



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

EFFETTO DELL'AGLIO COME ADDITIVO NELLA DIETA DI VACCHE DA LATTE SUI CARATTERI QUALITATIVI, SULLE PROPRIETÀ DI COAGULAZIONE E SUL PROCESSO DI CASEIFICAZIONE DEL LATTE

Relatore:

Prof. Franco Tagliapietra

Correlatore:

Dott. Claudio Cipolat-Gotet

Laureanda:

Susanna Mariacarla Paglia

Matricola n. 1130918

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

Sommario

Riassunto	II
Abstract	III
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Impatto ambientale della zootecnia	1
1.2 Ruolo della zootecnica nella emissione di metano	2
1.2.1 La metanogenesi ruminale	3
1.2.2 I metanobatteri	6
1.2.3 Riduzione della produzione di metano	6
1.2.3.1 Strategie alimentari per la riduzione di metano	7
1.3 Aglio come additivo nella dieta dei ruminanti	17
1.3.1 Effetto dell'aglio sulla produzione di latte nelle vacche da latte	20
1.4 Effetti benefici dell'aglio per l'uomo	21
1.4.1 Integrazione dell'aglio nei prodotti lattiero-caseari	23
2. OBIETTIVI.....	25
3. MATERIALI E METODI	26
3.1 Disegno sperimentale.....	26
3.2 Analisi del latte.....	28
3.2.1 Lattodinamografia	28
3.2.2 Modellizzazione del tracciato lattodinamografico	31
3.3 Mini-caseificazione.....	32
3.4 Analisi Statistica	41
4. DISCUSSIONE.....	43
5. CONCLUSIONI	60
6. BIBLIOGRAFIA	61

Riassunto

Le attività antropiche contribuiscono all'emissione di gas serra, prevalentemente anidride carbonica (CO₂), metano (CH₄) e protossido di azoto (N₂O), che causano il cambiamento della composizione dell'atmosfera terrestre. Il settore zootecnico ha un ruolo rilevante per quanto riguarda le emissioni di metano (28% delle emissioni totali) e di protossido d'azoto (6% delle emissioni totali). In particolare le fermentazioni enteriche dei ruminanti contribuiscono per circa l'80% del totale di metano emesso in atmosfera. Per questo motivo, negli ultimi anni, lo studio di strategie in relazione alla possibile mitigazione delle emissioni di metano hanno suscitato un grande interesse nel settore della ricerca.

Il presente lavoro di tesi ha voluto valutare l'effetto dell'uso dell'aglio come additivo nella dieta di vacche da latte sui caratteri che definiscono la produzione e la qualità del latte (composizione chimica, acidità e cellule somatiche), sulle proprietà di coagulazione e sui caratteri che descrivono il processo di caseificazione. La prova ha previsto l'utilizzo di 4 bovine di razza Frisona Italiana alle quali è stata somministrata una dieta additivata o meno con l'aglio secondo uno schema a quadrato latino 4 x 4 (4 vacche x 4 periodi sperimentali). Le 4 tesi a confronto sono state: dieta controllo priva di aglio (CTR), dieta con l'estratto dell'aglio allil-sulfide (ALL), dieta con 100 g/d di aglio naturale (A100) e dieta con 400 g/d di aglio naturale (A400).

Durante tutta la prova sperimentale, sono stati raccolti 2 campioni di latte per ogni bovina rispettivamente durante la mungitura mattutina e serale. Nell'ultima settimana di trattamento di ciascun periodo, in due giornate differenti non consecutive sono stati prelevati anche 10 litri di latte/vacca (5 litri per 2 mungiture, mattina e sera) da sottoporre rispettivamente ad analisi chimica e a caseificazione.

La somministrazione di aglio nella dieta non ha determinato alcun effetto significativo per i caratteri qualitativi del latte, ad eccezione di una tendenziale riduzione della proteina. I parametri di coagulazione tradizionale, di modellizzazione e di caseificazione non hanno riportato dei cambiamenti significativi con l'inserimento dell'aglio nella dieta. Pertanto, a questi dosaggi e relativamente ai parametri valutati, non è stata riscontrata alcuna differenza nell'impiego *in vivo* di questo alimento sui caratteri qualitativi, sulla coagulazione e sulla caseificazione del latte bovino.

Alla luce di quanto osservato, in relazione all'efficacia dell'uso dell'aglio nell'alimentazione bovina per ridurre le emissioni di metano nell'atmosfera, è possibile utilizzare questo additivo senza alcun effetto nei confronti della qualità tecnologica-casearia del latte. È necessario però effettuare ulteriori studi *in vivo* con l'obiettivo di aumentare il numero di animali coinvolti nella prova per confermare i risultati ottenuti nel presente lavoro.

Abstract

Anthropic activities contribute to the release of greenhouse gases, predominantly carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and nitrous oxide (N₂O), which cause the change of the Earth's atmosphere composition. The livestock sector plays a major role in methane emissions (28% of total emissions) and nitrous oxide (6% of total emissions). In particular, the ruminant enteric fermentations contribute about 80% of the total methane released into the atmosphere. For this reason, in the recent years, researchers focused on the study of strategies for the mitigation of methane emissions: it has been recently shown that garlic, or garlic components, used as feed additives could represent a good strategy to decrease the rumen methane production of dairy cows. This thesis aimed to evaluate the effect of using garlic as an additive of the dairy cows diet on the traits related to the milk production and quality (chemical composition, acidity and somatic cells), coagulation and cheese-making efficiency. The experiment was completed according to a 4×4 Latin Square with 4 Holstein-Friesian lactating cows fed in 4 consecutive periods with a total mixed ratio (TMR) not supplemented (CTR) or supplemented with garlic, as raw (A100: 100 g/d and A400: 400 g/d) or as allyl-sulfide, a pure derivative (ALL: 2 g/d). Throughout the experimental trial, 2 samples of milk were collected for each cow respectively during morning and evening milking. Moreover, during the last week of each period, 10 liters of milk/cow (5 liters /milking, morning and evening) were collected on two different and not consecutive days for chemical analysis and cheese-making.

The use of garlic as an additive of the dairy cows diet did not show any significant effect on the milk quality traits, with the exception of a slight reduction in the protein content. As for milk quality, traditional and modeled coagulation properties, as well as cheese-making process traits were not influenced by the inclusion of garlic in the cows diet. Therefore, at these garlic dosages, no differences were found in all the traits related to the milk production and quality: in relation to the effectiveness of the use of garlic in the bovine feeding system to reduce methane emissions into the atmosphere, it is possible to conclude that to use of this additive has no effect on milk technological quality. However, to confirm the results obtained in the present study, further in-vivo studies should be carried out with the aim of increasing the number of animals involved in the trial.

1. INTRODUZIONE

1.1 Impatto ambientale della zootecnia

L'allevamento zootecnico ha una forte influenza nei confronti dell'ambiente: l'orientamento di ogni forma di produzione agro-zootecnica verso un sistema eco-sostenibile rappresenta un requisito di fondamentale importanza.

A causa della *Rivoluzione Verde* e dei fenomeni dell'urbanizzazione e dell'industrializzazione che hanno avuto inizio negli anni 60, c'è stato un progressivo impoverimento delle risorse ambientali che ha determinato una riduzione delle materie prime disponibili per produrre alimenti di origine animale e vegetale (Pulina *et al.*, 2011). Inoltre, il crescente grado di benessere dei paesi in via di sviluppo sta comportando il cambiamento delle scelte alimentari dei consumatori verso un maggior utilizzo nella dieta di alimenti di origine animale.

In aggiunta, l'impatto ambientale della zootecnia si sta manifestando attraverso emissioni di metano CH₄ (circa il 28% delle emissioni totali) e protossido d'azoto N₂O (circa il 6% delle emissioni totali), due gas ad effetto serra che contribuiscono per il 12% al totale delle emissioni antropogeniche (Caserini, 2015). Questi due gas, insieme all'anidride carbonica (CO₂), svolgono un'azione negativa nei confronti dell'ambiente portando ad un innalzamento della temperatura globale con conseguente perdita di biodiversità animale e vegetale (Crovetto e Sandrucci, 2010). Quindi, per questi motivi, negli ultimi decenni la ricerca in ambito zootecnico si è focalizzata a trovare strategie che consentano di incrementare l'efficienza alimentare degli animali da reddito per migliorarne la produttività. A questo proposito l'obiettivo è ridurre lo spreco delle risorse ambientali disponibili, individuare delle tecniche di mitigazione delle emissioni di gas serra da parte degli allevamenti, e al contempo assicurare un maggior ritorno economico all'allevatore, grazie ai minori costi di produzione per unità di prodotto ottenuto.

Le interazioni fra zootecnia e ambiente variano in base al tipo di specie (monogastrici o poligastrici) e, all'interno della specie alla categoria di animali allevati, alle tecniche ed, in generale, al sistema di allevamento: a parità di tutte queste condizioni, è chiaro che l'intensificazione e l'industrializzazione delle produzioni zootecniche determinano un maggior impatto ambientale.

L'impatto ambientale conseguente al settore zootecnico viene classificato attraverso degli effetti diretti ed indiretti: gli effetti ambientali diretti riguardano le immissioni delle escrezioni di

feci e urina, e le eruttazioni dei gas provenienti dalle fermentazioni ruminali e/o intestinali; gli effetti ambientali indiretti sono, invece, l'utilizzo di risorse idriche ed energetiche connesse alla produzione di alimenti, all'allevamento, all'industria di trasformazione e distribuzione.

Diversamente dal passato, l'alimentazione degli animali in produzione deve considerare numerosi aspetti legati sia al soddisfacimento dei fabbisogni nutritivi per garantire delle performance adeguate, sia all'impatto ambientale derivante dal tipo di apporto nutrizionale scelto. L'allevamento degli animali da reddito è responsabile dal 7 al 18 % delle emissioni di gas serra di origine antropica espressi in CO₂ equivalenti per anno (FAO, 2013): in particolare, il protossido di azoto (N₂O), metano (CH₄) e biossido di carbonio (CO₂) rappresentano rispettivamente il 53%, 44% e 5% delle emissioni di natura antropica (IPCC, 2007).

Per poter dare un valore alle emissioni, a ciascun gas serra è assegnato un valore GWP (Global Warming Potential) definito dalla capacità di riscaldare il pianeta rispetto ad una quantità equivalente di CO₂ in un determinato periodo di tempo. Il metano e il protossido di azoto contribuiscono al riscaldamento globale rispettivamente 23 volte e 298 volte in più rispetto alla CO₂ nel corso di un periodo di riferimento di 100 anni (Crovetto e Sandrucci, 2010; IPCC, 2013).

1.2 Ruolo della zootecnica nella emissione di metano

Il metano, considerato uno dei maggiori gas responsabili dell'effetto serra, deriva in gran parte dalle attività zootecniche e, in particolare, tra le specie da reddito allevate, il comparto bovino è sicuramente quello che in termini di produzione di gas serra e scarsa efficienza di trasformazione delle risorse, grava maggiormente sulle problematiche attuali.

Si calcola che la zootecnica contribuisca alla produzione del 35-40% del metano di origine antropico di cui l'80% di queste emissioni deriva da allevamenti estensivi (Crovetto e Sandrucci, 2010).

L'emissione di CH₄ deriva prevalentemente dalle fermentazioni microbiche di carboidrati e aminoacidi che avvengono nel rumine dei ruminanti e nel cieco dei monogastrici, motivo per cui, avendo il cieco una minore capacità di sintetizzare il metano, i ruminanti sono i maggiori produttori del gas in questione (EPA, 2015). Infatti, con particolare riferimento ai vari comparti produttivi della zootecnica italiana, il 56% della produzione di gas serra è attribuita all'allevamento dei bovini da latte, il 18% a quello da carne, il 12% a quello suino, mentre i restanti settori zootecnici contribuiscono complessivamente per il 14% (Pulina *et al.*, 2011).

La produzione di metano ad opera dei microrganismi (circa 500-700 litri/giorno), oltre ad essere nocivo per l'ambiente, determina una riduzione della produttività per l'animale, e di conseguenza una perdita economica per l'allevatore.

Il metano prodotto dai ruminanti è influenzato da numerosi fattori intrinseci all'animale, quali il livello produttivo, lo stato fisiologico, la taglia e l'ingestione e da fattori estrinseci quali la temperatura e le caratteristiche quali-quantitative della dieta che viene loro somministrata (Crovetto e Sandrucci, 2010): tra le diverse scelte zootecniche, una dieta maggiormente digeribile può determinare, ad esempio, una minore produzione di metano rispetto ad una dieta grossolana e quindi gli allevamenti che adottano un maggior utilizzo di concentrati a scapito di foraggi garantiscono una riduzione delle emissioni di questo gas.

1.2.1 La metanogenesi ruminale

I ruminanti stabiliscono un rapporto simbiotico con i microrganismi del rumine, nel quale l'animale fornisce i nutrienti e le condizioni ambientali ottimali per la fermentazione degli alimenti, e i microrganismi degradano la fibra e sintetizzano la proteina microbica rispettivamente come approvvigionamento energetico e proteico per l'animale. Tuttavia questo rapporto simbiotico determina delle perdite di energia sotto forma di metano, e di proteina sotto forma di azoto ammoniacale (Kamra *et al.*, 2005; Kamra *et al.*, 2008). Questa perdita di energia, come detto precedentemente, non solo limita le prestazioni produttive degli animali, ma contribuisce anche all'inquinamento ambientale.

I responsabili della metanogenesi sono gli archeobatteri, gruppo di microrganismi unico dal punto di vista filogenetico: questi sono caratterizzati da lento sviluppo ed una stretta anaerobiosi. Nell'ambiente ruminale, i metanogeni prendono parte alla fase conclusiva della catena di degradazione dell'alimento; in questa fase tre differenti gruppi di microrganismi intervengono nelle tre fasi della metanogenesi:

1. La prima fase prevede la degradazione dei nutrienti presenti nella razione; amido, cellulosa, emicellulosa e pectina vengono utilizzati come substrati dai microrganismi che intervengono nella digestione (in particolare batteri, protozoi e funghi) e idrolizzati in zuccheri semplici (mono e oligo saccaridi), mentre la componente proteica dell'alimento viene utilizzata da batteri proteolitici (in particolare *Prevotella ruminicola*) e viene degradata a scheletro carbonioso con produzione di ammoniaca.
2. Nella seconda fase gli zuccheri semplici (glucosio) e lo scheletro carbonioso delle proteine prodotti nella prima fase vengono utilizzati da batteri acetogenici, protozoi e miceti che, a

loro volta, producono gli acidi grassi volatili (acetato, propionato e butirato), H₂ e CO₂ (Sherwood *et al.*, 2005).

In particolare l'idrogeno molecolare si forma a partire dagli *idrogenosomi*, attraverso i quali vengono eliminati parte dei protoni derivanti dalla dissociazione dei composti acidi generati durante le fermentazioni; questo elemento, se accumulato nel rumine, provocherebbe l'inibizione dei microrganismi ruminanti poiché ad elevate pressioni parziali di H₂, il processo di ri-ossidazione dei cofattori deputati al trasporto di elettroni (NADH, FADH₂ e ferrodossina) viene impedito. Per mantenere bassa la concentrazione ruminale di idrogeno e permettere quindi il proseguimento dei processi fermentativi, esso viene eruttato dall'animale o prontamente utilizzato da altre specie microbiche come appunto i metanogeni (Guglielmelli, 2009).

3. Nella terza fase i batteri metanogeni specializzati appartenenti al dominio degli *Archaea* utilizzano i prodotti dei primi due stadi (soprattutto H₂ e CO₂) per produrre metano secondo la reazione:

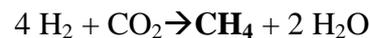
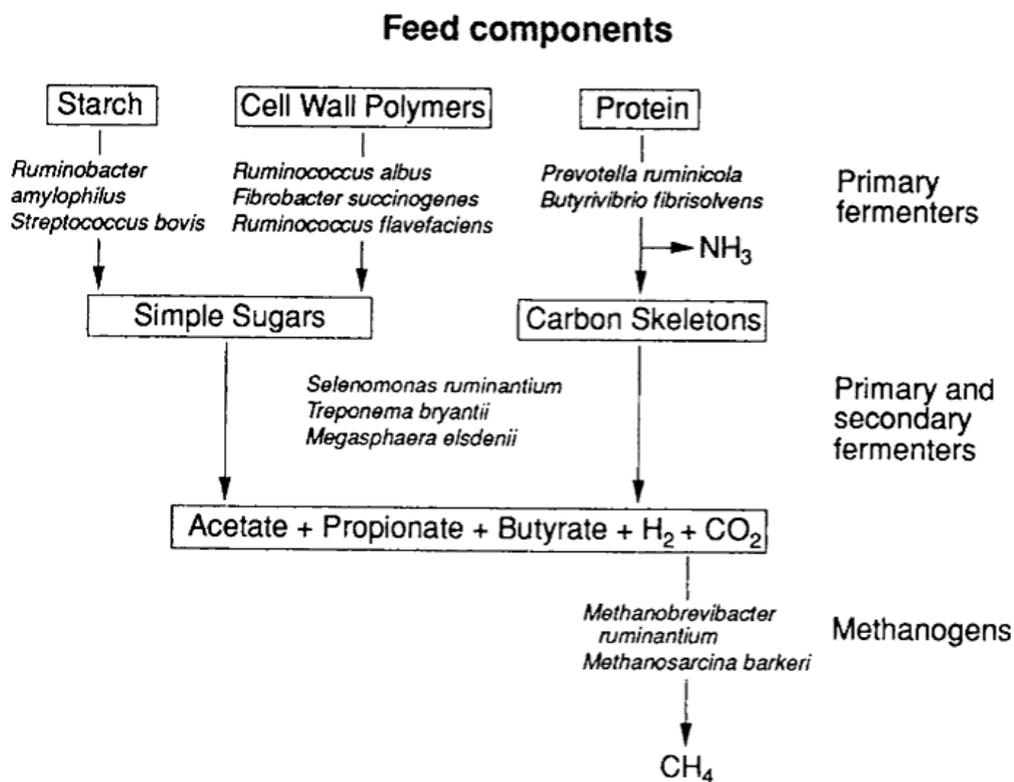


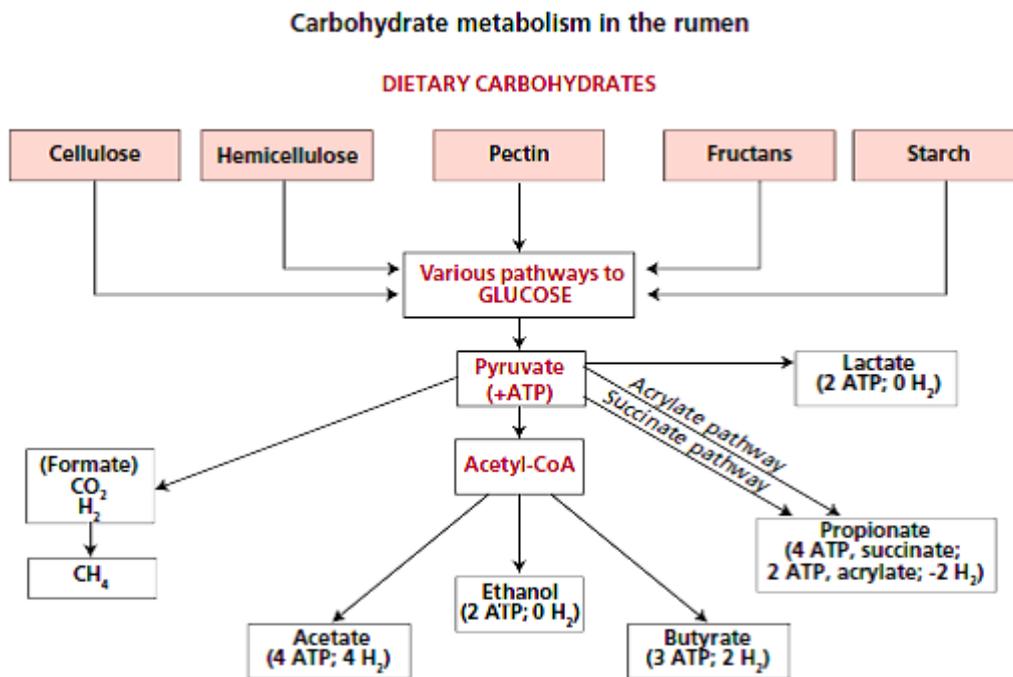
Figura 1. Schema della fermentazione microbica nel rumine (McAllister *et al.*, 1996)



Nello specifico, il glucosio della seconda fase viene degradato dai microrganismi ruminali in piruvato, il quale può intervenire nelle seguenti quattro reazioni:

- È degradato a Acetil-CoA con successiva formazione di alcoli, acetato o butirrato, le cui reazioni sono responsabili della produzione di idrogeno.
- È utilizzato come precursore del propionato tramite la via del succinato, la cui reazione invece richiede l'utilizzazione dell'idrogeno.
- Produce il lattato.
- Produce il formiato e $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ che possono concorrere alla produzione di metano.

Figura 2. Metabolismo dei carboidrati nel rumine (FAO, 2013)



I microrganismi coinvolti nella produzione di acetato rilasciano il doppio di idrogeno rispetto ai produttori di acido butirrico, mentre il processo deputato alla formazione di propionato non prevede una produzione, bensì un utilizzo di H_2 da parte dei batteri (Moss *et al.*, 2000).



