



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**ALLA SCOPERTA DEL MICROBIOTA DEL
SURSTRÖMMING, LA TRADIZIONALE ARINGA
ACIDA SVEDESE**

Discovering the microbiota of surströmming, the traditional
Swedish sour herring

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
MANUEL CAPORALONI

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatore:
DOTT. VESNA MILANOVIC

ANNO ACCADEMICO 2018-2019



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

ALLA SCOPERTA DEL MICROBIOTA DEL
SURSTRÖMMING, LA TRADIZIONALE ARINGA
ACIDA SVEDESE

Discovering the microbiota of surströmming, the traditional Swedish
sour herring

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
MANUEL CAPORALONI
Manuel Caporaloni

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI
Andrea Osimani

Correlatore:
DOTT. VESNA MILANOVIC
Vesna Milanovic

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
1. INTRODUZIONE	6
2. SCOPO DELLA TESI	10
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 Campionamento.....	11
3.2 Misure chimico-fisiche.....	13
3.3 Analisi microbiologiche	13
3.4 Analisi statistiche.....	15
3.5 Composizione terreni di coltura	15
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	18
4.1 Parametri chimico-fisici	18
4.2 Analisi microbiologiche	20
CONCLUSIONI	26
BIBLIOGRAFIA	27

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Composizione nutrizionale del surströmming	9
Tabella 2. Composizione del terreno di coltura PCA.....	15
Tabella 3. Composizione del terreno di coltura M17.....	15
Tabella 4. Composizione del terreno di coltura MRS.....	16
Tabella 5. Composizione del terreno di coltura VRBGA.....	16
Tabella 6. Composizione terreno di coltura PAB	17
Tabella 7. Composizione del terreno di coltura MSA.....	17
Tabella 8. Composizione del terreno di coltura YPD.....	17
Tabella 9. Parametri fisico-chimici del surströmming.....	18
Tabella 10. Risultati delle conte vitali di batteri ed eumiceti nel surströmming.....	24
Tabella 11. risultati delle conte di batteri ed eumiceti alofili in Surströmming.....	25

ELENCO DELLE FIGURE

Immagine 1. Lattina di surströmming acquistata dal produttore svedese 1 (Mannerströms) (campioni S1-S5).....	11
Immagine 2. Lattina di surströmming acquistata dal produttore svedese 2 (Oskars) (campioni S6-S10).....	12
Immagine 3. Lattina di surströmming acquistata dal produttore svedese 3 (Kallax) (campioni S11-S15).....	12
Immagine 4. Aringa intera fermentata non pastorizzata in salamoia (surströmming).....	12

1. INTRODUZIONE

La fermentazione dei pesci rappresenta uno dei metodi più antichi per la conservazione o il miglioramento della qualità dei prodotti ittici (Speranza et al., 2015). Infatti, in alcune regioni del mondo, la pesca potrebbe essere condizionata dalle stagioni, divenendo così discontinua; perciò, per alcune popolazioni, la conservazione dei prodotti ittici è di primaria importanza. I prodotti fermentati sono attualmente comuni nell'est e nel sud-est dell'Asia, ma anche nei Paesi Nordici Europei, dove la fermentazione del pesce è spesso associata alla salagione (Skåra et al., 2015; Speranza et al., 2015). L'uso del sale come conservante era conosciuto prima dell'era cristiana nelle società ben sviluppate, come Cina e Antico Egitto. Più in dettaglio, per i paesi nordici europei, rappresentati principalmente dalla Penisola Scandinava e l'Islanda, la salagione del pesce era particolarmente difficoltosa a causa della scarsità del sale; quindi, nell'era vichinga, invece di usare una salagione completa, è stata sviluppata empiricamente una salagione leggera (Skåra et al., 2015). Il processo di produzione generalmente varia in base alla specie del pesce, alla disponibilità del sale, alle temperature, alle tecniche di conservazione, alla manipolazione delle derrate crude e alla tradizione. A questo proposito, le diverse stagionature dei pesci in una leggera salamoia hanno le stesse radici, ma le differenti tecnologie hanno portato a processi e prodotti differenti. Mirabili esempi di produzioni ittiche fermentate e stagionate nei paesi europei del Nord sono rappresentati dal rakfisk e dal gravlax, entrambi ottenuti dai salmoni di acqua dolce, dal surströmming, da aringhe e spratti fermentati e stagionati in botti con salamoia (Skåra et al., 2015), e dall'hákarl, ottenuto dallo squalo di Groenlandia, il quale però è l'unico tra questi prodotti a non essere ottenuto con l'uso del sale (Osimani et al. 2019). In particolare, il consumo delle aringhe da parte degli scandinavi e altre popolazioni nel Baltico e nel Mare del Nord risale a 5.000 anni fa (Kurlansky, 2002). Durante il sedicesimo secolo, nella costa svedese del golfo di Bothnia, l'abilità delle popolazioni locali di conservare le aringhe in salamoia ha dato luce al cosiddetto surströmming (Kurlansky, 2002). Le aringhe, al contrario degli altri pesci come salmoni e trote, sono adatte a questo tipo di fermentazione in quanto hanno un contenuto minore in grassi (Skåra et al., 2015). Il nome di questa ricercata preparazione alimentare deriva dalla fusione di 2 sostantivi: "sur" (in italiano acido

o aspro) e “strømming”, il quale è il nome locale per le aringhe (*Clupea harengus* var. *membras*) catturate nelle regioni a nord del Mar Baltico (Skåra et al., 2015). Si presume che la preparazione del surstrømming sia stata inventata per ovviare alla mancanza di sale, che viene comunemente utilizzato per la conservazione delle aringhe. In queste regioni della Svezia, il surstrømming era un cibo alla base della dieta di queste popolazioni, tant'è che veniva somministrato nelle razioni per l'esercito svedese nel XVII secolo (Skåra et al., 2015).

