 4,04% млечни мазнини, а представителите на породата Симентал показаха млечна мазнина 3,67%.

Млякото осигурява на човека големи количества висококачествени белтъчини. По съдържание на протеини изследваните сурови млека показват най-високи стойности при животните от породата Българско родопско говедо - 3,39%, следвани от тези на породата Симентал с 3,33%, и на последно място по резултат са животните от породата Монбелиард с 3,24%. Показаните разлики са съпоставимо малки, съответно с 0,06% и с 0,15%(p<0,05).

Плътността е масата на млякото при 20 °C, съдържаща се в единица обем. Нормалната плътност за кравето мляко говори за неговата естественост. При изследваните от нас сурови млека, тя показва следните стойности: 30,63 °A за млякото получено от животни от породата Монбелиард, 31,90 °A за млякото получено от представителите на порода Симентал и 33,44 °A за млякото получено от животни на Българското родопско говедо. Представителите и на трите породи показват допустими параметри.

Активна киселинност (pH) е показател характеризиращ активността на

The dry fat free residue had the highest values in the first-calf feifers of 'Bulgarian Rhodope Cattle' with 8.87%, followed by 'Simmental' with 8.74% and those of 'Montbeliarde' with 8.48%. The shown differences are small, respectively 0.13% and 0.39% (p <0.05).

Milk fat affects the dry matter, because under the influence of various factors it shows fluctuations in a wide range. It is characterized by easy digestibility by the human body.

Fats in the test milk were in the form of a suspension. Here the superiority is for the representatives of 'Bulgarian Rhodope Cattle' with 4.71% milk fat, followed by 'Montbeliarde' with 4.04% milk fat, and the representatives of 'Simmental' with 3.67% milk fat.

Milk provides humans with large amounts of high quality protein. The highest value of protein content was registered in raw milk of 'Bulgarian Rhodope Cattle' with 3.39%, followed by those of 'Simmental' with 3.33%, and 'Montbeliard breed with 3.24%.

The shown differences are small, respectively 0.06% and 0.15% (p<0.05).

Density is the mass of milk at 20°C contained in a unit volume. The normal density for cow's milk shows its naturalness.

In the raw milk studied here, it shows the following values: 30.63 °A for milk from 'Montbeliarde', 31.90 °A for milk from 'Simmental' and 33.44 °A for milk obtained from 'Bulgarian Rhodope Cattle'.

Representatives of all three breeds show acceptable parameters.

Active acidity (pH) is an indicator characterizing the activity of H+ ions. The

Н+ йони. Основните източници на водородни катиони в суровото мляко са киселинни компоненти в дисоциирана форма. Най-висока е активната киселинност на млякото полученото животните на породата Българско родопско говедо, pH 6,57, а най-ниска на млякото получено от животни от породата Симентал pH 6,44. Млякото получено от породата Монбелиард заема междинно положени с pH 6,53.

Титруема (обща, потенциална) киселинност. Изразява се в градуси по Тьорнер (°Т). Зависи от състава на млякото и състава на използваните фуражи. При изследваните от нас сурови млека е в нормални стойности, съответно 17,4 °Т за животните от породата Симентал, 17,7 °Т за животните от породата Монбелиард, и 18,0 °Т за животните от породата Българско родопско говедо.

Точката на замръзване е показател зависещ от осмотичното налягане на солите и е фактор влияещ върху естествеността на суровото мляко. Точката на замръзване на млякото при трите породи варира от -0,56°С за животните от породата Монбелиард до -0,59°С за животните от породата Българско родопско говедо. Представителите на породата Симентал заемат междинно положени с резултат -0,58°С. Показаните стойности са в рамките на допустимото.

Получените от нас резултати се доближават до резултатите на Hamit et al. (2014), Wangdi et al. (2016) и Gosteva et al. (2017), а в някои отношения ги и допълват.

main sources of hydrogen cations in raw milk are acidic components in dissociated form.

The highest active acidity of milk was registered for ‘Bulgarian Rhodope Cattle’, pH 6.57, and the lowest for ‘Simmental’ with pH 6.44. Milk from ‘Montbeliarde’ occupied intermediates with pH 6.53.

Titratable (total, potential) acidity. It is expressed in degrees Turner (°T). It depends on milk composition and feed composition.

It is in normal values in the raw milk in this experiment, respectively 17.4 °T for ‘Simmental’, 17.7 °T for ‘Montbeliarde’, and 18.0° T for ‘Bulgarian Rhodope Cattle’.

