

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in
MEDICINA VETERINARIA



Tesi di Laurea Magistrale

TRACCIABILITÀ DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI E
SOSTENIBILITÀ DEGLI ALLEVAMENTI

TRACEABILITY OF DAIRY PRODUCTS AND
SUSTAINABILITY OF FARMS

Relatore

Prof.ssa Flavia Gottardo

Laureanda

Anna Michieli

Anno Accademico 2022/2023

RIASSUNTO

Il sistema di allevamento influenza la composizione chimica, il profilo nutrizionale ed i caratteri organolettici dei prodotti lattiero-caseari. La sostituzione degli insilati con fieno ed erba fresca nella dieta delle bovine da latte e l'uso dei pascoli alpini sono pratiche sostenibili per l'ambiente e migliorano la qualità delle produzioni che ne derivano. La comunità scientifica si dedica all'elaborazione di metodiche analitiche con l'obiettivo finale di dimostrare al consumatore la salubrità del prodotto e la sostenibilità della filiera. Lo scopo del presente lavoro è prendere in esame alcuni studi relativi alla tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari, focalizzando l'attenzione sull'efficacia delle procedure da questi adottate. In particolare, sono oggetto di disamina:

- I profili DART-HRMS ottenuti da diluizioni di latte vaccino polare e non-polare per identificare i *biomarkers* che si esprimono nel latte prodotto a partire da diverse modalità di dieta.
- I modelli multivariati per valutare la correlazione tra il contenuto di acidi grassi del latte e l'origine botanica, il metodo di conservazione, la proporzione dei foraggi forniti con la dieta.
- La *Mid Infrared Spettroscopy* (MIR) per indagare gli effetti del pascolamento estivo sulla concentrazione degli acidi grassi nel latte.
- L'analisi della frazione lipidica per tracciare i diversi processi con cui viene prodotto il formaggio Asiago DOP.
- La risonanza magnetica nucleare protonica ad alta risoluzione (^1H NMR) per tracciare il formaggio Asiago DOP ottenuto dal latte di bovine al pascolo.
- La *Near Infrared Spettroscopy* (NIRS) per distinguere formaggi Asiago d'Alleva ottenuti da filiere diverse sulla base di composizione chimica, colore e sito produttivo. Questa procedura spettroscopica è non-distruttiva, semplice e di rapida esecuzione e costituisce una valida alternativa ad altre metodiche di laboratorio più costose e laboriose.

ABSTRACT

Chemical composition, nutritional and organoleptic profiles of the dairy products are affected by the farm system. Replacing silages with hays and fresh grass and grazing on alpine pastures are sustainable practices that improve dairy products quality. The scientific community is elaborating analytical methods to certificate healthiness and sustainability of the food productions. This study aims to describe some studies about dairy products traceability, focusing on the effectiveness of the following analysis techniques:

- *DART-HRMS profiles obtained from two polar/non-polar cow milk dilutions to identify putative discriminative biomarkers according to different dietary forage types.*
- *Multivariate models to evaluate how the fatty acids content of milk correlates to botanical origin, conservation method and quantity of forages in the cow's diet.*
- *Mid Infrared (MIR) spectroscopy to test the effect of summer grazing on the concentration of fatty acids in the milk.*
- *Lipid composition to discriminate between the main production systems of Asiago PDO cheese.*
- *¹H NMR technique coupled with multivariate canonical discriminant analysis (CDA) to discriminate pasture-based alpine Asiago cheese of different maturation time from analogues processed in the same dairy plant from hay-based milk.*
- *Near Infrared Spectroscopy (NIRS) to discriminate the production chain of Asiago d'Allevo cheese according to chemical composition, color, and productive site. This real-time is non-destructive, easy and fast to execute and is a reliable alternative to more expensive and time-consuming lab determinations.*

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. L'alimentazione delle bovine da latte.....	9
1.2. Gli allevamenti delle bovine da latte in pianura e nelle Alpi.....	14
1.3. La produzione lattiero-casearia.....	16
1.4. La sostenibilità ambientale delle produzioni lattiero-casearie.....	17
1.5. Le metodiche analitiche per la tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari.....	18
1.5.1. DART-HRMS.....	19
1.5.2. Modelli multivariati.....	19
1.5.3. Spettroscopia MIR.....	20
1.5.4. Biomarkers lipidici.....	21
1.5.5. ¹H NMR.....	21
1.5.6. Spettroscopia NIR.....	22
2. MATERIALI E METODI.....	23
2.1. DART-HRMS.....	23
2.2. Modelli multivariati.....	28
2.3. Spettroscopia MIR.....	31
2.4. Biomarkers lipidici.....	33
2.5. ¹H NMR.....	35
2.6. Spettroscopia NIR.....	37
3. RISULTATI.....	39
3.1. DART-HRMS.....	39
3.2. Modelli multivariati.....	41
3.3. Spettroscopia MIR.....	43
3.4. Biomarkers lipidici.....	45
3.5. ¹H NMR.....	47
3.6. Spettroscopia NIR.....	49
4. DISCUSSIONE.....	53
4.1. DART-HRMS.....	53
4.2. Modelli multivariati.....	56

4.3. Spettroscopia MIR.....	58
4.4. <i>Biomarkers</i> lipidici.....	60
4.5. ^1H NMR.....	61
4.6. Spettroscopia NIR.....	62
5. CONCLUSIONI.....	65
6. BIBLIOGRAFIA.....	68

1. INTRODUZIONE

1.1. L'alimentazione delle bovine da latte

I bovini sono ruminanti e presentano un tratto digestivo sostanzialmente diverso rispetto a quello degli altri mammiferi. Si nutrono prevalentemente di componenti vegetali altamente fibrose (gambi e foglie) e per digerirle si avvalgono di protozoi, batteri e funghi che colonizzano i loro prestomaci ed intestino. Questi ospiti simbiotici trovano nel reticolo-rumine un microambiente ideale alla digestione delle fibre mediante fermentazione microbica e produzione di acidi grassi prevalentemente a corta catena, come acetato, propionato e butirrato, che possono essere poi utilizzati dall'ospite. L'acido lattico viene rilasciato solo in minime quantità, a meno che il pH ruminale non scenda sotto il 6.0.

In allevamento ai bovini vengono somministrati alimenti freschi o, più comunemente, conservati essiccati o sottoforma di insilato. L'insilato è il prodotto che si ottiene sottoponendo la massa vegetale ad un processo di fermentazione anaerobica controllata, durante il quale vengono prodotti acido lattico, acido acetico ed acido butirrico. L'essiccazione ed il pH acido prevengono la crescita di microrganismi dannosi.

L'alimentazione dei ruminanti consiste prevalentemente di carboidrati (oltre il 70%) derivanti dalle componenti vegetali fibrose (emicellulosa, cellulosa, lignina) e non fibrose (zuccheri ed amido). Le proteine costituiscono circa il 10-20% della dieta, i grassi meno del 3%. Le cellule microbiche risultanti dalla digestione ruminale dei carboidrati in condizioni anaerobiche sono la principale fonte di proteine e vitamine.

Mentre la fermentazione dei carboidrati derivanti dalle fibre è un processo relativamente lento, i carboidrati non fibrosi vengono facilmente e rapidamente fermentati. Ed è soprattutto durante la fermentazione di questi ultimi che gli acidi grassi a corta catena sono rilasciati in abbondanza, con conseguente forte impatto sul pH ruminale. Per mantenere un pH ottimale gli acidi grassi a corta catena devono essere assorbiti dalle pareti ruminali e proseguire attraverso l'orifizio reticolo-omasale lungo il tratto intestinale. Il contenuto fibroso della dieta stimola fortemente la ruminazione, che consiste nel rigurgito dell'ingesta che dal reticolo-rumine torna in bocca dove viene

ulteriormente masticata e poi di nuovo ingoiata. Mentre ruminata l'animale produce una grande quantità di saliva ricca di bicarbonato, essenziale per il mantenimento del corretto pH ruminale. Esiste una stretta correlazione tra il tempo di masticazione durante la ruminazione e il contenuto di fibra nella dieta.

I foraggi possono suddividersi in due principali categorie: legumi ed erbe. I legumi contengono molte proteine e, soprattutto a livello di foglia, sono una preziosa fonte di vitamine. Le erbe sono più diffuse e resistenti dei legumi, possono tollerare climi umidi, freddi e suoli poveri di nutrienti. Grano, avena, orzo sono impiegati in piccola misura come foraggi altamente fibrosi.

Il fattore che più influenza il valore nutritivo dei foraggi è il loro stadio di maturazione al momento del raccolto. Con il passare del tempo, la proporzione di stelo della pianta aumenta mentre la proporzione di foglie diminuisce. Gli steli sono ricchi di fibre e poveri di proteine, carboidrati solubili, vitamine e minerali. I foraggi grezzi contengono un'alta percentuale di NDF (*Neutral Detergent Fiber*), il materiale rimanente dopo aver bollito un campione di alimento in una soluzione detergente neutra, costituito prevalentemente da lignina, emicellulosa e cellulosa. Una corretta percentuale di NDF è di importanza essenziale nella dieta dei bovini, perché stimola fortemente la ruminazione e quindi la produzione di saliva per il mantenimento del pH ruminale. Il livello di NDF nella dieta è un parametro importante da tenere in considerazione nella formulazione delle razioni. Per stimare l'ammontare minimo di fibra necessario ed il livello di masticazione determinato da un certo alimento sono stati proposti molti sistemi (Mertens, 2002). Tra questi, l'NDF fisicamente efficace (peNDF) prende come riferimento particelle di fieno di una data lunghezza corrispondenti a NDF fisicamente efficace al 100% (quattro ore di masticazione per kg di fieno. Mertens, 1997). Tale sistema è particolarmente interessante perché evidenzia la stretta correlazione tra il peNDF ed il pH ruminale. Il peNDF di ogni alimento si ottiene moltiplicando il coefficiente di fibra fisicamente efficace (*physically effective fiber*, pef) per la concentrazione di NDF. Come proposto da Mertens (1997) il valore di pef per una data sostanza può essere stimato da tabelle o misurando la proporzione di materia secca trattenuta da setacci oscillanti verticalmente (>1.18mm). Allo stesso modo si può ricavare la concentrazione di NDF. Il peNDF >1.18mm di un alimento si determina moltiplicando il corrispondente pef per il livello di NDF misurato o la percentuale >1.18mm trattenuta dal filtro per la concentrazione di NDF. La

conclusione di queste analisi è che, per mantenere un pH ruminale medio di 6.0, la dieta delle bovine da latte dovrebbe contenere almeno il 22% di peNDF >1.18mm. Altri studi analizzano misurazioni continue del pH ruminale senza riscontrare un effetto significativo dovuto alle varie percentuali di peNDF e alla dimensione delle particelle di foraggio, ma evidenziando una chiara correlazione tra la masticazione e la quantità di peNDF (Yang *et al.*, 2001; Yang and Beauchemin, 2006). Quindi, secondo questi autori e diversamente da quanto concluso in precedenza, il peNDF risulta essere un indicatore più accurato dell'attività masticatoria che del pH (Yang and Beauchemin, 2006). Inoltre, l'aumentata attività masticatoria non incrementa sensibilmente la produzione giornaliera di saliva per il fatto che la maggiore masticazione durante l'alimentazione e la ruminazione viene controbilanciata da una ridotta salivazione nei periodi di masticazione assente (Maekawa *et al.*, 2002). Anche quando le diete sono formulate per contenere sufficienti quantitativi di fibra e fibra fisicamente efficaci, la capacità tampone del rumine può non risultare sufficiente per la tendenza degli animali a scartare le particelle lunghe a favore di quelle più corte (Calberry *et al.*, 2003; Leonardi and Armentano, 2003).

La *clearance* degli acidi dal rumine è influenzata dalla dimensione e dalla densità delle papille ruminali, che ne determinano la velocità di assorbimento (Van Soest, 1994). Le vacche che hanno da poco partorito sono a maggiore rischio di acidosi ruminale subacuta (SARA) rispetto a quelle in media ed avanzata lattazione, per il fatto che durante il periodo di asciutta la lunghezza e la densità delle papille ruminali diminuisce (Dirksen *et al.*, 1985) con conseguente riduzione fino al 50% della capacità del rumine di assorbire gli acidi. Sono necessarie diverse settimane affinché questa capacità venga ripristinata con la reintroduzione di diete altamente concentrate e l'aumento della concentrazione e dell'assorbimento degli acidi grassi volatili, in particolare il butirrato (Dirksen *et al.*, 1985).

I mangimi cosiddetti "concentrati" sono ricchi di carboidrati (zuccheri ed amido o carboidrati non strutturati, NSC) ad elevato contenuto energetico per la presenza di fibre altamente digeribili (polpa di barbabietola ed agrumi, macinati) contenenti anche pectina. I concentrati possono anche avere alte percentuali di proteine (concentrati proteici, >20% di proteina grezza di origine vegetale o animale) o di proteine e grassi (olio di semi). I concentrati altamente energetici sono miscele di cereali e l'amido in essi contenuto è fermentato nel rumine. Il tasso di fermentazione può variare notevolmente a seconda delle

condizioni chimiche (più amilopectina che amilosio), fisiche (più semi immaturi ed umidi che maturi ed essiccati), trattamenti fisico-termo-meccanici (più fiocchi che farine che schiacciati). In generale il grano fermenta più dell'orzo e molto più del mais e del sorgo. Questi ultimi due cereali sono particolarmente sensibili agli effetti dei trattamenti. Altri sottoprodotti impiegati quali fonti di energia sono gusci di mandorle, spremitura di mele ed agrumi, farina di cocco, polpa di barbabietola, residui della produzione da forno, granaglie di scarto di birrifici e distillerie. I sottoprodotti vengono solitamente fermentati bene, anche se più lentamente. I metaboliti finali del processo sono gli acidi grassi volatili, con l'esclusione dell'acido lattico. Pochi sono gli alimenti molto ricchi di zuccheri (melassa e siero del latte) ed il loro tasso di fermentazione è estremamente alto. I concentrati proteici derivano dagli olii di semi (soia, canola, girasole, lino, cotone) o dai semi dei legumi (fave, piselli). Alcuni sottoprodotti dei cereali possono essere altamente proteici (farina di glutine di mais, farina di germe di grano o mais). Prima della BSE, venivano impiegati anche sottoprodotti di origine animale, come farine di carne, di ossa, di sangue e di pesce, ma attualmente nella dieta dei ruminanti questi non sono più ammessi. Vengono utilizzate delle fonti non proteiche di azoto (urea, ammoniaca, sali) per il fatto che rilasciano ammoniaca e possono essere trasformate dai microrganismi ruminali per la sintesi di aminoacidi e proteine. Le proteine alimentari si possono caratterizzare per la degradabilità ruminale e, relativamente alla parte non degradabile, per la digeribilità e la composizione amminoacidica. Relativamente alla composizione chimica, le prolamine sono meno degradabili delle albumine e globuline; considerando l'anatomia della pianta, le proteine derivanti dalle foglie verdi sono più degradabili di quelle dei semi; in quanto alla tecnica di conservazione, è maggiore la degradabilità delle proteine degli insilati rispetto a quelle del fieno; infine, i trattamenti termici (soprattutto se $>130^{\circ}\text{C}$) o alcuni agenti chimici (formaldeide) tendono a diminuire la degradabilità ruminale delle proteine.

Gli olii di semi possono essere utilizzati tali e quali (semi di cotone) o previo trattamento termo-meccanico (fiocchi di soia). In entrambi i casi sono ricchi di proteine (più del 20 e del 30% rispettivamente) e di grassi (circa il 20%). L'elevato contenuto di fibra ben digeribile dei semi di cotone è utile per gli animali ad alto rendimento.

Per quanto riguarda i grassi, generalmente la loro proporzione è bassa nelle razioni alimentari delle bovine da latte. Piccoli quantitativi di grassi vengono somministrati per

aumentare il rifornimento di energia o di specifici acidi grassi, utili per metabolismo, sistema immunitario e *performances* riproduttive. Sono fonte di grassi i prodotti di origine animale (sego), i derivati marini (alghe, olio di pesce), le granaglie (semi di lino, semi di cotone). Il sego contiene acidi grassi saturi (C16, C18), mentre gli acidi grassi insaturi si trovano prevalentemente negli olii vegetali (olio di semi di lino, C18:3 n3; olio di semi di girasole, C18:2 n6) o nei prodotti marini (ricchi in acidi grassi poli-insaturi omega 3). Tuttavia, è necessario tenere in considerazione il fatto che grandi quantità di acidi grassi insaturi vengono saturati durante i normali processi di bio-idrogenazione ruminale rimanendo così solo parzialmente disponibili per l'animale.

L'ammontare di macro-minerali (calcio, magnesio, fosforo e sodio), elementi in traccia (selenio, rame, zinco, manganese, ferro, iodio, cobalto) e vitamine (vitamina E, vitamina D, vitamina A o il suo precursore β -carotene) può variare notevolmente nelle razioni a seconda del tipo di alimento, del periodo di raccolta, della qualità del suolo e dei processi di conservazione. Solitamente le integrazioni di minerali, microelementi e vitamine sono necessarie. I componenti della dieta possono essere analizzati per valutarne la composizione e fornire supplementi in quantità adeguata. I minerali vengono comunemente integrati con sostanze inorganiche (bicarbonato di sodio; ossido di calcio, di carbonato, di magnesio) mentre per gli elementi in traccia si possono fornire sostanze sia inorganiche che organiche.

Le bovine da latte durante la lattazione hanno generalmente un bilancio energetico negativo e la massimizzazione dell'assunzione di sostanza secca è una delle questioni chiave nelle pratiche di allevamento. Il cibo deve essere reso disponibile e facilmente accessibile nel corso dell'intera giornata per garantire l'ottimale DMI (*dry matter intake*). La dieta va bilanciata allo scopo di fornire il corretto apporto energetico e proteico e la fibra fisicamente efficace deve essere sufficiente a mantenere una buona fermentazione ruminale.

In passato, e nelle piccole aziende anche ai giorni nostri, era uso comune fornire le diverse componenti della dieta separatamente. Le vacche nutrite con foraggi, ricchi di NDF (*neutral detergent fiber*), e concentrati, fonte di NFC (*non fiber carbohydrates*) facilmente fermentescibili, tendono a preferire i secondi a scapito dei primi. Questo le rende soggette alle sopracitate variazioni del pH ruminale e conseguente aumento del

rischio di incorrere in SARA (*sub acute ruminal acidosis*), ragione per cui sono state formulate le cosiddette razioni miste. Con il TMR (*total mixed ration*) tutte le componenti della dieta (concentrati, fibre, supplementi, misti di minerali e vitamine) sono mescolate insieme. Il mescolamento viene effettuato sulla base di precisi calcoli alimentari all'interno dei carri miscelatori. Per garantire un rimescolamento completo di foraggi, concentrati ed integratori, diversi anche per dimensioni, i foraggi devono essere sezionati in particelle di circa 18mm. Quando la lunghezza dei foraggi è maggiore, i vari componenti tendono a separarsi permettendo alle bovine di selezionare ed assumere preferibilmente le parti più appetibili scartando il resto. Le razioni vengono mescolate e fornite agli animali tre volte al giorno. Il buon mantenimento dei carri miscelatori è fondamentale affinché il mescolamento sia preciso. Per ottimizzare l'uniformità della razione è importante che il contenuto di acqua sia pari al 40-50%. Il concentrato è fornito anche separatamente, in maniera computerizzata, più volte al giorno ed in piccole quantità allo scopo di evitare un sovraccarico di NFC rapidamente fermentescibili e le fluttuazioni del pH ruminale che ne conseguirebbero. Le vacche vengono riconosciute individualmente al distributore di concentrati mediante un transponder localizzato a livello auricolare o di collare. Il numero di distributori deve essere proporzionato al numero di animali. Prima che venga fornita la nuova razione sarebbe auspicabile ripulire la mangiatoia. Un numero adeguato di postazioni ed uno spazio sufficiente in mangiatoia (non meno di 60cm/capo; De Vries *et al.*, 2004) sono condizioni indispensabili a garantire il corretto nutrimento, limitando i tempi di attesa, la competizione e lo stress.

1.2. Gli allevamenti delle bovine da latte in pianura e nelle Alpi

L'allevamento delle bovine da latte nelle pianure dell'Italia settentrionale si basa prevalentemente su vacche ad alto merito genetico (Frisone) stabulate *indoor* e nutrite con TMR costituite principalmente da insilato di mais. In tempi recenti, con il duplice obiettivo di aumentare la qualità nutrizionale del latte e di mitigare l'impatto ambientale negativo delle monoculture di mais, la TMR viene integrata con fieno ottenuto da prati permanenti ed insilati di foraggi di erbe (loietto italiano), cereali (sorgo, frumento) e legumi (erba medica; Lanza *et al.*, 2021).

Diversamente dalla pianura, le Alpi presentano peculiari caratteristiche geografiche e climatiche che non consentono di coltivare molte varietà vegetali e l'allevamento di

ruminanti capaci di nutrirsi e produrre latte basandosi sulle risorse naturalmente offerte dal territorio è da sempre parte integrante dell'economia locale (Bonsembiante e Cozzi, 2003). Per molti anni, i vari allevamenti di montagna hanno avuto in comune il fatto di tenere gli animali all'interno di fienili posti a valle durante l'autunno, l'inverno e la primavera e di trasferirli sui pascoli d'alta montagna in estate. Si tratta di un sistema di allevamento estensivo, basato sul consumo di foraggi locali e su una relazione intima tra gli animali ed il territorio (Andrighetto *et al.*, 1996). Le bovine allevate estensivamente in montagna appartengono tipicamente a razze rustiche (Simmenthal, Bruna alpina, Grigia alpina, Valdostana) che si adattano bene alle difficoltà dell'ambiente ma la cui produttività è bassa. A partire dagli anni Sessanta, con l'affermazione delle attività industriali a scapito di quelle rurali, i tradizionali allevamenti alpini sono andati incontro ad una profonda crisi e sono stati progressivamente abbandonati. Questo fenomeno è stato particolarmente evidente nelle montagne venete, dove ha interessato l'80% degli allevamenti nell'arco di trent'anni (Cozzi and Bizzotto, 2004). Il disuso dei pascoli ha amplificato molte problematiche ambientali, quali l'erosione del suolo ed il rischio di valanghe e di incendi, oltre a determinare il peggioramento estetico del paesaggio alpino (Viola, 1989). La crisi è stata aggravata dall'affermarsi del nuovo modello produttivo di tipo intensivo, che ha preso piede anche in ambiente montano, con conseguenze negative determinate, in particolar modo, dall'impiego di bovine altamente produttive, per le cui esigenze energetiche i foraggi locali non risultano sufficienti. Bizzotto, in uno studio condotto nel 2003, ha messo a confronto i due sistemi produttivi, quello tradizionale (estensivo) e quello intensivo praticati nella zona di Asiago (Veneto) ed ha evidenziato che nella seconda modalità l'alimento prodotto altrove e comprato dagli allevatori rappresenta oltre il 75% della razione consumata dalle bovine in lattazione. Questa percentuale non varia neppure durante la stagione estiva, quando gli animali dovrebbero essere in grado di soddisfare il loro fabbisogno energetico pascolando. Negli allevamenti estensivi, invece, la dipendenza dall'acquisto di prodotti all'esterno si riduce al 40% durante l'autunno, l'inverno e la primavera e scende al 20% in estate.

Il sistema di allevamento alpino tradizionale è sostenibile e contribuisce alla conservazione del paesaggio, al richiamo del turismo ed alla qualità dei prodotti caseari che ne derivano (Mack *et al.*, 2013; Niero *et al.*, 2018). La pratica del pascolo migliora il benessere degli animali, che ne beneficiano in termini di salute e di comportamento (Arnott *et al.*, 2016). Tuttavia, come precedentemente descritto, i prati naturali non

soddisfano i fabbisogni di bovine appartenenti a razze altamente produttive, le quali vanno incontro a bilancio energetico negativo, con conseguenti deperimento fisico e calo della produttività. Questi animali, ed in particolare le Frisone, selezionate per una produzione di latte estremamente spinta, richiedono la somministrazione di concentrati (Bovolenta *et al.*, 2002; Romanzin *et al.*, 2018) e difficilmente si mantengono in buona salute pascolando libere in ambiente montano (Leiber *et al.*, 2006).

