

PRODUZIONE DI “CASU MARZU” IN CONDIZIONI CONTROLLATE: VALUTAZIONE DELL’EFFETTO DELLA COLONIZZAZIONE DA *Piophila casei* SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E CHIMICHE DEI FORMAGGI

PRODUCTION UNDER CONTROLLED CONDITIONS OF “CASU MARZU” CHEESE: EFFECT OF THE *Piophila Casei* COLONIZATION ON MICROBIAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE CHEESES

Mazzette R.¹, Colleo M.M.¹, Riu G.², Piras G.¹, Piras F.¹, Addis M.², Pes M.², Pirisi A.², Meloni D.¹, Mureddu A.¹, Spada S.², Fiori M.², Coinu M.³, Lentini A.³

⁽¹⁾ Dip. Biologia Animale-sez. Ispezione Alimenti, Sassari;

⁽²⁾ AGRIS – Dip. Ricerca nelle Produzioni Animali, Olmedo (SS);

⁽³⁾ Dip. di Protezione delle Piante - sez. Entomologia Agraria, Sassari

SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the effect of the *Piophila casei* colonization under controlled conditions on “casu marzu”, a typical Sardinian sheep milk cheese. Three batches of two different kind of cheese (*PO*, holed paste and *PC*, firm paste) were produced in duplicate (test and control). Test cheeses were exposed to the *Piophila casei* colonization in a conditioned store room, while control cheeses were suitably protected. All the samples were analyzed at 0, 10, 30, 60 and 90 days from the production. The pH and a_w , the chemical composition and the microbiological parameters (food safety and process hygiene criteria) were determined. The colonization was unhomogeneous between the batches: *PO* cheeses were more easily colonized and showed more intense proteolysis and lipolysis respect to *PC* cheeses. The microbiological parameters were strongly affected by the experimental process conditions. The authors discuss about the opportunity of a controlled production of “casu marzu” and the implications to the health of consumers.

Key words

Sheep milk cheese, *Piophila casei*, chemical characteristics, food hygiene, “casu marzu”

INTRODUZIONE

Il “casu marzu” (letteralmente “formaggio marcio”) viene prodotto in Sardegna da formaggi ovini e bovini di diversa tipologia (a latte crudo, semicotti) per azione delle larve della mosca casearia: *Piophila casei*⁽¹⁾. È inserito nell’elenco dei prodotti tradizionali della Regione Sardegna (D.M. 18 Luglio 2000 e successive integrazioni), con denominazioni differenti in relazione alle aree di produzione: casu becciu (formaggio vecchio), casu fattittu (formaggio pronto), hasu muhidu (formaggio mosso), casu frazigu (formaggio marcio), casu modde (formaggio molle), casu gumpagadu (formaggio con i vermi).

Prodotti simili al “casu marzu” fanno parte anche della tradizione di altre località in Italia, come il cacio marcatto (Abruzzo), il salterello (Friuli), il furmai nis (Emilia Romagna), e all’estero, come il rothen cheese (Croazia) ed il milbenkäse (Germania).

Tradizionalmente la produzione di “casu marzu” avviene nei mesi più caldi, quando l’aumento della temperatura favorisce il ciclo vitale della *Piophila casei*, frequentemente presente nei locali di produzione e stagionatura dei formaggi. La comparsa della *Piophila casei* si registra in genere intorno alla fine di maggio, mentre la scomparsa avviene intorno alla fine di ottobre - inizio di novembre. Durante questo periodo si hanno in media 6 cicli biologici

completi che molto spesso si sovrappongono cronologicamente⁽⁶⁾. Nel periodo favorevole alla vita della mosca, la presenza di gonfiori precoci e di fessurazioni della crosta dei formaggi favorisce l'infestazione e la deposizione delle uova da parte dell'insetto. La colonizzazione viene anche volontariamente agevolata con l'adozione di alcuni accorgimenti, tra i quali: la riduzione della concentrazione e dei tempi di salamoia; una pressatura meno intensa; la foratura della crosta; l'uso dell'olio, che ammorbidisce la crosta e attrae il dittero; l'esposizione delle forme negli ambienti più caldi dell'azienda (ambiente di caseificazione dove è presente il fuoco); la ridotta frequenza del rivoltamento delle forme. Inoltre, in seguito alla colonizzazione, si ricorre all'asportazione del piatto superiore dei formaggi ("su tappu") ed allo sminuzzamento della pasta, oltre che all'impilamento delle forme, per favorire la migrazione della *Piophilha*. Essa depone le uova, in numero variabile da 140 a 500 per ciascun esemplare, dalle quali si sviluppano le larve L1, L2 ed L3, queste ultime caratteristiche per la capacità di compiere frequenti salti (23 cm di lunghezza e di 20 cm di altezza massima). La durata media dello stadio larvale è pari a 5 giorni, ma in condizioni avverse di temperatura può prolungarsi⁽¹⁰⁾. La fase successiva di impupamento, che ha una durata media di 12 giorni, in relazione alla temperatura, avviene generalmente dopo che le larve hanno abbandonato il formaggio, ma la presenza di pupe può essere talvolta evidenziata anche nel contesto della pasta. In condizioni microclimatiche favorevoli (25°C, 60% u.r.%) il ciclo biologico della *Piophilha casei* si completa in circa 20 giorni⁽¹¹⁾. Nel corso della colonizzazione dei formaggi le larve modificano la consistenza della pasta, con un'azione in parte meccanica e in parte enzimatica (proteolisi)⁽¹⁾.

All'azione diretta delle larve presenti nel formaggio sono stati attribuiti fenomeni patologici nell'uomo, quali rinomiasi, miasi gastrointestinale ed uro-genitale, specie in situazioni caratterizzate da gravi carenze igieniche⁽⁸⁾. Secondo alcuni autori la *Piophilha casei* può inoltre fungere da vettore di spore di *Clostridium botulinum* e viene pertanto considerata un infestante degli ambienti di produzione alimentare⁽³⁾. Ulteriori problematiche da considerare sono inoltre quelle connesse ai fenomeni proteolitici che le larve producono nella pasta, dai quali possono derivare metaboliti dannosi per l'uomo, quali le ammine biogene⁽⁷⁾.

