

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
*Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse
naturali e Ambiente*
Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

TESI DI LAUREA

**APPLICAZIONE DI TECNICHE MULTI-ANALITICHE PER
L'AUTENTICAZIONE DEL FORMAGGIO ASIAGO**

Relatore: Dott. Severino Segato
Correlatore: Ch.mo Prof. Martino Cassandro

Laureando: Mose' Giaretta

matricola 1040338

Anno Accademico 2013/2014

Alla mia Famiglia,

INDICE

RIASSUNTO.....	pag.5
ABSTRACT.....	pag.6
1. INTRODUZIONE.....	pag.7
1.1 Il formaggio “Asiago” DOP.....	pag.7
1.2 Fattori influenzanti la qualità dei formaggi.....	pag.11
1.3 Tecniche multianalitiche e autenticità.....	pag.14
2. OBIETTIVO.....	pag.25
3. MATERIALI E METODI	pag.26
3.1 Tesi a confronto.....	pag.26
3.2 Descrizione della tecnologia di produzione del formaggio Asiago...	pag.28
3.3 Metodiche Analitiche.....	pag.33
3.3.1 Analisi Acidi Grassi.....	pag.33
3.3.2 Analisi Vitamine Liposolubili	pag.34
3.3.3 Analisi del Colore.....	pag.34
3.4 Analisi Statistica.....	pag.35

4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	pag.37
4.1 Influenza del sistema di produzione sulla qualità nutrizionale e reologica.....	pag.37
4.2 Analisi discriminante dei sistemi di produzione sulla base degli acidi grassi.....	pag.39
4.3 Analisi discriminante dell'epoca di stagionatura sulla base degli acidi grassi.....	pag.46
4.4 Analisi discriminante del sistema di produzione sul colore.....	pag.50
5. CONCLUSIONI.....	pag.57
BIBLIOGRAFIA.....	pag.59
RINGRAZIAMENTI.....	pag.63

RIASSUNTO

Lo scopo della tesi e della sperimentazione condotta, è stato quello di ricercare nel formaggio Asiago d'Allevio dei markers chimico-fisici capaci di garantire l'autenticità della provenienza del formaggio e scongiurare eventuali frodi alimentari.

Per fare ciò, sono state prese in analisi 121 formaggi provenienti da varie realtà della Provincia di Vicenza, ma tutte riconducibili essenzialmente a tre sistemi di produzione.

Le varie realtà analizzate sono state suddivise nelle seguenti tipologie : HL-BM (Highland Barn May) ovvero produzione di montagna a maggio in stalla (poiché l'alpeggio nel mese di maggio non è ancora iniziato), HL-PJ (Highland pasture in July) produzione al pascolo in montagna a luglio, HL-PS (Highland pasture in September) produzione al pascolo in settembre ed infine LL-B (Lowland Barn) ovvero produzione in pianura.

Per ogni realtà d'origine sono stati prelevati campioni di formaggio a 6, 12, 18 e 36 mesi di stagionatura. I campioni sono stati analizzati per il profilo in acidi grassi.

Anche il colore è stato analizzato attraverso uno spettrofotometro. Sul dataset nutrizionale (profilo acidi grassi e vitamine liposolubili) e su quello colorimetrico è stata eseguita una analisi discriminante mediante uno specifico modello matematico-statistico.

I risultati ottenuti hanno denotato una ottima capacità dei CLA nel discriminare i formaggi rispetto al sistema di produzione, soprattutto si è riusciti a distinguere nettamente fra i formaggi provenienti dalla pianura e quelli provenienti dal pascolo di montagna. Meno marcata la discriminazione da parte dei CLA rispetto al periodo di stagionatura. Per quanto riguarda l'analisi del colore invece si è dimostrata assolutamente un'analisi inaffidabile, poichè non è riuscita in alcun modo a discriminare i formaggi ne rispetto all'origine ne rispetto alla stagionatura.

In sintesi, emerge una maggiore qualità nutrizionale dei formaggi prodotti in alpeggio rispetto a quelli prodotti in pianura e la possibilità di perfezionare un modello matematico statistico basato sull'analisi del profilo acidico.

ABSTRACT

The purpose of the thesis and the test conducted, was to research the “Asiago d’Allevo” cheese physical-chemical markers capable of guaranteeing the authenticity of the origin of the cheese and avoid potential food fraud.

To do this, there were 121 cheeses taken into analysis from various areas of the province of Vicenza, but all were essentially related to three production systems.

The various areas analyzed were divided into the following types: HL-BM or mountain productions in May in the barn (because in May the pasture has not started yet), HL-PJ production cow grazing in the mountains in July, HL-PS production to cow grazing in September and finally LL-B or production in the plains.

For each area of origin, cheese samples were taken at 6, 12,18 and 36 months of age. The samples were processed for fatty acid profile.

Even the color was analyzed through spectroscopy color analysis. On the nutritional database (profile fatty acids and fat-soluble vitamins) and on colorimetric one, a discriminant analysis was performed using a specific mathematical-statistical model.

The results obtained denoted a great capacity of CLA in discriminating the cheeses with respect to production system, and above all, we were able to distinguish clearly between the cheeses from the plains and those from the mountain pastures. The lower marked were separated by CLA compared to the aging periods. As regards to the analysis of the color, it proved to be totally unreliable because it was not able in any way to discriminate the cheeses by their origin or by their season.

In summary, the best quality nutrition of cheeses was found which were produced on the pasture compared to those produced in the plains and an opportunity to refine a mathematical model based on statistical analysis of fatty acid profile.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Il formaggio “Asiago” DOP

L’ Asiago è un formaggio di latte vaccino a pasta semidura prodotto nell’area nord-est d’Italia (nella regione del Veneto e nella regione del Trentino Alto Adige), riconosciuto dall’Unione Europea come prodotto tipico e di origine protetta (DOP).

Questo formaggio viene prodotto e venduto in due tipologie:

- Il “pressato” sottoposto ad una pressatura e caratterizzato da un periodo di stagionatura breve (minimo 20 giorni);
- “l’allevato” varietà non sottoposta a pressatura e caratterizzata da un periodo di stagionatura più lungo (dai 6 ai 36 mesi).

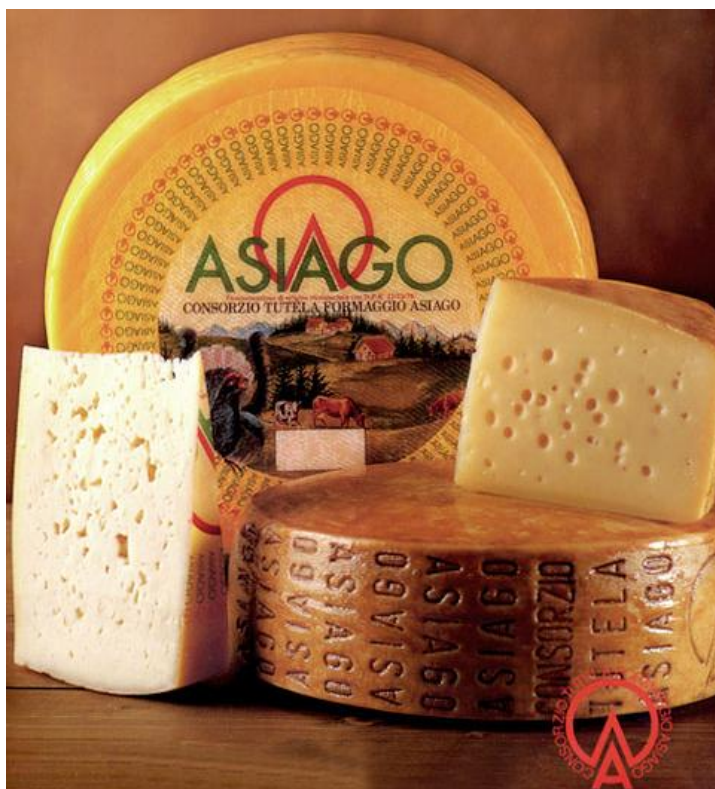


Fig1.1 Il formaggio “Asiago”

Il disciplinare di produzione, stabilisce l'area geografica all'interno della quale è possibile produrre questo tipo di formaggio. Tale area corrisponde alle province di Vicenza e Trento ed in parte alle province di Padova e Treviso.



Fig1.1 Le province che corrispondono all'area in cui il disciplinare consente la produzione del formaggio "Asiago"

Le forme di formaggio Asiago D.O.P. sono contraddistinte dalla presenza di una placchetta di caseina numerata e marchiate con il logo costitutivo della denominazione. Il logo rappresenta una forma di formaggio tagliata e mancante di uno spicchio, dove al posto dello spicchio mancante vi è una lettera A stilizzata ed inserita parzialmente nella forma.



Fig 1.2 Logo costitutivo della denominazione;
FONTE: Disciplinare di produzione Asiago DOP.

Lungo tutta la circonferenza della crosta inoltre, è riportata ripetutamente la denominazione “Asiago” nello stile come in figura 1.3.

ASIAGO

Fig 1.3 Nome della denominazione;

FONTE: Disciplinare di produzione Asiago DOP.

Esiste tuttavia una terza tipologia di formaggio Asiago, ovvero le due varianti sopradescritte ma prodotte ad altitudini superiori ai 600 m s.l.m..

Dato che è radicato nell’immaginario comune l’associazione del prodotto della montagna con l’idea di freschezza e di genuinità, l’interesse nell’acquisto da parte del consumatore di quest’ultima tipologia di prodotto è sempre in aumento.

Proprio per questo (ma non solo), il consorzio del formaggio Asiago ha creato un marchio apposito per contraddistinguere le forme di provenienza montana come “prodotto della montagna” (fig 1.4).



Fig 1.4 Marchio menzione aggiuntiva “prodotto della montagna”;

FONTE: Disciplinare di produzione DOP Asiago.

E' noto che qualsiasi tipo di formaggio è un prodotto la cui qualità, le cui caratteristiche organolettiche e nutrizionali, sono il risultato non solo della qualità del latte, ma anche di molteplici fattori posti a monte del ciclo di produzione. Tra i fattori più influenti sicuramente troviamo: l'alimentazione degli animali, la razza ed il management dell'allevamento, l'ambiente di produzione (caseificio), l'area geografica, la composizione del latte che ne deriva ed il periodo di stagionatura del formaggio.

In particolare l'alimentazione degli animali è uno dei fattori di maggior rilievo, e non a caso il disciplinare di questo prodotto vieta l'uso di alcuni particolari tipi di foraggi e mangimi.

Considerando il divieto sopracitato (che sembrerebbe uniformare la dieta delle bovine ed omologare tutti gli allevamenti) ed il fatto che il territorio di produzione dell'Asiago è circoscritto dal disciplinare di produzione, si potrebbe pensare ad un formaggio che presenti sempre le medesime caratteristiche ovunque prodotto. In realtà grazie ai diversi ambienti presenti all'interno del territorio e grazie alla pratica dell'alpeggio, l'Asiago di montagna si differenzia significativamente sotto vari aspetti.



Fig 1.5 Forma di formaggio "Asiago" d'Allevio DOP

1.2 Fattori influenzanti la qualità dei formaggi

In pianura e negli allevamenti intensivi gli animali vengono nutriti con una dieta ricca di concentrati e calibrata in modo tale da soddisfare i bisogni di produzione e di mantenimento dell'animale.

In montagna invece, durante il periodo estivo gli animali possono nutrirsi al pascolo, questa pratica prevede che l'alimentazione degli animali sia basata principalmente sul foraggio fresco che essi stessi si procurano nei prati.

Il pascolo però quasi sempre non è sufficiente a coprire i reali fabbisogni energetici della vacca. Infatti i pascoli di quota sono caratterizzati da cicli vegetativi brevi che rendono l'erba più ricca in frazioni fibrose che di conseguenza ne diminuiscono la digeribilità della sostanza organica e del tenore delle proteine, diminuendo quindi anche l'apporto energetico. Un foraggio con una componente fibrosa consistente inevitabilmente aumenta il tempo di digestione e quindi la permanenza dell'alimento a livello ruminale. Essendo l'ingestione della vacca regolata dalla digeribilità dell'erba consumata, la conseguenza è una minor ingestione ed una incompleta copertura dei fabbisogni energetici dell'animale.

Ne deriva che l'animale al pascolo non riesce a sostenere i ritmi produttivi della pianura traducendo lo scarso apporto energetico in una minor produzione di latte. Oltretutto, l'animale ha un ulteriore aumento di spesa energetica dovuta al procurarsi il cibo da solo, in luoghi che a volte presentano difficoltà di accesso.

In contrasto con questi aspetti negativi, molti studi hanno appurato come il formaggio prodotto da latte di vacche allevate al pascolo abbia caratteristiche organolettiche e nutrizionali migliori del latte di pianura. Il pascolo accresce il profilo acidico del latte, in particolare la frazione importante per la nutrizione umana (Novelli et al., 2010).

In generale, per la sua composizione ed il contenuto in acidi grassi saturi, è noto che il formaggio viene visto negativamente da medici e dietologi, ma è altrettanto vero che esso può apportare nella dieta umana vari tipi di sostanze e importanti nutrienti, in particolare: proteine, peptidi bioattivi (composti azotati che agiscono decrementando l'ipertensione, e che derivano

dalla proteolisi delle frazioni proteiche durante la stagionatura del formaggio), amminoacidi, grassi, acidi grassi, vitamine e minerali.

E' sicuramente importante però considerare che la composizione del profilo acidico del formaggio è molto ricca in acidi grassi saturi (70-75%) ma vi sono contenuti anche i mono- ed i polinsaturi (25-30%) che agiscono positivamente sulla salute umana. In particolare vi sono i CLA ovvero coniugati dell'acido linoleico con azione anticancerogena (Walther et al., 2008) ed altri ω -3.

Molti studi hanno evidenziato come sia possibile modificare la qualità del grasso, quindi il profilo acidico del latte e del formaggio, agendo sulla composizione della dieta (Chilliard et al., 2002; Segato et al. 2006b; Egger et al., 2007; Bittante et al. 2011; Pretto et al., 2013), ed inoltre hanno addirittura rilevato la possibilità del formaggio di acquisire proprietà nutraceutiche.

E' stato il caso di uno studio universitario Italiano sul formaggio Pecorino, che ha confermato la forte correlazione tra tali proprietà dell'alimento e l'importanza del tipo di alimentazione degli animali, richiamando l'attenzione anche dei media. La ricerca ha nutrito un gregge di pecore con lino, ottenendo dei formaggi ad alto valore nutrizionale contenenti peptidi bioattivi. Lo studio ha riscontrato come le persone sottoposte al consumo quotidiano di pecorino, non solo non abbiano aumentato il loro livello di colesterolo nel sangue, ma nei casi di ipercolesterolemia siano addirittura riusciti ad abbassarlo. La particolare dieta degli animali oltretutto ha fatto registrare un aumento della produzione di latte dell'8% e del 4% di proteina e grasso, migliorandone la resa (Secchiari et al. 2009).