The freezing point is an indicator that depends on the osmotic pressure of the salts and is a factor influencing the naturalness of raw milk. The freezing point of milk in the three breeds varies from -0.56°C for the animals of ‘Montbeliarde’ to -0.59°C for ‘Bulgarian Rhodope Cattle’. Representatives of ‘Simmental’ breed occupy intermediate positions with a result of -0.58°C. The values shown are within the allowable range.

Our results are close to those of Hamit et al. (2014), Wangdi et al. (2016) and Gosteva et al. (2017), and in some respects complement them.

ИЗВОДИ

Трите породи крави изследвани през пасищния сезон, показват състав на млякото, подходящ за преработка в млечни продукти и деликатеси. Хигиенните и органолептичните характеристики на проучените сурови, крави млека гарантират безопасност за здравето и добър вкус за хората. Сухият безмаслен остатък на представителките на

CONCLUSIONS

The three cow breeds examined during the grazing season show milk composition suitable for processing into dairy products and delicacies. The hygienic and organoleptic characteristics of studied raw cow’s milk guarantee safety for health and good taste for people. Solids non-fat residue of the representatives of the three breeds

трите породи показва стойности над 8%, през пролетно-летния период, което е показател за добре извършвана селекция.

showed values over 8% during the spring-summer period, which is an indicator of well-performed selection.

БЛАГОДАРНОСТИ

Към ръководствата на ИПЖЗ-Троян и ИКХТ-София за оказаната подкрепа.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to the management of RIMSA-Troyan and ICFT-Sofia for their support.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bauman, D. and J. Grinari**, 2003. Nutritional Regulation of Milk Fat Synthesis. *Ann. Rev. Nutr.*, 23, 203-277.
2. **Cabiddu, A., M. Addis, S. Spada, M.Sitzia, M. Molle and G.Pieddd**, 2005. The Effect of Different Legume-based Pastures on the Fatty Acid Composition of Sheep Milk with Focus on CLA. *Grassland Sci. in Eur.*, 9, 1133-1135.
3. **Castillo, C.,V. Pereira, A. Abuelo and J. Hernandez**, 2013. Effect of Supplementation with Antioxidants on the Quality of Bovine Milk Production. *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 616098, 8 pages http://dx.doi.org./10.1155/2013/616098
4. **Dimitrov, T., G. Mihailova, T. Iliev and N. Naidenova**, 2008. Milk and Dairy Products with Research Methods. Stara Zagora, pp. 15-89 (Bg).
5. **Gosteva, E., M. Kozlova and M. Ulimbashev**, 2017. Technological and Physico-chemical Indicators of Milk from Cows of Different Genotypes. In: Proceedings of the Krasnoyarsk Scientific Center for Zootechnics and Veterinary Medicine, Animal Husbandry and Dairy, Krasnoyarsk, (2-6), 97-107
6. **Hamiti, X., I. Boci, P. Lazo, G. Bardhi and A. Xinxo**, 2014. Physicochemical Quality of Raw Milk from Dairy Factories in 5 Albanian regions, *JNTS*, XIX(2), 47-54
7. **Marinova, V. and S. Pashova**, 2011, Comparative Study of Fresh Milk Offered in the Commercial Network, Izvestia, Edition of the Varna University of Economics, Varna, pp. 97-107.
8. **Mihailova, G. and Ts. Odjakova**, 2006. Fatty acid Profile of Milk from Sheep Reared in the Region of the Central Rhodope Mountains. *Ecology and Future*, 2, 21-24.
9. **Peychevski, Iv. and Hr. Chomakov**, 1988. Mlekarstvo, Zemizdat, Sofia, pp. 65-106 (Bg).
10. **Rostova, N. and A. Zhukov**, 2012. Physico-chemical Properties of Milk from First-calf Heifers of Different Genotypes. *Izvestia*, Orenburg State Agrarian University, Orenburg, 3, 106-109.
11. **Slavchev, G., R. Enikova, M. Makaveeva**, 2003. Manual for Physicochemical and Microbiological Control of Milk and Dairy Products. Association of Dairy Producers in Bulgaria (Bg).
12. **Wangdi, J., T. Zangmo, Mindu Karma and P. Bhujel**, 2016. Compositional Quality of Cows Milk and its Seasonal Variations in Bhutan. *Livestock Research for Rural Development*, 28(1) 14 http://www.lrrd.org/lrrd28/ I /wang28002.html
13. **Zahariev, Z, K. Zhelev, N. Rusev, S. Atich and Sh. Sharev**, 2017. Raising Cows and Buffaloes. Enyovche, Sofia, pp. 3-40 (Bg).