L'interesse suscitato dal "casu marzu" nei consumatori ha contribuito nel corso degli anni allo sviluppo di una realtà sommersa, ma, secondo i produttori, remunerativa (produzioni stimate in oltre

1.000 q/a). Per tale ragione alcuni produttori primari e caseifici industriali hanno promosso un'iniziativa di valorizzazione, finanziata dalla Regione Sardegna. In questo contesto, allo scopo di ottenere il riconoscimento del "casu marzu", è stato preliminarmente condotto un lavoro di caratterizzazione dei prodotti artigianali (aziendali) e successivamente una prova di colonizzazione sperimentale, finalizzata alla produzione di "casu marzu" in condizioni controllate. L'obiettivo della seconda parte del progetto, i cui risultati vengono riportati nel presente lavoro, prevedeva la valutazione della capacità della *Piophilha casei* di colonizzare i formaggi, differenti per struttura e contenuto in sale, ed inoltre dell'effetto della colonizzazione sulla composizione e sulle caratteristiche igienico-sanitarie degli stessi.

MATERIALI E METODI

Presso il caseificio sperimentale di Agris Sardegna, sono state condotte 2 caseificazioni, replicate per 3 volte (R1, R2, R3) in tre giorni consecutivi, per complessive 6 lavorazioni. Circa 250 L di latte ovino intero venivano trasformati applicando la tecnologia di un formaggio ovino a pasta cruda dolce, previa pastorizzazione. In occasione di ciascuno dei giorni di lavorazione, veniva effettuata la caseificazione di formaggi con pasta "occhiata" (PO) e con pasta compatta (PC). Entrambe le tipologie sono state fabbricate utilizzando caglio liquido di vitello e una coltura lattica liofilizzata (Filata 2, Danisco Italia). Solo per il formaggio a pasta occhiata (PO), in aggiunta alla coltura lattica, è stata utilizzata anche una coltura selezionata di lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*). Dopo 24 ore dalla produzione i formaggi sono stati sottoposti a salatura per via umida, utilizzando una salamoia alla concentrazione di 20 °Be. La metà delle forme di ciascuna tipologia è stata mantenuta in salamoia per 12 ore, l'altra metà per 24 ore. Successivamente alla salatura i formaggi sono stati sottoposti a stufatura, a 20°C per 24 ore, allo scopo di favorire l'insorgere del gonfiore, e quindi ad un periodo di maturazione di 10 gg a temperatura di 12°C e u.r. pari all'80%. Sono stati pertanto ottenuti 4 gruppi di formaggi sperimentali: formaggi a pasta compatta: con 12 h (PC12) e 24 h (PC24) di salatura; formaggi a pasta occhiata con 12 h (PO12) e 24 h (PO24) di salatura. Al termine del periodo di maturazione prestabilito (10 giorni), i formaggi sono stati trasferiti presso il Dipartimento di Protezione delle Piante, Sezione di Entomologia Agraria, dove è stato allestito un locale a temperatura di 25°C e u.r. del 60%, idoneo alla rea-

lizzazione delle prove di colonizzazione sperimentale da parte di esemplari di *Piophil casei* sviluppati in condizioni controllate. Metà delle forme (test) è stata esposta alla colonizzazione, mentre l'altra metà (controllo) è stata opportunamente protetta dall'infestazione, attraverso il confinamento in un'area della stesso locale separata da una zanzariera a maglie strette.

Le analisi di laboratorio sono state effettuate su tutti i formaggi test e controllo a 0, 10, 30, 60 e 90 giorni dalla produzione. Sui formaggi è stata valutata la presenza di larve e di eventuali modificazioni indotte dalla colonizzazione sull'aspetto della crosta e della pasta. Il prelievo e la preparazione dei campioni sono stati eseguiti secondo le norme FIL-IDF (Standard 122C:1996). Sono stati determinati i seguenti parametri: 1) Parametri chimico-fisici e di composizione: a_w : mediante Aqualab CX3 ((Decagon, USA); pH: metodo potenziometrico, mediante pHmetro Orion 420° (Orion, USA); Sostanza Secca (metodo FIL-IDF 4A, 1982); grasso (metodo butirrometrico, Van Gulik,); NaCl: mediante titolazione potenziometrica con AgNO₃ tramite titolatore automatico Mettler Toledo (modello DL55, Mettler, U.S.A.); azoto totale: proteine (NTx6,25); indici di proteolisi: azoto solubile a pH 4,6 (NS), azoto solubile in acido tricloroacetico al 12% (NS-TCA) e azoto solubile in acido fosforotungstico al 5% (NS-PTA)⁽⁴⁾; lipolisi: determinazione degli acidi grassi liberi (AGL) per via gascromatografica, secondo il metodo descritto da De Jong and Badings, (1990). 2) Parametri Microbiologici: la ricerca è stata effettuata sul latte di due delle tre repliche (R2 ed R3), solo nella pasta dei campioni prelevati nelle fasi 0 e 10 e nella pasta e nella crosta di tutti gli altri⁽⁵⁾: Carica Batterica a 30°C (latte) e Carica Microbica Mesofila Aerobia Totale (formaggi, CMMAT); Coliformi totali ed *E. coli*; *Enterococcus spp*; Germi Lattici in MRS; Sporulati aerobi mesofili; Anaerobi solfito riduttori; *Pseudomonas spp.*; Muffe e Lieviti; Stafilococchi coagulanti positivi e coagulanti-negativi; *Clostridium perfringens*; *Bacillus cereus*; *Salmonella spp.*; *Listeria*

monocytogenes (ISO 11290-1:1996 e 11290-2:1998). L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando la procedura GLM (General Linear Model) con software Minitab statistical package release 12 (Minitab Inc., USA) ed il confronto multiplo fra le medie è stato effettuato utilizzando il test LSD ($\alpha=0.05$). Per quanto riguarda l'elaborazione statistica dei parametri chimico fisici, in una prima fase i risultati sono stati elaborati confrontando i formaggi controllo con i formaggi test nei diversi periodi di maturazione (30, 60 e 90 giorni). Successivamente solo sui formaggi test è stato valutato l'effetto del tipo di pasta (2 livelli, compatta e occhiata), l'effetto del contenuto di NaCl (2 livelli, salamoia 12 ore e salamoia 24 ore) e la loro interazione.