Considerando una dieta a base di foraggi invece, si è potuto osservare come la composizione acidica sia molto influenzata dal modo in cui essi vengono conservati. La conservazione e l'appassimento in campo è la maggior causa di perdite di acidi grassi polinsaturi dovuta a fenomeni ossidativi soprattutto a carico dell'acido α -linolenico. Le perdite sono dovute al sistema della lipossigenasi, una difesa della pianta quando i tessuti le vengono danneggiati. Le lipasi della pianta rilasciano l'acido α -linolenico e l'acido linoleico dalle membrane danneggiate, e poi vengono convertiti in idroperossi-pufa ed ulteriormente catabolizzati con la formazione di composti

volatili come aldeidi e alcoli. Ma vi è un ulteriore perdita di acidi grassi dovuta alla lacerazione o alla perdita delle foglie del foraggio durante le operazioni di raccolta del fieno (le foglie sono la parte della pianta che più contiene acidi grassi polinsaturi).

La quantità di acidi grassi contenuta nella dieta dei bovini è fondamentale poiché una volta che vengono assorbiti con l'alimentazione sono sottoposti ad un intenso processo di idrolisi e bio-idrogenazione da parte della microflora del rumine che da insaturi li trasforma in acidi grassi saturi. L'acido linoleico per esempio, nel rumine subisce un processo incompleto che lo trasforma in acido vaccenico e rumenico ed in questa forma passa nell'intestino dove viene assorbito nel circolo ematico e successivamente trasferito nel latte. L'attività microbica del rumine è tanto meno efficace quanto maggiore è la quantità di acido grasso polinsaturo ingerito.

L'acido rumenico rappresenta l'80-90% degli isomeri CLA, ed è il primo composto intermedio che si viene a formare nel processo di biodrogenazione ruminale dell'acido linoleico a cui segue la conversione in acido vaccenico e in acido stearico.

La diminuzione della produzione di latte può indurre ad una diminuzione dei precursori responsabili della sintesi degli acidi grassi a corta catena, favorendo il rilascio nel latte di quelli insaturi derivanti sia dall'ingestione che dalla mobilizzazione dei lipidi di riserva (Bugaud 2001).

Il pascolo arricchisce latte e formaggio anche di vitamine, che altrimenti nel foraggio conservato tenderebbero a diminuire con il passare del tempo poiché sensibili al calore, ai raggi UV, alle variazioni di pH ed alla disidratazione (Shingfield et al., 2005). Un'alta presenza di vitamine nel foraggio contrasta l'inibizione della crescita della flora ruminale indotta dall'assunzione di alte concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, in questo modo resta possibile l'utilizzo della cellulosa ingerita altrimenti inutilizzabile.

In particolare il β -carotene ed i tocoferoli agiscono come antiossidanti e stabilizzatori della membrana cellulare batterica, permettendo un corretto metabolismo ruminale (Kennedy e Liebler 1992).

Tuttavia tutti questi aspetti nutrizionali positivi, al momento non sono sufficientemente valorizzati nel mercato dei latticini tanto da rendere

attraente la produzione in alpeggio per gli allevatori, che invece devono sostenere maggiori difficoltà data l'ostilità dell'ambiente di montagna. Le condizioni di maggior difficoltà operativa e l'aggravio della minor produzione latte restano delle negatività che costringono inevitabilmente ad incrementare il prezzo del prodotto di montagna rispetto a quello di pianura. Questo sovrapprezzo serve soprattutto a compensare le difficoltà produttive e annulla i fattori ambientali negativi che altrimenti renderebbero tali realtà assolutamente non convenienti e competitive con le aziende di pianura.

1.3 Tecniche multianalitiche e autenticità

Nonostante il tentativo di creazione di un mercato di nicchia, negli ultimi decenni si è registrato un declino dell'attività d'alpeggio e un progressivo abbandono delle malghe dovuto principalmente alle difficoltà operative ed ai motivi poco sopra citati, ma anche ad un mancato ricambio generazionale nell'attività di malga (Andrighetto et al., 1997; Bonsembiante e Cozzi, 2003). Purtroppo l'abbandono dei pascoli di montagna trasforma il cotico erboso pascolivo in boschi e praterie arbustate, e ciò ha un riflesso negativo non solo sull'agricoltura ma anche sul paesaggio e conseguentemente sul turismo.

E' molto triste perdere tali realtà, sia per il loro legame con la tradizione e con la storia, sia per gli effetti negativi sull'ambiente ed il turismo, ma anche perché è stato osservato come nelle piccole realtà produttive si ottengono i formaggi di migliore qualità (Bittante et al., 2011).

Il riconoscimento e l'apposizione del marchio "prodotto della montagna" nel caso del formaggio Asiago, è un fattore positivo per salvaguardare l'attività produttiva e l'economia montana. Purtroppo però tale marcatura è ancora insufficiente a tutelare veramente i produttori e soprattutto a salvaguardare i consumatori dalle frodi alimentari, rese appetibili dalla maggiorazione di prezzo.

Per risolvere questo problema, la ricerca scientifica si è impegnata da alcuni anni nell'individuazione di markers e nella messa a punto di tecniche di

analisi efficaci e veloci da impiegare nell'autenticazione di provenienza del prodotto.

Già a partire dalla fine del secolo scorso, alcuni studi sul parmigiano reggiano avevano tentato di identificare i formaggi prodotti in diverse aree basandosi sullo studio di alcuni parametri chimici della frazione non volatile, ma ciò non è stato possibile per l'alto standard del livello di produzione (Careric et al., 1994).

Successivi studi hanno permesso di classificare il formaggio Emmenthal prodotto in vari paesi Europei basandosi su determinate caratteristiche come la presenza o meno di microrganismi tipici della zona di provenienza. Tuttavia nonostante l'efficacia di tale metodo per lo specifico caso dell'Emmenthal, è stata conclusa la sua non facile applicabilità a tutti gli altri tipi di formaggi. Gli autori della ricerca stessi rimandano all'utilizzo di analisi statistiche multivariate sia per classificare che per avere un riconoscimento preciso ed una maggior sicurezza d'analisi (Pillonel 2004).

Nel corso degli anni i ricercatori si sono posti spesso l'interrogativo del come fare, quale metodo scegliere per autenticare i formaggi a diversa tipologia produttiva od a diversa maturazione, e quali molecole o composti chimici o peculiarità del prodotto studiare.

Nel caso dell'Asiago è stata seguita anche la possibilità di una sua identificazione grazie alla ricerca dei terpeni ovvero degli alcoli presenti nelle erbe di montagna, questo metodo si è rivelato efficace nella discriminazione dei formaggi d'alpeggio (Favaro et al., 2005).

Alcuni studi hanno preso in considerazione i rapporti isotopici di H, C, N e O del latte e del formaggio ed hanno rilevato che essi sono legati al territorio, specialmente al tipo di vegetazione dell'ambiente riuscendo a distinguere tra formaggi prodotti in due diversi siti alpini (Bontempo et al., 2012).

L'aspetto interessante è che tale studio ha rilevato delle differenze come la diminuzione del $\delta^{15}\text{N}$ del 4‰ e del $\delta^{13}\text{C}$ del 23.5‰ nel caso di una mancata somministrazione per almeno due settimane di concentrato di mais alle bovine.

Si è appurato inoltre come il $\delta^2\text{H}$ ed il $\delta^{18}\text{O}$ possano essere usati per distinguere l'altitudine della zona di provenienza dei formaggi, il $\delta^{15}\text{N}$ per

determinare differenti tipi di essenze foraggere ed il $\delta^{13}\text{C}$ determini differenti apporti di mais nella dieta.

Nel caso del parmigiano reggiano, gli isotopi sono perfettamente in grado di distinguerlo da altre imitazioni europee ed extraeuropee (Camin et al., 2011).

Più frequentemente i ricercatori però scelgono di concentrare i loro sforzi prendendo in considerazione e studiando gli aspetti di interesse dal punto di vista nutrizionale e che forniscono un valore qualitativo aggiunto al prodotto.

Uno degli aspetti più importanti è sicuramente il profilo acidico, che come già detto, è fortemente influenzato dalla dieta degli animali.

La determinazione del profilo acidico riesce a delineare le proprietà nutrizionali, ma anche a stabilire l'origine dando un contributo fondamentale alla caratterizzazione geografica del latte/formaggio (Sacco et al., 2008).

Gli acidi grassi sono molecole formate da una catena di atomi di carbonio (catena alifatica – idrofoba) con un solo gruppo carbossilico ad una estremità (-COOH - idrofilo), e sono componenti fondamentali dei lipidi. La caratteristica degli acidi grassi è la lunghezza della catena di atomi di carbonio poiché essa influenza le proprietà fisico-chimiche dell'acido grasso.

Gli acidi grassi si possono quindi classificare in:

- acidi grassi a corta catena con numero di atomi di carbonio da 1 a 4;
- acidi grassi a catena media con numero di atomi di carbonio da 8 a 14;
- acidi grassi a lunga catena con numero di atomi di carbonio da 16 fino a 36.

Inoltre possono presentare doppi legami nella catena alifatica, fattore che ne influenza la temperatura di fusione. In generale abbiamo quindi:

- acidi grassi saturi dove i doppi legami nella catena sono assenti
- acidi grassi insaturi dove invece i doppi legami nella catena sono presenti, e si dividono ulteriormente in: monoinsaturi (MUFA) se è presente un solo doppio legame, e polinsaturi (PUFA) se sono presenti più doppi legami.

Alcuni degli acidi grassi insaturi sono considerati essenziali e vengono classificati in:

- Omega- 3 nel caso in cui l'ultimo doppio legame è posizionato sul terzo carbonio a partire dalla fine;
- Omega- 6 nel caso in cui l'ultimo doppio legame è posizionato sul sesto carbonio a partire dalla fine (a questa famiglia appartengono anche i CLA o isomeri dell'acido linoleico);
- Omega – 9 nel caso in cui l'ultimo doppio legame è posizionato sul nono carbonio a partire dalla fine.

Il contenuto dei CLA nel latte, per esempio, varia non solo in base all'alimentazione ma anche da specie a specie. Le pecore rispetto ai bovini ed alle capre sono gli animali che presentano il formaggio con il più alto valore di CLA ed il più basso di acidi grassi a corta catena. Il confronto inoltre tra formaggi della stessa specie ma ottenuti con tecnologie diverse di produzione, ha riportato diversi contenuti in acidi grassi a corta catena ma ugual contenuto di CLA. E' stato altresì osservato come i fattori coinvolti nel processo di caseificazione, il trattamento termico della cagliata, e l'aggiunta di colture starter non influisca sui CLA mentre questi fattori possono influenzare i processi lipolitici durante la lavorazione del formaggio, determinando variazioni nella composizione acidica. (Prandini et al., 2010)

Nello specifico caso del formaggio Asiago prodotto in alpeggio è stato registrato un aumento della percentuale dei CLA e dei PUFA n-3 (acidi grassi polinsaturi) rispetto allo stesso tipo di formaggio prodotto in pianura. Oltre ad un aumento dell'acido oleico (soprattutto nel primo periodo di pascolo), e del vaccenico.

Anche le vitamine e le provitamine possono essere dei buoni marcatori per i prodotti della montagna.

In generale le vitamine si dividono in:

- idrosolubili ovvero vitamine solubili in acqua e che devono essere introdotte quotidianamente con la dieta poiché non si accumulano nell'organismo (vit. C, B acido folico e vitamina H).

- liposolubili ovvero vitamine veicolate dai grassi, che sono stoccate nel fegato o nel tessuto adiposo (vit. A, E, D, K, F). Di conseguenza, queste ultime vengono trasmesse anche al latte ed al formaggio dove sono presenti in piccole quantità.

Le vitamine liposolubili non sono meno importanti delle prime e svolgono numerose funzioni tra cui la difesa del sistema immunitario, la protezione dagli agenti ossidanti, l'accrescimento e la sintesi dei tessuti organici, concorrendo nel mantenimento in salute dell'organismo.

In particolare si studia la vitamina A perché è un alcool monovalente insaturo, derivante dal beta-carotene presente nei vegetali freschi, ed essendo una molecola sensibile all'ossidazione il suo contenuto diminuisce con il tempo di immagazzinamento del foraggio. La vitamina E è molto diffusa soprattutto nei semi e negli oli vegetali, è un antiossidante e reagendo con il selenio protegge le membrane cellulari.

La presenza nel latte o nel formaggio di diversi quantitativi di entrambe le vitamine è indice del tipo di dieta seguito dalle bovine, inoltre svolgono un ruolo importantissimo di anti-ossidante a protezione del doppio legame degli acidi grassi insaturi durante la maturazione del formaggio. (Novelli et al., 2010)

Gli studi fino ad ora condotti hanno rilevato che nel formaggio Asiago prodotto in alpeggio, la variazione di retinolo non è significativa mentre per l' α -tocoferolo, la concentrazione nel latte è raddoppiata nel corso del passaggio dalla stalla all'alpeggio (Novelli et al., 2007).

In alpeggio quindi il latte si arricchisce in α -tocoferolo rispetto ad una dieta ricca in concentrati come quella di pianura (Elia et al., 2006). Nel caso del formaggio Asiago però, è stato osservato a fronte di un significativo aumento di β -carotene e vitamina E, nessuna variazione di rilievo per il retinolo (Novelli et al., 2007).

E' stata studiata anche la provitamina luteina che si è rilevato influire sul parametro del colore L^* aumentandolo dalla prima alla ventiquattresima settimana di stagionatura oltre ad influenzare anche il parametro del giallo b^* . La luteina non ha subito degradazioni, e si è dimostrata stabile durante tutto il periodo di conservazione (Jones, 2005).

Inoltre il contenuto in vitamine del formaggio, ne riduce il rischio di ossidazione indotto dal contenuto in acidi grassi insaturi, perché protegge i loro doppi legami e quindi migliora la conservazione del prodotto (Novelli et al., 2010).

I peptidi bioattivi possono essere considerati buoni marcatori molecolari poiché la composizione della frazione peptidica è significativamente influenzata dal tempo di maturazione con un progressivo arricchimento dai 6 ai 12 mesi, dalle tecniche e dal luogo di produzione poiché ogni peptide è il prodotto di specifiche attività enzimatiche, di diversa origine (Cavatorta et al., 2007).

I peptidi, con il progredire della stagionatura svolgono anche un'attività antimicrobica influenzando la microflora del prodotto. Essi sono corte proteine tra i 12-100 aa, che agiscono formando dei pori sulla parete della membrana batterica distruggendone la regolazione osmotica, oppure penetrando e interferendo nella sintesi proteica ed in quella di DNA e RNA (Brodgen, 2005).

Un altro esempio di buon marcatore è la microflora lattica che ha soprattutto un'effetto positivo sulla salute del consumatore (capacità di riequilibrare la flora intestinale, attività inibente nei confronti di m.o. patogeni). Nel caso dell'Asiago d'allevio prodotto in montagna è molto eterogenea e caratterizzata da elevata biodiversità ma con ceppi specifici legati all'area di produzione.

Questa microflora non starter può derivare dalla materia prima, dall'ambiente e dalle attrezzature di lavorazione, e questi ceppi sono diversi da malga a malga. Una via possibile è la schedatura di tutti questi ceppi di non starter-lab in modo da risalire al luogo preciso di produzione.

Anche il colore è una caratteristica molto importante dell'alimento ed oltre ad essere il primo aspetto del prodotto che il consumatore percepisce, è anche una delle principali caratteristiche (insieme all'odore ed al gusto) che concorre nell'influenzarne l'acquisto. Attraverso di esso è possibile definire la freschezza dell'alimento stesso (soprattutto nel caso di cibi velocemente deperibili), la composizione chimica o la presenza/assenza di determinate molecole e composti, la cui presenza nel prodotto può essere indice di tipicità e contraddistinguerne la zona di provenienza.

