



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

Profilo organico volatile del formaggio prodotto con latte da
allevamento stallino di fondovalle o da pascolo in malga.

Relatore:

Prof. Giovanni Bittante

Correlatori:

Dott.ssa Flavia Gasperi

Dott. Matteo Bergamaschi

Laureanda:

Elisa Rossi

Matricola n.1155095

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

*Nessuna giornata in cui si è imparato
qualcosa è andata persa.
(David Eddings)*

RIASSUNTO

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di valutare l'effetto dell'alpeggio sul profilo aromatico del formaggio confrontando i composti organici volatili di formaggi prodotti con latte ottenuto da bovine mantenute a fondovalle o mandate in malga nei 3 mesi estivi.

La prova ha comparato due gruppi omogenei di 6 bovine ciascuno dello stesso allevamento destinati a rimanere nell'azienda permanente di fondovalle (gruppo Stalla) o ad andare in alpeggio (gruppo Malga). Entrambi sono stati valutati da giugno a ottobre per esaminare l'omogeneità iniziale dei gruppi sperimentali durante la loro permanenza in stalla, le differenze eventualmente emerse durante l'alpeggio e gli eventuali effetti residui dell'alpeggio dopo il rientro in azienda. I rilievi sperimentali sono stati fatti su base individuale per cui, per ogni variabile studiata sono stati rilevati 60 dati (12 vacche x 5 mesi), salvo eliminazione di qualche outlier. Il campionamento del latte è stato eseguito durante la mungitura serale, per ogni campione sono stati raccolti 2000 mL di latte per ogni animale, in seguito portati, senza l'aggiunta di conservanti, nel laboratorio di "Qualità del Latte" del Dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova, entro 20 ore dal prelievo con l'ausilio di un frigorifero portatile che ha mantenuto i campioni a 4°C durante il trasporto. Dal volume totale utilizzato per diverse analisi, è stata prelevata un'aliquota di 1500 mL per bovina, processata secondo il metodo di micro-caseificazione per l'ottenimento di formaggelle, stagionate poi tre mesi e successivamente macinate. Un campione di formaggio macinato è stato messo in vial di vetro e diviso per tre repliche ciascuno e poi riposto a -80°C prima di eseguire l'analisi dei VOC tramite tecnica HS-SPME-GC-MS nell'Unità di ricerca Qualità Sensoriale della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige. Sono stati analizzati 4 campioni al giorno con le rispettive 3 repliche; per la preparazione dei campioni le vial sono state scongelate un'ora prima dell'analisi e ad ognuna sono stati aggiunti 4 mL di acqua distillata, 50 µL di standard interno e un'ancoretta magnetica. L'identificazione dei composti è avvenuta utilizzando il software del Turbo Mass (PerkinElmer, USA) per confronto tra spettro acquisito e spettro presente in libreria (NIST2014), cercando di trovare nei cromatogrammi composti volatili già studiati in precedenza e di rivelarne altri di nuovi.

Analizzando i cromatogrammi sono stati identificati 72 composti volatili, in particolare dopo l'analisi statistica 22 di loro hanno mostrato una maggiore significatività. Questi composti sono appartenenti principalmente alle famiglie chimiche degli alcoli, degli esteri, dei chetoni, dei terpeni, degli alcheni e degli idrocarburi aromatici. Facendo una valutazione dell'andamento dei VOC in generale, si è osservata una forte crescita delle concentrazioni nei campioni di malga

rispetto a quelli di stalla. Prendendo in considerazione le diverse famiglie di composti volatili, gli acidi non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi. Le aldeidi si comportano in modo simile alla famiglia degli acidi, mostrando un andamento delle due curve molto simile. I chetoni hanno un andamento decrescente da giugno a ottobre e abbastanza simile nelle due curve, intersecandosi in due punti. Per quanto riguarda le famiglie che hanno mostrato l'andamento più significativo nei confronti delle due tesi sperimentali, alcoli, esteri, alcuni alcheni, terpeni e idrocarburi aromatici hanno mostrato un aumento forte nei mesi di alpeggio, con concentrazioni minori nei mesi di giugno e ottobre (prima e dopo l'alpeggio). Questo aumento invece non si è presentato nei campioni di formaggio da latte di bovine mantenute in stalla. I composti volatili che hanno presentato un incremento nel periodo dell'alpeggio sono quindi influenzati dall'alimentazione verde dovuta al pascolo e dal cambiamento di ambiente della mandria.

Questi risultati sono utili a definire le basi scientifiche delle differenze aromatiche fra formaggi di malga e di fondovalle utili per una caratterizzazione, riconoscimento e valorizzazione dei prodotti di malga.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of alpine pasture on the aromatic profile of the cheese, analyzing the volatile organic compounds (VOCs) of cheese produced with milk obtained from cows reared in the permanent farm of the valley and from cows sent to the alpine pasture during the summer period.

The trial has compared two homogeneous groups of 6 Brown Swiss cows: one destined to remain in the permanent farm of the valley (Down group), the second group sent to the summer farm in the highlands (Up group). Both groups were evaluated monthly from June to October to examine the initial homogeneity of the experimental groups during their first month stay in the permanent farm, the differences exerted during the pasture season (from July to September) and any residual effects of the pasture after returning to the permanent farm on October. The experimental controls were made on an individual basis so that, for each variable studied, 60 data were collected (12 cows x 5 months), except for the elimination of some outliers. The milk sampling was done during the evening milking and for each sample 2000 mL of milk of each animal were collected. The transport of the fresh samples, without the addition of preservatives, in the "Milk Quality" laboratory of the DAFNAE Department of University of Padua, was done within the 20 hours from the collection with the aid of a portable refrigerator to maintain the cold chain. From the total volume used for different analyses, an aliquot of 1500 mL per sample was taken and processed according to the model-cheese-making procedure for obtaining small cheeses, those were aged for three months and then grinded for the analyses. A sample of grinded cheese was divided in three replicates and placed in glass vials, then stored at -80°C before performing the analysis of VOCs using HS-SPME-GC-MS technique in the Sensory Quality Research Unit of the Edmund Mach Foundation of San Michele all'Adige. Four samples per day were analyzed with the respective 3 replicates; for sample preparation, the vials were defrosted one hour before analysis and 4 mL of distilled water, 50 µL of internal standard and a magnetic anchor were added to each sample. The identification of the compounds was made using the Turbo Mass software (PerkinElmer, USA) to compare the acquired spectrum and the spectrum present in the library (NIST2014), trying to find in the volatile chromatograms already studied previously and to reveal other new ones.

Analyzing the chromatograms, 72 VOCs were identified and, after the statistical analysis, 22 of them showed a significant effect of the pasture. These compounds mainly belong to the chemical families of alcohols, esters, ketones, terpenes, alkenes and aromatic hydrocarbons.

Making an assessment of the trend of the VOCs total content in cheese, there was a strong growth in concentrations in the samples of cheese from milk coming from the summer temporary farm in highland compared to those from the permanent farm in the lowland. Considering the different families of volatile compounds, the acids did not show significant differences between the two groups. The aldehydes behaved similarly to the acid family, showing a very similar trend of the two curves. Ketones had a general decreasing trend from June to October and quite similar in the two curves, intersecting in two points. As for the families that showed the most significant trend towards the two experimental thesis, alcohols, esters and some alkenes, terpenes and aromatic hydrocarbons showed a strong increase in the months of summer pasture, with lower concentrations in the months of June and October (before and after the pasture). However, this increase did not occur in the cheese samples of cows kept in the permanent farm. The volatile compounds that showed an increase during the period of the mountain pasture are therefore influenced by the green feeding due to grazing and by the change in the environment of the herd.

These results are useful for defining the scientific basis of the aromatic differences between the cheeses from summer and permanent farms. This information can also be useful for the characterization, identification and valorization of highland dairy products.

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUZIONE.....	13
1.1 L'alpeggio di ieri e di oggi.....	13
1.2 Il cambiamento d'ambiente animale e il benessere animale.....	14
1.3 Proprietà, gestione e tecnologia delle malghe.....	15
1.4 L'alimentazione in alpeggio e le sue modifiche.....	17
1.5 Stagionalità dei parti.....	19
1.6 Razza delle bovine.....	21
1.7 Produzione e qualità di latte in alpeggio.....	23
1.8 Alpeggio e prodotti caseari tipici.....	25
1.9 Profilo aromatico dei formaggi di malga.....	27
2. OBIETTIVI DELLA RICERCA.....	31
3. MATERIALI E METODI.....	33
3.1 LA PROVA SPERIMENTALE.....	33
3.1.1 L'azienda di fondovalle.....	33
3.1.2 La malga e l'alpeggio.....	33
3.1.3 Il disegno sperimentale.....	35
3.1.4 Campionamento del latte.....	36
3.1.5 Micro-caseificazione sperimentale.....	36
3.1.6 Campionamento e analisi del formaggio.....	38
3.2 L'ANALISI DEI COMPOSTI VOLATILI.....	38
3.2.1 Descrizione delle tecniche.....	39
3.2.2 Strumentazione usata.....	40
3.2.3 Protocollo analitico: preparazione campione, programmazione corsa gas- cromatografica, sessioni di analisi.....	41
3.3 ANALISI DEI DATI.....	42
3.3.1 Preparazione del dataset.....	42
3.3.2 Analisi statistica.....	43
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	45
4.1 Profilo dei composti volatili nei formaggi.....	45
5. CONCLUSIONI.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	63
SITOGRAFIA.....	76

1. INTRODUZIONE

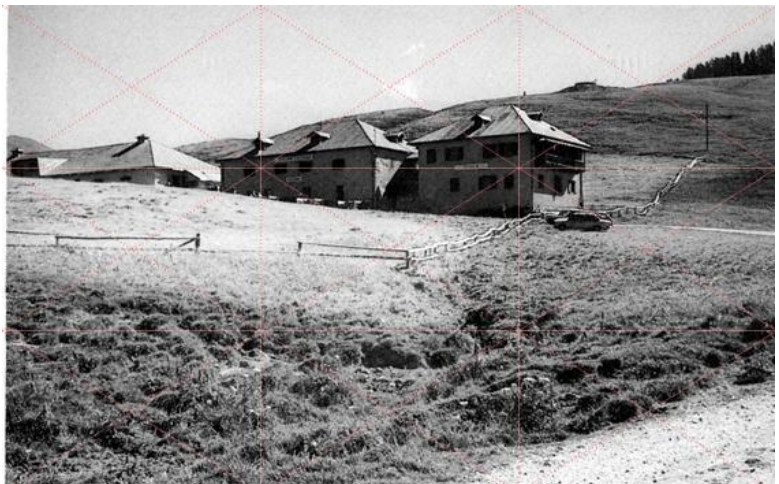
1.1: L'alpeggio di ieri e di oggi

La differenza fondamentale di “facoltatività” dell'alpeggio dai giorni nostri a quelli dei nostri avi è di abissale importanza. Negli anni passati non era concepibile allevare animali in montagna senza ricorrere all'alpeggio, poiché le migliori superfici coltivabili in vicinanza dei villaggi erano utilizzate per produzioni alimentari (cerali, patate, legumi) e le scorte di fieno erano limitate alle produzioni dei maggenghi (prati-pascoli di mezza montagna), come raccolte di “fieno selvatico” nei boschi e pascoli magri di alta montagna o comunque non accessibili al bestiame (Michele Corti). Nel corso del XIX secolo con l'aumento dell'allevamento bovino aumentarono i prati a spese delle coltivazioni e la farina (in genere di mais) veniva acquistata con il provento della vendita del burro e dei vitelli. La “fame” d'erba era comunque tale che inviare i capi all'alpeggio restò a lungo una necessità stringente. E', infatti, risaputo che nei secoli l'uomo ha dovuto dissodare terreni incolti per ricavarci le risorse per vivere, così nelle valli Alpine furono sfruttate le zone di pascolo per le mandrie fino all'erba dei più impervi prati in cima alle montagne.

La monticazione estiva, nota anche come *malga* (esempio in *Figura 1*) è una fase agricola temporanea in cui la mandria del bestiame viene spostata sui pascoli alpini per poter sfruttare il foraggio d'alta montagna. Quasi tutti gli allevatori trasferiscono le manze e le giovenche in alpeggio, ma gran parte di essi sposta anche le vacche in lattazione (Sturaro *et al.* 2013a). Gli

Figura 1: Malga Juribello nel 1984.

aspetti che più la caratterizzano fanno riferimento all'essenzialità recata all'ambiente, al paesaggio, alle condizioni idro-geologiche che si aggiungono all'importanza del legame creato tra i prodotti tipici di qualità e il territorio da cui derivano. La pratica della transumanza è declinata nelle recenti decadi (Mack



et al. 2013; Sturaro *et al.* 2013b), seguendo il processo generale di intensificazione dell'agricoltura nelle aree produttive e l'abbandono delle aziende nelle aree marginali (García-Martínez *et al.* 2009; Bernuès *et al.* 2011; Strijker 2005). Da una parte si è verificata una concentrazione dell'allevamento bovino in vere e proprie imprese agricole in grado di disporre di superfici

foraggiare relativamente ampie, dall'altra è diventato possibile acquistare sul mercato gli alimenti per il bestiame svincolando l'allevamento dalla base foraggera (Michele Corti). Studi sulla sostenibilità della malga hanno riportato l'effetto dell'abbandono o dell'intensità del pascolo sulla biodiversità del cotico erboso (Parolo *et al.* 2011), il potenziale effetto mitigante della pastura estiva sull'ambiente di allevamento (Penati *et al.* 2011; Guerci *et al.* 2014), l'effetto del movimento sulla salute e sul benessere animale (Mattiello *et al.* 2005; Corazzin *et al.* 2010; Comin *et al.* 2011), sulla loro produzione e sulla qualità del latte (Bovolenta *et al.* 1998, 2009; Leiber *et al.* 2006; Romanzin *et al.* 2013; Farruggia *et al.* 2014), che sono importanti questioni poiché questo è spesso trasformato in prodotti a elevata qualità.

1.2: Il cambio d'ambiente e il benessere animale

L'alpeggio ha molti effetti positivi sul benessere animale, innanzitutto offre la possibilità di muoversi ed eseguire ginnastica funzionale (*Figura 2*), aspetto importante data la diffusione della stabulazione fissa nelle zone montane, migliora la salute degli unghioni che diventano più duri,

Figura 2: Bovine libere al pascolo.



importante per le bovine che provengono dalle stalle libere e oltre a ciò da la possibilità di esprimere i comportamenti tipici di specie. Per di più, all'animale dà la possibilità di alimentarsi con l'erba, alimento non disponibile in stalla e consente all'allevatore di poter raccogliere nel fondovalle il fieno necessario per alimentare il bestiame durante l'anno. Un

fattore negativo può essere quello del trasporto degli animali, ormai più della metà delle malghe viene raggiunta con gli automezzi grazie alle opere di miglioramento stradale, per cui va considerato che lo stress dovuto al trasporto, può ripercuotersi negativamente sul benessere e sulla salute degli animali; solo in alcune malghe viene effettuata la transumanza a piedi come veniva fatta anni addietro, permettendo alle bovine il consumo del pascolo intermedio prima di arrivare in malga. Va tenuto presente che, ogni volta che si verificano dei cambiamenti nella routine dell'animale e della mandria, anche se si passa da una situazione peggiore ad una migliore, è richiesto uno sforzo di adattamento ad un ambiente nuovo (Ferrante *et al.*, 1997), che nel caso dell'alpeggio implica anche un cambiamento sostanziale del regime alimentare e dell'ambiente

sociale (Mattiello *et al.*, 2004). Per quanto riguarda il cambio di ambiente sociale, va considerato che gli animali che vanno ad utilizzare uno stesso alpeggio, molto spesso provengono da diverse stalle di fondovalle; è noto che il rimescolamento di individui di diversa provenienza può causare stress sociale, infatti quando si uniscono gruppi di animali che non hanno mai avuto contatti tra loro devono essere instaurate nuove relazioni, mettendo in discussione anche i rapporti gerarchici pre-esistenti tra gli individui di uno stesso gruppo. Non da ultimo è il cambio di clima, talvolta ostico, con temperature mediamente basse e soggette ad ampie escursioni, forti venti, elevato irraggiamento solare e ridotta pressione parziale dell'ossigeno (Zemp *et al.*, 1988a). E' quindi importante fornire agli animali la possibilità di riparo dal vento o dai temporali, ma anche fornire zone di ombra per proteggersi da un eventuale eccessivo irraggiamento solare soprattutto nelle ore più calde (Redbo *et al.*, 2001); se tutti questi fattori non sono presi in considerazione, il benessere degli animali può essere compromesso. D'altronde in alpeggio i bovini beneficiano di un clima più fresco rispetto a quello del fondovalle, inoltre, l'altitudine unita alla maggior possibilità di movimento, può indurre delle modificazioni nei livelli plasmatici del metabolismo, il cui effetto a lungo termine si ripercuote positivamente sulla salute e sulla longevità delle bovine; infatti, è stato osservato che le manze che trascorrono una o due estati in alpeggio presentano mediamente una lattazione in più rispetto a manze della stessa mandria mantenute a fondovalle (Ruhland *et al.*, 1999). Il cambio di ambiente coinvolge anche un cambio nella routine di mungitura date le strutture spesso non ottimali e non in grado di garantire gli standard igienici, per cui è stato studiato che in alpeggio si assiste a un aumento del numero di cellule somatiche e della carica batterica del latte, con annesso aumento del rischio di mastite (Regi, 1987; Lamarche *et al.*, 2000; Busato *et al.*, 2000; Baroni *et al.*, 2006), anche per la diffusione d'infezioni mammarie contagiose. Un'altra complicazione è il calo del peso delle bovine durante il periodo di monticazione, visto come lo scadimento delle condizioni fisiche accompagnato dal calo di produzione, probabilmente attribuibile al maggior esercizio fisico e al ridotto apporto proteico ed energetico, è da notare, infatti, che anche fornendo un'integrazione alimentare, è spesso difficile compensare i cali di produzione (Berry *et al.*, 2001).

1.3: Proprietà, gestione e tecnologia delle malghe

In uno studio di Sturaro *et al.* (2013), sono raccolti dei dati riguardanti la struttura e la tecnologia presente nelle malghe, la composizione e gestione della mandria e le pratiche ambientali e imprenditoriali utilizzate. Le malghe considerate sono divise in due gruppi creati sulla

base delle loro caratteristiche strutturali e tecniche: nel primo gruppo la proprietà è per lo più dei comuni e le altre delle istituzioni pubbliche, in cui queste unità contengono strutture rinnovate e attrezzature moderne, mentre le malghe dell'altro gruppo sono per la maggior parte private e quindi spesso includono strutture ed equipaggiamenti obsoleti. La composizione e gestione della mandria è molto intensiva nella proprietà pubblica, mentre le caratteristiche ambientali e imprenditoriali del pascolo differiscono solo marginalmente. La variabilità socio-economica, stimata con un approccio multi-variabile, è maggiore per le malghe pubbliche, mentre il legame tradizionale e stretto tra la gestione delle malghe e l'ottimale conservazione dei pascoli è stato perturbato. La conoscenza dei sistemi di allevamento locale e i servizi che forniscono, sono necessari invece per elaborare politiche efficaci per l'agro-sistema delle Alpi (Van Huylenbroeck and Durand, 2003). La modernizzazione e l'intensificazione delle pratiche agricole nelle decadi seguenti hanno portato alla concentrazione delle stalle nelle aree più produttive, lasciando aree marginali e abbandonate, in cui il clima e la morfologia dei terreni impedivano l'adozione di pratiche intensive (Bernués *et al.*, 2011; Caraveli, 2000; García-Martinez *et al.*, 2009; Strijker, 2005). Il numero delle stalle è diminuito del 40% tra il 1980 e il 2000 (Streifeneder *et al.*, 2007); le rimanenti hanno subito profondi cambiamenti strutturali e della gestione. In contrasto con le intensive stalle moderne, quelle tradizionali sono oggi riconosciute come risorse di molte positive funzioni (Gibon, 2005), includendo il turismo (Thiene and Scarpa, 2008; Amanor-Boadu *et al.*, 2009), il controllo dell'avanzamento del bosco (Giupponi *et al.*, 2006; Mottet *et al.*, 2006; Cocca *et al.*, 2012), la conservazione della terra e del patrimonio culturale, (Hunziker, 1995; Baudry and Thenail, 2004; Kianicka *et al.*, 2010) e la protezione della biodiversità (Marini *et al.*, 2009, 2011). La remunerazione degli effetti positivi prodotti da queste stalle dovrebbe essere proporzionata con la grandezza dei benefici esterni prodotti (Gellrich *et al.*, 2007). Durante i mesi estivi, mentre il bestiame pascola in altitudine i terreni delle malghe, i prati di pianura e mezza montagna vengono tagliati per produrre le riserve di fieno per l'inverno. Lo stagionale spostamento dell'uomo e della mandria detta il programma delle attività agricole e influenza profondamente le tradizioni culturali delle società rurali nelle Alpi (Dodgshon and Olsson, 2007).