RISULTATI

Nel corso del periodo di esposizione alla colonizzazione sono state rilevate alcune modificazioni delle caratteristiche di consistenza e compattezza dei formaggi, con presenza di gonfiori e talvolta fratture, che, nel periodo compreso tra i 10 e i 30 giorni di maturazione, ha riguardato tanto i campioni test che i controlli. Tali alterazioni sono da attribuire all'esposizione dei formaggi a valori microclimatici che risultano ottimali per il ciclo vitale e l'attività di colonizzazione delle forme da parte della *Piophil casei*, ma non per una loro corretta maturazione. La colonizzazione delle forme è avvenuta in misura disomogenea a partire dai 30 giorni di maturazione. In particolare nel corso della prova sperimentale sono state rilevate a carico dei formaggi le seguenti modificazioni:

- dopo **30 giorni**: nessuno dei campioni appartenenti a R1 presentava segni di colonizzazione né modificazioni o alterazioni della pasta. La presenza di larve è stata invece evidenziata sulla crosta ed in parte della pasta dei formaggi *PO12* e *PO24* di R2 ed R3.
- dopo **60 giorni**: i formaggi appartenenti a R1 ri-

Tabella 1. Valori di a_w dei formaggi nel corso del periodo di maturazione (media \pm d.s.)

Periodo di maturazione (gg)	Salatura 12 ore				Salatura 24 ore			
	PC		PO		PC		PO	
	test	controllo	test	controllo	test	Controllo	Test	controllo
10	0,97 \pm 0,0		0,98 \pm 0,01		0,97 \pm 0,0		0,98 \pm 0,0	
30	0,97 \pm 0,0	0,97 \pm 0,0	0,97 \pm 0,0	0,97 \pm 0,0	0,96 \pm 0,01	0,96 \pm 0,0	0,97 \pm 0,01	0,97 \pm 0,0
60	0,95 \pm 0,01	0,96 \pm 0,01	0,96 \pm 0,0	0,96 \pm 0,0	0,94 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,95 \pm 0,0	0,95 \pm 0,0
90	0,94 \pm 0,01	0,94 \pm 0,01	0,93 \pm 0,01	0,94 \pm 0,00	0,92 \pm 0,01	0,93 \pm 0,00	0,92 \pm 0,00	0,93 \pm 0,01

PC: formaggio con pasta compatta; PO: formaggio con pasta "occhiata".

sultavano ancora non colonizzati, mentre la presenza di larve, accompagnata da rammollimento della crosta e della pasta, è stata registrata in formaggi a pasta compatta (*PC12* e *PC24*) e a pasta occhiata (*PO12* e *PO24*) appartenenti a R2 e solo nei campioni *PC24* del R3.

- dopo **90 giorni**: la colonizzazione interessava una forma di *PO24* del R1, tutti i formaggi test appartenenti al R2 e, tra quelli del R3, un *PC12*, due *PO12* e due *PO24*.

1) Parametri chimico-fisici e di composizione: a_w (tabella 1): non sono state evidenziate differenze significative ($P > 0.05$) nei valori medi in relazione alla tipologia dei formaggi (test e controllo), né alle repliche. Come atteso i valori tendevano a decrescere

($P < 0.01$) in tutti i campioni nel corso della maturazione. I livelli riscontrati sono da ritenersi normali in relazione alla tecnologia utilizzata ed alla durata della stagionatura. pH e composizione centesimale (tabella 2): la presenza delle larve non ha avuto effetti significativi sul pH e sui parametri di macrocomposizione, ad eccezione del contenuto in grasso. Tendenzialmente, ma non in modo significativo, e in conseguenza dei fenomeni proteolitici, si è osservato un aumento del pH nei formaggi colonizzati (test) rispetto ai controlli. Nei primi è stato inoltre evidenziato un contenuto in grasso significativamente ($P < 0.01$) più elevato rispetto ai formaggi controllo. L'accumulo di grasso nella pasta colonizzata e digerita dalle larve, già rilevato anche in "casu marzu"

Tabella 2. Parametri chimico-fisici e di macrocomposizione nei formaggi colonizzati (test) e nel controllo prima e dopo la colonizzazione della *Piophilha casei*, in funzione del periodo di stagionatura (media \pm d.s.).

	Periodo di maturazione (gg)	test	Controllo
pH (UpH)	10		5,29 \pm 0,09
	30	5,26 \pm 0,17	5,33 \pm 0,16
	60	5,62 \pm 0,40	5,51 \pm 0,30
	90	5,91 \pm 0,61	5,62 \pm 0,36
Sostanza secca (%)	10		57,00 \pm 1,44
	30	62,21 \pm 0,70	61,36 \pm 1,40
	60	65,50 \pm 1,78	66,08 \pm 1,01
	90	67,69 \pm 3,82	69,86 \pm 1,18
Grasso (%/t.q.)	10		30,06 \pm 2,41
	30	33,04 \pm 1,45	32,69 \pm 2,02
	60	34,27 \pm 1,92	34,46 \pm 1,54
	90	38,35 ^a \pm 1,45	36,61 ^b \pm 1,98
Proteina (%/t.q.)	10		23,70 \pm 0,79
	30	25,58 \pm 1,25	25,91 \pm 1,35
	60	26,94 \pm 1,25	27,11 \pm 1,10
	90	28,61 \pm 1,68	29,24 \pm 1,46
NaCl (%/t.q.)	10		0,95 \pm 0,29
	30	1,30 \pm 0,30	1,24 \pm 0,27
	60	1,49 \pm 0,37	1,49 \pm 0,33
	90	2,49 \pm 0,65	1,59 \pm 0,43