1.3. La produzione lattiero-casearia

La qualità del latte è influenzata da molti aspetti produttivi e biologici (Melzer *et al.*, 2013), la razza, la stagione, il numero e lo stadio di lattazione (Bär *et al.*, 2020; O'Callaghan *et al.*, 2016); tra questi l'alimentazione è certamente il fattore più determinante, il punto di partenza del processo metabolico che dai nutrienti porta alla secrezione della ghiandola mammaria (Lamanna *et al.*, 2011). L'area geografica di appartenenza ed il metodo di conservazione dei foraggi possono modificare la composizione chimica del latte, gli acidi grassi, le vitamine liposolubili, i composti azotati, gli acidi organici (Borreani *et al.*, 2013; Croissant *et al.*, 2007; O'Callaghan *et al.*, 2016). Il sapore dei prodotti caseari risente dell'origine dei foraggi, soprattutto quando si tratta di fieni polifitici, che sono fonte di acidi grassi poli-insaturi (PUFA) ed altri precursori dei composti volatili aromatici (terpeni, carotenoidi; Mordenti *et al.*, 2017).

Il sopracitato sistema alpino garantisce la produzione di latte nutrizionalmente molto valido, che viene processato per produrre formaggi DOP (Denominazione di Origine Protetta; Lora *et al.*, 2020). La Denominazione di Origine Protetta è un'etichetta creata dall'Unione Europea allo scopo di salvaguardare e promuovere prodotti alimentari di alta qualità di specifiche aree geografiche, costituiti da ingredienti locali e processati secondo una metodologia riconosciuta, peculiare della zona di provenienza e rigorosamente definita (Commissione Europea, 2012). L'Unione Europea ha assegnato l'etichetta DOP ad oltre 180 formaggi che rappresentano una porzione rilevante del mercato caseario globale. L'Italia è il paese che vanta il maggiore numero di formaggi DOP, di 50 differenti varietà (DOOR, 2018). Tra quelli derivati dal latte vaccino, l'Asiago è il quarto formaggio DOP più prodotto a livello nazionale, con circa 21000t prodotte e 1700t esportate, prevalentemente negli Stati Uniti, in Svizzera, in Australia, in Germania ed in Francia. L'Asiago DOP viene prodotto nell'altopiano di Asiago, nelle Prealpi orientali italiane, ed

il processo produttivo è descritto e protetto “dalla terra alla tavola” da ufficiale regolamento (Consorzio per la Protezione del Formaggio Asiago, 2006), che definisce l’origine geografica del latte e la produzione. Come per molti altri formaggi DOP, le linee-guida non riguardano la modalità di allevamento, salvo poche indicazioni che vietano l’uso di specifici sottoprodotti nell’alimentazione delle bovine. Tuttavia, è ormai riconosciuto che il sistema di allevamento influenza la composizione del latte ed il profilo nutrizionale ed organolettico dei prodotti caseari (De Marchi *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2010; Gulati *et al.*, 2018).

1.4. La sostenibilità ambientale delle produzioni lattiero-casearie

Acquisisce crescente importanza il concetto di sostenibilità ambientale nella produzione degli alimenti ed i produttori cominciano a prestare grande attenzione all’uso efficiente delle risorse allo scopo di realizzare prodotti *eco-friendly* in grado di rispondere alle richieste dei consumatori che hanno sempre più a cuore la questione ambientale (Dalla Riva *et al.*, 2018). Prendono così piede nel mercato prodotti quali il “Latte Nobile” (Campania, Italia) ed il “Latte Fieno” (Austria), provenienti da animali allevati con metodi tradizionali e sostenibili, che escludono la somministrazione di insilati e mangimi geneticamente modificati.

Le ripercussioni ambientali del settore zootecnico, uno dei più importanti a livello europeo ed italiano, negli ultimi decenni sono cresciute parallelamente all’aumento della domanda alimentare ed all’intensificazione delle *performances* produttive (Garnett, 2009; Iribarren *et al.*, 2011). La zootecnia è responsabile del 18% delle emissioni globali di GHG (*GreenHouse Gas*, gas serra; FAO, 2006), che hanno determinato ad oggi un innalzamento di 2°C delle temperature globali rispetto ai livelli preindustriali. Mitigare l’impatto ambientale risulta pertanto imperativo e la comunità scientifica sta elaborando metodi di valutazione della sostenibilità delle attività umane (Thomassen and De Boer, 2005). Uno degli strumenti elaborati a tale scopo è il *Life Cycle Assessment (LCA)*, definito come la compilazione e valutazione, attraverso tutto il ciclo di vita, dei flussi in entrata ed in uscita di energia e materiali, nonché dei potenziali impatti ambientali di un prodotto (*Principles and frameworks* delle norme UNI EN ISO 14040, 2006). Si tratta di una procedura standardizzata finalizzata a identificare le conseguenze ambientali del ciclo di vita di un prodotto, stimando gli impatti generati dall’intera catena di produzione

(González-García *et al.*, 2013). Le applicazioni del LCA nel settore agroalimentare sono numerose e comprendono anche l'industria lattiero-casearia.

Alla luce delle precedenti considerazioni, risulta chiara l'importanza di preservare la produzione lattiero-casearia alpina, il cui futuro dipende dalla salvaguardia di un sistema di allevamento estensivo, sostenibile dal punto di vista ambientale ed economico ed *animal-friendly* (Cozzi and Bizzotto, 2004). Le caratteristiche principali di questa modalità di allevamento sono:

- l'impiego di razze bovine robuste e ben adattabili all'ambiente, anche se meno produttive;
- l'ottimizzazione dello sfruttamento dei pascoli naturali;
- la gestione delle mandrie sincronizzata con la qualità e disponibilità delle risorse alimentari: la stagione dei parti dovrebbe coincidere con il tardo autunno/inizio dell'inverno quando le bovine sono all'interno delle stalle e vengono alimentate con diete più ricche di concentrati, sufficientemente energetiche da soddisfare i fabbisogni di inizio lattazione. I pascoli estivi sono indicati per le vacche gravide, a fine lattazione o in asciutta.

Per la crescita e lo sviluppo di questo sistema di allevamento estensivo sono di fondamentale importanza le sovvenzioni pubbliche, che dovrebbero essere proporzionali al servizio ambientale offerto. Un ulteriore prezioso contributo deriva dal riconoscimento delle indicazioni geografiche, delle denominazioni d'origine (DOP, IGP) e della conversione dell'allevamento in sistema biologico. I consumatori apprezzano anche la certificazione "*welfare friendly*", a dimostrazione che il prodotto proviene da un allevamento rispettoso delle relazioni tra gli animali e l'ambiente circostante.

1.5. Le metodiche analitiche per la tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari

La sostenibilità ambientale degli allevamenti tradizionali di montagna ed il valore delle produzioni lattiero-casearie alpine richiedono di essere riconosciute e validate e la comunità scientifica si sta dedicando allo studio e all'elaborazione di metodiche analitiche che possano rispondere a queste esigenze. L'obiettivo del presente lavoro è prendere in esame alcuni studi relativi alla tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari, focalizzando l'attenzione sull'efficacia delle procedure da questi adottate.

1.5.1. DART-HRMS

La spettroscopia di massa viene impiegata per indagare gli aspetti nutrizionali (Boudonck *et al.*, 2009; Foroutan *et al.*, 2019), i sistemi alimentari (Craigie *et al.*, 2013) e lo stato di salute dei bovini (Barreiro *et al.*, 2018; Langoni *et al.*, 2017). Questa metodica può fornire un quadro dettagliato della composizione degli alimenti e consentire la caratterizzazione di un grande numero di matrici biologiche (Segato *et al.*, 2019). La recente introduzione della ionizzazione ha notevolmente semplificato la procedura ed accorciato i tempi dell'analisi (Mirabelli *et al.*, 2019). L'analisi diretta in tempo reale accoppiata alla spettroscopia di massa ad alta risoluzione (DART-HRMS) in ambiente ionizzato permette una rapida caratterizzazione delle origini degli alimenti (Miano *et al.*, 2018), un controllo attento della sicurezza alimentare (Hajslova *et al.*, 2011) ed una differenziazione accurata del latte di capra, pecora, vacca e di altre matrici casearie (Hrbek *et al.*, 2014; Morlock and Schwack, 2006). Nello studio di Riuzzi *et al.* (2021) vengono analizzati i profili DART-HRMS ottenuti da due diluizioni di latte vaccino polare e non-polare per identificare i *biomarkers* espressi con tre diverse modalità di dieta. Gli studiosi ipotizzano che l'analisi DART-HRMS accoppiata ad un approccio di fusione dei dati di livello medio sia in grado di distinguere efficacemente i campioni di latte sulla base della tipologia di dieta adottata. Considerando l'elevato valore del latte alpino (Cifuni *et al.*, 2022), la validazione del sistema DART-HRMS ed il suo impiego possono essere di grande vantaggio.

1.5.2. Modelli multivariati

In un altro lavoro del 2021, Riuzzi *et al.* individuano la correlazione tra il contenuto di acidi grassi del latte e l'origine botanica, il metodo di conservazione, la proporzione dei foraggi forniti con la dieta. Mediante l'applicazione di modelli multivariati si può infatti prevedere l'impatto dei diversi foraggi sul processo metabolico che dal ruminante va alla ghiandola mammaria e che è responsabile del rilascio degli acidi grassi nel latte. Il latte contiene oltre 400 diversi acidi grassi, di varie lunghezza e saturazione. Alcuni di questi hanno un impatto negativo sulla salute umana e da ciò scaturisce una certa preoccupazione legata al consumo di latticini. Molti altri, tuttavia, come dimostrato da diverse ricerche, sono noti per le loro proprietà benefiche (Faulkner, 2018); tra questi gli

acidi grassi a corta catena ($\leq C10$), l'acido linoleico coniugato (CLA), gli acidi omega-3 (n-3) polinsaturi (PUFA), gli acidi grassi a catena dispari e ramificati (Pereira, 2014; Haug *et al.*, 2007). Gli acidi grassi a corta catena svolgono attività antivirale ed hanno un effetto ritardante sulla crescita tumorale (Astakhova, 2016; Ghosh, 2012). Molti studi evidenziano l'impatto dell'alimentazione delle bovine sulla composizione di acidi grassi del latte (Bär *et al.*, 2020; O'Callaghan *et al.*, 2016). Negli allevamenti intensivi di pianura, gli animali alimentati con foraggi provenienti dai prati producono latte più ricco di acidi grassi benefici, quali CLA e n-3, rispetto a quelli che si nutrono prevalentemente di insilati di mais. Queste differenze sono più marcate quando le bovine pascolano libere (O'Callaghan *et al.*, 2016), ma si rilevano anche quando vengono fornite razioni miste contenenti i foraggi provenienti dai sopraccitati pascoli (Bär *et al.*, 2020). Il ruolo della tipologia di foraggio e del metodo di conservazione, in particolare dell'insilamento, sul metabolismo ruminale degli acidi grassi è oggetto di dibattito. O'Callaghan *et al.* (2016) riportano concentrazioni relativamente alte di C18:2 n-6, C18:3 n-6, C22:0, C22:1 n-9 e C18:2 *c*-10, *t*-12 con diete basate sia sul fieno d'erba che sull'insilato di mais, quando queste sono arricchite con alti livelli di concentrati. Aumentando la proporzione di foraggi polifitici freschi o insilati si ha un significativo incremento di n-3, CLA ed acido vaccenico (VA, C18:1 *t*-11), anche se le bovine sono stabulate all'interno ed alimentate a base di TMR (Bär, 2020).

1.5.3. Spettroscopia MIR

Anche la *Mid Infrared Spectroscopy* (MIR) ha trovato interessante impiego nella delineazione di varie caratteristiche del latte, tra cui il contenuto di acidi grassi (De Marchi *et al.*, 2014). Niero *et al.* (2021), in particolare, la utilizzano per indagare gli effetti del pascolamento estivo sulla concentrazione degli acidi grassi individuali e di gruppo, nell'ipotesi che il profilo degli acidi grassi del latte prodotto dalle bovine lasciate libere al pascolo risponda meglio al fabbisogno nutrizionale dei consumatori. Questo permetterebbe di valorizzare ulteriormente tale modalità di allevamento.

1.5.4. *Biomarkers lipidici*

Un'altra metodica si focalizza sulla frazione lipidica dei prodotti caseari, la quale gioca un ruolo rilevante nella caratterizzazione degli aspetti nutrizionali (Parodi *et al.*, 2004) ed organolettici (Giaccone *et al.*, 2016; Romanzin *et al.*, 2016) degli stessi. Nell'ambito della Comunità Europea, l'identificazione dei formaggi DOP di alta qualità è oggetto di grande interesse per produttori, consumatori ed organi legislativi. L'individuazione di *biomarkers* in grado discriminare i formaggi gli uni dagli altri permette di scongiurare il rischio di incorrere in frodi. Recentemente, è stato dimostrato che gli acidi grassi del latte e le vitamine liposolubili possono essere indagati per risalire alle diverse diete fornite alle bovine da latte (Romanzin *et al.*, 2016; Vicente *et al.*, 2017; Adler *et al.*, 2013). Di conseguenza, l'analisi della frazione lipidica per l'identificazione di *biomarkers* permette di tracciare in modo promettente i diversi processi che portano alla produzione di un dato formaggio. Segato *et al.* (2017) applicano questa metodica per individuare nell'Asiago DOP *biomarkers* che consentano di discriminare tra i principali sistemi produttivi.

1.5.5. ^1H NMR

In un altro lavoro del 2019, Segato *et al.* trattano una diversa tecnica analitica, la risonanza magnetica nucleare protonica ad alta risoluzione (^1H NMR) e ne valutano la validità nel distinguere l'Asiago DOP prodotto da latte di vacche al pascolo da formaggi simili ma ottenuti da animali nutriti diversamente. Relativamente alla cagliata ed alla maturazione, l'Asiago DOP si distingue in Pressato (con un tempo di maturazione breve, compreso tra 20 e 90 giorni) ed Allevato (caratterizzato da una maturazione più lunga, una *texture* più dura, un sapore più forte e caratteristico). Per andare incontro alla richiesta dei giovani consumatori che prediligono sapori più delicati, alcuni caseifici hanno limitato il tempo di maturazione dell'Asiago Allevato, soprattutto quando ottenuto da latte di animali al pascolo. Tra le varie tipologie di Asiago DOP, i formaggi ottenuti dalle mandrie al pascolo si riconoscono per la frazione lipidica e la componente acquosa ricche di nutrienti funzionali e sostanze aromatiche (Corazzin *et al.*, 2019; Segato *et al.*, 2017). Questi prodotti vengono premiati dal mercato perché i consumatori ne riconoscono ed apprezzano le caratteristiche di salubrità e sostenibilità (Repar *et al.*, 2018; Gianelle *et al.*, 2018) ed è crescente la richiesta di salvaguardarne l'autenticità. A questo scopo, la tecnica ^1H NMR rappresenta uno strumento promettente per il *fingerprinting* metabolico

di latte e derivati ed è in grado di fornire un quadro completo di un grande numero di metaboliti (Scano *et al.*, 2019). Tale metodica viene applicata a campioni commerciali di latte vaccino per discriminarli in base alle proprietà nutrizionali degli stessi (Foroutan *et al.*, 2019), all'alimentazione degli animali (O'Callaghan *et al.*, 2018) ed al processo produttivo (biologico o convenzionale; Tsiafoulis *et al.*, 2019). Inoltre, porta ad interessanti risultati nell'identificazione della provenienza geografica di formaggi bufalini e vaccini (Mazzei and Piccolo, 2012; Consonni and Cagliani, 2008) e nella valutazione del processo di maturazione di due dei principali formaggi DOP italiani, il Parmigiano Reggiano ed il Grana Padano (Consonni and Cagliani, 2008; Lolli *et al.*, 2018). Anche Schievano *et al.* (2008) usano la risonanza magnetica nucleare (NMR) per discriminare formaggi Asiago d'Allevato ottenuti da differenti catene di produzione.

1.5.6. Spettroscopia NIR

Per distinguere formaggi Asiago d'Allevato di catene di produzione diverse, Cozzi *et al.* (2009) si avvalgono invece della *Near Infrared Spectroscopy* (NIRS), tecnica riconosciuta come utile strumento per il controllo *real-time* delle linee di produzione alimentare. Questa procedura spettroscopica non-distruttiva, semplice e di rapida esecuzione, viene impiegata per confrontare la composizione chimica ed il colore di diversi formaggi Asiago d'Allevato e discriminare formaggi provenienti da diversi siti produttivi.

2. MATERIALI E METODI

Allo scopo di confrontare le metodiche analitiche oggetto del presente studio, le procedure adottate nell'ambito di diversi studi sono di seguito descritte.



Figura 2.1. Mappa del Nord-Est Italia

2.1. DART-HRMS

La disanima inizia con lo studio di Riuzzi *et al.* (2021), condotto nel 2018 in Veneto, Nord-Est Italia ($45^{\circ}19'49''$ N $9^{\circ}47'56''$ E. Figura 2.1.) su 14 allevamenti di bovine da latte. Sulla base dei principali regimi alimentari adottati in quest'area, vengono formati tre gruppi, nominati a seconda della componente predominante della *Total Mixed Ration* (TMR): 1) insilato di mais (*mais silage*, MS); 2) misto di insilato e fieno secco permanente (*crop silage/hay*, SH); 3) fieno secco permanente ed erba medica (*grassland hay*, GH). Ogni azienda appartiene ad uno dei tre raggruppamenti. Gli animali allevati sono complessivamente di due razze (Frisona e Bruna) e si distribuiscono omogeneamente tra i gruppi. La dimensione media della mandria in lattazione ed il rendimento di latte (latte corretto per il grasso per vacca al giorno) sono rispettivamente 105 e 31.6 (MS), 84 e 29.8 (SH) e 71 e 28.2 (GH). In tabella 2.1.1 vengono elencati i principali ingredienti e la composizione chimica della TMR. I campioni di TMR sono analizzati per la sostanza secca (*Dry Matter*, DM) e la composizione chimica secondo la procedura AOAC descritta da Andrighetto *et al.* (2018).

Tabella 2.1.1. I principali ingredienti e la composizione chimica della TMR dei tre principali gruppi alimentari. I valori sono dati da media \pm deviazione standard (% sulla sostanza secca, *Dry Matter*). I fieni sono di prati permanenti ed erba medica; altri insilati sono sorgo, frumento, erba medica, loglio italiano; i concentrati amilacei comprendono prevalentemente prodotti del mais; i concentrati proteici sono costituiti da derivati della soia e del girasole; i residui sono paglia, crusca, polpa di barbabietola, un misto di vitamine e minerali.

	Insilato di mais (MS)	Insilato e fieno (SH)	Fieno, erba medica (GH)
Ingredienti (g/100g DM)			
Insilato di mais	32 (± 9)	8 (± 11)	0 (± 0)
Fieni	8 (± 3)	13 (± 9)	52 (± 10)
Erba verde appena falciata	0 (± 0)	3 (± 7)	8 (± 6)
Altri insilati	11 (± 9)	28 (± 10)	1 (± 3)
Concentrati amilacei	29 (± 4)	31 (± 9)	28 (± 8)
Concentrati proteici	15 (± 6)	14 (± 9)	8 (± 6)
Residui	5 (± 4)	3 (± 2)	3 (± 4)
Composizione chimica			
DM (g/100g)	55.1 (± 5.4)	58.4 (± 6.2)	69.1 (± 7.0)
Proteina grezza (g/100g DM)	14.0 (± 0.5)	14.0 (± 0.7)	13.6 (± 1.2)
Grasso grezzo (g/100g DM)	2.7 (± 0.5)	2.7 (± 0.4)	2.2 (± 0.8)
Ceneri grezze (g/100g DM)	8.0 (± 0.7)	8.0 (± 0.6)	8.3 (± 1.2)
aNDF (g/100g DM)	36.9 (± 2.3)	38.3 (± 2.2)	41.3 (± 4.8)
ADF (g/100g DM)	21.9 (± 2.0)	21.9 (± 4.3)	22.3 (± 5.1)
Amido grezzo (g/100g DM)	22.4 (± 2.0)	20.7 (± 2.3)	18.9 (± 2.8)

I ricercatori raccolgono 48 campioni di latte grezzo nel corso di quattro campionamenti, uno per stagione. I campioni per gruppo alimentare rispecchiano in proporzione la diffusione delle tre diete in Veneto: MS, n = 24; SH, n = 10; GH, n = 14. La composizione del latte (grasso, proteina, caseina, lattosio ed urea) e le caratteristiche chimiche (pH, β -idrossibutirrato, punto di congelamento) sono analizzati mediante la tecnica FT-MIR (spettroscopia infrarossa trasformata di Fourier) con un MilkoScan FT6000 (Foss Electric A/S, Hillerød, Danimarca). La conta delle cellule somatiche (SCC) è effettuata mediante Fossomatic 5000 (Foss Electric A/S).

Per l'analisi DART-HRMS, i campioni di latte grezzo vengono preparati secondo due diverse procedure. Nella prima, il latte è diluito 20 volte in una soluzione di acqua : metanolo (20 : 80; acqua MilliQ e metanolo HPLCgrade puro al 99.9%, da VWR International, Radnor, PA, USA) e fatto ruotare. Nella seconda, il latte viene diluito 20

volte in etilacetato (puro al 99.9%, Reagenti Carlo Erba, Cornaredo, Italia) e fatto girare. In questo modo vengono diluiti i composti polari (primo protocollo) e quelli non polari (secondo protocollo). L'analisi strumentale è condotta utilizzando una fonte di ioni DART SVP 100 (IonSense, Saugus, MA, USA), in accoppiamento con un Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La fonte di ioni è associata ad un campionatore Dip-it® (IonSense). Per facilitare il passaggio di ioni dalla fonte DART allo spettroscopio di massa viene posto un'interfaccia di vapore dello spessore di 12 mm. Le impostazioni del DART sono le seguenti: voltaggio della griglia 250 V, temperatura 250°C, velocità del campione 0.3 mm s⁻¹, tempo di analisi 0.66 min. I parametri dello spettroscopio di massa sono: obiettivo RF-S 55, temperatura capillare 250°C, tempo massimo di iniezione 10 ms. La risoluzione è impostata a 70000 FWHM ed il range di massa è 75-1125 Da sia positivo che negativo. Nella modalità con gli ioni positivi, sotto l'uscita DART viene posizionata una fiala di soluzione acquosa con 25% di ammoniaca allo scopo di agevolare e stabilizzare la formazione di ioni [M + NH₄]⁺. Tutte le analisi DART-MS sono condotte impostando un controllo automatico di 3 x 10⁶. I puntali Dip-it, caricati con 5 ml di campione ciascuno, si spostano automaticamente alla velocità costante di 0.3 mm s⁻¹ dall'uscita del DART. Il tempo di desorbimento dalla superficie di ogni puntale è di circa 20 s. Ogni campione di latte viene analizzato in triplicato e l'intero spettro in formato RAW viene visualizzato mediante XCalibur QualBrowser software (Thermo Fisher Scientific), convertito in files mzML usando Proteowizard (Holman *et al.*, 2014) e poi aperto con il software mMass (<http://www.mmass.org>), che interpreta i dati della spettroscopia di massa e l'assegnazione degli ioni mediante Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) ed i database di metabolomica umana (www.hmdb.ca). Prima delle analisi statistiche, gli spettri di quattro *dataset* (i due solventi di estrazione per le due modalità di ioni) sono convertiti in files into.csv grazie al software RStudio 3.6. (RStudio Team, 2016; RStudio Integrated Development for R; RStudio, Inc., Boston, MA, USA). La normalità dei dati della composizione e delle caratteristiche chimiche dei campioni di latte si valuta usando il test Shapiro-Wilk. I dati di SCC non normalmente distribuiti sono sottoposti a trasformazione logaritmica (SCC score) e nuovamente testati. Si applica un modello lineare ANOVA che includa gli effetti fissi della tipologia di dieta (MS, SH, GH) e l'effetto casuale dell'allevamento. I due gradi di libertà del fattore "tipologia di dieta" sono usati per ottenere il seguente *set* di contrasti ortogonali (MS + SH) / 2 vs GH ed MS vs SH. Il primo modello statistico è ricavato usando il software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Il triplicato dello spettro di dati viene

analizzato statisticamente dal software RStudio 3.6.1 e la piattaforma web MetaboAnalyst 4.0 (www.metaboanalyst.ca). Secondo le indicazioni di Gibb and Strimmer (2012), gli spettri vengono aperti usando il pacchetto MALDIquantForeign e normalizzati come corrente totale di ioni (TIC). Si rimuovono gli isotopi con il pacchetto R MALDIrppa ed i segnali ionici di ogni spettro si allineano con una tolleranza di 0.002 Da e sono scartati quando la frequenza è inferiore a 0.9 (Palarea-Albaladejo *et al.*, 2018). Gli ioni sono filtrati ed elencati in un *data-frame* secondo la loro appartenenza ad una specifica modalità di dieta. Si ripete la procedura per ciascuno dei quattro DART-HRMS datasets, come mostrato in figura 2.1.1. I segnali registrati nei quattro *dataset* sono caricati sulla piattaforma web MetaboAnalyst 4.0. I segnali degli ioni con valori mancanti per il 75% sono rimpiazzati con la metà del valore a più bassa intensità registrato. I segnali sono anche normalizzati con il diagramma di Pareto e poi impiegati nella procedura di selezione degli ioni prima della creazione della mappa di calore. Ogni *dataset* normalizzato, con una media di 3000 ioni, è sottoposto a controllo PLS-DA (figura 2.1.1). Inoltre, con un approccio di fusione di dati di livello medio, si uniscono i punteggi (otto componenti ciascuno) dei quattro PLS-DA. I punteggi fusi (trentadue componenti) sono nuovamente sottoposti a PLS-DA (Schwolow *et al.*, 2019). Si suddividono i punteggi fusi in *training* (n = 102) e *test* (n = 42) per valutare l'attendibilità del modello e sul *set* di *training* si effettua l'analisi discriminante lineare (LDA). Il modello LDA così generato viene utilizzato per predire i campioni dei foraggi nel *set* di *test*, che costituisce poi il punto di partenza per la costruzione di una matrice di confusione allo scopo di verificarne la capacità predittiva, come riportato da Bisutti *et al.* (2019). Si valutano i caricamenti ottenuti dal PLS-DA di ciascuno dei quattro *dataset* e si includono solo gli ioni il cui caricamento ha un valore maggiore di 0.3. Il dataset degli ioni fusi viene caricato sulla piattaforma web MetaboAnalyst 4.0 e viene creata la mappa di calore mediante *cluster analysis* gerarchica (HCA) utilizzando la distanza di correlazione di Pearson (1 e coefficiente di correlazione di Pearson assoluto) ed il metodo Ward. La mappa di calore fornisce una visualizzazione sintetica con le tipologie di dieta in colonna, gli ioni nelle righe ed il grado di correlazione tra le prime ed i secondi evidenziato dall'intensità del colore (figura 2.1.2).