1.2.2 I metanobatteri

I batteri metanogeni sono un gruppo distinto di microrganismi classificati in un dominio specifico, gli *Archaea*, all'interno del regno degli *Euryarchaeota* in relazione alle molteplici differenze rispetto ai batteri: il possesso di cofattori unici, la presenza di particolari lipidi intercellulari, l'assenza di polimeri peptidoglicani nella parete cellulare, la presenza di specifiche sequenze nucleotidiche nell' rRNA sono alcuni degli aspetti che contraddistinguono i metanogeni rispetto ai batteri.

I metanogeni sono anaerobi obbligati e crescono solo in ambienti con potenziali redox inferiori a -300 mV (McAllister *et al.*, 1996). Sono stati riconosciuti sessantasei specie di batteri metanogeni, isolati da una varietà di habitat anaerobici tra cui acquitrini, torbiere acide, terreni saturi d'acqua, e il tratto intestinale degli animali. Solo cinque di queste specie sono stati individuati nel rumine: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanosarcina mazei*. Tuttavia solo i *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosarcina spp.* sono stati trovati nel rumine a popolazioni superiori a 1×10^6 ml⁻¹ (McAllister *et al.*, 1996). Come indicato da Patra e Saxena (2010), i metanogeni creano un legame simbiotico con i protozoi ruminanti; l'inibizione di quest'ultimi, ad esempio tramite l'uso di saponine, riduce la quantità disponibile di H₂ e, di conseguenza, la riduzione del numero e dell'attività dei batteri metanogeni, diminuendo notevolmente la produzione di metano fino al 30-45% (FAO, 2013).

1.2.3 Riduzione della produzione di metano

Tra i possibili interventi, possono essere identificate quattro diverse strategie per la riduzione delle emissioni di metano (FAO, 2013):

- Direttamente a livello di flora ruminale, alterando il rapporto protozoi/batteri attraverso l'eliminazione dei protozoi con determinati agenti alimentari o chimici; questo provoca la riduzione della quantità di idrogeno come substrato per i metanogeni e la diminuzione della quantità di metano prodotto del 20-50% (Boadi *et al.*, 2004);
- Agendo sulla formulazione di una dieta adeguata o attraverso l'uso di additivi che vadano a modificare le fermentazioni enteriche;
- Modificando le pratiche di gestione dei reflui rimuovendoli regolarmente e frequentemente, conservandoli con temperature inferiori di 10°C, abbassando il pH ed eventualmente utilizzando il compostaggio aerobico o il biogas (Mele, 2013).

- Agendo sulla gestione e la produttività dell'allevamento, ovvero distribuendo la quantità di metano su una maggiore produzione, riducendo i tempi improduttivi e aumentando la longevità degli animali in produzione (Knapp *et al.*, 2014). Eventualmente un'ulteriore strategia gestionale consiste nell'agire su specifici programmi di miglioramento genetico selezionando animali che migliorano l'utilizzo di nutrienti e determinano una minore emissione di metano (Cassandro *et al.*, 2013).

1.2.3.1 Strategie alimentari per la riduzione di metano

Anche se sono molteplici i fattori che possono influenzare la produzione di metano, il miglioramento dell'efficienza con cui l'animale utilizza l'alimento è sicuramente uno dei più importanti obiettivi per l'intero comparto zootecnico.

La riduzione della produzione di metano, adottando metodi nutrizionali, si fonda su tre approcci base (Knapp *et al.*, 2014):

1. L'uso di ingredienti alimentari modificano il rapporto degli AGV prodotti nel rumine.
2. Aumento della frequenza di passaggio ruminale causando una digestione parziale a livello intestinale, con conseguente alterazione delle popolazioni microbiche e della loro produzione di AGV.
3. Utilizzo di diete caratterizzate da una migliore qualità per aumentare la produzione di latte per vacca.

1. I componenti dei mangimi forniscono i substrati per la fermentazione microbica: le differenze di digeribilità e di composizione chimica dei mangimi alterano la quantità di energia estratta dai microrganismi, il rapporto tra AGV e conseguentemente la produzione di metano.

La proporzione degli AGV influenza la quantità di metano prodotto, in quanto la formazione di propionato, come visto precedentemente, consuma la quantità di idrogeno, mentre la formazione di acetato e butirato genera H₂ responsabile della metanogenesi (Knapp *et al.*, 2014). In generale, quindi, qualsiasi componente della dieta che provochi uno spostamento a favore della produzione di propionato determina una riduzione della produzione di metano per unità di alimento fermentato. Anche la degradazione delle proteine del rumine e l'assimilazione di queste sotto forma di proteina microbica può provocare un consumo o una produzione di H₂. Anche la bioidrogenazione degli acidi grassi si traduce in un consumo di H₂.

2. La frequenza di passaggio ruminale influenza il grado di digestione, la formazione di AGV e la crescita microbica; come riportato da Knapp *et al.* (2014) un cambiamento del passaggio ruminale degli alimenti può determinare una variazione del 28% delle emissioni di metano. Ad esempio, l'uso di alimenti by-pass determina una minore fermentazione ruminale e quindi una minore produzione di CH₄ per unità di alimentazione, in relazione al tratto dell'apparato digerente nel quale avviene la digestione dei nutrienti.

3. L'utilizzo nella dieta di alimenti di alta qualità determina un aumento dell'efficienza e della produttività degli animali: questo provoca una diminuzione delle emissioni di CH₄ per unità di prodotto. Diete di elevata qualità (più digeribili o a maggior contenuto energetico) contengono elevate proporzioni di amido rispetto al NDF (Fibra Neutra Detersa), con conseguente riduzione delle emissioni di metano per unità di amido digerito. A titolo di esempio Leng (1993) ha stimato che il 75% delle emissioni di CH₄ deriva da ruminanti al pascolo alimentati con foraggi di bassa qualità.

Inoltre la qualità del foraggio può essere migliorata utilizzando foraggio giovane, non disidratato, non trattato chimicamente, proveniente da specie vegetali che hanno una digeribilità superiore.

È inoltre opportuno effettuare una corretta conservazione degli alimenti destinati al bestiame, optando preferibilmente per l'insilamento (Janssen, 2010). In generale, foraggi di migliore qualità otterranno una maggiore proporzione di NSC (Carboidrati Non Strutturali) rispetto a NDF e comunque la quota di NDF sarà meno lignificata (Moss *et al.*, 2000; Boadi *et al.*, 2004).

Queste alterazioni sulla digeribilità, sulle proporzioni di AGV, e sulla crescita microbica influenzano l'energia e la disponibilità delle proteine per la vacca e quindi influenzano anche l'efficienza con cui i nutrienti sono utilizzati per le funzioni produttive, tra cui la crescita e la sintesi del latte (NRC, 2001).

Sulla base di questi tre principi, le emissioni di CH₄ possono essere manipolate agendo su diversi ambiti (Knapp *et al.*, 2014; Hristov *et al.*, 2014):

- Livello di ingestione.
- Tipologia di foraggi, rapporto foraggi/concentrati e conservazione.
- Trattamento degli alimenti.
- Alimenti miscelati e frequenza di alimentazione.
- Alimentazione di precisione e analisi degli alimenti.
- Utilizzo di additivi alimentari.

Livello di ingestione

L'assunzione di alimenti è una variabile importante nel predire le emissioni di CH₄.

Come indicato da Johnson *and* Johnson (1995), aumentando l'ingestione, diminuisce la perdita di metano espressa in percentuale rispetto all'energia lorda ingerita. Per ogni unità percentuale di ingestione, il metano diminuisce di circa l'1,6%.

Il risultato è conseguente all'aumento della velocità di passaggio dell'alimento nel rumine: come risultato della maggior frequenza di passaggio, l'azione dei microrganismi diminuisce e, a sua volta, si riduce anche il tasso di fermentazione ruminale della dieta (Boadi *et al.*, 2004). Inoltre, un passaggio rapido dell'alimento favorisce la produzione di propionato a scapito degli altri due AGV.

Tuttavia, la misura in cui il livello di ingestione influisce sulla frequenza di passaggio degli elementi grossolani è inferiore rispetto all'uso di concentrati o di diete miste. Infatti quando quest'ultime contengono meno del 25% di concentrati, l'effetto dell'ingestione è limitato (Boadi *et al.*, 2004). Benchaar *et al.*, (2001) hanno osservato un incremento di emissioni di metano all'aumentare del livello di sostanza secca delle diete, indipendentemente dalla tipologia di alimenti utilizzati.

Tipologia di foraggi, rapporto foraggi/concentrati e conservazione

Nei ruminanti, la produzione di metano tende ad aumentare proporzionalmente con la maturità del foraggio in relazione al maggior contenuto in lignina di questo alimento (Janssen, 2010). Come già sottolineato, il miglioramento della digeribilità e della qualità della fibra può determinare un'ottimizzazione della produttività dell'animale. Altro fattore che influenza la fermentazione ruminale è la tipologia di foraggi: infatti, l'uso di leguminose nella dieta determina una produzione generalmente inferiore di metano rispetto all'uso di graminacee (Boadi *et al.*, 2004). A questo proposito, in uno studio condotto da Benchaar *et al.* (2001), è stato rilevato una diminuzione del 21% del metano prodotto con la sostituzione del fieno con l'erba medica: tale effetto è stato amplificato con l'aumento dell'ingestione animale, fino a raggiungere una diminuzione di emissione di questo gas del 40% per unità di sostanza secca ingerita (Johnson *and* Johnson, 1995).

In generale, l'inclusione nella dieta di una maggiore quantità di fibra rispetto ai concentrati determina una maggiore produzione di idrogeno e quindi di metano a livello ruminale: infatti, in una meta-analisi condotta da Bannink *et al.* (2008), è stato riportato che la fermentazione degli zuccheri e degli amidi spostano la fermentazione ruminale verso la produzione di propionato con una conseguente riduzione del pH ruminale. Aumentare la quantità di concentrati nella dieta dal 52 al 72%, può provocare un aumento del 59% di propionato nel rumine ed un calo del 44% del

rapporto tra acetato e propionato nelle vacche da latte in lattazione (Bannink *et al.*, 2008). Infatti, i carboidrati strutturali, come la cellulosa e la emicellulosa, se sottoposti a fermentazione ruminale, liberano acido acetico, acido butirrico e H₂, il quale rappresenta il substrato principale utilizzato dai metanogeni per la produzione di metano: al contrario, utilizzando una dieta ricca di concentrati si ha una maggiore produzione di propionato, con conseguente consumo di H₂ che viene quindi sottratto ai batteri metanogeni (Janssen, 2010). Inoltre, il propionato agisce direttamente sulla diminuzione del pH con conseguente inibizione dei protozoi e batteri metanogeni (Knapp *et al.*, 2014).

Va ricordato, però, che un uso eccessivo di concentrati potrebbe causare dei disturbi digestivi dovuti all'eccessivo abbassamento del pH ruminale, quali l'acidosi subclinica o clinica: questi disturbi possono provocare l'insorgenza di infiammazioni a livello mammario, articolare e uterino così come di chetosi e febbre da latte (Tamminga *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda la tipologia di conservazione del foraggio, la produzione di metano (in percentuale sull'energia lorda) risulta essere inferiore quando i foraggi vengono insilati rispetto a quando vengono essiccati: questo perché, durante il processo di insilamento, avvengono la maggior parte delle fermentazioni riducendo quindi quelle a livello ruminale (Boadi *et al.*, 2004). Infatti è stato osservato che le fermentazioni ruminali di diete basate sull'utilizzo di insilati è caratterizzata da una maggiore percentuale di propionato ed una percentuale inferiore di acetato rispetto alle diete a base di fieno. Benchaar *et al.* (2001) hanno osservato una diminuzione del metano di circa il 33% in relazione all'utilizzo di insilati di erba medica rispetto al fieno di erba medica.

Trattamento degli alimenti

I trattamenti termici come la pellettatura, l'estrusione e la tostatura possono cambiare il processo di degradazione delle proteine e dei carboidrati, diminuire la digeribilità della fibra e ridurre le emissioni di metano da parte dell'animale come risultato di un aumento della velocità di passaggio ruminale (Johnson *et al.*, 1996; Moss *et al.*, 2000) e di una diminuzione del rapporto acetato/propionato (Boadi *et al.*, 2004). A questo proposito, come riportato da Knapp *et al.* (2014), l'uso della pellet in elevate proporzioni nella dieta degli animali ha determinato una diminuzione delle emissioni di metano per unità di ingestione del 20-40%. La bassa digeribilità della fibra diminuisce, infatti, la quantità di sostanza organica disponibile nel rumine e il rapido passaggio dell'alimento associato alla pellettatura determina la diminuzione della produzione di metano. Questi effetti sono più pronunciati negli animali alimentati *ad libitum* rispetto a quelli in cui l'ingestione è limitata (Knapp *et al.*, 2014). Tuttavia la riduzione di metano può non essere così elevata da giustificare la spesa di energia supplementare e il probabile aumento della produzione di gas serra associate alla pellettatura degli alimenti (Boadi *et al.*, 2014).

Passando ad altri trattamenti degli alimenti, la macinazione fine di foraggi non ha dimostrato essere una soluzione ideale negli allevamenti di vacche da latte, a causa di una maggiore incidenza di dismetabolie e del minor contenuto di grasso nel latte (Boadi *et al.*, 2014).

Infine, Johnson *et al.* (1996) hanno osservato che riducendo il rapporto acetato/propionato il trattamento alcalino di paglia di cereali, l'emissione di metano può diminuire del 10% circa.

Alimenti miscelati e frequenza di alimentazione

Le razioni miscelate possono dare vantaggi per quanto riguarda la riduzione delle emissioni di metano, dal momento che tendono a stabilizzare i microrganismi ruminali (FAO, 2013).

Per quanto riguarda invece la frequenza dei pasti giornalieri, una riduzione tende ad aumentare la produzione di propionato a scapito dell'acetato, diminuendo quindi la produzione di metano nelle vacche da latte: questo effetto è associato all'inibizione dei batteri metanogeni a causa delle notevoli oscillazioni di pH ruminale (Boadi *et al.*, 2004). Tuttavia gli allevatori tendono, al contrario, ad aumentare la frequenza di alimentazione delle vacche da latte per ridurre le fluttuazioni giornaliere del pH ruminale, per garantire un'efficiente funzionalità ruminale e quindi un aumento della produzione di latte.

Alimentazione di precisione e analisi degli alimenti

L'alimentazione di precisione avrebbe probabilmente un effetto indiretto sull'emissione di metano attraverso il mantenimento di un ambiente ruminale stabile e massimizzando la sintesi proteica microbica, che è importante per ottimizzare l'efficienza di alimentazione e di conseguenza diminuire la produzione di metano. Infatti a parità di produzione di metano, l'aumento della produzione di latte consente di ridurre l'emissione di metano per kg di latte prodotto e tende quindi a ridurre l'impatto ambientale del settore lattiero-caseario. Tutte le strategie che consentono di aumentare i livelli produttivi degli animali hanno quindi una ripercussione positiva nel ridurre l'impatto ambientale dei ruminanti in termini di emissione di gas serra.

A titolo di esempio, un'analisi accurata della composizione dell'alimento è un passo fondamentale nel processo di alimentazione di precisione. Attualmente tecnologie di analisi degli alimenti, come ad esempio la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS), rappresentano uno strumento ideale per l'analisi della qualità dei componenti di grano, semi oleosi e foraggi. La velocità e il basso costo delle analisi tramite il NIRS, rende possibile l'acquisto di ingredienti base di alta qualità, formulando razioni di precisione per soddisfare le esigenze nutrizionali degli animali (Hristov *et al.*, 2014).

Utilizzo di additivi alimentari

Esistono un'ampia varietà di additivi che possono essere somministrati per ridurre le emissioni di metano: questi sono classificati in base al meccanismo d'azione. Gli additivi possono provocare un'inibizione diretta dei batteri metanogeni e quindi della metanogenesi e la soppressione dei protozoi ciliati, fornendo o stimolando un percorso competitivo per l'utilizzo dell' H_2 nel rumine (Knapp *et al.*, 2014).

Come proposto da Hristov *et al.* (2014), gli additivi utilizzati nell'alimentazione dei ruminanti come fattori di riduzione dell'emissione di metano sono i seguenti:

- **Integrazione lipidica:**

I grassi sono aggiunti nella dieta delle vacche da latte per aumentare la componente energetica, migliorare la produzione e modificare la composizione di acidi grassi del latte. L'aggiunta di lipidi nella dieta è tra le strategie alimentari più efficaci che hanno dimostrato ridurre la produzione di metano (Boadi *et al.*, 2004). In particolare, è stato dimostrato che gli acidi grassi a catena media (C8-C16) causano la maggiore riduzione della produzione di CH_4 (Dohme *et al.*, 2000).

Le differenze nella risposta della produzione metano dovuta all'aggiunta di grassi può essere dovuto alla tipologia e alla loro disponibilità nel rumine: Dohme *et al.* (2000), utilizzando grassi protetti nella dieta, non hanno osservato differenze in termini di metanogenesi. L'uso di acidi grassi saturi (es. olio di cocco) ha avuto un effetto tossico sui protozoi e sui batteri metanogeni a causa di interferenze con la funzionalità della loro membrana cellulare (Boadi *et al.*, 2004). L'integrazione lipidica permette anche di inibire prevalentemente i batteri fibrolitici: questa strategia si rivela importante soprattutto quando viene somministrata molta fibra nella dieta con conseguente elevata produzione di metano (Brask *et al.*, 2013).

La depressione nella produzione di CH_4 con aggiunta di grassi insaturi è stata attribuita al fatto che questi possono servire come accettori di elettroni durante la bioidrogenazione nel rumine (McAllister *et al.*, 1996): la bioidrogenazione utilizza, in una via alternativa alla metanogenesi, l' H_2 formato nel rumine per saturare gli acidi grassi insaturi; il risultato è la riduzione di substrato disponibile per i metanogeni con effetto limitante nei confronti della metanogenesi (Johnson *and* Johnson, 1995).

Il problema principale associato all'eccessiva aggiunta di grassi (oltre il 5-6% della razione) è che questi possono limitare la degradazione della fibra nel rumine e ridurre il contenuto di grasso nel latte (Boadi *et al.*, 2004). Come riportato da Hristov *et al.* (2014), in alcuni studi i lipidi hanno avuto un impatto negativo sull'appetibilità della razione con conseguente calo dell'ingestione e della produttività dell'animale. Come già accennato, un altro fattore

importante da tenere in considerazione è che l'uso dei lipidi determina spesso una riduzione della materia grassa del latte, in particolare se si combinano i lipidi con altre strategie di mitigazione della produzione di metano come gli ionofori (Hristov *et al.*, 2014).

- Inibitori:

Gli inibitori sono composti chimici con uno specifico effetto inibitorio sugli archeobatteri del rumine. Il 2-bromo-etano-sulfonato (BES) è un potente inibitore della metanogenesi perché è un analogo strutturale del coenzima M utilizzato dai batteri metanogeni (Hristov *et al.*, 2014). Dato che il coenzima M si trova solo nei batteri metanogeni, il BES funziona come un inibitore specifico. Come riportato da Boadi *et al.* (2004) il BES deprime la produzione di metano fino al 71% senza alterare in modo significativo la digeribilità della materia organica e le concentrazioni di AGV nel rumine. La riduzione del CH₄ è stato attribuito all'effetto tossico del BES per i batteri metanogeni. Tuttavia, uno studio *in vivo* ha mostrato che anche se il BES ha depresso efficacemente la produzione di metano, la sua efficacia ha avuto una durata temporanea (tre giorni dall'inizio del trattamento), suggerendo un adattamento della popolazione microbica al BES (Hristov *et al.*, 2014).

Altri composti come il cloroformio, il tetracloruro di carbonio, il cloruro di metilene e la ciclodestrina, sono stati identificati come efficaci inibitori della metanogenesi (Boadi *et al.*, 2004). Tuttavia, anche in questo caso, la microflora ruminale si adatta a questi composti, con scarsi effetti nel lungo periodo (Boadi *et al.*, 2004). In un recente studio condotto sugli ovini da Kung *et al.* (2003), l'aggiunta di 9,10-antrachinone nella dieta ha determinato una diminuzione della concentrazione di metano per tutto il periodo di trattamenti. Questo è stato il primo studio *in vivo* a dimostrare che il 9,10-antrachinone può parzialmente inibire la metanogenesi.

- Recettori di elettroni:

I principali composti ascrivibili a questo gruppo per il loro effetto anti-metanogenico sono il fumarato, i nitrati, i solfati, e il nitroetano (Hristov *et al.*, 2014).

Tuttavia anche nel caso di questi composti si è osservato un rapido adattamento dell'ecosistema ruminale. Inoltre, non sono ancora stati eseguiti degli studi *in vivo* a lungo termine, ad eccezione del nitrato utilizzato da Van Zijderveld *et al.* (2011): questi autori hanno osservato un costante calo della produzione di metano in bovine in lattazione durante il trattamento. Va detto però che il nitrato determina problemi legati alla produzione di ammoniaca e alla potenziale tossicità dei prodotti intermedi, come ad esempio i nitriti (Hristov *et al.*, 2014).

- Enzimi esogeni:

L'uso di enzimi esogeni (EXE), come ad esempio gli enzimi fibrolitici, sembra non avere effetti diretti sulla riduzione di metano, ma può migliorare la digeribilità della dieta e la produttività degli animali con il conseguente calo del metano prodotto per unità di produzione. Tuttavia gli studi condotti sono ancora insufficienti per dare un responso valido.

Inoltre alcuni enzimi come la xinalasi e l'endoglucanasi sembrano aumentare la produzione di metano per unità di sostanza secca (Hristov *et al.*, 2014).