In accordo con un'ordinanza reale, il surstrømming deve essere ottenuto da aringhe pescate tra aprile e maggio, mentre alcuni autori hanno riportato che possono essere pescate prima di luglio, prima della deposizione delle uova, dove in entrambi i casi il contenuto di grasso è minore (Alm, 1965; Kurlansky, 2002). La preparazione del surstrømming solitamente inizia con una fase di 1-2 giorni di pre-salagione delle aringhe in una soluzione satura di sale, mescolando continuamente per le prime 4 ore. Le teste e le interiora delle aringhe vengono rimosse, mentre le gonadi (uova) e i ciechi pilorici sono mantenuti. Successivamente, le aringhe precedentemente preparate vengono lasciate fermentare in barili sigillati, contenenti una leggera salamoia (17% di sale), dalle 3-4 alle 10-12 settimane a 15-18°C, in base alla procedura tradizionale applicata. I barili sono saltuariamente ruotati per alcuni giorni e poi stoccati. Le reazioni biochimiche che avvengono durante tale processo portano alla produzione di gas, il quale fuoriesce dalle doghe dei barili. Le aringhe e la salamoia vengono poi poste in lattine, dove la fermentazione continua nelle stesse, fino alla formazione di un rigonfiamento nella parte soprastante e sottostante (Kurlansky, 2002; Skåra et al., 2015). Il surstrømming è caratterizzato da una polpa fermentata color vino, come descritta da Kurlansky (2002) in maniera suggestiva: “*fizzes out, bubbling like fermented cider and smelling like a blend of Parmesan cheese and the bilge water from an ancient fishing vessel*” [sfrigola, gorgogliando come il sidro in fermento ed emanando sentori di Parmigiano e di acqua di sentina di un antico peschereccio]. È quindi innegabile che il consumo di surstrømming rappresenti una vera sfida anche per i palati più audaci. Si sa già che durante la fermentazione delle aringhe, le attività chimiche e microbiologiche influenzano pesantemente la sicurezza e le caratteristiche sensoriali del surstrømming. Chimicamente, come riportato da Skåra et al. (2015), il processo di fermentazione inizia con le normali fasi *post mortem*: formazione di acido lattico a causa delle condizioni di anaerobiosi nei tessuti muscolari, continuando con l'autolisi di proteine e lipidi; segue poi la stabilizzazione della flora, la quale è probabilmente controllata dai lattobacilli. Questi ultimi provengono molto

probabilmente dai barili, infatti, con l'uso di contenitori sterili, lo sviluppo del tipico aroma del surströmming non avviene.

Più in dettaglio, gli enzimi autolitici (calpaina, catepsine, proteasoma, caspasi) che naturalmente si trovano nella polpa del pesce e nei ciechi pilorici dell'intestino, combinati agli acidi organici (es. lattato, propionato, butirrato e acetato) e con acido solfidrico, prodotto dall'attività metabolica dei microrganismi, contribuiscono alla definizione delle principali caratteristiche del prodotto finale. Inoltre, il sale contenuto nella salamoia dovrebbe prevenire la crescita di batteri sporigeni, che possono portare alla putrefazione delle aringhe; infatti, putrescina, indolo, scatolo e cadaverina, tipici composti del processo di putrefazione, non sono stati rilevati in precedenti studi (Skåra et al., 2015).

Nonostante la lunga storia del consumo del surströmming, c'è una scarsità di conoscenze che riguardano le popolazioni microbiche coinvolte nella fermentazione delle aringhe. Infatti, sulla base della letteratura scientifica disponibile esiste solo uno studio che risale al 2000 (Kobayashi et al., 2000). Sebbene lo studio di Kobayashi et al. (2000) abbia gettato una prima preziosa luce su alcune specie microbiche presenti sul surströmming, le complesse popolazioni microbiche che sono coinvolte in questa fermentazione rimangono ancora sconosciute. Al momento sono disponibili numerose tecniche microbiologiche affidabili per aumentare la conoscenza delle specie microbiche presenti nelle matrici alimentari fermentate. Più in dettaglio, in aggiunta alle convenzionali tecniche basate sull'uso di terreni di crescita selettivi, lo studio del DNA o dell'RNA microbico, applicato direttamente alle matrici alimentari, consente il rilevamento delle specie presenti sia in maggiore sia in minor presenza. Tra i metodi molecolari più applicati e sensibili, il sequenziamento in parallelo e la real-time PCR forniscono dati per il profilo microbiologico degli alimenti.

Il surströmming, la cui composizione nutrizionale è riportata nella TABELLA 1, è spesso consumato con un tipo di pane chiamato tunnbröd, che può essere croccante o soffice. L'usanza, nata nella costa settentrionale della Svezia, prevede la preparazione di sandwich, chiamati comunemente surströmmings-klämma, caratterizzati da due fette di tunnbröd croccante, burro, patate bollite, schiacciate o a fette, rivestite dall'aringa fermentata e da cipolle tagliate a dadini. Inoltre, il surströmming è solitamente servito come piatto principale in una tradizionale festa, dal nome *surströmmingsskiva*, accompagnato da distillati e birra (Skåra et al., 2015).

Valori medi	Per 100g
Valore energetico	82kcal/344kj
Grassi	3,9g
di cui acidi grassi saturi	0,7g
Carboidrati	0g
di cui zuccheri	0g
Proteine	12g
Sale	8,8g

Tabella 1. Composizione nutrizionale del surströmming.

2. SCOPO DELLA TESI

Il surströmming è prodotto dalla fermentazione delle aringhe (*Clupea harengus* var. *membras*) catturate nelle regioni a nord del Mar Baltico. Attualmente l'unico lavoro scientifico riguardante la microbiologia del surströmming risale all'anno 2000 (Kobayashi et al., 2000), pertanto tale matrice alimentare rappresenta una fonte ancora sconosciuta di biodiversità microbica.

Il presente lavoro di tesi è stato realizzato con lo scopo di ottenere informazioni in merito ai gruppi microbici coinvolti nella trasformazione delle aringhe nel prodotto finito.

A tale scopo sono state condotte analisi microbiologiche per l'enumerazione dei seguenti microrganismi: mesofili aerobi totali, alofili anaerobi totali, batteri lattici mesofili, batteri lattici alofili, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, stafilococchi, eumiceti totali, eumiceti alofili, clostridi solfito-riduttori. E' inoltre stata valutata la presenza di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*.