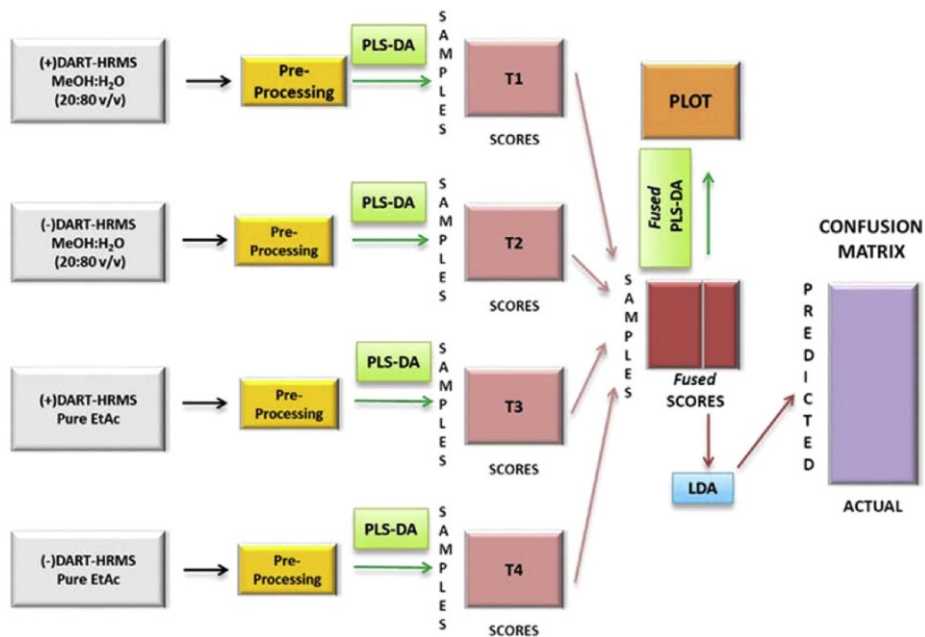


Figura 2.1.1. Diagramma di flusso del processo sperimentale e delle analisi statistiche DART-HRMS per discriminare i campioni di latte ottenuti dalle tre tipologie di dieta: MS, SH e GH. Dopo l'applicazione di DART-HRMS (*pre-processing*, riquadri gialli) vengono condotti quattro PLS-DA (riquadri verdi), i cui punteggi sono fusi insieme. Sui dati fusi si effettuano altre PLS-DA, i cui punteggi vengono raggruppati (riquadro arancione). I punteggi fusi vengono anche separati in modo causale in un *set* di *training* ($n = 102$) ed uno di *test* ($n = 42$), che sono utilizzati per ottenere un LDA, validato mediante matrice di confusione (riquadro violetto).

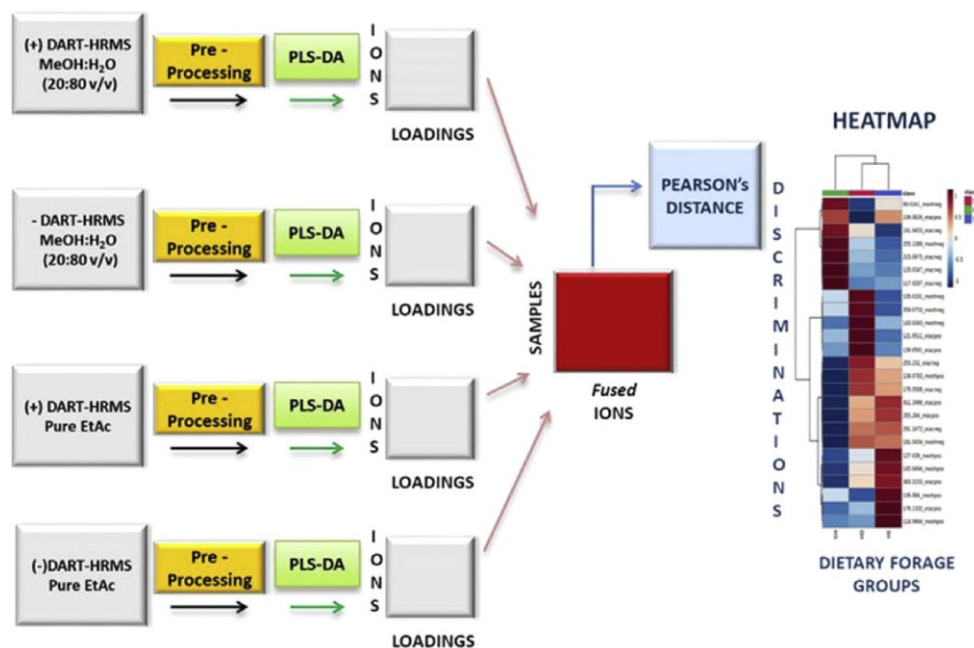


Figura 2.1.2. Diagramma di flusso sull'individuazione degli ioni più informativi. Dopo il pre-processamento descritto in figura 2.1.1 e la normalizzazione con metodo di Pareto (riquadri gialli), si eseguono delle PLS-DA preliminari (riquadri verdi). Gli ioni con punteggio di caricamento > 0.3 sono selezionati (riquadri grigi) e sottoposti a fusione dei dati di medio livello (riquadro rosso). Si eseguono *cluster analysis* gerarchiche sugli ioni fusi mediante distanza di correlazione di Pearson (1 e coefficiente di correlazione di Pearson assoluto; riquadro blu). Una matrice di correlazione è generata tra i 25 ioni selezionati e la tipologia di dieta. Nella mappa di calore, le tipologie di dieta corrispondono alle colonne, gli ioni alle righe. Le intensità di rosso (positive) e blu (negative) indicano il grado di correlazione.

2.2. Modelli multivariati

Gli allevamenti di bovine da latte dell'area geografica precedentemente descritta sono selezionati in quanto rappresentativi, in termini di dimensione della mandria e produzione di latte, della media dei sistemi intensivi italiani. In un altro lavoro, Riuzzi *et al.* (2021) si pongono come obiettivo individuare la correlazione tra il contenuto di acidi grassi del latte e la dieta ricorrendo all'applicazione di modelli multivariati. Per questo scopo, prendono in considerazione le medesime aziende, la cui affiliazione all'Associazione Italiana degli Allevatori garantisce che le caratteristiche descrittive vengano trascritte ogni mese durante l'intero periodo sperimentale (tabella 2.2.1). Si registrano dati sui dettagli della dieta e sulla produzione di latte ad ogni visita di campionamento (cinque per azienda) e si fa la media per vacca in lattazione per giorno. L'assunzione di sostanza secca (*dry matter intake*, DMI) viene stimata valutando la differenza fra la TMR distribuita e la rimanenza in mangiatoia 24 ore dopo o prima della successiva somministrazione. Si standardizza la produzione di latte (*Fat Protein Corrected Milk*, FPCM; International Dairy Federation, IDF, 2017) mediante l'equazione:

$$\text{FPCM (kg per giorno)} = Y \times [(0.0929 \times F + 0.0588 \times TP + 0.192) / 0.7576],$$

con Y, rendimento di latte in kg/giorno; F, percentuale di grasso; TP, percentuale di proteina (= CP \times 0.93 e CP come $N_{Kjeldahl} \times 6.38$); 0.0929, 0.0588 e 0.7576 sono Mcal/kg di grasso, proteina e latte standardizzato (4.0% F e 3.3% TP), rispettivamente. I dati di ciascuna azienda vengono inseriti in uno dei cinque gruppi alimentari, distinti in base al foraggio prevalente (percentuale della TMR sulla base del DMI): 1) alta percentuale di insilato di mais (*high maize silage*, HMS; insilato di mais $\geq 32\%$); 2) media percentuale di insilato di mais (*medium maize silage*, MMS; insilato di mais = 12-26%); 3) insilati misti (*mixed crop silage*, MCS; altri insilati $\geq 37\%$ ed insilato di mais = 0%); 4) fieno d'erba e di erba medica (*grass and lucerne hays*, HAY; prato permanente e fieno di erba medica $\geq 42\%$, insilato di mais = 0%, altri insilati $< 9\%$); 5) erba verde (*green grass*, GRG; erba fresca $> 20\%$ ed insilato di mais = 0%). Le razioni medie delle cinque tipologie alimentari e la loro composizione chimica sono riportate in tabella 2.2.1.

Tabella 2.2.1. Statistiche descrittive della mandria (media \pm deviazione standard); formulazione della dieta (%) e composizione chimica (% su DM) di cinque gruppi in base al principale foraggio. Altri insilati: sorgo, frumento, erba medica, erba, loglio; concentrati energetici: prodotti del mais, pastone di sorgo e di orzo; concentrati proteici: prodotti della soia, pastone di girasole; residui: paglia, crusca, polpa di barbabietola, Sali, mix di minerali e vitamine; aNDF, *neutral detergent fibre*; ADF, *acid detergent fibre*.

	HMS (n = 20)	MMS (n = 18)	MCS (n = 11)	HAY (n = 12)	GRG (n = 9)
Statistiche descrittive della mandria					
Vacche in lattazione (n)	96 (\pm 44)	122 (\pm 41)	68 (\pm 16)	71 (\pm 16)	50 (\pm 7)
Giorni in lattazione (d)	198 (\pm 29)	177 (\pm 27)	172 (\pm 17)	165 (\pm 21)	189 (\pm 24)
Intervallo di parto (d)	434 (\pm 31)	408 (\pm 17)	410 (\pm 24)	399 (\pm 17)	403 (\pm 17)
Ingredienti della dieta (% DM)					
Insilato di mais	35 (\pm 5)	23 (\pm 4)	0	0	0
Altri insilati	6 (\pm 4)	15 (\pm 5)	41 (\pm 6)	6 (\pm 4)	11 (\pm 9)
Fieno di prato permanente	8 (\pm 4)	8 (\pm 6)	8 (\pm 4)	35 (\pm 10)	19 (\pm 12)
Fieno di erba medica	3 (\pm 2)	4 (\pm 2)	2 (\pm 2)	13 (\pm 4)	6 (\pm 4)
Erba fresca	0	0	0	0	25 (\pm 5)
Concentrati energetici	27 (\pm 4)	27 (\pm 7)	34 (\pm 6)	35 (\pm 8)	27 (\pm 7)
Concentrati proteici	16 (\pm 5)	19 (\pm 6)	11 (\pm 4)	8 (\pm 5)	9 (\pm 5)
Residui	5 (\pm 2)	4 (\pm 2)	4 (\pm 2)	3 (\pm 2)	3 (\pm 1)
Composizione della dieta (% DM)					
DM (%)	54.8 (\pm 5.3)	56.6 (\pm 5.1)	55.8 (\pm 6.5)	69.5 (\pm 5.8)	64.7 (\pm 8.6)
Proteina grezza	14.0 (\pm 0.5)	14.1 (\pm 0.6)	14.1 (\pm 0.6)	14.0 (\pm 1.1)	13.5 (\pm 1.3)
Estratto di etere	2.7 (\pm 0.4)	2.8 (\pm 0.4)	2.7 (\pm 0.5)	2.6 (\pm 0.4)	2.5 (\pm 0.7)
Cenere	8.1 (\pm 0.7)	7.6 (\pm 0.5)	8.3 (\pm 0.4)	7.9 (\pm 0.6)	7.8 (\pm 0.4)
aNDF	36.8 (\pm 1.9)	37.2 (\pm 2.1)	37.7 (\pm 3.1)	40.7 (\pm 4.4)	37.6 (\pm 4.0)
ADF	21.7 (\pm 1.6)	22.2 (\pm 1.3)	22.3 (\pm 1.9)	23.9 (\pm 1.6)	20.3 (\pm 2.9)
Amido	22.6 (\pm 1.6)	22.4 (\pm 2.3)	21.7 (\pm 3.1)	19.4 (\pm 1.1)	20.6 (\pm 4.7)

Nel 2018, cinque campioni di latte grezzo sono raccolti da ciascuna delle aziende, nei mesi di marzo, maggio, luglio, settembre e dicembre (n = 70) ed in concomitanza vengono campionate anche le TMR annotandone di volta in volta le formulazioni. Le aziende possono variare le diete dei loro animali nel corso delle stagioni, fino a cambiare

completamente gruppo alimentare di appartenenza. I campioni si distribuiscono per gruppo alimentare come segue: HMS, quattro aziende, n = 20; MMS, quattro aziende, n = 18 (una delle aziende in origine appartenente al raggruppamento MMS cambia due volte, la prima in MCS, la seconda in HAY); MCS, due aziende, n = 11 (un'azienda passa a questa modalità a partire da MMS); HAY, due aziende, n = 12 (un'azienda passa ad HAY a partire da MCS); GRG, due aziende, n = 9 (un'azienda da GRG passa ad HAY). Secondo le indicazioni di Rego *et al.* (2016), si lasciano trascorrere almeno tre settimane tra i cambiamenti della dieta ed i campionamenti di latte. I campioni di TMR e latte vengono congelati a -20°C fino al momento dell'analisi. Dopo lo scongelamento, i campioni di TMR sono analizzati per le caratteristiche chimiche, secondo le metodiche AOAC (934.01 per la sostanza secca, AOAC, 2003; 2001.11 per la proteina grezza, AOAC, 2005; 2003.05 per l'estratto di etere, AOAC, 2006; 942.05 per le ceneri, AOAC, 2003; 996.11 per l'amido, AOAC, 2000), per aNDF (ANKOM Technology, 2015) e per ADF (ANKOM Technology, 2015). La composizione del latte (proteina grezza, caseina, grasso, lattosio) ed i parametri chimici (urea, pH) sono analizzati mediante spettroscopia ad infrarossi di Fourier, usando il MilkoScan FT6000 (Foss Electric A/S, Hillerod, Danimarca). La conta delle cellule somatiche (SCC, 100000/ml) viene eseguita con Fossomatic 5000 (Foss Electric A/S, Hillerod, Danimarca) ed il punteggio SCC è calcolato applicando la formula: $[\log_2 (SCC/100,000) + 3]$.

Per l'analisi del contenuto di acidi grassi (FA) del latte, due replicati di circa 35g ciascuno prelevati da ogni campione vengono liofilizzati, mescolati fino ad ottenere una polvere omogenea, trasferiti in fiale, metilati ed esterificati per prepararli alla gas cromatografia (GC), come descritto da Chilliard *et al.* (2009) e da Stergiadis *et al.* (2015). Gli acidi grassi (FA) risultanti sono espressi in g / 100 g degli acidi grassi totali. Tutte le analisi statistiche vengono condotte utilizzando i software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e XLStat (Addinsoft, release 2016, New York, USA). Le statistiche delle mandrie (DMI e rendimento di latte, espressi per vacca al giorno), la composizione chimica del latte grezzo ed il profilo degli acidi grassi vengono analizzati usando un modello lineare misto che integra gli effetti fissati del gruppo alimentare (*feeding group*, FG) e l'effetto casuale dell'allevamento (SAS PROC MIXED). I livelli del fattore FG vengono confrontati usando la correzione di Bonferroni. Il *dataset* dei profili degli acidi grassi è sottoposto ad analisi multivariata fattoriale discriminante (FDA), ponendo come valore predittivo FG. La FDA suddivide la varianza totale in quattro funzioni principali,

F1 – F4. I risultati della FDA sono tracciati per classificare i cinque FG secondo le funzioni F1 ed F2. I coefficienti di correlazione (con valore assoluto maggiore di 0.20) tra gli FA di partenza e le funzioni F1 e/o F2 vengono rappresentati nel grafico a dispersione di FDA. I risultati sono utilizzati per creare una matrice di confusione e la *performance* della classificazione è valutata per accuratezza, precisione, sensibilità, specificità e per il coefficiente di correlazione di Matthew (MCC; Segato *et al.*, 2019). Si eseguono analisi di regressione multipla multivariata (SAS PROC REG) sulla base dei quattro principali tipi di foraggio (insilato di mais, insilato di raccolti misti, erba e fieno di erba medica, erba fresca) su alcuni acidi grassi e le classi chimiche da essi derivate (SFA, MUFA, PUFA, CLA, HUFAn-3, OCFA). Si stimano i coefficienti di regressione. L'acido grasso più discriminante individuato da FDA è rappresentato graficamente mediante *box-whiskers plots* attraverso i cinque FG.

2.3. Spettroscopia MIR

Niero *et al.* (2021) ricercano la correlazione tra il profilo degli acidi grassi (FA) del latte ed il pascolamento estivo mediante spettroscopia ad infrarossi (MIR). I campioni sono prelevati da un allevamento di bovine da latte situato in Veneto, nel Cansiglio (BL, Italia) ad un'altitudine di 1100 m e comprendono bovine di razza Simmenthal (SI, 55), Frisona (HO, 3) ed incroci HO x SI (CR, 22). Tra ottobre e maggio inoltrato questi animali sono stabulati all'interno ed alimentati con TMR a base di fieno di prato (9.5 kg), erba medica (3 kg), mais molto umido (7 kg), pastone di cereali (3 kg) ed un misto di proteine, minerali e vitamine (3.5 kg). La mungitura si pratica mattina (dalle 5 alle 7.30) e sera (dalle 17 alle 19.30). In primavera avanzata ed in estate (da maggio a settembre), gli animali sono lasciati liberi al pascolo e si nutrono di erba fresca secondo il sistema di pascolamento rotazionale Voisin, che prevede l'utilizzo di tutta l'erba a disposizione in un dato paddock e successivo trasferimento in un altro paddock, giorno dopo giorno. Questa gestione si basa su tempi brevi, *stock* ad alta densità, un periodo di riposo sufficiente affinché le piante si riprendano dal pascolamento. Nello studio di Niero *et al.* (2021), le vacche in lattazione pascolano per 24 ore in ciascun paddock, 50-70 animali per ettaro al giorno. Durante la mungitura, due volte al giorno, le bovine ricevono come integrazione energetica un pastone di mais ed altri cereali. Da maggio inoltrato a fine agosto 2020, campioni ripetuti di latte sono raccolti da tutte le vacche durante la mungitura. L'obiettivo dei ricercatori è caratterizzare il latte prima dell'inizio e durante la stagione

del pascolo. Il campionamento di latte si effettua tre giorni ed un giorno prima dell'inizio del pascolamento per stimare la qualità del latte durante la stabulazione *indoor* (*barn farming*, BF). Il latte viene campionato due, tre, sette, quattordici giorni dopo l'inizio del pascolamento, per valutarne la qualità precocemente (*early grazing*, EG). Il campionamento viene effettuato successivamente, ventuno, quarantanove e novantuno giorni dall'inizio della stagione al pascolo (*mid-late grazing*, MLG). Subito dopo il campionamento, 200 µl di conservante (Bronopol; 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diolo) viene aggiunto a 40 ml di latte e mantenuto a 4°C fino al trasferimento al laboratorio dell'Associazione Allevatori della Regione Veneto (ARAV). Qui si determinano la composizione chimica (grasso, proteina, caseina e lattosio), gli acidi grassi individuali, i gruppi di acidi grassi mediante MilkoScan FT6000 (FOSS Analytical A/S, Hillerød, Denmark). La conta delle cellule somatiche (SCC) è determinata con Fossomatic 7 DC (FOSS Analytical A/S, Hillerød, Denmark). I valori di SCC sono convertiti in punteggi (*somatic cell score*, SCS) per ottenere la normalità e l'omogeneità delle varianze con la formula $SCS = 3 + \log_2 (SCC/100)$ (Ali, Shook, 1980). Gottardo *et al.* (2017) valutano l'accuratezza dei modelli MIR nella determinazione degli acidi grassi ed individuano un coefficiente di determinazione compreso tra 0.55 (C16:0) e 0.81 (C18:1) per gli acidi grassi individuali e tra 0.72 (PUFA) e 0.98 (SFA) per i gruppi di acidi grassi. Il *dataset* iniziale consta di 658 registrazioni di 55 SI, 3 HO e 22 CR. Si escludono i dati relativi alle HO, perché troppo pochi. Allo stesso modo sono rimosse dal *dataset* le bovine per le quali è disponibile un solo giorno di registrazione. I giorni in lattazione (*days in milk*, DIM) sono impostati tra 5 e 560, i parti tra 1 ed 8 ed i numeri di parti maggiori di 5 raggruppati in un'unica classe. I rendimenti di latte (*milk yield*, MY) < 2kg vengono scartati. I campioni che eccedono di tre deviazioni standard rispetto alla media di ciascun carattere sono trattati come valori mancanti. Il *dataset* finale include 616 giorni di registrazioni di 51 S e 19 CR. Per valutare le fonti di variazione dei caratteri analizzati, si applica il seguente modello lineare (procedura GLIMMIX, software SAS v. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA):

$$y_{ijklm} = \mu + \text{periodo}_i + \text{razza}_j + \text{stadio}_k + \text{numero di parti}_l + \text{vacca}_m(\text{razza}_j) + e_{ijklm},$$

dove y_{ijklm} è la variabile dipendente (MY, componente, FA individuale o gruppo di FA); μ è l'intercetta; periodo_i è l'effetto fissato dell' i -esimo periodo di campionamento ($i = \text{BF, EG, MLG}$); razza_j è l'effetto fissato della j -esima razza ($j = \text{SI e CR}$); stadio_k è l'effetto

fissato del k-esimo stadio di lattazione ($k = 1 - 8$; la prima classe va da 5 a 45 DIM, a seguire 7 classi di 45 DIM ciascuna, l'ultima con DIM > 315 giorni); numero di parti_l è l'effetto fissato della l-esima classe di parti di una data bovina ($l = 1 - 6$, dove l'ultima classe include numeri di parti tra 6 ed 8); vacca_m(razza_j) è l'effetto random della m-esima vacca (inclusivo della razza di appartenenza); e_{ijklm} è il residuo *random*. Le differenze tra i minimi quadrati degli effetti fissati sono testate con il Tukey *post-hoc* test ($p < 0.05$). I coefficienti di Pearson (r) tra i residui della composizione del latte, gli SCS, gli FA individuali ed i gruppi di FA vengono stimati.