- Alimentazione diretta microbica (DFM):

I DFM, prevalentemente lieviti, sono comunemente utilizzati come integratori nella produzione animale, in quanto possono stabilizzare il pH ruminale e produrre aminoacidi, peptidi e vitamine (Hristov *et al.*, 2014). Nei ruminanti viene prevalentemente utilizzato il *Saccharomyces cerevisiae* che induce la crescita di batteri acetogenici i quali utilizzano l'H₂ nel rumine, riducendo il substrato disponibile ai metanogeni (Newbold *and* Rode, 2006).

Altri utilizzi dei DFM come miglioratori della fermentazione ruminale includono l'inoculazione di batteri produttori o utilizzatori di lattato per promuovere lo sviluppo della microflora intestinale più desiderabile e stabilizzare il pH. Una meta-analisi condotta da Krehbiel *et al.* (2003) ha riportato effetti positivi nella salute dei bovini giovani trattati con vari DFM (principalmente a base di *Lactobacillus* e *Streptococcus* e in alcuni casi *Propionibacterium spp.*). Ci sono stati anche altri studi basati sull' inoculo nel rumine di funghi (*Candida kefir*) e batteri lattici (*Lactococcus lactis*), insieme ai nitrati, sia per ridurre la metanogenesi sia per prevenire la formazione di nitriti, ma non ci sono dati consistenti risultati attestanti l'efficacia dell'esperimento (Hristov *et al.*, 2014).

- Ionofori:

Gli ionofori sono sostanze altamente lipofile, in grado di proteggere e delocalizzare la carica degli ioni e facilitare il loro movimento attraverso le membrane (Boadi *et al.*, 2004). Lo ionoforo più comunemente usato è il monensin. Gli ionofori, che vengono aggiunti alle diete ruminanti per migliorare l'efficienza di utilizzo degli alimenti, hanno dimostrato diminuire efficacemente la produzione di metano e aumentare la produttività degli animali (Moss *et al.*, 2000): il risultato è associato alla riduzione selettiva di ruminococchi Gram-positivi, e la proliferazione dei batteri Gram-negativi (Boadi *et al.*, 2004).

Sebbene gli antibiotici abbiano effetti positivi per prevenire una malattia, prevenire disturbi metabolici e migliorare l'efficienza di alimentazione (Page, 2006), da gennaio 2006 è stato vietato nell'Unione Europea (direttiva 1831/2003 / CEE, della Commissione Europea, 2003) l'uso di antibiotici nei mangimi animali, a causa della comparsa di residui e ceppi batterici antibiotico-resistenti. Per questo motivo si è intensificata la ricerca e lo studio di prodotti naturali alternativi come mezzo per modulare la fermentazione ruminale e per migliorare l'efficienza del processo di digestione.

- Sostanze bioattive delle piante:

Come detto precedentemente, a seguito del divieto posto dall'UE relativamente all'uso degli antibiotici nell'alimentazione animale, è cresciuto l'interesse nei confronti dei prodotti vegetali naturali, la maggior parte dei quali sono classificati come GRAS (generalmente riconosciuti come sicuri) per il consumo umano (Kamra *et al.*, 2012).

Le piante producono una vasta varietà di composti organici derivati dal metabolismo secondario, che sembrano avere una funzione diretta nella loro crescita e sviluppo (Calsamiglia *et al.*, 2007). Nel corso degli anni queste sostanze sono state considerate prodotti di scarto del metabolismo primario. Tuttavia essi sono responsabili dell'odore e del colore delle piante e delle spezie, hanno importanti funzioni ecologiche come messaggeri chimici tra la pianta e l'ambiente e spesso mostrano attività antimicrobica contro una vasta gamma di batteri, lieviti e muffe. Ultimamente hanno suscitato particolare interesse per il loro potenziale nel miglioramento della fermentazione ruminale e sono state quindi utilizzate come additivo per mangimi per aumentare la produttività dell'animale e possibilmente ridurre le emissioni di metano (Cardozo *et al.*, 2005).

Questi metaboliti secondari sono difficili da classificare, perché le loro vie metaboliche di sintesi, le proprietà ed i meccanismi d'azione sono spesso sovrapposti. Tuttavia, vengono divisi in tre gruppi: le saponine, i tannini e gli oli essenziali.

Gli effetti ed i meccanismi d'azione delle saponine e dei tannini sulla fermentazione ruminale sono stati ampiamente studiati: questi hanno evidenziato un'attività anti-metanogenica nel rumine, in quanto inibiscono direttamente la crescita dei metanogeni e di protozoi (Patra e Saxena, 2010). Le saponine, inoltre, modificano il rapporto tra gli AGV diminuendo la percentuale di acetato e, in parte, di butirrato; va ricordato comunque che il loro effetto è correlato alla tipologia della dieta e al pH (Bodas *et al.*, 2012).

Come riportato da Hristov *et al.* (2014), è inoltre importante tenere presente che la riduzione del metano dovuta ai tannini non deve determinare effetti negativi sulla digestione e la

produzione: relativamente ad uno studio condotto in vacche da latte al pascolo, l'emissione di metano è stata ridotta fino al 30%, ma la produzione di latte si è ridotta di circa il 10%.

Gli oli essenziali sono un gruppo di composti secondari vegetali utilizzati come additivi naturali per i ruminanti, ottenuti dalla frazione volatile della pianta successivamente a distillazione a vapore (Calsamiglia *et al.*, 2007).

Gli oli essenziali possono svolgere un ruolo protettivo contro i batteri e i funghi. L'attività antimicrobica degli oli essenziali può essere attribuita all'azione di una serie di piccoli terpenoidi e composti fenolici (Wallace *et al.*, 2002).

I terpenoidi derivano da una struttura base costituita da 5 atomi di carbonio, chiamata unità isoprene e sono classificati sulla base del numero di queste unità nello scheletro. I fenilpropanoidi invece sono composti da una catena di 3 atomi di carbonio legati ad un anello aromatico di 6 atomi di carbonio (Patra e Saxena, 2006). I terpenoidi e i fenilpropanoidi sviluppano la loro azione contro i batteri attraverso l'interazione con la membrana cellulare (Calsamiglia *et al.*, 2007): una parte di questa attività è dovuta alla natura idrofoba degli idrocarburi ciclici, che consente loro di interagire con le membrane cellulari e accumularsi nel doppio strato lipidico dei batteri, occupando uno spazio tra le catene degli acidi grassi.

Questa interazione determina dei cambiamenti conformazionali nella struttura della membrana, con conseguente fluidificazione ed espansione (Griffin *et al.*, 1999). La perdita di stabilità di membrana provoca una fuoriuscita di ioni, determinando una diminuzione del gradiente ionico di transmembrana.

I batteri possono controbilanciare questi effetti utilizzando pompe ioniche, ma il loro sviluppo viene comunque rallentato (Griffin *et al.*, 1999). Nel rumine questo determina una riduzione della popolazione microbica ruminale causando variazioni nelle fermentazioni.

Questi meccanismi di azione sono più efficaci contro i batteri Gram-positivi, in cui la membrana cellulare può interagire direttamente con i composti idrofobici degli oli essenziali (Cimanga *et al.*, 2002). Al contrario, la parete cellulare esterna intorno alla membrana cellulare dei batteri Gram-negativi è idrofila e non permette l'ingresso di sostanze lipofile, e quindi della maggior parte degli oli essenziali (Cimanga *et al.*, 2002). Tuttavia, la membrana esterna dei batteri Gram-negativi non è completamente impermeabile alle sostanze idrofobiche, e alcune molecole a basso peso molecolare, come ad esempio il timo, possono interagire con l'acqua (attraverso ponti idrogeno), varcare la parete cellulare per diffusione attraverso lo strato di lipopolisaccaridi o tramite le proteine di membrana, e interagire con il doppio strato lipidico delle cellule (Griffin *et al.*, 1999).

Sebbene l'azione principale degli oli essenziali come antimicrobici sembra essere centrata nella sua attività sulla membrana cellulare, questo non è l'unico meccanismo di azione.

Come indicato da Calsamiglia *et al.* (2007) gli oli essenziali hanno anche la capacità di coagulare alcuni costituenti cellulari per la denaturazione delle proteine. Numerosi studi hanno anche riportato la capacità di alcuni composti fenolici e non fenolici degli oli essenziali di interagire con i gruppi chimici delle proteine e gli enzimi. In generale, i fenoli interagiscono con proteine attraverso ponti idrogeno e interazioni ioniche o idrofobe; i composti non fenolici, invece, interagiscono attraverso un altro gruppo funzionale, come il gruppo carbonilico del cinnamaldeide. Altri composti aldeidici possono anche interagire con gli acidi nucleici e le proteine, con conseguente loro inattivazione (Calsamiglia *et al.*, 2007).

L'olio essenziale presente nell'aglio è un caso particolare, perché molti composti di questo olio non si trovano in tutta la pianta, come la maggior parte degli altri oli essenziali, ma sono prodotti da tiosolfati durante il trattamento a vapore della pianta stessa (Calsamiglia *et al.*, 2007).

L'aglio è molto attivo contro una vasta gamma di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, funghi, parassiti e virus. La sua attività antimicrobica è dovuta a diversi meccanismi di azione, tra cui l'inibizione della sintesi di RNA, DNA e di proteine della cellula (Feldberg *et al.*, 1988).

Tuttavia, il principale meccanismo antimicrobico sembra essere correlato alla sua capacità di interagire con i gruppi sulfidrilici (-SH) di altri composti attivi (Calsamiglia *et al.*, 2007). Infatti, molti studi hanno riportato che l'attività antimicrobica del solfuro di allile, uno dei principali composti dell'aglio, aumenta alla presenza di atomi di zolfo, e che l'attività antimicrobica dell'olio di aglio è più potente dell'attività dei suoi principali composti presi singolarmente, dimostrando che l'effetto antimicrobico è il risultato dell'interazione tra i diversi componenti (Ross *et al.*, 2001; Busquet *et al.*, 2005).

1.3 Aglio come additivo nella dieta dei ruminanti

L'aglio (*Allium sativum*, appartenente all'ordine *Asparagales* e della famiglia *Alliaceae*) è una pianta da cui derivano diversi metaboliti secondari, quali l'alicina ($C_6H_{10}S_{20}$), il solfuro di allile ($C_6H_{10}S$), il disolfuro di diallile ($C_6H_{10}S_2$) e l'allile mercaptano (C_3H_6S).

Quando utilizzato nelle prove sperimentali come aggiunta nella dieta delle vacche da latte, l'aglio è stato somministrato sotto forma oleosa. L'olio di aglio è una miscela di un gran numero di molecole differenti che si trovano direttamente nella pianta o come risultato dai cambiamenti che si verificano durante la sua lavorazione; tra queste ultime molecole si annoverano i composti sulfurei

(tiosulfonati come allicina, sulfidi, solfossidi della cisteina e peptidi non volatili del tipo gamma-glutamilcisteina.), gli enzimi, gli aminoacidi liberi, gli steroli, gli steroidi, i glicosidi triterpeni, flavonoidi, i fenoli ed i composti organosolfuri (Lawson, 1996).

L'aglio è noto per le sue proprietà terapeutiche (antiparassitarie, insetticide, antitumorali, antiossidanti, immunomodulanti, anti-infiammatorie, ipoglicemiche), ma recentemente è stato utilizzato in diversi studi come modulatore delle fermentazioni ruminanti in considerazione della sua attività antimicrobica contro un ampio spettro di batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Calsamiglia *et al.*, 2007).

In studi condotti sul fluido ruminale *in vitro*, Busquet *et al.* (2005) hanno mostrato che l'olio di aglio riduce le proporzioni di acetato, aumenta quelle di propionato e butirato e riduce il rapporto CH₄:AGV da 0,20 a 0,05.

In particolare, l'olio di aglio nel suo complesso e dei due suoi estratti (disolfuro di diallile e allile mercaptano), hanno ridotto le proporzioni di acetato e metano e aumentato la quantità di propionato e butirato nella stessa misura: questo ha dimostrato che il disolfuro di diallile e allile mercaptano sono i responsabili principali della maggior parte degli effetti dell'aglio come agente anti-metanogenico.

Al contrario gli altri suoi componenti allicina e solfuro di allile hanno effetti secondari sulla fermentazione microbica ruminale (Calsamiglia *et al.*, 2007).

L'attività antimicrobica dell'aglio è stata generalmente attribuita all'allicina (Amagase *et al.*, 2001). L'allicina deriva dall'allina, un aminoacido solforato sintetizzato a partire dalla cisteina, ricco nei tessuti mesofili e presente prevalentemente nel bulbo dell'aglio. L'enzima che degrada l'allina in allicina è anch'esso presente nel bulbo, ma è concentrato nella guaina del fascio vascolare e rimane separato dal substrato allina tramite le pareti cellulari che dividono i due tipi di tessuti. Quando il bulbo viene spezzettato, rotto o contuso, l'allina viene rilasciata ed interagisce con l'enzima allinase presente nei vacuoli adiacenti. Il contatto tra allina e allinase porta alla formazione di intermedi reattivi che si uniscono velocemente a formare vari tiosulfonati tra cui l'allicina. Tuttavia l'allicina è una molecola volatile, molto reattiva che viene rapidamente convertita in altri composti come solfuro di allile, disolfuro di diallile, trisolfuro di diallile, vinil ditiine e ajoene (Lawson, 1996; Amagase *et al.*, 2001).

L'aglio sembra incidere anche sul metabolismo dell'azoto, con effetti variabili a seconda dei componenti considerati.

Cardozo *et al.* (2004) hanno riportato che l'olio di aglio riduce il livello di azoto ammoniacale, aumenta i peptidi e le concentrazioni di aminoacidi azotati, dimostrando che attraverso l'uso dell'aglio viene inibita la deaminazione.

Ferme *et al.* (2004) hanno mostrato che l'aglio modifica la popolazione microbica riducendo la quantità dei batteri proteolitici *Prevotella* (principalmente *Prevotella ruminicola* e *Prevotella bryantii*) a livello ruminale. I batteri *Prevotella* sono principalmente responsabili della degradazione delle proteine e della deaminazione degli aminoacidi.

Tuttavia la riduzione della deaminazione può essere anche dovuta ad una riduzione della disponibilità delle deidrogenasi (responsabili della deaminazione) nel caso in cui gli inibitori del metano vengano utilizzati (Hino *and* Russell, 1985): ciò può spiegare la lieve riduzione della deaminazione degli aminoacidi osservata con l'utilizzo nella razione di olio di aglio. Essendo la *Prevotella ruminicola* responsabile della degradazione della componente proteica a scheletro carbonioso che è utilizzato dai batteri acetogenici, protozi e miceti con produzione di AGV, H₂ e CO₂ nella seconda fase della metanogenesi, la loro inibizione determina una minore quantità di substrato disponibile ai batteri metanogeni, e quindi una minor quantità di metano emesso.

L'effetto anti-microbico dell'aglio è correlato anche al pH ruminale, probabilmente in relazione allo stato dissociato (idrofilico) o indissociato (idrofobico) delle molecole. Quando il pH ruminale diminuisce, le molecole dell'aglio tendono ad essere maggiormente in forma indissociata, interagendo con il doppio strato lipidico della membrana cellulare dei batteri ed esplicando il proprio effetto antimicrobico (Calsamiglia *et al.*, 2007).

L'effetto anti-metanogenico dell'aglio e dei suoi componenti è dato dall'inibizione dei microrganismi ruminali *Archaea*, i quali possiedono un'unica membrana lipidica contenente glicerolo legato a due isoprenoidi che garantiscono la stabilità della membrana (De Rosa *et al.*, 1986). La sintesi dell'isoprene (unità dell'isoprenoide) nei metanogeni *Archaea* è catalizzata dall'idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduttasi. L'aglio ed i suoi composti organosolfuri sono forti inibitori dell'HMG-CoA reduttasi e, quindi, la sintesi dell'isoprene è inibita: di conseguenza i metanogeni vengono inibiti a livello ruminale con conseguente riduzione di produzione di metano. Si pensa inoltre che l'aglio possa agire indirettamente riducendo il numero di protozoi ruminali e diminuendo l'H₂ disponibile per la formazione di metano (Soliva, 2011).

Nonostante diversi studi indichino chiaramente che potenzialmente l'aglio può essere utilizzato come additivo nei mangimi per la modifica dell'ecosistema microbico ruminale al fine di ridurre le emissioni di metano, bisogna considerare gli eventuali aspetti negativi legati al suo uso.

In particolare possono essere individuati quattro limitazioni nell'uso dell'aglio come additivo alimentare:

- Come mostrato precedentemente, i risultati in letteratura non permettono di identificare la modalità d'azione specifica dell'aglio e delle sue componenti. Infatti, si possono trovare

notevoli differenze tra le parti della pianta utilizzate e soprattutto il diverso trattamento subito prima del loro uso nella dieta degli animali (Flachowsky *and* Lebzien, 2012).

- La maggior parte degli studi relativi all'effetto dell'aglio a livello ruminale sono stati condotti *in vitro*, dove le incubazioni solitamente hanno una durata limitata di alcune ore/giorni. Si dovrebbe quindi confermare la sua azione e durata *in vivo*, convertendo il dosaggio da $\mu\text{g/ml}$ in g/kg di sostanza secca assunta dall'animale, in modo da valutare la reale commestibilità dell'additivo e verificare la persistenza del suo effetto nel lungo periodo senza adattamento della popolazione microbica alle sostanze integrate (Bodas *et al.*, 2012; Knapp *et al.*, 2014).
- L'allicina è il componente dell'aglio responsabile del suo odore pungente. Essendo un composto volatile, la possibilità di trasferirsi nei prodotti animali è elevata. Inoltre questo componente può dare problemi di appetibilità della razione (Flaschowsky *and* Lebzien, 2012).
- Occorre valutare anche l'eventuale impatto economico dovuto all'impiego dell'aglio nella razione, in relazione alla possibile diminuzione della produzione o dell'effetto sulla salute dell'animale. Inoltre vanno considerati i costi dell'additivo stesso, soprattutto se vengono utilizzati i suoi componenti specifici (Knapp *et al.*, 2014).

1.3.1 Effetto dell'aglio sulla produzione di latte nelle vacche da latte

Le piante producono una vasta varietà di metaboliti secondari che hanno un potenziale antimicrobico nei confronti di certi ceppi microbici ruminali (Beenchar *et al.*, 2008).

L'aglio, in particolare, se inserito nelle diete di ruminanti ha dimostrato diminuire il rapporto acetato/propionato nel rumine, aumentando l'efficienza delle fermentazioni ruminali e riducendo le emissioni di metano (Yang *et al.*, 2007). Inoltre, in un recente studio indonesiano condotto da Caribu *et al.* (2016), l'aggiunta di aglio con altri minerali organici come selenio, cromo e zinco nella dieta delle vacche da latte, ha mostrato effetti benefici per quanto riguarda l'efficienza di utilizzo dell'alimento e della produttività.

In particolare la integrazione nella dieta di estratti dell'aglio e minerali organici ha determinato un incremento significativo della produzione di latte, dimostrando che la combinazione dei due elementi è in grado di favorire la sintesi del prodotto (Caribu *et al.*, 2016). Il selenio, inoltre, può proteggere le cellule secernenti delle ghiandole mammarie dai radicali liberi prodotti durante il metabolismo, garantendo la loro integrità. Il cromo, invece, può incrementare i recettori di insulina nelle cellule secernenti delle ghiandole mammarie, determinando un maggior legame con il

glucosio e quindi una sua maggiore concentrazione: essendo il glucosio il precursore della sintesi del lattosio, la produzione di latte aumenta (Prayitno *et al.*, 2014).

L'attività antibatterica dell'aglio permette invece di ridurre la quantità delle cellule somatiche fino al 41% (Caribu *et al.*, 2016). Il numero di cellule somatiche è un buon indicatore dello stato sanitario della mammella, in particolare per quanto riguarda la eventuale presenza di mastite subclinica.

Inoltre, l'aumento della produzione di latte legata all'utilizzo di aglio nella dieta delle bovine da latte può essere legata alla sua attività anti-metanogenica, in quanto sembra poter favorire l'utilizzo dell'energia della dieta, che verrebbe dissipata sotto forma di metano durante le fermentazioni ruminali, in energia per produrre latte (Caribu *et al.*, 2016). A titolo di esempio, nei paesi tropicali come l'Indonesia, dove la maggior parte dei mangimi sono carenti di minerali, la combinazione dell'aglio con minerali organici sembra possa aumentare l'efficienza energetica e la produzione di latte (Caribu *et al.*, 2016).

1.4 Effetti benefici dell'aglio per l'uomo

I metaboliti secondari delle piante tradizionalmente hanno un ruolo importante per la salute umana (Benchaar *et al.*, 2008). Utilizzati per la loro essenza, il loro sapore e la proprietà antibatterica, le piante ed i loro estratti sono stati utilizzati dall'uomo fin dall'antichità (Burt, 2004).

La medicina a base vegetale era ampiamente praticata fino al ventesimo secolo, diminuita poi a causa dell'introduzione di farmaci sintetici innovativi ed efficaci, più economici e con benefici più rilevanti per la salute umana (Greathead, 2003).

Negli ultimi anni, tuttavia, la comparsa di batteri resistenti a più farmaci con conseguente rischio per la salute, fatto crescere nuovamente l'interesse nei confronti degli estratti vegetali ad uso terapeutico.

- Effetto antimicrobico dell'aglio:

L'aglio ha diverse proprietà officinali, ma la sua attività antimicrobica contro alcuni patogeni rappresenta l'aspetto sicuramente più interessante e, per questo motivo è molto studiato a livello di ricerca scientifica.

Le proprietà antimicrobiche dell'aglio sono il risultato diretto dell'allicina prodotta dallo schiacciamento dell'aglio crudo, la cui azione, però, viene ridotta con la cottura o la bollitura (Sato *and* Mitaya, 2000).