I campioni analizzati sono inoltre stati sottoposti ad analisi chimico-fisiche per la valutazione di: pH, concentrazione di sale (NaCl), attività dell'acqua (a_w), concentrazione di acido acetico e acido lattico.

Sono stati sottoposti alle analisi sopra citate n. 15 campioni di surströmming reperibili in commercio e prodotti da n. 3 produttori (n. 5 campioni per produttore) di origine Svedese.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Sono state acquistate quindici lattine di surströmming pronto da consumare da tre differenti produttori svedesi (Immagine 1, 2 e 3). I campioni sono stati ordinati come segue: S1-S5 ottenuti dal produttore 1, S6-S10 ottenuti dal produttore 2 e S11-S15 ottenuti dal produttore 3. Ogni campione consisteva in 400 g di aringhe intere fermentate in salamoia non pastorizzate (Immagine 4). Non sono state fornite ulteriori informazioni sul campione dai produttori o dall'etichetta della lattina.



Immagine 1. Lattina di surströmming acquistata dal produttore svedese 1 (Mannerströms) (campioni S1-S5).



Immagine 2. Lattina di surströmming acquistata dal produttore svedese 2 (Oskars) (campioni S6-S10).



Immagine 3. Lattina di surströmming acquistata dal produttore svedese 3 (Kallax) (campioni S11-S15).



Immagine 4. Aringa intera fermentata non pastorizzata in salamoia (surströmming).

3.2 Misure chimico-fisiche

I valori di pH dei campioni del surströmring sono stati determinati con un pHmetro equipaggiato con un elettrodo a solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italy).

L'acidità titolabile totale (TTA) è stata determinata usando 10g dei campioni di surströmring, i quali sono stati omogeneizzati in 90 ml di acqua distillata per 5 minuti a 260 rpm usando un apparecchio Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milan, Italy). I risultati sono espressi come il volume totale (ml) di NaOH 0.1 N usato per raggiungere un pH di 8,3.

La concentrazione di sale (cloruro di sodio) è stata valutata tramite analisi gravimetrica in conformità col metodo indicato dall'Istituto Superiore di Sanità italiano (ISTISAN, 96/34).

L'attività dell'acqua (a_w) è stata misurata in conformità con il metodo standard ISO 21807:2004 usando l'apparecchio Aqualab 4TE (Meter Group, Pullman, USA).

La concentrazione di acido acetico e acido lattico è stata misurata con l'Acetic Acid (Acetate Kinase Manual Format) test kit e con il D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) (Rapid) test kit entrambi di Megazyme (Bray, Ireland).

Per ogni campione, le misure sono state svolte in doppio, e i risultati sono espressi come la deviazione media standard.

3.3 Analisi microbiologiche

Per la valutazione delle conte vitali dei microrganismi, 25 grammi di ogni campione di surströmring sono stati omogeneizzati in 225ml di acqua peptonata sterile (peptone, 1g/l dell'azienda WVR Chemicals) per 5 minuti a 260 rpm, usando uno Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milan, Italy). Gli omogenati ottenuti (diluizione 10⁻¹) sono stati ulteriormente diluiti dieci volte, fino ad ottenere una serie di diluizioni seriali decimali. In base al tipo di terreno utilizzato, aliquote di 1 ml di ciascuna diluizione scalare sono state quindi seminate in doppio nella semina per inclusione, mentre aliquote di 100µl nella semina per spandimento. I gruppi microbici presi in esame sono elencati di seguito:

- 1) microrganismi mesofili aerobi totali su plate count agar (PCA) incubati a 30°C per 48 h;
- 2) microrganismi alofili aerobi totali contati su PCA con l'8% di NaCl dopo essere stati incubati a 30°C per 7 giorni;

- 3) microrganismi alofili anaerobi totali contati in PCA con l'8% di NaCl dopo un'incubazione in giare di anaerobiosi usando AnaeroGen 2.5 l Atmosphere Generation Systems (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) a 30°C per 7 giorni;
- 4) lattobacilli mesofili (LAB) su terreno De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (De Man et al., 1960) incubati a 30°C per 48 h e su terreno M17 incubati a 22°C per 72 h per il conteggio dei rispettivamente presunti lattobacilli e lattococchi;
- 5) LAB alofili su terreno MRS e M17 con l'8% di NaCl incubati a 30°C per 7 giorni e a 22°C per 10 giorni, rispettivamente per il conteggio dei lattobacilli e lattococchi alofili presunti;
- 6) Enterobacteriaceae contati su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) dopo un'incubazione a 37°C per 24 h (Garofalo et al., 2017);
- 7) Pseudomonadaceae contati su Pseudomonas Agar Base (PAB) con supplemento selettivo ceftrimide-fucidin-cephalosporin (CFC) (VWR International, Milan, Italy) e incubati a 30°C per 24-48 h;
- 8) stafilococchi contati su Mannitol Salt Agar (MSA) (Chapman, 1945) e incubato a 37°C per 72 h;
- 9) eumiceti totali contati su Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD) (Ausubel et al., 1994) incubati a 25°C per 72 h;
- 10) eumiceti alofili contati su terreno YPD con l'8% di sale dopo un'incubazione a 25°C per 72 h;
- 11) I clostridia solfito-riduttori sono stati enumerate come di seguito descritto: 10 ml degli omogenati sono stati trattati in bagno-maria a 75°C per 20 minuti e di seguito sottoposti a shock termico in ghiaccio. Sono state quindi allestite diluizioni seriali decimali che successivamente sono state inoculate su mezzo di crescita Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC, Biolife) incubato a 44 °C per 18–24 h in condizioni di anaerobiosi realizzate come sopra descritto.

I terreni MRS e M17 sono stati addizionati di cicloesimide (250 mg/l) per prevenire la crescita degli eumiceti, mentre al terreno YPD è stato aggiunto cloramfenicolo (100 mg/l) per prevenire la crescita batterica.

È stato inoltre utilizzato un sistema miniVIDAS (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) per valutare la presenza di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. usando il metodo *Enzyme-linked Fluorescent Assay* (ELFA) in conformità con i protocolli validati AFNOR BIO 12/11-03/04 e AFNOR BIO 12/16–09/05, rispettivamente (Aquilanti et al., 2007).