Lo scenario culturale montanaro era caratterizzato da pascoli, costruzioni, fienili, sentieri, recinti e abbeveratoi con un alto valore estetico e naturale, soprattutto in aree in cui altrimenti i boschi sarebbero avanzati (Thiene and Scarpa, 2009; Kianicka *et al.*, 2010; Scarpa *et al.*, 2010). La trasformazione verso sistemi intensivi ha influenzato profondamente il settore del bestiame, infatti lo stato delle malghe è per lo più sconosciuto, poiché sono unità temporanee e non sono

tutt'ora disponibili censimenti come per le stalle permanenti. La tradizione della malga è diventata negli anni importante presidio della parte più alta del territorio montano, sostenere i sistemi tradizionali di allevamento estensivo e i pascoli ad alto valore nutrizionale è tuttora una priorità nelle politiche agricole, riguardanti anche la biodiversità (European Commission 2011a, 2011b) e per questo scopo il mantenimento di questo legame con l'alpeggio è essenziale.

1.4: L'alimentazione in alpeggio e le sue modifiche

Quando le vacche vanno in alpeggio, vi è un cambiamento nella dieta, un aumento del dispendio energetico dovuto al movimento associato all'attività di pascolo, nuove interazioni con individui sconosciuti provenienti da altre aziende e un generale bisogno di adattamento a un diverso ambiente. In questo periodo le bovine sono costrette ad ambulare per lunghe distanze, spesso in pendenza, pietrosi pendii ricoperti di arbusti, che possono limitare la loro assunzione d'erba e renderle suscettibili ai negativi effetti dell'anossia (Leiber *et al.* 2006). La transumanza estiva dei capi dalle stalle permanenti del fondovalle o di pianura alla malga, comporta un cambiamento dall'allevamento all'interno, in cui le bovine hanno accesso a una costante razione di fieno e mangime o unifeed (Sturaro *et al.* 2013a), all'allevamento all'aperto con l'alimentazione al pascolo e una limitata integrazione. I pascoli alpini sono caratterizzati da una bassa produttività, una stagione vegetativa breve e una proporzionale composizione botanica e chimica (Bovolenta *et al.* 1998). Queste condizioni possono causare uno squilibrio nutrizionale, che a sua volta potrebbe influenzare la produzione, la composizione del latte e di conseguenza la resa casearia. Normalmente si provvede a colmare queste necessità con un supplemento di concentrati (Leiber *et al.* 2006; Bovolenta *et al.* 2009), ma la compensazione del deficit nutrizionale dato dal pascolo è un compito difficile soprattutto perché gli animali sono liberi di muoversi in aree vaste e pascolano distese erbose eterogenee. Molte delle vecchie stalle delle malghe sono state trasformate in sale di mungitura, così le vacche che stanno all'esterno sia di giorno che di notte tornano alla malga solo per la mungitura (Zendri *et al.* 2013). La composizione del mangime qualche volta è modificata durante l'alpeggio per aumentare il contenuto di proteina grezza, in parallelo con la sua diminuzione nell'erba (Leiber *et al.* 2006). Dal punto di vista ambientale e nutrizionale, la transumanza estiva causa stress durante il primo periodo di pascolo (Zemp *et al.* 1989), anche per le vacche provenienti da diverse aziende. Le condizioni stressanti sono confermate da un progressivo calo nella produzione, che porta il rendimento giornaliero a essere quasi dimezzato in quattro mesi, e dal recupero delle funzioni produttive dopo che le vacche tornano in stalla

(Farruggia *et al.* 2014). La diminuzione della produzione di latte nel complesso fa seguito anche alla diminuzione dei depositi di grasso corporeo. E' ben risaputo che i depositi adiposi corporei sono importanti nel mantenimento della produzione a inizio lattazione, ma meno verso la metà e alla fine della lattazione (Roche *et al.* 2009). L'interazione tra la condizione corporea dell'animale e le caratteristiche del cotico erboso determina il comportamento alimentare (Pittroff and Soca, 2006) e la quantità di sostanza secca ingerita dall'erba (HDMI: herbage dry matter intake) (Pittroff and Soca, 2006; Chilibroste *et al.*, 2007; Gregorini *et al.*, 2009). Questa interazione può essere modulata attraverso le pratiche che mirano a gestire l'ingestione di erba (Chilibroste *et al.*, 2007). Soca *et al.* (2014), hanno presentato uno studio sull'influenza della motivazione ad alimentarsi, dell'alterazione del comportamento e delle prestazioni dei ruminanti al pascolo, in conseguenza alla limitazione del tempo al pascolo e all'integrazione con mangime. Questo studio valuta la combinazione di tre lunghezze del tempo al pascolo e di due livelli di apporto di mangime sul comportamento alimentare, sull'assunzione e le performance produttive di vacche da latte. Le misure sono state eseguite su: apporto di sostanza secca dell'erba e sua digeribilità, tempo dedicato al pascolo, alla ruminazione, e al riposo, tasso di masticazione, produzione e composizione del latte, così come cambiamenti nel peso e nel body condition score. La restrizione del periodo di pascolamento aumenta il tempo di permanenza nel prato e la lunghezza del periodo iniziale di pascolo, non influenza l'assunzione totale di erba o la produzione di latte, ma riduce la ruminazione, il tempo di riposo e la concentrazione di grasso nel latte. Il livello d'integrazione di mangime invece riduce il tempo al pascolo non influenzando la ruminazione e il tempo di riposo, mentre il tasso di masticazione è maggiore nelle vacche senza restrizione cui viene dato il livello minore di supplemento di concentrati. Così con quest'aggiunta si riduce l'assunzione di sostanza secca e la totale digeribilità della sostanza organica dell'erba, ma si nota un aumento nella produzione di latte senza effetti sulla sua composizione. Un tempo limitato al pascolo aumenta il livello di fame delle bovine (Gregorini *et al.*, 2009); per esempio, Gregorini *et al.* (2009) hanno segnalato livelli elevati di grelina all'aumento del tempo di restrizione al pascolo. Questa limitazione ha mostrato un aumento a breve termine del tasso HDMI, massa del morso e tasso di morso dei bovini al pascolo (Patterson *et al.*, 1998; Perez-Ramirez *et al.*, 2009; Dobos *et al.*, 2009). L'integrazione di mangime spesso ha effetti negativi sul tasso di assunzione di sostanza secca al livello di pascolamento. Questo effetto negativo riguarda un effetto saziante immediato esercitato dai concentrati (Roche *et al.*, 2007), i quali riducono la motivazione di alimentarsi nel successivo periodo di pascolamento dopo che è stata data l'integrazione, in questo modo si riducono il tempo

di consumo e di pascolamento successivi (Krysl and Hess, 1993; Soca, 2006). Nonostante la riduzione nel pascolamento, il supplemento di concentrati può essere usato strategicamente o per sostituire l'erba durante un periodo povero di verde e/o per aumentare l'assunzione totale di energia con lo scopo di aumentare la produzione di latte (Bargo *et al.*, 2003). Comunque, sono poche le informazioni su come il comportamento al pascolo e la produzione e composizione del latte sono influenzate dall'interazione di entrambi, pascolamento limitato e livello d'integrazione, che sono tra i più frequenti cambiamenti nell'alimentazione della vacca da latte (Perez-Ramirez *et al.*, 2009). Il tempo ristretto di pascolamento è associato con il cambiamento del comportamento al pascolo e la selettività per soddisfare l'assunzione giornaliera di foraggio (Soca, 2006). Questa plasticità comportamentale aiuta l'animale nel mantenimento delle performance e potrebbe contribuire a ridurre i costi metabolici ed energetici della vacca al pascolo con la restrizione del foraggio.

1.5: Stagionalità dei parti

Durante gli ultimi cinquanta anni, le aziende di vacche da latte sono passate da un sistema tradizionale, in scala ridotta, basato sull'alimentazione a foraggio, verso sistemi più grandi e specializzati, insiemi caseari non stagionali con una dipendenza dal pascolo molto ridotta e un sostanziale aumento nel livello d'integrazione con mangimi (Knaus, 2009; Marini *et al.*, 2011). Poiché l'uso del suolo agricolo è nel complesso limitato ai prati permanenti a causa delle condizioni climatiche e del terreno in gran parte delle Alpi, la maggioranza dei concentrati ha bisogno di essere comprata, rendendo i sistemi caseari alpini ad alto input suscettibili alle fluttuazioni del mercato (Horn *et al.*, 2012; Marini *et al.*, 2011). Inoltre l'effetto ambientale, così come il potenziale di eutrofizzazione ed eco-tossicità dei concentrati sono generalmente più elevati di quelle delle fibre, specialmente del pascolo. Questo alla fine si traduce in un ridotto impatto ambientale dei sistemi di pascolo a basso input (Basset-Mens *et al.*, 2009; Zimmermann, 2006). Allo scopo di ridurre i costi di produzione, la dipendenza da risorse esterne, l'impatto ambientale e l'implementazione di un sito adattato, il sistema di produzione del latte basato sul pascolo potrebbe essere un futuro alternativo anche nelle regioni alpine specialmente nell'agricoltura biologica (Thomet *et al.*, 2011). Così i sistemi a bassi input sono comuni in regioni con temperature e clima ostili e hanno un rapporto sfavorevole tra i prezzi del latte e del concentrato; l'Irlanda e la Nuova Zelanda possono servire come esempi tipici (Hemme, 2012). I sistemi a basso input mirano a ridurre i costi di produzione massimizzando la quantità di latte al

pascolo a basso prezzo da un lato e riducendo al minimo l'uso di costosi mangimi integrativi dall'altro. In queste regioni le mandrie generalmente seguono uno schema di stagionalità riproduttiva al fine di ottenere un utilizzo ottimale del pascolo e una conversione efficiente del foraggio in latte (Dillon *et al.*, 1995; Roche, 2011). La stagionalità, così come lo schema dei parti ha un impatto maggiore sulla produzione del latte e sulla sua composizione, sulla sua fornitura durante tutto l'anno, sulla forma della curva di lattazione, sui cambiamenti nella domanda di mangimi e sulla composizione della razione dell'allevamento (Garcia *et al.*, 2000). Nelle regioni predisposte al pascolo e alla stagionalità produttiva, la stagione di parto è mirata a coincidere con la stagione d'inizio della crescita del pascolo (Dillon *et al.*, 2003). Per questo motivo i parti sono concentrati tra il tardo inverno e inizio primavera e le vacche sono in asciutta durante l'inverno, in modo da abbinare la domanda di cibo della mandria con l'alimentazione al pascolo (Dillon *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2000), in tal modo il contenuto dietetico del pascolo è massimizzato (Dillon, 2006). In confronto ai parti primaverili, quelli invernali comportano una maggiore produzione di latte (Auldsit *et al.*, 1997; Dillon *et al.*, 1995), ma anche una maggiore domanda d'integrazione alimentare con mangimi, che può influenzare la competitività economica (Dillon *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2000). Comunque, differenze meno pronunciate nelle date di parto possono non essere la conseguenza di cambiamenti nella produttività (McCarthy *et al.*, 2013). Le condizioni climatiche più rigide nelle regioni alpine riducono la stagione di crescita dei prati permanenti e richiedono un periodo di alimentazione a fieno più lungo rispetto alle tipiche regioni di produzione di latte stagionale. In uno studio effettuato in Austria, Sud della Germania e Svizzera, le vacche sono portate al pascolo da marzo/aprile fino a ottobre/novembre e nella dieta annuale media è stato raggiunto un contributo del 50-70% dato dall'erba al pascolo (Steinbergeretal, 2012; Steinwiddereetal, 2010; Thomet *et al.*, 2004). Il tipo di vacche utilizzate costituisce un'altra differenza tra i sistemi alpini e tipici basati sulla produzione del latte. In queste zone le vacche da latte per decenni sono state selezionate per vivere a condizioni di bassi input (pascolo). Al contrario, la selezione è avvenuta in condizioni di sistemi di produzione ad alto input e alto rendimento ed è quindi principalmente concentrata sulla produzione del latte per capo, in gran parte dell'Europa, comprese le regioni alpine (Piccand *et al.*, 2013). Di conseguenza, la richiesta di nutrienti e di energia delle vacche da latte selezionate sotto condizione ad alti input, supera probabilmente la fornitura di foraggio, razioni a bassi input, specialmente durante il primo mese di lattazione. Le vacche con diversi meriti genetici per produttività e fitness sono probabilmente differenti nella loro idoneità per il pascolo alpino, per sistemi stagionali a bassi

input (Horn *et al.*, 2013). Nelle regioni alpine un periodo di alimentazione in stalla piuttosto lungo, di cinque o sei mesi, è inevitabile. In un tale sistema, spostare la stagione di parto dalla primavera all'inverno o tardo autunno è una misura per evitare un'eccessiva mancanza di energia e un rischio connesso nell'aumentare la salute e i disordini riproduttivi nei genotipi non adatti ai sistemi di pascolo: la mandria sta in stalla durante il periodo più critico della lattazione, dove viene alimentata con foraggi conservati e concentrati di alta qualità. In uno studio precedente sulle condizioni alpine, è risultato che vi è un aumento della produzione di latte rispetto al parto primaverile, ma la perdita di peso corporeo non viene influenzata (Steinwidder *et al.*, 2011). Nello studio di Horn *et al.* (2012), la data di parto riguardante il turno di pascolo era il fattore che più influenzava la composizione della dieta. I risultati dello studio presentato mostrano che il parto autunnale aumentava la richiesta di mangimi supplementari rispetto al parto primaverile. Il totale consumo di concentrati e la loro proporzione nella dieta diminuivano, mentre la proporzione di foraggio aumentava quando le vacche partorivano all'inizio del periodo di pascolo. Questo è parallelo al decrescere della durata dell'alimentazione con fieno e al concentrato limitato nella razione durante il pascolo. A causa di un periodo in stalla breve, Dillon *et al.* (1995) trovò una riduzione nel totale consumo di concentrati simile a quella riportata per la Bruna, quando è stata spostata la data di parto da fine gennaio a metà marzo. Una ridotta quantità di sostanze nutritive attraverso mangimi complementari può offrire vantaggi ecologici, come un alto livello d'integrazione di mangime porta a un'elevata escrezione di nutrienti e può aumentare il rischio di eutrofizzazione ed ecotossicità, in particolare in un ecosistema sensibile come quello delle Alpi (Basset-Mens *et al.*, 2009; Gruber *et al.*, 1999; Zimmermann, 2006).

1.6: Razza delle bovine

Una volta le bovine che si allevavano nel territorio montano non erano ad alta specializzazione produttiva, bensì erano animali a triplice attitudine, utilizzate soprattutto da lavoro, da latte e carne per il sostentamento della famiglia. Queste bovine erano perciò caratterizzate da un'elevata rusticità, adattabilità all'ambiente e alle condizioni climatiche tante volte avverse, abituate a stare all'esterno dal crescere della prima erba dopo lo scioglimento della neve all'autunno successivo. Esse mostravano una grande adattabilità alle zone impervie, scoscese ed erano in grado di saper ricercare l'alimento anche nei pascoli che, essendo a elevate altitudini non offrivano grandi quantità d'erba. Nei giorni nostri il sistema di allevamento della vacca da latte è molto diversificato nelle regioni montane, dove vengono allevate diverse razze spesso anche

all'interno della stessa azienda (Mattiello *et al.* 2011; Sturaro *et al.* 2013b). Le principali razze allevate sono la Bruna (Brown Swiss), nota per le sue peculiarità nei parametri della caseificazione e la Frisona (Holstein Friesian), le cui caratteristiche produttive sono eccelse, ma, a seguito del miglioramento genetico le capacità di adattamento delle due razze sono in calo, anche per l'aumento della mole dell'animale e la diminuzione della forza negli arti.

L'interazione tra genotipo e la data del parto è indicativa per il totale consumo di concentrati, è ovviamente connessa con la produzione di latte e non può essere separata da quest'ultimo: infatti, da dopo le prime tre settimane alla settimana di lattazione, i concentrati erano integrati secondo la produzione di latte. Le bovine che partorivano nel tardo inverno sono state asciugate verso la fine del periodo di vegetazione e hanno potuto quindi sfruttare al massimo la stagione di pascolo. Questo, indica che la proporzione massima del pascolo nella dieta per vacche in lattazione negli ambienti alpini sarà tipicamente nell'intervallo di 55-60%. L'interazione tra razza e periodo di parto trovata in questo studio indica che una variazione nella data di parto a proposito del periodo di pascolo, non può avere lo stesso effetto con diversi genotipi. La produzione di latte e la produzione di latte solido della Bruna decresceva considerevolmente da 1224 kg a 81 kg, quando era spostato il parto dal tardo autunno all'inizio primavera; al contrario non ci sono stati effetti osservati per la Frisona. Questo può essere parzialmente spiegato dal diverso potenziale genetico per la produzione di latte dei due genotipi: le vacche da latte con alto merito genetico per la produttività rischiano di perdere parte del loro vantaggio nel patrimonio genetico in condizioni a bassi input (Ferris *et al.*, 1999; Horan *et al.*, 2005; Kolver *et al.*, 2002; Veerkamp *et al.*, 1994). Questi risultati indicano che sostanzialmente, un più lungo periodo con alimentazione a fieno e un'elevata integrazione di mangimi associata con il parto in tardo autunno, aiutava la razza Bruna a esprimere al meglio il suo merito genetico per il latte e la produzione di latte solido. Il minor potenziale genetico della Frisona è stato realizzato con bassi apporti di nutrienti e livelli bassi di approvvigionamento energetico. Questo è in linea con la diversa risposta di produzione dei due genotipi ad un aumento dei concentrati. La selezione genetica per la produzione di latte prevede un aumento del latte marginale come risposta delle vacche all'integrazione con concentrati (Kennedy *et al.*, 2002, 2003), probabilmente a causa di un maggior bilancio energetico negativo di vacche ad alto valore genetico (Coulon and Rémond, 1991). In coerenza con i risultati pubblicati da Steinwilder *et al.* (2011), non ci sono effetti tra la data del parto e la media del peso corporeo durante la lattazione. Il peso corporeo della vacca da latte è influenzato dall'età, dalla razza, dal grado di grasso e di riempimento degli stomaci, ma anche dallo

stadio di lattazione, dalla gestazione e dallo stato energetico (Alaweh *et al.*, 2012). Nonostante il cambiamento nel peso non sia l'indicatore più affidabile per il bilancio energetico (Clark *et al.*, 2005; Coffey *et al.*, 2004), un continuo monitoraggio del peso corporeo permette di includere lo stato energetico, per cui animali che perdono peso per periodi di tempo lunghi sono decisamente in uno stato energetico negativo (Alaweh *et al.*, 2012; Jorritsma *et al.*, 2003). E' ben noto che un livello elevato di condizioni corporee con il parto, influenzano il tasso di mobilitazione corporea e quindi la perdita di peso (Friggens *et al.*, 2004). Comunque, la significativa interazione tra la razza e il periodo di parto, per il peso corporeo giornaliero cambia attraverso la lattazione e indica che, diversamente dalla Frisona, la Bruna perde più peso durante la lattazione o non è in grado di recuperarlo fino a fine lattazione. Specialmente per la Bruna questo indica che l'accesso illimitato ai foraggi e un elevato consumo di concentrati durante il periodo in stalla potrebbero non avere ridotto la mobilitazione delle riserve corporee, ma potrebbe aumentare la produzione di latte considerevolmente paragonato agli animali che partoriscono in primavera con un livello minore di consumo di concentrati. Questo supporta l'ipotesi di Friggens *et al.* (2013) e Yan *et al.* (2006) la quale, sostiene che vacche selezionate principalmente per la produttività indirizzano i nutrienti attraverso la produzione di latte piuttosto che verso le condizioni corporee. Nonostante l'ampia gamma di parametri produttivi, riproduttivi e metabolici studiati, e le sostanziali differenze tra i sistemi di allevamento dai quali le due razze provenivano, solo per pochi tipi di vacche sono state trovate interazioni con la dieta. Entrambi i regimi di alimentazione non hanno consentito la realizzazione del potenziale di produzione della Bruna, come è stato indicato dall'elevato picco della risposta della produzione di latte e dal più basso tasso di sostituzione osservato per questa razza. Quindi, sono state riscontrate differenze relativamente piccole in base alla razza nella produzione complessiva di latte. In coerenza con questo, né il bilancio energetico e la mobilitazione dei tessuti corporei, né le performance riproduttive differivano tra i genotipi. Riducendo l'integrazione di concentrati è stato allargato l'intervallo tra l'ingrasso e la quantità di energia richiesta ed è aumentata la mobilitazione dei tessuti immediatamente dopo il parto, ma questo non ha avuto impatto sul BCS.