L'aglio è un agente antimicrobico naturale efficace contro diversi batteri (*Bacillus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*), funghi, lieviti, piccoli insetti e parassiti. Diversi esperimenti condotti *in vitro* hanno dimostrato la diminuzione di alcuni batteri importanti come *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiellapneumoniae* alla presenza di estratti di aglio fresco (Farbman *et al.*, 1993; Ankri and Mirelman, 1999).

Il principale effetto anti-microbico dell'allicina è dovuta alla sua interazione ossidativa con importanti enzimi contenenti il tiolo (Kamra *et al.*, 2012). L'attività antimicrobica dei composti fenolici estratti dall'aglio contro i batteri (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis*) e funghi (*Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Fusarium oxysporum*) ne fa di questo prodotto un conservante alimentare (Kamra *et al.*, 2012). Ross *et al.* (2001) hanno comparato la proprietà antimicrobica dell'olio di aglio e dell'aglio in polvere contro gli agenti patogeni nel metabolismo umano: questi autori hanno evidenziato che i tiosulfinati dell'aglio in polvere hanno più potenzialità dei solfuri dell'olio di aglio, ma per combattere le infezioni intestinali l'olio di aglio è più efficace a causa della sua maggiore affinità alla cisteina.

Un certo numero di teorie sono state proposte per spiegare il meccanismo con cui l'aglio esercita la propria attività antibatterica. Come dimostrato in diversi studi riportati da Benchaar *et al.* (2008), il meccanismo con cui l'aglio interagisce con i batteri nel metabolismo umano è il medesimo descritto nel caso dei ruminanti, in quanto l'aglio interagisce sulla membrana cellulare dei batteri, alterando anche il trasporto di elettroni, i gradienti ionici, la traslocazione di proteine, la fosforilazione ed altre reazioni enzimatiche-dipendenti (Ultee *et al.*, 1999; Dorman and Deans, 2000).

- L'aglio come agente anti-colesterolo:

Una recente ricerca ha evidenziato un effetto inibente dell'aglio sull'attività dell'enzima idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduttasi e suggerisce una possibile azione anticolesterolo di questo alimento in quanto l'enzima è il responsabile della produzione di colesterolo negli esseri umani (Kamra *et al.*, 2012).

- L'aglio come prebiotico:

L'aglio sembra agire anche come prebiotico in quanto stimola i microrganismi intestinali positivi che consentono di migliorare l'ecosistema microbico. Infatti, l'aglio, oltre ai composti volatili, è una ricca fonte di inulina, un oligomero del fruttosio e un prebiotico molto efficace (Kamra *et al.*, 2012). L'inulina non è degradata nel tratto gastrointestinale ed è quindi

disponibile come substrato per la microflora dell'intestino crasso. Diversi studi hanno dimostrato l'effetto stimolante dell'inulina sul *Biofidobacterium* ed il mantenimento di bassi livelli di agenti patogeni, come ad esempio *Escherichia coli* e *Clostridium* (Wang and Gibson, 1993).

- Proprietà antitrombotiche e antitumorali:

Sono stati condotti diversi studi relativamente al potenziale antitrombotico dell'aglio, identificando il trisolfuro metile di allile, estratto dall'olio di aglio, come il principio più attivo per l'inibizione dell'aggregazione piastrinica. Gli altri composti solfurei dell'olio di aglio (per esempio dimetil trisolfuro e diallil trisolfuro) hanno mostrato una minore azione inibitoria verso l'aggregazione piastrinica (Ariga and Seki, 2006).

L'efficacia dell'aglio contro il cancro è stato riconosciuto da molti ricercatori: i recenti studi epidemiologici sul rapporto tra il consumo aglio e l'incidenza di tumori hanno dimostrato una relazione reciproca soprattutto nei confronti di questa malattia a livello dello stomaco e del colon-retto. Studi effettuati specificatamente a tali tumori indicano un effetto protettivo dell'aglio crudo o cotto sullo stomaco e sul colon-retto, se somministrato in elevate quantità (Ariga and Seki, 2006). Infatti i composti solforati derivati dall'aglio, in particolare solfuri di allile, sono noti per essere responsabili del potenziale anti-carcinogenico dell'aglio (Wang *et al.*, 2012). Infine, uno studio riportato da Wang *et al.* (2012) ha evidenziato che l'aglio può avere un effetto positivo inibendo la formazione di nitrosamine a livello intestinale (potenti composti cancerogeni che si formano durante la digestione).

1.4.1 Integrazione dell'aglio nei prodotti lattiero-caseari

Se l'aglio infatti, è ampiamente utilizzato in tutto il mondo come medicinale per i suoi notevoli effetti benefici, nel settore lattiero caseario il suo utilizzo è ancora fortemente limitato. Questo prodotto trova un suo utilizzo nei paesi in via di sviluppo, dove la preparazione del latte e la lavorazione dei prodotti lattiero-caseari vengono svolte in condizioni antigieniche (Regu *et al.*, 2016). Per questo motivo i piccoli produttori nei Paesi più poveri usano conservanti naturali per migliorare la qualità del latte e dei prodotti lattiero-caseari. Come indicato da Mishra and Behal (2010), i conservanti naturali come l'aglio possono essere delle valide alternative ai conservanti chimici utilizzati nelle varie industrie alimentari per migliorare la durata di conservazione degli alimenti.

Per ragioni differenti, l'aglio è stato utilizzato come integratore nello yogurt per migliorare i valori nutrizionali rispetto allo yogurt bianco (Qureshi *et al.*, 2011): in questo studio l'utilizzo dell'aglio ha migliorato il valore di grasso, acidità, solidi totali, lattosio e proteina; in particolare il contenuto proteico della polvere di aglio migliora la qualità dello yogurt.

Si può dedurre, inoltre, che l'aglio può avere un effetto significativo su tutti i microrganismi presenti nello yogurt. La pastorizzazione, durante la produzione dello yogurt, elimina la maggior parte dei microrganismi, ma alcuni di essi sono in grado di sopravvivere. Con l'applicazione dell'aglio, invece, i microrganismi presenti nello yogurt sembra possano essere ridotti drasticamente (Adewumi *and* Idowu, 2014). Questo è attribuito alla capacità dell'aglio di inibire molte specie batteriche, lieviti, funghi e virus. Tuttavia, dato l'odore pungente dell'aglio dovuto alla presenza dell'allicina, la sua integrazione influisce sulla qualità organolettica dei prodotti finali, conferendo un sapore acido e piccante, non gradevole a tutti (Adewumi *and* Idowu, 2014). A tal riguardo la maggior parte dei consorzi di produzione del latte (Parmigiano Reggiano, grana Padano, Trentingrana, etc.) vietano l'impiego di aglio e di aglio selvatico nell'alimentazione delle vacche e spesso prevedono forti multe ai trasgressori.

2. OBIETTIVI

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto dell'uso dell'aglio come additivo nella dieta di vacche da latte sui caratteri che definiscono la produzione e la qualità del latte (composizione chimica, acidità e cellule somatiche), sulle proprietà di coagulazione e sui caratteri che descrivono l'intero processo di caseificazione.

Nel considerare l'aglio naturale e i relativi estratti come sostanze in grado di interagire attivamente sulle dinamiche fermentative ruminanti riducendo le emissioni di metano, la finalità dello studio condotto è stata quella di valutare l'utilizzo dell'additivo *in vivo* senza compromettere i processi di produzione e la qualità dei prodotti ottenuti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno sperimentale

Nel periodo tra settembre e dicembre 2016 è stata condotta una prova sperimentale presso il Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali ed Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli Studi di Padova, con lo scopo di valutare l'effetto dell'aglio utilizzato nella dieta di vacche in lattazione sulla produzione, le caratteristiche qualitative e l'attitudine casearia del latte.

Il disegno sperimentale ha previsto uno schema a quadrato latino 4×4: sono state utilizzate 4 vacche in lattazione di razza Frisona tutte al secondo parto e con un intervallo dello stadio di lattazione tra 107 e 139 giorni.

Le bovine sono state alimentate tramite unifeed (TMR): durante i quattro periodi sperimentali consecutivi, le 4 tesi sono state testate in modo rotazionale, per sottoporre tutte le vacche a tutti i trattamenti (Tabella 1). Questi 4 trattamenti hanno previsto l'unifeed: in assenza di aglio (controllo= CTR), integrato con aglio in polvere (A100 = 100 g/d/vacca; A400 = 400 g/d/vacca) o integrato con l'estratto dell'aglio solfuro di allile (ALL = 2 g/d/vacca).

Tabella 1. Disegno sperimentale secondo lo schema a quadrato latino 4×4¹

Periodo sperimentale	Durata giorni	Attività	Bovine in prova			
			Frisona 1	Frisona 2	Frisona 3	Frisona 4
1	7	Transizione				
	14	Trattamento	CTR	A100	A400	ALL
2	7	Transizione				
	19	Trattamento	ALL	CTR	A100	A400
3	5	Transizione				
	16	Trattamento	A400	ALL	CTR	A100
4	4	Transizione				
	13	Trattamento	A100	A400	ALL	CTR

¹CTR = dieta "controllo" senza somministrazione di additivi; A100 = dieta con aggiunta di 100g/d di aglio in polvere; A400 = dieta con aggiunta di 400 g/d di aglio in polvere; ALL = dieta con aggiunta di solfuro di allile.

Ciascun periodo sperimentale ha avuto la durata compresa tra 17 e 26 giorni: questo intervallo di tempo comprende i giorni di trattamento e anche i giorni di transizione per annullare l'effetto del periodo precedente, durante i quali tutte le bovine hanno ottenuto la dieta priva di additivo. Sia nei

periodi di transizione che di trattamento, la razione è stata ripartita in due pasti giornalieri: la prima parte somministrata alle 8.00 integrata o non integrata con aglio omologata alla stessa quantità per tutte e quattro le bovine, e la seconda parte alle 13.00 come completamento del pasto giornaliero. In questo modo è stato possibile assicurare la completa ingestione degli additivi durante la fase di trattamento. Durante i giorni di transizione, la quantità totale di unifeed è stata suddivisa a metà e distribuita nei due pasti quotidiani previsti. Per ottenere una stima più precisa del livello di ingestione, sono stati considerati anche gli eventuali residui alimentari trovati in corrispondenza dei box.

Durante la prova è stata utilizzata una dieta standard per bovine da latte costituita da insilato di mais, concentrato di mais-orzo, concentrato di girasole-soia, fieno di erba medica, fieno di prato, polpa di barbabietola da zucchero e altri additivi come riportato in Tabella 2 e Tabella 3.

Tabella 2. Composizione della dieta standard utilizzata nella presente prova sperimentale

Alimenti	Quantità, % SS
Insilato di mais	29,1
Mix energetico di mais – orzo	23,3
Mix proteico di girasole – soia	17,3
Fieno di erba medica	12,3
Fieno di prato	12,0
Polpa di barbabietola	3,7
Altri additivi	2,3

Tabella 3. Composizione chimica della dieta standard utilizzata nella presente prova sperimentale

Nutrienti	% SS
Amido	25,3
Proteina	13,0
NDF	37,5

L'aglio utilizzato (Aglio Bianco Polesano) è una varietà locale riconosciuta come DOP, mentre il solfuro di allile è stato acquistato dalla ditta Sigma-Aldrich Chemical (Milano).

Per stimare la quantità di unifeed da distribuire, è stata utilizzata un'equazione proposta dall'NRC (2001) per il calcolo dei fabbisogni energetici di una bovina in lattazione.

Prima della distribuzione, l'aglio è stato pulito e macinato, mentre il solfuro di allile è stato inserito nella dieta direttamente nella sua forma liquida. Le tre integrazioni (100 g/d/vacca o 400 g/d/vacca di aglio e 2 g/d/vacca di solfuro di allile) prima dell'aggiunta alla razione tramite un erogatore a spruzzo, sono state diluite in 150 ml di acqua. Durante tutta la prova sperimentale sono stati raccolti 2 campioni di latte per ogni bovina rispettivamente durante la mungitura mattutina e serale.

Nell'ultima settimana di trattamento di ciascun periodo, in due giornate differenti non consecutive sono stati prelevati 10 litri di latte/vacca (5 litri per 2 mungiture, mattina e sera) da sottoporre rispettivamente ad analisi chimica e a caseificazione.

3.2 Analisi del latte

Tutti i campioni di latte raccolti giornalmente (mattina e sera) sono stati refrigerati immediatamente alla temperatura di 4°C. Ad ogni campione di latte è stato aggiunto il 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol come conservante. I campioni raccolti, sono stati raggruppati ed analizzati due giorni a settimana (lunedì e giovedì). Per ogni campione di latte è stata determinata:

- la composizione chimica del latte (% di grasso, proteina, caseina, lattosio, sostanza secca) tramite l'utilizzo di un MilkoScan FT2 (FossElectric A/S, Hillerod, Denmark);
- il pH con pH-metro portatile (Crison Basic 25; Crison Instruments SA, Barcelona, Spain);
- le cellule somatiche tramite Fossomatic Minor (FossElectric A/S); le cellule somatiche sono state log-trasformate in *somatic cell score* per rendere la distribuzione normale del carattere (Ali and Shook, 1980);
- i parametri lattodinamografici mediante Formagraph (FossElectric A/S, Hillerod, Denmark);

Anche il latte utilizzato nelle due giornate di caseificazione entro periodo è stato analizzato per la composizione chimica, il pH e le cellule somatiche.

3.2.1 Lattodinamografia

Per l'analisi lattodinamografica è stato utilizzato lo strumento meccanico Formagraph (FossElectric A/S, Hillerod, Denmark). Il principio di funzionamento dello strumento si basa sull'attrito prodotto dall'aumento della viscosità del latte durante il processo di coagulazione.

Il Formagraph si compone di due moduli:

1. una piastra che pre-riscalda i campioni di latte a 35°C;
2. un modulo di registrazione composto da dieci pendoli, ciascuno dei quali dispone di un sistema ottico di registrazione. L'oscillazione eseguita da un campo elettromagnetico su un pendolo costituisce il principio di misura del modulo di registrazione.

Figura 3. Modulo riscaldante

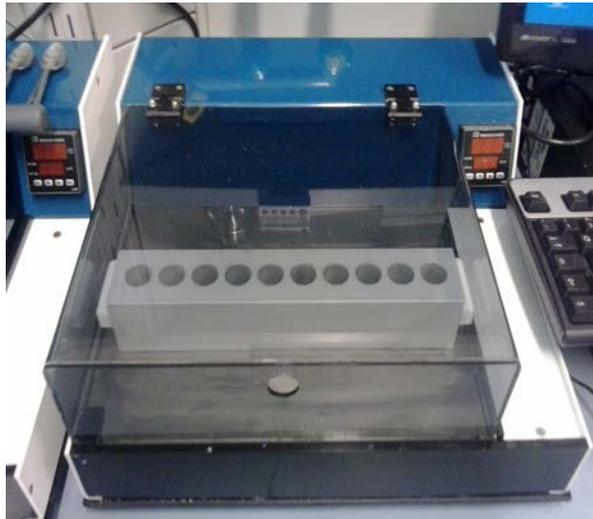
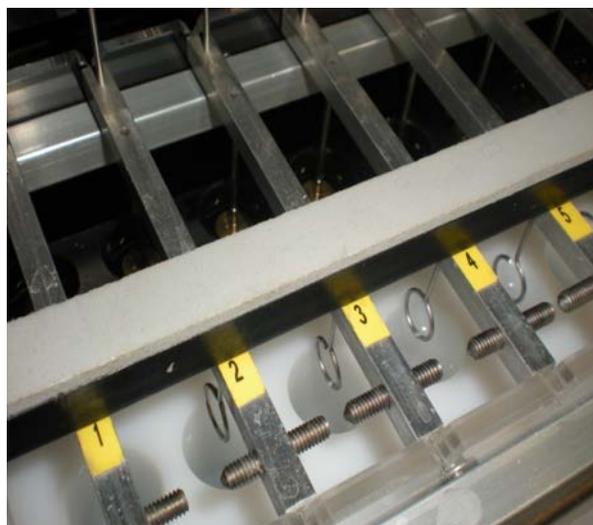


Figura 4. Pendoli del Formagraph



Ogni analisi prevede le seguenti fasi: lo strumento è composto da una piastra pre-riscaldante a 35°C sulla quale è posto il rack costituito da 10 pozzetti, ognuno dei quali rappresenta un campione di analisi, e dove vengono aggiunti 10 ml di latte/pozzetto. Alla temperatura di 35°C, dopo circa 15 minuti di pre-riscaldamento, vengono inseriti per ogni unità di analisi 200 µl di

soluzione coagulante enzimatica (1,2% di caglio liquido di bovino; NATUREN TM STANDARD 215, Hansen 215 IMCU/ml).

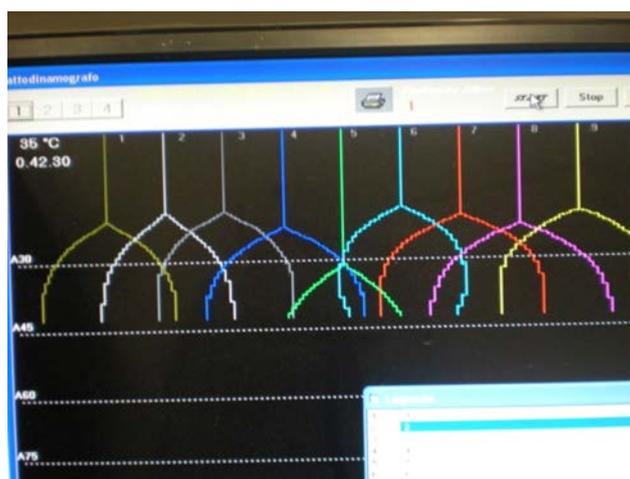
In seguito il *rack* viene posizionato all'interno del modulo di registrazione su una piastra oscillante che durante l'analisi lo muove trasversalmente al pendolo inserito in ogni pozzetto. Fino a quando il coagulo non si è formato, il pendolo rimane fermo. Al momento della gelificazione del campione di latte, l'aumento di viscosità e l'iniziale formazione della cagliata trasmettono una forza sufficiente al pendolo per iniziare ad oscillare, permettendo così la registrazione della coagulazione tramite il grafico "consistenza coagulo/tempo" espresso in mm/min. La singola linea continua del grafico viene registrata in corrispondenza di una consistenza del coagulo pari a 0 mm, quando i fasci luminosi riflessi dagli specchi dei singoli pendoli non evidenziano alcun spostamento. Viceversa tali fasci luminosi vengono registrati in differenti posizioni laterali (oscillazione trasversale) sul grafico la cui distanza aumenta all'aumentare della consistenza del coagulo. L'aggiornamento dell'ampiezza della campana avviene in tempo reale (ogni 15 secondi). Nella presente prova la durata dell'analisi è stata di 60 minuti. Di norma questa tipologia di analisi prevede una durata di 30 minuti con la determinazione di tre parametri classici:

1. tempo di coagulazione (RCT, min): è il tempo che intercorre dall'aggiunta del caglio fino all'inizio della formazione del coagulo, che coincide con l'apertura del tracciato. In questa fase l'enzima chimosina rimuove la parte terminale idrofilica della κ -caseina (caseinomacropetide) favorendo, con il passaggio dallo stato liquido allo stato di gel, l'aggregazione delle micelle caseiniche (gelificazione);
2. tempo di rassodamento (k_{20} , min): è dato dal tempo (minuti) trascorso dall'inizio della gelificazione (RCT) al raggiungimento di un coagulo ad una consistenza standard, con un'ampiezza della forbice del tracciato lattodinamografico di 20 mm;
3. consistenza del coagulo (a_{30} , mm): è la larghezza (mm) della forbice del tracciato a 30 minuti dall'aggiunta del caglio.

La possibilità di prolungare l'analisi ha permesso di rilevare anche:

4. a_{45} : è la larghezza (mm) della forbice del tracciato a 45 minuti dall'inizio della prova;
5. a_{60} : è la larghezza (mm) della forbice del tracciato a 60 minuti dall'inizio della prova.

Figura 5. Tracciato ottenuto durante un'analisi con il Formagraph



3.2.2 Modellizzazione del tracciato lattodinamografico

In questo studio, il modello matematico per riassumere tutte le informazioni rilevate durante l'analisi lattodinamografica è stato quello proposto da Bittante (2011). I caratteri ottenuti dal modello sono stati stimati utilizzando la misura dell'ampiezza della campana determinata dallo strumento ogni 15 secondi dall'inizio dell'analisi. Questo modello, infatti, utilizza tutte le informazioni rese disponibili durante l'analisi per la stima dei 3 parametri, i quali non derivano da una singola misurazione dello strumento (diversamente da quanto accade con le tradizionali analisi lattodinamografiche).

Il modello proposto da Bittante (2011) è il seguente:

$$CF_t = CF_P \times [1 - e^{-k_{CF} \times (t - RCT_{eq})}] ,$$

dove:

CF_t = la consistenza del coagulo (mm) al tempo t ;

CF_P = il valore potenziale asintotico della consistenza del coagulo a tempo infinito (mm);

k_{CF} = tasso costante di consistenza del coagulo ($\%/min^{-1}$);

RCT_{eq} = il tempo di coagulazione (min).

La scelta del modello da utilizzare è stata determinata su quanto osservato dalle curve lattodinamografiche misurate: più dell'80% dei campioni non ha mostrato sineresi e per il restante 15% circa, il tempo di raggiungimento di consistenza massima (t_{max}) è stato registrato tra i 55 e i 60 min di analisi. Inoltre, per ridurre la quota di campioni non convergenti al modello proposto, sono

stati utilizzati solamente i rilievi di consistenza del coagulo fino al raggiungimento del massimo valore entro singola analisi. Per questo motivo la stima dei parametri modellizzati ha previsto un numero differente di rilievi entro singolo campione analizzato.