Lettere diverse nella stessa riga indicano differenze significative ($P < 0.05$) per l'effetto della colonizzazione.

prodotto artigianalmente a livello aziendale (dati non pubblicati), appare un interessante dato da approfondire. Per quanto riguarda l'evoluzione dei parametri di macrocomposizione, nel corso della stagionatura si è osservato un aumento del contenuto in grasso, proteine e sale, per effetto della progressiva riduzione del tenore di umidità che si realizza durante la maturazione del formaggio. Indici di pro-

teolisi: nella tabella 3 sono riportati i valori relativi agli indici di proteolisi determinati prima e durante la fase di esposizione alla colonizzazione dei formaggi. L'azione delle larve di *Piophilha casei* ha avuto un effetto significativo sugli indici di proteolisi a partire dai 60 giorni di stagionatura. In particolare nei formaggi colonizzati dalle larve (test), dopo 60 giorni di maturazione la percentuale di

Tabella 3. Indici di proteolisi nei formaggi colonizzati (test) e nel controllo prima e dopo la colonizzazione della *Piophila casei*, in funzione del periodo di stagionatura (media \pm d.s.).

	Periodo di maturazione (gg)	test	controllo
NS/NT (%)	10		10,24 \pm 2,63
	30	16,32 \pm 3,34	14,39 \pm 1,35
	60	34,94 ^a \pm 16,35	21,41 ^b \pm 2,36
	90	55,11 ^A \pm 23,38	26,16 ^B \pm 3,20
NS-TCA/NT (%)	10		7,24 \pm 3,34
	30	10,84 \pm 2,58	9,72 \pm 0,64
	60	29,82 ^a \pm 15,64	17,92 ^b \pm 2,04
	90	51,30 ^A \pm 23,82	19,95 ^B \pm 3,26
NS-PTA/NT (%)	10		2,74 \pm 0,85
	30	4,42 ^a \pm 1,32	3,43 ^b \pm 0,88
	60	9,22 \pm 3,54	7,25 \pm 2,05
	90	18,43 ^a \pm 9,32	10,45 ^b \pm 2,97

Lettere minuscole diverse nella stessa riga indicano differenze significative ($P < 0.05$) per l'effetto della colonizzazione. Lettere maiuscole diverse nella stessa riga indicano differenze significative ($P < 0.01$) per l'effetto della colonizzazione.

NS/NT e di NS-TCA/NT è aumentata rispettivamente del 50 e del 66% rispetto ai formaggi controllo ($P < 0.05$). Dopo 90 giorni di maturazione l'incremento della proteolisi nei formaggi test, rispetto ai controlli, è risultata del 95% per l'NS/NT ($P < 0.01$), del 160% per l'NS-TCA/NT ($P < 0.01$) e del 76% per l'NS-PTA/NT ($P < 0.05$). Nei formaggi colonizzati (test) la proteolisi è risultata molto spinta. L'azoto non proteico (NS-TCA) rappresentava circa l'86% dell'azoto solubile (NS) nei campioni a 60 gg di maturazione ed il 93% in quelli a 90 gg e risultava costituito da piccoli peptidi, aminoacidi e prodotti di degradazione di questi ultimi. Indici di lipolisi: in tabella 4 sono riportati i valori relativi agli acidi grassi liberi determinati nei formaggi test e controllo a 90 giorni di maturazione. Nei formaggi colo-

nizzati le larve hanno indotto, in modo significativo ($P < 0.01$), una maggiore lipolisi rispetto a quanto osservato nei formaggi non esposti all'azione della *Piophila casei*. È interessante notare che mentre nei formaggi controllo gli acidi grassi a corta catena rappresentavano l'81% degli acidi grassi liberi totali, e fra questi i più rappresentativi sono risultati gli acidi acetico e butirrico, nella pasta colonizzata dalle larve questa percentuale diminuiva fino al 46% a favore di un incremento degli acidi grassi a media e lunga catena. Questa inversione del profilo acidico, già osservata anche in formaggi prodotti artigianalmente (dati non pubblicati), potrebbe essere dovuta alla diversa selettività e specificità degli enzimi lipolitici prodotti dalle larve della *Piophila casei* rispetto a quelli presenti normalmente nel formaggio.

Tabella 4. Indici di lipolisi nei formaggi colonizzati (test) e nel controllo prima e dopo la colonizzazione della *Piophila casei*, a 90 giorni di stagionatura (media \pm d.s.).

AGL	test	controllo
corta catena (mml/kg/t.q.)	179,19 ^A \pm 131,35	54,64 ^B \pm 31,03
media catena (mml/kg/t.q.)	209,17 ^A \pm 177,93	7,27 ^B \pm 4,42
lunga catena (mml/kg/t.q.)	172,83 ^A \pm 155,89	2,69 ^B \pm 0,91
corta catena (%)	46,34 ^B \pm 21,34	81,62 ^A \pm 8,53
media catena (%)	30,98 ^A \pm 10,70	13,34 ^B \pm 7,25
lunga catena (%)	22,68 ^A \pm 11,89	5,04 ^B \pm 2,78

Lettere maiuscole diverse nella stessa riga indicano differenze significative ($P < 0.01$) per l'effetto della colonizzazione.