1.7: Produzione e qualità di latte in alpeggio

In uno studio elaborato da Bergamaschi *et al.* nel 2016, si è evidenziato come la transumanza sia una pratica ancora eseguita in molte aree montane alpine e come sia importante per molte stalle permanenti, per le sue peculiarità, aumentare la produzione di latte e i prodotti

tipici lattiero-caseari, essendo più costosi possano aumentare il reddito aziendale. Questi studiosi hanno notato una forte riduzione (21%) nella resa produttiva dopo essere state spostate le bovine dalla stalla permanente alla malga, che potrebbe essere dovuto a un aumento dello stress in reazione alle condizioni ambientali e ad alimentazione diversa. La produzione di latte durante la stagione di pascolo era quasi costante nella prima fase (luglio), ma più avanti è calata del 15% durante la seconda fase (agosto); questo schema è coerente con gli effetti dell'avanzamento della gravidanza e infine, è stato osservato un effetto positivo sulla produzione di latte nel ritorno alle stalle permanenti (+10%). Un modello simile è stato considerato da *Leiber et al.* (2006) a metà lattazione nelle Brune andate al pascolo in Svizzera, con una decrescita del 27% nell'ECM (energy corrected milk) prodotta dopo lo spostamento dalla pianura al pascolo, e -10% durante la pastura estiva, sebbene non siano stati osservati recuperi della produzione dopo che le vacche sono tornate nei pascoli in pianura. *Zendri et al.* (2016a) hanno monitorato la produzione di latte su 15 aziende nella stessa area dello studio appena citato e hanno studiato un piccolo effetto negativo (-10%) dello spostamento delle vacche in lattazione in malga, un grande decremento nella produzione di latte (-43%) durante la stagione di pascolo e un elevato recupero (+26%) dopo il ritorno nelle stalle permanenti. Le differenze tra questo schema e quello osservato nello studio di Bergamaschi et al. (2016) possono essere parzialmente spiegate dalla diversa composizione di razze nella mandria. In questo lavoro le vacche erano principalmente Brune e razze a duplice attitudine, che per *Zendri et al.* hanno presentato un minore effetto negativo della transumanza estiva sulla produzione di latte della Frisona. E' stato notato un marcato aumento del contenuto di grasso dopo che le vacche si sono spostate in alpeggio, in concomitanza con una sostanziale riduzione della quantità di latte, con il risultato di una diminuzione molto più piccola della produzione di grasso giornaliero. D'altra parte, l'alpeggio ha un minor effetto sulla proteina nel latte e sul contenuto di caseina, con una produzione giornaliera in calo a un livello simile a quello osservato per la quantità di latte. Un aumento nel contenuto di grasso e della relativa stabilità delle proteine e delle caseine è stato osservato da *Leiber et al.*, ma non da *Zendri et al.* Il contenuto di lattosio era in diminuzione all'inizio del pascolo estivo concomitante con un aumento delle cellule somatiche, indicazione di un probabile aumento d'incidenza delle mastiti subcliniche. La diminuzione del contenuto di lattosio e l'aumento delle cellule somatiche (SCS) dopo lo spostamento in malga sono stati osservati anche nel sondaggio guidato da *Zendri et al.* (2013), mentre *Leiber et al.* (2006) hanno trovato solo il decremento del lattosio senza un parallelo aumento delle SCS. In tale studio, l'aumento delle cellule somatiche era probabilmente dovuto alla

concentrazione delle SCS come risultato del calo nella produzione giornaliera di latte piuttosto che un aumento dell'incidenza della mastite subclinica, come la giornaliera escrezione di cellule somatiche con un aumento solo marginale durante l'alpeggio. Prendendo le variazioni osservate nei caratteri qualitativi, il contenuto energetico del latte è stato stimato in aumento del 5% subito dopo l'arrivo al pascolo e poi tornato ai valori precedenti. La produzione giornaliera di energia del latte, comunque, è diminuita del 18% dopo aver spostato le vacche al pascolo e di un altro 14% durante l'estate in alpeggio, per poi recuperare un 14% dopo il ritorno in stalla. Le variazioni nella composizione del latte durante il periodo di pascolo dipendono anche da una contemporanea variazione nella quantità e qualità del grasso disponibile (Buchin *et al.*, 1999; Collomb *et al.*, 2002; Gorlier *et al.*, 2012). Anche se questo studio di Bergamaschi *et al.* (2016), non è stato progettato per quantificare l'assunzione e la composizione di foraggi freschi, è stato possibile per avere qualche indicazione sulla relazione tra il regime alimentare delle vacche e il loro livello produttivo, esaminando le correlazioni tra la quantità e la qualità del foraggio disponibile nell'area del pascolo e nella composizione del latte. Per quanto riguarda la composizione, è stata trovata una tendenza verso una relazione sfavorevole tra la quantità della sostanza secca del foraggio disponibile nei pascoli alpini frequentati dalle vacche, il grasso nel latte e il contenuto di solidi totali. Anche la qualità del foraggio ha influenzato la composizione del latte, poiché esisteva una forte correlazione positiva tra il contenuto lipidico dell'erba e quello del latte e dei solidi totali del latte.

1.8: Alpeggio e prodotti caseari tipici

Vi sono diverse tecniche di caseificazione, la procedura tradizionale usata in alpeggio per produrre formaggio di malga richiede parecchi passaggi. Normalmente il latte della sera è tenuto in un apposito recipiente per la scrematura naturale durante tutta la notte e il giorno dopo questo latte scremato viene mescolato nella caldaia assieme al latte munto la mattina successiva. La separazione per gravità della crema dal latte della sera non solo riduce il grasso del latte e il contenuto di solidi totali (TS), ma concentra leggermente il contenuto di caseina e lattosio; l'effetto principale della scrematura è una notevole riduzione nel contenuto di cellule somatiche del latte serale. La separazione per gravità dovrebbe essere influenzata dal livello di batteri nel latte prima della separazione, dal tempo e dalla temperatura (Caplan *et al.*, 2013). Le immunoglobuline bovine sono coinvolte nel processo di agglutinazione e di raggruppamento dei globuli di grasso nel latte, e possono contribuire alla separazione per gravità dei batteri e delle cellule somatiche (Euber *et al.*, 1984; Caplan *et al.*, 2013). Un alto contenuto di cellule somatiche

può ridurre la resa casearia e aumentare l'attività lipolitica e proteolitica nel latte intero e nello yogurt (Politis and Ng-Kwai-Hang,1988); la scrematura naturale è usata anche nella produzione di formaggi a pasta dura partendo dal latte crudo come via di rimozione dei microbi anti-caseificanti, specialmente i clostridi, che possono causare il gonfiore tardivo del formaggio (Bertoni *et al.*, 2001; Caplan *et al.*, 2013; Feligni *et al.*, 2014). La scrematura naturale non ha effetti sulle tradizionali proprietà coagulative e sulla modellazione dei parametri riguardanti la consistenza del coagulo e la sineresi. Stocco *et al.* (2015) hanno osservato un piccolo effetto della scrematura naturale sui caratteri lattodinamografici nel latte destinato alla produzione del Grana Padano. Mescolare il latte della sera scremato con il latte della mattina, era sfavorevole per la compattezza della cagliata, com'è risultato in una miscela nel contenitore dei due componenti in termini di tempo di coagulazione (RCT) e velocità di presa del coagulo (k_{20}), ma minore in termini di consistenza del coagulo a 30' dall'aggiunta del caglio (a_{30}). Il modello della consistenza della cagliata ha rivelato che entrambe le costanti (compattezza coagulo e sineresi) erano maggiori della media delle due componenti e più simili di quelle del latte intero della mattina, che spiega il potenziale inferiore osservato e la massima compattezza della cagliata. In media, il carattere RCT era buono ed era più corto di quello del latte di Bruna allevate nelle stalle permanenti della stessa provincia (Cecchinato *et al.*, 2013). Gli altri due caratteri tradizionali (k_{20} e a_{30}) erano anch'essi favorevoli per il latte ottenuto durante la transumanza estiva. In una prova sotto condizioni simili, Bovolenta *et al.* (2009) hanno registrato delle proprietà coagulative meno favorevoli di quelle dello studio appena citato, ma hanno anche scoperto che questi caratteri dipendono dalla quantità delle componenti dei concentrati somministrati al pascolo. Un approccio più analitico basato sul modellare tutte le informazioni del lattodinamografo ha rivelato che il potenziale della consistenza della cagliata e la costante di velocità istantanea della cagliata erano simili nel latte di malga e quello derivante dalle stalle permanenti (Bittante *et al.*, 2015). La costante della velocità istantanea era diversa, tuttavia, era molto più lenta nel latte del pascolo, che spiega la maggiore compattezza della cagliata ottenuta anche su intervalli simili. E' possibile notare una più veloce coagulazione del latte della mattina che degli altri tipi. Tuttavia la consistenza della cagliata del latte intero mattutino era minore di quello intero della sera dopo scrematura. In media, il latte nel recipiente (misto) presenta minore consistenza della cagliata in termini di potenziale asintotico e un massimo valore di consistenza della cagliata. Inoltre, questo tipo di latte era caratterizzato da un'alta costante istantanea di rassodamento della cagliata e costante istantanea della sineresi maggiore degli altri tre tipi di latte. Dovrebbe essere indicato che i parametri di consistenza della

cagliata e specialmente del potenziale e del massimo valore di rassodamento, siano relazionati fenotipicamente e geneticamente alla resa del formaggio (Cecchinato and Bittante, 2016). Le proprietà coagulative del latte erano altamente influenzate dalla qualità dell'erba poiché erano correlate negativamente con il contenuto di fibra (NDF), mentre il tempo di coagulazione era correlato positivamente con il contenuto proteico dell'erba.

1.9: Profilo aromatico dei formaggi di malga

In un altro lavoro elaborato da *G. Bittante et al.* (2017), sono state studiate le correlazioni genetiche e l'ereditabilità legata ai caratteri qualitativi e caseari, tra cui l'analisi dei composti volatili (VOC) emanati dai prodotti; per i quali, una comprensione dettagliata dei parametri genetici dell'aroma del formaggio può essere molto interessante per poter, attraverso programmi di miglioramento genetico, modificare le caratteristiche qualitative dei prodotti attraverso una valutazione diretta o indiretta di questi parametri qualitativi. I composti organici volatili (VOC) sono descrittori della qualità sensoriale del cibo, includendo l'aroma (Badings, 1991; Liaw *et al.*, 2011), e possono essere usate diverse tecniche spettrometriche di massa per determinarli. Per esempio, GC-MS (Gas-cromatografia con spettrometro di massa) può essere usato per la determinazione qualitativa e quantitativa delle molecole responsabili dell'aroma (Tunick, 2014). Parecchi studi hanno pubblicato l'effetto della dieta somministrata agli animali, del tipo d'erba e della composizione botanica del pascolo sui VOC e sulle proprietà sensoriali del formaggio (Agabriel *et al.*, 2004; Carpino *et al.*, 2004; Bovolenta *et al.*, 2014). Il latte derivante da vacche al pascolo contiene una serie di composti attivi che potrebbero essere responsabili dell'odore specifico dato dal pascolo al latte e al formaggio (Carpino *et al.*, 2004; Cornu *et al.*, 2009). Le differenze nei caratteri sensoriali del formaggio dipendono dal fatto che il latte derivi da animali in alpeggio oppure da animali che sono stati ripostati in stalla (Martin *et al.*, 2005; Coppa *et al.*, 2011). Il tipo di sistema lattiero-caseario è molto correlato con il prodotto finale, quindi latte e formaggio (Capuano *et al.*, 2015; Giaccone *et al.*, 2016). Studi recenti sono stati incentrati sulla quantificazione degli effetti sui formaggi dei VOC di diversi sistemi caseari, delle caratteristiche individuali degli animali, dell'altitudine della malga e della quantità di concentrati nella dieta (Bovolenta *et al.*, 2014; Bergamaschi *et al.*, 2015a, b). L'analisi dei VOC richiede strumenti rapidi, molto sensibili e possibilmente non distruttivi; è stata condotta su più di 1.000 formaggi per cui sono stati analizzati i profili aromatici con la tecnica Proton Transfer Reaction-Time of Flight-Mass Spectrometry (PTRToF-MS). Nell'aria aspirata da una provetta contenente 3 grammi di formaggio

grattugiato, sono stati analizzati più di 600 picchi spettrometrici riferiti a diverse sostanze volatili che costituiscono il suo aroma. Da questi più di 600 picchi, ne sono stati selezionati 317 che avevano una maggiore intensità e, dopo l'eliminazione di possibili picchi interferenti, sono stati considerati i 240 picchi che meglio caratterizzavano l'aroma di ciascun formaggio. Su questi sono stati studiati gli effetti del sistema di allevamento e delle caratteristiche individuali delle vacche al momento del prelievo del latte e cioè: lo stadio di lattazione, l'ordine di parto e la produzione giornaliera di latte. Di ogni vacca è stato considerato il pedigree fino alla quarta generazione che ha consentito di individuare i gruppi di progenie e tutte le parentele esistenti fra le bovine. Dai risultati ottenuti è stato compreso che 55 dei 240 picchi erano stati influenzati dal sistema di allevamento, i formaggi prodotti da vacche allevate in aziende tradizionali, alimentate principalmente a fieno e allevate a stabulazione fissa, hanno presentato un profilo aromatico diverso nel formaggio di quello ottenuto da vacche allevate presso stalle moderne a stabulazione libera e con alimentazione distribuita tramite il carro unifed. Si è visto che la distribuzione degli insilati ha modificato particolarmente l'aroma del formaggio. Un altro parametro influenzante il 58% dei VOC è stato lo stadio di lattazione, il formaggio dato da latte di vacche fresche, soprattutto anche quello tra bovine a metà lattazione e a fine lattazione è stato molto diverso. Nel corso della lattazione la concentrazione dei VOC è cambiata in modo opposto, l'andamento degli esteri, responsabili delle note fruttate, è aumentato dal 7° mese di lattazione in poi, mentre quello di aldeidi e chetoni, responsabili delle note erbacee, è diminuito verso la fine della lattazione. Soltanto il 9% dei VOC è stato influenzato dall'ordine di parto, mentre la differenza tra la produzione di latte di una vacca dall'altra dello stesso allevamento, quindi a pari condizioni, è stata responsabile dell'influenza del 13% dei VOC. Per quanto riguarda la genetica studiata sull'aroma del prodotto, nello studio sopra citato, è stato evinto che esiste una variabilità genetica connessa all'aroma del formaggio: solo 6 picchi, di quelli esaminati, hanno valori di ereditabilità inferiori al 3,5% e la maggior parte dei picchi rimanenti è caratterizzata da una ereditabilità simile a quella della produzione di latte, delle cellule somatiche e anche dei parametri tecnologici. Questa ricerca ha quindi valutato le correlazioni esistenti tra la genetica e i composti volatili, che sono risultate positive e che la composizione del latte abbia un effetto marcato sui VOC più importanti, aventi valori di ereditabilità anche del 12,5%. Nello specifico, grasso, proteine e caseine influenzano positivamente l'aroma, per cui i fattori genetici associati alla composizione del latte sono in parte anche responsabili dell'aroma del formaggio. I composti volatili più responsabili dell'aroma e caratterizzati da un maggior livello di ereditabilità appartengono a diverse famiglie aromatiche

come: gli esteri, le aldeidi, i chetoni e i terpeni. In un altro studio eseguito da *Bergamaschi e Bittante* (2018), è stata fatta un'indagine dei composti volatili di 11 diversi prodotti (latte intero serale, latte scremato, latte intero del mattino mescolato nel recipiente, panna, cagliata, siero, ricotta, scotta e formaggio stagionato a 6 e a 12 mesi). In questo esperimento, effettuato su prodotti caseari provenienti dal pascolo alpino, sono state identificate molecole appartenenti a diverse famiglie chimiche: alcoli, aldeidi, esteri, acidi grassi volatili, chetoni, lattoni, solfuri, terpeni, fenoli e benzene. L'evoluzione dei VOC dipende dallo specifico aspetto tecnologico dei processi per trasformare il formaggio e la ricotta, come la scrematura per affioramento, la temperatura e il periodo di stagionatura. Perciò, in questo lavoro è stato concluso che i VOC possono essere usati come marcatori dei prodotti e dei loro processi di trasformazione.

Questo elaborato volge a studiare quali sono le differenze tra stalla e malga, soprattutto per quanto riguarda l'alimentazione, verde o secca, ma anche altri effetti che possono essere dati dall'ambiente in cui si trovavano gli animali, dalla variabilità tra i due gruppi, dalla variabilità esistente tra vacche primipare e/o pluripare e dalle differenze che possono crearsi tra capi. Lo studio dei composti volatili è molto importante perché va a definire quello che è l'aroma del prodotto, importante quindi anche a livello di commercio dello stesso una volta proposto al consumatore.

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il presente lavoro fa parte di uno studio svolto dal dipartimento DAFNAE della Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria di Legnaro (PD) e ha lo scopo di valutare l'andamento dei composti volatili nel formaggio in relazione all'alpeggio. In particolare lo studio è mirato a compiere un confronto tra formaggio di vacche mandate in malga e di vacche rimaste in stalla. La malga Juribello, si trova in Trentino ed è situata nel Parco Naturale Paneveggio Pale di San Martino presso il Passo Rolle, mentre la stalla presa in considerazione è collocata in Val di Sole (TN) nel comune di Malè. Questo lavoro viene eseguito per osservare le peculiarità dei due diversi prodotti create da ambiente, stabulazione, alimentazione e clima diversi, volti a caratterizzare in maniera differente il prodotto finale, anche per promuovere i prodotti di malga.

3. MATERIALI E METODI

3.1: LA PROVA SPERIMENTALE

La seguente prova richiama l'obiettivo posto in questo lavoro, ovvero effettuare un confronto tra i profili dei composti volatili presenti nei formaggi ottenuti da animali in alpeggio in malga e animali rimasti in fondovalle in stalla.

3.1.1: L'azienda di fondovalle

La stalla di fondovalle utilizzata (*Figura 3*) è quella dell'Azienda Agricola Maso S.Biagio Società Agricola Semplice di Alessio e Silvano Rauzi situata a Malè in Val di Sole (TN) a 737 mslm. L'azienda presenta circa 145 capi di razza Bruna Italiana, tra cui 85 vacche da latte, con media produttiva per lattazione di circa 80-82 quintali e 60 capi di rimonta. E' caratterizzata da stabulazione libera su

Figura 3: Azienda Agricola Rauzi.



cuccette con paglia, due auto-alimentatori e una sala mungitura a spina di pesce (6+6). Il metodo di alimentazione delle bovine è tradizionale con fieno, prodotto in azienda dai 20 ettari di sfalcio di proprietà aziendale e l'aggiunta di integrazione con mangime.