3.3 Mini-caseificazione

Nel mini-caseificio, ubicato nella Azienda Agraria Sperimentale “L.Toniolo”, subito dopo la mungitura mattutina, è stata effettuata la caseificazione del latte delle 4 bovine. Come già accennato, nell’ultima settimana di trattamento di ciascun periodo, in due giornate differenti sono stati prelevati 10 litri di latte (5 litri per 2 mungiture, mattina e sera) da sottoporre rispettivamente ad analisi chimica e a caseificazione. Per ogni singolo periodo, il latte delle 4 tesi sperimentali è stato trasformato per la produzione di un formaggio semistagionato e semicotto, con maturazione di 60 giorni tramite l’utilizzo di 4 mini-caldaie della capacità di 10 L (Cuve à fromage 10L, Pierre Guérin Technologies, Mauze, France).

Prima della caseificazione, il latte non ha subito alcun trattamento termico o di scrematura.

La metodica di lavorazione ha previsto lo svolgimento di determinate operazioni a tempi prestabiliti di seguito spiegate e meglio semplificate dal diagramma di flusso in Figura 13:

- Peso e raccolta campione di latte prima dell’inserimento in caldaia;
- Riempimento delle caldaie dopo idoneo mescolamento del latte della mungitura mattutina e serale (5 + 5 litri), con 10L di latte individuale refrigerato e mantenuto a 4°C prima della caseificazione (Figura 6);

Figura 6.Mescolamento del latte nella caldaia



- Riscaldamento del latte per 40 min fino a 35°C;
- Misurazione del pH e della temperatura dopo 35 minuti dall'inizio del riscaldamento (Figura 7);

Figura 7. Misurazione del pH e della temperatura tramite pH-metro



- Acidificazione del latte per 20 min tramite l'aggiunta di starter industriale (*Streptococcus thermophilus*, 4 Unit/1000 L, STA IDC, CSL Starter cultures, Lodi);
- Misurazione del pH e della temperatura dopo 15 minuti dall'inizio dell'acidificazione;
- Aggiunta di 2.5 ml/caldaia di caglio liquido di bovino (NATUREN TM STANDARD 215, Hansen 215 IMCU/ml) portati a volume di 40 ml con acqua distillata (Figura 8);

Figura 8. Aggiunta di caglio nella caldaia



- Rilievo manuale della gelazione del latte tramite cucchiaino da laboratorio (Figura 9);

Figura 9. Rilievo gelazione del latte tramite cucchiaino da laboratorio



- In seguito alla coagulazione i pozzetti sono spostati in un altro bagnomaria pre-riscaldato a 55°C per la cottura della cagliata;
- Taglio della cagliata a 4 fasi tramite l'utilizzo di coltelli automatizzati:

FASE	Durata, sec	Velocità coltelli, rpm
1	15	30
2	15	30
3	15	40
4	45	40

ad ogni taglio, tra la prima fase e la terza fase, è prevista una sosta di 1 min;

Al termine della terza fase è previsto l'inizio della cottura della cagliata con il raggiungimento di circa 45°C prima dello scarico del siero. Tra il terzo ed il quarto taglio è prevista una sosta di 5 min;

Figura 10. Taglio della cagliata



- Agitazione del coagulo tramite l'utilizzo di pale agitatrici automatiche (velocità 40 rpm per 5 min);
- Sosta sotto siero per 5 min;
- Agitazione del coagulo tramite l'utilizzo di pale agitatrici automatiche (velocità 70 rpm per 5 min);
- Scarico del siero, con peso e rilievo pH (Figura 11) e raccolta di un campione per l'analisi chimica tramite MilkoScan FT2 (FossElectric A/S, Hillerod, Denmark);

Figura 11. Scarico e misurazione pH del siero



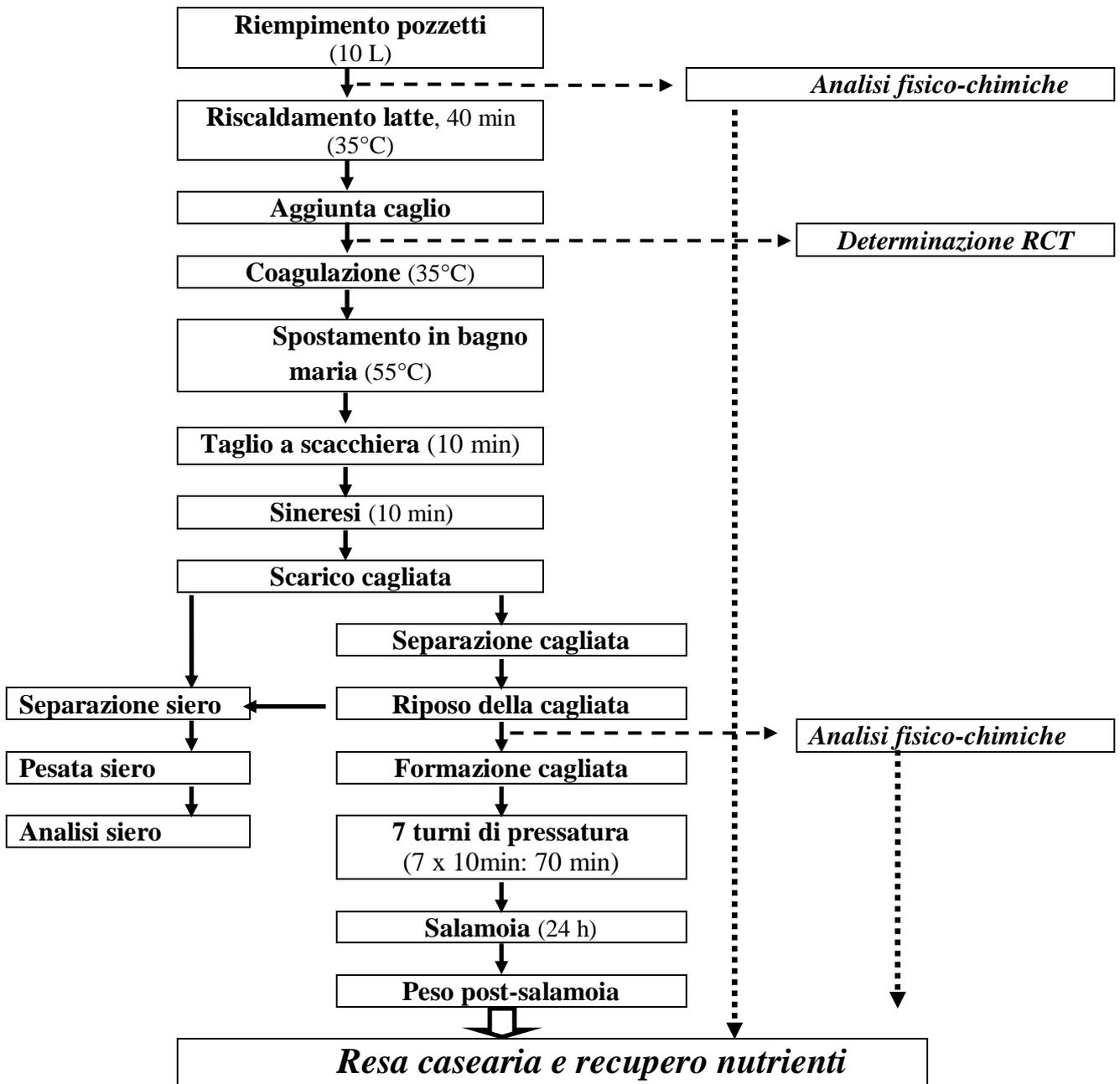
- Rivoltamento manuale della cagliata per 20 min;
- Pressatura (2 bar) in 7 fasi successive di 10 min ciascuna (totale 70 min); tra una fase ed un'altra la cagliata viene rivoltata;

Figura 12. Pressatura della cagliata



- Salamoia liquida al 20% di NaCl per 24 ore;
- Al termine della salamoia i formaggi sono pesati ed inseriti in maturatore ad una temperatura di 15°C ed un valore di umidità relativa dell'85%;
- La stagionatura prevede 60 giorni; dopo 21 giorni dalla caseificazione i formaggi sono stati messi sottovuoto e reinseriti ad una temperatura di 5°C.

Figura 13. Diagramma di flusso delle fasi di lavorazione della metodica di mini-caseificazione



Grazie alla determinazione del peso e della composizione del latte e del siero, e al peso della cagliata dopo la fase di salamoia, è stato possibile stimare la composizione della cagliata e definire dei caratteri che descrivono l'efficienza del processo di caseificazione.

Sono state stimate 3 tipologie differenti di resa in cagliata:

La resa casearia (CY_{CURD} , %) è stata determinata tramite il rapporto tra il peso della cagliata, espresso in grammi, ed il peso del latte, anch'esso espresso in grammi:

$$\%CY_{CURD} = \frac{\text{cagliata (g)}}{\text{latte (g)}} \times 100$$

La resa in sostanza secca (CY_{SOLIDS} , %) è stata determinata tramite il rapporto tra il peso della sostanza secca presente nella cagliata, espresso in grammi, sul peso totale del latte, anch'esso espresso in grammi:

$$\%CY_{SOLIDS} = \frac{\text{sostanza secca cagliata (g)}}{\text{latte (g)}} \times 100$$

La resa in acqua (CY_{WATER} , %) è stata determinata tramite il rapporto tra il peso dell'acqua presente nella cagliata, espresso in grammi, sul peso totale del latte, anch'esso espresso in grammi:

$$\%CY_{WATER} = \frac{\text{acqua cagliata (g)}}{\text{latte (g)}} \times 100$$

Sono stati inoltre stimati in percentuale i recuperi nella cagliata di alcuni componenti del latte (grasso, proteina, sostanza secca ed energia): il recupero di grasso nella cagliata (REC_{FAT} , %) è stato calcolato tramite il rapporto del grasso nella cagliata, espresso in grammi, sul grasso totale del latte, anch'esso espresso in grammi:

$$REC_{FAT}(\%) = \frac{\text{grasso cagliata (g)}}{\text{grasso latte (g)}} \times 100$$

Il recupero di proteina nella cagliata ($REC_{PROTEIN}$, %), è stato calcolato tramite il rapporto della proteina nella cagliata, espressa in grammi, sulla proteina totale del latte, anch'essa espressa in grammi:

$$REC_{PROTEIN}(\%) = \frac{\text{proteina cagliata (g)}}{\text{proteina latte (g)}} \times 100$$

Il recupero di sostanza secca nella cagliata (REC_{SOLIDS} , %), è stato calcolato tramite il rapporto della sostanza secca nella cagliata, espressa in grammi, sulla sostanza secca totale del latte, anch'essa espressa in grammi:

$$REC_{SOLIDS}(\%) = \frac{\text{sostanza secca cagliata (g)}}{\text{sostanza secca latte (g)}} \times 100$$

Il recupero di energia nella cagliata (REC_{ENERGY} , %), è stato calcolato tramite il rapporto dell'energia nella cagliata, espressa in MJ, sull'energia totale del latte, anch'essa espressa in MJ:

$$REC_{ENERGY}(\%) = \frac{\text{acqua cagliata (MJ)}}{\text{acqua latte (MJ)}} \times 100$$

L'energia del latte è stata stimata utilizzando un'equazione proposta dall'NRC (2001) per la stima dei fabbisogni energetici della vacca in lattazione. Quella della cagliata, invece, è stata stimata come differenza tra quella del latte e quella del siero (stimato tramite la stessa equazione utilizzata per il latte).

Le rese (totale, in sostanza secca ed acqua) sono state moltiplicate per la produzione giornaliera di latte individuale al fine di determinare la produzione giornaliera di formaggio in kg per vacca (dCY_{CURD} , dCY_{SOLIDS} , dCY_{WATER} , rispettivamente per la resa classica, per la sostanza secca e per l'acqua).

Facendo riferimento ad uno studio svolto da Stocco *et al.* (2017) sono state stimate anche la resa teorica e l'efficienza di resa. La resa teorica classica, espressa come $Th-\%CY_{CURD}$ è stata calcolata utilizzando la formula proposta da Van Slyke *and* Price (1949) e riportata poi da Emmons *and* Modler (2010):

$$Th \%CY_{CURD} = (0.93 \times \%fat + \%casein - 0.1) \times 1.09 / [(100 - \%M) / 100]$$

dove 1.09 rappresenta la correzione per i minerali del latte, per il sale e i carboidrati del formaggio e %M è la percentuale di umidità del formaggio (100 - %sostanza secca). È stata calcolata anche una resa teorica in sostanza secca ($Th\%CY_{SOLIDS}$) che deriva dalla formula precedente eliminando la parte relativa alla correzione per la percentuale di umidità del formaggio, ovvero:

$$Th \%CY_{SOLIDS} = (0.93 \times \%fat + \%casein - 0.1) \times 1.09$$

L'efficienza della resa classica, espressa come $Ef\%CY_{CURD}$ della resa in sostanza secca espressa come $Ef\%CY_{SOLIDS}$, sono state calcolate facendo il rapporto tra le rispettive rese ottenute nella prova sperimentale e quelle teoriche:

$$Ef\%CY_{CURD} = \%CY_{CURD} / Th\%CY_{CURD}$$

$$Ef\%CY_{SOLIDS} = \%CY_{SOLIDS} / Th\%CY_{SOLIDS}$$

3.4 Analisi Statistica

Le informazioni sperimentali sono state analizzate impiegando le procedure del pacchetto statistico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Per la caratterizzazione dell'effetto del utilizzo dell'aglio nella dieta delle bovine da latte è stata utilizzata un ANOVA. Il modello lineare misto utilizzato è stato il seguente:

$$y_{ijklmno} = \mu + \text{aglio}_i + \text{mungitura}_j + \text{SCS}_k + \text{data}_l(\text{periodo})_m + \text{animale}_n * \text{periodo}_m + \text{periodo}_m + \text{animale}_n + e_{ijklmno},$$

dove:

$y_{ijklmno}$ = variabile dipendente (caratteri relativi alla produzione e qualità del latte);

μ = intercetta generale del modello;

aglio_i = effetto fisso dell' i^{ma} classe della tesi sperimentale (4 livelli; controllo; A100, A400 e ALL);

mungitura_j = effetto fisso della j^{ma} mungitura ($j = 2$ livelli, mattina e sera);

SCS_k = effetto fisso del k^{ma} covariata del somatic cell score;

$\text{data}_l(\text{periodo})_m$ = effetto random dell' l^{ma} data entro periodo sperimentale m ;

$\text{animale}_n * \text{periodo}_m$ = effetto random relativo all'interazione dell' n^{ma} bovina e l' m^{mo} periodo sperimentale;

periodo_m = effetto random dell' m^{mo} periodo sperimentale (4 livelli);

animale_n = effetto random dell' n^{ma} bovina (4 livelli);

$e_{ijklmno}$ = errore casuale $\sim N(0, \sigma^2 e)$.

Per le proprietà di coagulazione e per i caratteri ottenuti con la modellizzazione, agli effetti fissi già presenti è stato aggiunto quello del pozzetto (10 livelli).

Per le informazioni raccolte nel processo di caseificazione è stato utilizzato il seguente modello lineare misto:

$$y_{ijklmn} = \mu + \text{aglio}_i + \text{SCS}_j + \text{data-caseificazione}_k(\text{periodo})_l + \text{animale}_m * \text{periodo}_l + \text{periodo}_l + e_{ijklmn},$$

dove:

y_{ijklmn} = variabile dipendente (caratteri relativi alla caseificazione);

μ = intercetta generale del modello;

aglio_i = effetto fisso dell' i^{ma} classe della tesi sperimentale (4 livelli; controllo; A100, A400 e ALL);

SCS_j = effetto fisso del j^{ma} covariata del somatic cell score;

data-caseificazione_k(periodo)_l = effetto random dell' k^{ma} data di caseificazione entro periodo sperimentale l ;

animale_m*periodo_l = effetto random relativo all'interazione dell' m^{ma} bovina e l' l^{mo} periodo sperimentale;

periodo_l = effetto random dell' l^{mo} periodo sperimentale (4 livelli);

e_{ijklmn} = errore casuale $\sim N(0, \sigma^2_e)$.

Infine, per verificare l'effetto della tesi sperimentale (utilizzo di aglio nella dieta) sono stati anche testati i seguenti contrasti:

1. Utilizzo di aglio: tesi controllo vs aggiunta di aglio (A100, A400 e ALL).
2. Utilizzo aglio grezzo vs principio attivo: aglio naturale (A100 e A400) vs solfuro di allile.
3. Effetto dose di aglio grezzo: A100 vs A400.

4. DISCUSSIONE

La presente prova ha voluto testare l'effetto dell'inclusione dell'aglio nella dieta delle bovine in lattazione nei confronti dei caratteri che descrivono la qualità del latte destinato alla trasformazione in formaggio. Per quanto riguarda la raccolta dei dati individuali, si sono considerati gli ultimi 5 giorni di ogni periodo corrispondenti alla settimana in cui sono state effettuate anche le caseificazioni. Il database si è composto quindi di 160 osservazioni, ottenute considerando le 4 vacche in lattazione valutate nella prova sperimentale, le quali sono state sottoposte a due mungiture giornaliere (mattina e sera) per 5 giorni di ognuno dei 4 periodi oggetto di studio. La razza utilizzata è stata la Frisona Italiana. Il presente studio, utilizzando solamente 4 bovine durante l'intera prova sperimentale, ha presentato una bassa variabilità di tutti i caratteri analizzati. Il numero di animali utilizzati è giustificato dall'intero piano sperimentale della prova: infatti, il presente lavoro fa parte di una prova che ha previsto la completa analisi dell'effetto dell'uso di aglio come aggiunta nella dieta delle vacche da latte; in particolare, questo effetto è stato valutato anche a livello di emissioni di metano attraverso la fermentazione del liquido ruminale *in vitro*. Questo tipo di analisi non permette la valutazione di un numero elevato di campioni per sessione di analisi (es. giorno): per questi motivi si è scelto di utilizzare solamente 4 animali durante l'intera prova sperimentale.

In Tabella 4 sono riportate le statistiche descrittive relative alla produzione e ai caratteri qualitativi del latte e alle proprietà di coagulazione. Rispetto lo scenario nazionale (AIA, 2016), i risultati della presente prova sperimentale hanno evidenziato valori medi più elevati per i principali componenti che determinano la qualità del latte (grasso e proteina). I dati dell'Associazione Italiana Allevatori (AIA), inerenti all'anno 2016, definiscono infatti i livelli di grasso e proteina per la Frisona Italiana rispettivamente di 3,70% e 3,26%. Nel presente lavoro il contenuto di grasso medio nel latte è stato di 4,14% con un minimo di 2,27% ed un massimo di 7,00%: nel caso della proteina sono stati osservati valori medi di 3,38%. Il tenore di grasso è risultato simile a quanto presentato da Malchiodi *et al.* (2014), studio nel quale è stato testato l'effetto del *cross-breeding* utilizzato nella razza Frisona, nei confronti della qualità del latte: gli autori hanno riscontrato livelli medi di grasso del 4,09%. La proteina, invece, rispetto i dati da noi raccolti, è risultata maggiore (3,71%).

Come atteso, il lattosio ha mostrato una bassa variabilità così come l'acidità del latte espressa tramite il pH. È importante ricordare che il pH influenza le proprietà di coagulazione del latte: in particolare, all'aumentare dell'acidità del latte si riscontra una diminuzione del tempo di coagulazione, in quanto la chimosina, principale componente del caglio, svolge la sua azione in modo più efficace a pH sub-acidi (Cipolat-Gotet *et al.*, 2012).

La conta delle cellule somatiche (SCC) rappresenta un carattere essenziale per la valutazione dello stato di salute e di stress dell'animale, in quanto indice di eventuali mastiti. Da un punto di vista tecnologico, come riportato da Del Prato (2009), un'elevata presenza di cellule somatiche ($SCC > 400 \cdot 000$) può avere effetti negativi per la caseificazione del latte, provocando un innalzamento del pH e un prolungamento dei tempi di rassodamento della cagliata. Nel presente studio, le vacche hanno mediamente presentato un SCS di 2,02, pari a circa 50'000 cellule somatiche. Questo carattere ha mostrato un'elevata variabilità, con un coefficiente di variabilità pari al 91%: il risultato è probabilmente dovuto al fatto che, durante la prova sperimentale, abbiamo assistito a degli episodi di mastite con il conseguente superamento del milione di cellule somatiche per ml di latte.

Tabella 4. Statistiche descrittive (Media, deviazione standard, minimo, massimo, skewness e curtosi) relative alle variabili che descrivono la qualità del latte, le proprietà di coagulazione e i parametri di modellizzazione

Variabile	N	Media	DS	Minimo	Massimo	Skewness	Curtosi
Produzione giornaliera, kg/d ¹	160	16,9	2,85	9,00	23,0	0,06	-0,76
Caratteri qualitativi							
Grasso, %	160	4,14	0,92	2,25	7,00	0,10	-0,21
Proteina, %	160	3,38	0,28	2,80	4,03	0,08	-0,79
Grasso/proteina	160	1,23	0,26	0,65	2,14	0,53	1,10
Caseina, %	160	2,61	0,24	2,10	3,13	0,06	-0,62
Indice caseinico, %	160	77,2	1,97	72,6	81,5	-0,36	-0,49
Lattosio, %	160	4,93	0,1	4,66	5,15	-0,03	-0,29
Sostanza secca, %	160	13,0	0,93	10,9	15,5	-0,11	-0,83
SCS ²	160	2,02	1,83	-1,06	8,05	1,02	1,08
pH	160	6,64	0,05	6,52	6,78	0,02	-0,13
Proprietà di coagulazione tradizionali³							
RCT, min	159	28,3	5,78	13,3	47,0	0,71	1,42
k ₂₀ , min	155	7,04	2,59	3,15	18,2	1,42	2,98
a ₃₀ , mm	160	11,0	11,7	0,00	45,8	0,92	-0,10
a ₄₅ , mm	160	34,4	12,5	0,00	57,1	-0,68	0,55
a ₆₀ , mm	160	44,6	10,4	0,00	62,9	-1,02	2,00
Parametri di modellizzazione CF_t⁴							
RCT _{eq} , min	159	28,5	5,62	13,7	46,2	0,64	1,30
CF _p , mm	159	52,6	7,41	26,3	65,4	-0,76	1,01
k _{CF} , %/min	159	7,05	1,84	2,36	12,6	0,39	0,37
tmax, min	159	59,2	2,56	39,0	60,0	-4,67	27,3

¹Produzione giornaliera per singola mungitura

²SCS = $3 + \log_2 (SCC/100)$.