Vi sono vari modi per determinare il colore, principalmente i metodi si dividono in soggettivi e strumentali. I metodi soggettivi sono il Panel Test o la comparazione con scale cromatiche e si basano sulla percezione di un individuo che potrebbe non coincidere con la percezione di un altro soggetto. I metodi strumentali invece permettono un approccio ed una definizione di questo parametro in modo più scientifico, avvalendosi dell'uso di strumenti come i colorimetri e gli spettrofotometri, oppure determinandone il contenuto di pigmenti.

Il colore di un alimento (o di un qualsiasi oggetto) è determinato dalla sua capacità di riflettere o assorbire in modo differenziato le diverse lunghezze d'onda della radiazione elettromagnetica nello spettro del visibile (400-700 nm). L'oggetto che riflette completamente la luce viene percepito come bianco mentre un oggetto che la assorbe completamente viene percepito nero.

Il sistema colorimetrico CIE $L^*a^*b^*$, consiste nel descrivere il colore dell'alimento rilevato dallo spettrocolorimetro scomponendolo in tre valori che hanno come punto di riferimento tre colori primari.

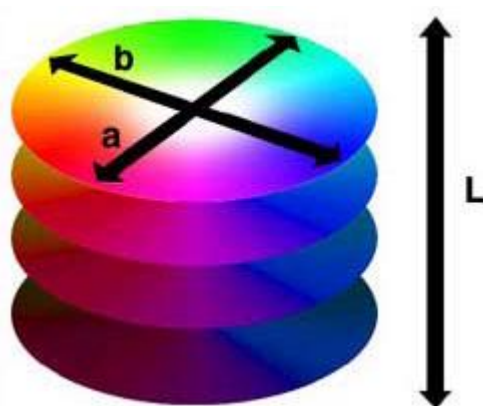


Fig 1. Rappresentazione dei limiti e degli intervalli cromatici delle coordinate del sistema Lab;

FONTE: Il colore degli Alimenti e la sua misurazione – Università di Milano

Attualmente non è ancora possibile stabilire se l'analisi del colore sia una tecnica valida per autenticare il formaggio oppure no, poichè non molti studi si sono concentrati su questa caratteristica ed il fenomeno dell'evoluzione del colore durante la stagionatura, è ancora poco chiaro.

Rimane il dato di fatto che è il primo aspetto che colpisce il consumatore, ed è idea diffusa nell'immaginario comune che una colorazione arancio-giallastra sia tipica e contraddistingua i formaggi montani.

Questa convinzione non è del tutto errata poiché è noto come alcune essenze e tipi di erbe presenti in montagna, siano ricche in pigmenti e carotenoidi che trasmettono questa colorazione dapprima al latte e poi al formaggio. Ciò nonostante non è possibile considerarlo come un fattore totalmente discriminante sul quale affidarsi per l'autenticazione di origine. Questo perchè sarebbero necessari ulteriori approfondimenti alla luce del fatto che qualsiasi erba o foraggio fornito agli animali non appartenente alla famiglia delle graminacee può influenzare il colore, senza tener conto della possibilità che le industrie aggiungano pigmenti od additivi per trarre in inganno il consumatore.

Tuttavia è interessante la relazione notata tra il colore manifestato nel formaggio (Segato et al., 2007; - Dufosse et al., 2005; – Buffa et al., 2001) e:

- il periodo e l'alimentazione degli animali,
- il sistema di produzione del latte ed i trattamenti che subisce durante la lavorazione,
- le reazioni biochimiche, il tipo di flora batterica che si sviluppa ed il tipo di lieviti presenti sul formaggio durante la stagionatura

Uno studio sul formaggio Ragusano di varie stagionature (Carpino et al., 2004) prodotto con latte di vacche alimentate al pascolo o con unifeed, non ha osservato differenze per la luminosità, mentre per il giallo il valore è risultato maggiore nel caso di vacche alimentate con foraggio verde. Stagionature prolungate, secondo alcuni autori indurrebbero un aumento della luminosità per la idrolisi di alcuni pigmenti che aumentano la riflessione della luce (Saldo et al., 2002). Anche se secondo altri la luminosità ha una modesta valenza ai fini qualitativi mentre sono il rosso ed il giallo ad influenzare maggiormente l'aspetto del formaggio (Jones et al., 2005).

In particolare nel formaggio Asiago d'alpeggio è stato osservato un predominante fenomeno di decremento del parametro di misurazione del colore relativo alla lucentezza L^* con il progredire della stagionatura dal 6° al 12° mese (Segato et al., 2007; Marchesini et al., 2009).

Però in accordo con quanto precedentemente affermato si è visto come sia l'alimentazione degli animali e successivamente la stagionatura ad influenzare significativamente il colore, con un decremento di L^* durante la stagionatura ed un decremento di b^* durante il primo anno e dopo i 18 mesi. Il valore del rosso a^* del formaggio Asiago è risultato in accordo con la letteratura (Dufossé et al., 2005; Pinho et al., 2005) anche se è diminuito solo nel primo anno, il formaggio invecchiato degli studi di letteratura ha presentato sì un decremento di L^* ma anche un incremento di b^* . Questa differenza con lo studio sul formaggio Asiago è dovuta alle epoche di stagionatura considerate. Mentre per la letteratura sono stati analizzati formaggi di 3-4 mesi per l'Asiago si è arrivati ai 36.

Il parametro L^* ha mostrato una correlazione negativa con la sostanza secca, nel particolare con la percentuale di proteine, mentre nessuna correlazione con il contenuto di grassi. Per il rosso a^* ed il giallo b^* la correlazione con i grassi è negativa, anche se questa relazione può essere dovuta a fenomeni di lipolisi o cambiamenti di microflora (Dufossé et al., 2005). In sintesi comunque, lo studio sull'Asiago osserva come l'invecchiamento ne influenzi significativamente il colore.

La tecnica NIRS è una tecnica analitica molto usata che si basa sull'assorbimento o riflettanza da parte del campione di un fascio di luce infrarossa ad una determinata lunghezza d'onda compresa tra i 700 – 2500 nm. L'attendibilità di questa tecnica analitica è confermata da numerosi studi in cui è impiegata con successo, infatti si ritiene abbia la stessa capacità di discriminazione dei tradizionali metodi chimici analitici ma con il vantaggio di essere più veloce ed economica.

Si è provato ad utilizzare anche la variante MIR o medio infrarosso con lunghezze d'onda tra i 2500 ed i 5×10^4 nm con discreti risultati nella determinazione dell'azoto NPN (non protein nitrogen) e WSN (water soluble

nitrogen), ma la determinazione del sodio e dell'azoto totale non è stata precisa. (Karoui et al., 2005; Gottardo et al., 2013)

La tecnica NIRS è in grado di quantificare non solo il totale degli acidi grassi saturi, dei MUFA, dei PUFA e degli acidi grassi total-trans, ma può approssimativamente stabilire la presenza di acidi grassi come: il caprilico, caprico, miristico, palmitico, vaccenico e rumenico. Ma anche allo stesso modo: il laurico, lo stearico, oleico, linoleico e linolenico (De Marchi et al., 2011).

Nel caso particolare del formaggio Asiago d'Allevio è in grado di classificare perfettamente i campioni provenienti dalla pianura distinguendoli da quelli alpini in particolar modo quando queste due filiere sono un vero e proprio sistema di produzione lattiero-caseario diversificato. Nel dettaglio comunque la tecnica NIRS è in grado di classificare i formaggi anche in base ai diversi tipi di management aziendale, tempo di maturazione e periodo di produzione (Ottavian et al., 2012 ; Cozzi et al., 2009).

La tecnica NMR o risonanza magnetica nucleare è una tecnica non invasiva che si basa su un principio fisico secondo il quale alcuni nuclei dotati di una proprietà intrinseca chiamata spin nucleare (o forza di rotazione) se sottoposti ad un campo magnetico ed irraggiati con onde elettromagnetiche a radiofrequenza, assorbono e riemettono onde radio di frequenza proporzionale all'intensità del campo magnetico percepito dal nucleo (risonanza). Lo spettro delle onde elettromagnetiche che vengono emesse od assorbite dal campione durante la prova, detiene informazioni sulla distribuzione degli elettroni attorno ai nuclei (quindi sulla componente chimica del campione) e informazioni sulle interazioni magnetiche fra i nuclei (quindi sulla struttura e la dinamica delle molecole del campione).

L'NMR permette di effettuare analisi chimiche qualitative e quantitative, con la possibilità di ottenere informazioni significative nella ricostruzione della struttura e della dinamica delle singole molecole.

Essendo che questa tecnica riesce ad ottenere i risultati in un breve arco di tempo e la preparazione dei campioni risulta semplice, ha il vantaggio di poter essere usata per processare e comparare velocemente un alto numero di campioni

Impiegata in ambito alimentare è riuscita a distinguere uno stesso tipo di formaggio fatto maturare con tecniche fermentative differenti (Piras et al., 2013), oltre che nel caso di formaggi a veloce deperimento come la mozzarella di Bufala, rivelarne rapidamente il grado di invecchiamento a maggior protezione e tutela dei consumatori (Mazzei e Piccolo, 2011).

L’NMR è in grado di delineare il profilo fosfolipidico dei formaggi, i fosfolipidi sono una classe di lipidi molto importante per il loro potere tecnologico come emulsionanti e per il loro valore nutrizionale (Kaffarnik et al., 2013). Inoltre dagli spettri è possibile risalire ai livelli di zucchero, amminoacidi e acidi organici del campione, fornendo un ulteriore contributo alla discriminazione (Sacco et al., 2008).

CAPITOLO 2

OBBIETTIVO

L'attività sperimentale oggetto di questa tesi di laurea ha avuto il fine di definire varie tipologie di Asiago, un ridotto complesso di marcatori nutrizionali e/o reologici in grado di identificare e discriminare formaggi prodotti con latte di pascolo/alpeggio in confronto a quelli ottenuti con latte prodotto in pianura.

Infatti, il consorzio per la tutela del formaggio Asiago oltre ad aver definito i limiti geografici in cui può essere prodotto il formaggio ne ha anche da tempo riconosciuto la variante "prodotto montano", identificandolo con un proprio marchio.

Tuttavia, date le difficili condizioni di produzione in alpeggio e il conseguente sovrapprezzo del prodotto finito, il marchio "prodotto della montagna" non ha scongiurato ed escluso la possibilità di frodi.

Ne risulta una sempre più urgente necessità di riuscire ad identificare con metodi analitici veloci ed affidabili la reale provenienza e le caratteristiche di questo alimento, per salvaguardare sia i produttori sia i consumatori.

A tal fine, nella sperimentazione ci si è avvalsi dell'ausilio di tecniche multianalitiche quali la determinazione del profilo acidico e delle vitamine liposolubili oppure delle caratteristiche colorimetriche.

A completamento delle determinazioni analitiche si è costruito un modello matematico-statistico potenzialmente capace di discriminare (classificare) formaggi ottenuti in differenti sistemi di produzione e/o aventi diversi periodi di stagionatura.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Tesi a confronto

La sperimentazione, ha preso in considerazione 121 forme di formaggio Asiago Allevato a diversa epoca di stagionatura e prodotte in quattro sistemi di produzione della Provincia di Vicenza. I luoghi di produzione considerati sono stati: caseifici di pianura (denominati “Low” e collocati tra i 60 ed i 200 m s.l.m.), e aziende ubicate in montagna (denominate “High” e collocate ad un altitudine maggiore di 600 m s.l.m). Nell’ottica di creare le stesse condizioni, il periodo di campionamento è stato il medesimo per tutte le realtà produttive prese in esame, ovvero produzioni da maggio a settembre.

Il formaggio prodotto in pianura è stato prodotto con latte proveniente da allevamenti dove gli animali sono allevati con una razione mista tipica dell’allevamento intensivo (insilato, foraggi affienati, granella ed altri tipi di concentrati).

Nelle aziende di montagna invece il formaggio è stato prodotto con latte prodotto in stalla oppure in alpeggio.

In sintesi, per quanto riguarda il fattore **sistema di produzione**, vi sono quattro tesi sperimentali a confronto:

La prima tesi è stata denominata **HL-PJ** (pasture highland in July– pascolo di montagna in luglio) questa sigla indica il formaggio prodotto in luglio con latte di bovine mantenute al pascolo di malghe situate nell’altipiano di Asiago; il latte è stato caseificato presso la malga stessa.

La seconda tesi è stata denominata **HL-PS** (pasture highland in September– pascolo di montagna in settembre) questa sigla indica il formaggio prodotto in settembre con latte di bovine mantenute al pascolo di malghe situate nell’altipiano di Asiago; il latte è stato caseificato presso la malga stessa.

La terza tesi, denominata **HL-BM** (highland barn in May – stalla di montagna in maggio) indica invece il formaggio prodotto con latte di bovine stabulate in stalla (poiché il periodo di alpeggio in maggio deve ancora iniziare) e

alimentate con una dieta a base di foraggi secchi e concentrati amilacei; il formaggio è stato caseificato in un caseificio di montagna;

La quarta ed ultima tesi è stata denominata **LL-B** (barn lowland – stalla in pianura) indica il formaggio ottenuto da latte di bovine mantenute in stalle di pianura e alimentate con diete tipiche di vacche ad elevato merito genetico; il latte è stato caseificato in caseifici di pianura. La produzione di formaggio è avvenuta nel corso di tutta la stagione estiva.

Per ciascuna tesi relativa al fattore sistema di produzione, i formaggi sono stati fatti stagionare (fattore **epoca di stagionatura**): per 6 o 12 o 18 o 36 mesi, ed i campioni sono stati prelevati ogni volta utilizzando forme diverse di formaggio.

In sintesi sono stati prodotti 48 formaggi per la tesi HL-PJ, 48 formaggi per HL-PS, 11 formaggi per la tesi HL-BM e 14 formaggi LL-B.

Allo stato attuale della ricerca, la suddivisione dei formaggi per epoca di stagionatura risulta la seguente: 31 campioni per la tesi “6 mesi”, 41 per la tesi “12 mesi”, 32 per la tesi “18 mesi”, 17 per la tesi “36 mesi”.

Per altro, vi è da sottolineare che alcuni formaggi preventivamente destinati all’epoca di maturazione più lunga (36 mesi) non si sono potuti analizzare per evidenti anomalie che hanno alterato l’aspetto colorimetrico e chimico.

3.2 Descrizione della tecnologia di produzione del formaggio Asiago

Il disciplinare di produzione dell' Asiago è molto chiaro e preciso sulla tecnica di produzione dei due tipi di questo formaggio (pressato e allevo) e non consente trattamenti di produzione diversi da quelli descritti dal disciplinare stesso.

All'arrivo in caseificio, il latte deve essere stoccato ad una temperatura compresa fra i 4 e gli 11 °C ed essere lavorato entro 60 ore dalla mungitura. Nel caso del formaggio pressato il latte utilizzato è intero e può provenire da una o due mungiture.

Il latte in caldaia viene portato ad una temperatura di 35/40 °C e miscelato con fermenti lattici (lattoinnesto) e caglio. Dopo 15/25 minuti dall'aggiunta del caglio, viene rotta la cagliata fino alle dimensioni di una noce/nocciola.