3.1.2: La malga e l'alpeggio

La malga utilizzata per l'alpeggio è la Malga Juribello (*Figura 4*), posta nel Parco di Paneveggio e delle Pale di San Martino, a 1868 mslm, è una malga sperimentale di proprietà della Provincia Autonoma di Trento, gestita dalla Federazione Provinciale Allevatori, monticata da vacche da latte e altri animali. Le vacche stanno libere al pascolo durante il giorno e la notte, prima di essere munte entrano in stalla, usata come zona di attesa, prima di entrare in sala mungitura. Due

Figura 4: Complesso della Malga Juribello.



volte al giorno vengono munte 150 vacche con una media a capo di 20 L/giorno per un totale di circa 3000 litri. Il latte viene interamente conferito presso il Caseificio Sociale di Primiero per essere lavorato nei prodotti tipici della zona come il Trentingrana DOP, la Tosèla di Primiero o il Botìro di Primiero di Malga. Soltanto una volta alla settimana 550 litri di latte vengono tenuti in malga per la dimostrazione didattica della caseificazione a scopo turistico - informativo (*Figura 5*). Il piano di alimentazione usato è quello più frequente per bovine produttive al pascolo e prevede perciò l'alimentazione verde, al pascolo, sommata da un'integrazione di mangime durante i turni di mungitura. Malga Juribello è nota come stazione di ricerca e di sviluppo dell'alpicoltura, i suoi pascoli si sviluppano su un'estensione di 180 ha (*Figura 6*) e sono composti da diverse consociazioni create dalle differenti specie erbacee. La parte di pascolo meno pregiata a livello foraggero è formata dal nardeto, molto diffuso ma poco energetico, dal rodoro-vaccineto, costituito da arbusti di rododendro e mirtillo con bassa qualità, il romiceto, formato da piante a foglia larga come il Rumex, il senecio e le ortiche, parte meno pregiata che necessita dell'intervento dell'uomo per la pulizia ed infine il cariceto, pregiato ecologicamente circonda gli ambienti umidi ma ha un valore foraggero quasi nullo (da "BioTour delle Malghe, Parco Naturale Paneveggio Pale di San Martino). Una parte discretamente produttiva del pascolo è costituita dal seslerieto, di valore perché ricco di specie, ma la più buona per gli animali rimane il poeto, e soprattutto del poeto, costituito da piante appetitose e di discreto valore nutrizionale, tra le quali proprio la Poa.

Figura 5: Caseificazione didattica nel caseificio della malga.



Figura 6: Pascolo del Passo Rolle attorno alla malga.



3.1.3: Il disegno sperimentale

Avendo l'obiettivo principale di valutare l'effetto dell'alpeggio sulla qualità dei prodotti lattiero-caseari, il disegno sperimentale ha previsto la comparazione fra due gruppi (*Tabella 1*) di 6 bovine ciascuno dello stesso allevamento destinati a rimanere nell'azienda permanente di fondovalle (gruppo Stalla) e ad andare in alpeggio (gruppo Malga).

Per avere una valutazione completa dell'effetto dell'alpeggio i due gruppi sperimentali sono stati controllati anche prima e dopo l'alpeggio secondo lo schema seguente:

Tabella 1: Divisione della mandria per mese e locazione.

	<i>Gruppo Stalla (Down)</i>	<i>Gruppo Malga (Up)</i>
Controllo/caseificazione di:		
- giugno	fondo-valle Malè	fondo-valle Malè
- luglio	fondo-valle Malè	Alpeggio Juribello
- agosto	fondo-valle Malè	Alpeggio Juribello
- settembre	fondo-valle Malè	Alpeggio Juribello
- ottobre	fondo-valle Malè	fondo-valle Malè

Questo disegno sperimentale permette di valutare l'omogeneità iniziale dei due gruppi sperimentali (mese di giugno), le differenziazioni dovute all'alpeggio (mesi di luglio, agosto e settembre) e gli eventuali effetti residui dell'alpeggio dopo il rientro in stalla (mese di ottobre).

Infatti, le caseificazioni sperimentali sono state svolte mensilmente nel periodo tra giugno e ottobre 2017.

Le vacche utilizzate erano 12 Brune Italiane pluripare iscritte al relativo Libro Genealogico e sottoposte ai controlli funzionali della produttività, suddivise nei due sottogruppi: le vacche rimaste per tutto il periodo in stalla (gruppo stalla), identificate con il numero aziendale 25, 30, 66, 71, 87 e 304; e le vacche che nel periodo di luglio, agosto e settembre sono state in alpeggio (gruppo malga), identificate con il numero 5, 26, 140, 145, 150 e 401, bilanciate per stadio di lattazione e numero di parti.

Tutti i rilievi sperimentali sono stati fatti su base individuale per cui, per ogni variabile studiata, sono stati rilevati 60 dati (12 vacche x 5 mesi). Poiché una bovina del gruppo Stalla nel mese di

giugno ha evidenziato problemi sanitari, i relativi dati sono stati esclusi dal dataset finale che è quindi relativo a 59 informazioni per carattere.

Le informazioni riguardanti le vacche e la mandria sono state ottenute dalla Federazione provinciale allevatori di Trento.

3.1.4: Campionamento del latte

La procedura di campionamento, descritta nel dettaglio da Cipolat-Gotet et al. (2012) e Cecchinato et al (2013), prevede di standardizzare la raccolta, la refrigerazione, il trasporto e la conservazione dei campioni di latte per minimizzare la variabilità residua. Il campionamento del latte è stato eseguito durante il turno di mungitura serale. Per ogni campione sono stati raccolti 2000 mL di latte per singolo animale. I campioni, senza l'aggiunta di conservanti, sono stati in seguito refrigerati in frigorifero portatile a 4°C e trasportati entro circa 20 ore nel laboratorio di "Qualità del Latte" del Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università di Padova. Il campione da 2000 mL è stato suddiviso in due aliquote da 500 ml e da 1500 mL. La prima aliquota di latte è stata usata per le analisi chimico-fisiche come la composizione chimica, la conta cellule somatiche e per quella delle proprietà coagulative del latte, eseguite sul latte fresco. Inoltre da questa aliquota 50 mL di latte sono stati congelati a -80°C in falcon di plastica per l'analisi dei composti organici volatili (VOC).

3.1.5: Micro-caseificazione sperimentale

La caseificazione è avvenuta su base individuale la mattina seguente, entro 20 ore dal campionamento del latte utilizzando la seconda aliquota campionata (1500 ml). In totale sono stati prodotti 59 micro- formaggi individuali. Per la micro-caseificazione è stato seguito il metodo indicato da *Cipolat-Gotet* et al. (2013), così come per la rilevazione dei parametri di resa casearia. L'attrezzatura per la caseificazione utilizzata comprendeva: 4 bagnomaria, ognuno equipaggiato con un termostato digitale per il controllo della temperatura; in ciascun bagnomaria sono stati posti 5 pozzetti in acciaio inox da 1500 mL per il latte, in questo modo è possibile seguire la caseificazione in contemporanea per un totale di 20 campioni e pertanto sono state eseguite in parallelo le 12 micro-caseificazioni previste per ogni campionamento.

La procedura di caseificazione è divisa nelle seguenti fasi:

- riempimento di ogni pozzetto con 1500 mL di latte individuale refrigerato a 4°C durante la notte;

- pesata dei pozzetti riempiti di latte (al netto della tara) prima dell'immersione in bagnomaria;
- immersione dei pozzetti nel bagnomaria a temperatura di 35°C per riscaldamento;
- rilevamento del pH e della temperatura a 25 min;
- aggiunta di 8 mL di soluzione di caglio per pozzetto (145 µL di caglio liquido bovino diluito in 48 mL di acqua distillata; Hansen standard 160 80 ± 5% chimosina e 20 ± 5% pepsina; 160 international milk clotting units (IMCU)/mL; Pacovis Amrein AG, Berna, Svizzera) a 30 min dall'inizio del riscaldamento; rilevazione manuale del tempo di coagulazione o RCT:rennet coagulation time, utilizzando un cucchiaio da laboratorio (*Figura 7*);
- dopo i 20 min di riposo, taglio a croce (*Figura 8*) e spostamento della cagliata in formella più piccola con immersione nel siero spurgato per 10 min;
- pesata della cagliata e del siero a 30 min dalla separazione e analisi della composizione chimica del secondo;
- pressatura idraulica della cagliata di 30 min a 250 kPa con rivoltamento ogni 10 min e pesatura finale;
- immersione della cagliata in salamoia (soluzione satura al 20% di NaCl) per 30 min (*Figura 9*) e pesatura finale;
- inserimento delle forme ottenute in maturatore a 15°C e 85% U.R;
- dopo una settimana di maturazione il formaggio è stato messo sottovuoto e conservato per 3 mesi a 15°C.

Figura 7: Rilevazione con cucchiaio da laboratorio del RCT.

Figura 8: Taglio della formagella.

Figura 9: Formagelle in salamoia.



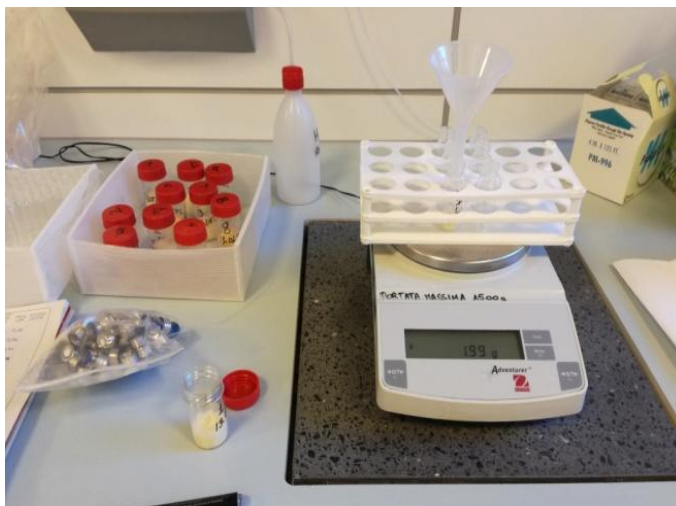
3.1.6: Campionamento e analisi del formaggio

Dopo i 3 mesi di stagionatura, le piccole forme di formaggio sono state tagliate, private

Figura 10: Pesatura dei campioni con bilancia analitica.

della crosta, campionate e analizzate per i caratteri di colore e texture.

Un campione di 5-8 g campionato dalla formetta di ogni formaggio è stato macinato, campionato e riposto in vial di vetro chiaro da 20 mL (Supeclo, Bellefonte, PA, USA) per le analisi dei VOC e stoccato a -80°C fino all'analisi.



Per ogni formaggio sono state preparate le

repliche da analizzare suddividendo il campione in due o tre vial da 2 grammi in conformità a quant'era la quantità di formaggio. Ogni replica è stata pesata con la bilancia analitica (Figura 10) e poi codificata con un codice che permetteva di identificare il campione con un numero che andava da 1 a 59 seguito dalle lettere A, B e C che stavano ad indicare le diverse repliche. Le codifiche dei vari campioni sono state inserite in una tabella con tutte le caratteristiche appartenenti a quel determinato campione (stalla/malga, mese monticazione, data campionamento/analisi). Dopo la pesata, le vial sono state riposte in freezer a -80°C in attesa dell'analisi.

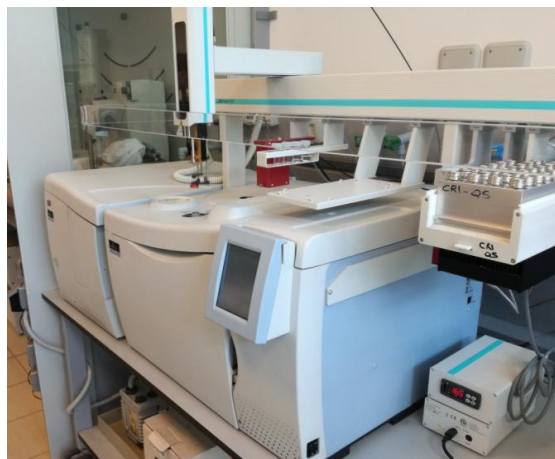
3.2: L'ANALISI DEI COMPOSTI VOLATILI

Con la dicitura "Composti Organici Volatili" (COV o VOC - Volatile Organic Compounds), s'intendono tutta quella serie di composti organici, prodotti dalle attività umane o naturali, che si trovano allo stato di gas alle condizioni di temperatura e pressione esistenti a livello troposferico. Possono essere semplici idrocarburi saturi o insaturi a molecola lineare e non, composte esclusivamente da carbonio e idrogeno, o molecole più complesse per la presenza di altri elementi come ossigeno, azoto, zolfo che possono essere classificati in base alla presenza di gruppi funzionali in classi chimiche come ad esempio chetoni, aldeidi, alcoli, acidi ed esteri.

3.2.1: Descrizione delle tecniche

Per la determinazione dei composti volatili si è utilizzata la tecnica HS-SPME-GC-MS (Figura 11): Headspace Solid Phase MicroExtraction - Gas Chromatography - Mass Spectrometry per cui la procedura di analisi prevede l'estrazione dei composti presenti nello spazio di testa per adsorbimento su fase solida, seguita dal desorbimento degli stessi per riscaldamento e iniezione in colonna gascromatografica dove

Figura 11: Gascromatografo (Clarus500).



vengono separati e successivamente identificati e quantificati grazie ad uno spettrometro di massa che funge da rivelatore. La tecnica GC-MS consente l'identificazione e la quantificazione di sostanze organiche in diverse matrici. L'apparato SPME è un dispositivo molto semplice che assomiglia ad una siringa modificata, costituita da un supporto per fibre e un assemblaggio di fibre, quest'ultimo contenente una fibra retrattile SPME lunga 1 o 2 cm. La fibra più comune è una fibra trifasica DBV/CAR/PDMS sottile in silice fusa, rivestita con un film polimerico sottile. L'applicazione SPME prevede il campionamento dello spazio di testa per cui l'ago viene inserito attraverso un setto perforabile, necessario come protezione per la fibra, che dopo essere stata inserita nel contenitore viene esposta all'ambiente dove si trovano i composti volatili. Il rivestimento polimerico agisce come una spugna, attraendo gli analiti per i processi di assorbimento e adsorbimento. L'estrazione è basata su un principio simile a quello della cromatografia, impostata su partizionamento gas-liquido o liquido-liquido. La cinetica del processo di estrazione SPME dipende da un numero di parametri (es: tipo di fibra, spessore del film, agitazione del campione, ecc); i tempi di analisi dei campioni sono tipicamente nell'ordine di pochi minuti, ma possono arrivare anche a qualche ora. Dopo l'estrazione degli analiti, la fibra è ritratta in un ago di metallo (nella protezione meccanica), e il passaggio successivo è il trasferimento degli analiti dalla fibra al gas-cromatografo. In questo caso, il desorbimento termico degli analiti avviene nell'iniettore caldo del GC. Dopo l'inserimento dell'ago nell'iniettore, la fibra viene spinta fuori dall'ago di metallo, questa poi viene esposta all'elevata temperatura e gli analiti vengono eluiti dalla fase mobile. Cromatografia e rilevamento avvengono in maniera convenzionale, mentre la scelta tra prelievo dei campioni e cromatografia dipende principalmente dalla polarità e dalla volatilità degli analiti. Dato che non c'è solvente (solo quello assorbito dalla fibra), di solito viene

utilizzata l'iniezione splitless, ovvero tutto il campione iniettato viene convogliato all'interno della colonna cromatografica, quindi l'analisi è molto sensibile.

La spettrometria di massa invece, è una tecnica analitica basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica. Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone, il catione radicalico che si forma, in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri, generando in parte cationi e/o radicali cationi. Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione sono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector. Il processo consiste dunque nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione dei diversi ioni prodotti e nella loro rivelazione. Il risultato è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale. Per il riconoscimento dei composti si ricorre a software che basandosi su librerie di spettri di molecole note ne permettono l'identificazione, si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

3.2.2: Strumentazione usata:

- cella freezer -20°C (stoccaggio campioni)
- vial di vetro chiaro da 20 mL con tappi magnetici muniti di setto in ptfe/silicone compatibili con autocampionatore CTC (Supelco)
- spatola
- bilancia tecnica (Spes)
- micropipetta (Gilson)
- puntali per micropipetta (Gilson)
- ancoretta magnetica
- fibra per SPME trifasica (Supelco)
- GC-MS (PerkinElmer) con autocampionatore CTC (CTC Analytics AG)

3.2.3: Protocollo analitico: preparazione campione, programmazione corsa gas-cromatografica, sessioni di analisi

Le analisi GC sono state svolte secondo una programmazione giornaliera che prevedeva di analizzare 4 campioni in 3 repliche al giorno. Complessivamente sono state eseguite 15 giornate di analisi. I campioni sono stati analizzati secondo un ordine casuale per ridurre al minimo eventuali errori dovuti alla giornata di analisi. Le vial previste venivano tolte dal freezer a -80°C almeno un'ora prima della preparazione. A ogni serie è stato sempre aggiunto un campione di "riferimento" ottenuto da un mix omogeneo di vari formaggi che, replicato in ogni giornata di analisi, permette di tenere sotto controllo la riproducibilità dell'analisi e l'efficienza della fibra. Anche il campione di riferimento è stato preparato in precedenza e congelato a -80°C insieme ai campioni in analisi.

Dopo lo scongelamento, al campione venivano aggiunti 4 mL di acqua distillata, 50 μL di IS (internal standard) e un'ancoretta magnetica necessaria per omogeneizzare il campione e mantenerlo in agitazione. Lo standard interno è una sostanza chimica che viene aggiunta in quantità esattamente nota ai campioni. Questo permette di compensare gli errori derivanti da perdita di analita durante le fasi di trattamento del campione e di analisi, assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga. Per questo lo standard interno deve essere un composto che si comporta in maniera simile alla specie chimica d'interesse, poiché gli effetti della preparazione del campione devono essere i più simili possibili sul segnale dello standard interno e dell'analita nel campione. Lo standard interno utilizzato in questo lavoro è il 4-methyl-2-pentanone in soluzione acquosa a concentrazione 0.0499008 g/L. Le vial così preparate venivano poi sistemate sul cooler dell'autocampionatore (CTC combiPAL, CTC Analysis AG, Switzerland) ad una temperatura di 4°C in attesa di analisi. La fibra utilizzata in questo studio è una trifasica DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carbone/polidimethylsiloxane) lunga 2 cm (Supelco), questa permette di adsorbire un maggior numero di classi chimiche di composti. Prima della fase di estrazione, il campione veniva termostato a 40°C per 30 minuti. Questa fase fa sì che lo spazio di testa si arricchisca di composti volatili. La fibra veniva poi esposta nello spazio di testa alla stessa temperatura per 30 minuti. Dopodiché la fibra veniva esposta ai 250°C dell'iniettore del GC per 5 minuti. In questo modo i composti adsorbiti venivano rilasciati dalla fibra e spinti dal gas carrier, elio iperpuro 5.5, all'interno della colonna gascromatografica con un flusso di 2 mL/min. La colonna utilizzata per la separazione dei composti era una HP-Innowax di lunghezza 30 metri, diametro 0.32 mm, spessore del film 0.25 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La

programmata della corsa gascromatografica iniziava a 40°C per 3 minuti, rate di 4°C/min fino a 180°C, 180°C per 6 minuti, rate di 5°C/min fino a 220°C (GC-MS Clarus 500, PerkinElmer, USA). Lo spettrometro di massa operava in modalità EI (electron ionization mode) a 70 eV e veniva eseguita una scansione delle masse dalla 33 alla 350.

Il software utilizzato per l'acquisizione dei cromatogrammi e successiva elaborazione è il Turbo Mass (PerkinElmer, USA). L'identificazione dei composti è avvenuta per confronto tra spettro acquisito e spettro presente in libreria (NIST2014), cercando di trovare nei cromatogrammi composti volatili già studiati in precedenza e di rivelarne altri di nuovi.

3.3: ANALISI DEI DATI

3.3.1: Preparazione del dataset

Ogni campione è stato classificato in una tabella (esempio *Tabella 2*) secondo il numero di formaggio prodotto (ID_FORMAGGIO), il numero di capo (ID_RAUZI), la data di campionamento (GIORNO CAMPIONAMENTO) effettuato o a malga Juribello o all'azienda Rauzi in base alla suddivisione del gruppo, il gruppo denominato "UP" per la l'alpeggio e il gruppo "DOWN" per le bovine rimaste sempre in stalla. Il campionamento è avvenuto un giorno prima della data di analisi (GIORNO ANALISI) nel laboratorio dell'Università di Padova, poi dopo la micro caseificazione il tutto è stato trasferito nei laboratori di San Michele, dove il campione è stato suddiviso in tre repliche denominate con le prime tre lettere dell'alfabeto (A, B, C) e poi pesato per l'analisi gascromatografica.