³RCT = tempo di gelazione; k₂₀ = tempo di rassodamento; a₃₀(a₄₅, a₆₀) = consistenza del coagulo dopo 30 (45, 60) min dall'inserimento del caglio

⁴RCT_{eq} = RCT stimato con l'equazione di modellizzazione CF_t(min); CF_p = valore potenziale asintotico della consistenza del coagulo a tempo infinito (mm); k_{CF} = tasso costante di consistenza del coagulo (min⁻¹); tmax = tempo necessario a raggiungere la massima consistenza del coagulo

Per quanto riguarda i parametri di coagulazione, come accennato precedentemente, sono stati considerati i caratteri tradizionali, quali il RCT, k_{20} , a_{30} , a_{45} , a_{60} rispettivamente come indicazione del tempo di coagulazione, il tempo di rassodamento del coagulo e la consistenza della cagliata a 30 minuti, 45 minuti e 60 minuti. Inoltre sono stati presi in esame i tre parametri di modellizzazione ai fini di costruire il modello asintotico proposto da Bittante (2011). Mediamente abbiamo osservato un tempo di coagulazione pari a 28,3 minuti: per la prova sono state utilizzate poche vacche di razza Frisona, tipicamente conosciuta per la sua scarsa attitudine casearia. Il risultato presentato in Tabella 4 relativo all'RCT evidenzia un latte caratterizzato da una coagulazione molto tardiva. Nello studio di Malchiodi *et al.* (2014), questo carattere ha mostrato dei valori medi di 20,86 minuti, risultato molto più vicino a quanto atteso per questa razza. Anche in questo caso, la presenza di alcuni casi di mastite durante la prova sperimentale, può aver influito sul processo di coagulazione.

Oltre al tempo di coagulazione molto elevato, sono stati osservati dei valori medi mediocri anche per gli altri caratteri: il tempo di rassodamento del coagulo è risultato essere a 7,04 min ($28,3 + 7,04 = 35,04$ min dall'inizio dell'analisi), a differenza dei 4,87 min rilevati da Malchiodi *et al.* (2014). La somma di questi due caratteri assume un'importanza fondamentale nel processo di caseificazione in quanto rappresenta il tempo che intercorre dall'aggiunta del caglio al primo taglio della cagliata effettuato dal casaro. Di conseguenza le consistenze ai tempi di 30 min, 45 min e 60 min sono state rispettivamente di 11,0 mm, 34,4 mm e 44,6 mm e questo risultato rispecchia un coagulo a fine processo molto debole.

Per quanto riguarda i parametri di modellizzazione, RCT_{eq} ha presentato un tempo di 28,5 min, un valore molto simile a quello ottenuto con il lattodinamografo: questo è un risultato atteso in quanto questo carattere ha lo stesso significato del corrispondente RCT tradizionale ma presenta una migliore ripetibilità in quanto è stimato tramite tutte le osservazioni registrate durante l'analisi.

La media di CF_p è risultata di 52,6 mm con un coefficiente di variabilità del 14%: in questo caso, il valore medio osservato in Tabella 4 è risultato simile a quanto riportato da Malchiodi *et al.* (2014), indicando che, escluso il tempo di coagulazione, l'andamento della coagulazione osservato nel presente studio può essere ascrivibile alla razza. La media di k_{CF} è stata di $7,05 \text{ \%}/\text{min}^{-1}$ con una DS di 1,84.

In Tabella 5 sono riportate le statistiche descrittive (media, deviazione standard, minimo, massimo, skewness e curtosi) dei caratteri che descrivono la qualità del latte destinato alla caseificazione e dei principali caratteri che definiscono l'efficienza del processo di caseificazione. Il dataset in questo caso è composto da 32 osservazioni, corrispondenti al latte di entrambe le

mungiture giornaliere delle 4 vacche in lattazione valutate nella prova sperimentale per 2 giorni di ognuno dei 4 periodi oggetto di studio.

Tabella 5. Statistiche descrittive (Media, deviazione standard, minimo, massimo, skewness e curtosi) relative alle variabili che descrivono la qualità del latte, la resa casearia e l'efficienza del processo di caseificazione

Variabile	N	Media	DS	Minimo	Massimo	Skewness	Curtosi
Produzione giornaliera, kg/d	32	33,32	2,58	28,00	38,00	-0,56	-0,36
Caratteri qualitativi							
Grasso, %	32	3,83	0,74	2,64	5,06	-0,31	-1,26
Proteina, %	32	3,39	0,27	2,92	3,89	0,01	-0,89
Grasso:proteina	32	1,13	0,17	0,75	1,43	-0,54	-0,39
Caseina, %	32	2,65	0,22	2,24	3,06	-0,02	-0,66
Indice caseinico, %	32	78,11	1,43	74,75	80,50	-0,61	-0,21
Lattosio, %	32	4,99	0,08	4,84	5,17	0,17	-0,59
Sostanza secca, %	32	12,76	0,84	11,35	14,22	-0,27	-1,35
SCS ¹	32	1,57	1,45	-1,06	4,76	0,39	-0,31
pH	32	6,66	0,05	6,56	6,77	0,13	-0,12
Resa casearia, %							
Resa classica	32	12,87	1,71	9,98	16,34	0,02	-0,90
Resa in sostanza secca	32	6,55	0,87	5,14	7,94	-0,25	-1,45
Ritenzione idrica acqua	32	6,32	1,01	4,22	8,41	0,03	-0,49
Resa teorica ed efficienza, %²							
Resa teorica classica	32	13,07	1,80	10,19	16,15	-0,15	-1,44
Resa teorica sostanza secca	32	6,67	0,92	5,20	8,24	-0,15	-1,44
Efficienza resa classica	32	0,99	0,07	0,88	1,19	0,87	1,48
Efficienza resa sostanza secca	32	0,98	0,02	0,96	1,02	0,29	-0,27
Recuperi nella cagliata, %³							
REC _{PROTEINA}	32	77,06	1,57	74,87	80,29	0,95	-0,34
REC _{GRASSO}	32	86,67	3,21	80,39	91,28	-0,70	-0,77
REC _{SOSTANZA SECCA}	32	51,13	3,61	44,56	55,86	-0,33	-1,30
REC _{ENERGIA}	32	68,27	3,64	61,51	73,02	-0,37	-1,36
Produzione giornaliera individuale, kg×d⁻¹							
Resa giornaliera classica	32	4,27	0,52	3,22	5,31	0,08	-0,34
Resa giornaliera sostanza secca	32	2,18	0,29	1,58	2,75	-0,08	-0,89
Ritenzione idrica acqua	32	2,09	0,30	1,43	2,69	-0,05	-0,19

¹SCS = 3 + log₂ (SCC/100).

²Resa teorica classica = $(0,93*\%fat + \%casein - 0,1)*1,09/[100-\%M]/100$; Resa teorica sostanza secca = $0,93*\%fat + \%casein - 0,1)*1,09$; Efficienza resa classica = $resa\ classica / resa\ teorica\ classica$; Efficienza resa sostanza secca = $resa\ in\ sostanza\ secca / efficienza\ resa\ sostanza\ secca$.

³REC_{PROTEINA}= recupero di proteina nella cagliata; REC_{GRASSO} = recupero di grasso nella cagliata; REC_{SOSTANZA SECCA}= recupero di sostanza secca nella cagliata; REC_{ENERGIA}= recupero di energia nella cagliata.

Quindi in questo caso, diversamente dal dataset presentato in Tabella 4, essendo stati utilizzati i campioni di latte mescolati delle due mungiture giornaliere, la variabilità dei caratteri analizzati è risultata minore.

Da un punto di vista dei valori medi, tutti i componenti del latte hanno presentato caratteristiche simili a quelle descritte nella tabella precedente. In particolare, il latte destinato alla caseificazione ha presentato un valore medio di grasso, proteina, caseina, sostanza secca, lattosio e pH rispettivamente pari a 3,83%, 3,39%, 2,65%, 12,76%, 4,99% e 6,66. Si può notare una differenza in termini di SCS, in questo caso pari a 1,57 (e quindi circa 37'000 SCC) rispetto ai 2,02 di media precedente (Tabella 4).

In Tabella 5 è inoltre espressa la produzione giornaliera di entrambe le mungiture, pari a 33,32 kg/d medi. La variabilità molto bassa della produzione di latte (da 28 a 38 kg/d), è dovuta al fatto che sono stati utilizzati pochi animali in un arco della lattazione molto limitato.

Per quanto riguarda la resa casearia, i recuperi nella cagliata e la produzione giornaliera individuale di formaggio, è possibile confrontare i risultati da noi ottenuti con lo studio proposto da Cipolat-Gotet *et al.* (2013) in cui è stata utilizzata una metodica da laboratorio per la caseificazione di campioni individuali di latte di bovine appartenenti alla razza Bruna. In particolare la resa classica è risultata inferiore nella presente prova (12,87 vs 14,97%): questo risultato può essere dovuto al tipo di razza (Stocco *et al.*, 2017) e al tipo di processo di caseificazione utilizzati nella prova sperimentale.

La sostanza secca della cagliata è stata circa del 50%: questo risultato è confermato dall'uguale contributo della resa in sostanza secca e della ritenzione idrica dell'acqua per la resa classica (6,55% e 6,32% rispettivamente).

Nel caso dei recuperi di proteina (77,06%), grasso (86,67%), sostanza secca (51,13%) ed energia (68,27%) i dati ottenuti nel presente studio sono risultati leggermente più bassi ma comunque paragonabili a quelli ottenuti da Cipolat-Gotet *et al.* (2013), pari rispettivamente a 78,08%, 89,79%, 51,88% e 67,19%: anche in questo caso la metodica utilizzata ha comportato ad ottenere dei risultati medi differenti.

Considerando i caratteri di produzione giornaliera di formaggio, la caratteristica tendenza ad una maggior produzione di latte da parte della Frisona, ha determinato dei valori di resa giornaliera classica più elevati rispetto allo studio condotto da Cipolat-Gotet *et al.* (2013). I dati riscontrati nella presente prova sperimentale sono stati di 4,27 kg/d, 2,18 kg/d e 2,09 kg/d rispettivamente per la resa giornaliera classica, la resa giornaliera in sostanza secca e la ritenzione idrica dell'acqua, a differenza dello studio citato dove i valori erano pari a 3,63 kg/d, 1,74 kg/d e 1,88 kg/d.

In generale è importante evidenziare che tutti i caratteri hanno presentato una distribuzione tendenzialmente normale: lo si può notare dai dati skewness e curtosis tendenti allo zero (Tabella 4 e 5).

In Tabella 6 sono presenti i risultati dell'analisi della varianza relativi ai caratteri qualitativi, alle proprietà di coagulazione del latte (RCT, k_{20} , a_{30} , a_{45} e a_{60}) e alle variabili del modello proposto da Bittante (2011). Il modello lineare adottato ha considerato gli effetti fissi della mungitura giornaliera, della tesi (addizione di aglio nella dieta), della covariata per l'SCS e per la parte relativa alla coagulazione è stato considerato anche l'effetto pozzetto di analisi. Nel modello è stato introdotto come covariata l'effetto SCS per correggere i risultati ottenuti dagli episodi di mastiti che si sono manifestati durante la prova. Il modello lineare utilizzato ha inoltre considerato gli effetti random dell'animale, dell'animale*periodo, della data entro periodo e del periodo. Nel caso dell'effetto dell'animale per la produzione e dell'effetto del periodo per il grasso, abbiamo ottenuto un valore di varianza spiegata pari a 0: questo è dovuto probabilmente al fatto che sono stati utilizzati pochi animali per la prova e che questi caratteri sono risultati poco variabili per l'effetto considerato. L'effetto dell'animale per la proteina, invece, è stato molto elevato: tale valore ha presentato un *root means* di 0,22 che, in percentuale sul totale della varianza del carattere, è stato di circa il 50%: si tratta di un risultato atteso, in quanto le frazioni proteiche sono influenzate da aspetti genetici legati all'animale. Per lo stesso motivo si può notare come anche la variabilità della caseina sia dovuta per il 47% dall'effetto dell'animale.

Come si può vedere in Tabella 6, in alcuni casi l'RMSE è risultato elevato rispetto gli altri fattori random considerati nel modello ed in particolare nel caso della produzione giornaliera del latte, dell'RCT sia tradizionale che quello stimato dal modello e dell' a_{30} . In linea di massima l'effetto animale e quello del periodo sono stati i due fattori più importanti per i caratteri qualitativi e quelli relativi alla coagulazione rispetto agli altri random inclusi nel modello. A titolo di esempio, il 42% della variabilità del grasso e il 53% della sostanza secca sono dovuti all'effetto dell'animale. L'effetto del periodo è stato particolarmente rilevante per la proteina, per la caseina e per l'indice caseinico, descrivendo rispettivamente il 42%, il 43% e il 50% della variabilità dei caratteri considerati. Per quanto riguarda il carattere SCS, invece, il 26% della variabilità è stata spiegata dall'effetto animale*periodo: come già accennato, il risultato può essere dovuto alla presenza di mastiti in certi periodi per qualche bovina utilizzata nella prova. Come atteso (Bobbo *et al.*, 2016), l'effetto relativo alla covariata SCS è risultato significativo per la maggior parte dei caratteri considerati. In particolare, relativamente ai caratteri qualitativi del latte, è risultato significativo ($P < 0,001$) per il grasso, il rapporto grasso:proteina, per l'indice caseinico e per la sostanza secca. L'importanza di questo effetto è risultata rilevante anche per il lattosio e il pH ($P < 0,01$) e in parte anche per la proteina ($P < 0,05$). Per quanto concerne invece le proprietà di coagulazione e i parametri di modellizzazione, l'effetto SCS è risultato particolarmente importante per RCT, a_{45} e RCT_{eq} ($P < 0,001$).

Tabella 6. Analisi della varianza (*F-value* e significatività) per i caratteri qualitativi, le proprietà di coagulazione e i parametri di modellizzazione

Variabile ¹	EFFETTI FISSI				EFFETTI RANDOM (RM) ²				RMSE ³
	Mungitura	Aglio	SCS	Pozzetto	Animale	Animale*Periodo	Data (Periodo)	Periodo	
Produzione giornaliera, kg/d	483,1***	0,2	0,5	-	0,00	0,68	0,43	0,64	1,32
Caratteri qualitativi									
Grasso, %	1,3	0,3	24,5***	-	0,55	0,31	0,14	0,00	0,55
Proteina, %	98,7***	3,0*	5,1*	-	0,22	0,04	0,02	0,20	0,08
Grasso/proteina	0,2	0,6	19,9***	-	0,14	0,08	0,04	0,09	0,18
Caseina, %	74,6	1,8	0,1	-	0,18	0,04	0,03	0,18	0,07
Indice caseinico, %	2,4	0,9	20,8***	-	0,52	0,68	0,71	1,55	1,08
Lattosio, %	7,0**	1,1	11,3**	-	0,06	0,05	0,04	0,03	0,06
Sostanza secca, %	9,6**	0,3	25,3***	-	0,64	0,27	0,12	0,19	0,49
SCS ²	7,2**	1,0	-	-	0,96	0,97	0,36	0,39	1,21
pH	30,4***	1,8	11,1**	-	0,03	0,01	0,02	0,03	0,02
Proprietà di coagulazione tradizionali ³									
RCT, min	0,2	1,3	14,0***	1,3	2,93	1,38	1,47	2,02	4,72
k ₂₀ , min	2,7	0,8	2,6	0,7	1,72	0,56	0,95	1,17	1,75
a ₃₀ , mm	0,0	1,2	6,3*	0,3	4,54	6,17	2,96	2,76	9,14
a ₄₅ , mm	1,7	1,3	12,2***	0,7	8,44	3,89	2,76	5,99	8,91
a ₆₀ , mm	6,6*	1,3	9,7**	1,3	6,70	2,88	1,95	5,96	7,18
Parametri di modellizzazione CF _t ⁴									
RCT _{eq} , min	0,3	1,2	14,4***	1,4	2,83	1,44	1,46	1,93	4,57
CF _p , mm	1,2	0,4	7,3**	1,5	1,22	0,58	0,47	0,69	1,29
k _{CF} , %/min	10,8**	0,8	1,8	3,6***	3,93	1,70	1,80	3,88	4,92

¹Produzione giornaliera per singola mungitura; SCS = $3 + \log_2 (SCC/100)$; RCT = tempo di gelazione; k₂₀ = tempo di rassodamento; a₃₀ (a₄₅, a₆₀) = consistenza del coagulo dopo 30 (45, 60) min dall'inserimento del caglio; RCT_{eq} = RCT stimato con l'equazione di modellizzazione CF_t (min); CF_p = valore potenziale asintotico della consistenza del coagulo a tempo infinito (mm); k_{CF} = tasso costante di consistenza del coagulo (min⁻¹).

²RM = gli effetti random sono espressi nell'unità di misura della variabile dipendente.

³RMSE = Root means square error.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

È inoltre risultato significativo per a_{60} e CF_p ($P < 0,01$) e in parte anche per a_{30} ($P < 0,05$). Come si può vedere in Tabella 6, l'effetto del pozzetto è risultato molto significativo solo per k_{CF} , indicando la bassa riproducibilità per questo carattere ma la buona ripetibilità di tutti gli altri caratteri analizzati nell'analisi lattodinamografica.

La mungitura giornaliera è stata significativa soprattutto per alcuni caratteri: il risultato ottenuto è dovuto probabilmente all'effettivo differente intervallo di mungitura mattina-sera e sera-mattina; per questo motivo, come mostrato in Tabella 6, l'effetto della mungitura giornaliera ha notevolmente influenzato la produzione giornaliera ($P < 0,001$). Anche i caratteri relativi alla proteina e al pH hanno subito un'influenza significativa dall'effetto mungitura, a seguire il lattosio, la sostanza secca e l'SCS ($P < 0,01$). Per quanto riguarda i parametri di coagulazione e di modellizzazione, l'effetto della mungitura giornaliera è stato significativo per k_{CF} ($P < 0,01$) e per a_{60} ($P < 0,05$): a differenza di quanto osservato nel presente lavoro, Martin *et al.* (2009) non hanno evidenziato alcuna evidente differenza legata al numero di mungiture/giorno nei confronti della qualità del latte e dei formaggi prodotti.

In Figura 14 sono raffigurate rispettivamente le *LS-Means* della produzione giornaliera, del grasso, della proteina e del pH per l'effetto mungitura. La produzione (Figura 14a) è risultata essere maggiore alla mattina rispetto alla sera (19,19 kg/d vs 14,53 kg/d).

Di conseguenza, nella mungitura serale si può notare un aumento della materia utile per la produzione di formaggio (Figura 14 b e c) ma anche del lattosio: in particolare, la proteina è stata di 3,32% nella mungitura mattutina rispetto al 3,44% nella mungitura serale; un'altra variabile qualitativa che è risultata essere influenzata dall'effetto della mungitura è il pH, pari a 6,63 nella prima mungitura quotidiana e 6.65 nella seconda (Figura 14d).

In Figura 15 sono raffigurate le due curve relative alla coagulazione del latte munto al mattino e alla sera. Il processo di coagulazione, nonostante le differenze in termini qualitativi del latte, è risultato abbastanza simile: la gelazione del latte è risultata praticamente identica mentre è stata osservata una maggiore velocità di aumento della consistenza del latte serale rispetto quello mattutino (k_{CF} : 7,19 vs 6.96 %/min; $P < 0.01$) che ha portato delle differenze a 60 minuti in termini di consistenza (a_{60} : 46,03 mm vs 42,2 mm; $P < 0.05$).

Passando all'effetto oggetto del presente studio, ovvero all'influenza dell'inserimento dell'aglio nell'alimentazione delle vacche sui caratteri qualitativi e tecnologici del latte, non è stata rilevata alcuna importante differenza tra le varie tesi testate durante la prova sperimentale (Tabella 7). Sulla base della letteratura disponibile (Calsamiglia *et al.*, 2007; Busquet *et al.*, 2005; Amagase *et al.*, 2005; Ferme *et al.*, 2004) l'aglio può esercitare un'attività anti-metanogenica e quindi può favorire l'utilizzo di parte dell'energia che verrebbe dissipata sotto forma di metano durante le

fermentazioni ruminali, in energia per produrre latte. Nella presente ricerca l'utilizzo dell'aglio nella dieta non ha esercitato effetti significativi sulla produzione quali-quantitativa. Il trattamento sperimentale è risultato significativo solo per le proteine nel latte con una diminuzione di questo componente degli animali alimentati con il supplemento di aglio, soprattutto quando somministrato come alimento mentre più limitato è stato l'effetto del principio attivo utilizzato in purezza.