3.4 Analisi statistiche

È stato utilizzato l'Honest Significant Difference (HSD) test (livello di significatività 0,05) di Tukey-Kramer per valutare le differenze tra i campioni con un'analisi unidirezionale della varianza (ANOVA). È stato inoltre usato il software JMP Version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) per effettuare tutti i test.

3.5 Composizione terreni di coltura

In base ai gruppi microbici da enumerare, sono stati utilizzati differenti terreni di coltura, la cui composizione viene riportata nelle seguenti tabelle:

- Plate Count Agar (PCA) (WVR Chemicals), con e senza aggiunta di NaCl (8%):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Digerito enzimatico di caseina	- 5g/l
- Estratto di lievito	- 2,5g/l
- Glucosio	- 1g/l
- Agar	- 15g/l

Tabella 2. Composizione del terreno di coltura PCA

- M17 agar (liofilchem), con e senza aggiunta di NaCl (8%):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Idrolisato triptico di caseina	- 2,5g/l
- Estratto di carne	- 5g/l
- Estratto di lievito	- 2,5g/l
- Peptone	- 2,5g/l
- Peptone di soia	- 5g/l
- Sodio glicerofosfato	- 19g/l
- Solfato di magnesio	- 0,25g/l
- Acido ascorbico	- 0,5g/l
- Lattosio	- 5g/l
- Agar	- 13g/l

Tabella 3. Composizione del terreno di coltura M17

- De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (WVR Chemicals) (De Man et al., 1960), con e senza aggiunta di NaCl (8%):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Digerito enzimatico di caseina	- 10g/l
- Estratto di carne	- 10g/l
- Estratto di lievito	- 4g/l
- Glucosio	- 20g/l
- Fosfato di dipotassio	- 2g/l
- Acetato di sodio	- 5g/l
- Triammonio citrato	- 2g/l
- Solfato di magnesio	- 0,2g/l
- Solfato di manganese	- 0,05g/l
- Tween 80	- 1.08g/l
- Agar	- 15g/l

Tabella 4. Composizione del terreno di coltura MRS

- Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (WVR Chemicals) (Garofalo et al., 2017):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Digerito enzimatico di tessuti animali	- 7g/l
- Estratto di lievito	- 3g/l
- Glucosio	- 10g/l
- Cloruro di sodio	- 5g/l
- Sali biliari n. 3	- 1,5g/l
- Rosso neutro	- 0,03g/l
- Cristal violetto	- 0,002g/l
- Agar	- 15g/l

Tabella 5. Composizione del terreno di coltura VRBGA

- Pseudomonas Agar Base (PAB) (WVR Chemicals):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Peptone gelatinizzato	- 16g/l
- Caseine idrolisate	- 10g/l
- Solfato di potassio	- 10g/l
- Cloruro di magnesio	- 1,6g/l
- Agar	- 11,5g/l

Tabella 6. Composizione terreno di coltura PAB

- Mannitol Salt Agar (MSA) (WVR Chemicals) (Chapman, 1945):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Idrolisato peptico di tessuto animale	- 7g/l
- Idrolisato pancreatico di caseina	- 5g/l
- Estratto di carne	- 1g/l
- Cloruro di sodio	- 75g/l
- D-Mannitolo	- 10g/l
- Rosso fenolo	- 0,025g/l
- Agar	- 15g/l

Tabella 7. Composizione del terreno di coltura MSA

- Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD) (Ausubel et al., 1994), con e senza aggiunta di NaCl (8%):

Componente	Concentrazione (g/l)
- Estratto di lievito	- 5g/l
- Peptone	- 10g/l
- Glucosio	- 10g/l
- Agar	- 9g/l

Tabella 8. Composizione del terreno di coltura YPD

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Attualmente nella letteratura scientifica è disponibile solo uno studio sul microbiota del surströmming (Kobayashi et al., 2000), insieme a un altro che si occupa del rilevamento dei contaminanti chimici (composti arsenicali) nello stesso prodotto (Richter et al., 2012).

In maggiore dettaglio, lo studio di Kobayashi et al. (2000) si focalizza sull'identificazione di alofili anaerobi stretti isolati da solo 2 lattine di surströmming. Sebbene limitato, lo studio di Kobayashi et al. (2000) ha fornito un primo sguardo interessante sulle specie batteriche coinvolte nelle attività microbiologiche che conducono alla produzione di questo alimento svedese così particolare.

4.1 Parametri chimico-fisici

I risultati delle analisi chimico-fisiche dei campioni del surströmming pronto al consumo sono riportati nella Tabella 9.

Campione	pH	a _w	NaCl (g/100 g)	TTA (ml di NaOH 0,1 M)	Acido acetico (g/100g)	Acido lattico (g/100 g)
S1	6,93±0,01	0,929±0,003	6,92±0,57	5,2±0,07	0,289±0,009	< 0,00002
S2	6,80±0,01	0,940±0,001	8,28±0,00	4,7±0,21	0,346±0,004	< 0,00002
S3	6,83±0,01	0,937±0,001	8,59±0,37	4,7±0,21	0,322±0,002	< 0,00002
S4	6,95±0,01	0,935±0,001	7,43±0,16	4,3±0,21	0,324±0,030	< 0,00002
S5	6,79±0,01	0,928±0,001	6,49±0,16	4,5±0,49	0,297±0,005	< 0,00002
S6	6,67±0,01	0,917±0,000	6,79±0,16	5,0±0,21	0,491±0,048	< 0,00002
S7	6,83±0,01	0,914±0,002	7,38±0,08	5,7±0,78	0,474±0,030	< 0,00002
S8	6,98±0,01	0,922±0,001	7,36±0,24	4,5±0,14	0,474±0,025	< 0,00002
S9	6,72±0,01	0,911±0,001	7,91±0,14	7,4±0,42	0,438±0,008	< 0,00002
S10	6,76±0,00	0,911±0,001	7,69±0,01	6,7±0,28	0,422±0,021	< 0,00002
S11	6,81±0,01	0,916±0,003	7,57±0,13	4,3±0,28	0,296±0,026	< 0,00002
S12	6,77±0,01	0,921±0,001	8,88±0,21	4,6±0,49	0,314±0,003	< 0,00002
S13	6,84±0,01	0,922±0,002	8,46±0,17	4,0±0,14	0,349±0,008	0,001±0,001
S14	6,84±0,01	0,917±0,001	8,72±0,07	4,0±0,00	0,328±0,006	0,004±0,002
S15	6,91±0,01	0,916±0,001	8,62±0,06	4,4±0,14	0,556±0,036	0,041±0,006

Tabella 9. Parametri fisico-chimici del surströmming.