2.4. Biomarkers lipidici

Si descrive ora la procedura adottata da Segato *et al.* (2017) nell'analisi della frazione lipidica del formaggio Asiago DOP. Lo scopo dello studio in esame è discriminare tra i tre principali processi produttivi che differiscono per dimensione e localizzazione delle aziende produttive, alimentazione delle bovine e sistema gestionale. Due sistemi produttivi rappresentano il centro storico del formaggio Asiago DOP e sono localizzati sull'altopiano di Asiago, nella regione Veneto (Italia). Il primo sistema si basa sul pascolamento stagionale (P-UL): le vacche pascolano in estate e ricevono come integrazione un quantitativo giornaliero di concentrati (3.0 – 5.0 kg di sostanza secca, *dry matter*, DM, per vacca in lattazione) in base al loro rendimento. Questa produzione è su piccola scala e solitamente ad essere lavorato è il latte prodotto da una o poche mandrie. Il secondo sistema produttivo si basa sulla somministrazione di fieno (H-UL); alle bovine viene somministrata TMR composta da erbe locali perenni, granaglie di cereali e fonti proteiche. Tali aziende sono di piccola/media scala e producono formaggio che è etichettato come prodotto di montagna in conformità con il regolamento europeo 665/2014. Una terza modalità produttiva (MS-LL) di media/grande scala coinvolge le aziende delle pianure nei dintorni di Asiago. Il latte proviene in questo caso da bovine altamente produttive, stabulate *indoor* ed alimentate con TMR a base di insilato di mais altamente energetico. Tre campioni di latte grezzo per ogni sistema produttivo vengono raccolti nel periodo estivo (tra luglio e settembre) e processati per produrre formaggio Asiago DOP in luoghi diversi. 81 forme di formaggio (28 di P-UL, 26 di H-UL e 27 di MS-LL, rispettivamente) sono lasciate maturare per circa sei mesi, in condizioni di $10 \pm 2^\circ \text{C}$ ed 80–85% di umidità relativa. I campioni di formaggio vengono analizzati in duplicato per l'umidità, la proteina totale, l'azoto idrosolubile ed il contenuto di sale. Il

contenuto di lipidi è determinato mediante metodo di estrazione ASE 200 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) con una soluzione di esano / 2-propanolo (3 : 2, v/v) poi rimossa per mezzo di un evaporatore rotante. Secondo il metodo proposto da Christie *et al.* (2001), un'aliquota di 40 mg di grasso anidro è utilizzato per metilare gli acidi grassi (FA). Il metossido di sodio (CH₃ONa) viene impiegato come catalizzatore ed il metil 12-tridecanoato come standard (Nu Chek Prep Inc., Elysian, MN). Le analisi degli acidi grassi metil-esteri sono effettuate con gascromatografia bi-dimensionale su uno strumento 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) collegato ad un sistema cromatografico (Agilent ChemStation, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) e adattato a due colonne capillari. Il gas vettore è l'idrogeno, la temperatura di iniezione 270° C, il rivelatore della fiamma di ionizzazione impostato a 250° C. La temperatura del fornello della gascromatografia è compresa tra 50° C e 150° C con un incremento di 50° C al minuto e poi aumentata a 240° C a 2° C / min. Si identificano gli acidi grassi del formaggio confrontando il tempo di ritenzione e la posizione del picco con quelli di una miscela di 52 acidi grassi puri (Nu Chek Prep Inc., Elysian, MN). I cromatogrammi bi-dimensionali sono analizzati mediante il software per immagini GC x GC (Zoex Corp., Houston, TX, USA). Gli acidi grassi individuali sono espressi in g / 100 g di acidi grassi totali (fattore di correzione del metodo AOAC 963.22, 2000). Le analisi delle vitamine A (retinolo) ed E (α -tocoferolo) sono eseguite mediante cromatografia liquida altamente performante secondo i metodi indicati da Zahar and Smith (1990) e Indyk (1990), rispettivamente. Un modello 510 HPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) viene attrezzato di una colonna RP-C18 Discovery di 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m (Supelco, St. Louis, MO), 25 ° C, fase mobile metanolo / acqua (98 : 2) e di un modello 2996 rivelatore di UV (Waters Corp.). Le due vitamine vengono determinate impostando lunghezza d'onda 324 nm per il retinolo e 293 nm per l' α -tocoferolo, rispettivamente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tutte le analisi statistiche sono condotte con un software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). I parametri chimici del formaggio vengono sottoposti ad un modello lineare ANOVA, con il sistema produttivo ed il latte di massa come effetti fissati. I due gradi di libertà del sistema di produzione del formaggio sono usati per i seguenti confronti: P-UL vs (HUL + MS-LL) / 2 and H-UL vs MS-LL. Il set di dati della razione lipidica viene preliminarmente selezionato per evitare la ridondanza delle variabili. Questo determina la cancellazione di variabili strettamente correlate tra di loro ($r > 0.95$, coefficiente di Pearson). Un'altra analisi discriminante (PROC STEPDISC) è applicata agli acidi grassi rimanenti ed alle vitamine liposolubili.

Un'analisi (PROC CANDISC) viene condotta per rilevare le variabili che massimizzano la distanza tra i sistemi produttivi. Si ottengono due funzioni canoniche, CAN1 e CAN2 ed il pool finale di acidi grassi e vitamine ($r > 0.60$). Il grado di dissimilarità tra sistemi produttivi viene misurato mediante distanze quadratiche Mahalanobis e l'attendibilità del modello discriminante canonico è valutato con *cross-validation*.

2.5. ¹H NMR

La disanima procede con la trattazione della tecnica ¹H NMR associata all'analisi discriminante canonica (CDA) che Segato *et al.* (2019) adottano per distinguere il formaggio Asiago di diversi stadi maturativi ottenuto da latte di animali al pascolo da altri provenienti da allevamenti in cui si somministra una dieta a base di fieno. Come nel lavoro precedentemente descritto, anche questo studio è condotto nell'altopiano di Asiago e coinvolge otto allevamenti di bovine da latte simili tra loro per quanto riguarda la razza degli animali, il rendimento in latte e la gestione. Quattro allevamenti si basano sul pascolamento estivo delle bovine con un'integrazione giornaliera di 4.5 kg di sostanza secca (DM) di concentrato (un misto di mais ed orzo, soia ed un mix di minerali e vitamine). Nelle altre quattro aziende, le vacche sono stabulate *indoor* e viene loro somministrata TMR che, in termini di DM è costituita da 40-50% di fieno d'erba proveniente da prati locali permanenti, 5-8% di erba medica, 42-50% di concentrato (mais ed orzo, soia e girasole ed un mix di minerali e vitamine). Si raccolgono tre campioni di latte di massa sia dal gruppo al pascolo, sia da quello a cui è somministrato fieno, a metà luglio, metà agosto ed all'inizio di settembre. Ad ogni campionamento, il latte di massa viene trasferito al medesimo impianto lattiero-caseario di montagna per la produzione di formaggio. Il latte di massa dei due sistemi alimentari viene lavorato separatamente secondo le indicazioni DOP per produrre formaggio Asiago Pressato (due mesi di maturazione), Allevo_4 (quattro mesi di maturazione) ed Allevo_6 (sei mesi di maturazione). Per la maturazione, le forme vengono conservate in condizioni di $10 \pm 2^\circ\text{C}$ di temperatura ed 80 – 85% di umidità relativa. I campioni di formaggio (circa 2 kg ciascuno) dei sei tipi di Asiago (tre tempi di maturazione, RT, ottenuti da ciascuno dei due sistemi di alimentazione, FS) sono suddivisi in quarti ed inviati al laboratorio refrigerati ($3 \pm 1^\circ\text{C}$). Di ogni campione si valuta il gradiente di concentrazione, escluso lo strato di 2 cm dalla scorza. La composizione chimica del formaggio è analizzata in triplice copia adottando i metodi standard dell'International Dairy Federation per

l'umidità, la proteina grezza, l'azoto idrosolubile, le ceneri grezze ed il sale NaCl, mentre i grassi sono analizzati con metodo di estrazione in solvente. Il pH viene misurato due volte con pH-metro portatile (KnickPortamess®911, Berlino, Germania) fornito di un elettrodo conico (diametro della punta di 5 mm, Crison 5232, Modena, Italia) in soluzione acquosa omogeneizzata. Per quanto riguarda l'analisi ^1H NMR, circa 200 mg di ciascun campione di formaggio vengono macinati e mescolati con 1 ml di acqua pesante per un'ora a temperatura ambiente. Per la completa rimozione della componente apolare, si aggiungono 100 μl di cloroformio deuterato. Dopo aver centrifugato, si prelevano 600 μl di surnatante. Gli spettri ^1H NMR sono registrati mediante spettroscopio VARIAN INOVA-600 MHz (Varian, Palo Alto, CA, USA), attrezzato di una sonda di 5 mm a tripla risonanza inversa. Si acquisiscono 128 immagini, con un'ampiezza di 9595.8 Hz a tempo di acquisizione di 1707 s. L'identificazione dei *markers* ^1H NMR dell'Asiago DOP è ottenuta mediante spettri mono- e bi-dimensionali. Gli spettri ^1H NMR sono inseriti nel software MestReNova (6.0.2, Mestrelab Research, Spagna). La composizione chimica del formaggio ed i dati biochimici sono sottoposti a metodo lineare ANOVA (PROC GLM) con i cinque effetti fissati del sistema alimentare (pascolo vs fieno) e del tempo di maturazione (Pressato vs Allevo_4 vs Allevo_6) e la loro interazione. Tutte le correlazioni vengono corrette con Bonferroni. Il *dataset* degli integrali normalizzati ^1H NMR costituisce la matrice che viene analizzata mediante analisi multivariata discriminante canonica (DCA). I risultati ^1H NMR più predittivi dei sei gruppi sperimentali sono individuati mediante analisi discriminante (PROC STEPDISC). L'ulteriore procedura analitica multivariata è condotta su tredici risultati ^1H NMR per completare la CDA suddividendo la varianza totale nelle tre funzioni canoniche CAN1, CAN2 e CAN3. Il grado di dissimilarità tra i sei gruppi sperimentali è misurato con le distanze quadratiche di Mahalanobis (D2-Mahalanobis). I risultati della CDA vengono rappresentati graficamente secondo le prime due funzioni canoniche, CAN1 e CAN2, insieme con i valori dei coefficienti dei 13 valori predittivi ^1H NMR. L'affidabilità della classificazione CDA è verificata (PROC DISCRIM). Si crea una matrice di confusione sulla base dei risultati e se ne valutano accuratezza, precisione, sensibilità, specificità ed il coefficiente di correlazione di Matthew (MICC) come descritto da Bisutti *et al.* (2019). Tutte le analisi sono condotte usando il software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e gli *scatter plot* del CDA si ottengono mediante XLStat (Addinsoft, 2016, New York, USA) ed il software Statistica (TIBCO Software Inc., 13.4.0.14, Palo Alto, USA). Il *p-value* per la significatività è impostato a 0.05.

2.6. Spettroscopia NIR

L'ultima procedura oggetto di analisi è la spettroscopia NIR, che Cozzi *et al.* (2009) utilizzano per distinguere formaggi Asiago d'Allevio di diverse catene produttive. Lo studio prende in considerazione tre differenti modalità di produzione: allevamento alpino (*alpine farm*, AF), stabilimento industriale di montagna (*mountain factory*, MF) e stabilimento industriale di pianura (*lowland factory*, LF), che si differenziano per localizzazione ed altitudine della zona di produzione del latte (pianura < 300 m, montagna > 600 m), dimensione (numero di forme / anno) e periodo (stagionale o durante tutto l'anno). In ogni sito, un questionario viene consegnato al responsabile del caseificio per ottenere informazioni relative alla provenienza del latte. Le specifiche domande sono inerenti alle razze bovine coinvolte, al regime alimentare adottato (rapporto foraggi : concentrati e tipologia di foraggio). Delle 35 aziende, 14 sono AF di piccole dimensioni, che lavorano durante la stagione estiva basandosi su allevamenti di tipo estensivo. Questi sono caratterizzati da mandrie di vacche appartenenti a razze locali a duplice attitudine (Rendena, Grigia alpina e Simmenthal), che vengono trasferite in montagna all'inizio di giugno, quando sono in lattazione avanzata ed il cui sostentamento si basa prevalentemente sui pascoli con piccole integrazioni di concentrati fornite due volte al giorno con la mungitura. Le restanti 21 aziende si classificano come industriali e di queste 13 si trovano in pianura. Gli stabilimenti di montagna sono mediamente grandi e raccolgono il latte nelle zone di montagna adiacenti, da allevamenti diversi che detengono vacche sia altamente produttive che a duplice attitudine, in modalità semi-intensive. Agli animali, alimentati secondo regimi simili a quelli di pianura, vengono somministrati fieni di prato ed erba medica. Solo una piccola percentuale di latte raccolto da questi siti proviene da bovine al pascolo, durante il periodo estivo. Le aziende di pianura sono le più grandi in termini di produttività ed il latte che processano proviene da bovine di alto merito genetico (Frisone e Brune), sottoposte a regimi alimentari ricchi di concentrati e che non vengono lasciate libere al pascolo in estate. L'insilato di mais fornisce loro il 35-45% della sostanza secca ed il fieno di erba medica e di prato completa la razione. Il lavoro di Cozzi *et al.* si focalizza sul formaggio Asiago d'Allevio stagionato dodici mesi. Il protocollo di campionamento prevede la raccolta di cento forme di formaggio (peso 8-12 kg, diametro 30-36 cm, altezza 9-12 cm) da diverse aziende tra giugno 2003 e gennaio 2005. I campioni di formaggio vengono analizzati per la composizione chimica: umidità (asciugatura in forno a 102° C), lipidi totali (metodo Gerber van Gulik), proteine totali ed

azoto idrosolubile (metodo Kjeldahl) e cloruro di sodio (metodo potenziometrico). L'estrazione degli acidi grassi si effettua a partire da 10 g di formaggio con una soluzione mista di diclorometano / metanolo (2 : 1; Nourooz-Zadeh and Appelqvist, 1988). I campioni sono poi trans esterificati (procedura di Christie, 1982) e gli acidi grassi metil esteri analizzati con la gas-cromatografia. Il colore del formaggio viene misurato mediante spettrocolorimetro portatile Minolta CM-2002 (Minolta Camera Co., Osaka, Giappone) ed il sistema CIELAB (1976). Per la NIRS, una fetta di formaggio (escludendo i 2 cm di crosta tutto intorno) di almeno 150 g viene polverizzata con un Retsch Grindomix (Retsch GmbH, Haan, Germania) a 4000 giri per 10 s con azoto liquido. Si pongono 20 g di formaggio fresco grattugiato in una coppa del diametro di 50 mm e si effettua lo *scan* ad intervalli di 2 nm da 1100 a 2500 nm usando lo spettroscopio Foss NIRSystems modello 5000 (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA) controllato dal software WinISI II versione 1.5 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). Ogni spettro consta di una media di trentadue *scans*. I valori di riflettanza sono convertiti in valori di assorbanza mediante la formula: $\text{assorbanza} = \log (1 / \text{riflettanza})$ e le calibrazioni vengono eseguite dal software WinISI II versione 1.5 (Infrasoft International). La composizione chimica del formaggio ed i dati del colore sono sottoposti a modello lineare ANOVA, ponendo come effetti fissati il sistema produttivo ed il mese di campionamento. I due gradi di libertà del sistema produttivo vengono impiegati per sviluppare il seguente set di contrasti ortogonali: AF vs [(MF + LF) / 2] e MF vs LF. Un'analisi discriminante fattoriale (FDA) viene condotta su un *pool* di dati chimici e parametri di colore per discriminare i tre sistemi produttivi. Il *dataset* include solo le variabili che nel test ANOVA mostrano un effetto significativo del sistema produttivo ed esclude quelle con elevata multi-collinearità. Si calcolano le distanze di Fisher per mostrare le differenze tra le modalità produttive e si mostrano in grafico i punteggi dei campioni con ellissi di confidenza del 95%. La matrice di confusione finale viene calcolata. I risultati sono validati per sensibilità e specificità. I campioni vengono classificati secondo i tre sistemi di produzione usando spettri NIR con analisi discriminante PLS (WinISI II, versione 1.5, Infrasoft International). Successivamente, un'analisi discriminante generale (Statistica 6.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) combina gli spettri della composizione chimica e del colore per valutare eventuali miglioramenti nei risultati della matrice di confusione. Le informazioni ottenute dagli spettri vengono considerate sulla base delle prime tre componenti principale, che spiegano oltre il 90% della varianza spettrale totale.

3. RISULTATI

Le metodiche analitiche in esame esitano in risultati utili ai fini della tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari, che vengono ora descritti con lo scopo di valutarne la consistenza e metterli a confronto.

3.1. DART-HRMS

Riuzzi *et al.* (2021) rilevano che, al variare della dieta delle bovine da latte, l'unica componente che varia significativamente ($p < 0.005$) è il lattosio, con il valore più basso quando l'alimentazione è a base di fieno da prati ed erba medica (GH).

L'obiettivo principale è valutare l'attendibilità del sistema DART-HRMS nell'identificare il regime alimentare somministrato. La capacità discriminante viene verificata su ciascun *dataset* (+ / -) ottenuto dalle due diluizioni del latte mediante una serie di quattro regressioni parziali dei minimi quadrati PLS-DA. Le PLS-DA mostrano che la capacità di questa tecnica spettroscopica di massa di separare i campioni di latte in base alla tipologia di foraggi somministrata con la dieta è limitata con entrambi i solventi, polare (acqua : metanolo) e non polare (etilacetato). Per ovviare a questo limite, vengono fusi i dati di quattro DART (due solventi per due modalità di ioni) e si effettuano PLS-DA sui risultati della fusione. Questo approccio permette il raggruppamento dei tre sistemi alimentari, come mostrato in figura 3.1.1.

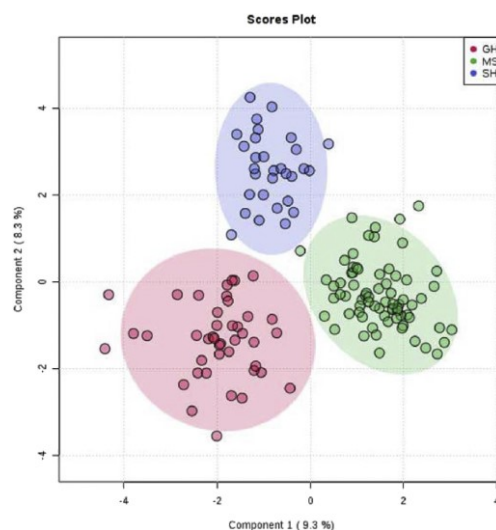


Figura 3.1.1. Regressione parziale dei minimi quadrati (PLS-DA) dei punteggi fusi delle tre tipologie di dieta, insilato di mais (MS), misto di insilati e fieno (SH) e fieno d'erba (GH), basate sui segni (+ / -) DART-HRMS nel latte. Intervalli di confidenza del 95% a forma di ellisse.

Per verificare ulteriormente la capacità discriminante dei metaboliti individuati da DART-HRMS, gli autori dello studio in esame eseguono analisi discriminanti lineari (LDA), che esitano in statistiche descrittive di alto valore (≥ 0.90). Il *fingerprinting* del latte ottenuto mediante DART-HRMS permette di riconoscere il foraggio somministrato con la dieta grazie all'identificazione di un *pool* di venticinque ioni informativi. In figura 3.1.2 viene rappresentata la matrice di correlazione con gli ioni che separano le tre tipologie di alimentazione. Il *pattern* dell'insilato di mais (MS) si differenzia fortemente dal sistema a base di fieno ed erba (GH), il quale ha degli ioni in comune con la dieta mista (SH).

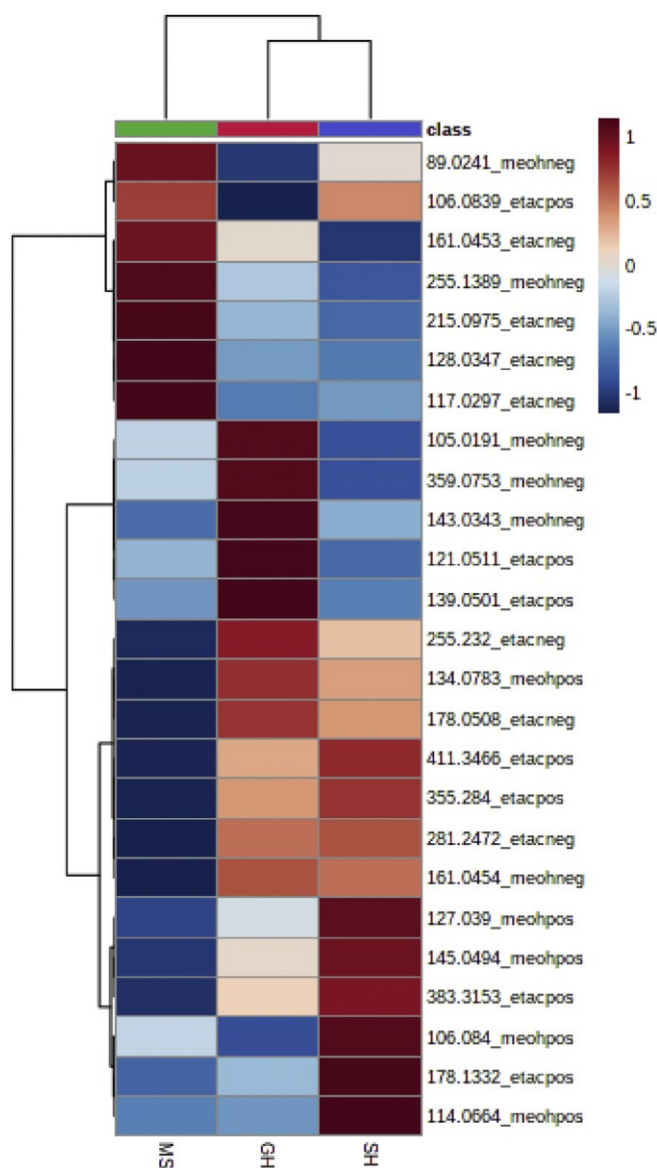


Figura 3.1.2. Mappa di calore basata sulla *clustering analysis* gerarchica (HCA) degli ioni del latte individuati dal metodo (+/-) DART-HRMS a seconda del regime alimentare: insilato di mais (MS), misto di insilati e fieno (SH) e fieno di prato ed erba medica (GH). Le gradazioni di colori del rosso-marrone (positivo) e del blu (negativo) indicano il grado di correlazione tra gli ioni metabolici e la modalità alimentare. Le distanze di Pearson tra i tre raggruppamenti sono mostrate.

Gli autori descrivono ventuno dei venticinque ioni individuati. Il gruppo MS mostra una maggiore correlazione positiva con i seguenti ioni: glucosio, lattato, glutammato, derivato dell'acido idrossicinnamico e tre altri ioni ignoti. I campioni di latte ottenuti a partire dalla dieta mista (SH) sono correlati a creatinina, norgramina, metil 2-furoato, dimetil fumarato, tre monoacilgliceroli (MAG) collegati agli acidi grassi C18:2, C20:2 e C22:2 ed uno ione ignoto. La metodica DART-HRMS distingue la dieta GH evidenziando la presenza di acido palmitico (C16:0), flavonoide *O*-metilato, purina, 2-aminonicotinato, acido glicerico, acido 3-idrossi-2-metilglutarico ed acido 2-idrossi-2-etilsuccinico.