Figura 14. *LS-Means* relative alla produzione giornaliera, del grasso, della proteina e del pH per l'effetto mungitura

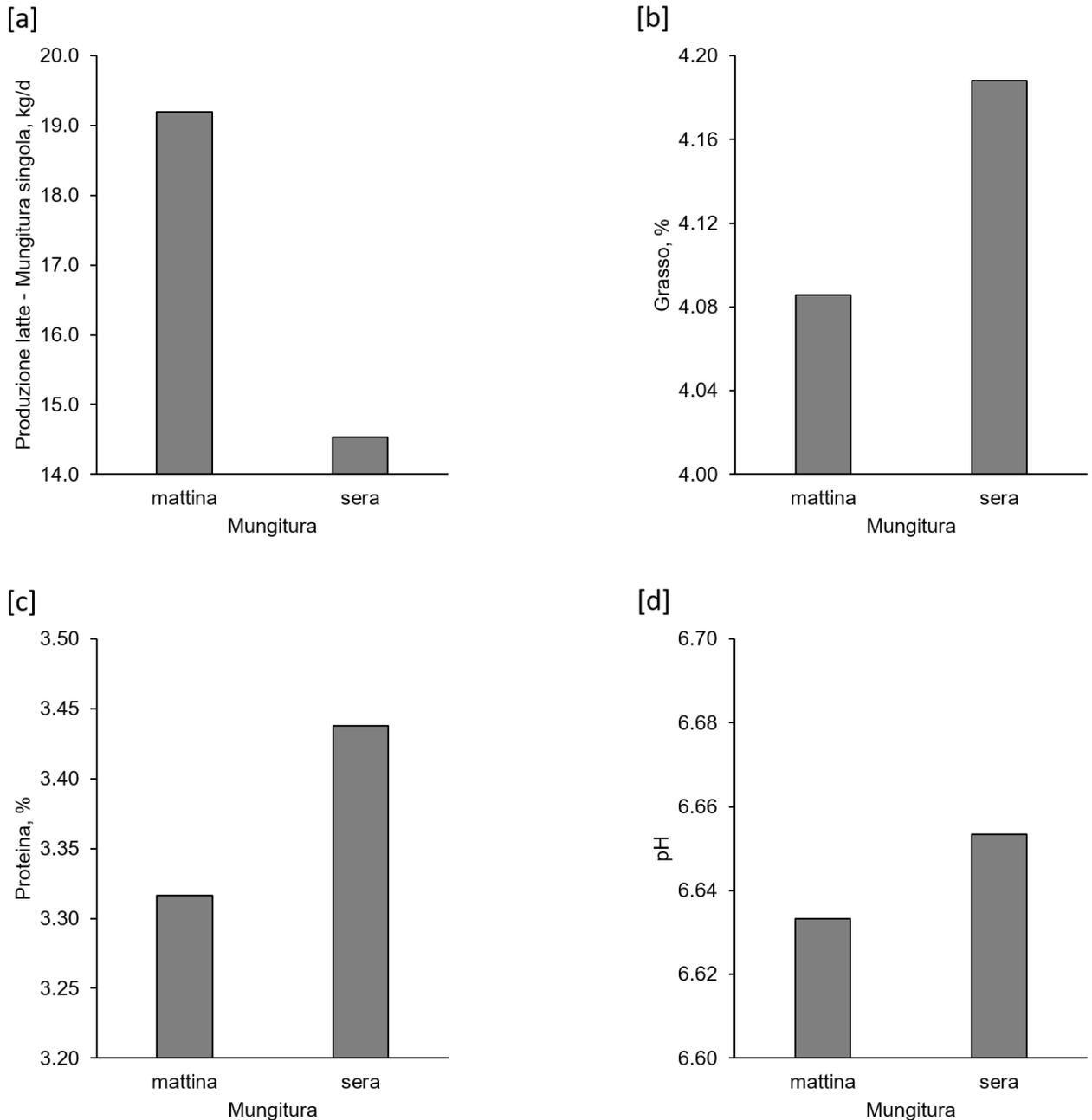
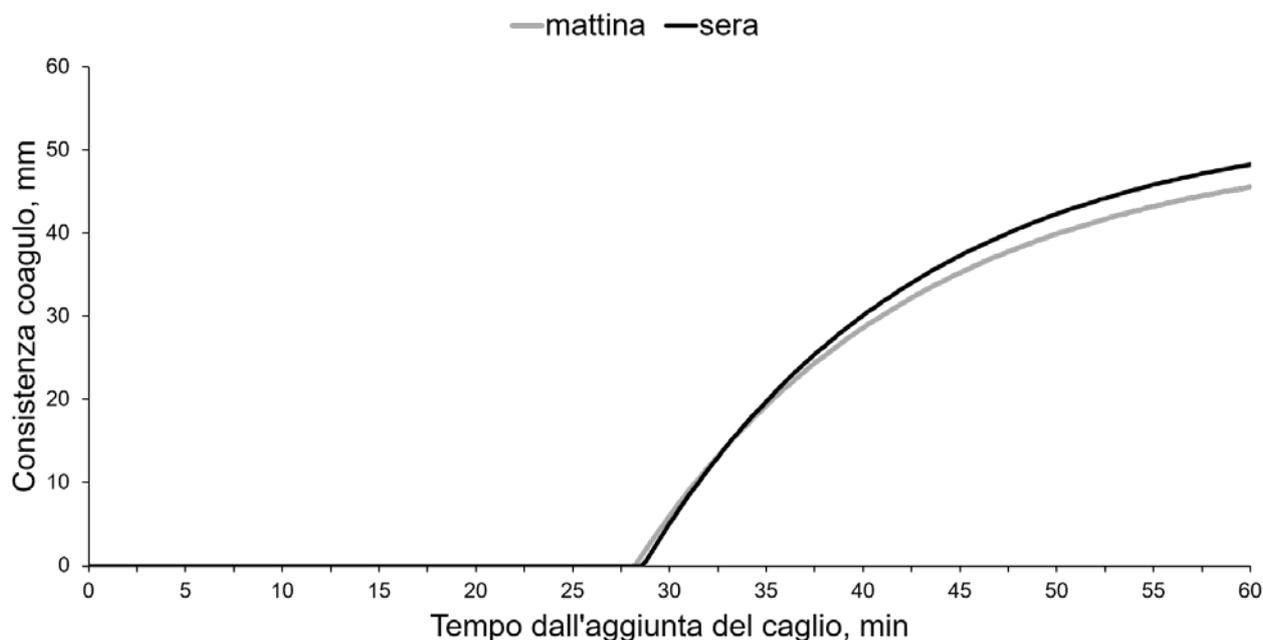


Figura 15. Effetto della mungitura (mattina vs sera) sulla coagulazione del latte



Pur non risultando significativo l'effetto "tesi" per la maggior parte delle variabili prese in considerazione, l'analisi dei contrasti ortogonali ci permette di evidenziare delle differenze tra le 4 tesi sperimentali confrontate durante la prova (Tabella 7).

Il grasso è risultato essere pari al 4,17% nella dieta di controllo e aumenta a 4,27% nella dieta con l'aggiunta di 400 g/d di aglio naturale. L'uso del solfuro di allile e di 100 g/d di aglio naturale ha determinato, invece, una diminuzione del tenore in grasso fino a rispettivamente 4,05% e 4,06%.

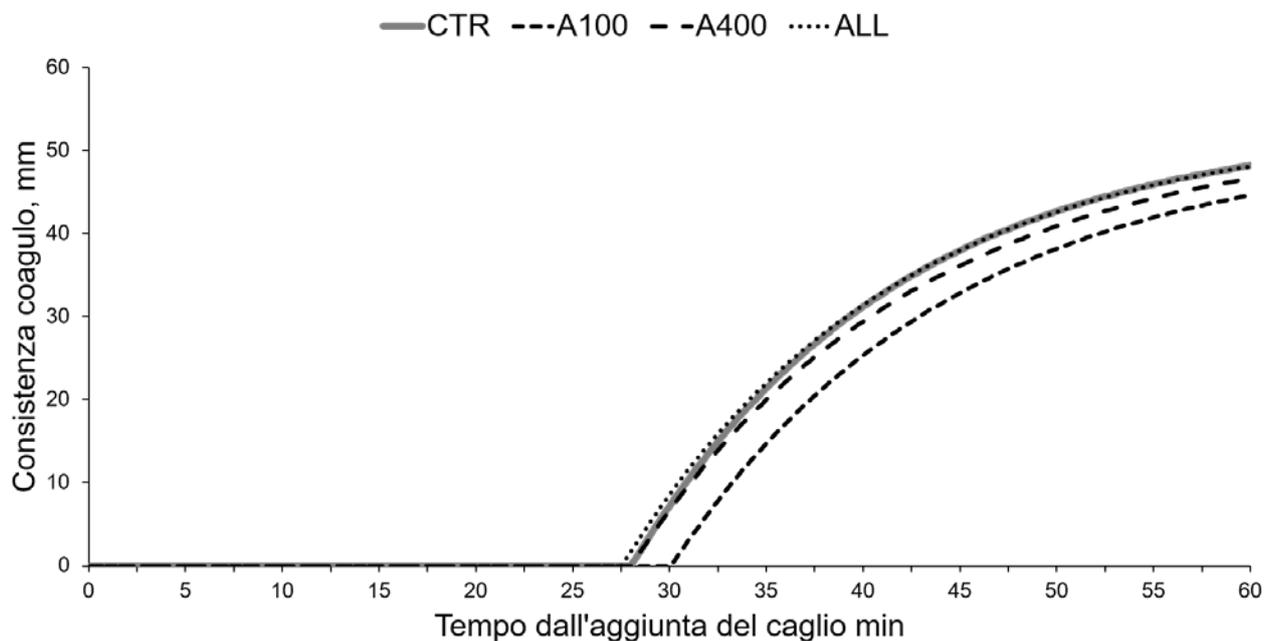
Per quanto riguarda la proteina, come anticipato precedentemente, si è notata una variazione significativa dovuta all'utilizzo dell'aglio nella dieta. In Tabella 7, infatti, si può notare una diminuzione del tenore in proteina con l'integrazione di aglio nella razione da 3,43% per la tesi "controllo" a 3,39%, 3,35% e 3,34% rispettivamente utilizzando 2 g/d di solfuro di allile, 100 g/d di aglio naturale, 400 g/d di aglio naturale. Di conseguenza, in relazione ad un contenuto di caseina simile tra le 4 diete, l'indice caseinico ha manifestato un aumento con l'uso di aglio, passando dal 76,70 % nella dieta controllo a 77,54% nella dieta integrata con solfuro di allile, tali differenze non hanno però raggiunto la significatività statistica.

Per quanto riguarda il contenuto in cellule somatiche (SCS), non è stata osservata alcuna variazione significativa utilizzando una dieta integrata con aglio: si può notare, però, un aumento non atteso del SCS con l'utilizzo di solfuro di allile con valori medi 2,76 rispetto a 1,74 della dieta controllo. Come riportato da Caribu *et al.* (2016), data l'attività antibatterica dell'aglio, ci si poteva aspettare una riduzione della quantità delle cellule somatiche. Come già più volte sottolineato, a

causa dei pochi animali utilizzati e dei frequenti episodi di mastite, il risultato del presente studio può essere stato in parte influenzato dagli eventi e dal disegno sperimentale della prova. La struttura del disegno sperimentale del presente studio non consente infatti considerazioni sull'effetto dei trattamenti sperimentali sullo stato di salute degli animali.

In Figura 16 è rappresentato l'effetto dell'aggiunta dell'aglio nella dieta delle bovine sulla coagulazione del latte, mentre in Tabella 7 sono riportate le *LS-Means* per ciascun carattere rilevato in un'analisi lattodinamografica con i relativi contrasti. Nonostante non abbiamo osservato alcuna significatività per nessun carattere relativo alla coagulazione, osservando la Figura 16 è possibile notare come solamente la tesi A100 si discosti dalle altre tre: in particolare il latte di vacche integrate con 100 g/d di aglio naturale ha cominciato a gelificare mediamente a 29,91 min, mentre per le altre 3 diete abbiamo osservato un RCT (o RCT_{eq}) vicino ai 27 min. Di conseguenza i valori di a_{30} (5,82 mm), di a_{45} (30,40 mm) e di a_{60} (41,61 mm) del latte della dieta A100 sono stati inferiori, sebbene in modo non significativo, rispetto agli stessi caratteri relativi al latte degli altri 3 trattamenti.

Figura 16. Effetto dell'aggiunta dell'aglio nella dieta delle bovine sulla coagulazione del latte



L'integrazione di 100 g/d di aglio nella dieta, ha determinato, inoltre, una riduzione rispetto alla dieta controllo dei parametri di modellizzazione k_{CF} e CF_P : per quanto riguarda il k_{CF} , la dieta A100 ha fatto registrare un valore medio di 6,91 %/min rispetto a 7,37 %/min e la consistenza massima CF_P è stata di 51,08 mm nel caso della dieta con 100 g/d di aglio e di 53,21 mm nella dieta controllo.

Tabella 7. *LS-Means* e relativi contrasti per l'effetto dell'aggiunta dell'aglio nella dieta¹ delle bovine sui caratteri qualitativi, le proprietà di coagulazione e i parametri di modellizzazione

Variabili	CTR		AGLIO		Contrasti (F- e P-value)		
	ALL	Aglio naturale		Controllo vs Aglio	ALL vs A100-400	A100 vs A400	
		A100	A400				
Produzione giornaliera ² , kg/d	16,7	17,1	16,7	16,9	0,1	0,4	0,0
Caratteri qualitativi							
Grasso, %	4,17	4,05	4,06	4,27	0,0	0,3	0,7
Proteina, %	3,43	3,39	3,35	3,34	6,8*	2,2	0,0
Grasso:proteina	1,22	1,19	1,20	1,28	0,0	0,6	1,2
Caseina, %	2,63	2,63	2,58	2,59	2,2	2,9	0,2
Indice caseinico, %	76,7	77,5	77,0	77,3	1,8	0,6	0,3
Lattosio, %	4,89	4,96	4,93	4,95	2,8	0,4	0,2
Sostanza secca, %	13,0	12,9	12,9	13,1	0,1	0,1	0,9
SCS ³	1,74	2,76	1,93	1,64			
pH	6,63	6,65	6,64	6,65	4,8*	0,2	0,4
Proprietà di coagulazione tradizionali ⁴							
RCT, min	27,8	27,2	29,9	27,8	0,2	1,6	2,1
k ₂₀ , min	6,82	6,75	7,27	7,54	0,6	1,7	0,2
a ₃₀ , mm	13,7	11,5	5,82	13,6	0,7	0,2	2,6
a ₄₅ , mm	35,9	36,3	30,4	34,9	0,5	1,5	1,7
a ₆₀ , mm	45,9	46,3	41,6	44,2	0,7	2,2	1,0
Parametri di modellizzazione CF _t ⁵							
RCT _{eq} , min	28,0	27,6	30,1	28,0	0,2	1,4	2,0
CF _p , mm	7,37	7,15	6,91	6,88	0,5	1,1	0,7
k _{CF} , %/min	53,2	53,3	51,1	52,4	0,9	0,3	0,0

¹CTR= dieta controllo priva di aglio; ALL = dieta integrata con 2 g/d di solfuro di allile; A100 = dieta integrata con 100 g/d di aglio naturale; A400 = dieta integrata con 400 g/d di aglio naturale.

²Produzione giornaliera per singola mungitura.

³SCS = 3 + log₂ (SCC/100).

⁴RCT = tempo di gelazione; k₂₀ = tempo di rassodamento; a₃₀ (a₄₅, a₆₀) = consistenza del coagulo dopo 30 (45, 60) min dall'inserimento del caglio.

⁵RCT_{eq} = RCT stimato con l'equazione di modellizzazione CF_t (min); CF_p = valore potenziale asintotico della consistenza del coagulo a tempo infinito (mm); k_{CF} = tasso costante di consistenza del coagulo (min⁻¹).

*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001

Questo studio è il primo a focalizzarsi sulla relazione tra l'integrazione di aglio nella dieta delle bovine e le relative conseguenze sulla qualità e la coagulazione del latte, e non vi sono studi in letteratura che abbiano già affrontato l'argomento. Tuttavia nel lavoro svolto su 85 allevamenti da

Bittante *et al.* (2015) è stata presa in considerazione l'influenza di 4 diverse tipologie di alimentazione (tradizionale, moderno senza carro miscelatore, moderno con carro miscelatore basato sull'uso di insilati o a secco) sui parametri qualitativi, di coagulazione tradizionale e di modellizzazione del latte. Tra le fonti di variazione testate per i parametri CF_t , il sistema di allevamento che ha mostrato le differenze più grandi è stato quello tradizionale rispetto le altre 3 tipologie moderne, con queste ultime che hanno evidenziato velocità di gelazione e sineresi maggiore. Tra le tipologie moderne, l'uso del carro miscelatore ha prodotto una t_{max} maggiore a causa di un k_{CF} più elevato.

Inoltre, nello studio condotto da Verdier *et al.* (1995), sono state analizzate le differenze nei formaggi ottenuti da 9 campioni di latte prodotti da vacche di 3 razze diverse (3 x 3; Frisona, Montbéliarde e Tarentaise) sulla base della dieta somministrata inserendo rispettivamente *Dactylis Glomerata*, insilato di loietto o di mais. L'introduzione nella dieta dell'insilato di mais ha portato ad un aumento della resa casearia rispetto alle altre due diete: il risultato è stato dovuto alla maggior concentrazione di grasso e proteina nel latte delle vacche alimentate con questa dieta. Il trattamento con *Dactylis Glomerata* ha determinato una riduzione significativa di sostanza secca nel formaggio rispetto a quelli ottenuti con le altre diete. Inoltre, il formaggio prodotto tramite l'uso di insilato di loietto nella dieta è risultato più giallo rispetto alle altre diete: il colore giallo della cagliata è strettamente relazionato ai carotenoidi nel latte provenienti dai prodotti alimentari più o meno assorbiti nel rumine sulla base della composizione delle membrane lipidiche nel latte (Hay, 1993).

Sulle stesse razze, Verdier *et al.* (1998) hanno svolto un'analisi relativa alle caratteristiche dei formaggi ottenuti da diete delle vacche da latte con aggiunta di foraggio insilato o fieno. Il tipo di dieta ha condizionato notevolmente le proprietà del formaggio ed, in particolare, la dieta a base di fieno ha determinato un aumento della resa casearia. Inoltre, a conferma di ciò che è stato detto precedentemente, il formaggio di vacche alimentate con foraggio insilato è risultato essere più giallo e con sentori organolettici vicini all'amaro. Tale aspetto si può ritrovare anche nello studio svolto da Carpino *et al.* (2004) su un'analisi condotta sul formaggio Ragusano.

In Tabella 8 sono presentati i risultati relativi all'analisi della varianza dei caratteri raccolti nel processo di caseificazione. Il modello lineare utilizzato ha considerato gli effetti fissi della tesi (addizione di aglio nella dieta), della covariata SCS e della caldaia: come già visto in Tabella 6, nel modello è stata inserita come covariata l'effetto del SCS per correggerlo dalle situazioni di infiammazione mammaria che abbiamo riscontrato durante la prova. L'effetto delle cellule somatiche è risultato significativo per la maggior parte dei caratteri considerati, in particolare per quanto riguarda le rese casearie, le rese teoriche e le rese giornaliere ($P < 0,01$).

Tabella 8. Analisi della varianza (*F-value* e significatività) per la resa casearia e le altre variabili misurate nel processo di caseificazione

Variabile ¹	EFFETTI FISSI			EFFETTI RANDOM (RM) ³			RMSE ⁴
	Tesi	SCS ²	Caldaia	Animale*Periodo	Data caseificazione(periodo)	Periodo	
Resa casearia, %							
Resa classica	0,3	13,5**	1,4	1,07	0,56	0,46	0,56
Resa in sostanza secca	0,2	14,8**	0,9	0,75	0,10	0,00	0,15
Ritenzione idrica acqua	0,3	6,8*	1,7	0,48	0,57	0,45	0,39
Resa teorica ed efficienza, %							
Resa teorica classica	0,3	15,7**	1,3	1,52	0,22	0,00	0,33
Resa teorica sostanza secca	0,3	15,7**	1,3	0,77	0,11	0,00	0,17
Efficienza resa classica	1,1	9,7*	3,0	0,03	0,05	0,03	0,02
Efficienza resa sostanza secca	1,0	0,3	1,1	0,01	0,00	0,00	0,01
Recuperi nella cagliata, %							
REC _{PROTEINA}	0,1	1,2	0,6	1,56	0,00	0,00	0,47
REC _{GRASSO}	0,1	1,6	0,5	3,17	0,29	0,00	0,79
REC _{SOSTANZA SECCA}	0,2	12,3**	0,8	3,00	0,47	0,00	0,77
REC _{ENERGIA}	0,1	8,4*	1,1	3,35	0,40	0,00	0,61
Produzione giornaliera individuale, kg×d ⁻¹							
Resa giornaliera classica	0,9	22,3**	0,5	0,00	0,00	0,00	0,41
Resa giornaliera sostanza secca	0,7	15,1**	0,4	0,14	0,03	0,03	0,19
Ritenzione idrica acqua	0,5	9,9*	0,7	0,00	0,14	0,03	0,23

¹Resa teorica classica = $(0,93*\%fat + \%casein - 0,1)*1,09/[100-\%M]/100$; Resa teorica sostanza secca = $0,93*\%fat + \%casein - 0,1$; Efficienza resa classica = resa classica/ resa teorica classica; Efficienza resa sostanza secca = resa in sostanza secca/ efficienza resa sostanza secca; REC_{PROTEINA}= recupero di proteina nella cagliata; REC_{GRASSO} = recupero di grasso nella cagliata; REC_{SOSTANZA SECCA}= recupero di sostanza secca nella cagliata; REC_{ENERGIA}= recupero di energia nella cagliata.