In tabella 5 sono mostrati i risultati relativi all'effetto del tipo di pasta (occhiata o compatta) e della quantità di NaCl (12 o 24 ore di salamoia) sugli indici di proteolisi determinati nei formaggi prima (10 gg) e dopo la colonizzazione delle larve (30, 60, e 90 giorni di stagionatura). È stata riscontrata un'elevata variabilità tra le tre ripetizioni delle prove sperimentali, in conseguenza della disomogeneità dell'esito della colonizzazione, che ha interessato in modo irregolare e non raffrontabile i formaggi test. Pertanto non è stato evidenziato nessun effetto significativo del tipo di pasta (PC e PO) o della durata della permanenza in salamoia sugli indici di proteolisi. Tuttavia dopo 30 gg di maturazione sono stati osservati indici superiori (P >0.05) nei formaggi sottoposti a 12 h di salatura, indipendente-

mente dal tipo di pasta. Presumibilmente il minore contenuto di sale ha favorito una più precoce colonizzazione. Nei formaggi a pasta occhiata, a 90 giorni di stagionatura, le larve hanno indotto comunque una maggiore proteolisi (P >0.05), indipendentemente dal livello di sale della pasta.

In tabella 6 sono riportati i risultati relativi all'effetto del tipo di pasta (occhiata o compatta) e della quantità di NaCl (12 o 24 ore di salamoia) sulla lipolisi dei formaggi a 90 giorni di stagionatura. Anche in questo caso la disomogeneità della colonizzazione ha condizionato la variabilità dei risultati ottenuti e non ha reso possibile evidenziare alcun effetto significativo legato al tipo di pasta o al livello di sale sulla lipolisi dei formaggi colonizzati. L'occhiatura della pasta ha comunque indotto una

Tabella 5. Influenza del tipo di pasta e della permanenza in salamoia sui parametri indicatori di proteolisi nei formaggi durante il periodo di maturazione(media±d.s.)

Periodo di maturazione(gg)		Salatura 12 ore		Salatura 24 ore	
		PC	PO	PC	PO
NS/NT (%)	10	11,59±3,48	10,74±3,62	9,38±1,99	9,25±1,75
	30	17,15±2,65	18,94±4,85	13,95±2,51	15,24±1,76
	60	30,31±14,31	31,03±16,16	46,18±18,58	32,23±20,08
	90	51,78±24,04	61,43±30,43	38,60±26,56	68,63±5,98
NS-TCA/NT (%)	10	7,61±3,55	7,67±5,33	7,15±2,58	6,54±3,53
	30	11,71±2,41	12,38±3,37	9,14±0,86	10,15±2,99
	60	24,30±10,88	25,73±15,48	40,20±19,01	29,05±19,81
	90	46,52±23,35	58,57±30,75	34,36±27,22	65,74±5,74
NS-PTA/NT (%)	10	2,51±0,94	3,21±1,40	2,63±0,21	2,61±0,78
	30	4,30±2,04	5,53±0,96	3,47±1,05	4,37±0,40
	60	8,64±3,03	8,03±2,74	11,22±5,57	8,99±3,55
	90	15,52±6,97	22,70±12,28	12,09±7,19	23,40±9,44

PC: formaggio con pasta compatta; PO: formaggio con pasta "occhiata".

Tabella 6. Influenza del tipo di pasta e della permanenza in salamoia sui parametri indicatori di lipolisi nei formaggi a 90 giorni di maturazione(media±d.s.)

AGL	Salatura 12 ore		Salatura 24 ore	
	PC	PO	PC	PO
corta catena (mmol/kg/t.q.)	137,92±109,87	223,94±172,62	82,46±88,04	272,45±112,41
media catena (mmol/kg/t.q.)	133,59±171,27	270,37±233,83	114,33±184,75	318,37±102,05
lunga catena (mmol/kg/t.q.)	122,59±157,61	247,88±224,88	88,93±148,08	231,92±91,03
corta catena (%)	51,11±22,32	44,44±25,70	56,89±28,81	32,93±6,37
media catena (%)	26,46±10,34	31,45±8,97	26,89±13,94	39,13±9,63
lunga catena (%)	22,43±12,13	24,11±16,74	16,22±15,22	27,94±3,32

PC: formaggio con pasta compatta; PO: formaggio con pasta "occhiata".

maggiore lipolisi nei formaggi a 90 giorni di maturazione, indipendentemente dal contenuto di sale.

2) Parametri Microbiologici: i risultati sono espressi come \log_{10} u.f.c./ml o g. a) latte: il latte destinato alla caseificazione presentava livelli medi della Carica Batterica a 30°C superiori a 6. Il profilo microbico era caratterizzato dalla presenza di Stafilococchi coagulasi-negativi ($3,34 \pm 1,50$), Muffe ($3,30 \pm 0,00$), Lieviti ($3,17 \pm 0,00$) ed *Enterococcus spp* ($2,45 \pm 0,63$). In uno dei campioni sono stati inoltre rilevati livelli di *Pseudomonas spp* pari a 4,06. I patogeni ricercati non sono risultati invece rilevabili. b) formaggi (tabelle 7 e 8): CMMAT: i livelli medi nella pasta sono risultati disomogenei fra le repliche e nell'ambito di esse. Valori maggiori sono stati riscontrati nei formaggi analizzati a 30 giorni di maturazione, indipendentemente dal tipo di campione (test o controllo) e dall'esito della colonizzazione, presumibilmente in conseguenza all'esposizione dei formaggi a temperature elevate (25 °C). Successivamente si è assistito ad un'incostante e non significativa riduzione dei livelli di CMMAT, parallelamente alla diminuzione dell' a_w e dei Germi Lattici. Differenze non significative ($P > 0,05$) hanno riguardato i formaggi *PC24* e *PO24* dopo 90 gg di ma-