La cagliata viene successivamente semicotta a circa 44 °C, raccolta in forme di plastica marchiate (con il logo identificativo del formaggio Asiago) e pressate fino ad un massimo di 12 ore. E' consentita la possibilità di utilizzare quantità di acqua potabile per esigenze tecnologiche durante la lavorazione.

Per la produzione di formaggio d'allevo invece il latte può provenire o da una mungitura parzialmente scremata per affioramento oppure da due mungiture dove una o entrambe sono state parzialmente scremate per affioramento.

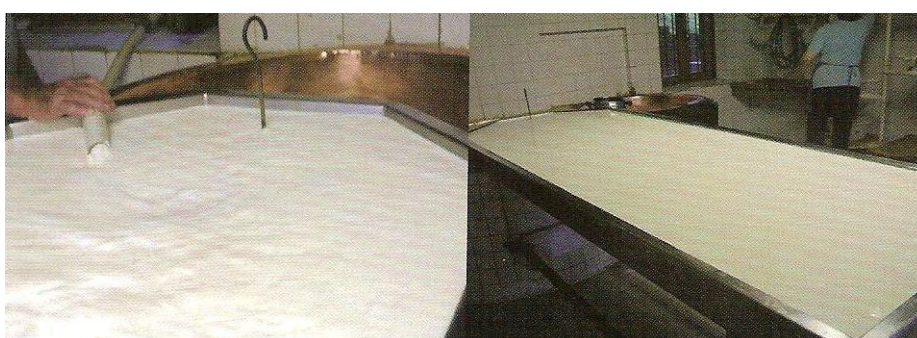


Fig. 3.1: vasche per l'affioramento.

Il latte, nei limiti di legge può essere addizionato di lisozima (E 1105) tranne quello destinato alla produzione che si fregia del marchio "prodotto della montagna".

In questa tipologia di formaggio Asiago quindi, il latte in caldaia viene portato ad una temperatura che va dai 33 ai 37 °C. Viene aggiunto il caglio e dopo un tempo variabile tra i 15 ed i 30 minuti viene rotta la cagliata in pezzi di dimensioni pari ad una nocciola od inferiore.

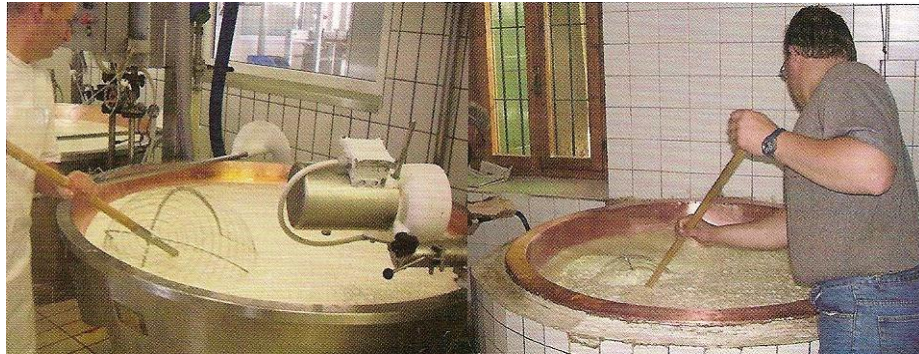


Fig.3.2 rottura della cagliata

Questo per permettere un maggior spurgo di siero dalla cagliata dato che il periodo di maturazione a cui va incontro la tipologia Allevato è più lungo rispetto al Pressato.

Non è assolutamente consentito il riutilizzo di sfridi o ritagli di precedenti cagliate per la produzione di formaggio Asiago D.O.P.

Per entrambe le tipologie di Asiago, si procede alla formatura e le forme così prodotte sostano per un periodo minimo di 48 ore in locali a temperatura ed umidità controllata (10/15 °C e 80/85% U). In questi locali viene applicata la salatura o con il metodo di aspersione del sale a secco sulla forma oppure per immersione della forma in salamoia.

Il periodo minimo di stagionatura per la tipologia di formaggio Asiago pressato è di 20 giorni dalla data di produzione, mentre di 30 giorni nel caso si fregi della denominazione “prodotto della montagna”. Per la tipologia Asiago d’Allevato invece, la stagionatura minima è di 60 giorni a partire dall’ultimo giorno del mese di produzione, 90 giorni se “prodotto della montagna”.

E’ obbligo sancito dal disciplinare che anche la stagionatura, oltre che la produzione, debba avvenire all’interno del territorio descritto dal disciplinare stesso. Stagionatura che avviene in idonei magazzini con temperature

comprese fra i 10/15 °C ed umidità relativa fra 80/85%, parametri che devono essere monitorati da strumentazioni adeguate secondo la normativa vigente. Per l'Asiago d'Allevo è consentito un periodo di maturazione dopo salatura (circa 15 giorni) in cui il formaggio è conservato a temperature comprese fra i 5 e gli 8 °C.

Diversamente per il formaggio Asiago “prodotto della montagna”, il formaggio è e deve essere stagionato in locali di aziende site in territorio montano, locali che possono avere condizioni di stagionatura determinate dall'ambiente naturale. Durante il processo tecnologico di trasformazione del latte in formaggio, nel corso della sperimentazione, sono stati rilevati diversi parametri. Al mattino, all'inizio della lavorazione è stata misurata la temperatura del latte scremato della mungitura della sera precedente. Nel mese di maggio (quindi con vacche in stalla e produzione in caseificio) tale parametro era di 10 °C. Il latte della mungitura della mattina invece è risultato di 11 °C, la quantità di latte lavorato in caldaia è stata di 1000 l con pH di 6.84. Dopo l'aggiunta del caglio e degli starter il pH si è abbassato a 6.57, mentre la coagulazione è avvenuta dopo 10 minuti a 37 °C. La cagliata è stata fatta riposare per 23 minuti, dopo la rottura è stata stesa sul banco di sgrondo posta nella forma con pressione manuale.

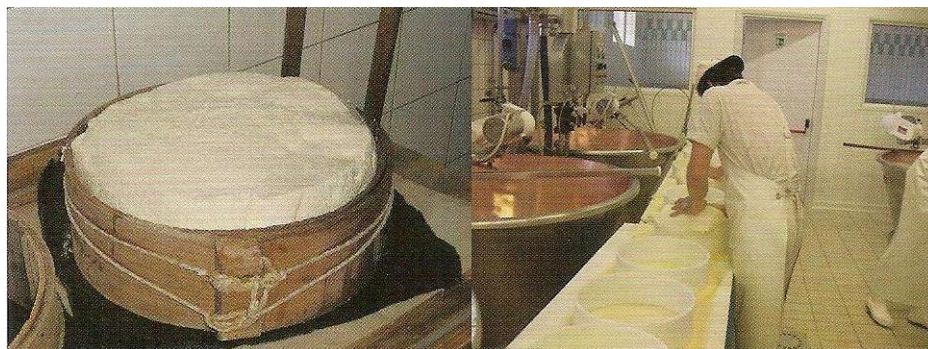


Fig 3.3 Formatura delle forme

Le forme sono state poi impilate le une sulle altre e fatte riposare a temperatura ambiente per 4 ore, successivamente poste in cella per 2 giorni. Dopo ciò sono state immerse per 6-8 giorni in una salamoia con una concentrazione di sale al 19% e ad una temperatura di 11 °C.

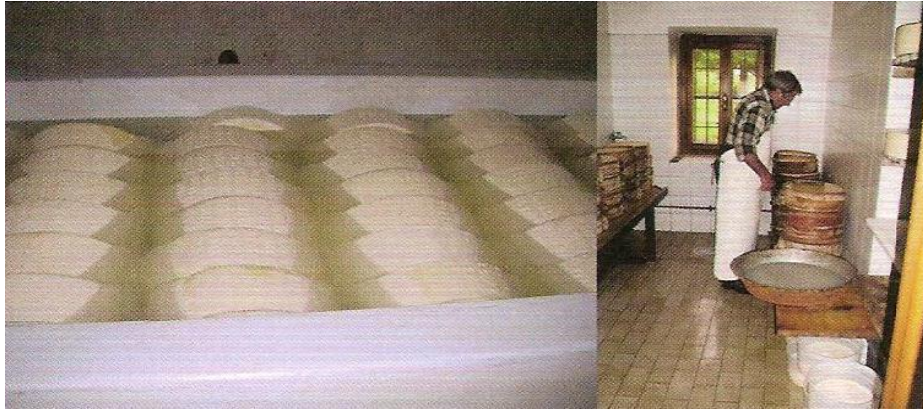


Fig 3.4 Salamoia

La stagionatura è avvenuta ad una temperatura compresa tra gli 8 e gli 11 °C con umidità relativa del 75 %.

Nei mesi estivi (quindi con vacche in alpeggio e produzione in malga), la temperatura al mattino del latte scremato della sera precedente oscillava tra gli 11 ed i 16 °C in luglio e tra i 16 ed i 18.5 °C in settembre.

A Settembre, il latte della mungitura della mattina registrava valori tra i 23 ed i 31.5 °C.

La quantità di latte lavorato variava in luglio tra i 600 e i 1200 l con pH 6.49-6.53 e tra i 550 e i 1000 l in settembre con pH 6.50-6.84.

Per raggiungere la coagulazione sono stati necessari dai 15 ai 40 minuti con temperatura tra i 34-41 °C e pH tra i 6.42 ed i 6.60 in luglio mentre in settembre il tempo di coagulazione è risultato il medesimo, temperatura tra i 35-40 °C e pH 6.44-6.65.

La cagliata ha riposato dai 10 ai 34 minuti in luglio e dai 20 ai 40 minuti in settembre, il taglio è avvenuto sul banco di sgrondo o in caldaia prima dell'estrazione, mentre la formatura è avvenuta per pressione delle forme impilate a due a due.

Successivamente le forme hanno sostato a temperatura ambiente per un periodo variabile di qualche ora fino in taluni casi ad arrivare anche ad un giorno, la sosta in cella o comunque in locale fresco invece è durata dai 2 ai 7 giorni. Trascorso ciò, le forme sono state poste in salamoia con concentrazione salina tra il 18-24% per 5-8 giorni ad una temperatura tra gli

11 ed i 17 °C oppure trattate per salatura a secco per 10 giorni a 16 °C. Infine la stagionatura è avvenuta ad una temperatura compresa fra gli 11 ed i 16 °C con una umidità relativa dell'85 %.

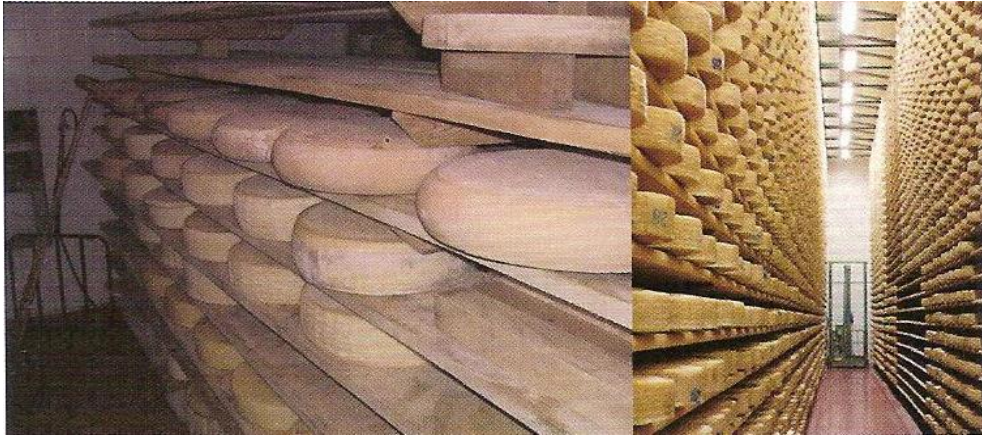


Fig3.5 Stagionatura

3.3 Metodiche Analitiche

Per ciascuno dei 121 formaggi analizzati, è stato prelevato un campione di circa 2 kg ovvero circa un quarto di forma. Non appena tagliati i campioni sono stati velocemente portati in laboratorio e refrigerati a 4 °C.

Per tenere conto dei gradienti di concentrazione, ciascun campione è stato tagliato asportando l'altezza dell'intera forma (Karoui et al., 2006), inoltre i primi 2 cm partendo dalla scorza sono stati eliminati. Le analisi del colore sono state effettuate su pezzi di formaggio intero mentre per le analisi chimiche ne è stata grattugiata una aliquota e conservata a -80 °C.

3.3.1 Analisi degli acidi grassi

La determinazione del contenuto in acidi grassi è stata fatta prelevando un'aliquota di 20 g. Per poter separare il grasso della matrice alimentare tramite centrifugazione, è stato necessario macinare finemente l'aliquota ed omogeneizzarla in acqua.

I campioni così ottenuti, sono stati quindi centrifugati ottenendo la separazione della parte grassa. Da quest'ultima sono stati prelevati 100 mg di grasso, lavato poi con metanolo ed eptano in successione.

Una parte di questo estratto organico è stata transesterificata con il procedimento descritto da Christie (1982). Così facendo sono stati ottenuti dei metilesteri degli acidi grassi che sono stati analizzati attraverso gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma, ed utilizzando una colonna capillare Omegawax 250 (30m x 0.25mm i.d.).

Per identificare il tipo di acidi grassi è stato fatto un confronto dei tempi di ritenzione con gli standard puri commerciali, ed i risultati sono espressi come % del totale dei composti identificati.

3.3.2 Analisi vitamine liposolubili

Per la nostra prova abbiamo determinato il contenuto nel latte e nel formaggio di retinolo (Vit. A) e di alfa-tocoferolo (Vit E) utilizzando la cromatografia liquida (HPLC).

Per svolgere l'analisi, è stata prelevata un'aliquota di 0.5 g finemente macinata. In entrambi i casi il campione è stato solubilizzato con etanolo e potassa al 50%, ottenendo così la saponificazione. Al fine di recuperare il saponificato, il campione (ancora caldo dalla reazione di saponificazione) è stato trattato con una miscela di etere etilico e etere di petrolio. Successivamente un'aliquota della fase organica è stata prelevata, anidrificata e risospesa con metanolo di grado analitico per fluorimetria.

La determinazione delle due vitamine è avvenuta contemporaneamente, la separazione cromatografica è stata realizzata con sistema a fase inversa C18 Discovery Supelco (150mm x 4.6 mm, 5 µm) a 25 °C, fase mobile metanolo:acqua (98:2), rivelatore UV (324 nm per il retinolo e 293 per il tocoferolo).

3.3.3 Analisi del colore

Durante la prova sperimentale mi sono occupato in modo particolare dell'analisi del colore. Analisi che è stata condotta presso i laboratori dell'Università di Padova sede di Agripolis, secondo il sistema colorimetrico CIE L*a*b*.

I campioni sono stati prelevati direttamente dalla forma di formaggio attraverso il taglio di una fetta di 1cm di spessore. Al fine di una corretta analisi è stata importante l'accuratezza nel corso dell'operazione del taglio della fetta, operazione che è stata fatta in modo da creare una superficie di taglio il più possibile uniforme, liscia e senza irregolarità.

Dopo esposizione all'aria dei campioni per un'ora a 2+/-2 °C, con l'ausilio dello spettrocolorimetro C508 Minolta camera co. Osaka Japan settato su illuminante D65 ovvero luce del giorno standard e osservatore a 10°, ogni fetta è stata analizzata in 5 diversi punti rappresentativi.