²SCS = $3 + \log_2 (SCC/100)$.

³RM = gli effetti random sono espressi nell'unità di misura della variabile dipendente.

⁴RMSE = Root means square error.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Il contenuto in cellule somatiche ha inoltre influenzato i recuperi di sostanza secca ($P<0,01$) e di energia nella cagliata ($P<0,05$).

La caldaia utilizzata per le operazioni di mini-caseificazione è stata inserita nel modello per valutare la ripetibilità del metodo di caseificazione utilizzato. Essa è risultata essere statisticamente non significativa per tutte le variabili considerate, a testimonianza che la metodica proposta presenta un'ottima ripetibilità tra le differenti caldaie utilizzate. Tra i fattori random inseriti nel modello, quello che ha inciso maggiormente sulla variabilità dei caratteri è l'effetto dell'animale*periodo. In particolare, nella nostra prova, l'effetto dell'animale*periodo descrive il 58% della variabilità della resa classica e il 94% della variabilità della resa in sostanza secca, della resa teorica classica e della resa teorica in sostanza secca. L'effetto considerato è risultato essere importante anche per i recuperi: descrivendo il 92% della variabilità dei recuperi di proteina e di sostanza secca, il 93% della variabilità dei recuperi di grasso e il 95% della variabilità dei recuperi di energia nella cagliata. L'effetto della data di caseificazione entro periodo ha evidenziato valori leggermente più bassi sia per la ritenzione idrica che per l'efficienza della resa teorica (35 % e 49% rispettivamente). Il periodo, invece, ha mostrato dei valori molto più bassi rispetto agli altri fattori random inclusi nel modello.

Passando all'effetto oggetto di studio, l'inserimento dell'aglio nella dieta di vacche da latte non ha provocato alcun effetto sui parametri misurati durante il processo di caseificazione confermando quanto osservato già per i caratteri qualitativi e di coagulazione del latte.

Per quanto riguarda le produzioni di formaggio giornaliero, abbiamo osservato dei valori alti per il RMSE, come conseguenza di quanto osservato per la produzione di latte (Tabella 6).

Le *LS-Means* relative all'effetto dovuto all'aggiunta di aglio nella dieta delle bovine nei confronti dei caratteri rilevati durante la caseificazione sono riportate in Tabella 9: nessun contrasto testato è risultato significativo a conferma che l'uso dell'aglio non influenza i caratteri di caseificazione. L'aggiunta di 400 g/d di aglio naturale nella dieta ha portato ad un aumento trascurabile delle tre rese rispetto ad una razione priva dell'additivo in questione. In particolare la resa classica è stata di 13,34% nella dieta con la dose massima di aglio rispetto a 12,60% nella dieta controllo mentre la resa in sostanza secca è stata del 6,80% nel primo caso e 6,49% nel secondo; infine la ritenzione di acqua è stata di 6,48% e 6,12% rispettivamente per la dieta con 400 g/d di aglio e la dieta controllo. Le altre dosi di aglio hanno presentato valori di rese leggermente maggiori (e non significativamente differenti) rispetto a quella controllo (Tabella 9).

Tabella 9. *LS-Means* e relativi contrasti per l'effetto dell'aggiunta dell'aglio nella dieta¹ delle bovine sulla resa casearia e altre variabili misurate durante il processo di caseificazione

Variabili	CTR		AGLIO		Contrasti (F- e P-value)		
	ALL	Aglione naturale		Controllo vs Aglione	ALL vs A100-400	A100 vs A400	
		A100	A400				
Produzione giornaliera ² , kg/d	16,7	17,1	16,7	16,9	0,1	0,4	0,0
Resa casearia, %							
Resa classica	12,6	12,7	12,8	13,3	0,3	0,2	0,4
Resa in sostanza secca	6,49	6,47	6,44	6,80	0,0	0,1	0,5
Ritenzione idrica acqua	6,12	6,37	6,30	6,48	0,7	0,0	0,2
Resa teorica ed efficienza, % ³							
Resa teorica classica	12,8	12,9	12,9	13,7	0,1	0,2	0,5
Resa teorica sostanza secca	6,55	6,58	6,57	6,97	0,1	0,2	0,5
Efficienza resa classica	0,99	1,01	0,99	0,97	0,0	2,6	0,6
Efficienza resa sostanza secca	0,99	0,98	0,98	0,98	2,7	0,0	0,3
Recuperi nella cagliata, % ⁴							
REC _{PROTEINA}	77,1	76,9	76,8	77,4	0,0	0,1	0,2
REC _{GRASSO}	86,6	87,0	86,2	86,9	0,0	0,1	0,1
REC _{SOSTANZA SECCA}	51,1	50,7	50,6	52,1	0,0	0,1	0,4
REC _{ENERGIA}	68,0	68,2	67,7	69,1	0,0	0,0	0,4
Produzione giornaliera individuale, kg×d ⁻¹							
Resa giornaliera classica	4,17	4,14	4,29	4,47	0,6	1,5	0,7
Resa giornaliera sostanza secca	2,15	2,08	2,18	2,29	0,1	1,4	0,7
Ritenzione idrica acqua	2,03	2,08	2,10	2,17	1,0	0,3	0,3

¹CTR= dieta controllo priva di aglio; ALL = dieta integrata con 2 g/d di solfuro di allile; A100 = dieta integrata con 100 g/d di aglio naturale; A400 = dieta integrata con 400 g/d di aglio naturale.

²Produzione giornaliera per singola mungitura.

³Resa teorica classica = $(0,93*\%fat + \%casein - 0,1)*1,09/[100-\%M]/100$]; Resa teorica sostanza secca = $0,93*\%fat + \%casein - 0,1)*1,09$; Efficienza resa classica = resa classica/ resa teorica classica; Efficienza resa sostanza secca = resa in sostanza secca/ efficienza resa sostanza secca.

⁴REC_{PROTEINA}= recupero di proteina nella cagliata; REC_{GRASSO} = recupero di grasso nella cagliata; REC_{SOSTANZA SECCA}= recupero di sostanza secca nella cagliata; REC_{ENERGIA}= recupero di energia nella cagliata.

Per quanto riguarda i recuperi, come si può vedere in Tabella 9, non ci sono stati dei cambiamenti significativi sulla base della tipologia di dieta somministrata: si è osservato, comunque, valori più bassi di recupero di proteina nella cagliata nella dieta con 100 g/d di aglio e con solfuro di allile rispetto alla dieta controllo. Il recupero di grasso è risultato leggermente più

alto utilizzando la dieta con solfuro di allile e con 400 g/d di aglio, riportando dei valori rispettivamente di 87,0% e 86,9% rispetto a 86,6% nella dieta controllo. Lo stesso andamento lo si è riscontrato con i recuperi di energia nella cagliata: la dieta controllo ha determinato il 68,0% di recupero di energia, mentre la dieta con solfuro di allile il 68,2% e la dieta con 400 g/d di aglio il 69,1 %. Infine, il recupero di sostanza secca nella cagliata è risultato inferiore nella dieta con solfuro di allile e con 100 g/d di aglio rispetto a quella controllo, a differenza della somministrazione di 400 g/d di aglio che ha evidenziato un aumento di un punto percentuale.

5. CONCLUSIONI

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di verificare l'eventuale influenza dell'aggiunta dell'aglio nella dieta nei confronti dei caratteri che descrivono la qualità, la coagulazione e la caseificazione del latte bovino. La somministrazione di aglio nella dieta non ha determinato alcun effetto significativo per i caratteri qualitativi del latte, ad eccezione di una leggera riduzione della proteina. I parametri di coagulazione tradizionale, di modellizzazione e di caseificazione non hanno riportato dei cambiamenti significativi con l'inserimento dell'aglio nella dieta. Pertanto, a questi dosaggi e relativamente ai parametri valutati, non è stata riscontrata alcuna differenza nell'impiego *in vivo* di questo additivo sui caratteri qualitativi, sulla coagulazione e sulla caseificazione del latte bovino. Questo risultato, in relazione all'importanza del uso dell'aglio nell'alimentazione bovina per la riduzione delle emissioni di metano nell'atmosfera, assicura la possibilità di utilizzo di questo additivo senza il peggioramento della qualità tecnologico-casearia del latte. La fase successiva sarà quella di valutare l'effetto dell'aglio nei confronti della qualità organolettico-sensoriale del latte ma soprattutto del formaggio prodotto nella presente prova sperimentale. Sicuramente si rendono necessari ulteriori studi *in vivo* con l'obiettivo di aumentare il numero di animali coinvolti nella prova per confermare i risultati ottenuti nel presente lavoro.

6. BIBLIOGRAFIA

- **Adewumi O.O., Idowu, O.M., 2014.** Physicochemical, Microbial load and Sensory properties of milk, yoghurt with or without garlic. Department of Animal Production and Health, Federal University of Agriculture, Abeokuta, Ogun State.
- **Ali A.K.A and Shook G.E., 1980.** An Optimum Transformation for Somatic Cell Concentration in Milk. *J. Dairy Sci.* 63: pp. 487-490.
- **Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y., 2001.** Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition* 131: pp. 955-962.
- **Ankri S, Mirelman D., 1999.** Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2: pp. 125-129.
- **Ariga T., Seki T., 2006.** Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: A review. *Biofactors* 26: pp. 93-103.
- **Bannink A., France J., López S., Gerrits W.J.J., Kebreab E., Tamminga S., Dijkstra J., 2008.** Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 143 (2008), pp. 3–26.
- **Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A., Beauchemin K.A., 2008.** A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim Feed Sci Technol.*;145: pp. 209-228.
- **Benchaar, C., C. Pomar, and J. Chiquette, 2001.** Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modeling approach. *Can. J. Anim. Sci.* 81, pp. 563-574.
- **Bittante G., Cipolat-Gotet C., Malchiodi F., Sturaro E., Tagliapietra F., Schiavon S., and Cecchinato A., 2015.** Effect of dairy farming system, herd, season, parity, and days in milk on modeling of the coagulation, curd firming, and syneresis of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 98 :2759–2774.

- **Boadi D., Benchaar C., Chiquette J. e Massé D., 2004.** Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84 (3): pp. 319-335.
- **Bobbo T., Cipolat-Gotet C., Bittante G., Cecchinato A., 2016.** The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. *J. Dairy Sci.* 99 (7): pp. 5104-5119.
- **Bodas R., Prieto N., García-González R., Andrés S., Giráldez F. J. e López S., 2012.** Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176, pp. 78-93.
- **Brask M., Lund P., Hellwing A. L. F., Poulsen M. and Weisbjerg M. R., 2013.** Enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in dairy cows fed different forages with and without rapeseed fat supplementation. *Animal Feed Science and Technology*, 184, pp. 67-89.
- **Burt S., 2004.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microb.* 94, pp. 223-253.
- **Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, and C. Kamel. 2005.** Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88: pp. 2508-2516.
- **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007.** Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: pp. 2580- 2595.
- **Cardozo P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005.** Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83: pp. 2572-2579.

- **Cardozo P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel, 2004.** Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82: pp. 3230-3236.
- **Caribu H.P., Suwarno, Agus Susanto, Anuraga Jayanegara, 2016.** Effect of Garlic Extract and Organic Mineral Supplementation on Feed Intake, Digestibility and Milk Yield of Lactating Dairy Cows. *Asian Journal of Animal Sciences*, pp. 2-6.
- **Carpino S., Horne J., Melilli C., Licitra G., Barbano D.M., Van Soest P.J., 2004.** Contribution of Native Pasture to the Sensory Properties of Ragusano Cheese. *J. Dairy Sci.* 87: pp. 308-315.
- **Caserini S., 2015.** Cambiamenti climatici e sicurezza alimentare. *Ingegneria dell’Ambiente*. Vol. 2, n.1/2015.
- **Cassando M., Mele M. and Stefanon B., 2013.** Review article. Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Italian Journal of Animal Science*, 12:e73, pp. 450-458.
- **Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. Bruyne, N. Hermans, J. Totte’, L. Pieters, and A. J. Vlietinck, 2002.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79: pp. 213-220.
- **Cipolat-Gotet, C., A. Cecchinato, M. De Marchi, M. Penasa, and G. Bittante., 2012.** Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 95:6806-6819.
- **Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M. and Bittante, G., 2013.** Factors affecting variation of different measures of cheese yield and nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *J. Dairy Sci.* 96: 7952-7965.
- **Crovetto G. M. e Sandrucci A., 2010.** Allevamento animale e riflessi ambientali. Editore a cura della Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche, Brescia, pp. 1-5.

- **De Rosa, M., A. Gambacorta, and A. Gliozzi, 1986.** Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol. Rev.* 50: pp. 70-80.
- **Dohme, F., Machmuller A., Wasserfallen A., Kreuzer W., 2000.** Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Can. J. Anim. Sci.* 80: pp. 473–482.
- **Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, pp- 308-316.
- **EPA (Environmental Protection Agency), 2015.** National Greenhouse gas Emission data. Draft inventory for U.S. Greenhouse Gas Emission and Sinks: 1990-2013, chapter 6 (Agriculture). February 2015, pp. 1-5.
- **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation), 2013.** Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production. A review of technical options for non-CO₂ emissions. Editors Gerber P. J., Henderson B. and Makkar H. P. S., Roma.
- **Farbman K.S., Barnett E.D., Bolduc G.R., Klein J., 1993.** Antibacterial activity of garlic and onions: a historical perspective. *Pediatric Infectious Disease Journal* 12:pp. 613-614.
- **Feldberg, R. S., S. C. Chang, A. N. Kotik, M. Nadler, Z. Neuwirth, D. C. Sundstrom, and N. H. Thompson, 1988.** In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob. Agents Chem.* 32: pp.1763–1768.
- **Ferre D., M. Banjac, S. Calsamiglia, M. Busquet, C. Kamel, and G. Avgustin, 2004.** The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia Microbiol. (Praha)* 49: pp. 151-155.
- **Flachowsky G. and Lebziern P., 2012.** Effects of phytochemical substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for research process. *Animal Feed Science and Technology*, 76, pp. 70-77.

- **Greathead H., 2003.** Plant and plant extract for improving animal productivity. Proc. Nutr. Soc. 62, pp. 279-290.
- **Griffin S. G., Wyllie S. G., Markham J. L., Leach D. N., 1999.** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour Fragr. J. 14: pp. 322 -332.
- **Guglielmelli A., 2009.** Studio sulla produzione di metano nei ruminanti: valutazione *in vitro* di alimenti e diete. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli. Italia.
- **Hay RJM, 1993.** Colour and flavour changes in milk through pasture breeding. In: Mi/kfat flavour forum, summary of proceedings. Palmerston North, New Zealand, 32-35.
- **Hino T., Russell J. B., 1985.** Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. Appl. Environ. Microbiol. 50: pp- 1368-1374.
- **Hristov A. N., Oh J., Firkins J. L., Dijkstra J., Kebreab E., Waghorn G., Makkar H. P. S., Adesogan A. T., Yang W., Lee C., Gerber P. J., Henderson B. and Tricarico J. M., 2014.** Special Topic- Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. a review of enteric methane mitigation options. Journal of Animal Science 91, pp. 5045-5069.
- **IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2014.** Mitigation of Climate Change, chapter 11. www.ipcc.ch/report/ar5/wg3.
- **IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007.** Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Cambridge University Press.

- **Janssen P. H., 2010.** Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160, pp. 1-22.
- **Johnson D. E., Ward G. M., Ramsey J. J., 1996.** Livestock methane: Current emissions and mitigation potential. Pages 219–233 in *Nutrient Management of Food Animals to Enhance and Protect the Environment*.
- **Johnson K. A. and Johnson D. E., 1995.** Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, pp. 2483-2492.
- **Kamra D.N., Agarwal N., Sakthivel P.C., Chaudhary L.C., 2012.** Garlic as a rumen modifier for eco-friendly and economic livestock production, *Journal of Applied Animal Research*, 40:2, pp. 90-96.
- **Kamra, D. N., Patra A.K., Chatterjee P.N. Chatterjee, Ravindra Kumar, Neeta Agarwal and Chaudhary L.C., 2008.** Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of rumen of buffalo: a brief overview. *Australian J. Exp. Agriculture*, 48, pp. 175-178.
- **Kamra, D., 2005.** Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, vol.89, pp. 1, 10.
- **Knapp J. R., Laur G. L., Vadas P. A., Weiss W. P. and Tricarico J. M., 2014.** Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97, pp. 3231-3261.
- **Krehbiel CR., Rust SR., Zhang G., and Gilliland SE., 2003.** Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J Anim Sci.* 81: pp. 120-132.
- **Kung, L., Jr., K. A. Smith, A. M. Smagala, K. M. Endres, C. A. Bessett, N. K. Ranjit, and J. Yaissle, 2003.** Effects of 9,10 anthraquinone on ruminal fermentation, total-tract digestion, and blood metabolite concentrations in sheep. *J. Anim. Sci.* 81: pp. 323–328.

- **Lawson L., 1996.** The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. Pages 37-107 in *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*. H. P. Koch, and L. D. Lawson, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- **Leng R. A., 1993.** Quantitative ruminant nutrition - A green science. *Australian Journal of Agricultural Research* 44: pp. 363-80.
- **Malchiodi F., Cecchinato A., Penasa M., Cipolat-Gotet C., Bittante G., 2014.** Milk quality, coagulation properties, and curd firmness modeling of purebred Holsteins and first- and second-generation crossbred cows from Swedish Red, Montbéliarde, and Brown Swiss bulls. *J. Dairy Sci.* 97 :4530–4541.
- **Martin B., Pomiès D., Pradel P., Verdier-Metz I., Rémond B., 2009.** Yield and sensory properties of cheese made with milk from Holstein or Montbéliarde cows milked twice or once daily. *J. Dairy Sci.* 92 (10): pp. 4730-4737.
- **McAllister T. A., Okine E. K., Mathison G. W. and Cheng K.-J., 1996.** Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76 pp. 231-243.
- **Mishra N., Behal K. K., 2010.** Antimicrobial activity of some spices against selected microbes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 2(3): pp. 187-196.
- **Moss A. R., Jouany J. P. and Newbold J., 2000.** Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Review article. *Annales de Zootechnie* 49, pp. 231-253.
- **NRC (National Research Council), 2001.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.
- **Newbold C. J., Rode L. M., 2006.** Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International Congress Series* 1293, pp. 138–147.
- **Patra K. A. and Saxena J., 2010.** Review. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, pp. 1198-1222.

- **Prayitno C.H., Suwarno and Subagyo Y., 2014.** Performance of dairy goat fed diets supplemented with garlic powder (*Allium sativum*) and organic mineral. Proceedings of the 2nd Asia Dairy Goat Conference, April 25-27, 2014, Bogor, Indonesia.
- **Qureshi A.M, Hassan S.Y, Sulariya A.M, Rashid A. A., 2011.** Preparation and Nutritional evaluation of Garlic based yogurt, *Sci.Int.(Lahore)*,23: pp. 59-62.
- **Pulina G., Francesconi A.H.D., Mele M., Ronchi B., Stefanon B., Sturaro E., Trevisi E., 2011.** Sfamare un mondo di nove miliardi di persone: le sfide per una zootecnia sostenibile. *Italian Journal of Agronomy*. 6(s2):e7
- **Regu M., Yilma, Z., Seifu, E., 2016.** Effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) powder on chemical composition and sensory property of *Ayib* - Ethiopian cottage cheese, *International Food Research Journal* 23(3): pp. 1226-1232.
- **Ross Z. M., O’Gara E.A., Hill D.J., Sleightholme H.V., and Maslin D.J., 2001.** Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:pp. 475-480.
- **Sato T., Mitaya G., 2000.** The nutraceutical benefit, part IV: garlic. *Nutrition* 16: pp. 787-788.
- **Sherwood L., Klandorf H., Yancey P., 2005.** *Animal Physiology: from Genes to Organisms*, pp. 665-666.
- **Soliva C. R., Amelchanka S. L., Duval S. M. and Kreuzer M., 2011.** Ruminant methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 106, pp. 114-122.
- **Stocco G., C. Cipolat-Gotet C., Gasparotto V., Cecchinato A., Bittante G., 2017.** Breed of cow and herd productivity affect milk nutrient recovery in curd, and cheese yield, efficiency and daily production. *Animal* accepted.

- **Tamminga S., Bannink A., Dijkstra J. and Zom R., 2007.** Feeding strategies to reduce methane loss in cattle. Animal Science Group, Wageningen Ur, Report 34, 1-54.
- **Ultee A., Kets E.P.W., Smid E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 65, pp. 4606-4610.
- **Van Zijderveld S. M., Gerrits W. J. J., Dijkstra J., Newbold J. R., Hulshof R.B. A., Perdok H. B., 2011.** Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. J. Dairy Sci. 94: pp. 4028–4038.
- **Verdier I., JB Coulon J.B., Pradel P., Berdagué J.L., 1995.** Effect of forage type and cow breed on the characteristics of matured Saint-Nectaire cheeses. Lait, 75: pp. 523-533.
- **Verdier I., JB Coulon J.B., Pradel P., Berdagué J.L., 1998.** Effect of forage conservation (hay or silage) and cow breed on the coagulation properties of milks and on the characteristics of ripened cheeses. J. Dairy Sci. 65: 9-21.
- **Wang H.C, Pao J., Lin S.Y., Sheen L.Y., 2012.** Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1271: pp. 44-52.
- **Wang X., Gibson GR., 1993.** Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology 75: pp. 373-380.
- **Yang W.Z., Benchaar C., Ametaj B.N., Chaves A.V., He M.L., McAllister T.A., 2007.** Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. Journal Dairy Sci. 90: pp. 5671-5681.