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

I valori di pH oscillavano tra $6,67 \pm 0,01$ (campione S6) e $6,98 \pm 0,01$ (campione S8), mentre i valori di a_w sono stati tra $0,911 \pm 0,001$ (campioni S9 e S10) e $0,940 \pm 0,001$ (campione S2). La concentrazione di NaCl è stata tra $8,88 \pm 0,21 \text{g}/100\text{g}$ (campione S12) e $6,49 \pm 0,16 \text{g}/100\text{g}$ (campione S5). I valori di TTA misurati dai campioni di surströmming oscillavano tra $7,4 \pm 0,42 \text{ml}$ di 0.1 N di NaOH (campione S9) e $4,0 \pm 0,00 \text{ml}$ di NaOH 0.1 N (campione S14). Le concentrazioni di acido acetico erano comprese tra $0,289 \pm 0,009 \text{g}/100\text{g}$ (campione S1) e $0,556 \pm 0,036 \text{g}/100\text{g}$ (campione S15). È stata misurata una concentrazione molto bassa di acido lattico tra i campioni, con la maggior parte dei valori che erano compresi tra $<0,00002 \text{g}/100\text{g}$ e il massimo valore $0,041 \pm 0,006 \text{g}/100 \text{g}$ (campione S15). Sia le misurazioni di acido acetico che di acido lattico si trovano in linea con i risultati pubblicati da Kobayashi et al. (2000), confermando concentrazioni maggiori del primo rispetto al secondo.

I campioni di surströmming analizzati in questo studio sono stati tutti caratterizzati da valori di pH che si aggirano tra 6,67 e 6,98, quindi vicino alla neutralità; i valori registrati si trovavano in accordo con quanto riportato da Kobayashi et al. (2000) nella stessa matrice alimentare. I valori di NaCl misurati in questo studio sono stati leggermente più bassi in confronto a quelli riportati da Kobayashi et al. (2000), che presentava valori da 9% a 9,5%. È noto che il sale interagisce con le proteine miofibrillari, così da influenzare la capacità di trattenere acqua (Laub-Ekgreen et al., 2019). Nei cibi conservati in salamoia, il sale è trasferito dal gradiente di concentrazione, mentre l'acqua è trasferita dalla pressione osmotica tra il muscolo e il mezzo salante; inoltre, nei pesci in salamoia, i grassi e la pelle possono influenzare i risultati del processo di salagione (Laub-Ekgreen et al., 2019). L' a_w rivelata dai campioni di surströmming è stata tra 0,911 e 0,940. Riguardo i valori di pH e a_w , il suströmming è stato riscontrato come un alimento pronto al consumo che è potenzialmente abile a supportare la crescita di *L. monocytogenes*, sebbene non vi siano dati in merito alle dinamiche relative all'evoluzione dei parametri chimico-fisici durante la fermentazione.

Infatti, come riportato dal Regolamento (CE) 2073/2005 e dalle modifiche del Regolamento (CE) 1442/2007, sui criteri microbiologici per i prodotti alimentari, i prodotti che sono incapaci di supportare la crescita di *L. monocytogenes* sono quelli con un $\text{pH} \leq 4,4$ e $a_w \leq 0,92$ o con un $\text{pH} \leq 5,0$ e $a_w \leq 0,94$. È noto che tutti i campioni analizzati hanno mostrato valori di pH sopra i limiti stabiliti dal sopra-menzionato Regolamento, e 3 dei 15 campioni hanno evidenziato valori di $a_w > 0,92$.

Nonostante ciò tutti i campioni hanno rivelato l'assenza di *L. monocytogenes* in 25 g di prodotto (come descritto di seguito). Sono necessari ulteriori studi per chiarire meglio se il

pH finale rilevato è mantenuto attraverso tutta la fermentazione o è influenzato da deacidificazione microbica o enzimatica durante la produzione.

4.2 Analisi microbiologiche

I risultati delle conte vitali dei mesofili totali aerobi, dei lattobacilli e lattococchi mesofili presunti, delle Enterobacteriaceae, delle Pseudomonadaceae, degli stafilococchi e degli eumiceti totali sono riportate nella Tabella 10.

I mesofili aerobi totali mostravano una conta vitale tra $5,67 \pm 0,04$ log ufc/g (campione S2) e $4,08 \pm 0,089$ log ufc/g (campione S14); le medie dei produttori A e B sono risultate significativamente più elevate, mentre per il produttore C il valore è risultato significativamente più basso.

Le conte dei lattobacilli mesofili presunti sono state caratterizzate da valori che oscillavano tra $4,57 \pm 0,18$ log ufc/g (campione 3) e <1 log ufc/g (i campioni da S6 a S14). Il valore medio significativamente più alto è stato riscontrato per il produttore A, mentre il produttore B ha mostrato il valore più basso.

I lattococchi mesofili presunti hanno mostrato conte tra $4,80 \pm 0,07$ log ufc/g (campione S2) e <1 log ufc/g (i campioni da S6 a S14). Il produttore A ha mostrato il valore medio significativamente più alto, mentre il produttore B ha mostrato il valore più basso.

Per le Enterobacteriaceae e le Pseudomonadaceae sono state osservate conte molto basse, entrambe con valori <1 log ufc/g per tutti i campioni.

Per quanto riguarda gli stafilococchi, sono state rilevate conte comprese fra $5,77 \pm 0,07$ log ufc/g (campione S5) e $2,60 \pm 0,43$ log ufc/g (campione S8). Il produttore A ha riportato il più alto valore medio, mentre i produttori B e C quelli più bassi.

Per tutti i campioni, la conta degli anaerobi solfito-riduttori è stata <2 log ufc/g.