turazione ed in particolare è stato rilevato un numero di germi maggiore nei formaggi controllo rispetto ai test. Coliformi totali: la presenza è risultata sporadica e indipendente dal momento dell'analisi e dalle caratteristiche dei prodotti. Sono stati infatti riscontrati in soli 3 campioni, di cui uno test al giorno 0 e 2 controlli, appartenenti a R3 ed esaminati dopo 60 giorni di maturazione. Tutti i campioni positivi erano a pasta compatta (PC). Stafilococchi coagulasi-negativi (SCN): rappresentavano, dopo i Lieviti, la componente microbica prevalente. Anche per questo parametro l'analisi della varianza non ha evidenziato differenze significative in relazione alla presenza delle larve. Tuttavia, tra i formaggi test, i colonizzati presentavano livelli medi di SCN superiori ai non colonizzati, in particolare nei campioni sottoposti a un periodo di salatura inferiore (12 h). Più significativo è risultato invece l'effetto del fattore replica di lavorazione. In particolare i livelli maggiori ($P < 0,01$) sono stati riscontrati nei prodotti appartenenti a R2 a 30, 60 e 90 giorni di maturazione. *Pseudomonas spp*: la prevalenza nelle diverse fasi del processo è risultata disomogenea e, nei campioni positivi, il numero variava da < 1 a oltre 5 log. In particolare la presenza di *Pseudomonas spp*.

Tabella 7 - Profilo microbiologico dei formaggi in relazione alla tecnologia di trasformazione e alla eventuale colonizzazione: i valori vengono riportati come medie fra i lotti (media \pm d.s. \log_{10} ufc/g) in riferimento al periodo di stagionatura.

	Periodo di maturazione (gg)	Salatura 12 ore				Salatura 24 ore			
		PC test	PC controllo	PO test	PO controllo	PC test	PC controllo	PO test	PO controllo
CMMAT	0	-*	-	$6,61 \pm 1,07$	-	$6,02 \pm 1,31$	-	$6,91 \pm 1,04$	-
	10	-	-	$7,02 \pm 1,26$	-	$6,72 \pm 0,94$	-	$7,12 \pm 0,85$	-
	30	$7,48 \pm 0,35$	$7,71 \pm 0,26$	$8,17 \pm 0,20$	$7,88 \pm 0,39$	$7,60 \pm 0,08$	$7,34 \pm 0,33$	-	$7,98 \pm 0,34$
	60	$7,67 \pm 0,31$	$7,30 \pm 0,71$	$6,68 \pm 1,16$	$7,30 \pm 0,41$	$7,71 \pm 0,06$	$7,08 \pm 0,55$	$7,17 \pm 0,34$	$7,44 \pm 0,43$
	90	$7,41 \pm 0,67$	$6,88 \pm 0,60$	$7,56 \pm 0,21$	$6,07 \pm 1,41$	$6,55 \pm 0,70$	$7,56 \pm 0,21$	$6,34 \pm 0,63$	$7,35 \pm 0,22$
<i>Stahylococcus spp</i>	0	$2,31 \pm 0,44$	-	$2,87 \pm 1,58$	-	$2,14 \pm 0,60$	-	-	-
	10	$4,27 \pm 1,93$	-	$4,08 \pm 0,68$	-	$4,60 \pm 0,61$	-	-	-
	30	$4,51 \pm 0,52$	$4,04 \pm 0,48$	7,48	$3,77 \pm 0,14$	4,84	$3,97 \pm 0,06$	-	$4,61 \pm 0,25$
	60	5,20	$3,54 \pm 0,99$	4,78	$5,08 \pm 1,68$	$5,38 \pm 0,66$	$3,98 \pm 0,09$	4,20	$4,19 \pm 0,29$
	90	$4,46 \pm 1,39$	$2,85 \pm 1,20$	$6,24 \pm 1,75$	$5,08 \pm 1,52$	4,16	$5,45 \pm 2,12$	3,00	$4,79 \pm 0,96$
<i>Pseudomonas spp</i>	0	-	-	1,30	-	2,00	-	-	-
	10	$4,12 \pm 1,15$	0,00	$3,74 \pm 2,03$	-	$4,11 \pm 2,81$	-	-	-
	30	3,95	4,11	5,90	-	-	2,85	-	-
	60	5,35	5,48	5,26	-	-	-	4,46	-
	90	$4,48 \pm 0,42$	-	-	-	-	-	-	-
Sporulati aerobi mesofili	0	$1,77 \pm 1,08$	-	$3,15 \pm 1,65$	-	$2,00 \pm 1,41$	-	3,85	-
	10	$2,33 \pm 0,25$	-	$2,09 \pm 0,19$	-	$2,72 \pm 0,88$	-	$2,15 \pm 0,21$	-
	30	$1,30 \pm 0,43$	$1,35 \pm 0,49$	$1,36 \pm 0,39$	$1,33 \pm 0,35$	$1,83 \pm 0,49$	$1,47 \pm 0,58$	2,68	$1,40 \pm 0,17$
	60	1,30	$2,16 \pm 1,64$	1,48	$2,37 \pm 0,74$	$1,39 \pm 0,12$	$1,65 \pm 0,49$	3,00	$2,89 \pm 1,36$
	90	2,30	$1,00 \pm 0,00$	-	$1,10 \pm 0,17$	1,48	$2,59 \pm 2,50$	1,30	$1,67 \pm 0,35$

Legenda: *= al di sotto del limite di rilevabilità del metodo;

è stata riscontrata in 3 campioni esaminati prima dell'esposizione alla mosca (0 e 10 giorni) e, in modo disomogeneo, ma con livelli maggiori, alcuni formaggi test e controlli a 30 e 60 giorni di maturazione. A 90 giorni il riscontro è risultato sporadico. Anaerobi solfito riduttori: sono risultati non rilevabili in tutti i campioni esaminati. Sporulati aerobi mesofili: la presenza è risultata disomogenea e con livelli mediamente contenuti, specie col procedere della maturazione. Non sono state rilevate differenze significative tra i prodotti colonizzati e gli altri testati. Muffe totali: la presenza è risultata correlata ($P < 0.05$) alla colonizzazione dei formaggi da parte delle larve di *Piophilha casei*. Infatti erano interessati tutti i campioni test risultati colonizzati, nei quali anche all'esame visivo è stata rilevata la presenza di Muffe verdi. I livelli erano variabili, tuttavia nei prodotti stagionati per 90 giorni il numero è risultato superiore nei campioni controllo (fino a 5,48) rispetto ai test. Enterococcus spp: la presenza risulta normale in formaggi ottenuti da latte ovino, tuttavia nel corso della prova il riscontro è risultato disomogeneo in relazione alla tecnologia adottata e al periodo di stagionatura. La presenza di questo gruppo di microrganismi era più costante nei pro-