3.2. Modelli multivariati

Riuzzi *et al.* (2021) ricercano l'impatto dei diversi foraggi sul processo metabolico che dal ruminante porta alla ghiandola mammaria e che è responsabile del rilascio degli acidi grassi nel latte. Gli autori distinguono cinque gruppi alimentari in base al foraggio prevalente (alta percentuale di insilato di mais, HMS; media percentuale di insilato di mais, MMS; insilati misti, MCS; fieno d'erba e di erba medica, HAY; prato permanente e fieno di erba medica, GRG). Come mostrato in tabella 3.2.1, il numero di bovine in lattazione è maggiore negli allevamenti che somministrano insilato di mais rispetto a quelli che forniscono erba essiccata o fresca e leguminose e variano significativamente anche alcuni parametri della composizione del latte. Il sistema alimentare basato su prato e fieno di erba medica registra i valori più bassi di rendimento giornaliero di latte, di proteina grezza, di caseina e di lattosio. Il profilo degli acidi grassi tra i gruppi alimentari differisce per acido vaccenico (VA), C18:2 *c*-9, *t*-11 (acido linoleico coniugato, CLA9), C20:5 *c*-5, *c*-8, *c*-11, *c*-14, *c*-17 (acido eicosapentaenoico, EPA) e concentrazioni totali di CLA, che risultano tutti maggiori ($p < 0.05$) nei campioni di latte provenienti da GRG rispetto a quelli di HMS, diversamente dalle concentrazioni di acidi grassi saturi (SFA) ed acidi grassi a corta catena (SCFA) che sono minori ($p < 0.05$). Differenze significative nelle concentrazioni di CLA9, CLA totale ed SCFA si evidenziano confrontando i gruppi GRG ed MMS. Il gruppo GRG si distingue significativamente dagli altri per la più alta concentrazione di CLA (con l'eccezione solo del latte prelevato dal raggruppamento HAY) e la più bassa presenza di SFA (ad eccezione di MMS). Differiscono anche le concentrazioni di C16:0 (acido palmitico, PA) e degli acidi grassi poli-insaturi (PUFA) che sono più basse e più alte, rispettivamente, in GRG rispetto a MCS ed HAY. Altre differenze si evidenziano confrontando HAY con gli altri raggruppamenti: in HAY,

C18:2 *c*9, *c*12 (acido linoleico, LA) è tendenzialmente meno presente ($p = 0.066$) che in GRG, mentre C18:3 *c*9, *c*12, *c*15 (acido alfa linolenico, ALA,) e gli n-3 sono presenti in misura maggiore rispetto ad HMS, con conseguente minore rapporto n-6 : n-3 ($p < 0.05$). L'esecuzione dell'analisi fattoriale discriminante (FDA) esita in due funzioni principali (F1 ed F2; λ di Wilks = 0.002) che valgono per il 59.0% ed il 20.1% della varianza totale, rispettivamente. La FDA identifica i nove acidi grassi più significativamente discriminanti: C9:0, C10:0, C16:1 *c*-9, C17:0, C17:1 *c*-9, C18:0 (acido stearico, SA), ALA, CLA 9 e C20:0, tutti con un coefficiente di correlazione maggiore di 0.25 con F1 e/o F2. Gli acidi grassi che maggiormente contribuiscono a differenziare i gruppi alimentari gli uni dagli altri evidenziati da questa metodica analitica non sono in linea con quelli risultati dall'analisi univariata; solo ALA e CLA9 sono significativi in entrambe le analisi. I profili degli acidi grassi dei campioni di latte prelevati da HAY e GRG differiscono chiaramente da quelli provenienti da diete basate sulla somministrazione di insilati e tra di loro; mostrano invece delle sovrapposizioni tra i gruppi HMS, MMS ed MCS.

I risultati ottenuti dalle regressioni lineari multiple usando l'acido grasso più predittivo per le quattro fonti di foraggio sono riportati in tabella 3.2.2. Entrambe le tipologie di insilato (di mais ed "altri") influenzano lievemente le concentrazioni individuali di acidi grassi, ma aumentano significativamente gli acidi grassi saturi totali e, di conseguenza, riducono le concentrazioni di PUFA, in particolare ALA e CLA9. La dieta a base di fieno correla positivamente con C17:0 e CLA9 e negativamente con l'acido stearico, esitando in percentuali maggiori di PUFA. Il fieno sembra diminuire l'acido linoleico ed aumentare gli acidi grassi, anche se l'effetto su questi ultimi è meno marcato che con gli insilati. La dieta a base di erba fresca sembra avere conseguenze moderate sul profilo degli acidi grassi, ma contribuisce ad aumentare le concentrazioni di C17:0 e CLA9.

Tabella 3.2.2. Regressioni multiple lineari degli acidi grassi (FA) più discriminanti e delle classi chimiche da essi derivate basate su diverse tipologie di foraggi somministrati con la dieta (% di sostanza secca). Ogni equazione (i dati dei FA sono espressi come g / 100 g di FA totali) è presentata come segue: intercetta del modello (\pm errore standard) e coefficiente di regressione dei foraggi quando significativo ($p < 0.05$ o 0.10 ; ns = $p > 0.10$). Il valore p si riferisce alla significatività del modello di regressione. LA = acido linoleico, C18:2 *c*-9, *c*-12; ALA = acido alfa linolenico, C18:3 *c*-9, *c*-12, *c*-15; CLA9 = C18:2 *c*-9, *t*-11; SFA = acidi grassi saturi.

		Coefficienti di regressione dei foraggi				
Acidi grassi	Intercetta	Insilato di mais	Insilati "altri"	Fieni	Erba fresca	<i>p</i> value
C16:1	1.53 (± 0.23)	Ns	ns	ns	Ns	0.229
C17:0	0.35 (± 0.06)	0.0018	ns	0.0024	0.0026	0.001
C18:0	11.4 (± 1.0)	Ns	ns	-0.011	-0.009	0.078
LA	2.47 (± 0.33)	Ns	-0.018	-0.017	Ns	0.001
ALA	0.51 (± 0.11)	-0.0043	-0.0033	ns	Ns	0.005
CLA9	0.53 (± 0.12)	-0.0026	-0.0025	0.0027	0.0041	0.003
SFA	65.5 (± 1.4)	0.068	0.084	0.054	ns	0.055
MUFA	28.7 (± 1.3)	Ns	ns	-0.045	ns	0.034
PUFA	5.77 (± 0.47)	-0.018	-0.035	0.019	ns	0.001
CLA	0.72 (± 0.13)	-0.0035	-0.0049	Ns	ns	0.001
OCFA	2.13 (± 0.40)	Ns	ns	Ns	ns	0.699

3.3. Spettroscopia MIR

L'altra metodica trattata utile del delineare il profilo degli acidi grassi nel latte è la spettroscopia ad infrarossi (MIR) che Niero *et al.* (2021) adottano per valutare l'effetto del pascolamento sulla componente lipidica del latte. Nei campioni di latte prelevati dalle bovine libere al pascolo durante la stagione estiva, gli autori riscontrano che C14:0 e C18:1 sono gli acidi grassi meno (0.32 g / 100 ml di latte) e più (1.01 g / 100 ml) concentrati, rispettivamente. Il contenuto di C18:0 varia tra 0.02 e 0.66 g / 100 ml di latte e presenta il maggiore coefficiente di variazione (30.69%), seguito da C18:1, il cui coefficiente di variazione è pari a 29.22%. C14:0 e C16:0 hanno i coefficienti di variazione più bassi, 23.03% e 22.18% rispettivamente. Tra i gruppi di acidi grassi, gli acidi grassi saturi sono i più abbondanti, con una concentrazione media di 2.31 g / 100 ml di latte, seguiti dagli acidi grassi mono-insaturi (MUFA; 0.97 g / 100 ml di latte) e dagli acidi grassi poli-insaturi (PUFA; 0.11 g / 100 ml di latte). L'analisi della varianza per la concentrazione degli acidi grassi del latte determina i risultati evidenziati in tabella 3.3.1 e di seguito descritti: lo stadio di lattazione incide significativamente ($p < 0.001$) sulle variazioni nella concentrazione degli acidi grassi individuali e nei gruppi di acidi grassi, con l'eccezione degli acidi grassi a corta catena. Il periodo di campionamento influenza significativamente C14:0, C16:0 e la maggior parte dei gruppi di acidi grassi ($p < 0.05$).

Tra gli acidi grassi individuali, solo C14:0 varia significativamente con il numero di parti ($p < 0.001$). Gli acidi grassi individuali ed i gruppi di acidi grassi non risultano essere significativamente influenzati dalla razza. L'effetto *random* determinato dalle singole bovine e comprensivo della razza è responsabile di una bassa proporzione di varianza. Gli autori calcolano i coefficienti di correlazione di Pearson tra gli acidi grassi individuali ed i gruppi di acidi grassi e la composizione chimica del latte ed evidenziano che i gruppi di acidi grassi correlano fortemente con la concentrazione di grassi nel latte ($r > 0.75$), ad eccezione degli acidi grassi *trans*. Il modello statistico mostra significative e positive correlazioni tra gli acidi grassi individuali ed i gruppi di acidi grassi. La correlazione tra gli acidi grassi *trans* ed i gruppi di acidi grassi aumenta con il grado di insaturazione.

Tabella 3.3.1. Risultati dell'analisi della varianza (*F-values* e significatività) degli acidi grassi (FA) individuali e dei gruppi di FA. SCFA: acidi grassi a corta catena; MCFA: acidi grassi a media catena; LCFA: acidi grassi a lunga catena; SFA: acidi grassi saturi; MUFA: acidi grassi mono-insaturi; PUFA: acidi grassi poli-insaturi; TFA: acidi grassi *trans*. RSD: deviazione standard residua. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

	Effetti fissati				Varianza bovina %	RSD
	Periodo di campionamento	Razza	Giorni in lattazione	Numero di parti		
Acidi grassi individuali, g/100ml di latte						
C14:0	56.15***	0.05	11.58***	4.18***	21.78	0.06
C16:0	71.27***	0.07	11.07***	1.30	21.50	0.14
C18:0	2.21	0.01	14.60***	1.31	21.55	0.08
C18:1	0.56	0.03	16.87***	1.59	1.50	0.23
Gruppi di acidi grassi, g/100ml di latte						
SCFA	99.88***	0.46	1.90	1.33	22.72	0.09
MCFA	100.15***	0.20	9.19***	2.17	25.31	0.21
LCFA	8.48***	0.03	16.51***	1.53	17.97	0.31
SFA	70.55***	0.15	9.83***	2.07	17.53	0.41
MUFA	1.56	0.01	20.77***	2.42*	17.02	0.21
PUFA	3.99*	0.07	11.70***	1.60	22.48	0.02
TFA	28.17***	1.01	7.81***	2.29*	21.12	0.03

Il modello dei minimi quadrati è applicato ai profili degli acidi grassi in diversi periodi di campionamento e mostra i seguenti risultati: tra gli acidi grassi individuali, C14:0 e C16:0

declinano progressivamente, mostrando i valori massimi nel periodo in cui gli animali sono stabulati all'interno (0.36 e 0.95 g / 100 ml di latte, rispettivamente) e minimi nel periodo di pascolamento medio ed avanzato (0.29 e 0.76 g / 100 ml di latte).

3.4. Biomarkers lipidici

Segue ora una descrizione di alcune metodiche analitiche applicate all'analisi dei prodotti caseari, in particolare formaggi DOP. Segato *et al.* (2017) analizzano la composizione chimica, il profilo di acidi grassi ed il contenuto di vitamine liposolubili del formaggio Asiago DOP ottenuto mediante tre diversi processi produttivi: il primo basato sul pascolamento stagionale (P-UL); il secondo sulla somministrazione prevalente di fieno (H-UL); il terzo su una dieta a base di insilato di mais (MS-LL). Il formaggio MS-LL presenta il maggiore contenuto di umidità e la più bassa percentuale di grasso. Le composizioni chimiche di P-UL e H-UL si differenziano limitatamente, fatta eccezione per l'azoto idrosolubile e il contenuto di sale. I formaggi prodotti dal latte delle bovine al pascolo presentano il maggiore contenuto di acidi grassi a corta catena C4:0 ed il minore contenuto di acidi grassi a media catena (da C8:0 a C14:0) rispetto ad H-UL e MS-L. Il formaggio P-UL contiene quantità significativamente ($p < 0.001$) più alte di acidi grassi mono-insaturi (MUFA) e poli-insaturi (PUFA) ed una riduzione degli acidi grassi saturi (SFA). Inoltre, il formaggio P-UL è il più ricco di acido linoleico coniugato (CLA). Anche il contenuto totale di acidi grassi a catena ramificata dispari (OBCFA) è maggiore nel latte P-UL. Tra gli acidi grassi ciclici, l'acido ω -cicloesiletridecanoico (ω -C19) è simile nei tre diversi sistemi produttivi, mentre l'acido grasso ciclopropano si ritrova solo nel formaggio MS-LL. I confronti tra H-UL e MS-LL sono poco significativi per la maggior parte degli acidi grassi, ma evidenziano che il formaggio H-UL è più povero di SFA ($p < 0.001$) e più ricco di MUFA ($p = 0.020$), PUFA ($p < 0.001$) e *cis*-9, *trans*-11 CLA ($p < 0.001$). Le vitamine A (retinolo) ed E (α -tocoferolo) sono più concentrate ($p < 0.001$) nel formaggio P-UL, mentre non si evidenziano differenze tra H-UL e MS-LL. Segato *et al.* (2017) effettuano un'analisi discriminante canonica sulla frazione lipidica degli ottantuno campioni di formaggio prelevati, allo scopo di discriminare i tre sistemi produttivi. La procedura esita nell'identificazione di quindici variabili, quattordici acidi grassi e la vitamina A. Di queste, solo nove acidi grassi e la vitamina A hanno coefficiente di correlazione > 0.60 (figura 3.4.1). In figura 3.4.2 è tracciato il grafico a dispersione creato sulla base dei coefficienti canonici standardizzati che evidenzia la separazione tra i

formaggi dei tre sistemi produttivi. Le distanze quadratiche Mahalanobis tra i tre raggruppamenti indicano che i campioni P-UL si differenziano molto sia da H-UL (D^2 -Mahalanobis = 272; $p < 0.001$) che da MS-LL (D^2 -Mahalanobis = 260; $p < 0.001$). Il grado di dissimilarità tra H-UL e MS-LL è minore ma comunque significativo (D^2 -Mahalanobis = 36; $p < 0.001$).

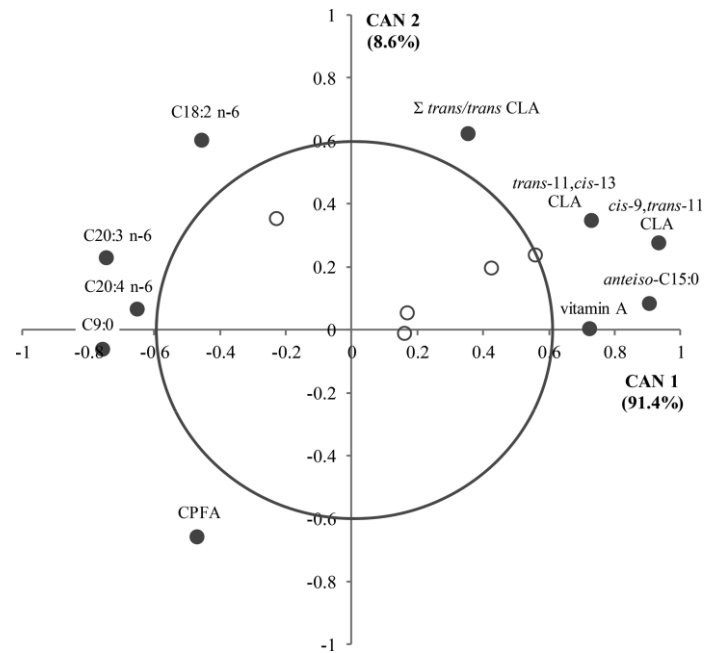


Figura 3.4.1. Pool di acidi grassi (FA) e vitamine liposolubili selezionati mediante regressione. I cerchi grigi rappresentano i costituenti lipidici i cui coefficienti di correlazione sono più alti di 0.60. Gli assi (CAN1 e CAN2) tengono conto della variabilità totale delle variabili misurate per il 91.4% e l'8.6%, rispettivamente.

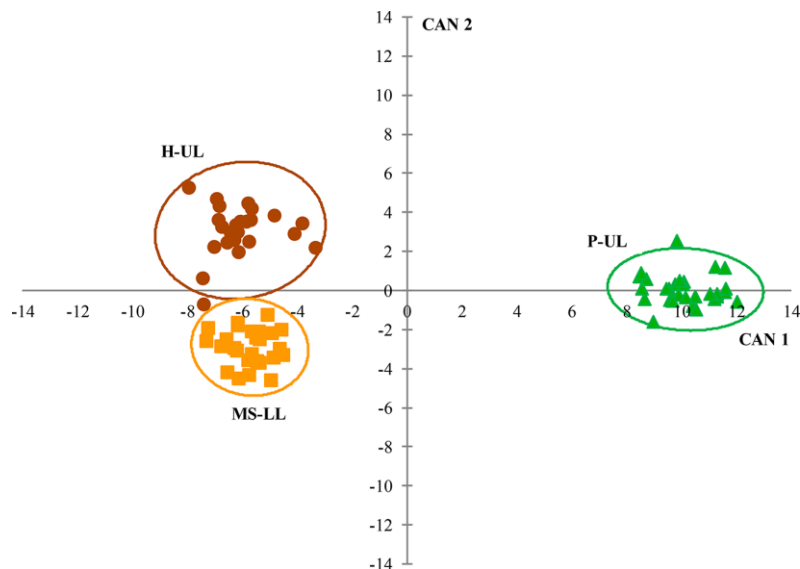


Figura 3.4.2. Grafico a dispersione dell'analisi discriminante canonica dei tre sistemi produttivi del formaggio Asiago DOP. Le ellissi tracciate indicano il 95% di confidenza. Triangoli verdi, P-UL; cerchi marroni, H-UL; quadrati arancioni, MS-LL.

Le analisi combinate delle figure 3.4.1 e 3.4.2 permettono l'identificazione dei composti lipidici utili per distinguere i diversi sistemi produttivi del formaggio Asiago DOP. I campioni di formaggio P-UL si concentrano a destra del grafico e si caratterizzano per concentrazioni più alte di CLA, *anteiso*-C15:0 e vitamina A. I campioni di H-UL tendono ad aggregarsi in alto ed a sinistra del grafico e correlano prevalentemente con la frazione n-6 dei PUFA (C18:2 n-6, C20:3 n-6 e C20:4 n-6). I campioni MS-LL si localizzano nella parte inferiore sinistra ed i loro principali *biomarkers* sono il ciclopropano e C9:0.

3.5. ¹H NMR

In un altro studio del 2019, Segato *et al.* trattano una diversa tecnica analitica, la risonanza magnetica nucleare protonica ad alta risoluzione (¹H NMR) e ne valutano la validità nel distinguere l'Asiago DOP prodotto da latte di vacche al pascolo, da formaggi simili ma ottenuti da animali nutriti diversamente. Gli autori osservano che la composizione chimica del formaggio Asiago alpino DOP non varia con il regime alimentare delle bovine ma è influenzato dal tempo di maturazione. Il formaggio Asiago Pressato è caratterizzato da una maggiore percentuale di umidità e da livelli più bassi di proteina e grasso grezzi. L'obiettivo principale dello studio in esame è identificare e quantificare i profili metabolici idrosolubili dei formaggi alpini Asiago DOP ricavati da sistemi alimentari basati sui pascoli e sul fieno e con tre diversi tempi di maturazione. Gli spettri ¹H NMR sono dominati dai segnali dell'acido lattico; altri segnali intensi sono quelli di acido acetico, glicerolo, aminoacidi idrofobici, etanolo ed acido citrico. I segnali nella zona 7.0–8.5 ppm corrispondono principalmente agli aminoacidi aromatici e ad altri composti aromatici. Segnali minori nelle zone 3.3–3.5 e 4.6–5.2 sono specifici degli zuccheri (figura 3.5.1).

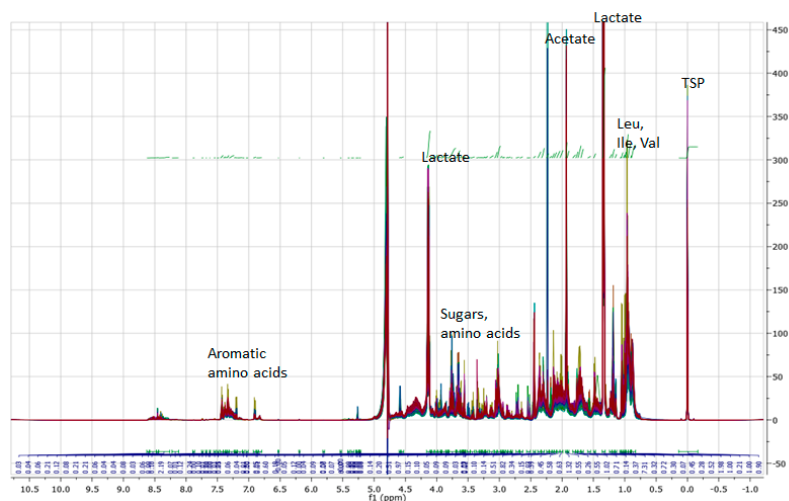


Figura 3.5.1. Copertura degli spettri ^1H NMR (600MHz) dei campioni di formaggio DOP.

L'analisi multivariata CDA permette di identificare le variabili ^1H NMR più informative per la distinzione dei campioni di formaggio Asiago DOP. Ne risultano tredici segnali integrati ^1H NMR, che vengono verificati mediante ANOVA. Il regime alimentare influenza significativamente ($p < 0.05$) le seguenti variabili: composto zuccherino A, 2,3-butanediolo, lisina, colina e composto ignoto. La tirosina tende ($p = 0.091$) ad essere differente. Per quanto riguarda il tempo di maturazione, ne risultano significativamente influenzate tutte le tredici variabili: zucchero A, zucchero B, 2,3-butanediolo, zucchero C, acido lattico, acido citrico, lisina, ignoto 1, acido aspartico, colina, ignoto 2, fenilalanina, tirosina. I campioni derivati dal pascolamento si caratterizzano per i maggiori livelli di colina e 2,3-butanediolo. Sulla base dei risultati della CDA (λ di Wilk = 0.007, F value = 18.6, $df1 = 80$, $df2 = 158$, $p < 0.001$), viene tracciato un grafico a diffusione dei campioni di Asiago DOP secondo i coefficienti canonici standardizzati delle funzioni canoniche CAN 1 e CAN 2, che spiegano il 78.7% della varianza totale (figura 3.5.2). I campioni Pressato ed Allevo_4 basati sui pascoli si raggruppano nella parte inferiore, mentre i campioni Allevo_6 da pascolo si sovrappongono parzialmente a quelli Allevo_4 da fieno nella porzione superiore sinistra. Il Pressato-fieno e l'Allevo_6-fieno si distribuiscono nella parte superiore sinistra del grafico. La discriminazione tra i gruppi sperimentali è rivelante come confermato dai valori significativamente alti delle distanze Mahalanobis (D^2 -Mahalanobis).

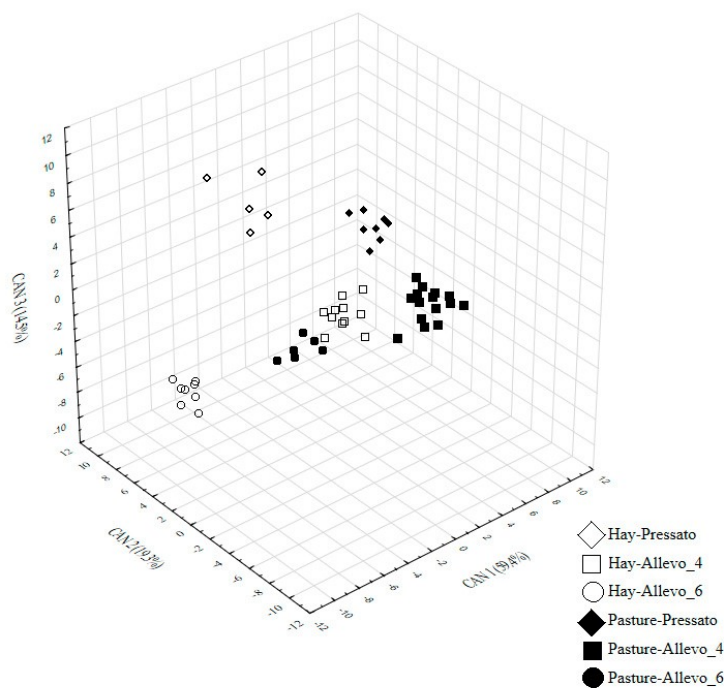


Figura 3.5.2. Grafico a dispersione tri-dimensionale dell'analisi discriminante canonica di sei gruppi sperimentali (due sistemi alimentari per tre tempi di stagionatura) di campioni di formaggio Asiago DOP. Pressato: due mesi di stagionatura, Allevo_4: quattro mesi di stagionatura; Allevo_6: sei mesi di stagionatura.