Trattandosi di formaggio l'impatto dei processi di congelamento/scongelo sulla matrice sono limitati ed è stato quindi possibile scongelare ogni campione, suddividerlo nelle tre repliche e ricongelarlo per poi eseguire in un secondo momento l'analisi dopo scongelamento. Diverso sarebbe stato se avessimo dovuto analizzare il latte, che è una matrice più delicata, ed è quindi preferibile evitare il doppio congelamento.

Tabella 2: Esempio del dataset dei campioni di formaggio.

<i>ID_FORMAGGIO</i>	<i>ID_RAUZI</i>	<i>GIORNO</i> <i>ANALISI</i>	<i>GIORNO</i> <i>CAMPIONAMENTO</i>	<i>AZIENDA</i>	<i>MESE</i>	<i>GRUPPO</i>	<i>CAMPIONE</i>	<i>PESO</i> <i>(g)</i>	<i>TIPO</i> <i>ANALISI</i>
1	5	08/08/2017	07/08/2017	Juribello	August	Up	1F_A	2.18	GC
1	5	08/08/2017	07/08/2017	Juribello	August	Up	1F_B	1.95	GC
1	5	08/08/2017	07/08/2017	Juribello	August	Up	1F_C	2.02	GC

3.3.2: Analisi statistica

I dati dei composti volatili sono stati analizzati utilizzando le procedure del software statistico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Per l'analisi statistica è stato applicato un modello lineare misto per l'analisi della varianza (ANOVA) che ha incluso come effetto fisso una combinazione di 2 variabili, il gruppo di appartenenza dell'animale (gruppo stalla/down e gruppo alpeggio/up) e il mese di campionamento (da giugno ad ottobre). Come effetto random è stato incluso l'effetto del singolo animale. Il modello è il seguente:

$$y_{ijk} = \mu + \text{animale}_i + \text{MG}_j + e_{ijk}$$

dove:

- y_{ijk} = variabili dipendenti;
- μ = intercetta generale del modello;
- animale_i = effetto random dell' i^{mo} animale campionato;
- MG_j = effetto fisso dell' j^{mo} livello della concatenata mese-gruppo (10 livelli);
- e_{ijk} = errore casuale $\sim N(0, \sigma^2 e)$.

Con le medie corrette per l'effetto della combinata sono stati stimati i contrasti ortogonali tra i livelli per verificare l'andamento del gruppo in stalla durante la prova (contrasti lineare, quadratico, cubico) e per confrontare i due gruppi entro il singolo mese (gruppo stalla vs gruppo alpeggio).

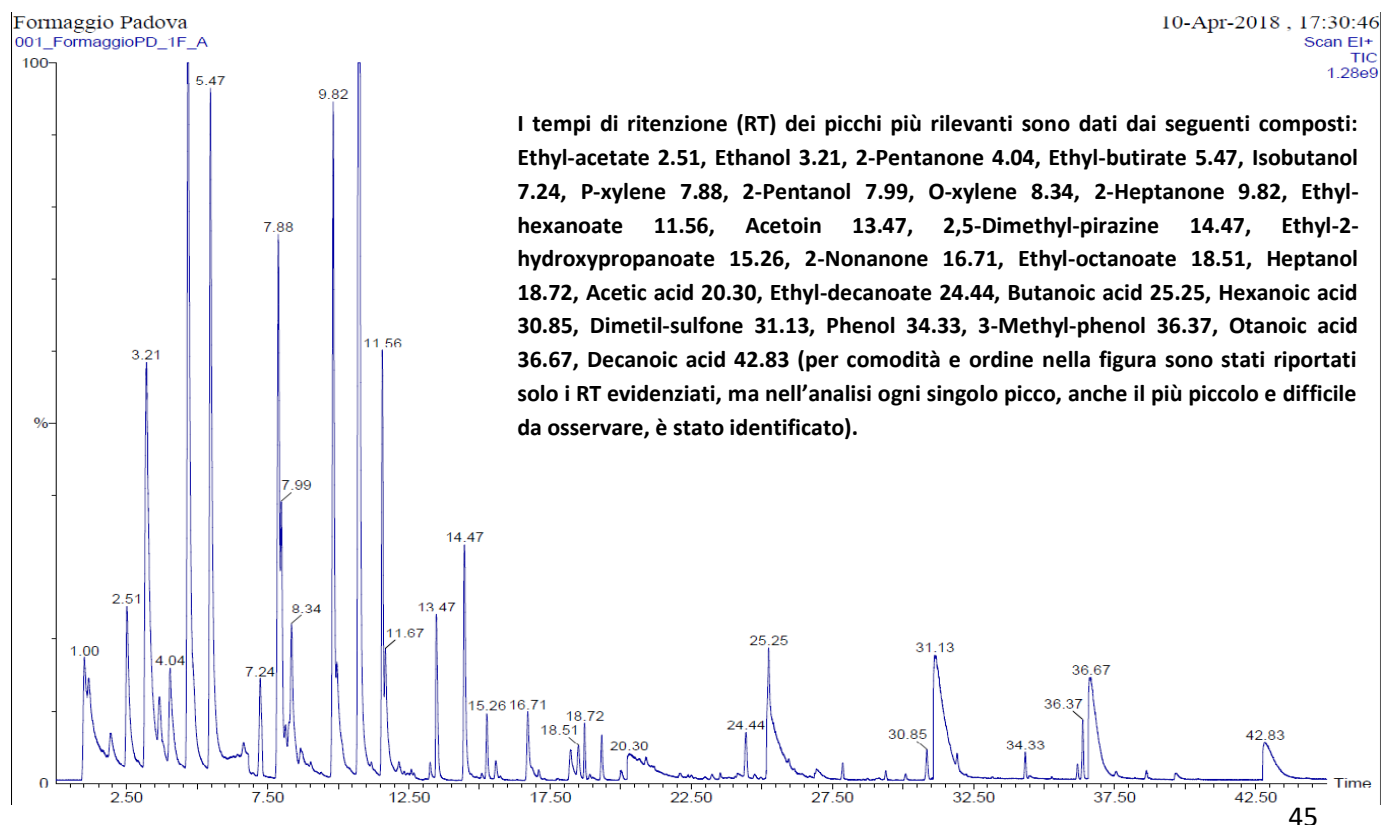
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1: Profilo dei composti volatili nei microformaggi

Dopo aver fatto l'analisi gas-cromatografica, il passo successivo è stato quello di analizzare i cromatogrammi di tutti i campioni. I composti volatili (VOC) corrispondenti a picchi individuati sono stati identificati confrontando i loro spettri di massa con quelli presenti nella libreria NIST2014. Nella *Figura 12* è riportato a titolo di esempio il cromatogramma di uno dei campioni di latte. Sull'asse delle ascisse è presentato il tempo di ritenzione in minuti, ovvero il tempo necessario alle singole sostanze per attraversare la colonna cromatografica che è tanto maggiore quanto maggiore è l'interazione del singolo composto con la fase stazionaria della colonna; mentre sull'asse delle ordinate è mostrata l'intensità del segnale registrato dal detector dello strumento.

In questo cromatogramma si possono notare numerosi picchi corrispondenti a differenti composti volatili. I composti volatili trovati appartengono alle famiglie di composti più frequenti, tra le quali: gli acidi carbossilici, gli alcoli, le aldeidi, gli esteri, i chetoni e altri presenti in minore quantità. L'analisi aveva l'obiettivo principale di osservare i diversi cambiamenti delle famiglie di composti, soprattutto osservando se c'erano effetti differenti tra i campioni di latte da animali in alpeggio e quelli da animali in stalla.

Figura 12: Cromatogramma d'esempio del campione F1_A.



In seguito è riportata la *Tabella 3* con la lista dei composti trovati, dove i VOC sono stati classificati per famiglia chimica di appartenenza. Nella stessa sono stati indicati il tempo di ritenzione in cui il composto si è presentato, la media, la deviazione standard, i valori minimi e massimi. I dati sono espressi come logaritmo naturale della concentrazione del composto in µg/L (concentrazione equivalente di standard interno) più 1 (Es.: $\ln([\mu\text{g/L}] + 1)$).

Tabella 3: Statistiche descrittive e tempi di ritenzione dei composti volatili rilevati con GC-MS.

COV ¹	TR ²	N	Media ³	Dev Std	Min	Max
Totale		58	12.05	0.85	10.48	14.62
Acidi		58	10.80	1.21	8.67	14.38
Acido Acetico	19.91	58	8.48	0.94	6.90	10.41
Acido Propionico	23.63	58	4.65	0.58	3.65	5.99
Acido Butanoico	25.25	58	9.13	1.26	6.65	12.75
Acido Pentanoico	28.59	58	4.65	1.23	2.89	8.43
Acido Esanoico	30.74	58	9.90	1.29	7.57	13.53
Acido Eptanoico	34.40	58	5.03	1.29	3.30	8.96
Acido Octanoico	36.63	58	9.07	1.28	7.35	13.22
Acido Nonanoico	39.68	58	5.44	0.89	3.67	7.98
Acido Decanoico	42.81	58	7.62	1.20	5.74	11.04
Acido 9-Decenoico	45.16	58	4.70	1.29	2.78	8.93
Acido Dodecanoico	49.70	57	4.10	1.02	2.55	7.46
Alcoli		58	9.66	0.92	7.15	11.08
Etanolo	3.21	58	8.37	1.14	6.09	10.61
2-Butanolo	5.14	58	3.39	2.21	0.01	8.29
Isobutanolo	7.23	58	6.28	1.24	3.20	8.12
2-Pentanolo	7.99	43	3.87	1.57	1.92	8.16
1-Butanolo	8.72	57	4.08	1.10	2.46	6.76
4-Metil-2-pentanolo	9.40	58	1.97	1.93	0.00	6.93
3-Metil-1-butanolo	10.73	58	8.72	1.28	5.41	10.29
3-Metil-3-buten-1-olo	12.11	57	4.21	0.63	2.87	5.39
1-Pentanolo	12.15	57	4.01	1.15	0.05	6.18
Esanolo	15.58	57	5.38	0.84	3.46	7.61

Eptanolo	18.90	57	3.72	0.70	2.14	5.77
2,6-Dimetil-4-eptanolo	19.34	58	4.45	1.57	2.10	8.84
2-Etil-esanolo	20.02	58	4.67	0.45	3.50	5.62
2-Nonanolo	20.89	58	4.86	1.32	0.04	7.06
2-Fenil-2-propanolo	27.87	58	5.04	0.41	4.18	6.21
Fenetil-alcool	31.85	58	4.50	0.64	2.94	5.76
Fenolo	34.33	58	5.50	0.43	4.75	6.97
4-Metil-fenolo (p-cresolo)	36.19	58	5.12	0.62	4.16	7.24
3-Metil-fenolo (m-cresolo)	36.38	58	6.40	0.49	5.53	7.93
2-Fenossietanolo	37.55	58	3.62	0.51	2.54	5.13
Aldeidi		58	6.35	0.77	4.93	8.61
2-Metilbutanale	2.92	58	4.47	1.29	2.61	7.43
3-Metilbutanale	2.94	58	4.71	1.25	2.85	7.64
Esanale	6.65	57	3.24	1.43	0.10	5.38
Nonanale	16.89	56	4.98	0.85	3.33	7.36
Benzaldeide	20.96	58	4.38	0.64	3.18	6.53
Esteri		58	10.84	0.99	9.17	12.73
Etilacetato	2.51	57	6.55	1.37	3.84	9.34
Etilbutirrato	5.47	58	9.77	0.96	7.87	11.52
Etilbenzene	7.78	57	7.32	1.25	4.03	9.44
2-Metilpropil-butanoato	9.02	57	4.44	0.93	2.51	6.44
Etiletanoato	11.56	58	10.01	1.18	7.40	12.03
2-Metilbutil-butanoato	12.60	58	5.39	1.13	2.79	7.77
Etil-2-idrossipropanoato	15.28	58	4.88	1.64	1.79	8.11
Etiloctanoato	18.22	58	7.99	1.16	5.70	10.64
Etildecanoato	24.44	58	6.82	1.02	5.02	10.39
Etil-9-decenoato	25.95	58	4.86	1.04	3.14	8.06
2-Fenetilacetato	29.4	55	3.20	1.09	1.42	5.68
Etildodecanoato	30.09	57	4.75	0.91	3.03	7.81
Etiltetradecanoato	35.27	58	3.48	0.61	2.51	5.53
Chetoni		58	9.05	1.41	7.12	11.94
2-Propanone	1.84	58	3.89	1.17	2.01	6.50

2-Butanone	2.68	57	3.19	2.74	0.05	8.23
2-Pentanone	4.05	57	7.04	1.68	4.34	10.73
2-Esanone	6.62	58	4.51	1.29	2.52	7.75
2-Eptanone	9.82	58	8.14	1.80	5.25	11.29
Acetoino	13.26	57	5.74	0.99	3.52	7.66
2-Nonanone	16.72	58	7.11	1.62	4.42	10.29
2-Undecanone	23.23	58	4.51	0.96	3.08	7.23
Acetofenone	24.73	58	4.12	0.60	3.04	6.01
2-Tridecanone	29.19	58	2.60	0.64	1.49	5.04
Altri composti		57	8.53	0.71	6.84	10.00
3-Octene	1.99	57	4.17	0.61	2.85	5.27
p-Xilene	7.89	57	7.25	1.32	3.97	9.43
m-Xilene	8.13	57	6.62	1.05	4.29	8.79
o-Xilene	8.34	55	6.33	0.82	4.38	8.22
Limonene	10.13	58	3.60	0.94	2.20	5.50
Stirene	12.35	58	4.27	0.68	2.88	5.73
Composti Solforati						
Metantiolo	1.26	57	3.28	0.44	2.25	4.15
Carbendisulfide	1.41	58	3.56	2.81	0.00	10.71
Dimetilsulfone	31.58	58	3.73	0.46	2.81	4.82
Lattoni						
Butirrolattone	24.06	58	3.71	0.51	2.82	5.18
δ-Eptalattone	33.18	58	3.31	0.55	2.27	5.33
δ-Decalattone	38.63	58	4.51	0.52	3.01	6.22
δ-Dodecalattone	46.05	58	3.34	0.58	1.92	5.09

1 Composti organici volatili

2 Tempo di ritenzione

3 Valori espressi come $\ln([\mu\text{g/L}] + 1)$; $\mu\text{g/L}$ = concentrazione equivalente di standard interno

Sottoponendo i dati all'analisi statistica della varianza sono state trovate differenze significative, più o meno rilevanti, tra i microformaggi appartenenti ai 2 gruppi di allevamento e lavorati nei 5 mesi di sperimentazione. Valutando questa significatività statistica, alcuni composti sono risultati poco significativi oppure con una significatività casuale o poco influente per la nostra ricerca. Ad

esempio, il metantiolo nei due gruppi è risultato significativamente differente solo nel mese di agosto ($P < 0.05$), mentre l'esanale solo nel mese di giugno ($P < 0.001$), quando le vacche si trovavano nelle stesse condizioni di allevamento. In alcuni casi i composti hanno segnalato significatività solo per i contrasti lineare, quadratico e cubico, indicando semplicemente un trend da giugno ad ottobre nel gruppo presente in stalla. Per questi motivi, i composti non aventi significatività sensata ed interessante non sono stati considerati in questa prima esplorazione. Invece, nel gruppo dei composti significativi sono racchiusi quelli che hanno presentato differenze significative ($P < 0.05$) nei mesi dedicati all'alpeggio (luglio, agosto, settembre) e quelli che hanno presentato un effetto residuo della malga anche nel mese di ottobre. L'importanza di questa valutazione viene data anche ai diversi andamenti dei composti, ovvero quelli che hanno presentato un andamento in cui la propria concentrazione era in crescita nei mesi di alpeggio e in calo nei mesi di stalla sono stati considerati maggiormente perché probabilmente questo è dovuto al consumo d'erba rispetto che al consumo di fieno. I composti che hanno richiamato maggiormente l'attenzione sono 22 (Tabella 4), appartenenti principalmente alle famiglie chimiche degli alcoli, degli esteri, dei chetoni, dei terpeni, degli alcheni e degli idrocarburi aromatici. Questi singoli composti volatili e le rispettive famiglie di appartenenza sono stati rappresentati con grafici che mostrano le differenze significative tra le medie corrette dei 2 gruppi di allevamento all'interno del singolo mese (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$) e il trend della media del gruppo in stalla da giugno ad ottobre (lineare, quadratico o cubico).

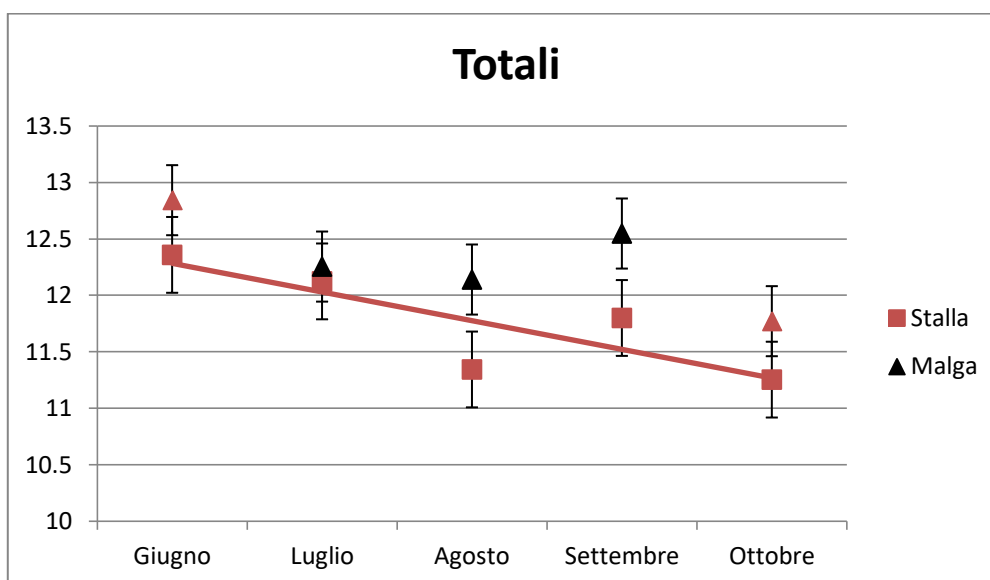
Tabella 4: Lista dei composti volatili considerati significativi dall'analisi statistica.

NOME COMPOSTO	FAMIGLIA	SIGNIFICATIVITA'
3-Octene	Alcheni	Luglio-agosto-settembre-ottobre
Etilacetato	Esteri	Luglio-settembre-ottobre
Etanolo	Alcoli	Luglio-agosto-ottobre
2-Butanolo	Alcoli	Luglio-settembre-ottobre
Etilbutirrato	Esteri	Luglio-agosto-settembre-ottobre
Isobutanolo	Alcoli	Luglio-agosto-settembre
4Metil-2pentanolo	Alcoli	Luglio-agosto-settembre
Limonene	Terpeni	Luglio-agosto
3Metil-1butanolo	Alcoli	Giugno-luglio-agosto
Etilsesanoato	Esteri	Luglio-agosto

Stirene	Idrocarburi Aromatici	Luglio-agosto
2-Metilbutil-butanoato	Esteri	Luglio-settembre
Etil-2-idrossipropanoato	Esteri	Luglio-agosto
2-Nonanone	Chetoni	Luglio-agosto
Eptanolo	Alcoli	Luglio-settembre
2-Etilsanolo	Alcoli	Luglio-agosto
2-Nonanolo	Alcoli	Luglio-agosto-ottobre
2-Fenilacetato	Esteri	Luglio-agosto-settembre
Fenil-alcool	Alcoli	Luglio-settembre
3-Metil-3-buten-1-olo	Alcoli	Luglio-ottobre
1-Pentanololo	Alcoli	Luglio-settembre
Acetoino	Chetoni	Luglio-agosto

Facendo una valutazione dell'andamento dei VOC in totale, si è osservata nel *Grafico 1* una crescita delle concentrazioni dei campioni di malga rispetto a quelli di stalla; i campioni di malga hanno mostrato un calo tra giugno e luglio, con un andamento quasi costante fino ad agosto, un picco a settembre con un calo verso ottobre. Mentre i campioni prelevati dal formaggio di vacche da stalla hanno mostrato un calo più accentuato fino ad agosto con picco a settembre e calo ad ottobre ma a una concentrazione minore. Anche se la differenza non è risultata significativa per la forte variabilità individuale, tenuto conto della scala logaritmica, in agosto e settembre i formaggi da latte di malga hanno presentato un tenore di composti volatili circa doppio di quello dei formaggi da latte di fondo valle.