3.3.4 Analisi Statistica

Un'analisi statistica preliminare ha testato l'effetto del sistema di produzione (production system, PS) e dell'epoca di maturazione (ripening time, RT) su profilo in acidi grassi (% sul totale degli identificati), contenuto in vitamine A ed E e caratteristiche reologiche (colore e tenerezza) dei formaggi. Dopo aver verificato la normalità e l'omogeneità della varianza delle variabili indagate con il test di Shapiro-Wilk (PROC UNVIARIATE), i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando la PROC GLM di SAS (1999). Il modello lineare e bifattoriale ha considerato gli effetti fissi sistema di produzione (PS) ed epoca di stagionatura (RT) e relativa interazione:

$$Y_{ijk} = \mu + PS_i + RT_j + PS*RT_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

μ = media generale;

PS_i = effetto fisso sistema di produzione ($i = \text{BB-L, HL-BM, HL-PJ, HL-PS}$);

RT_j = effetto fisso epoca di stagionatura ($j = 6, 12, 18, 36$ mesi);

$PS*RT_k$ = interazione tra gli effetti fissi PS e RT;

ε_{ijk} = random residuo $\sim N(0, \sigma_e^2)$.

Qualora l'effetto fisso PS risultasse significativo ($P < 0.05$), le differenze tra i livelli sono state determinate utilizzando il test *probability of difference* (PDIFF) con l'opzione Bonferroni-adjustment.

Successivamente è stata condotta l'analisi canonica discriminante (CDA, *canonical discriminant analysis*) su due distinti dataset: i) dataset nutrizionale includente il profilo degli acidi grassi e le vitamine liposolubili; ii) dataset reologico includente i parametri colorimetrici e il pH. Entro ciascun dei due dataset, la CDA [*stepwise* (PROC STEPDISC) *forward canonical discriminant analyses* (CDA), PROC CANDISC] è stata condotta per discriminare i 4 gruppi (livelli) del fattore allo studio sistema di produzione (PS: BB-L, HL-BM, HL-PJ, HL-PS) e i 4 gruppi (livelli) del fattore allo studio epoca di stagionatura (6, 12, 18 e 36 months). Con l'ausilio della matrice delle correlazioni, per ciascun dataset, si è selezionato il maggior numero di variabili non correlate tra di loro (esclusa una delle due variabili con indice di

correlazione r di Pearson > 0.50). Di seguito, per ciascuna combinazione dataset x fattore di classificazione (2 dataset x 2 fattori di classificazione), sul dataset comprendente il complesso delle variabili non correlate tra loro, si è condotta una analisi stepwise (PROC STEPDISC) per individuare quelle variabili che maggiormente contribuiscono alla separazione dei gruppi sulla base dei valori di F ($P < 0.05$) come criterio di inclusione nella stepwise analyses. Sul ridotto complesso di variabili selezionate si è infine condotta la CDA che ha permesso di stimare la varianza spiegata dalle prime due variabili canoniche (CAN 1 e CAN2), nonché di determinare le distanze quadrate di Mahalanobis (*squared Mahalanobis distances*), e relativa significatività, tra i vari gruppi dei fattori di classificazione. Ricorrendo al software statistico XLSTAT, la struttura canonica totale espressa dalle due variabili canoniche (CAN 1 e CAN 2) è stata rappresentata graficamente (*scattergram* con l'opzione *scatter plots*) con relativa definizione di un ellissoide rappresentate l'intervallo di confidenza al 95% (*confidence ellipses option*) attorno al centroide del gruppo.

Un'ulteriore sviluppo dell'analisi discriminante, è stato l'esecuzione di una cross-validation (PROC DISCRIM) per validare/verificare la capacità di discriminazione del modello ottenuto con l'approccio di analisi multivariata adottato.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il software SAS (2008; release 9.2), ad eccezione dei grafici della CDA eseguiti con il software XLSTAT (Addinsoft, version 2013.4.07).

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Influenza del sistema di produzione sulla qualità nutrizionale e reologica

Il sistema di produzione ha influenzato significativamente il profilo acidico dei formaggi come riportato in tabella 1. Dalla tabella si evince come i formaggi HL-PJ e HL-PS siano più poveri in acidi grassi saturi (SFA) e più ricchi invece di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) rispetto ai formaggi di stalla in montagna HL-BM e stalla in pianura LL-B.

In particolare, nei formaggi d'alpeggio si registra un minor contenuto di C12:0 (laurico), C14:0 (miristico) e C 16:0 (palmitico) mentre vi è un maggior contenuto in C18:1 n9 (oleico) e C18:1 n7 (vaccenico), in C18:0 (stearico), e di coniugati dell'acido linoleico (CLA) cis9 trans11 C18:2 e cis12 trans10 C18:2.

Interessante notare che nei formaggi d'alpeggio vi è anche una maggior presenza in acidi grassi ω 3 e ω 6. L'analisi statistica ci ha permesso di rilevare che, in generale sia per gli SFA sia per i MUFA che per i PUFA l'effetto fisso sistema di produzione (PS) e l'effetto fisso epoca di stagionatura risultano altamente significativi ($P < 0.001$).

In tabella i valori sono stati classificati anche in base al PDIFF test, si noti come l'unico acido grasso che riporta quattro livelli distinti significativamente diversi fra loro, è l'acido grasso cis-9 trans-11C18:2 (trans vaccenico).

Table 1. Effect of the **production system** (PS) and **ripening time** (RT) on fatty acids distribution (% of total identified fatty acids) of Asiago cheese

	Production system				SEM	Significance		
	LL-B	HL-BM	HL-PJ	HL-PS		PS	RT	PS*RT
C4:0	2.12	2.11	1.97	2.02	0.065	0.172	0.002	<0.001
C6:0	1.57 ^a	1.50 ^a	1.24 ^c	1.40 ^b	0.045	<0.001	<0.001	0.239
C8:0	0.93 ^a	0.92 ^a	0.70 ^b	0.84 ^a	0.033	<0.001	<0.001	<0.001
C10:0	2.27 ^a	2.19 ^a	1.56 ^c	1.79 ^b	0.098	<0.001	0.001	0.003
C12:0	2.76 ^a	2.63 ^a	1.88 ^c	2.27 ^b	0.103	<0.001	<0.001	0.003
C14:0	10.24 ^a	10.27 ^a	8.18 ^c	9.17 ^b	0.298	<0.001	<0.001	0.082
C14:1	0.78 ^a	0.79 ^a	0.47 ^b	0.75 ^a	0.042	<0.001	<0.001	<0.001
C15:0	1.04 ^a	0.98 ^{ab}	0.75 ^b	1.07 ^a	0.063	<0.001	0.035	0.087
C15:1	0.15 ^b	0.26 ^{ab}	0.27 ^a	0.30 ^a	0.010	<0.001	0.001	<0.001
C16:0	30.02 ^a	29.51 ^a	26.04 ^b	25.87 ^b	0.363	<0.001	0.033	0.019
C16:1	1.41 ^a	1.27 ^b	1.32 ^b	1.38 ^a	0.025	<0.001	0.002	<0.001
C17:0	0.60	0.59	0.64	0.59	0.031	0.169	0.005	<0.001
C17:1	0.30 ^{ab}	0.27 ^b	0.35 ^a	0.33 ^{ab}	0.016	0.003	0.495	0.143
C18:0	11.93 ^b	10.76 ^c	12.63 ^a	11.87 ^b	0.253	<0.001	0.137	0.020
C18:1 n9	22.52 ^{bc}	21.66 ^c	25.54 ^a	23.16 ^b	0.575	<0.001	<0.001	0.218
C18:1 n7	2.21 ^c	3.16 ^b	4.65 ^a	4.58 ^a	0.203	<0.001	0.039	0.078
C18:2 n6	2.28 ^b	2.51 ^{ab}	2.63 ^a	2.36 ^b	0.107	0.006	0.011	0.540
C18:3 n6	0.14 ^{ab}	0.20 ^{ab}	0.24 ^a	0.10 ^b	0.021	<0.001	<0.001	<0.001
C18:3 n3	0.58 ^b	0.65 ^b	0.86 ^a	0.93 ^a	0.042	<0.001	0.297	0.222
<i>cis-9,trans-11</i> C18:2	0.63 ^d	1.12 ^c	1.41 ^b	1.69 ^a	0.073	<0.001	0.140	0.059
<i>cis-12,trans-10</i> C18:2	0.04 ^c	0.04 ^c	0.15 ^a	0.10 ^b	0.010	<0.001	<0.001	<0.001
C20:0	0.18	0.17	0.15	0.17	0.017	0.607	<0.001	0.021
C20:1 n9	0.09	0.07	0.06	0.09	0.012	0.013	<0.001	0.016
C20:2	0.08 ^a	0.04 ^b	0.04 ^b	0.05 ^b	0.005	<0.001	0.167	<0.001
C20:3 n6	0.12	0.11	0.12	0.10	0.008	0.008	<0.001	0.003
C20:4 n6	0.18 ^a	0.16 ^{ab}	0.15 ^b	0.16 ^{ab}	0.007	<0.001	0.022	<0.001
C20:5 n3	0.06	0.06	0.07	0.08	0.007	0.052	0.064	0.264
SFA	62.4 ^a	61.7 ^a	55.8 ^b	57.1 ^b	0.705	<0.001	<0.001	0.001
MUFA	27.4 ^b	27.5 ^b	32.6 ^a	30.5 ^a	0.606	<0.001	<0.001	0.105
PUFA	4.2 ^c	4.9 ^b	5.7 ^a	5.6 ^a	0.101	<0.001	<0.001	0.006
Σ n-6	3.0 ^{ab}	3.0 ^{ab}	3.12 ^a	2.7 ^b	0.110	<0.001	0.016	0.086
Σ n-3	0.73 ^b	0.77 ^b	0.98 ^a	1.06 ^a	0.045	<0.001	0.387	0.087
n-6/n-3	0.25 ^c	0.26 ^{bc}	0.32 ^b	0.40 ^a	0.024	<0.001	0.328	0.202

Legend: a,b,c,d means within a row with different superscript differ ($P < 0.05$); HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn; the ripening period are at 6, 12, 18 and 36 months.

4.2 Analisi discriminante dei sistemi di produzione sulla base degli acidi grassi

Come riportato nel paragrafo dell'analisi statistica 3.3.4, l'analisi canonica discriminante impone di ridurre le variabili del dataset eliminando quelle correlate tra loro.

Dopo aver terminato la matrice delle correlazioni rispetto alla tabella 1, il profilo di acidi grassi sottoposti a stepwise non includeva tra gli altri il vaccenico; inoltre anche la vitamina E è stata esclusa. Sia il vaccenico sia la vitamina E se presenti ad alti livelli di presenza sono considerati una garanzia di animali allevati al pascolo (e che quindi sarebbero stati ottimi discriminatori).

Tuttavia si è deciso di escluderli, il vaccenico in particolare perché fortemente correlato con i CLA, che invece sono molto più interessanti nutrizionalmente rispetto ai dubbi effetti di quest'ultimo (Novelli et al., 2007).

La vitamina E invece è stata esclusa perché facilmente somministrabile dagli allevatori anche alle bovine di pianura, i suoi effetti benefici ne fanno un costo vantaggioso da sostenere. In sintesi si è cercato di adottare particolari acidi grassi con effetto benefico per l'uomo, importanti dal punto di vista nutrizionale, legati alla filiera della produzione al pascolo.

In tabella 2 sono stati riportati gli acidi grassi discriminanti rispetto al sistema di produzione del formaggio. Sono ordinati in base all'ordine di entrata nel modello, e la tabella ne mette in evidenza la capacità di discriminare fra i gruppi HL-BM, HL-PJ, HL-PS e LL-B. Più l'indice statistico Wilks' λ è ridotto maggiore è la capacità di discriminare degli acidi grassi considerati è elevata. Ovvero con solo il primo acido grasso cis-9, trans -11 C18:2, il valore di Wilks' λ corrisponde a 0.41, ma se si prendono in considerazione anche i successivi acidi grassi tale valore diminuisce progressivamente. In relazione ad un livello di probabilità soglia pari a P 0.05 nel modello sono stati selezionati gli acidi grassi riportati in tabella 2.

Table 2. Summary of the steps for the interactive forward mode (stepwise) for the CDA (canonical discriminant analysis) for the **production system** (PS) of the cheeses according to the nutritional parameters.

	Wilks' λ	Approx F	P
<i>cis-9,trans -11 C18:2</i>	0.41	51.6	<10 ⁻⁴
C18:2n6	0.26	21.5	<10 ⁻⁴
C14:1	0.18	14.4	<10 ⁻⁴
C18:3n6	0.14	11.8	<10 ⁻⁴
Vitamin A	0.10	11.2	<10 ⁻⁴
C16:1	0.08	10.1	<10 ⁻⁴
<i>cis-12,trans -10 C18:2</i>	0.06	8.5	<10 ⁻⁴
C15:0	0.06	5.6	0.001
C20:2	0.05	4.9	0.003
C15:1	0.04	4.0	0.010

Dopo aver condotto la CDA (canonical discriminant analysis) sulla base dei 9 acidi grassi e la vitamina A, selezionati dalla stepwise si sono ottenute due variabili canoniche CAN1 e CAN2 i cui relativi coefficienti standardizzati e la struttura di matrice sono riportati in tabella 3. Si precisa che più il valore dei coefficienti standardizzati si avvicina allo zero minore è la capacità di quel parametro nel discriminare; al contrario maggiore è il valore, più è elevata la capacità discriminante.

Nella tabella 3 è riportata anche la percentuale di varianza spiegata dal modello. Per la discriminazione del sistema di produzione sulla base degli acidi grassi selezionati, la variabile canonica CAN 1 spiega il 74% della varianza riferibile alla totalità degli acidi grassi e delle vitamine liposolubili dei 121 campioni di formaggio processati, mentre CAN 2 ne spiega il 20%, per un totale (CAN1 + CAN2) del 94%.

Considerando i valori dei coefficienti standardizzati della variabile CAN 1, dalla tabella 3 si evince che l'acido grasso che più discrimina per il sistema di produzione è un coniugato dell'acido linoleico CLA, il *cis-9 trans-11 C18:2*, a seguire troviamo la *vitamina A*, il *C18:2 n6* ed il *cis-12, trans -10 C18:2*.

Per quanto riguarda CAN 2 invece l'acido grasso più importante è il *C 18:3 n6*, poi vi è il *cis-12,trans-10 C18:2*, la *Vitamina A* ed il *cis-9,trans-11 C18:2*.

Table 3. Canonical discriminant standardized coefficients, structure matrix and variance explained by each canonical function (CAN 1 vs CAN 2) with regard to the **production systems** of the cheeses according to the nutritional parameters

	Standardized coefficients		Structure matrix ^b	
	CAN 1	CAN 2	CAN 1	CAN 2
Vitamin A	0.693	-0.580	0.364	-0.127
C14:1	-0.143	0.398	-0.188	0.699
C15:0	0.416	0.414	-0.032	0.649
C15:1	0.322	0.313	0.578	0.025
C16:1	0.024	0.230	0.028	0.348
C18:2n6	0.673	0.305	0.092	-0.389
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2	2.154	0.464	0.814	0.189
<i>cis</i> -12, <i>trans</i> -10 C18:2	0.520	-0.650	0.337	-0.507
C18:3n6	-0.131	-0.733	-0.084	-0.561
C20:2	-0.364	0.387	-0.375	0.524
Variance (%) ^c	74.0	20.0		

^aStandard coefficient ^bCorrelations between the variables retained after the stepwise procedure and each of the two canonical functions. The higher the absolute value of the correlation coefficient, the greater the contribution of the individual variable to the canonical function. ^cPercentage of the total variance explained by each canonical function.