Infine, escludendo il campione S4, che ha mostrato una conta vitale di $1,92 \pm 1,30$ log ufc/g, gli eumiceti totali sono risultati <1 log ufc/g nei restanti campioni. Il valore medio più alto è stato rilevato nel campione proveniente dal produttore A.

Le conte vitali dei microrganismi alofili aerobi e anaerobi totali, i lattobacilli e i lattococchi alofili presunti e gli eumiceti alofili sono state riportate nella Tabella 11.

Nel dettaglio, la conta vitale degli alofili totali aerobi oscilla tra $6,74 \pm 0,18$ log ufc/g (campione S8) e $4,99 \pm 0,06$ log ufc/g (campione S1), con i campioni del produttore B che mostrano i valori medi più alti.

Gli alofili anaerobi totali avevano valori da $6,98 \pm 0,05$ log ufc/g (campione S10) a $5,61 \pm 0,13$ (campione S14), con i campioni del produttore B che mostravano i valori più alti.

La conta dei lattobacilli alofili presunti ha portato a risultati tra $7,06 \pm 0,10$ log ufc/g (campione S15) e $5,85 \pm 0,19$ log ufc/g (campione S13). Il produttore B ha mostrato i valori medi maggiori, mentre gli altri due produttori hanno mostrato i valori minori.

Per quanto riguarda i lattococchi alofili presunti, tutti i campioni dei produttori A e B hanno mostrato valori < 1 log ufc/g. Le conte vitali provenienti dal produttore C hanno mostrato valori tra $5,59 \pm 0,06$ log ufc/g (campione S15) e $4,00 \pm 0,06$ log ufc/g (campione S13).

Non sono stati rilevati eumiceti alofili, con tutte le conte che sono state < 1 log ufc/g.

Inoltre, nessun campione ha rivelato la presenza di *L. monocytogenes* in 25 g di prodotto.

Nonostante una scarsità di conoscenza sul microbiota coinvolto nella produzione di surströmming, è risaputo che la preparazione di questa aringa acida svedese è effettuata senza l'uso di colture starter. Quindi, i microrganismi autoctoni presenti nel surströmming sono probabilmente di origine ambientale o di origine animale (es. intestino del pesce o sua pelle).

L'alta presenza di mesofili totali aerobi evidenzia un'intensa attività microbica durante la shelf-life del prodotto. Tale gruppo microbico comprende una grande varietà di batteri pro-tecnologici, deteriorativi e patogeni. La presenza di un'attiva frazione microbica è stata anche confermata dalla presenza di rigonfiamenti nelle lattine, le quali sono deformate a causa della formazione di gas interni. Inoltre, la conta degli alofili aerobi totali è stata conforme con i valori riportati da Gassem et al. (2019) per il cefalo fermentato in salamoia (Hout-Kasef), dove la conta batterica era tra 3,26 e 5,14 log ufc/g, con un valore medio di 4,32 log ufc/g. Nello studio effettuato da Wawire et al. (2019) sono state rilevate conte inferiori per i batteri alofili nelle sardine maculate pressate in salamoia (*Amblygaster sirm*), con valori compresi tra 2,0 e 2,8 log ufc/g.

Tra i batteri lattici, i lattobacilli e i lattococchi alofili sono stati prevalenti rispetto a quelli coltivati su terreni di crescita senza integrazione di NaCl. I batteri lattici costituiscono un folto gruppo di microrganismi che producono acido lattico come principale metabolita della fermentazione dei carboidrati (Françoise, 2010). Le loro attività metaboliche portano alla produzione di una vasta gamma di prodotti fermentati di origine vegetale o animale, rappresentando uno dei gruppi più importanti di microrganismi pro-tecnologici. È noto che i batteri lattici marini colonizzano nicchie ambientali estreme, come l'acqua di mare. I batteri lattici sono normalmente inclusi nel microbiota intestinale dei pesci e la loro presenza è influenzata dalla salinità dell'acqua o dallo stress ambientale (Ringo and Storm, 1994). Più in dettaglio, i lattobacilli sono già stati rilevati nel salmone dell'Atlantico, nel pollack, nel salmerino del Mar Artico, nel merluzzo e nella trota iridea; inoltre, è stata segnalata la

presenza di *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Françoise, 2010). Tra i batteri lattici alofili, i generi *Staphylococcus* e *Tetragenococcus* dominano solitamente durante la produzione di prodotti ittici fermentati (Taira et al., 2007), contribuendo così ad abbassare il pH e ridurre il rischio di putrefazione; tuttavia, una parte del processo di degradazione del muscolo è anche a carico dagli enzimi endogeni del pesce (Françoise, 2010).

Le Enterobatteriacee comprendono sia batteri alterativi che batteri patogeni; i bassi conteggi vitali generalmente registrati nel surströmming per questa famiglia batterica, così come l'assenza di *Salmonella* spp., confermano l'instaurarsi di condizioni ambientali inadatte per la loro sopravvivenza nei pesci fermentati in salamoia, come precedentemente riportato da altri autori (Alfonzo et al. 2018; Gasse, 2019; Wawire et al., 2019).

Per quanto riguarda le Pseudomonadaceae, è noto che i membri del genere *Pseudomonas* possono essere naturalmente presenti nell'ambiente ittico, essendo l'agente causale dell'infezione o del deterioramento dei pesci trasformati (Kačániová et al., 2017). Nei campioni analizzati, sono stati costantemente registrati conteggi bassi di Pseudomonadaceae. Tuttavia, è noto che alcune specie di *Pseudomonas* hanno una forte attività lipolitica che potrebbe interagire con il grasso delle aringhe in scatola, contribuendo così alla definizione del sapore del surströmming. Inoltre, Osmani et al. (2019) hanno recentemente indicato che le specie *Pseudomonas* possono avere un ruolo nella riduzione del contenuto di TMA nel muscolo del pesce. Sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio le dinamiche di tali famiglie batteriche durante la fermentazione del surströmming.