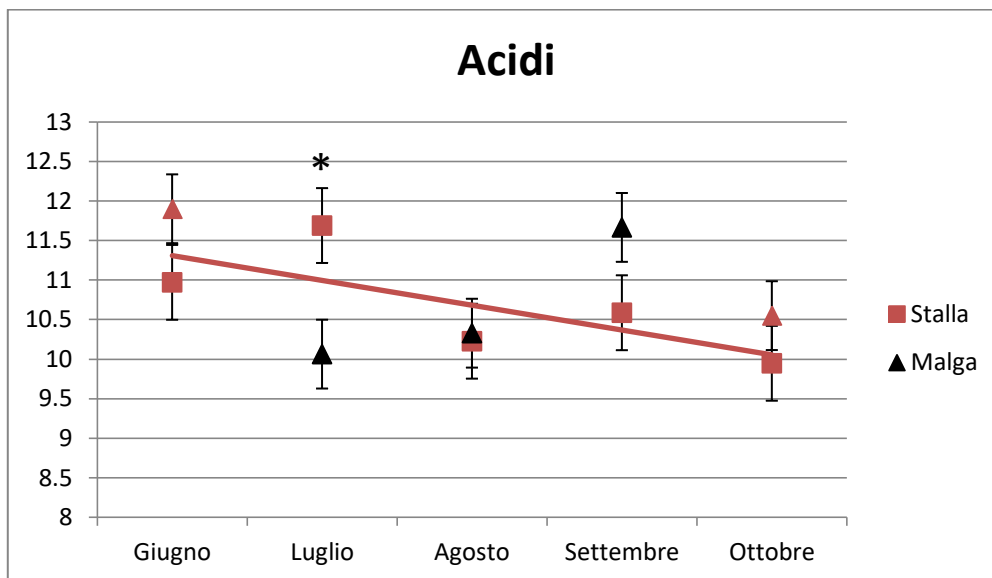
Grafico 1: Andamento generale VOC dei due gruppi (Down/stalla – Up/malga).



Acidi

La famiglia degli acidi (*Grafico 2*) ha visto la curva dei campioni di malga intersecare due volte la curva di quelli di stalla; la linea della malga subisce un calo drastico significativo da giugno a luglio con una leggera crescita verso agosto, un picco a settembre con successivo calo a ottobre, mentre i campioni di stalla subiscono una crescita a luglio con calo verso agosto e piccola crescita verso settembre. Alte concentrazioni di acidi grassi a corta e media catena sono rilasciate dalla lipolisi dei trigliceridi nel latte (Bills & Day, 1964), questi hanno un notevole impatto aromatico, l'intensiva lipolisi è indesiderabile nella maggior parte delle varietà di formaggi perché sviluppa rancidità. Gli acidi grassi liberi devono essere controbilanciati con altri composti aromatici per sviluppare un aroma apprezzato (Bosset & Gauch, 1993; Fox et al., 1995). Gli acidi grassi sono substrati di reazioni enzimatiche che producono aromi. L'ossidazione e la decarbossilazione produce metil-chetoni e alcoli secondari e l'esterificazione di idrossi-acidi grassi produce lattoni.

Grafico 2: Andamento famiglia degli Acidi.

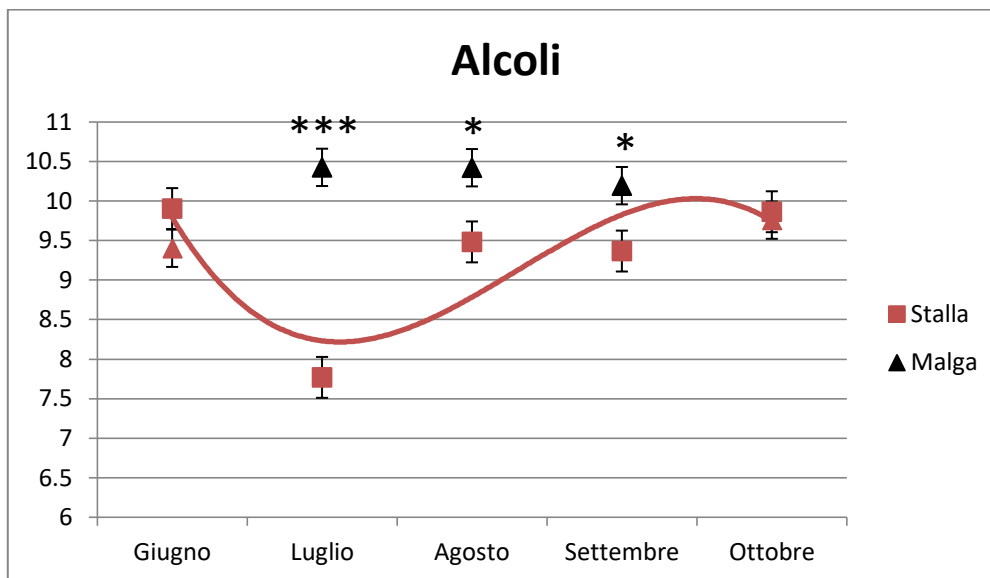


Alcoli

Gli alcoli sembrano mostrare l'andamento più concorde al seguente studio (*Grafico 3*), mostrando un andamento crescente da giugno verso luglio, poi un andamento costante quasi fino a settembre e un calo ad ottobre, presentando un comportamento di positività nei confronti del gruppo malga. La corrispondente linea del gruppo stalla invece mostra un andamento più "spezzato", con un calo da giugno a luglio con un successivo incremento ad agosto, un andamento costante verso settembre e un aumento a ottobre.

Come spiegato da Curioni e Bosset (2002), gli alcoli derivano dalla biosintesi di molte vie metaboliche che s'incontrano nel formaggio: il metabolismo del lattosio, la riduzione a metilchetone, il metabolismo degli aminoacidi come la degradazione dell'acido linoleico e linolenico (Molimard & Spinnler, 1996), precursori di otto composti aromatici del carbonio e la degradazione di caseine e lipidi in aminoacidi e aldeidi fino alla produzione di alcoli. Il verificarsi di questo alcool è legato al metabolismo del *Penicillium* (Karahadian et al., 1985a, Karahadian et al., 1985b). Esso è uno dei principali elementi che compongono l'aroma di formaggi a pasta molle, ma anche fondamentale di quelli a pasta dura.

Grafico 3: Andamento famiglia degli Alcoli.



Nell'analisi statistica sono risultati significativi parecchi alcoli, tra cui: l'etanolo, il 2-butanolo l'isobutanolo, il 4metil-2pentanolo, il 3metil-1butanolo l'eptanolo, il 2etil-esanolo, il 2-nonanolo, il fenetil-alcool, il 3metil-3-buten-1-olo e il pentanolo. In particolare il metabolismo dell'etanolo produce piruvato e dall'azione dell'acetil-CoA produce acetaldeide con la produzione finale di etanolo. Il 2-butanolo probabilmente è formato dalla riduzione del butan-2,3-dione a butan-2,3-diolo dall'azione dei batteri starter e dalla successiva riduzione a butan-2-olo dall'attività dei batteri non starter dell'acido lattico durante la stagionatura del formaggio (Berard et al.,2007). Il 3metil-1-butanolo dato dalla degradazione delle leucine, aminoacidi a catena ramificata formati dalle aldeidi o dalla degradazione di Stecker delle leucine (Carbonell et al.2002, Berard,et al.,2007). Infine, il 2-etil-esanolo deriva dal grasso nel latte e dagli acidi grassi a catena corta.

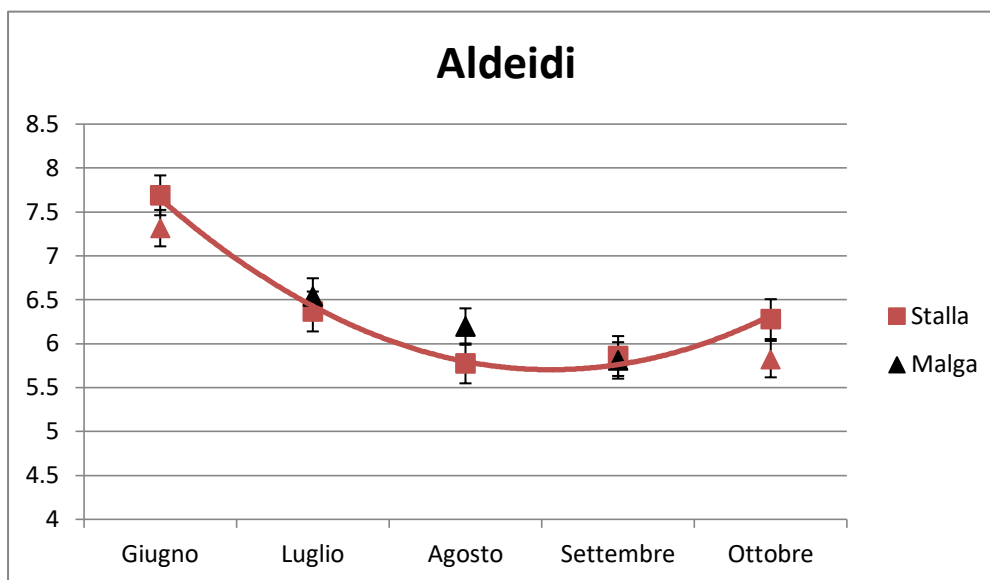
Aldeidi

Per quanto riguarda le aldeidi, come gli acidi non presentano significatività per la ricerca, nel *Grafico 4* gli andamenti delle due curve sono molto simili, dimostrando un calo da giugno ad agosto con una piccola ripresa a ottobre.

Le aldeidi sono originate dagli aminoacidi o dalla transaminazione, che porta a decarbossilazione o alla degradazione di Stecker. Questa reazione è semplice e può verificarsi senza la catalisi enzimatica durante la stagionatura (Keeney & Day, 1957). In effetti, le aldeidi sono composti transitori e non si accumulano nel formaggio perché sono rapidamente trasformati in alcoli o negli

acidi corrispondenti (Hayaloglu et al., 2013). Pertanto, il basso livello di aldeidi indica una buona maturazione del formaggio, mentre alte concentrazioni possono causare sapori e odori sgradevoli (Moio and Addeo, 1998).

Grafico 4: Andamento della famiglia delle Aldeidi.

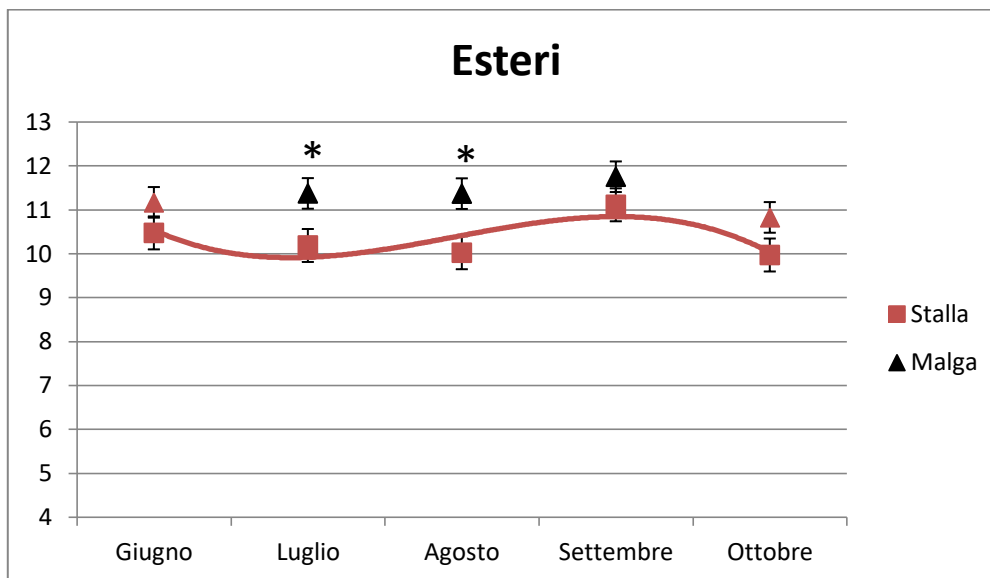


Esteri

Gli esteri spiccano come gli alcoli per un comportamento in crescita nei mesi di alpeggio dei campioni del gruppo malga, questi crescono fino a settembre da giugno, con un piccolo calo a ottobre. Mentre i campioni del gruppo stalla hanno un piccolo calo ad agosto, con un picco a settembre e un altro calo a ottobre (Grafico 5).

Gli esteri sono principalmente prodotti dalla reazione enzimatica o chimica degli acidi grassi con gli alcoli (Curioni and Bosset, 2002), generalmente alti nel latte e formaggio derivante dal pascolo (Carpino et al., 2004). La maggior parte degli esteri può conferire note fruttate e tipiche floreali all'aroma del formaggio (Liu et al., 2004), soprattutto gli etil-esteri sono noti per il loro importante ruolo nella formazione di un carattere fruttato, sebbene questi esteri abbiano una soglia di percezione molto bassa. Inoltre, questi composti possono ridurre al massimo la piccantezza e l'amarezza del formaggio data dagli acidi grassi e dalle ammine (Urgeghe et al., 2012).

Grafico 5: Andamento famiglia degli Esteri.



Gli esteri importanti per lo studio sono stati: l'etil-acetato, prodotto dalla muffa *Penicillium Camemberti* (Larsen, T. O. 1998) è importante perché attribuisce al formaggio sapore di nocciola (Liu et al., 2004); l'etil-butirrato, deriva dall'etanolo e dalla tributirina (Liu, Holland, & Crow, 2003a) oppure anch'esso viene prodotto dal *Penicillium Camemberti* (Larsen, T. O. 1998) e l'etil-esanoato prodotto da acidi grassi (Liu et al., 2004) che può contribuire ad incrementare la percezione del gusto dolce (Liu et al., 2004). Altri composti significativi sono stati il 2-metilbutilbutanato, l'etil-2-idrossipropanato e il 2-fenetil-acetato, prodotto dai lieviti *Kloeckera saturnus*, *Hansenula anomala*, *Pic. pastoris* e *Saccharomyces delbrueckii* (Albertazzi, et al. 1994), anche il lievito *Klu. marxianus* (var. *lactis*, var. *marxianus* e var. *fragilis*) è responsabile di questa produzione ma non solo del 2-fenetil-acetato (Kallel-Mhiri, et al. 1993; Fabre et al., 1995; Jiang, 1995).

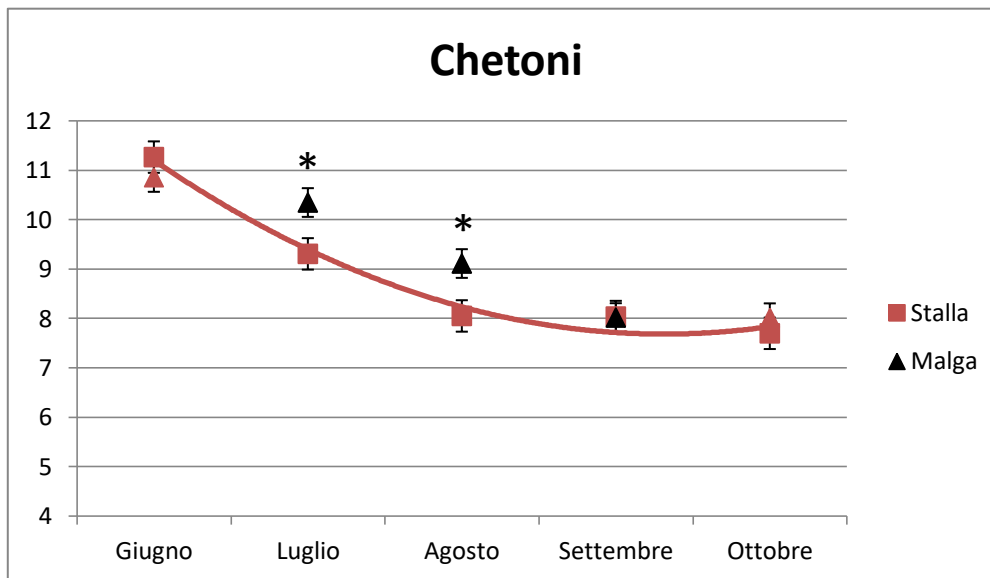
Chetoni

I chetoni hanno un andamento decrescente da giugno a ottobre e abbastanza simile nelle due curve, intersecandosi in due punti (Grafico 6).

I chetoni sono costituenti comuni di molti prodotti caseari. Nella superficie di formaggi stagionati la sintesi di questi composti è relazionata all'attività enzimatica delle muffe. I chetoni sono generati dall'azione enzimatica di lipidi e/o aminoacidi o dalla reazione di Maillard che è comune nei prodotti lattiero-caseari (Carbonell et al., 2002). Questi conferiscono all'aroma del formaggio

note fruttate, verdi, leggermente speziate e floreali (Jeon,2011). I chetoni hanno una bassa soglia di percezione e in particolare, il diacetile e l'acetoino conferiscono sapore di burro al formaggio (Molimardand Spinnler, 1996; Moio and Addeo, 1998).

Grafico 6: Andamento famiglia dei Chetoni.

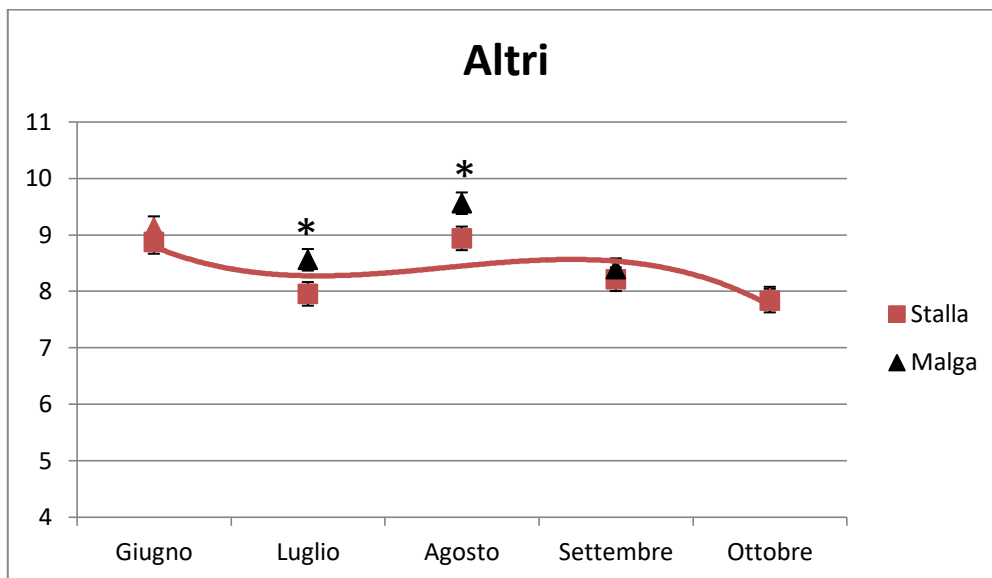


Nell'analisi i due chetoni risultati significativi sono: il 2-nonanone e l'acetoino, questo composto è l'unico VOC significativamente più basso in malga che nel formaggio di fondovalle.

Altri composti

Per i composti che non appartengono a queste famiglie chimiche, si è costituito un gruppo unico facendo la media dei vari andamenti (Grafico 7), per cui la linea dei campioni di malga risulta maggiore di quella di stalla con un calo da giugno a luglio, un picco ad agosto e un calo verso settembre e ottobre.

Grafico 7: Andamento altri composti volatili.