La figura 1 rappresenta lo scatter plots della struttura canonica totale, ovvero è la rappresentazione grafica della separazione (classificazione dei 121 formaggi di Asiago prodotti nei quattro sistemi di produzione HL-BM, HL-PJ, HL-PS e LL-B).

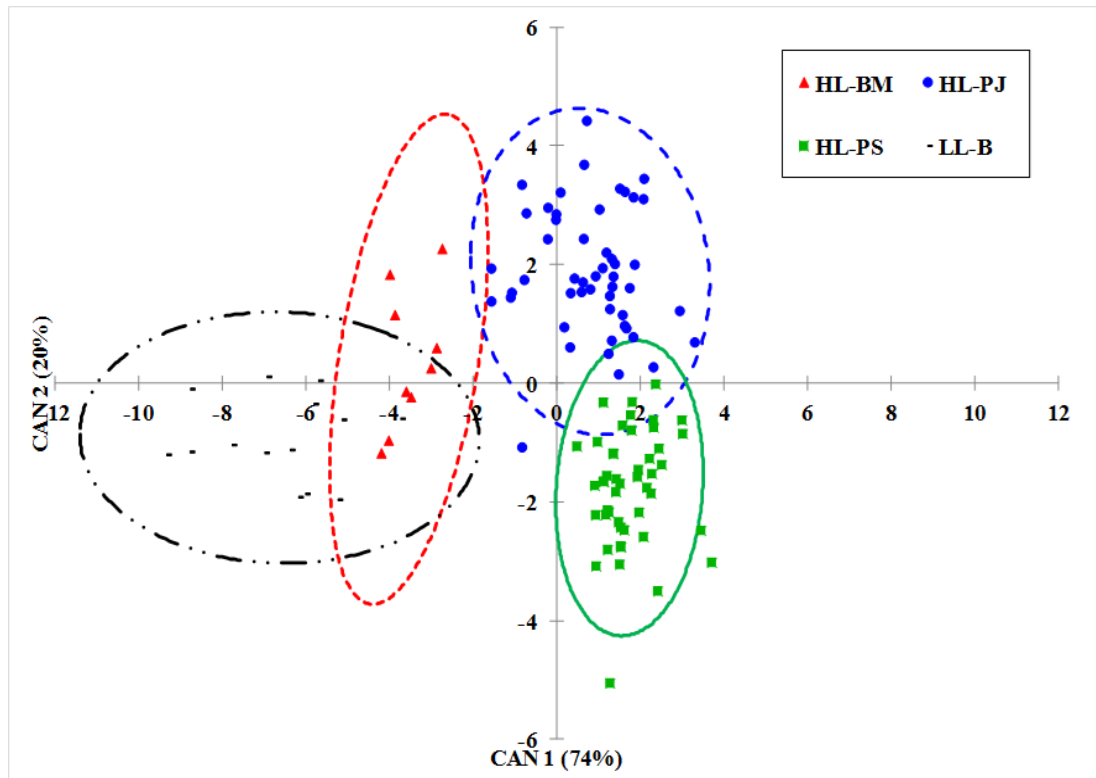


Fig. 1 Canonical discriminant analysis of nutritional (FAME profile) by the plot of the first two canonical variables CAN 1 versus CAN 2 with loadings (% of explained variance) in brackets. Ninety-five percent ellipses are drawn around each centroid of groupings. The 121 cheese samples were made by milk obtained in four **production systems**: HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn).

Come accennato, nella figura 1 i campioni sono rappresentati in funzione delle due variabili canoniche che sintetizzano la variabilità espressa dalla totalità del profilo acidico e dalle due vitamine liposolubili analizzate nei formaggi. Il fattore discriminante è soprattutto la variabile canonica CAN 1 che esprimendo la maggior parte della varianza, permette di suddividere e classificare i campioni sull'asse delle ascisse in base al loro contenuto in CLA. In particolare, possiamo osservare come i campioni provenienti dal pascolo HL-PJ e HL-PS (blu e verdi) collocandosi in valori positivi di CAN 1,

siano più ricchi in contenuto di CLA rispetto ai campioni prodotti in pianura LL-B (neri) che invece si collocano su valori negativi. Quanto detto sussiste appunto perché in CAN 1 il coefficiente standard con valori positivi è formato dai CLA e invece valori negativi corrispondono a minor valori di questi nutrienti.

I campioni di montagna prelevati da formaggi con latte di stalla HL-BM (rossi), si attestano intorno a valori leggermente superiori agli LL-B ma molto simili tanto da avere un'area in comune dell'intervallo di confidenza, confondendosi. Ne consegue che con i parametri presi in considerazione in questo studio, non siamo in grado di poter distinguere e classificare con certezza eventuali campioni ignoti collocati nell'area del grafico occupata dagli intervalli di confidenza di questi due tipi di formaggio HL-BM ed LL-B.

Risulta dubbia anche la discriminazione tra i formaggi d'alpeggio (blu e verdi) poiché anche in questo caso una zona dell'intervallo di confidenza è in comune fra i due gruppi.

Ciò che è più importante invece è il fatto che vi sia una marcata separazione fra i campioni prelevati da formaggi montani prodotti al pascolo (campioni verdi e blu) ed i campioni di pianura (neri). Questo risultato ci permette di affermare che gli acidi grassi da noi presi in esame per questo studio, riescono perfettamente a discriminare i formaggi consentendoci di poter determinare con un minimale errore di stima l'autenticità dell'Asiago d'alpeggio.

Per meglio interpretare la figura 1, vi è da considerare anche un parametro statistico che misura le distanze fra i gruppi. Questo parametro statistico è la distanza quadratica di Mahalanobis, maggiore è la distanza quadratica di Mahalanobis più netta è la separazione e più efficace è la classificazione dei formaggi.

Nella tabella 4 sono state riportate tutte le distanze quadratiche di Mahalanobis fra i vari gruppi di campioni in base al sistema di produzione. Anche questa misurazione statistica ci conferma il divario fra i gruppi di campioni del pascolo HL-PJ e HL-PS ed i campioni di pianura LL-B con valori di distanza molto elevati, rispettivamente di 70.2 e 83.9. Nel caso dei campioni di stalla in montagna HL-BM la distanza rispetto ai campioni di

pascolo in luglio HL-PJ è insufficiente con un valore di 21.4 mentre a settembre (HL-PS) vi è il valore minimo che consente di separare nettamente i gruppi ovvero 32.1. In tutti gli altri casi anche la distanza quadratica di Mahalanobis conferma l'impossibilità di separare nettamente i gruppi.

Table 4. Squared Mahalanobis distances (D^2 -Mahalanobis) obtained using CDA between the **production systems** according to nutritional parameters

	HL-BM	HL-PJ	HL-PS	LL-B
HL-BM (<i>P</i>)	-	21.4 (<0.0001)	32.1 (<0.0001)	29.6 (<0.0001)
HL-PJ (<i>P</i>)	21.4 (<0.0001)	-	7.9 (<0.0001)	70.2 (<0.0001)
HL-PS (<i>P</i>)	32.1 (<0.0001)	7.9 (<0.0001)	-	83.9 (<0.0001)
LL-B (<i>P</i>)	29.6 (<0.0001)	70.2 (<0.0001)	83.9 (<0.0001)	-

Legend: HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn

A seguito di una procedura di *cross-validation* su un ridotto dataset di campioni, si è validata la capacità del modello adottato di differenziare/discriminare i formaggi in relazione al sistema di produzione. Come riportato in tabella 5, vi è una corretta classificazione sia per quelli prodotti con latte di pianura (100% dei casi) sia per quelli ottenuti con latte di stalla di montagna (87.5% dei casi). Per quanto concerne i formaggi di alpeggio, la classificazione evidenzia performance inferiori (tra il 75-88% dei casi) ma l'erronea discriminazione avviene tra le due tesi del pascolo (HL-PJ e HL-PS), cioè il modello appare in grado di differenziare perlomeno i campioni di Asiago di montagna se comparati a quelli di Asiago di pianura.

Table 5. Discriminant analysis performance classification using nutritional dataset (**cross-validation** by using a sub-set of 30 random selected samples)

	HL-BM	HL-PJ	HL-PS	LL-B	Total
HL-BM, n° (%)	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
HL-PJ, n° (%)	0 (0.0)	6 (75.0)	2 (25.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
HL-PS, n° (%)	0 (0.0)	1 (12.5)	7 (87.5)	0 (0.0)	8 (100.0)
LL-B, n° (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)	6 (100.0)

Legend: HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn

4.3 Analisi discriminante dell'epoca di stagionatura sulla base degli acidi grassi

La tabella 6 riporta i parametri significativi per la discriminazione rispetto all'epoca di maturazione (6,12,18 e 36 mesi). In questo caso, la stepwise ha selezionato 14 tipi di acidi grassi e la vitamina A; il parametro più importante è risultato essere il C14:1, ovvero l'acido miristoleico.

Table 6. Summary of the steps for the interactive forward mode (stepwise) for the CDA (canonical discriminant analysis) for the **ripening time** of cheeses (6, 12, 18 and 36 months) according to the nutritional parameters

	Wilks' λ	Approx F	P
C14:1	0.59	25.7	<10 ⁻⁴
C18:3n6	0.39	17.5	<10 ⁻⁴
C20:3n6	0.28	14.2	<10 ⁻⁴
C20:3n3	0.22	10.4	<10 ⁻⁴
C14:0	0.17	9.8	<10 ⁻⁴
C16:1	0.14	8.3	<10 ⁻⁴
C17:0	0.12	6.5	0.0001
C15:1	0.10	6.5	0.0001
Vitamin A	0.08	8.8	<10 ⁻⁴
C18:3n3	0.05	13.8	<10 ⁻⁴
C20:4n6	0.04	7.3	0.0001
<i>cis</i> -12, <i>trans</i> -10 C18:2	0.04	5.7	0.001
C20:0	0.03	5.2	0.002
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2	0.03	5.4	0.002
C18:2n6	0.02	11.7	<10 ⁻⁴

Nel caso dell'analisi discriminante in base alla stagionatura riportata in tabella 7, i coefficienti standardizzati CAN 1 e CAN 2 hanno una varianza rispettivamente del 52.3% e del 33.0% per un totale dell'85.3% dei campioni analizzati. Anche in questo caso il coefficiente CAN 1 è più rappresentativo e l'acido grasso più discriminante risulta anche qui il *cis*-9 *trans*-11 C18:2, seguito dal C18:2 n6, dalla vitamina A e dal C18:3 n3.

Per quanto riguarda CAN 2 invece al primo posto troviamo il C14:0 acido miristico, seguito dal C14:1acido miristoleico, poi dal cis-12,trans-10 C18:2 e dal C20:3 n6. In questo caso i primi quattro parametri più importanti dei coefficienti standardizzati non coincidono.

Table 7. Canonical discriminant standardized coefficients, structure matrix and variance explained by each canonical function (CAN 1 vs CAN 2) with regard to the **ripening classes** of the cheeses according to the nutritional parameters.

	Standardized		Structure matrix ^b	
	CAN 1	CAN 2	CAN 1	CAN 2
Vitamin A	1.243	0.394	0.297	0.137
C14:0	-0.049	1.057	0.291	0.390
C14:1	0.720	-0.907	0.682	-0.213
C15:1	-0.593	-0.657	-0.321	0.062
C16:1	0.311	0.426	0.193	0.119
C17:0	-0.397	0.480	-0.351	0.489
C18:2n6	-1.258	-0.238	-0.318	-0.149
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2	-1.315	-0.042	-0.110	-0.116
<i>cis</i> -12, <i>trans</i> -10 C18:2	0.254	0.861	-0.540	0.486
C18:3n3	1.232	0.059	0.254	-0.003
C18:3n6	0.385	-0.282	0.106	-0.504
C20:0	0.333	0.034	0.309	-0.380
C20:3n3	0.391	0.335	0.429	0.239
C20:3n6	0.018	-0.759	-0.394	-0.494
C20:4n6	-0.315	-0.083	-0.206	0.086
Variance (%) ^c	52.3	33.0		

^aStandard coefficient ^bCorrelations between the variables retained after the stepwise procedure and each of the two canonical functions. The higher the absolute value of the correlation coefficient, the greater the contribution of the individual variable to the canonical function. ^cPercentage of the total variance explained by each canonical function.

L'analisi discriminante è molto utile proprio perché riesce a riassumere in sole due variabili latenti (coordinate cartesiane) le numerose variabili

considerate, consentendo di tracciare un grafico dove i vari campioni si collocano in base alla maggior presenza o assenza dei parametri considerati nella costruzione delle variabili canoniche. Gli ellissi tracciati nei grafici corrispondono all'intervallo di confidenza dei campioni al 95%.

La figura 2 classifica i formaggi in base alla stagionatura. (6,12,18 e 36 mesi)

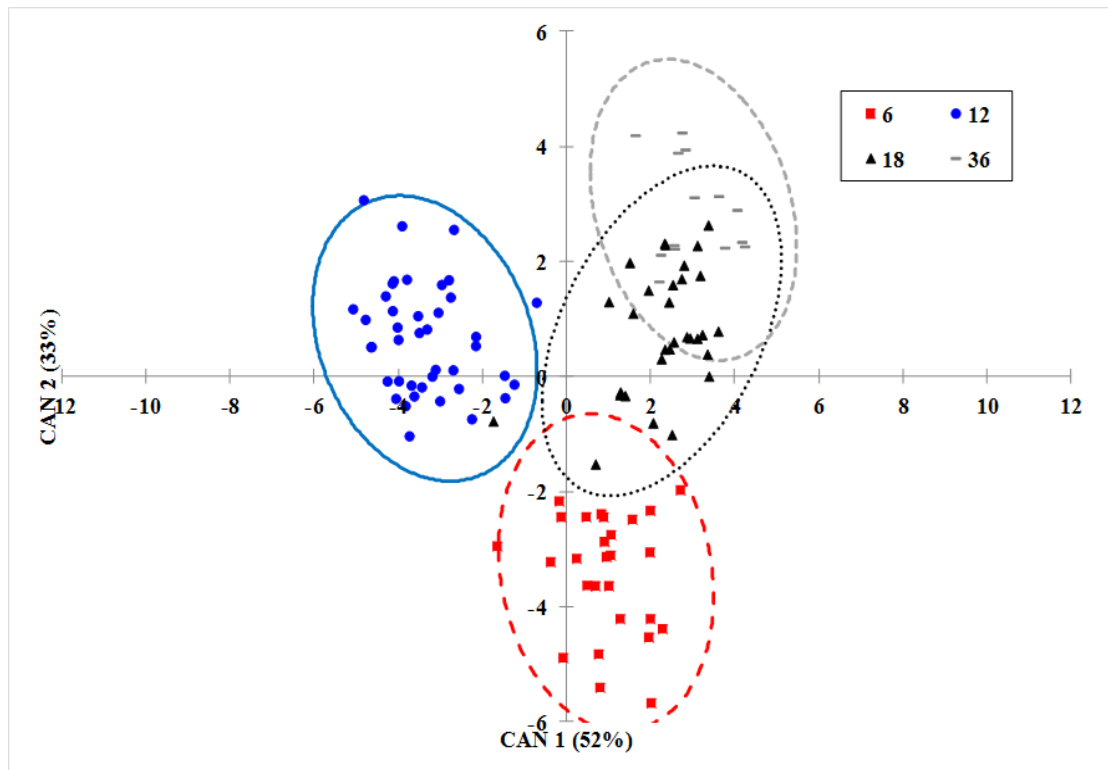


Fig. 2 Canonical discriminant analysis of nutritional (FAME profile) by the plot of the first two canonical variables CAN 1 versus CAN 2 with loadings (% of explained variance) in brackets. Ninety-five percent ellipses are drawn around each centroid of groupings. The 121 cheese samples were ripened from four different **ripening time**: 6, 12, 18 or 36 months.