dotti con pasta occhiata (PO), con livelli variabili ma mediamente più elevati nei campioni colonizzati dalle larve. Anche il riscontro nei formaggi PC e PO dopo 90 giorni di maturazione risulta normale, in relazione alle caratteristiche di resistenza degli Enterococchi. Lieviti totali: rappresentavano la componente microbica prevalente tra quelle determinate, tanto nei formaggi PO, nei quali era atteso in considerazione dell'inoculo iniziale, quanto in quelli PC. Nei primi si è registrata una disomogenea riduzione a partire dal giorno 0, ad eccezione dei campioni controllo. B.cereus: il riscontro è risultato sporadico e limitato alle prime fasi del processo. Le prove di identificazione (VITEK system, Biomerieux) hanno consentito di evidenziare la presenza di ceppi appartenenti al "*B. cereus group*" in: n.2 campioni esaminati al momento della produzione (fase 0), di cui un PO12 e un PC24 appartenenti a R3; n. 1 PC24 esaminato dopo 10 giorni di maturazione, appartenente a R2; n.2 campioni controllo PO12 e PO24 dopo 60 gg e 90 gg, appartenenti a R1. Cl. Perfringens: è risultato presente sulla crosta di 2 formaggi a 60 giorni di maturazione, di cui uno test PO24 e uno controllo PO24. Non sono stati rilevati E.coli, S.aureus, Salmonella spp e Listeria monocytogenes.

Tabella 8 - Profilo microbiologico dei formaggi in relazione alla tecnologia di trasformazione e alla eventuale colonizzazione: i valori vengono riportati come medie fra i lotti (media \pm d.s. \log_{10} ufc/g) in riferimento al periodo di stagionatura.

	Periodo di maturazione (gg)	Salatura 12 ore				Salatura 24 ore			
		PC		PO		PC		PO	
		test	controllo	test	controllo	test	controllo	test	controllo
<i>Enterococcus spp</i>	0	-*	-	4,70	-	-	-	4,60	-
	10	3,23	-	2,30	-	3,56	-	4,60 \pm 2,83	-
	30	5,28	-	4,70	5,15	5,49 \pm 0,02	5,48	3,73 \pm 1,90	4,64 \pm 0,28
	60	3,70	5,38 \pm 0,13	5,06	4,68 \pm 0,69	4,08	5,03	5,75	4,96
	90	2,85 \pm 0,21	-	4,21 \pm 0,09	-	2,00	4,68 \pm 0,76	-	-
<i>Muffe</i>	0	-	-	-	-	3,0 \pm 0,0	-	-	-
	10	2	-	-	-	-	-	-	-
	30	3,3	1,6	3,5	1,8	4,0 \pm 2,1	5,5	3,5	3,3 \pm 2,0
	60	4,28	2,00 \pm 1,00	3,60	2,30 \pm 1,41	3,00	2,50 \pm 0,71	2,30	1,85 \pm 0,21
	90	2,65 \pm 0,49	3,00 \pm 0,0	2,42 \pm 0,82	3,39 \pm 0,55	2,00 \pm 0,0	5,48 \pm 0,0	2,85 \pm 0,21	4,39 \pm 1,54
<i>Lieviti</i>	0	-	-	5,76 \pm 0,58	-	-	-	5,71 \pm 0,64	-
	10	4,71 \pm 1,04	-	5,55 \pm 0,32	-	4,15 \pm 0,13	-	5,43 \pm 1,17	-
	30	3,70 \pm 0,0	2,79 \pm 2,53	4,15 \pm 0,0	3,19 \pm 1,68	4,94 \pm 0,76	4,38 \pm 1,01	4,73 \pm 0,0	3,68 \pm 2,14
	60	5,26 \pm 0,0	3,33 \pm 1,35	3,30 \pm 0,0	3,16 \pm 0,24	3,80 \pm 0,0	3,59 \pm 0,59	4,45 \pm 0,0	3,40 \pm 0,34
	90	3,46 \pm 0,54	4,33 \pm 0,80	2,20 \pm 1,13	3,27 \pm 0,93	2,23 \pm 0,0	4,35 \pm 1,59	2,85 \pm 0,21	4,43 \pm 1,00
<i>B. cereus</i>	0	-	-	4 (1)	-	2 (1)	-	-	-
	10	5,77 (1)	-	-	-	2 (1)	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: *=a di sotto del limite di rilevabilità del metodo

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La valutazione dell'impatto esercitato dalla colonizzazione controllata di *Piophilu casei* sulle caratteristiche di composizione ed igieniche del "casu marzu" risulta complessa a causa della disomogeneità dei risultati. La colonizzazione è risultata più frequente nei formaggi a pasta occhiata (PO), mentre non è stata influenzata significativamente dal tempo di permanenza in salamoia delle forme. È risultata sempre limitata a parti localizzate della crosta e della pasta e in nessun caso ha interessato le forme in modo massivo, né è stato osservato il tipico rammollimento della pasta. Il "casu marzu" si conferma comunque un prodotto molto caratterizzato, dal forte aroma ovino e dal gusto molto intenso, a causa dei processi biochimici (proteolisi e lipolisi) che avvengono nel corso della maturazione e che modificano profondamente le caratteristiche del formaggio di origine. Da questo punto di vista può essere considerato un prodotto di trasformazione dotato di una sua specificità. Resta comunque da approfondire la ricerca di eventuali metaboliti, derivanti dalla proteolisi, tossici per il consumatore e descritti in altri formaggi nei quali tali fenomeni sono alla base della maturazione⁽⁶⁾.