I dati relativi agli stafilococchi coagulasi-negativi raccolti nel presente studio sono conformi ai risultati di Gasse (2019), che riportava conteggi compresi tra 2,71 e 3,85 log ufc/g, con un valore medio di 3,23 log ufc/g. Nello studio di Gasse (2019), tra le specie rilevate, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus saprophyticus* erano quelli che dominavano il processo di fermentazione. Come riportato da Zeng et al. (2017), le attività di proteasi e lipasi degli stafilococchi coagulasi-negativi producono vari composti aromatici, che possono essere responsabili dello sviluppo della consistenza e degli aromi nei pesci fermentati in salamoia.

Il numero degli alofili anaerobi è stato conforme ai dati pubblicati da Kobayashi et al. (2000), che ha riportato conteggi tra 6,3 e 6,7 log ufc/g, confermando così la forte associazione di un tale gruppo microbico con le condizioni ambientali salate e anaerobiche stabilite all'interno delle lattine di surströmming.

Il numero di eumiceti totali è stato inferiore ai valori riportati da Gassem (2019) per lo stesso gruppo microbico, che, nel cefalo fermentato sotto sale, mostrava un valore medio di 1,33 log ufc/g. I conteggi di eumiceti nel surströmming erano inferiori anche a quelli riportati da Wawire et al. (2019) nelle sardine macchiate pressate in salamoia, dove la conta totale dei miceti ha mostrato un valore massimo di 3,6 log ufc/g. I lieviti di origine marina sono stati precedentemente isolati da acqua di mare, alghe, pesci e mammiferi marini, nonché uccelli marini (Zaky et al., 2014); pertanto, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire meglio il loro eventuale contributo durante la fermentazione delle aringhe.

È interessante notare che non sono stati rilevati anaerobi solfito-riduttori. Le conte dei batteri anaerobici che riducono il solfito sono generalmente considerati indicatori di contaminazione da clostridi. Nonostante ciò, come riportato da Prevost et al. (2013), un tale gruppo batterico non è supportato da alcuna considerazione tassonomica; quindi, il loro significato dovrebbe probabilmente essere riconsiderato. In effetti, molti altri generi batterici possono presentare un fenotipo solfito-riduttore, tra cui *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Tissierella* e *Veillonella*, (Prevost et al., 2013).

Inoltre, il monitoraggio dei prodotti ittici per quanto riguarda la presenza di *C. botulinum* (non oggetto della presente tesi) deve essere costantemente condotto per proteggere la salute dei consumatori, soprattutto quando si prendono in considerazione alimenti in scatola non sottoposti a forti trattamenti termici.

Campioni*	Mesofili totali aerobi	Lattobacilli mesofili presunti	Lattococchi mesofili presunti	Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae	Stafilococchi coagulasi-negativi	Anaerobi solfito-riduttori	Eumiceti totali
S1	4,66±0,05	4,19±0,02	4,80±0,11	1,04±1,47	< 1,00	4,57±0,13	< 2,00	< 1,00
S2	5,67±0,04	3,77±0,16	4,20±0,08	< 1,00	< 1,00	4,18±0,26	< 2,00	< 1,00
S3	4,96±0,02	4,57±0,18	4,80±0,20	< 1,00	< 1,00	4,31±0,44	< 2,00	< 1,00
S4	4,74±0,12	4,18±0,00	4,52±0,04	< 1,00	< 1,00	5,02±0,56	< 2,00	1,92±1,30
S5	5,09±0,07	4,50±0,55	4,67±0,41	< 1,00	1,00±0,00	5,77±0,07	< 2,00	< 1,00
S6	5,40±0,02	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	3,04±0,19	< 2,00	< 1,00
S7	5,56±0,01	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	2,96±0,26	< 2,00	< 1,00
S8	5,41±0,11	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	2,60±0,43	< 2,00	< 1,00
S9	5,35±0,06	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	3,52±0,25	< 2,00	< 1,00
S10	5,41±0,10	< 1,00	< 1,00	< 1,00	1,00±0,00	3,00±0,00	< 2,00	< 1,00
S11	4,71±0,06	< 1,00	2,68±0,14	< 1,00	1,00±0,00	3,33±0,18	< 2,00	< 1,00
S12	4,70±0,00	< 1,00	2,50±0,20	< 1,00	1,13±1,59	3,22±0,06	< 2,00	< 1,00
S13	4,18±0,04	< 1,00	2,39±0,04	< 1,00	< 1,00	2,65±0,07	< 2,00	< 1,00
S14	4,08±0,89	< 1,00	2,37±0,23	< 1,00	< 1,00	2,69±0,09	< 2,00	< 1,00
S15	5,35±0,63	1,65±0,07	2,67±0,23	1,30±0,00	2,05±0,21	3,94±0,16	< 2,00	< 1,00

Tabella 10. Risultati delle conte vitali di batteri ed eumiceti nel surströmming.

I valori sono espressi come media ± deviazione standard. *Produttore A, campioni S1-S5; Produttore B, campioni S6-S10; Produttore C, campioni S11-S15.

Campioni*	Alofili aerobi totali	Alofili anaerobi totali	Lattobacilli alofili presunti	Lattococchi alofili presunti	Eumiceti alofili
S1	4,99±0,06	5,69±0,11	5,99±0,09	< 1,00	< 1,00
S2	6,08±0,04	6,09±0,07	5,88±0,05	< 1,00	< 1,00
S3	5,58±0,10	5,91±0,05	5,59±0,09	< 1,00	< 1,00
S4	5,43±0,20	5,83±0,03	5,93±0,05	< 1,00	< 1,00
S5	5,90±0,36	6,01±0,25	6,15±0,21	< 1,00	< 1,00
S6	6,45±0,00	6,52±0,06	6,52±0,03	< 1,00	< 1,00
S7	6,74±0,05	6,91±0,03	6,72±0,02	< 1,00	< 1,00
S8	6,74±0,18	6,64±0,14	6,68±0,04	< 1,00	< 1,00
S9	6,53±0,08	6,88±0,09	6,75±0,03	< 1,00	< 1,00
S10	6,60±0,03	6,98±0,05	6,95±0,03	< 1,00	< 1,00
S11	6,07±0,13	6,00±0,07	5,94±0,00	5,09±0,20	< 1,00
S12	5,92±0,13	5,87±0,09	5,88±0,16	4,16±0,06	< 1,00
S13	5,32±0,29	5,89±0,27	5,85±0,19	4,00±0,06	< 1,00
S14	5,61±0,53	5,61±0,13	5,86±0,28	4,21±0,13	< 1,00
S15	6,52±0,01	6,92±0,04	7,06±0,10	5,59±0,06	< 1,00

Tabella 11. risultati delle conte di batteri ed eumiceti alofili in Surströmming.