Per tracciare questo grafico e costituire le due variabili canoniche CAN1 e CAN2 abbiamo tenuto in considerazione gli stessi acidi grassi discriminanti per il sistema di produzione.

Purtroppo dal grafico si evince che con questi parametri risulta difficile discriminare campioni ignoti di diversa epoca di maturazione.

I campioni di formaggio di 6 mesi riescono a differenziarsi dai 12 e dai 36 mesi ma l'area dell'intervallo di confidenza dei campioni a 18 mesi si

sovrappone ai formaggi di 6 e 36, rendendo impossibile una discriminazione di campioni ignoti fra 6 e 18 e fra 18 e 36.

Ciò che ha determinato la collocazione dei formaggi a 12 mesi di stagionatura verso l'area di sinistra del grafico sembra essere stato in modo particolare il contenuto di vitamina A.

Anche le distanze quadratiche di Mahalanobis confermano quanto detto, in tabella 8 sono state riportate tutte le distanze fra i vari gruppi di campioni in base all'epoca di maturazione. La misurazione statistica in questo caso ci conferma che non vi è sufficiente separazione tra i gruppi per poter discriminare.

Le uniche distanze accettabili, poiché almeno superiori a 30 sono tra i gruppi a 6 e 12 mesi con il gruppo a 36, come detto però la collocazione del gruppo a 36 mesi è dubbia per un eccesso di campioni provenienti dalla montagna.

Dato un campione ignoto, non è possibile in questo caso stabilire con sicurezza il grado di maturazione del formaggio.

Table 8. Squared Mahalanobis distances (D^2 -Mahalanobis) obtained using CDA (canonical discriminant analysis) between the **ripening classes** (months) according to nutritional parameters

	6	12	18	36
6 (P)	-	18.3 (<0.0001)	18.4 (<0.0001)	39.3 (<0.0001)
12 (P)	18.3 (<0.0001)	-	22.1 (<0.0001)	35.4 (<0.0001)
18 (P)	18.4 (<0.0001)	22.1 (<0.0001)	-	18.8 (<0.0001)
36 (P)	39.3 (<0.0001)	35.4 (<0.0001)	18.8 (<0.0001)	-

Legend: 6, 12, 18 and 36 (months) of ripening period

4.4 Analisi discriminante del sistema di produzione sul colore

Anche in questo caso, come riportato nel paragrafo dell'analisi statistica 3.3.4, l'analisi canonica discriminante impone di ridurre le variabili del dataset eliminando quelle correlate tra loro.

Dalla tabella 9 è molto evidente come i formaggi di pianura presentino maggiore lucentezza L^* rispetto ai formaggi d'alpeggio, mentre questi ultimi sono maggiormente contraddistinti da più elevati valori del parametro giallo b^* .

Dopo aver terminato la matrice delle correlazioni rispetto alla tabella 9 i parametri sottoposti a stepwise sono risultati essere il parametro della lucentezza L^* , il parametro del rosso a^* ed il parametro del giallo b^* , tutti gli altri sono stati scartati poiché troppo correlati con questi ultimi, che sono invece di maggiore importanza proprio perché sono i parametri che descrivono direttamente il colore.

Ad essere puntigliosi anche questi tre parametri risultano correlati tra loro, soprattutto il parametro a^* con il parametro b^* , ma non è stato possibile escluderli altrimenti sarebbe risultata impossibile la prova stessa.

Table 9. Effect of the **production system** (PS) and **ripening time** (RT) on colour traits, pH and shear force of Asiago cheese

	Production system				SEM	Significance		
	LL-B	HL-BM	HL-PJ	HL-PS		PS	RT	PS*RT
L^*	66.3 ^a	61.1 ^b	61.1 ^b	59.6 ^b	1.03	<0.001	<0.001	0.245
a^*	-2.0 ^b	-0.9 ^a	-0.7 ^a	-1.5 ^b	0.15	<0.001	0.001	0.006
b^*	10.6 ^b	10.1 ^b	12.6 ^{ab}	13.8 ^a	0.69	<0.001	0.006	0.004
C^*	10.7 ^b	10.3 ^b	12.7 ^{ab}	13.9 ^a	0.67	<0.001	0.009	0.005
H^*	98.6 ^a	103.0 ^a	95.1 ^b	93.4 ^b	1.06	<0.001	<0.001	<0.001
pH	5.69 ^b	5.82 ^a	5.73 ^b	5.79 ^a	0.013	0.002	0.473	0.004

Legend: a,b,c,d means within a row with different superscript differ ($P < 0.05$); HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn; the ripening period are at 6, 12, 18 and 36 months.

La tabella 10 riporta i valori di Wilks' λ per i tre parametri del colore discriminanti rispetto al sistema di produzione: il parametro più discriminante è a^* che risulta di 0.709, sommandovi il parametro L^* il valore scende a 0.457 ed infine tenendo conto anche di b^* , 0.426.

Table 10. Summary of the steps for the interactive forward mode (stepwise) for the CDA (canonical discriminant analysis) for the **production system** (PS) of the cheeses according to the colour traits.

	Wilks' λ	Approx F	P
a^*	0.709	16.0	$<10^{-4}$
L^*	0.457	21.3	$<10^{-4}$
b^*	0.426	2.8	0.044

a, redness index; L*, lightness; b*, yellowness index*

I tre parametri sono stati poi riportati in tabella 11 in ordine crescente di importanza. Anche qui, come per gli acidi grassi la tabella riporta per ogni parametro del colore il valore dei due coefficienti standardizzati CAN 1 e CAN 2.

Il valore della varianza della variabile canonica CAN 1 corrisponde a 90.1 mentre per CAN 2 è di 5.9, l'importanza di CAN 1 è preponderante ed unite insieme coprono il 96% della variabilità dei campioni esaminati.

Sia nel caso di CAN 1 che nel caso di CAN 2 il parametro più discriminante è la lucentezza L^* , a seguire troviamo il parametro a^* ed infine il parametro del giallo b^* .

Poiché è nell'immaginario comune che i formaggi di montagna siano di una colorazione gialla più accesa, questa scarsa rilevanza del parametro giallo b^* potrebbe lasciare sorpresi. Tuttavia alla luce del fatto che qualsiasi foraggio eccetto le graminacee influenza la colorazione gialla del prodotto, è chiaro che per distinguere il sistema di produzione, gli altri due parametri accrescano di importanza. Da questo studio si evince invece come i formaggi montani si caratterizzino per l'essere più scuri e meno lucenti di quelli di

pianura che al contrario insieme ai formaggi HL-BM (stalla in montagna) sono più luminosi.

Table 11. Canonical discriminant standardized coefficients, structure matrix and variance explained by each canonical function (CAN 1 vs CAN 2) with regard to the **production systems** of the cheeses according to the colour traits.

	Standardized		Structure matrix ^b	
	CAN 1	CAN 2	CAN 1	CAN 2
L*	-1.051	0.751	-0.440	0.882
a*	0.976	0.648	0.701	0.712
b*	0.428	-0.187	0.664	0.544
Variance (%) ^c	90.1	5.9		

^aStandard coefficient ^bCorrelations between the variables retained after the stepwise procedure and each of the two canonical functions. The higher the absolute value of the correlation coefficient, the greater the contribution of the individual variable to the canonical function. ^cPercentage of the total variance explained by each canonical function.

Nella figura 3 sono riportati tutti i campioni di formaggio Asiago HL-BM, HL-PJ, HL-PS e LL-B, secondo il colore.

Si può osservare come soprattutto i campioni HL-PJ e HL-PS si mescolano e sovrappongono, tuttavia anche gli altri campioni non riescono a distinguersi in modo netto dagli altri, sovrapponendo i rispettivi intervalli di confidenza e rendendo difficile la discriminazione.

Anche la distanza quadratica di Mahalanobis conferma quanto appena detto, in nessun caso e per nessun gruppo si arriva ad una distanza sufficiente per discriminare. I campioni HL-BM si distanziano dai campioni HL-PJ di 6.5 mentre dai campioni HL-PS di 10.4 e da LL-B di 1.7. I campioni HL-PJ si distanziano dagli HL-PS solo dello 0.8 che è anche il valore più basso registrato, mentre da LL-B di 4.0 ed infine i campioni HL-PS si distanziano da LL-B di 7.3.

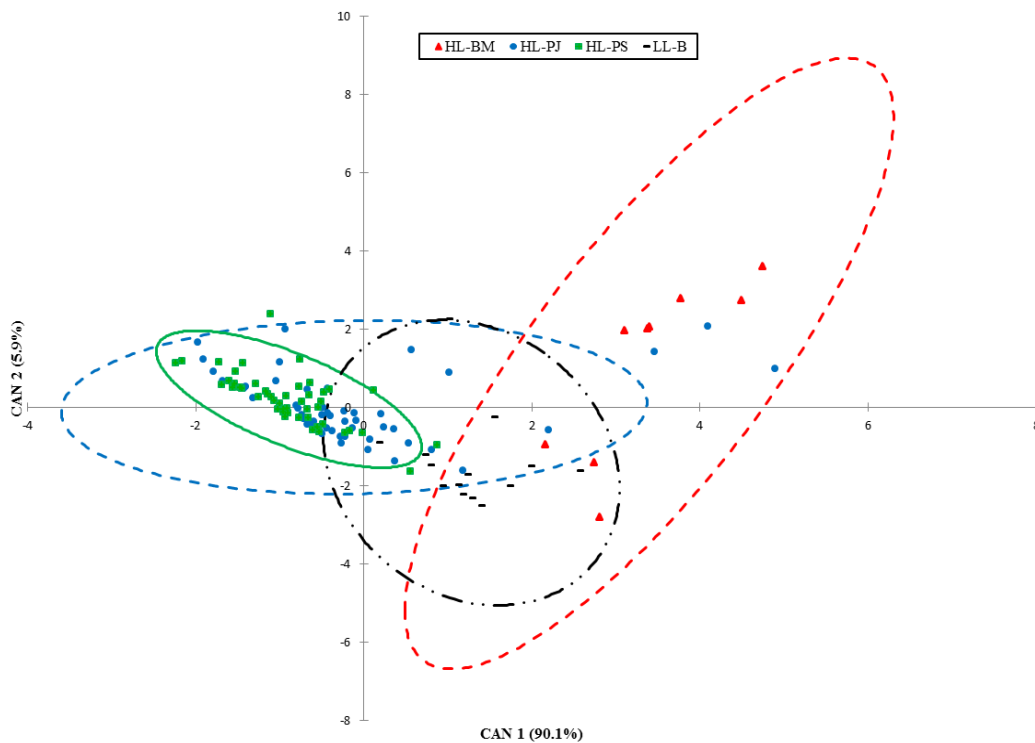


Fig. 3 Canonical discriminant analysis of the colour traits (L^* , a^* and b^*) by the plot of the first two canonical variables CAN 1 versus CAN 2 with loadings (% of explained variance) in brackets. Ninety-five percent ellipses are drawn around each centroid of groupings. The 121 cheese samples were made by milk obtained in four **production systems**: HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn).

Table 12. Squared Mahalanobis distances (D^2 -Mahalanobis) obtained using CDA (canonical discriminant analysis) between the **production systems** according to the colour traits.

	HL-BM	HL-PJ	HL-PS	LL-B
HL-BM	-	6.5	10.4	1.7
(P)		(<0.0001)	(<0.0001)	(0.031)
HL-PJ	6.5	-	0.8	4.0
(P)	(<0.0001)		(0.008)	(<0.0001)
HL-PS	10.4	0.8	-	7.3
(P)	(<0.0001)	(0.008)		(<0.0001)
LL-B	1.7	4.0	7.3	-
(P)	(0.031)	(<0.0001)	(<0.0001)	

Legend: HL- BM, Asiago from highland-barn-May; HL-PJ, Asiago from highland-pasture-July; HL-PS, Asiago from highland-pasture-Sept.; LL-B, Asiago from lowland-barn

In conclusione l'analisi del colore non è un'analisi attendibile per discriminare i campioni di formaggio in base alla provenienza.

Analogamente alla tabella 10, la tabella 13 riporta i parametri significativi per la discriminazione rispetto all'epoca di maturazione dei formaggi (6,12,18 e 36 mesi) rispetto al colore.

In questo caso, il parametro più importante è L^* con Wilks λ di 0.576, che sommato a b^* diventa 0.126 ed unito ad a^* 0.101.

Table 13. Summary of the steps for the interactive forward mode (stepwise) for the CDA (canonical discriminant analysis) for the **ripening classes** (RT) of the cheeses according to the colour traits.

	Feed		
	Wilks' λ	Approx F	P
L^*	0.576	28.8	$<10^{-4}$
b^*	0.126	5.6	0.001
a^*	0.101	4.3	0.006

*a**, redness index; *L**, lightness; *b**, yellowness index

Nella tabella 14 sono riportati i valori delle variabili canoniche rispetto all'epoca di maturazione a 6, 12, 18 e 36 mesi. La variabilità dei campioni coperta dalle variabili considerate è del 98.3%, rispettivamente CAN 1 corrisponde all'88.9% mentre CAN 2 al 9.4%. Anche nel caso dell'epoca di maturazione il valore più rappresentativo in CAN 1 è la lucentezza L^* a seguire stavolta b^* ed infine a^* .

Per la variabile canonica CAN 2, il parametro maggiormente discriminante è il tenore di rosso a^* poi il tenore di giallo b^* ed infine la lucentezza L^* .

La figura 4 classifica i formaggi secondo il colore ed in base all'epoca di maturazione a 6,12,18 e 36 mesi.

Table 14. Canonical discriminant standardized coefficients, structure matrix and variance explained by each canonical function (CAN 1 vs CAN 2) with regard to the **ripening classes** of the cheeses according to the colour traits.

	Standardized		Structure matrix ^b	
	CAN 1	CAN 2	CAN 1	CAN 2
L*	1.161	0.014	0.924	-0.136
a*	-0.265	-1.862	0.513	-0.543
b*	0.742	1.559	0.605	0.018
Variance (%) ^c	88.9	9.4		

^aStandard coefficient ^bCorrelations between the variables retained after the stepwise procedure and each of the two canonical functions. The higher the absolute value of the correlation coefficient, the greater the contribution of the individual variable to the canonical function. ^cPercentage of the total variance explained by each canonical function.