Per confermare l'accuratezza dell'algorithm CDA, gli autori effettuano una validazione che conferma l'attendibilità dei profili metabolici ^1H NMR nel discriminare campioni di formaggio Asiago DOP da pascolo e da fieno solo per la varietà Pressato, con il minore tempo di stagionatura (coefficiente di maturazione di Matthew = 1.00). All'aumentare della stagionatura si verifica una perdita progressiva dell'accuratezza.

3.6. Spettroscopia NIR

Gli ultimi risultati studio trattati nel presente lavoro derivano dall'applicazione della spettroscopia NIR nel discriminare tra tre diversi sistemi produttivi del formaggio Asiago d'Allevo, uno estensivo di montagna (AF) e due intensivi, di montagna (MF) e di pianura (LF; Cozzi *et al.*, 2009). Differenze significative nella composizione chimica riguardano la frazione lipidica e la componente azotata non proteica dei campioni AF rispetto a quelli degli altri due sistemi. Anche il profilo degli acidi grassi si differenzia significativamente nei campioni AF rispetto agli altri. Il formaggio delle aziende alpine presenta un minore contenuto di acidi grassi a corta catena e di C16:0 ed un aumento degli acidi grassi insaturi e degli ω -3. I formaggi MF e LF contengono invece maggiori concentrazioni di acidi

grassi a corta catena, C14:0 e C16:0. I differenti sistemi produttivi influenzano il colore del formaggio, come mostrato in tabella 3.6.1.

Tabella 3.6.1. Effetto dei sistemi produttivi sul colore del formaggio Asiago d'Alleva. SE, errore standard.

Composizione chimica	Sistemi produttivi			Contrasti ortogonali		
	AF	MF	LF	AF vs (MF + LF) / 2	MF vs LF	SE
Chiarezza	73.0	73.2	74.4	ns	ns	0.71
Rosso	2.0	0.2	0.2	< 0.001	ns	0.18
Giallo	18.6	14.9	14.2	< 0.001	ns	0.84

Il formaggio AF presenta tonalità del rosso e del giallo più intense rispetto ai prodotti industriali, mentre nessuna differenza si evidenzia tra i campioni MF e LF. La struttura canonica totale dell'analisi discriminante fattoriale (FDA) effettuata sul *dataset* dei parametri chimici e del colore mostra un valore λ di Wilks = 0.15 ($p < 0.0001$). Si individuano due fattori discriminanti: il primo è responsabile del 95% della variabilità totale e correla positivamente con C12:0, C14:0, C14:1, C16:0 e negativamente con C18:1 c9, C18:1 t11 ed il rossore; il secondo spiega il restante 5% di variabilità e correla positivamente con C16:1. I coefficienti canonici dei campioni per i tre sistemi produttivi vengono tracciati nel grafico mostrato in figura 3.6.1.

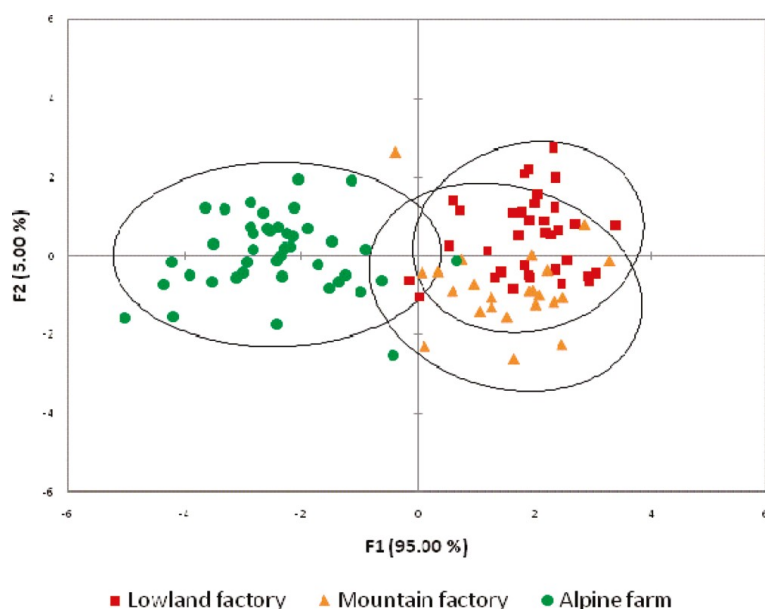


Figura 3.6.1. Analisi discriminante fattoriale dei campioni Asiago d'Alleva usando il *dataset* di parametri chimici e di colore: grafico della distribuzione spaziale dei campioni con ellissi del 95% di confidenza.

Vengono calcolate le distanze di Fisher tra i sistemi produttivi i cui valori risultano significativi solo per AF vs MF (10.3; $p < 0.001$) e AF vs LF (15.4; $p < 0.001$). Si osserva una sostanziale sovrapposizione tra i campioni MF e LF (distanze di Fisher = 1.0; $p < 0.43$). A conferma di ciò, la matrice di confusione generata da FDA mostra un'elevata percentuale di classificazione corretta solo per i campioni AF, con 0% di falsi positivi, 4.8% di falsi negativi ed un errore di validazione del 5.83%. Relativamente all'analisi spettroscopica NIR, i picchi negli spettri si localizzano a 1208, 1456, 1728, 1762, 1940, 2308 e 2348 nm per tutti e tre i sistemi produttivi dei campioni di Asiago d'Alleva. I risultati dell'analisi discriminante calcolati utilizzando gli spettri NIR sono presentati in tabella 3.6.2. Più del 90% dei campioni AF è correttamente assegnato alla classe di appartenenza con un tasso di falsa positività inferiore al 20%. L'accuratezza della classificazione basata sugli spettri NIR da soli risulta molto bassa per i campioni MF, che mostrano una sensibilità dell'8.7%. Cinque su otto campioni MF sono classificati erroneamente. La corretta classificazione di questi campioni viene migliorata dall'analisi discriminante che combina gli spettri con i dati chimici e di colore. La classificazione erronea tra i campioni MF e LF ottenuta dalla calibrazione basata sugli spettri NIR da soli è molto più frequente e viene solo parzialmente migliorata dall'analisi discriminante che combina gli spettri NIR con i parametri chimici e di colore.

Tabella 3.6.2. Matrice di confusione dell'analisi discriminante condotta per identificare correttamente i campioni di allevamento estensivo alpino (AF) da quelli industriali usando gli spettri NIR da soli o messi insieme ai parametri chimici e di colore.

		Spettri NIR					Spettri NIR + parametri chimici e di colore				
		previsti			Sensibilità (%)	Specificità (%)	previsti			Sensibilità (%)	Specificità (%)
reali	N	AF	MF	LF			AF	MF	LF		
AF	42	38	1	3	90.5	82.8	40	2	0	95.2	96.5
MF	23	8	2	13	8.7	94.8	2	16	4	69.6	92.2
LF	35	2	3	30	85.7	75.4	0	4	31	88.6	93.7

Sulla base di questi risultati, gli autori hanno sviluppato una serie finale di calibrazioni per discriminare i campioni AF da quelli industriali (tabella 3.6.3).

Tabella 3.6.3. Matrice di confusione dell'analisi discriminante condotta per identificare correttamente i campioni dei tre sistemi di produzione usando gli spettri NIR da soli o messi insieme ai parametri chimici e di colore.

		Spettri NIR				Spettri NIR + parametri chimici e di colore			
		previsti				previsti			
Reali	n	AF	industrie	Sensibilità (%)	Specificità (%)	AF	Industrie	Sensibilità (%)	Specificità (%)
AF	42	39	3	92.9	91.4	40	2	95.2	98.3
Industrie	58	5	53	91.4	92.9	1	57	98.3	95.2

La corretta identificazione dei campioni sulla base degli spettri NIR risulta soddisfacente per entrambi i gruppi con sensibilità e specificità superiori al 90%. L'accuratezza della discriminazione migliora leggermente combinando gli spettri con i valori chimici e di colore. La solidità dell'equazione discriminante basata sugli spettri NIRS da soli nel distinguere i campioni alpini da quelli industriali viene validata. Il *set* di validazione è costituito da sette campioni indipendenti di formaggio Asiago d'Alleva con un tempo di stagionatura simile a quello del *set* di *training*. Questi campioni vengono raccolti nel 2008, due derivano da AF e cinque da LF. La predizione per il sistema di produzione classifica correttamente tutti i campioni di validazione.

4. DISCUSSIONE

I risultati precedentemente descritti vengono di seguito discussi con lo scopo di trarre conclusioni sulla consistenza, attendibilità e praticità delle diverse procedure trattate.

4.1. DART-HRMS

Il fatto che Riuzzi *et al.* (2021) nella composizione chimica del latte abbiano riscontrato differenze significative ($p < 0.05$) nel lattosio quando la dieta è a base di fieno ed erba medica è probabilmente dovuto alla minore sintesi a livello ruminale di propionato, il principale precursore della gluconeogenesi nei ruminanti (Alothman *et al.*, 2019). Gli altri parametri potrebbero non mostrare significative variazioni perché il merito genetico delle bovine ed il valore nutrizionale dei foraggi somministrati sono simili tra le diverse aziende. Studi precedenti (Borreani *et al.*, 2013; Mordenti *et al.*, 2017) evidenziano che sostituire l'erba con il mais influenza leggermente la composizione del latte, soprattutto per quanto riguarda la proteina grezza che tende ad aumentare. Pertanto, in un mercato che valuta il latte considerando solo il contenuto di grasso e proteina, gli allevatori che somministrano una dieta più sostenibile a base di fieno ed erba medica non riceverebbero il giusto riconoscimento per altri caratteri qualitativamente validi, quali gli acidi grassi, le vitamine, i composti nutraceutici. Le diete che si basano prevalentemente sull'insilato di mais sono tipiche degli allevamenti intensivi e promuovono le monoculture di mais; quelle miste (insilato e fieno) prevedono un cambiamento nell'uso della terra coltivabile rispetto alle monoculture e la rotazione dei raccolti; le diete a base di fieno di prato ed erba medica, infine, incentivano la crescita di prati permanenti a salvaguardia del biotopo e sono sostenibili, come raccomandato dalle indicazioni della Comunità Europea.

Per valutare l'attendibilità della metodologia DART-HRMS nel discriminare gli effetti di diete diverse sul latte, Riuzzi *et al.* effettuano delle regressioni parziali dei minimi quadrati che danno risultati consistenti quando i dati vengono fusi insieme. I tre raggruppamenti in base alla dieta sono spazialmente separati, per effetto delle significative differenze nel profilo metabolico. Dai risultati ottenuti emerge che l'approccio statistico in esame viene rinforzato quando completato dalla fusione di livello medio, come riscontrato anche da Pirro *et al.* (2014). Tale procedura permette di ottenere informazioni più accurate sui dati ricavati dalla spettroscopia di massa ionizzata,

riducendo interferenze ed errori. Come evidenziato dai valori ≥ 0.90 delle statistiche descrittive, l'approccio integrato DART-HRMS e fusione dei dati è uno strumento valido nell'identificare il latte a seconda del foraggio somministrato con la dieta, in particolare quando si tratta di fieno ed erba medica (GH). La distinzione tra le diete a base di insilato di mais (MS) e quella mista (SH) è meno netta. Questi risultati confermano che l'origine botanica ed il metodo di conservazione dei foraggi modificano sostanzialmente il profilo metabolico del latte. Il metodo DART-HRMS individua efficacemente l'alimentazione a base di fieno ed erba medica (GH) e può così essere impiegato per certificare la maggiore sostenibilità ambientale e la produzione di derivati caseari di alta qualità nutrizionale ed organolettica (O'Callaghan *et al.*, 2018). La sostituzione del fieno ricavato da prati permanenti polifitici con crescenti quantitativi di insilato di mais e/o di altri foraggi può modificare la proporzione di NDF, con conseguenze che si ripercuotono sul processo metabolico che porta alla produzione del latte (Sun *et al.*, 2017). Gli ioni rilevati dal sistema DART-HRMS sono verosimilmente rappresentativi dei processi metabolici che avvengono nella conversione dei foraggi in latte; tuttavia, questo argomento richiede ulteriori approfondimenti.

Segue una disanima degli ioni riscontrati nelle diverse tipologie di dieta con relativa spiegazione del loro probabile ruolo metabolico. Il valore del lattosio è significativamente maggiore nei campioni di latte ottenuti da diete ricche di insilato di mais (MS) rispetto a quelle a base di fieno ed erba (GH). Il maggiore quantitativo di amido grezzo ed altri carboidrati rapidamente fermentescibili presenti nella dieta MS può aumentare la sintesi di propionato nel rumine, innalzando di conseguenza i livelli di glucosio e lattato nel latte (Mordenti *et al.*, 2017). La forte correlazione positiva tra MS e glutammato può essere spiegata dal fatto che questo è uno degli aminoacidi più abbondanti nel mais e risulta essere un *biomarker* del latte per le bovine ad alta produttività (Boudonck *et al.*, 2009; Melzer *et al.*, 2013). Besle *et al.* (2010) individuano nel latte delle bovine a cui viene somministrato insilato ottenuto dall'intera pianta del mais acido idrossicinamico, indicatore dell'idrolisi della parete cellulare che avviene durante il processo di insilamento. In letteratura (Foroutan *et al.*, 2019; Scano *et al.*, 2014), la creatinina è riscontrata nel latte in quanto metabolita intermedio del metabolismo energetico ed indicatore di condizioni alimentari stressanti nelle bovine in lattazione. Nel gruppo SH (dieta mista di insilati e fieno) lo stress potrebbe essere determinato da un'assunzione sbilanciata di nutrienti dovuta alla variabilità degli ingredienti della dieta. Tenori *et al.*

(2018) suggeriscono che la creatina ed il suo precursore, la creatina, potrebbero essere indicativi del valore nutrizionale del latte. Riuzzi *et al.* sono i primi a rilevare la norgramina tra i *biomarkers* della dieta SH; pertanto, la spiegazione della presenza di questo ione richiederebbe ulteriori studi ed approfondimenti. Il derivato del fumarato ed il metil 2-furoato sono composti a basso peso molecolare; la presenza del primo è rilevata anche nello studio di Melzer *et al.* (2013), quella del secondo in Hrbek *et al.* (2014); entrambi non sembrano correlare con specifiche varietà di fieno (Bugaud *et al.*, 2001). L'individuazione dei tre monoacilgliceroli è coerente con le osservazioni di Hrbek *et al.* (2014) e potrebbe essere spiegata con le frammentazioni che si verificano nel corso della processazione DART o fenomeni idrolitici nel latte; tuttavia, non c'è una chiara spiegazione che giustifichi la loro presenza nei campioni di latte del raggruppamento SH. Il *pool* di MAG è presente, in misura minore, anche nel latte del gruppo GH, evidenziando la maggiore incidenza di acidi grassi insaturi nelle diete SH e GH rispetto a quella a base di insilato di mais (MS). Le piante erbacee, insilate o essiccate, ed i fieni polifitici sono caratterizzati da una più alta concentrazione di acidi grassi poli-insaturi a lunga catena (PUFA) rispetto a *Zea mays* (Coppa *et al.*, 2015; Segato *et al.*, 2017). Questi risultati trovano conferma nel lavoro di Borreani *et al.* (2013), i quali dimostrano che razioni miste a base di insilati d'erba e di fieni forniscono maggiori quantità di PUFA rispetto a diete con prevalenza di insilato di mais. Un tratto molecolare distintivo di un sistema alimentare a base di erba e fieno è l'acido palmitico (C16:0), la cui incidenza diminuisce con regimi alimentari formati prevalentemente da insilato di mais (Coppa *et al.*, 2015). L'acido palmitico aumenta quando il pascolamento è sostituito dalla somministrazione di fieno essiccato (Borreani *et al.*, 2013; Segato *et al.*, 2017). La presenza del flavonoide *O*-metilato nei campioni di latte del sistema GH dimostra che i composti poli-fenolici antiossidanti si preservano nei fieni polifitici parzialmente essiccati ed immagazzinati in fienile in condizioni di oscurità (Besle *et al.*, 2010). Tracce di purina e 2-aminocotinato, presenti nei campioni di latte del gruppo GH, sono evidenziate anche da Boudonck *et al.* (2009) e Melzer *et al.* (2013) e si rivelano utili nella tracciabilità del latte. I due acidi organici, idrossi-2-metilglutarato e 2-idrossi-2-etilsuccinato potrebbero essere coinvolti nella via del piruvato (Boudonck *et al.*, 2009) e nella trasformazione del glicerolo in glucosio (Sun *et al.*, 2017), suggerendo una serie di cicli metabolici strettamente integrati a supporto del metabolismo del lattato a livello di ghiandola mammaria. I risultati ottenuti confermano che l'approccio combinato DART-HRMS e fusione dei dati è capace di individuare i metaboliti indicativi di un dato sistema alimentare.

4.2. Modelli multivariati

Lo studio di Riuzzi *et al.* (2021) è designato per delineare i profili degli acidi grassi nel latte, in bovine di alto merito genetico di allevamenti di pianura. Gli autori applicano l'analisi statistica univariata per valutare le principali differenze in produzione, qualità e profilo degli acidi grassi nel latte in base a cinque tipologie di dieta, poi effettuano l'analisi fattoriale discriminante per identificare gli acidi grassi peculiari di ciascun gruppo alimentare ed infine verificano mediante regressioni lineari multiple la significatività e la grandezza della relazione tra acido grasso discriminante e tipo di foraggio somministrato. Le *performances* riproduttive delle bovine sono strettamente correlate al *dry matter intake*. Il contenuto minore di proteina grezza, in particolare caseina, nel latte proveniente dal gruppo alimentare basato su erba e fieno (GRG) potrebbe essere dovuto ad uno squilibrio ruminale determinato dalla degradazione delle fibre altamente fermentescibili e delle fonti di azoto, che si verifica tipicamente per il consumo di erba verde. Inoltre, i bassi valori di proteina e caseina potrebbero spiegarsi con la presenza dei polifenoli che riducono la degradabilità delle proteine a livello ruminale e di conseguenza il rifornimento di aminoacidi. Il ridotto livello di lattosio nel latte GRG potrebbe essere determinato da uno scarso apporto di concentrati e di sostanza totale con conseguente ridotta sintesi di propionato. Come precedentemente detto, il propionato è il principale precursore della gluconeogenesi nei ruminanti e questo spiegherebbe la minore sintesi di glucosio e quindi di lattosio. Riuzzi *et al.* non riscontrano differenze significative nel contenuto totale di grassi tra i diversi gruppi alimentari. Le maggiori diversità interessano la concentrazione degli acidi grassi più rilevanti dal punto di vista nutrizionale. Queste sono spesso statisticamente significative quando si confrontano GRG (alimentazione a base di erba e fieno) e HMS (somministrazione di alte percentuali di insilato di mais). Un risultato interessante è l'effetto significativo ($p < 0.05$) della dieta a base di fieno ed erba fresca sulle concentrazioni totali di CLA, CLA9 ed il suo precursore acido vaccenico, specialmente quando si fa il confronto con diete a base di insilato di mais, coerentemente con quanto descritto da altri autori (Bär, 2020; O'Callaghan *et al.*, 2016). Le elevate concentrazioni di CLA sono probabilmente dovute ai foraggi polifitici ricchi di acido linoleico ed alfa-linolenico, che vanno incontro ad idrogenazione incompleta con la formazione dell'intermedio acido vaccenico al posto dell'acido stearico (C18:0). Sia l'acido vaccenico che l'acido stearico nella ghiandola mammaria vanno incontro a de-

saturazione, con sintesi rispettivamente di CLA9 ed acido oleico (OA, C18:1 *c*-9) (Borreani *et al.*, 2013). L'osservazione che le concentrazioni di CLA9 nel latte si riducono sostituendo nella dieta il pascolamento con la somministrazione di insilato di mais trova conferma nel lavoro di Akbaridoust *et al.* (2014). I foraggi somministrati con i sistemi alimentari HAY e GRG ottenuti da vegetazione polifitica di prati permanenti determinano nel latte maggiori concentrazioni anche di acido alfa linolenico (ALA), acido eicosapentaenoico (EPA) ed n-3 rispetto ad altre diete. Gli autori osservano che razioni costituite da insilato di mais come componente predominante aumentano nel latte i livelli di acidi grassi a corta catena (SCFA, C4:0 e C6:0) ed acido palmitico (PA), con incremento della concentrazione totale di acidi grassi saturi, ma questi risultati sono in contraddizione con quelli di altri lavori (Yang *et al.*, 2019). Gli acidi grassi a corta e media catena sono sintetizzati *de novo* nella ghiandola mammaria a partire da acetato e butirrato, mentre altri (come l'acido palmitico) possono derivare direttamente dall'alimentazione, soprattutto quando basata sull'insilato di mais (Segato *et al.*, 2017). Ad eccezione del gruppo HAY, il contenuto di NDF (indicativo della fibra digeribile) è costante in tutte le diete, con una media compresa tra 36.8 e 37.7%. Questo potrebbe spiegare perché gli acidi grassi a corta catena non si riducono con la somministrazione di insilato di mais, ma non giustifica l'incremento della sintesi *de novo*. L'obiettivo principale dello studio di Riuzzi *et al.* è valutare l'influenza dell'alimentazione sul *fingerprinting* lipidico nel latte, considerando cinque tipologie di foraggiamento. A tale scopo gli autori eseguono l'analisi discriminante fattoriale su settanta profili di acidi grassi ed evidenziano che i campioni di latte HAY correlano con l'acido alfa linolenico, che si conferma essere un forte *biomarker* specifico delle diete a base di fieno. Il latte GRG sembra essere caratterizzato principalmente da CLA9 e C17:0, acidi grassi comunque ben rappresentati anche in HAY. C16:1 *c*-9 è un debole *biomarker* lipidico di latte MCS e HMS e, insieme con C17:1 *c*-9, sembra correlare sia con MCS che con GRG. Tuttavia, spiegare il ruolo di questi acidi grassi non è semplice. C16:1 *c*-9 sembra indicare la somministrazione di insilati di mais (Coppa *et al.*, 2015) e di diete altamente concentrate (Eisenstecken *et al.*, 2021), mentre C17:1 *c*-9 si ritrova associato a diete a base di erba fresca (Coppa *et al.*, 2015). Altri lavori riportano che, rispetto all'erba fresca, gli insilati altamente digeribili aumentano nel latte le concentrazioni di acidi grassi saturi, come C10:0 (Segato *et al.*, 2017; Eisenstecken *et al.*, 2021) ed acido stearico (Akbaridoust *et al.*, 2014), a causa della più intensa bio-idrogenazione ruminale. La forte correlazione tra MMS ed acido stearico potrebbe essere spiegata con la maggiore produttività delle bovine di questo gruppo, che potrebbe

determinare un bilancio energetico negativo e conseguente mobilitazione delle riserve lipidiche corporee. Lo studio di Riuzzi *et al.* sostiene l'efficacia del profilo degli acidi grassi nel tracciare i prodotti caseari in base al sistema alimentare adottato e lo conferma ulteriormente mediante modelli di regressione lineare. Quest'ultima metodica analitica evidenzia che la somministrazione di insilati di mais e di altra natura influenza debolmente gli acidi grassi individuali, ma aumenta significativamente gli acidi grassi saturi totali con conseguente riduzione dei PUFA, soprattutto ALA e CLA9. Sostituire nella dieta gli insilati con fieno ed erba fresca determina maggiori concentrazioni nel latte di PUFA, soprattutto ALA e CLA9, ed effetti benefici sulla salute dei consumatori. Anche la composizione botanica e lo stadio maturativo al momento del raccolto influenzano le concentrazioni di ALA e dei PUFA totali e questo potrebbe giustificare le fluttuazioni che si osservano nello stesso gruppo HAY nel corso del tempo. La somministrazione di insilati "altri" sembra aumentare il contenuto di acidi grassi saturi nel latte più di quanto faccia la somministrazione di fieno, come mostrato dai coefficienti di regressione più alti. Il sistema alimentare che esercita il più grande effetto sulla composizione di acidi grassi del latte è GRG, in cui la somministrazione di erba fresca aumenta il livello di acidi grassi salutari, CLA e C17:0. Una previsione accurata della composizione degli acidi grassi sulla base dei foraggi assunti con la dieta è difficile da ottenere ed interpretare, per il fatto che la composizione lipidica del latte dipende dalla combinazione di molti fattori, l'alimentazione, la genetica, lo stadio di lattazione, la stagione (Młynek *et al.*, 2021). Occorre considerare anche la variabilità dell'origine botanica, dello stadio maturativo e del metodo di conservazione dei foraggi stessi, oltre alla gestione del sistema alimentare. Ciononostante, l'approccio multivariato adottato da Riuzzi *et al.* è in grado di fornire un valido supporto alla delineazione della componente lipidica del latte.