Ad esempio, il 3-octene, della famiglia degli alcheni ha presentato un andamento decrescente da giugno ad agosto, con un picco a settembre e successivo decremento a ottobre per il gruppo malga, mentre nel gruppo stalla si è notato un decremento da giugno ad agosto con leggero aumento a settembre. Questo composto deriva dalla degradazione ossidativa dei lipidi nel latte.

Il limonene, della famiglia dei terpeni, ha mostrato un'interessante significatività nei mesi di luglio e agosto. La linea del gruppo di malga ha subito un incremento da giugno a luglio, con una piccola diminuzione ad agosto e un altro picco a settembre, per poi calare drasticamente a ottobre. I terpeni sono importanti componenti in quei formaggi processati nelle regioni alpine in modo artigianale (Bugaud et al, 2001a; Bugaud et al, 2001b). Questi composti derivano dalla pianta, determinando l'origine del prodotto, in particolare dei formaggi di montagna che contengono più terpeni rispetto ai formaggi di pianura (Bergamaschi, 2015). Essi donano all'aroma freschezza e odore erbaceo.

Un altro composto che ha mostrato significatività nei mesi di luglio e agosto è stato lo stirene, appartenente agli idrocarburi aromatici. Il grafico ha mostrato un andamento simile tra le linee del gruppo di malga e del gruppo di stalla, in particolare c'è stato un andamento decrescente tra giugno e ottobre.

CONCLUSIONI

La presente tesi ha avuto l'obiettivo di valutare l'effetto dell'alpeggio sull'andamento dei composti volatili nel formaggio. Nella prova è stato eseguito un confronto tra formaggi ottenuti da vacche mandate in malga e vacche rimaste in stalla. Per la seguente prova sono stati utilizzati campioni di latte raccolti da giugno a ottobre 2017, presso la Malga Juribello e l'azienda di fondovalle di Alessio e Silvano Rauzi, in collaborazione con la Federazione Provinciale Allevatori del Trentino.

Dai risultati ottenuti è emerso che dei 72 composti volatili identificati, 22 risultano significativi per la nostra analisi; questi hanno presentato differenze significative ($P < 0.05$) nei mesi dedicati all'alpeggio (luglio, agosto e settembre) e un effetto residuo della malga anche nel mese di ottobre. L'andamento totale dei VOC ha mostrato una crescita delle concentrazioni dei campioni di malga rispetto a quelli di stalla, i campioni di malga hanno mostrato un calo tra giugno e luglio con un andamento quasi costante fino ad agosto e un picco a settembre con calo verso ottobre; mentre i campioni di stalla hanno mostrato un calo più accentuato fino ad agosto con picco a settembre e calo ad ottobre ma ad una concentrazione minore. In parole povere in agosto e settembre i formaggi ottenuti da latte di malga hanno presentato un tenore di composti volatili circa doppio di quelli ottenuti dai formaggi di fondovalle, dimostrando che la presenza dell'erba nell'alimentazione animale rispetto al fieno porta a cambiamenti importanti sia nell'aroma sia nel sapore dei prodotti ottenuti in alpeggio. In particolare le famiglie chimiche con andamento più significativo nei confronti delle due tesi sperimentali sono alcoli, esteri, alcuni alcheni, terpeni e idrocarburi aromatici; essi hanno mostrato un aumento forte nei mesi di alpeggio, con concentrazioni minori nei mesi di giugno e ottobre, prima e dopo l'alpeggio, cosa che non si è presentata nei campioni di stalla.

Lo studio dei composti volatili ha un'origine recente e molto importante, perché queste molecole, anche se presenti in piccola concentrazione, conferiscono all'aroma del formaggio un aspetto sensoriale rilevante, che incide sulla qualità finale dei prodotti. Il presente lavoro dimostra un approccio generale nelle ricerche sui composti volatili, per cui sono stati dimostrati principalmente gli andamenti in generale degli stessi, che essendo composti eterogenei, anche se provengono dalla stessa classe chimica potrebbero derivare da vie metaboliche differenti, per cui in un approfondimento futuro del seguente elaborato andrebbero esaminati più a fondo i singoli composti.

Lo scopo della sperimentazione è stato di dimostrare attraverso i risultati su basi scientifiche un incremento dei composti volatili nel periodo d'alpeggio, influenzato principalmente dal cambiamento dell'alimentazione, dell'ambiente e della gestione della mandria. L'importanza di questa tesi sta soprattutto nel definire le differenze aromatiche e sensoriali che si creano tra i prodotti di malga e di fondovalle, peculiarità che possono essere percepite e apprezzate dal consumatore. Questi requisiti sono necessari a definirne la valorizzazione e la caratterizzazione, che possono derivare da un particolare territorio, ambiente, gestione o tradizione legati al pascolo e alla monticazione estiva, ma che possono anche stabilirne il successo a livello commerciale grazie alle loro particolarità e qualità.

BIBLIOGRAFIA

- Agabriel, C., B. Martin, C. Sibra, J. C. Bonnefoy, M. C. Montel, R. Didiene, S. Hulind, 2004, *Effect of dairy production system on the sensory characteristics of Cantal cheeses: A plant-scale study*, Anim. Res., 53:221–234.
- Alaweh, J.I., Stevenson, M.A., Williamson, N.B., Lopez-Villalobos, N., Otley, T., 2012, *The effect of live weight change on reproductive performance in a seasonally calving, pasture fed dairy herd*, Livest. Sci., 145, 131–139.
- Albertazzi, E., Cardillo, R., Servi, S., & Zucchi, G., 1994, *Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components*, Biotechnology Letters, 16, 491–496.
- Amanor-Boadu, V.R., Marletta, P., Biere, A., 2009, *Entrepreneurial supply chains and strategic collaboration: the case of Bagòss cheese in Bagolino, Italy*. Int. Food Agribusiness Manage, Rev. 12:49-68.
- Auldust, J., Walsh, B.J., Thomson, N.A., 1997, *Effects of time-of-calving on dairy production*, Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., 57, 204.
- Badings, H. T, 1991, *Milk*, Pages 91–106 in Volatile Compounds in Food and Beverages. H. Maarse, ed. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
- Bargo, F., Muller, L., Kolver, E., Delahoy, J., 2003, *Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture*, J. Dairy Sci. 86,1–42.
- Basset-Mens, C., Ledgard, S., Boyes, M., 2009, *Eco-efficiency of intensification scenarios for milk production in New-Zealand*, J.Ecol.Econ., 68, 1615–1625.
- Battaglini L, Bovolenta S, Gusmeroli F, Salvador S, Sturaro E, 2014, *Environmental sustainability of Alpine livestock farms*, Ital J Anim Sci, 13:3155.
- Baudry, J., Thenail, C., 2004, *Interaction between farming systems, riparian zones, and landscape patterns: a case study in western France*, Landscape Urban Plan, 67:121-129.
- Berard, J., F. Bianchi, M. Careri, A. Chatel, A. Mangia, and M. Mus-ci, 2007, *Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of “Fontina Valle d’Aosta”, a protected designation of origin Italian cheese*, Food Chem, 105:293–300.
- Bergamaschi M., Bittante G., 2017, *From milk to cheese: Evolution of flavor fingerprint of milk, cream, curd, whey, ricotta, scotta, and ripened cheese obtained during summer Alpine pasture*, J. Dairy Sci. 101:1–17.

- Bergamaschi M., Cipolat-Gotet C., Stocco G., Valorz C., Bazzoli I., Sturaro E., Ramanzin M., Bittante G., 2016, *Cheesemaking in highland pastures: Milk technological properties, cream, cheese and ricotta yields, milk nutrients recovery, and products composition*, ELSEVIER, J. Dairy Sci., 99:9631–9646.
- Bergamaschi, M., E. Aprea, E. Betta, F. Biasioli, C. Cipolat-Gotet, A. Cecchinato, G. Bittante, F. Gasperi, 2015, *Effects of the dairy system, herd and individual cow characteristics on the volatile organic compound profile of ripened model cheeses*, J. Dairy Sci., 98:2183–2196.
- Bergamaschi, M., F. Biasioli, A. Cecchinato, C. Cipolat-Gotet, A. Cornu, F. Gasperi, B. Martin, G. Bittante, 2015b, *PTR-ToF-MS: A high-throughput and innovative method to study the influence of dairy system and cow characteristics on the volatile compound fingerprint of cheeses*, J. Dairy Sci., 98:8414–8427.
- Bernués A, Ruiz R, Olaizola A, Villalba D, Casasús I, 2011, *Sustainability of pasture-based livestock farming systems in the European Mediterranean context: synergies and trade-offs*, Livest Sci, 139:44–57.
- Bertoni, G., L. Calamari, and M. G. Maianti, 2001, *Producing specific milk for specialty cheeses*, Proc. Nutr. Soc., 60:231–246.
- Bills, D.D., Day, E.A., 1964, *Determination of the major free fatty acids of Cheddar cheese*, J. Dairy Sci. 47, 733– 738.
- Bittante G., Cecchinato A., Bergamaschi M., settembre 2017, *Genetica e profumo del formaggio*, Dalla Ricerca Scientifica, n°3.
- Bittante, G., C. Cipolat-Gotet, F. Malchiodi, E. Sturaro, F. Tagliapietra, S. Schiavon, A. Cecchinato, 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.
- Bosset, J. O., & Liardon, R., 1984, *The aroma composition of Swiss Gruy"ere cheese. II. The neutral volatile components*, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 17, 359–362.
- Bosset, J.O., Gauch, R., 1993, *Comparison of the volatile flavour compounds of six European 'AOC' cheeses by using a new dynamic headspace GCMS method*, Int. Dairy J. 3, 359– 377.
- Bovolenta S., Corazzin M., Sacca E., Gasperi F., Biasioli F., Ventura W., 2009, *Performance and cheese quality of Brown cows grazing on mountain pasture fed two different levels of supplementation*, Livest Sci, 124:58–65.

- Bovolenta S., Ventura W., Piasentier E., Malossini F., 1998, *Supplementation of dairy cows grazing an Alpine pasture: effect of concentrate level on milk production, body condition and rennet coagulation properties*, Ann Zootech, 47:169–178.
- Bovolenta, S., A. Romanzin, M. Corazzin, M. Spanghero, E. Aprea, F. Gasperi, E. Piasentier, 2014, *Volatile compounds and sensory properties of Montasio cheese made from the milk of Simmental cows grazing on alpine pastures*, J. Dairy Sci., 97:7373–7385.
- Buchin, S., B. Martin, D. Dupont, A. Bornard, C. Achilleos, 1999, *Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese*, J. Dairy Res., 66:579–588.
- Bugaud, C., Buchin, S., Coulon, J. B., Hauwuy, A., & Dupont, D., 2001a, *Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk*, Le Lait, 81, 401–414.
- Bugaud, C., Buchin, S., Hauwuy, A., & Coulon, J. B., 2001b, *Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures*, Le Lait, 81, 757–773.
- C. Cipolat-Gotet, A. Cecchinato, M. De Marchi, G. Bittante, 2013, *Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process*, J. Dairy Sci. 96 :1–14, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6516>.
- Caplan, Z., C. Melilli, D. M. Barbano, 2013, *Gravity separation of fat, somatic cells, and bacteria in raw and pasteurized milks*, J. Dairy Sci, 96:2011–2019.
- Capuano, E., R. Gravink, R. Boerrigter-Eenling, S. M. van Ruth, 2015, *Fatty acid and triglycerides profiling of retail organic, conventional and pasture milk: Implications for health and authenticity*, Int. Dairy J., 42:58–63.
- Caraveli, H., 2000, *A comparative analysis on intensification and extensification in Mediterranean agriculture: dilemmas for LFAs policy*, J. Rural Stud, 16:231-242.
- Carbonell, M., Nunez, M., and Fernandez-Garcia, E., 2002, *Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese*, Lait 82, 699-711
- Carpino, S., S. Mallia, S. La Terra, C. Melilli, G. Licitra, T. E. Acree, D. M. Barbano, P. J. Van Soest, 2004, *Composition aroma compounds of Ragusano cheese: Native pasture and total mixed rations*, J. Dairy Sci., 87:816–830.

- Carpino, S., S. Mallia, S. La Terra, C. Melilli, G. Licitra, T. E. Acree, D. M. Barbano, e P. J. Van Soest, 2004, *Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: Native pasture and total mixed rations*, J. Dairy Sci., 87:816–830.
- Cecchinato, A., C. Cipolat-Gotet, J. Casellas, M. Penasa, A. Rossoni, G. Bittante, 2013, *Genetic analysis of rennet coagulation time, curd-firming rate, and curd firmness assessed over an extended testing period using mechanical and near-infrared instruments*, J. Dairy Sci., 96:50–62.
- Cecchinato, A., G. Bittante, 2016, *Genetic, herd, and environmental relationships of different measures of individual cheese yield and curd nutrients recovery/whey loss and coagulation properties of bovine milk*, J. Dairy Sci., 99:1975–1989, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9629>.
- Chilibroste, P., Soca, P., Mattiauda, D., Bentancur, O., Robinson, P., 2007, *Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review*, Anim. Prod. Sci., 47, 1075–1084.
- Clark, C.E.F., Fulkerson, W.J., Nandra, K.S., Barchia, I., Macmillan, K.L., 2005, *The use of indicators to assess the degree of mobilisation of body reserve in dairy cows in early lactation on a pasture-based diet*, Livest. Prod. Sci., 94, 199–211.
- Cocca, G., Sturaro, E., Gallo, L., Ramanzin, M., 2012, *Is the abandonment of traditional livestock farming systems the main driver of mountain landscape change in Alpine areas?* Land Use Policy 29:878-886.
- Coffey, M.P., Simm, G., Oldham, J.D., Hill, W.G., Brotherstone, S., 2004, *Genotype and diet effects on Energy balance in the first three lactations of dairy cows*, J. Dairy Sci., 87, 4318–4326.
- Collomb, M., U. Butikofer, R. Sieber, B. Jeangros, J. O. Bosset, 2002, *Correlations between fatty acids in cows' milk fat produced in the lowland, mountain and highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder*, Int. Dairy J., 12:661–666.
- Coppa, M., I. Verdier-Metz, A. Ferlay, P. Pradel, R. Didienne, A. Farruggia, M. C. Montel, B. Martin, 2011, *Effect of different grazing systems on upland pastures compared with hay diet on cheese sensory properties evaluated at different ripening times*, Int. Dairy J., 21:815–822.

- Cornu, A., N. Rabiau, N. Kondjoyan, I. Verdier-Metz, P. Pradel, P. Tournayre, J. L. Berdague, B. Martin, 2009, *Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening*, *Int. Dairy J.*, 19:588–594.
- Corti M, *L'Alpeggio in Lombardia: gli animali*.
- Coulon, J.B., Rémond, B., 1991, *Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supplied to the dairy cow: A review*. *Livest. Prod. Sci.*, 29, 31–47.
- Curioni, P.M.G., J.O. Bosset, 2002, *Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry*, *International Dairy Journal* 12, 959–984.
- Daugstad K, Kirchengast C, 2013, *Authenticity and the pseudo-backstage of agri-tourism*, *Ann Tour Res*, 43:170–191.
- Dillon, P., 2006, *Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows*, *Fresh Forage for Dairy Cattle* (pp.1–26).
- Dillon, P., Buckley, F., O'Connor, P., Hegarty, D., Rath, M., 2003, *A comparison of different dairy cow breeds on a seasonal grass-based system of milk production: 1. Milk production, liveweight, body condition score and DM intake*, *Livest. Prod. Sci.*, 83, 21–33.
- Dillon, P., Crosse, S., Stakelum, G., Flynn, F., 1995, *The effect of calving date and stocking rate on the performance of spring-calving dairy cows*, *Grass Forage Sci.*, 50, 286–299.
- Dobos, R.C., Fulkerson, W.J., Sinclair, K., Hinch, G.H., 2009, *Grazing behaviour and pattern of intake of dairy cows grazing kikuyu (Pennisetum clandestinum) grass pastures in relation to sward height and length of grazing session*, *Anim. Prod. Sci.*, 49, 233–238.
- Dodgshon, R.A., Olsson, G.A., 2007, *Seasonality in European mountain areas. A study in human ecology*, *Landsc. Series* 7:85-101.
- Enrico Sturaro, Mara Thiene, Giampaolo Cocca, Meriem Mrad, Tiziano Tempesta, Maurizio Ramanzin, 2013, *Factors influencing summer farms management in the Alps*, *Ital J Anim Sci*, 12:25.
- Eriksson C, 2011, *What is traditional pastoral farming? The politics of heritage and 'real values' in Swedish summer farms (fäbodbruk)*, *Pastoralism*, 1:1–18.
- Euber, J. R., J. R. Brunner, 1984, *Reexamination of fat globule clustering and creaming in cow milk*, *J. Dairy Sci*, 67:2821–2832.
- European Commission, 2011a, *The CAP towards 2020 – impact assessment of alternative policy options*, Brussels (Belgium): European Commission, Directorate-General for Agriculture and Rural Development.

- European Commission, 2011b, *Our life insurance, our natural capital: an EU biodiversity strategy to 2020 COM(2011) 244 final*, Brussels (Belgium): European Commission.
- Fabre, C. E., Duviau, V. J., Blanc, P. J., & Goma, G., 1995, *Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, 17, 1207–1212.
- Farruggia A, Pomies D, Coppa M, Ferlay A, Verdier-Metz I, Le Morvan A, Bethier A, Pompanon F, Troquier O, Martin B, 2014, *Animal performances, pasture biodiversity and dairy product quality: how it works in contrasted mountain grazing systems*, *Agric Ecosyst Env*, 185:231–244.
- Feligni, M., E. Brambati, S. Panelli, M. Ghitti, R. Sacchi, E. Capelli, C. Bonacina, 2014, *One-year investigation of Clostridium spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis*, *Food Contr.*, 42:71–77.
- Ferris, C.P., Gordon, F.J., Patterson, D.C., Mayne, C.S., Kilpatrick, D.J., 1999, *The influence of dairy cow genetic merit on the direct and residual response to level of concentrate supplementation*, *J.Agric.Sci.*, 132, 467–481.
- Fox, P.F., Singh, T.K., McSweeney, P.L.H., 1995, *Biogenesis of flavour compounds in cheese*, *Adv. Exp. Med.*, 367, 59–98.
- Francesco Zendri, Maurizio Ramanzin, Giovanni Bittante & Enrico Sturaro, 2016, *Transhumance of dairy cows to highland summer pastures interacts with breed to influence body condition, milk yield and quality*, *Ital J Anim Sci*, 15:3, 481-491.
- Friggens, N.C., Andersen, J.B., Larsen, T., Aaes, O., Dewhurst, R.J., 2004, *Priming the dairy cow for lactation: a review of dry cow feeding strategies*, *Anim.Res.*, 53, 453–473.
- Friggens, N.C., Brun-Lafleur, L., Faverdin, P., Sauvant, D., Martin, O., 2013, *Advances in predicting nutrient partitioning in the dairy cow: recognizing the central role of genotype and its expression through time*, *Animal*, 7, 89–101.
- Gallois, A., & Langlois, D., 1990, *New results in the volatile odorous compounds of French cheeses*, *Le Lait*, 70, 89–106.
- García, S.C., Holmes, C.W., MacDonald, A., Lundman, M., Lundman, J., Pacheco-Navarro, R., 2000, *Comparative efficiency of autumn and spring calving for pasture-based dairy systems*, *Asian–Aus. J. Anim. Sci.*, 13, 533–537.
- García-Martínez A, Olaizola A, Bernués A, 2009, *Trajectories of evolution and drivers of change in European mountain cattle farming systems*, *Animal*, 3:152–165.