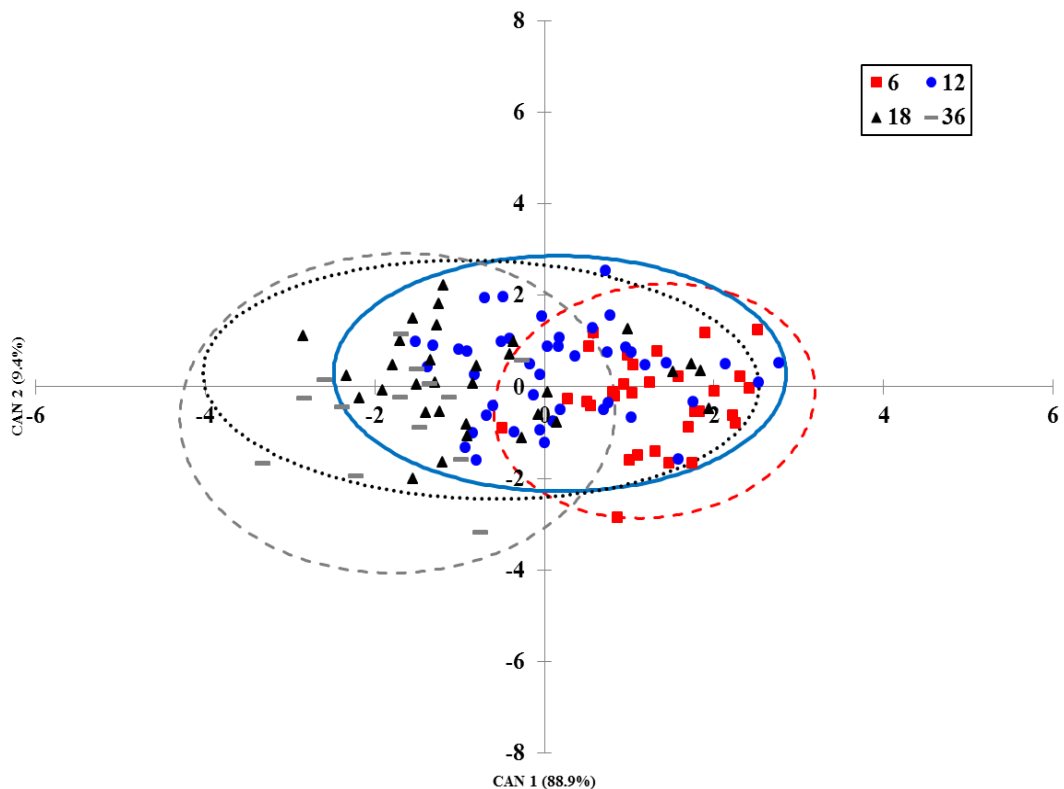


Fig. 4 Canonical discriminant analysis of the colour traits (L^* , a^* and b^*) by the plot of the first two canonical variables CAN 1 versus CAN 2 with loadings (% of explained variance) in brackets. Ninety-five percent ellipses are drawn around each centroid of groupings. The 121 cheese samples were ripened from four different **ripening time**: 6, 12, 18 or 36 months.

In questo grafico I campioni si collocano totalmente sovrapposti, di conseguenza, qui molto più che nei grafici precedenti, risulta impossibile un'eventuale discriminazione di un campione ignoto. La sovrapposizione quasi totale degli intervalli di confidenza, è confermata anche dai valori della distanza quadratica di Mahalanobis, che per ogni gruppo sono molto ben al di sotto del valore minimo di discriminazione.

La distanza fra i campioni al 6° mese di stagionatura con quelli al 12° risulta di 1.6, mentre con quelli al 18° di 4.4 e con quelli a 36 di 9.3. I campioni al 12° mese si distanziano da quelli al 18° per l'1.0, mentre da quelli al 36° mese di 4.4. I campioni al 18° mese rispetto a quelli al 36° sono distanti l'1.6. Per la nostra esperienza, tali risultati ci fanno affermare che l'analisi del colore non è assolutamente un'analisi valida nemmeno per differenziare i formaggi a diversa epoca di stagionatura.

Table 15. Squared Mahalanobis distances (D^2 -Mahalanobis) obtained using CDA (canonical discriminant analysis) between the **ripening classes** (months) according to the colour traits

	6	12	18	36
6 (<i>P</i>)		1.6 (<0.0001)	4.4 (<0.0001)	9.3 (<0.0001)
12 (<i>P</i>)	1.7 (<0.0001)		1.0 (0.001)	4.4 (<0.0001)
18 (<i>P</i>)	4.4 (<0.0001)	1.0 (0.001)		1.6 (0.002)
36 (<i>P</i>)	9.3 (<0.0001)	4.4 (<0.0001)	1.6 (0.002)	

Legend: 6, 12, 18 and 36 (months) of ripening period

Altri studi sono necessari soprattutto ricorrendo ad altre informazioni spettrofotometriche che possono dare altre tecniche multi-analitiche basate sulla spettrofotometria.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

La sperimentazione oggetto della presente tesi di laurea ha avuto il fine di verificare, in varie tipologie di formaggio Asiago d'Allevio, un ridotto numero di caratteristiche qualitative valide nell'identificare e discriminare, formaggi prodotti con latte d'alpeggio in comparazione con altri prodotti nei sistemi lattiero-caseari di pianura.

I risultati ottenuti durante la prova, ci consentono di poter affermare che l'abbinata analisi degli acidi grassi e vitamine liposolubili è una potenziale tecnica multianalitica sulla quale basarsi per poter discriminare i formaggi rispetto alla zona d'origine/alimentazione delle bovine lattifere. I risultati ottenuti evidenziano come tale ottimale capacità discriminante sia legata alla presenza di composti nutrizionali benefici per l'uomo quali i CLA e la vitamina A. I formaggi d'alpeggio si caratterizzano inoltre per un più equilibrato profilo acido stante l'aumento della quota dei polinsaturi (PUFA) a scapito dei saturi (SFA).

In relazione a un secondo fattore di classificazione, quale l'epoca di stagionatura, i risultati ottenuti non evidenziano una rilevante capacità discriminante degli acidi grassi. Peraltro, vi è da rilevare che i riscontri emersi nella analisi discriminante per l'epoca di stagionatura sono in parte condizionati dall'interazione con il fattore sistema di produzione poiché la ripartizione delle ripetizioni tra le varie tesi è risultata sbilanciata a favore dei formaggi di montagna/alpeggio.

Un'ulteriore parte sperimentale dello studio ha riguardato la discriminazione dei formaggi sulla base delle coordinate colorimetriche. Per entrambi i fattori di classificazione, si sono ottenute performance di discriminazione/classificazione molto basse. Da ciò possiamo affermare che in questa prova l'analisi del colore non è da considerarsi un'analisi valida né per la determinazione del sistema di produzione né per stabilire il grado di stagionatura del formaggio Asiago. Infatti, dai grafici ottenuti sulla base delle

due variabili canoniche , i campioni e gli intervalli di confidenza risultano quasi totalmente sovrapposti.

Tuttavia dall'analisi del colore è emerso che i parametri colorimetrici L^* , a^* e b^* variano in funzione del sistema di produzione, con i formaggi di pianura più luminosi e con valori minori relativi all'indice del giallo e del rosso rispetto ai formaggi di pascolo. In estrema sintesi si denota una lieve differenza ma non sufficiente per discriminare. Ciò induce a ritenere che ulteriori studi dovrebbero indagare anche lo spettro di assorbimento determinabile con lo spettrofotometro per verificare se vi sono ulteriori informazioni spettrali da utilizzare ai fini discriminatori.

In conclusione, da questa sperimentazione emerge che potrebbe essere perfezionato un modello matematico-statistico basato sulle caratteristiche del profilo acidico dei formaggi utile per la loro discriminazione rispetto all'origine/alimentazione degli animali. Tale modello potrebbe essere supportato da dati ottenibili con l'ausilio di tecniche multi-analitiche rapide e poco costose quali il NIRS e l'NMR.

E' emerso altresì che la qualità nutrizionale dei formaggi Asiago prodotti in montagna si discosta significativamente da quella dei formaggi prodotti in pianura, con particolare riferimento a quelli di alpeggio. Da questo punto di vista è auspicabile il rafforzamento della produzione di Asiago d'Allevato di pascolo, anche ricorrendo a una specifica marchiatura. Inoltre, sono necessarie ulteriori prove sperimentali che contribuiscano sia alla costruzione di modelli di discriminazione basati su caratteristiche qualitative chimico-fisiche (tracciabilità fisica e non solo documentale) sia alla loro validazione mediante rigorose procedure statistiche di validazione .

BIBLIOGRAFIA

- Disciplinary di produzione del formaggio “Asiago” DOP redatto dal Consorzio per la Tutela del Formaggio Asiago di Vicenza
- Novelli E., Segato S., Balzan S., “La produzione e trasformazione del latte nel comprensorio montano vicentino”
Fondazione Studi Universitari di Vicenza;
- Novelli E., Balzan S., Marchesini G., Segato S., Tenti S., Tutta C., Tealdo E. (2010) “Effect of alpine grazing on lipid composition of Asiago d’Allevato cheese”. 1st. international conference on “Trends and challenges in food technology, nutrition, catering and tourism” in Ljubljana Slovenia;
- 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. of Agriculture and Food Chemistry 11449-11454;
- Ottavian M., Facco P., Barolo M., Berzaghi P., Segato S., Novelli E., Balzan S.. (2012) “Near-Infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d’allevato cheese” J. of Food Engineering 289-298;
- Favaro G., Magno F., Boaretto A., Bailoni L., Mantovani R. (2005) “Traceability of Asiago Mountain Cheese: A Rapid, Low-Cost Analytical Procedure for its Identification Based on Solid-Phase Microextraction” J. Dairy Sci. 88:3426–3434, American Dairy Science Association;
- Bittante G., Cecchinato A., Cologna N., Penasa M., Tiezzi F., De Marchi M. (2011) “Factors affecting the incidence of first-quality wheels of Trentingrana cheese” J. Dairy Sci. 94 :3700–3707, American Dairy Science Association;

- Bittante G., Cologna N., Cecchinato A., De Marchi M., Penasa M., Tiezzi F., Endrizzi I., Gasperi F. (2011) "Monitoring of sensory attributes used the quality payment system of Trentingrana cheese" *J. of Dairy Science*, 94(11), 5699-5709;
- De Marchi M., Penasa M., Cecchinato A., Mele M., Secchiari P., Bittante G., (2011) "Effectiveness of mid-infrared spectroscopy predict fatty acid composition of Brown Swiss bovine milk" *Animals*, (10):1653-1658;
- Gottardo P., Tiezzi F., Penasa M., Toffanin V., Cassandro M., De Marchi M. (2013) "Milk fatty acids predicted by midinfrared spectroscopy in mixed dairy herds" *Agriculture Conspectus Scientificus*, 78(3): 263-266;
- Pretto D., De Marchi M., Penasa M., Cassandro M. (2013) "Effect of milk composition and coagulation traits on Grana Padano cheese yield conditions" *J. of Dairy Research* 80(1): 1-5.
- Dufosse L., Galaup P., Carlet E., Flamin C., Valla A. (2005) "Spectrocolorimetry in the CIE $L^*a^*b^*$ color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses" *Food Research International* (38): 919–924;
- Buffa M., Trujillo A., Pavia M., Guamis B. (2001) "Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats milk" *International Dairy Journal* (11): 927–934;
- Segato S., Balzan S., Elia C.A., Lignitto L., Granata A., Magro L., Contiero B., Andrighetto I., Novelli E. (2007) "Effect of period of milk production and ripening on quality traits of Asiago cheese" *Ital. J. Anim. Sci. Vol. 6 (Suppl. 1): 469-471;*
- Mazzei P., Piccolo A. (2011) "H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk" *Food Chemistry* (132): 1620–1627.
- Piras C., Marincola F.C., Savorani F, Engelsen S.B., Cosentino S., Viale S., Pisano M.B. (2013) "A NMR metabolomics study of the

- ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures” *Food Chemistry* (141): 2137–2147;
- Contarini G., Povolo M., Bonfitto E., Berardi S. (2002) “Quantitative analysis of sterols in dairy products: experiences and remarks” *International Dairy Journal* (12): 573–578;
 - Walther B., Schmid A., Sieber R., Wehrmüller K. (2008) “Cheese in nutrition and health” *Dairy Sci. Technol.* (88): 389–405 INRA, EDP Sciences;
 - Marchesini G., Balzan S., Segato S., Novelli E., Andrighetto I. (2009) “Colour traits in the evaluation of the ripening period of Asiago cheese” *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 8 (Suppl. 2): 412-413;
 - Pillonel L., Badertscher R., Casey M., Meyer J., Rossmann A., Schlichtherle-Cerny H., Tabacchi R., Bosset J.O. (2004) “Geographic origin of European Emmental cheese: Characterisation and descriptive statistics” *International Dairy Journal* (15): 547–556 ;
 - Karoui R., Mouazen A.M., Dufour E., Pillonel L., Picque D., De Baerdemaeker J., Bosset J.O. (2005) “Application of the MIR for the determination of some chemical parameters in European Emmental cheeses produced during summer” *Eur Food Res Technol* (222): 165–170;
 - Martinez I., Aursand M., Erikson U., T., Singstad T.E., Veliyulin E., van der Zwaagb C. (2003) “Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs” *Trends in Food Science & Technology* (14): 489–498;
 - Kaffarnik S., Ehlers I., Gröbner G., Schleucher J., Vetter W. (2013) “Two-Dimensional ³¹P,¹H NMR Spectroscopic Profiling of Phospholipids in Cheese and Fish” *J. Agric. Food Chem.* (61): 7061–7069;
 - Sacco D., Brescia M.A., Sgaramella A., Casiello G., Buccolieri A., Ogrinc N., Sacco A. (2008) “Discrimination between Southern Italy and foreign milk samples using spectroscopic and analytical data” *Food Chemistry* (114): 1559–1563;

- Jones S.T., Aryana K.J., Losso J.N. (2005) "Storage Stability of Lutein During Ripening of Cheddar Cheese" *J. Dairy Sci.* (88):1661–1670
American Dairy Science Association;
- Lucas A., Andueza D., Ferlay A., Martin B. (2007) "Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheeses by visible–near-infrared reflectance spectroscopy" *International Dairy Journal* (18): 595–604;
- Prandini A.; Sigolo S., Piva G., (2010) "A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses" *Journal of Food Composition and Analysis* (24): 55–61;
- Bontempo L., Lombardi G., Paoletti R., Ziller L., Camin F. (2012) "H, C, N and O stable isotope characteristics of alpine forage, milk and cheese" *International Dairy Journal* (23): 99-104;
- Camin F., Wehrens R., Bertoldi D., Bontempo L., Ziller L., Perini M., Nicolini G., Nocetti M., Larcher R. (2011) "H, C, N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses" *Analytica Chimica Acta* (711): 54– 59.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il mio relatore dott. Severino Segato per avermi seguito in tutti questi anni di studio universitario, la mia famiglia per avermi sostenuto ed incoraggiato ed il mio compagno di corso Giulio Gastaldon con il quale ho condiviso momenti di studio e i tragitti quotidiani da Vicenza a Padova.

Mosè Giaretta