4.3. Spettroscopia MIR

Niero *et al.* (2021), applicano la metodica MIR e riportano le concentrazioni medie di acidi grassi nel latte campionato durante la stagione estiva da bovine al pascolo. Rispetto ai loro dati, altri autori (Bobbo *et al.*, 2021; Manuelian *et al.*, 2019) riportano valori maggiori di acidi grassi saturi (SFA) e minori di acidi grassi poli-insaturi (PUFA). Le differenze tra i diversi studi possono essere determinate dall'impiego di razze bovine diverse e dal regime alimentare, che nel lavoro di Niero *et al.* si basa sul consumo prevalente di erba fresca. Le correlazioni significative e positive tra gli acidi grassi e la

composizione lipidica del latte trovano conferma in letteratura (Soyeurt *et al.*, 2007; Petrini *et al.*, 2016). Le strategie gestionali e gli incroci effettuati allo scopo di aumentare la concentrazione lipidica del latte avrebbero quindi effetti non solo sulla frazione insatura degli acidi grassi ma anche su quella satura, con implicazioni per la salute dei consumatori. Oltre a questo aspetto, Vanrobays *et al.* (2016) verificano mediante modelli di regressione la correlazione tra la componente grassa del latte e le emissioni di metano e dimostrano che la produzione di metano (g / giorno) correla positivamente con le concentrazioni nel latte di C14:0, C18:0 e SFA. Queste correlazioni mostrano grandezza e *pattern* diversi a seconda dello stadio di lattazione. Chillard *et al.* (2009) osservano che l'associazione tra acidi grassi nel latte e produzione di metano potrebbe essere dovuta alle vie biochimiche ruminanti che sono comuni a metano, acetato e butirato, come anche all'effetto degli acidi grassi assunti con la dieta (a corta catena, a media catena e C18). In considerazione delle correlazioni evidenziate da Niero *et al.* tra gli acidi grassi individuali ed i gruppi di acidi grassi, nell'attuazione delle strategie per aumentare il grasso nel latte bisognerebbe tenere conto anche del profilo degli acidi grassi, delineandolo mediante spettroscopia MIR. La composizione degli acidi grassi del latte è determinata prevalentemente da quattro fattori: 1) dieta; 2) sintesi *de novo* a livello di ghiandola mammaria; 3) bio-idrogenazione ruminale; 4) mobilizzazione delle riserve lipidiche corporee (Stoop *et al.*, 2009). Alcune delle variazioni nelle percentuali di acidi grassi riscontrate da Niero *et al.* potrebbero essere dovute allo stress metabolico vissuto dagli animali nel passaggio dalla stalla ai pascoli, con conseguenze mobilizzazione delle riserve corporee. Gli acidi grassi saturi e gli acidi grassi a media catena decrescono con l'avanzare della stagione estiva al pascolo, diversamente dai PUFA che tendono ad aumentare, coerentemente con le osservazioni condotte da Gottardo *et al.* (2017). Una proporzione inferiore di acidi grassi a media catena ed acidi grassi saturi a favore di un maggiore contenuto di PUFA è desiderabile per la salute umana, in quanto riduce il rischio di patologie cardiovascolari e l'aterosclerosi (Hanuš *et al.*, 2018). I risultati dello studio di Niero *et al.* suggeriscono che il latte prodotto da bovine libere al pascolo, relativamente al profilo di acidi grassi, soddisfa le raccomandazioni sull'alimentazione umana.

4.4. Biomarkers lipidici

Si evidenziano risultati interessanti in termini di tracciabilità dei formaggi anche nel lavoro di Segato *et al.* (2017), che analizza la composizione chimica del formaggio Asiago DOP prodotto in tre diverse modalità corrispondenti a tre distinti regimi alimentari. L'osservazione che il formaggio ottenuto da bovine al pascolo è più ricco di MUFA, PUFA e CLA e più povero di SFA trova riscontro in letteratura (Schievano *et al.*, 2008; Stergiadis *et al.*, 2015). La concentrazione di questi componenti salutari aumenta per l'assunzione di erba fresca, ricca di precursori di C18, come gli acidi linolenico e linoleico, e per la prevenzione della riduzione ruminale dell'acido vaccenico in acido stearico (Kay *et al.*, 2004). Il C18:3 n-3 assunto pascolando va incontro a bio-idrogenazione e ne derivano C18:1 *trans*-11 e C18:0, che a livello di ghiandola mammaria vengono de-saturati in CLA. Gli acidi grassi a catena ramificata dispari (OBCFA) sono benefici per la salute ed il loro maggiore contenuto nei formaggi P-UL è dovuto al più alto quantitativo di foraggi nella dieta (Vlaeminck *et al.*, 2006). Le maggiori concentrazioni di vitamine A ed E nel formaggio P-UL si spiegano con l'evidenza che l'erba verde è ricca di carotenoidi e di α -tocoferolo, che vengono persi per l'esposizione al sole e l'ossidazione durante lo sfalcio e l'immagazzinamento (Noziere *et al.*, 2006). Segato *et al.* mostrano che i campioni di formaggio P-UL si caratterizzano per concentrazioni più alte di CLA, *anteiso*-C15:0 e vitamina A. Questi componenti lipidici si possono considerare *biomarkers* specifici dell'Asiago DOP prodotto a partire dai pascoli dell'altopiano. La separazione tra i campioni H-UL e MS-LL è meno marcata. I campioni di H-UL correlano con la frazione n-6 dei PUFA (C18:2 n-6, C20:3 n-6 e C20:4 n-6), mentre i principali *biomarkers* di MS-LL sono il ciclopropano e C9:0. Questi risultati trovano conferma in letteratura (Giaccone *et al.*, 2016; Coppa *et al.*, 2015), dove si riporta anche un aumento della sintesi *de novo* di acidi grassi saturi ed un contenuto minore di *cis*-9 C18:1 nel latte e nei formaggi derivati da regimi alimentari a base di insilato di mais ed altamente concentrati rispetto a quelli che prevedono la somministrazione prevalente di fieno o insilati d'erba. La più ampia biodiversità botanica del fieno di montagna rispetto ai foraggi di pianura è tale da giustificare il diverso contenuto di acidi grassi di H-UL rispetto a MS-LL. In letteratura sono riportate molte correlazioni positive tra la sintesi di specifici acidi grassi a lunga catena ed alcune famiglie vegetali di montagna, quali le *Fabaceae* e le *Cyperaceae* (Coppa *et al.*, 2011; Gorlier *et al.*, 2012). La presenza degli acidi grassi ciclici nei prodotti caseari è oggetto

di indagine. I ciclopropani (acidi diidrosterculico e lactobacillico) e gli ω -cicloesili (acidi ω -cicloesiltridecanoico e ω -cicloesilundecanoico) si evidenziano con la somministrazione di insilato di mais e granaglie di cereali, rispettivamente (Marseglia *et al.*, 2013). Si conferma così il ruolo degli acidi grassi ciclici nel tracciare la presenza di insilato di mais nella dieta delle bovine. Lo studio di Segato *et al.* (2017) verifica l'efficacia di *biomarkers* lipidici nel discriminare il formaggio Asiago DOP in base al sistema produttivo.

4.5. ^1H NMR

L'obiettivo principale dello studio di Segato *et al.* del 2019 è identificare e quantificare i profili metabolici idrosolubili dei formaggi alpini Asiago DOP ricavati da sistemi alimentari basati sul pascolo e sul fieno e con tre diversi tempi di maturazione. Gli autori identificano tredici segnali integrati ^1H NMR. I campioni derivati dal pascolamento si caratterizzano per i maggiori livelli di colina e 2,3-butanediolo. I fosfolipidi sono lipidi polari, le cui teste possono essere costituite da colina, etanolamina, serina ed altri. Nei foraggi freschi, la proporzione di fosfolipidi può superare il 25% e la fosfatidil colina ne rappresenta la principale componente. Probabilmente, il pascolamento nei prati alpini permette un maggiore trasferimento di colina dalle foglie verdi rispetto alla dieta a base di fieno. Il 2,3-butanediolo è un metabolita della via del citrato: il citrato viene degradato a piruvato, che può essere poi convertito in 2,3-butanediolo. Questo composto potrebbe essere identificato come uno dei *markers* del formaggio Asiago ottenuto dai pascoli Pressato. Risulta molto difficile trovare una spiegazione al significativamente maggiore contenuto di lisina nei campioni derivati dal pascolamento e di tirosina in quelli delle diete a base di fieno. Mordenti *et al.* (2017) ipotizzano che potrebbero derivare da uno squilibrio tra la disponibilità ed il fabbisogno amminoacidico. I campioni che si basano sull'apporto di fieno correlano con la presenza del composto zuccherino A, che potrebbe coincidere con il galattosio per il suo posizionamento a 3.43ppm (Boiani *et al.*, 2019). Un ruolo importante nell'identificazione di questi campioni potrebbe essere giocato anche dal composto ignoto 1, nonostante la sua bassa proporzione. Tutte le variabili individuate risentono del tempo di maturazione. Il formaggio Pressato è caratterizzato dalla presenza di 2,3-butanediolo, lisina, tirosina e zucchero C. Il 2,3-butanediolo è un componente del sapore del formaggio che tende a sparire con il passare del tempo (Ruggirello *et al.*, 2018). Il segnale dello zucchero C è centrato su 3.96 ppm, zona in cui si concentrano

prevalentemente gli zuccheri (Boiani *et al.*, 2019). La fenilalanina è uno dei *markers* principali dei formaggi molto stagionati. La lisina sembra correlare con i formaggi a corta-media maturazione, mentre la tirosina può essere considerata un *marker* di processi proteolitici prolungati (Ochi *et al.*, 2013). Il processo maturativo porta ad un progressivo aumento degli acidi organici come il lattato e l'aspartato (Moreira *et al.*, 2018) e lo studio di Segato *et al.* conferma il ruolo predominante di questi *markers* nell'identificare le varietà Allevato. I campioni più stagionati correlano negativamente con il contenuto di citrato. Il citrato del latte viene metabolizzato in acetato, acetoina e diacetile, composti molecolari aromatici che contribuiscono fortemente al sapore del formaggio stagionato (Foroutan *et al.*, 2019). Gli autori valutano che il profilo metabolico ^1H NMR è attendibile nel discriminare campioni di formaggio Asiago DOP da pascolo e da somministrazione di fieno solo per la varietà Pressato, cioè quella con il minore tempo di stagionatura. All'aumentare della stagionatura si verifica una perdita progressiva dell'accuratezza, per l'instaurarsi di una complessa serie di reazioni chimiche e biochimiche, trasformazioni microbiche perdita di acqua e diffusione di sale che avvengono durante tempi di maturazione prolungati. Di conseguenza, l'applicazione di questa metodica emergente per discriminare il formaggio Asiago DOP ottenuto dai pascoli da quello basato sulla somministrazione di fieno deve essere limitata ai prodotti con breve stagionatura.

4.6. Spettroscopia NIR

L'ultima metodica oggetto della presente trattazione è la spettroscopia NIR che Cozzi *et al.* (2009) usano per delineare le differenze tra tre diversi sistemi produttivi del formaggio Asiago d'Allevato, uno estensivo di montagna (AF) e due intensivi, di montagna (MF) e di pianura (LF). Relativamente alla composizione chimica, nei campioni AF il contenuto lipidico è significativamente minore. Questo si riscontra frequentemente nel latte ottenuto da sistemi estensivi e potrebbe trovare spiegazione nell'incapacità del pascolamento di soddisfare pienamente il fabbisogno energetico delle bovine in lattazione (Andrighetto *et al.*, 1996). Una seconda ipotetica spiegazione a questa evidenza potrebbe essere legata al valore economico del burro. Il burro AF ha un elevato valore economico ed è molto richiesto dai consumatori locali e dai turisti; quindi, in queste zone si usa intensificare la pre-scrematura del latte prima della processazione in formaggio. L'aumento della frazione azotata nel formaggio AF potrebbe essere il risultato di un processo di maturazione più intenso, probabilmente dovuto alle procedure di produzione e

stagionatura del formaggio meno standardizzate adottate dai piccoli produttori. Il formaggio delle aziende alpine contiene meno acidi grassi a corta catena e C16:0 e più acidi grassi insaturi e ω -3. Come noto e precedentemente descritto, il regime alimentare e soprattutto la quantità e qualità dei foraggi somministrati influenzano la composizione di acidi grassi del latte. I formaggi MF e LF ottenuti da latte di bovine alimentate con foraggi conservati e/o insilato di mais contengono maggiori concentrazioni di acidi grassi a corta catena, C14:0 e C16:0. Il formaggio derivato da allevamenti estensivi presenta una colorazione più intensa rispetto ai prodotti industriali. La tonalità più gialla dei formaggi ottenuti da latte di bovine al pascolo è stata riscontrata anche da altri autori (Carpino *et al.*, 2004; Segato *et al.*, 2007). Il colore giallo deriva da β -carotene e carotenoidi annessi, che dalle piante verdi passano al latte e quindi al formaggio. Questi composti sono sensibili ad ossidazione, fotolisi e temperatura e si perdono durante le fasi di conservazione ed immagazzinamento dei foraggi (Noziere *et al.*, 2006). Il grafico risultato dall'analisi discriminante fattoriale dei campioni Asiago d'Allevato, in considerazione dei parametri della composizione chimica e del colore dei diversi formaggi, evidenzia una distanza significativa dei campioni AF rispetto agli altri. MF e LF invece tendono a sovrapporsi come conseguenza del simile sistema gestionale adottato. Negli ultimi decenni, molti allevatori in montagna hanno adottato sistemi intensivi, introducendo razze di bovine altamente produttive e diete ricche di concentrati. Questa strategia ha aumentato il rendimento di latte ma ha conformato la qualità del formaggio agli standard dei prodotti di pianura. Relativamente all'analisi spettroscopica NIRS, i picchi negli spettri si localizzano a 1208, 1456, 1728, 1762, 1940, 2308 e 2348 nm per tutti e tre i sistemi produttivi dei campioni di Asiago d'Allevato. Le bande di assorbimento a 1456 e 1940 nm sono da attribuire all'acqua (Shenk *et al.*, 1992). Tutti i restanti picchi sono da attribuire ai lipidi (Lucas *et al.*, 2008; Pierce *et al.*, 1994). Probabilmente la buona discriminazione dei campioni AF mediante NIRS deriva dal loro profilo di acidi grassi. La classificazione risulta poco accurata tra i campioni MF e LF, coerentemente con i risultati dello studio di Schievano *et al.* (2008) che hanno cercato di identificare i sistemi produttivi di un sottogruppo di campioni dello stesso formaggio mediante risonanza magnetica nucleare. Si può concludere che localizzazione ed altitudine non possono essere considerati *markers* affidabili di una differente qualità di formaggio, a meno che non siano espressione di una diversa modalità di allevamento, con impiego di razze bovine e regimi alimentari diversi.

I risultati dello studio di Cozzi *et al.* indicano che i formaggi prodotti a diverse altitudini possono essere distinti dalla spettroscopia NIR e dalle analisi di laboratorio solo quando rappresentano sistemi di allevamento diversi. L'applicazione di NIRS per distinguere la produzione di formaggio Asiago d'Allevamento porta a risultati simili a quelli ottenuti mediante analisi della composizione chimica e del colore.

5. CONCLUSIONI

Gli allevamenti estensivi di montagna rappresentano realtà preziose per la sostenibilità ambientale che le contraddistingue, il ruolo di tutela del territorio che svolgono e la qualità delle produzioni lattiero-casearie che ne derivano. La comunità scientifica si dedica da anni allo studio e all'elaborazione di metodiche analitiche adatte all'identificazione degli aspetti nutrizionali ed organolettici dei prodotti caseari, distinguendoli in base all'alimentazione ed alla tipologia di allevamento delle bovine. Il presente trattato si focalizza su sei procedure analitiche con l'obiettivo finale di metterle a confronto a confronto.

La prima è l'analisi diretta in tempo reale accoppiata alla spettroscopia di massa ad alta risoluzione (DART-HRMS). L'approccio permette di identificare un *pool* di biomolecole a basso peso molecolare in grado di discriminare i campioni di latte in base alla somministrazione prevalente di fieno o di insilato di mais, confermando così che l'origine botanica ed il metodo di conservazione dei foraggi determina variazioni nelle molecole degradate a livello ruminale e poi trasportate alla ghiandola mammaria. Ulteriori sperimentazioni sono richieste per confermare l'efficacia di DART-HRMS nel tracciare i cambiamenti metabolici nel latte.

La correlazione tra il contenuto di acidi grassi del latte e l'origine botanica, il metodo di conservazione, la proporzione dei foraggi forniti con la dieta può essere indagata con l'applicazione di modelli multivariati. L'analisi fattoriale discriminante pone in evidenza differenze sostanziali nella composizione del latte in base al regime alimentare delle bovine, che può essere a base di insilati, fieno o erba fresca. La somministrazione di fieno ed erba fresca determina una maggiore concentrazione di acidi grassi benefici per la salute dei consumatori (quali ad esempio C17:0, ALA e CLA9). Rispetto a quello derivato da insilato di mais, il latte prodotto a partire da diete a base di fieno polifitico sembra essere caratterizzato da una maggiore variabilità nei profili degli acidi grassi. Gli autori rilevano che la sostituzione di insilato di mais con fieno e/o erba fresca nella razione delle bovine migliora la qualità nutrizionale del latte, riducendo il contenuto di acidi grassi saturi ed aumentando quello di CLA e PUFA a lunga catena n-3, aumentando così la sostenibilità nutrizionale dei prodotti caseari.

La terza tecnica descritta è la *Mid Infrared Spettroscopy* (MIR) per indagare l'effetto del pascolamento sulla concentrazione degli acidi grassi nel latte. Gli autori rilevano che il latte prodotto durante la stagione al pascolo è caratterizzato da concentrazioni più basse di acidi grassi a media catena e di acidi grassi saturi e da una proporzione maggiore di PUFA rispetto a quello ottenuto durante la stabulazione *indoor*. Pascolare ha un impatto positivo sulla composizione di acidi grassi del latte, soprattutto dal punto di vista della salute del consumatore. Questa osservazione, che richiede ulteriori approfondimenti, può incrementare il mercato dei prodotti derivati dalle bovine allevate con questa modalità, con implicazioni positive anche per la tutela del territorio.

La frazione lipidica permette di distinguere diversi processi produttivi del formaggio Asiago DOP. Il contenuto dei principali composti lipidici, come i PUFA, i CLA e le vitamine liposolubili, aumenta nei formaggi prodotti in montagna, soprattutto quando il regime alimentare prevede il pascolamento. Il ciclopropano ed il C9:0 sono *biomarkers* specifici degli allevamenti di pianura che si basano sulla somministrazione di insilati di mais.

I profili metabolici ^1H NMR sono attendibili nel discriminare il formaggio Asiago DOP ottenuto dai pascoli da quello derivante da una dieta a base di fieno limitatamente ai prodotti con breve stagionatura. All'aumentare della stagionatura si verifica una perdita progressiva dell'accuratezza per l'instaurarsi di una complessa serie di reazioni chimiche e biochimiche, trasformazioni microbiche, perdita di acqua e diffusione di sale che avvengono durante tempi di maturazione prolungati.

In ultima analisi, la spettroscopia NIR trova applicazione nel discriminare tre diversi sistemi produttivi del formaggio Asiago d'Alleva, uno estensivo di montagna e due intensivi, rispettivamente di montagna e di pianura. L'efficacia di questa metodica nel distinguere i diversi sistemi di allevamento è simile a quella ottenuta con altre modalità, confermando che la spettroscopia NIR costituisce una valida alternativa alle altre indagini laboratoristiche più dispendiose in termini di costi e tempo. NIRS è uno strumento utile nel tracciare i formaggi derivati dagli allevamenti estensivi alpini distinguendoli da quelli ottenuti da sistemi intensivi, anche se lavorati nello stesso ambiente. La certificazione della modalità di allevamento da cui derivano i prodotti contribuisce a promuovere le

realità estensive, che costituiscono l'unica soluzione sostenibile per la salvaguardia del territorio alpino che le ospita.

6. BIBLIOGRAFIA

Adler, S. A., Jensen, S. K., Govasmark, E., Steinshamn, H., 2013. Effect of short-term versus long-term grassland management and seasonal variation in organic and conventional dairy farming on the composition of bulk tank milk. *J. Dairy Sci.*, 96, 5793-5810.

Akbaridoust, G., Plozza, T., Trenerry, V. C., Wales, W. J., Auldist, M. J., Dunshea, F. R. and Ajlouni, S., 2014. Influence of different systems for feeding supplements to grazing dairy cows on milk fatty acid composition. *J Dairy Res.*, 81(2):156-63.

Ali, A.K.A. and Shook, G.E., 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, 63, 487-490.

Alothman, M., Hogan, S. A., Hennessy, D., Dillon, P., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., 2019. The “grass-fed” milk story: Understanding the impact of pasture feeding on the composition and quality of bovine milk. *Foods*, 8, 1-24.

Andrighetto, I., Berzaghi, P. and Cozzi, G., 1996. Dairy feeding and milk quality: the extensive systems. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 22, 241-250.

Andrighetto, I., Serva, L., Gazziero, M., Tenti, S., Mirisola, M. and Garbin, E., 2018. Proposal and validation of new indexes to evaluate maize silage fermentative quality in lab-scale ensiling conditions through the use of a receiver operating characteristic analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 242, 31-40.

ANKOM Technology, 2015. Method 13, 4/10/15: Neutral detergent fiber in feeds - filter bag technique (for A2000 and A2000I). https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_13_NDF_A2000.pdf.

ANKOM Technology, 2015. Method 12, 4/10/15: Acid detergent fiber in feeds - filter bag technique (for A2000 and A2000I). https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_12_ADF_A2000.pdf.

AOAC, 2003. Official Methods of Analysis.

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis.

AOAC, 2006. Official Methods of Analysis.

AOAC, 2000. Official Methods of Analysis.

Arnott, G., Ferris, C.P. and O'Connell, N.E., 2016. Review: Welfare of dairy cows in continuously housed and pasture-based production systems. *Animal*, 11, 261–273.

Astakhova, L., 2016. Short chain fatty acids (SCFA) reprogram gene expression in human malignant epithelial and lymphoid cells. *PLoS ONE* 11, 1-18.

Bär, C., Sutter, M., Kopp, C., Neuhaus, P., Portmann, R., Egger, L., Reidy, B., Bisig, W., 2020. Impact of herbage proportion, animal breed, lactation stage and season on the fatty acid and protein composition of milk. *Int. Dairy J.* 109, 104785.

Barreiro, J. R., Gonçalves, J. L., Grenfell, R., Leite, R. F., Juliano, L. and Santos, M. V., 2018. Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 801-807.

Besle, J. M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdagué, J. L., 2010. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science*, 93, 2846-2856.

Bisutti, V.; Merlanti, R.; Serva, L.; Lucatello, L.; Mirisola, M.; Balzan, S.; Tenti, S.; Fontana, F.; Trevisan, G.; Montanucci, L., Contiero, B., Segato, S., 2019. Multivariate and machine learning approaches for honey botanical origin authentication using near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 27, 65–74.

Bizzotto, M., 2003. Confronto tra i sistemi di allevamento della vacca da latte nell'Altopiano dei Sette Comuni: considerazioni zootecniche e gestionali. Tesi di Laurea in Scienze Forestali ed Ambientali. Padova, Università degli Studi di Padova.

Bobbo, T., Penasa, M. and Cassandro, M., 2020. Genetic parameters of bovine milk fatty acid profile, yield, composition, total and differential somatic cell count. *Animals*, 10, 2406.