- Gellrich, M., Baur, P., Koch, B., Zimmermann, N.E., 2007, *Agricultural land abandonment and natural forest re-growth in the Swiss mountain: a spatially explicit economic analysis*, *Agric. Ecosys. Environ.* 118:93-108.
- Giaccone, D., A. Revello-Chion, L. Galassi, P. Bianchi, G. Battelli, M.Coppa, E. Tabacco, G.Borreani, 2016, *Effect of milk thermisation and farming system on cheese sensory profile and fatty acid composition*, *Int. Dairy J.*, 59:10–19.
- Gibon, A., 2005, *Managing grassland for production, the environment and the landscape. Challenges at the farm and the landscape level*, *Livest. Prod. Sci.*, 96:11-31.
- Giupponi, C., Ramanzin, M., Sturaro, E., Fuser, S., 2006, *Climate and land use changes, biodiversity and agri-environmental measures in the Belluno Province, Italy*. *Environ. Sci. Policy*, 9:163-173.
- Gorlier, A., M. Lonati, M. Renna, C. Lussiana, G. Lombardi, L.M. Battaglini, 2012, *Changes in pasture and cow milk compositions during a summer transhumance in the western Italian Alps*, *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 85:216–223.
- Gregorini, P., Clark, C., Jago, J., Glassey, C., McLeod, K., Romera, A., 2009, *Restricting time at pasture: Effects on dairy cow herbage intake, foraging behaviour, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session*, *J.DairySci.*, 92,4572–4580.
- Gruber, L., Steinwider, A., Stefanon, B., Steiner, B., Steinwender, R., 1999, *Influence of grass land management in Alpine regions and concentrate level on N excretion and milk yield of dairy cows*, *Livest.Prod. Sci.*, 61, 155–170.
- György Vas and Károly Vekey, 2004, *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*, *J. Mass Spectrom.*; 39: 233–254.
- Hayaloglu, A. A., C. Tolu, K. Yasar, D. Sahingil, 2013, *Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening*, *J. Dairy Sci.*, 96:2765–2780.
- Hemme, T., 2012, *IFCN Dairy Report 2012*, International Farm Comparison Network, Kiel, Germany.
- Horan, B., Dillon, P., Faverdin, P., Delaby, L., Buckley, F., Rath, M., 2005, *The interaction of strain of holstein-friesian cows and pasture-based feed systems on milk yield, body weight and body condition score*, *J. Dairy Sci.*, 88, 1231–1243.

- Horn, M., Knaus, W., Kirner, L., Steinwidder, A., 2012, *Economic evaluation of longevity in organic dairy cows*, *Org.Agric.*, 2, 127–143.
- Horn, M., Steinwidder, A., Gasteiner, J., Podstatzky, L., Haiger, A., Zollitsch, W., 2013, *Suitability of different dairy cow types for an Alpine organic and low-input milk production system*, *Livest.Sci.*, 153, 135–146.
- Hunziker, M., 1995, *The spontaneous reafforestation in abandoned agricultural lands: perception and aesthetic assessment by locals and tourists*, *Landscape Urban Plan*, 3:399-410.
- Jeon, Seon-Suk, et al., 2011, *Qualitative and Quantitative Analyses of Volatile Compounds in Cream Cheese and Cholesterol-removed Cream Cheese Made from Whole Milk Powder*, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31.6:879-885.
- Jiang, J., 1995, *Volatile metabolites produced by Kluyveromyces lactis and their changes during fermentation*, *Process Biochemistry*, 30, 635–640.
- Jorritsma, R., Wensing, T., Kruip, T.A., Vos, P.L., Noordhuizen, J.P., 2003, *Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows*, *Vet.Res.*, 34, 11–26.
- Jürgen H. Gross, 2017, *“Mass Spectrometry”*, a textbook, third edition, Springer.
- Kallel-Mhiri, H., & Miclo, A., 1993, *Mechanism of ethyl acetate synthesis by Kluyveromyces fragilis*, *FEMS Microbiology Letters*, 111, 207–212.
- Karahadian, C., Josephson, D. B., & Lindsay, R. C., 1985a, *Volatile compounds from Penicillium sp. contributing musty-earthy notes to Brie and Camembert cheese flavors*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 339–343.
- Karahadian, C., Josephson, D. B., & Lindsay, R. C., 1985b, *Contribution of Penicillium sp. to the flavors of Brie and Camembert cheese*, *Journal of Dairy Science*, 68, 1865–1877.
- Keeney, M., & Day, E. A., 1957, *Probable role of the Strecker degradation of amino acids in development of cheese flavor*, *Journal of Dairy Science*, 40, 874–876.
- Kennedy, J., Dillon, P., Delaby, L., Faverdin, P., Stakelum, G., Rath, M., 2003, *Effect of genetic merit and concentrate supplementation on grass intake and milk production with Holstein-Friesian dairy cows*, *J.Dairy Sci.*, 86, 610–621.
- Kennedy, J., Dillon, P., Faverdin, P., Delaby, L., Buckley, F., Rath, M., 2002, *The influence of cow genetic merit for milk production on response to level of concentrate supplementation in a grass-based system*, *Anim. Sci.*, 75, 433–445.

- Kianicka S, Knab L, Buchecker , 2010, *Maiensäss – Swiss Alpine summer farms – an element of cultural heritage between conservation and further development: a qualitative case study*, Int J Heritage Stud, 16:486–507.
- Knaus, W., 2009, *Dairy cows trapped between performance demands and adaptability*, J. Sci. FoodAgric., 89 (1107–1114), 1623.
- Kolver, E.S., Roche, J.R., DeVeth, M.J., Thorn, P.L., Napper, A.R., 2002, *Total mixed rations versus pasture diets: Evidence for a genotype x diet interaction in dairy cow performance*, Proc.N.Z.SocAnim.Prod., 62, 246–251.
- Krysl, L., Hess, B., 1993, *Influence of supplementation on behaviour of grazing cattle*, J.Anim.Sci., 71,2546–2555.
- L. Marilley, M.G. Casey, 2004, *Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*, International Journal of Food Microbiology 90, 139– 159.
- L. Marilley, M.G. Casey, 2004, *Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*, International Journal of Food Microbiology 90, 139– 159.
- Larsen, T. O., 1998, *Volatile flavour production by Penicillium caseifulvum*, International Dairy Journal, 8:883–887.
- Leiber F, Kreuzer M, Leuenberger H, Wettstein HR, 2006, *Contribution of diet type and pasture conditions to the influence of high altitude grazing on intake, performance and composition and renneting properties of the milk of cows*, Anim Res, 55:37–53.
- Liaw, I. W., R. E. Miracle, S. M. Jervis, M. A. D. Listiyani, M.A. Drake, 2011, *Comparison of the flavor chemistry and flavor stability of Mozzarella and Cheddar wheys*, J. Food Sci., 76:C1188–C1194.
- Liu, S. Q., R. Holland, and V. L. Crow, 2004, *Esters and their bio-synthesis in fermented dairy products*, Int. Dairy J., 14:923–945.
- Liu, S.-Q., Holland, R., & Crow, V. L., 2003a, *Synthesis of ethyl butanoate by a commercial lipase in aqueous media under conditions relevant to cheese ripening*, Journal of Dairy Research, 70.
- MacDonald, D., Crabtree, J.R., Wiesinger, G., Dax, T., Stamou, N., Fleury, P., Gutierrez Lazpita, J., Gibon, A., 2000, *Agricultural abandonment in mountain areas of Europe: Environmental consequences and policy response*, J. Environ. Manage, 59:47-69.

- Mack G, Walterand T, Flury C, 2013, *Seasonal Alpine grazing trends in Switzerland: economic importance and impact on biotic communities*, Environ Sci Policy, 32:48–57.
- Marco Horn, Andreas Steinwidder, Rupert Pfister, Johann Gasteiner, Mogens Vestergaard, Torben Larsen, Werner Zollitsch, 2014, *Do different cow types respond differently to a reduction of concentrate supplementation in an Alpine low-input dairy system?* , Livestock Science, 170, 72–83.
- Marco Horn, Andreas Steinwidder, Walter Starz, Rupert Pfister, Werner Zollitsch, 2014, *Interactions between calving season and cattle breed in a seasonal Alpine organic and low-input dairy system*, ELSEVIER, Livestock Science 160, 141–150.
- Marini, L., Fontana, P., Klimek, S., Battisti, A., Gaston, K.J., 2009, *Impact of farm size and topography on plant and insect diversity of managed grasslands in the Alps*, Biol. Conserv. 142:394-403.
- Marini, L., Klimek, S., Battisti, A., 2011, *Mitigating the impacts of the decline of traditional farming on mountain landscapes and biodiversity: a case study in the Europe an Alps*, Environ. Sci. Policy, 14, 258–267.
- Martin, B., I. Verdier-Metz, S. Buchin, C. Hurtaud, J. B. Coulon, 2005, *How does the nature of forages and pastures diversity influence the sensory quality of dairy livestock products?* J. Anim. Sci., 81:205–212.
- Mattiello S, Battini M, Andreoli E, Barbieri S, 2011, *Short communication: breed differences affecting dairy cattle welfare in traditional Alpine tie-stall husbandry systems*, J Dairy Sci, 94:2403–2407.
- McCarthy, B., Delaby, L., Pierce, K.M., Brennan, A., Horan, B., 2013, *The effect of stocking rate and calving date on milk production of Holstein-Friesian dairy cows*, Livest.Sci., 153, 123–134.
- McSweeney, P.L.H., Nursten, H.E., Urbach, G., 1997, *Flavours and off-flavours in milk and dairy products*, In: Fox, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 3. Chapman & Hall, London, pp. 403–468. 2nd ed.
- Moio, L. e F. Addeo, 1998, *Grana Padano cheese aroma*, J. Dairy Res., 65:317–333.
- Molimard, P., & Spinnler, H. E., 1996, *Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties*, Journal of Dairy Science, 79, 169–184.
- Molimard, P., & Spinnler, H. E., 1996, *Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties*, Journal of Dairy Science, 79, 169–184.

- Mottet, A., Ladet, S., Coqué, N., Gibon, A., 2006, *Agricultural land-use change and its drivers in mountain landscapes: a case study in the Pyrenees*, Agric. Ecosyst. Environ. 114:296-310.
- Orland, B., 2004, *Alpine milk: dairy farming as a pre-modern strategy of land use*, Environ. Hist, 10:327-364.
- P.Soca, H.González, H.Manterola, M.Bruni, D.Mattiauda, P.Chilibroste, P.Gregorini, 2014, *Effect of restricting time at pasture and concentrate supplementation on herbage intake, grazing behaviour and performance of lactating dairy cows*, Livestock Science, Elsevier, 170, 35-42.
- Patterson, D., McGilloway, D., Cushnahan, A., Mayne, C., Laidlaw, A., 1998, *Effect of duration of fasting period on short-term intake rates of lactating dairy cows*, Anim.Sci., 66,299–306.
- Perez-Ramirez, E., Delagarde, R., Peyraud, J.L., 2009, *Restricting daily time at pasture at low and high herbage allowance: effects on herbage intake and behavioural adaptation of lactating dairy cows*, J.DairySci., 92, 3331–3340.
- Piccand, V., Cutullic, E., Meier, S., Schori, F., Kunz, P.L., Roche, J.R., Thomet, P., 2013, *Production and reproduction of Fleckvieh, BrownSwiss, and 2 strains of Holstein-Friesian cows in a pasture-based, seasonal calving dairy system*, J.DairySci., 96, 5352–5363.
- Pittroff, W., Soca, P., 2006, *Physiology and models of feeding behaviour and intake regulation in food and feeding in domestic vertebrates*, In: Bels, V. (Ed.), Feeding in Domestic Vertebrates: From Structure to Behaviour, Paris, p. 278.
- Politis, I., K. F. Ng-Kwai-Hang, 1988, *Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency*, J. Dairy Sci., 71:1711–1719.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP, 2009, *Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare*, J Dairy Sci, 92:5769–5801.
- Roche, J., Sheahan, A., Chagas, L., Berry, D., 2007, *Concentrate supplementation reduces postprandial plasma gherlino in grazing dairy cows: a possible neuroendocrine basis for reduced pasture intake in supplemented cows*, J.DairySci., 90,1354–1363.
- Roche, J.R., 2011, *Feeds, ration for mulation – lactation rations in cows on grazing systems*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 453–457. (2ndedition).

- S. Bovolenta, A. Romanzin, M. Corazzin, M. Spanghero, E. Aprea, F. Gasperi, E. Piasentier, 2014, *Volatile compounds and sensory properties of Montasio cheese made from the milk of Simmental cows grazing on alpine pastures*, J. Dairy Sci. 97:1–13, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8396>.
- Scarpa, R., Notaro, S., Louviere, J., Raffaelli, R., 2010, *Exploring scale effects of best/worst rank ordered choice data to estimate benefits of tourism in Alpine grazing commons*, Am. J. Agr. Econ., 93:809-824.
- Soca, P., 2006, *Estrategia de rumiantes a pastoreo como respuesta a la intervención en el patrón diario de conducta. Sustentabilidade em sistemas pecuários*, Workshop Internacional. In: Masonni, A.F.B. (Ed.). Sustentabilidade em sistemas pecuarios, Brazil.
- Steinberger, S., Rauch, P., Spiekens, H., Hofmann, G., Dorfner, G., 2012, *Vollweide mit Winterabkalbung – Ergebnisse von Pilotbetrieben*, LfL Schr, 5, 1–102.
- Steinwider, A., Starz, W., Podstatzky, L., Kirner, L., Pötsch, E.M., Pfister, R., Gallnböck, M., 2010, *Low-Input Vollweidehaltung von Milchkühen im Berggebiet Österreichs – Ergebnisse von Pilotbetrieben bei der Betriebsumstellung*, Züchtungskunde, 82, 241–252.
- Stocco, G., C. Cipolat-Gotet, A. Cecchinato, L. Calamari, G. Bittante, 2015, *Milk skimming, heating, acidification, lysozyme, and rennet affect the pattern, repeatability, and predictability of milk coagulation properties and of curd-firming model parameters: A case study of Grana Padano*, J. Dairy Sci., 98:5052–5067.
- Streifeneder, T., Tappeiner, U., Ruffini, F.V., Tappeiner, G., Hoffmann, C., 2007, *Selected aspects of the agricultural structure change within the Alps - a comparison of harmonised agri-structural indicators on a municipal level within the Alpine Convention Area*, Rev. Geogr. Alp, 95:41-52.
- Strijker D, 2005, *Marginal lands in Europe – causes of decline*, Basic Appl Ecol, 6:99–106.
- Sturaro E, Marchiori E, Cocca G, Penasa M, Ramanzin M, Bittante G, 2013a, *Dairy systems in mountainous areas: farm animal biodiversity, milk production and destination, and land use*, Livest Sci, 58:157–168.
- Sturaro E, Thiene M, Cocca G, Mrad M, Tempesta T, Ramanzin M, 2013b, *Factors influencing summer farms management in the Alps*, Ital J Anim Sci, 12:153–161.
- Thiene M, Scarpa R, 2008, *Hiking in the Alps: exploring substitution patterns of hiking destinations*, Tourism Econ, 14:263–282.

- Thiene, M., Scarpa, R., 2009, *Deriving and testing efficient estimates of WTP distributions in destination choice models*, Environ. Resour. Econ., 44:379-395.
- Thomet, P., Cutullic, E., Bisig, W., Wuest, C., Elsaesser, M., Steinberger, S., Steinwidder, A., 2011, *Merits of full grazing systems as a sustainably and efficient milk production strategy*, Proc. European Grassl. Fed. Symp, 16, 273–285.
- Thomet, P., Leuenberger, S., Blättler, T., 2004, *Projekt Opti-Milch: Produktionspotential des Vollweidesystems*, Agrarforschung 11, 336–441.
- Tunick, M. H., 2014, *Analyzing volatile compounds in dairy products*, J. Sci. Food Agric., 94:1701–1705.
- Urgeghe, P. P., C. Piga, M. Addis, R. Di Salvo, G. Piredda, M. F. Scintu, I. V. Wolf, and G. Sanna, 2012, *SPME/GC-MS characterization of the volatile fraction of an Italian PDO sheep cheese to prevalent lypolitic ripening: The case of Fiore Sardo*, Food Anal. Methods, 5:723–730.
- Uthes, S., Piorr, A., Zander, P., Bienkowski, J., Ungaro, F., Dalgaard, T., Stolze, M., Moschitz, H., Schader, C., Happe, K., Sahrbacher, A., Damgaard, M., Toussaint, V., Sattler, C., Reinhardt, F.J., Kjeldsen, C., Casini, L., Muller, K., 2010, *Regional impacts of abolishing direct payments: an integrated analysis in four European regions*, Agric. Syst. 104 :110-121.
- Van Huylbroeck, G., Durand, G., 2003, *Multifunctional agriculture: a new paradigm for European agriculture and rural development*, Ashgate Publ., Aldershot, UK.
- Veerkamp, R.F., Simm, G., Oldham, J.D., 1994, *Effects of interaction between genotype and feeding system on milk production, feed intake, efficiency and body tissue mobilisation in dairy heifers*, Livest. Prod. Sci, 39, 229–241.
- Yan, T., Mayne, C.S., Keady, T.W.J., Agnew, R.E., 2006, *Effect of Dairy Cow Genotype with Two Planes of Nutrition on Energy Partitioning Between Milk and Body Tissue*, J.DairySci, 89, 1031–1042.
- Zemp M, Leuenberger H, Künzi N, Blum W, 1989, *Influence of high altitude grazing on productive and physiological traits of dairy cows. I. Influence on milk production and body weight*, J Anim Breed Genet, 106:278–288.
- Zendri F, Sturaro E, Ramanzin M, 2013, *Highland summer pastures play a fundamental role for dairy systems in an Italian Alpine region*, Agric Conspec Sci, 78:295–229.

- Zendri, F., M. Ramanzin, G. Bittante, E. Sturaro, 2016, *Transhumance of dairy cows to highland summer pastures interacts with breed to influence body condition, milk yield, and quality*, Ital. J. Anim. Sci., <http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2016.1217176>.
- Zimmermann, A., 2006, *Kosten und Umweltwirkungen der Milchviehfütterung und Beurteilung verschiedener Futtermittel und Fütterungsvarianten mittels Vollkostenrechnung und Ökobilanzierung*, ART-Berichte 662, 1–12.

SITOGRAFIA:

- https://it.wikipedia.org/wiki/Standard_interno
- https://it.wikipedia.org/wiki/Gascromatografia-spettrometria_di_massa
- http://www.uniroma2.it/didattica/MA2/deposito/spettrometria_massa.pdf
- http://www.dsa.unipr.it/trezzo/uni_parma/capitoli/inquinanti/cov_e_idrocarburi.htm
- <https://www.google.it/search?q=tempo+di+ritenzione+cromatografia&oq=tempo+di+ritenzione+&aqs=chrome.1.69i57j0l5.7266j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- https://www.google.it/search?safe=active&biw=1517&bih=641&tbm=isch&sa=1&ei=0XCfW-amFZLTsAetl7fICg&q=malga+juribello+nel+passato&oq=malga+juribello+nel+passato&gs_l=img.3...277735.281623.0.282058.12.12.0.0.0.0.149.1309.0j10.10.0....0...1c.1.64.img..2.1.149...0j0i30k1j0i5i30k1j0i24k1.0.-i_3khkevPU#imgrc=jLbirALkBIRpeM
- <https://www.tastetrentino.it/gustare/produttori/caseificio-sociale-di-primiero/>

RINGRAZIAMENTI

Non posso terminare questo lavoro e questa esperienza formativa senza volgere la più sincera gratitudine a Giovanni Bittante, relatore poliedrico e sempre presente durante il periodo di analisi e la stesura del lavoro e ai miei correlatori Flavia Gasperi e Matteo Bergamaschi, per i consigli dati durante l'intera sperimentazione. Vorrei ringraziare le persone che mi sono state vicine e mi hanno aiutato durante il periodo di raccolta dati, quindi tutte le persone che fanno parte dell'Unità di ricerca di Qualità Sensoriale della Fondazione Edmund Mach e del laboratorio di Qualità del Latte dell'Università di Padova, in particolare Emanuela, Eugenio, Riccardo, Julia, Nicolò e Qianlin Ni. E' stata un'esperienza molto interessante, formativa e che mi ha fatto crescere sia dal punto di vista personale che istruttivo. Inoltre un ringraziamento va fatto anche alla Federazione Provinciale Allevatori del Trentino e al direttore Claudio Valorz per averci dato la possibilità di includere la nostra sperimentazione nei loro lavori e di compiere la raccolta dati sulle loro bovine.

Vorrei infine ringraziare la mia famiglia, Dino, i miei coinquilini, i miei amici e tutte le persone che ho avuto il piacere di conoscere in questo percorso e che hanno sempre fatto il possibile per sostenermi nei momenti più difficili, credo che senza di loro non ce l'avrei fatta e mi auguro di imbartermi ancora in persone così speciali.

Elisa Rossi