Il profilo microbiologico è apparso nel complesso quello tipico dei formaggi ottenuti da latte ovino, in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche e al periodo di maturazione, anche se è risultato fortemente condizionato dai parametri microclimatici (temperatura e umidità) impostati nei locali di maturazione allo scopo di favorire la moltiplicazione della *Piophilu casei*. I valori del pH (>5,6) e in particolare dell' a_w (>0,920), rilevati nei formaggi a partire dai 30 giorni di maturazione, sono risultati insufficienti a limitare lo sviluppo di microrganismi alteranti, come gli Sporulati aerobi e *Pseudomonas spp*, la cui presenza è risultata sensibilmente elevata. I parametri di maturazione hanno inoltre favorito lo sviluppo delle Muffe e degli Stafilococchi coagulasi-negativi. Alla luce di tali riscontri si rende pertanto necessario introdurre alcuni accorgimenti che consentano di ottimizzare il processo di colonizzazione controllata, quali la modulazione delle temperature ambientali, al fine di favorire l'azione della *Piophilu* ma anche le ottimali dinamiche microbiche che si realizzano nel corso del processo di maturazione dei formaggi.

I risultati della presente ricerca, seppure preliminari, contribuiscono alla conoscenza del "casu marzu", prodotto tradizionale che, essendo oggetto di iniziative di valorizzazione finanziate con fondi pubblici, necessita di una più approfondita caratte-

rizzazione. Tra i vantaggi di tali iniziative va considerata la possibilità di fare uscire dal sommerso la produzione e la commercializzazione di un prodotto che continua a suscitare interesse e ad incontrare l'apprezzamento di un vasto numero di estimatori. Tuttavia i risultati ottenuti nel corso delle prove di colonizzazione controllata, e in precedenti indagini condotte su prodotti artigianali, evidenziano che il "casu marzu" è un prodotto che, per le sue caratteristiche, dovrebbe essere destinato precauzionalmente solo a consumatori adulti immunocompetenti.

Queste precauzioni non contrastano tuttavia con la possibilità di trovare soluzioni per consentirne la produzione in condizioni adeguate al rispetto delle attuali norme di igiene. Tra queste si può considerare la possibilità di limitare la produzione al livello aziendale, che peraltro risponde alla tradizione della trasformazione diretta del latte ovino in allevamento, alla quale si può ricondurre anche la produzione del "casu marzu". A tale riguardo può essere richiamato l'Accordo sancito in sede di Conferenza Stato-Regioni il 20 marzo 2008, riguardante la registrazione delle aziende di produzione e trasformazione del latte. In questo caso la produzione potrebbe essere consentita presso i caseifici aziendali registrati per la trasformazione del latte, eventualmente mediante l'adozione di opportune precauzioni, quali la presenza di locali dedicati, opportunamente confinati, e l'applicazione di idonee procedure di gestione dell'igiene (Reg. Ce n. 852/2004). Inoltre sarebbe ideale il ricorso da parte dei produttori primari all'utilizzo di colonie di mosche prodotte in condizioni controllate (appositi laboratori oppure autoctone), in modo da gestire la colonizzazione e non affidarsi a infestazioni accidentali. L'accordo citato prevede che i prodotti debbano essere venduti direttamente al consumatore finale, o a dettaglianti che commerciano nell'ambito della provincia, e deve essere garantita la condizione che tali attività non siano prevalenti per l'azienda, in termini di volumi. Restano naturalmente da definire gli aspetti legati ad una corretta commercializzazione, ma in questo caso si potrebbe ricorrere all'allontanamento delle larve al termine del processo, come avviene nell'infestazione naturale, e al ricorso ad adeguate metodologie di confezionamento della sola pasta proteolizzata, peraltro già attuate dai produttori. Si tratta comunque di ipotesi che devono essere discusse attraverso il coinvolgimento delle autorità sanitarie ed in particolare dei servizi veterinari.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Consiglio Nazionale delle Ricerche Roma (1992). I Prodotti caseari del Mezzogiorno. Progetto strategico I Prodotti Alimentari Tipici nel Mezzogiorno, 453-455.
- 2) De Jong, C., & Badings, H.T., 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese. *Journal High Resolution Chromatography*, 13, 94-98.
- 3) Domenichini G. (1996). Protezione degli alimenti, contaminazione biologica e sanità ambientale nell'industria alimentare. *Etaslibri*, 124-125.
- 4) Gripon, J.C., Desmazeaud, M.J., Le Bars, D., & Bergere, J.L., 1975. Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. *Le Lait*, 55, 502-516.
- 5) Mazzette R., De Santis E.P.L., Mureddu A., Scintu M.F., Pirisi A. (2002). Caratteristiche microbiologiche di ricotte ovine ottenute da siero ultrafiltrato. *Atti S.I.S.VET.*, LVI, 379-380.
- 6) Milesi O. (1960). La *Piophila casei*. Ispettorato provinciale dell'Agricoltura- Vicenza. Latteria didattica P. Marconi-Thiene. Tip. "Il Giornale di Vicenza"
- 7) Novella-Rodriguez S., Veciana-Nogues M.T., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science* 63(3),750-755.
- 8) Panciotti R., Patrignani F., Iucci L., Guerzoni M. E., Suzzi G., Belletti N., Gardini F. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheese. *Food Chemistry*, 104, 693-701
- 9) Shalaby A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- 10) Tremblay E. (1994). *Entomologia Applicata*. Liguori Editore, Napoli.
- 11) Urquhart G. M., Armour J., Duncan J. L., Dunn A. M., Jennings F. W. (1996). *Parassitologia veterinaria*. Utet, 165- 169.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro Finanziato dal Comitato Promotore per la registrazione della DOP del "Casu Marzu" di Sardegna (Fondi POR 2000-2006). Un particolare ringraziamento al Sig. Pietrino Chelo di Laore Sardegna.