Boiani, M., Sundekilde, U., Bateman, L.M., McCarthy, D.G., Maguire, A. R., Gulati, A., Guinee, T. P., Fenelon, M., Hennessy, D. and Fitzgerald, R. J., 2019. Integration of high and low field ¹H NMR to analyse the effects of bovine dietary regime on milk

metabolomics and protein-bound moisture characterisation of the resulting mozzarella cheeses during ripening. *Int. Dairy J.*, 91, 155–164.

Bonsembiante, M. e Cozzi, G., 2003. L'allevamento nella montagna veneta come sistema produttivo e strumento di difesa ambientale. In: *Le scienze animali al servizio dell'uomo. Alcuni scritti di Mario Bonsembiante*. Padova, Cleup Editrice, I, 211–234.

Borreani, G., Coppa, M., Revello-Chion, A., Comino, L., Giaccone, D. and Ferlay, A., 2013. Effect of different feeding strategies in intensive dairy farming systems on milk fatty acid profiles, and implications on feeding costs in Italy. *Journal of Dairy Science*, 96, 6840-6855.

Boudonck, K. J., Mitchell, M. W., Wulff, J. and Ryals, J. A., 2009. Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics. *Metabolomics*, 5, 375-386.

Bovolenta, S., Ventura, W. and Malossini, F., 2002. Dairy cows grazing and alpine pasture: Effect of pattern of supplement allocation on herbage intake, body condition, milk yield and coagulation properties. *Anim. Res.*, 51, 15–23.

Bugaud, C., Buchin, S., Coulon, J. B., Hauwuy, A. and Dupont, D., 2001. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. *Lait*, 81, 401-414.

Calberry, J.M., Plaizier, J.C., Einarson, M.S., McBride, B.W., 2003. Replacing chopped alfalfa hay with alfalfa silage in a high barley concentrate total mixed ration, *Journal of Dairy Science* 86, 3611–3619.

Carpino, S., Horne, J., Melilli, C., Licitra, G., Barbano, D. M. and Van Soest, P. J., 2004. Contribution of native pasture to the sensory properties of Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.*, 87, 308–315.

Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J. and Doreau, M., 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92, 5199-5211.

Christie, W. W., 1982. A simple procedure of rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.*, 23, 1072–1075.

- Christie, W. W., Sébédio, J. L., Juanéda, P., 2001. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). *Inform*, 12, 147–152.
- Cifuni, G. F., Claps, S., Signorelli, F., Di Francia, A. and Di Napoli, M. A., 2022. Fatty acid and terpenoid profile: a signature of mountain milk. *Int. Dairy J.* 127, 105301.
- Commission Internationale de L'Eclairage (CIE), 1976. Colorimetry: Official Recommendations of the International Commission on Illumination; CIE No. 15 (E-1.3.1); CIE, Parigi, Francia.
- Consonni, R. and Cagliani, L., 2008. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ^1H NMR spectroscopy. *Talanta*, 76, 200–205.
- Coppa, M., Chassaing, C., Ferlay, A., Agabriel, C., Laurent, C., Borreani, G., 2015. Potential of milk fatty acid composition to predict diet composition and authenticate feeding systems and altitude origin of European bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 98, 1539-1551.
- Coppa, M., Ferlay, A., Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Didiene, R., Farruggia, A., Montel, M. C., Martin, B., 2011. Milk fatty acid composition and cheese texture and appearance from cows fed hay or different grazing systems on upland pastures. *J. Dairy Sci.*, 94, 1132–1145.
- Corazzin, M., Romanzin, A., Sepulcri, A., Pinosa, M., Piasentier, E., Bovolenta, S., 2019. Fatty acid profiles of cow's milk and cheese as affected by mountain pasture type and concentrate supplementation. *Animals* 2, 9, 68.
- Cozzi, G. and Bizzotto, M., 2004. Sustainability and environmental impact of the dairy production systems in mountain areas. *Acta agriculturae slovenica*, supplement 1, 21–28.
- Cozzi, G., Ferlito, J., Pasini, G., Contiero, B., Gottardo, F., 2009. Application of Near-Infrared Spectroscopy as an alternative to Chemical and Color Analysis to discriminate the production chains of Asiago d'Allevato cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 11449–11454.
- Craige Trenerry, V., Akbaridoust, G., Plozza, T., Rochfort, S., Wales, W. J., Auldish, M., 2013. Ultra-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry characterisation of milk polar lipids from dairy cows fed different diets. *Food Chemistry*, 141, 1451-1460.

- Croissant, A. E., Washburn, S. P., Dean, L. L. and Drake, M. A., 2007. Chemical properties and consumer perception of fluid milk from conventional and pasture-based production systems. *Journal of Dairy Science*, 90, 4942-4953.
- Dalla Riva, A., Burek, J., Kim, D., Thoma, G., Cassandro, M. and De Marchi, M., 2018. The environmental analysis of asiago PDO cheese: A case study from farm gate-to-plant gate. *Ital. J. Anim. Sci.* 17:250–262.
- De Marchi, M., Bittante, G., Dal Zotto, R., Dal Vit, C. and Cassandro, M., 2008. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *J. Dairy Sci.* 91:4092–4102
- De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M. and Penasa, M., 2014. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk. *J. Dairy Sci.*, 97, 1171–1186.
- DeVries, T.J., Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M., 2004. Effect of feeding space on the inter-cow distance, aggression, and feeding behavior of free-stall housed lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 1432-1438.
- Dirksen, G., Liebich, H.G., Mayer, W., 1985. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their function and clinical significance. *Bovine Practitioner*. 20, 116–120.
- DOOR, 2018. Database of PDO, PGI and TSG. European Union.
- Eisenstecken, D., Stanstrup, J., Robatscher, P., Huck, C. W. and Oberhuber, M., 2021. Fatty acid profiling of bovine milk and cheese from six European areas by GC-FID and GC-MS. *Int. J. Dairy Technol.* 74, 215-224.
- Faulkner, H., 2018. Effect of different forage types on the volatile and sensory properties of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 101, 1034-104.
- Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., Badran, H., Budinski, Z., Mandal, R., Ametaj, B. N., 2019. Chemical composition of commercial cow's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 4897–4914.
- Garnett T., 2009. Livestock-related greenhouse gas emissions: impacts and options for policy makers. *Environmental Science & Policy, Special Issue: Food Security and Environmental Change*, 12, n. 4:491–503.

Ghosh, S. K., Perrine, S. P., Williams, R. M. and Faller, D. V., 2012. Histone deacetylase inhibitors are potent inducers of gene expression in latent EBV and sensitize lymphoma cells to nucleoside antiviral agents. *Blood* 119, 1008-1017.

Giaccone, D., Revello-Chion, A., Galassi, L., Bianchi, P., Battelli, G., Coppa, M., Tabacco, E., Borreani, G., 2016. Effect of milk thermisation and farming system on cheese sensory profile and fatty acid composition. *Int. Dairy J.*, 59, 10-19.

Gianelle, D., Romanzin, A., Clementel, F., Vescovo, L., Bovolenta, S., 2018. Feeding management of dairy cattle affect grassland dynamics in an alpine pasture. *Int. J. Agric. Sustain.*, 16, 64–73.

Gibb, S. and Strimmer, K., 2012. Maldiquant: A versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics*, 28, 2270-2271.

González-García, S., Castanheira, E. G., Dias, A. C., Arroja, L., 2013. Using Life Cycle Assessment methodology to assess UHT milk production in Portugal. *Science of The Total Environment* 442: 225–34.

Gorlier, A., Lonati, M., Renna, M., Lussiana, C., Lombardi, G., Battaglini, L. M., 2012. Changes in pasture and cow milk composition during a summer transhumance in the western Italian Alps. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2012, 85, 216–223.

Gottardo, P., Penasa, M., Righi, F., Lopez-Villalobos, N., Cassandro, M. and De Marchi, M., 2017. Fatty acid composition of milk from Holstein-Friesian, Brown Swiss, Simmental and Alpine Grey cows predicted by mid-infrared spectroscopy. *Ital. J. Anim. Sci.*, 16, 380–389.

Gulati, A., Galvin, N., Lewis, E., Hennessy, D., O'Donovan, M., McManus, J. J., Fenelon, M. A., and Guinee, T. P., 2018. Outdoor grazing of dairy cows on pasture versus indoor feeding on total mixed ration: Effects on gross composition and mineral content of milk during lactation. *J. Dairy Sci.* 101:2710–2723.

Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., Kala, R., 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability—A review. *Molecules*, 23, 1636.

- Hajslova, J., Cajka, T., & Vaclavik, L., 2011. Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30, 204-218.
- Haug, A., Høstmark, A. T. and Harstad, O. M., 2007. Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids Health Dis.* 6, 1-16.
- Holman, J. D., Tabb, D. L. and Mallick, P., 2014. Employing ProteoWizard to convert raw mass spectrometry data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 46, 13.24.1-13.24.9.
- Hrbek, V., Vaclavik, L., Elich, O. and Hajslova, J., 2014. Authentication of milk and milk-based foods by direct analysis in real time ionization-high resolution mass spectrometry (DART-HRMS) technique: A critical assessment. *Food Control*, 36, 138-145.
- Indyk, H. E., 1990. Simultaneous liquid chromatographic determination of cholesterol, phytosterols and tocopherols in food. *Analyst*, 115, 1525–1530.
- International Dairy Federation (IDF), 2017. Bulletin 445/2010.
- Iribarren D., Hospido A., Moreira M. T., Feijoo, G., 2011. Benchmarking environmental and operational parameters through eco-efficiency criteria for dairy farms. *Science of The Total Environment* 409 n. 10:1786–1798.
- Kay, J. K., Mackle, T. R., Auldist, M. J., Thomson, N. A. and Bauman, D. E., 2004. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *J. Dairy Sci.*, 87, 369–378.
- Lamanna, R., Braca, A., Di Paolo, E. and Imperato, G., 2011. Identification of milk mixtures by ¹H NMR profiling. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49, S22-S26.
- Langoni, H., Camargo da Silva, C. P., Troncarelli, M. Z., Tata, A., Belaz, K. R. A., Eberlin, M. N., 2017. Short communication: Identification of *Corynebacterium bovis* by MALDI-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 100, 4287-4289.
- Lanza, I. *et al.*, 2021. Use of GC-MS and ¹H NMR low-level data fusion as an advanced and comprehensive metabolomic approach to discriminate milk from dairy chains based on different types of forage. *Int. Dairy J.* 123, 105174.

- Larsen, M. K., Nielsen, J. H., Butler, G., Leifert, C., Slots, T., Kristiansen, G. H. and Gustafsson, A. H., 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *J. Dairy Sci.* 93:2863–2873.
- Leiber, F., Kreuzer, M., Leuenberger, H. and Wettstein, H.R., 2006. Contribution of diet type and pasture conditions to the influence of high altitude grazing on intake, performance and composition and renneting properties of the milk of cows. *Anim. Res.*, 55, 37–53.
- Leonardi, C. and Armentano, L.E., 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows, *Journal of Dairy Science* 86, 557–564.
- Lolli, V., Dall’Asta, M., Del Rio, D. and Caligiani, A., 2018. In vitro digestibility of cyclopropane fatty acids in Grana Padano cheese: a study combining ¹H NMR and GC-MS techniques. *J. Food Eng.*, 237, 226–230.
- Lora, I., Zidi, A., Magrin, L., Prevedello, P. and Cozzi, G., 2020. An insight into the dairy chain of a Protected Designation of Origin cheese: the case study of Asiago cheese. *J. Dairy Sci.* 103, 9116–9123.
- Lucas, A., Andueza, D., Rock, E. and Martin, B., 2008. Prediction of dry matter, fat, pH, vitamins, minerals, carotenoids, total antioxidant capacity, and color in fresh and freeze dried cheeses by visible-nearinfrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6801–6808.
- Mack, G., Walter, T. and Flury, C., 2013. Seasonal alpine grazing in Switzerland: Economic importance and impact on biotic communities. *Environ. Sci. Pol.*, 32, 48–57.
- Maekawa, M., Beauchemin, K.A., Christensen, D.A., 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows, *Journal of Dairy Science* 85, 1165–1175.
- Malet-Martino, M., Gerothanassis, I. P., 2019. NMR-based metabolomics of the lipid fraction of organic and conventional bovine milk. *Molecules*, 24, 1067.
- Manuelian, C.L., Penasa, M., Visentin, G., Benedet, A., Cassandro, M. and De Marchi, M., 2019. Multi-breed herd approach to detect breed differences in composition and fatty acid profile of cow milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 64, 11–16.

- Marseglia, A., Caligiani, A., Comino, L., Righi, F., Quarantelli, A., Palla, G., 2013. Cyclopropyl and ω -cyclohexyl fatty acids as quality markers of cow milk and cheese. *Food Chem.* 2013, 140, 711–716.
- Mazzei, P. and Piccolo, A., 2012. ^1H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chem.*, 132, 1620–1627.
- Melzer, N., Wittenburg, D., Hartwig, S., Jakubowski, S., Kesting, U. and Willmitzer, L., 2013. Investigating associations between milk metabolite profiles and milk traits of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 1521-1534.
- Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463–1481.
- Mertens, D. R. 2002. Physical and chemical characteristics of fiber affecting dairy cow performance. Pages 125–144 in *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf.* Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Miano, B., Righetti, L., Piro, R., Dall'Asta, C., Folloni, S., Galaverna, G., 2018. Direct analysis real-time-high-resolution mass spectrometry for *Triticum* species authentication. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35, 2291-2297.
- Mirabelli, M. F., Gionfriddo, E., Pawliszyn, J. and Zenobi, R., 2019. Fast screening of illicit drugs in beverages and biological fluids by direct coupling of thin film microextraction to dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry. *Analyst*, 144, 2788-2796.
- Młynek, K., Danielewicz, A. and Strączek, I, 2021. The effect of energy metabolism up to the peak of lactation on the main fractions of fatty acids in the milk of selected dairy cow breeds. *Animals* 11, 1-14.
- Mordenti, A. L., Brogna, N. and Formigoni, A., 2017. Review. The link between feeding dairy cows and Parmigiano-Reggiano cheese production area. *Professional Animal Scientist*, 33, 520-529.
- Moreira, G.M., Costa, R. G., Teodoro, V. A., Paula, J. C., Sobral, D., Fernandes, C., Gloria, M. B. A., 2018. Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese. *LWT*, 98, 583–590.

- Morlock, G. and Schwack, W., 2006. Determination of isopropylthioxanthone (ITX) in milk, yoghurt and fat by HPTLC-FLD, HPTLC-ESI/MS and HPTLC-DART/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 586-595.
- Niero, G., Bobbo, T., Callegaro, S., Visentin, G., Pornaro, C., Cassandro, M., Cozzi, G., De Marchi, M. and Penasa, M., 2021. Summer pasture in mountainous area affects milk fatty acid profile of dual-purpose cows. *Agriculture*, 11, 928.
- Niero, G., Koczura, M., De Marchi, M., Currò, S., Kreuzer, M., Turille, G. and Berard, J., 2018. Are cheese-making properties of dual-purpose cattle impaired by highland grazing? A case study using Aosta Red Pied cows. *Ital. J. Anim. Sci.*, 17, 827–834.
- Noziere, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P. and Doreau, M., 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 418–450.
- Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L. A., 1988. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. *J. Food Sci.*, 53, 74–78.
- O'Callaghan, T. F., Hennessy, D., McAuliffe, S., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M. and Dillon, P., 2016. Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation. *Journal of Dairy Science*, 99, 9424-9440.
- O'Callaghan, T.F., Vázquez-Fresno, R., Serra-Cayuela, A., Dong, E., Mandal, R., Hennessy, D., McAuliffe, S., Dillon, P., Wishart, D. S. and Stanton, C., 2018. Pasture feeding changes the bovine rumen and milk metabolome. *Metabolites*, 8, 27.
- Ochi, H., Sakai, Y., Koishihara, H., Abe, F., Bamba, T. and Fukusaki, E., 2013. Monitoring the ripening process of Cheddar cheese based on hydrophilic component profiling using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Dairy Sci.*, 96, 7427–7441.
- Palarea-Albaladejo, J., McLean, K., Wright, F. and Smith, D. G. E., 2018. MALDIrppa: Quality control and robust analysis for mass spectrometry data. *Bioinformatics*, 34, 522-523.
- Parodi, P. W., 2004. Milk fat in human nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.*, 59, 3-59.
- Pereira, P. C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 30, 619-627.

- Petrini, J., Iung, L. H. S., Rodriguez, M. A. P., Salvian, M., Pértille, F., Rovadoscki, G.A., Cassoli, L. D., Coutinho, L. L., Machado, P. F. and Wiggans, G. R., 2016. Genetic parameters for milk fatty acids, milk yield and quality traits of a Holstein cattle population reared under tropical conditions. *J. Anim. Breed. Genet.*, 133, 384–395.
- Pierce, M. M. and Wehling, R. L., 1994. Comparison of sample handling and data treatment methods for determining moisture and fat in cheddar cheese by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2830–2835.
- Pirro, V., Oliveri, P., Ferreira, C. R., Gonz_alez-Serrano, A. F., Machaty, Z. and Cooks, R. G., 2014. Lipid characterization of individual porcine oocytes by dual mode DESIMS and data fusion. *Analytica Chimica Acta*, 848, 51-60.
- Rego, O. A., Cabrita, A. R. J., Rosa, H. J. D., Alves, S. P., Duarte, V., Fonseca, A. J. M., Vouzela, C. F. M., Rocha Pires, F. and Bessa, R. J. B., 2016. Changes in milk production and milk fatty acid composition of cows switched from pasture to a total mixed ration diet and back to pasture. *Ital. J. Anim. Sci.* 15, 76-86.
- Repar, N., Jan, P., Nemecek, T., Dux, D., Doluschitz, R., 2018. Factors affecting global versus local environmental and economic performance of dairying: a case study of swiss mountain farms. *Sustainability*, 10, 2940.
- Riuzzi, G., Tata, A., Massaro, A., Bisutti, V., Lanza, I., Contiero, B., Bragolusi, M., Miano, B., Negro, A., Gottardo, F., Piro, R., Segato, S., 2021. Authentication of forage-based milk by mid-level data fusion of (+/-) DART-HRMS signatures. *International Dairy Journal*, 112.
- Romanzin, A., Corazzin, M., Favotto, S., Piasentier, E., Bovolenta, S., 2016. Montasio cheese liking as affected by information about cows breed and rearing system. *J. Dairy Res.*, 64, 15-21.
- Romanzin, A., Corazzin, M., Piasentier, E. and Bovolenta, S., 2018. Concentrate supplement modifies the feeding behaviour of Simmental cows grazing in two high mountain pastures. *Animals*, 8, 76.
- Ruggirello, M., Giordano, M., Bertolino, M., Ferrocino, I., Cocolin, L. and Dolci, P., 2018. Study of *Lactococcus lactis* during advanced ripening stages of model cheeses characterized by GC-MS. *Food Microbiol.*, 74, 132–142.

- Scano, P., Cusano, E., Caboni, P., Consonni, R., 2019. NMR metabolite profiles of dairy: a review. *Int. Dairy J.*, 90, 56–67.
- Scano, P., Murgia, A., Pirisi, F. M. and Caboni, P., 2014. A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk. *Journal of Dairy Science*, 97, 6057-6066.
- Schievano, E., Pasini, G., Cozzi, G. and Mammi, S., 2008. Identification of the production chain of Asiago d'Allevo cheese by nuclear magnetic resonance spectroscopy and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7208–7214.
- Schwolow, S., Gerhardt, N., Rohn, S. and Weller, P., 2019. Data fusion of GC-IMS data and FT-MIR spectra for the authentication of olive oils and honeys-is it worth to go the extra mile? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 6005-6019.
- Segato, S., Merlanti, R., Bisutti, V., Montanucci, L., Serva, L., Lucatello, L., Mirisola, M., Contiero, B., Conficoni, D., Balzan, S., Marchesini, G. and Capolongo, F., 2019. Multivariate and machine learning models to assess the heat effects on honey physicochemical, colour and NIR data. *Eur. Food Res. Technol.* 245, 2269-2278.
- Segato, S., Balzan, S., Elia, C. A., Lignitto, L., Granata, A., Magro, L., Contiero, B., Andrighetto, I. and Novelli, E., 2007. Effect of period of milk production and ripening on quality traits of Asiago cheese. *Ital. J. Anim. Sci.*, 6 (Suppl. 1), 469–471.
- Segato, S., Caligiani, A., Contiero, B., Galaverna, G., Bisutti, V. and Cozzi, G., 2019. ¹H NMR metabolic profile to discriminate pasture based alpine asiago PDO cheeses. *Animals*, 9, 1-11.
- Segato, S., Galaverna, G., Contiero, B., Berzaghi, P., Caligiani, A., Marseglia, A., Cozzi, G., 2017. Identification of Lipid Biomarkers to discriminate between the different production systems for Asiago PDO Cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 65, 9887–9892.
- Shenk, J. S., Workman J. J. and Westerhaus M. O., 1992. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In *Handbook of Near-Infrared Analysis*; Burns, D. A., Ciurczak, E.W., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, NY; pp 383-431.
- Soyeurt, H., Gillon, A., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C. and Gengler, N., 2007. Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 90, 4435–4442.

- Stergiadis, S., Bieber, A., Franceschin, E., Isensee, A., Eyre, M. D., Maurer, V., Chatzidimitriou, E., Cozzi, G., Bapst, B., Stewart, G., Gordon, A., Butler, G., 2015. Impact of US Brown Swiss genetics on milk quality from low-input herds in Switzerland: Interactions with grazing intake and pasture type. *Food Chem.* 175, 609-618.
- Stoop, W.M., Bovenhuis, H., Heck, J. M. and van Arendonk, J. A., 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein–Friesian cows. *J. Dairy Sci.*, 92, 1469–1478.
- Sun, H.-Z., Shi, K., Wu, X.-H., Xue, M.-Y., Wei, Z.-H., Liu, J.-X., 2017. Lactation related metabolic mechanism investigated based on mammary gland metabolomics and 4 biofluids' metabolomics relationships in dairy cows. *BMC Genomics*, 18, Article 936.
- Tenori, L., Santucci, C., Meoni, G., Morrocchi, V., Matteucci, G. and Luchinat, C., 2018. NMR metabolomic fingerprinting distinguishes milk from different farms. *Food Research International*, 113, 131-139.
- Thomassen, M. A. and De Boer, I. J. M., 2005. Evaluation of indicators to assess the environmental impact of dairy production systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 111, n. 1:185-199.
- Tsiafoulis, C.G., Papaemmanouil, C., Alivertis, D., Tzamaloukas, O., Miltiadou, D., Balayssac, S., Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant* (2nd ed.), Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Vanrobays, M. L., Bastin, C., Vandenplas, J., Hammami, H., Soyeurt, H., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Gengler, N., 2016. Changes throughout lactation in phenotypic and genetic correlations between methane emissions and milk fatty acid contents predicted from milk mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.*, 99, 7247–7260.
- Vicente, F., Santiago, C., Jiménez-Calderon, J. D., Martínez-Fernandez, A., 2017. Capacity of milk composition to identify the feeding system used to feed dairy cows. *J. Dairy Res.*, 84, 254-263.
- Viola, F., 1989. Alcuni spunti di ecologia circa il valore delle risorse umane e naturali nell'area montana in riferimento alla tutela ed edificabilità del territorio agricolo. *Veneto Agricoltura*, 21–23.

- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M. and Dewhurst, R. J., 2006. Factors affecting odd-and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 389–417.
- Voisin, A., 1959. *Grass Productivity*; Philosophical Library Inc.: New York, NY, USA.
- Yang, W.Z. and Beauchemin, K.A., 2006. Effects of physically effective fiber on chewing activity and ruminal pH of dairy cows fed diets based on barley silage, *Journal of Dairy Science* 89, 217–228.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. and Rode, L.M., 2001. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84, 2203–2216.
- Yang, Y., Ferreira, G., Corl, B. A. and Campbell, B. T, 2019. Production performance, nutrient digestibility, and milk fatty acid profile of lactating dairy cows fed corn silage- or sorghum silage-based diets with and without xylanase supplementation. *J. Dairy Sci.* 102, 2266-2274.
- Zahar, M., Smith, D. E., 1990. Vitamin A quantification in fluid dairy products: rapid method for vitamin A extraction for high performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, 73, 3402–3407.