I valori sono espressi come log ufc/g ± deviazione standard. *Produttore A, campioni S1-S5; Produttore B, campioni S6-S10; Produttore C, campioni S11-S15.

CONCLUSIONI

Come riportato da Skåra et al. (2015), la produzione annuale di surströmming non è da trascurare, essendo approssimativamente di 600 tonnellate. Nonostante ciò, le caratteristiche fisico-chimiche e microbiologiche di questo pesce fermentato sono state per lo più inesplorate finora.

Sulla base dei risultati ottenuti nella presente tesi, è possibile affermare che la produzione di surströmming sia condotta da più gruppi microbici che interagiscono in un ambiente di fermentazione del tutto particolare.

Come per altre produzioni alimentari fermentate, i batteri lattici sembrano essere bene adattati al substrato e alle condizioni ambientali, risultando così un gruppo microbico cardine per l'ottenimento del prodotto finale.

Al contrario, gli eumiceti sembrano essere coinvolti in maniera meno rilevante tanto da risultare trascurabili quando coltivati in substrato contenente cloruro di sodio, e quindi simile alla composizione della salamoia entro la quale avvengono le trasformazioni microbiche in questione.

Importante sottolineare l'assenza di microrganismi patogeni, quali *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., nel prodotto finito, così come la quantità trascurabile di Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae entro le quali si colloca la maggior parte di microrganismi deterioranti e indicatori di scarsa igiene.

Questi risultati rappresentano un primo passo per l'ottenimento di informazioni più dettagliate in merito alla identificazione delle specie microbiche presenti nel surströmming e alla definizione delle dinamiche di popolazione che si instaurano durante la fermentazione dell'aringa.

BIBLIOGRAFIA

- Alfonzo, A., Gaglio, R., Francesca, N., Barbera, M., Saiano, F., Santulli, A., Matraxia, M., Rallo, F., Moschetti, G., 2018. Influence of salt of different origin on the microbiological characteristics, histamine generation and volatile profile of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.). *Food Control* 92, 301–311.
- Alm, F., 1965. Scandinavian anchovies and herring tidbits. In: Borgstrøm, G. (Ed.), *Fish as Food*. Academic Press, London (UK), pp. 195–216.
- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Clementi, F. 2016. Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview. *Int. Food Res. J.* 23, 429–445.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhk K.: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 1994.
- Chapman, G.H. The Significance of Sodium Chloride in Studies of Staphylococci. *J. Bacteriol.* 1945;50(2):201–203.
- De Man, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 23, 130-135.
- Françoise, L., 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27, 698–709.
- Garofalo, C., Bancalari, E., Milanović, E., Cardinali, F., Osimani, A., Savo Sardaro, M., L., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E., Gatti, M., 2017.

- Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 24-36.
- Gassem, M.A., 2019. Microbiological and chemical quality of a traditional salted-fermented fish (Hout-Kasef) product of Jazan Region, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 137–140.
- Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S., Klůga, A., Tokár, M., Kluz, M., Ivanišová, E., 2017. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharm. J.* 25, 1108–1116.
- Kobayashi, T., Kimura, B., Fujii, T., 2000. Strictly anaerobic halophiles isolated from canned Swedish fermented herrings (surströmming). *Int. J. Food Microbiol.* 54, 81–89.
- Kurlansky, M., 2002. A Nordic Dream. In: *Salt: A World History*. Vintage Books, London (UK), p. 138.
- Laub-Ekgreen, M.H., Jessen, F., Martinez-Lopez, B., 2019. Mechanistic modelling of the coupled salt and water transport in herring during brining and curing. *J. Food Eng.* 250, 18–25.
- Osimani, A., Ferrocino, I., Agnolucci, M., Cocolin, L., Giovannetti, M., Cristani, C., Palla, M., Milanović, V., Roncolini, A., Sabbatini, R., Garofalo, C., Clementi, F., Cardinali, F., Petruzzelli, A., Gabucci, C., Tonucci, F., Aquilanti, L., 2019. Unveiling hákarl: A study of the microbiota of the traditional Icelandic fermented fish. *Food Microbiol.*, 82, 560–572.
- Prevost, S., Cayol, J.-L., Zuber, F., Tholozan, J.-L., Remize, F., 2013. Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety. *Food Contr.* 32, 222-227.

- Regulation (EC) No. 1441/2007 (2007). of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off. J. Eur. Union, Available online <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:EN:PDE>.
- Regulation (EC) No. 2073/2005 (2005). of the European Parliament and the Council of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off. J. Eur. Union, Available online <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:EN:PDE>.
- Richter, J., Lischka, S., Piechotta, C., 2012. Analysis of arsenic species in fish after derivatization by GC-MS. *Talanta* 101, 524–529.
- Ringo, E., Strom, E., 1994. Microflora of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.); gastrointestinal microflora of free-living fish, and effect of diet and salinity on the intestinal microflora. *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 623–629.
- Skåra, T., Axelsson, L., Stefánsson, G., Ekstrand, B., Hagen, H., 2015. Fermented and ripened fish products in the northern European countries. *J. Ethn. Foods* 2, 18–24.
- Speranza, B., Racioppo, A., Bevilacqua, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2015. Selection of autochthonous strains as starter cultures for fermented fish products. *J. Food Sci.* 80, M151–M160.
- Taira, W., Funatsu, Y., Satomi, M., Takano, T., Abe, H., 2007. Changes in extractive components and microbial proliferation during fermentation of fish sauce from underutilized fish species and quality of final products. *Fish. Sci.* 73, 913–923.
- Wawire, M., Tsighe N., Mahmud A., Abraha B., Wainaina I., Karimi S., Abdulkerim Z., 2019. Effect of salting and pressing on quality characteristics of spotted sardine (*Amblygaster sirm*) during different storage conditions. *J. Food Comp. Anal.* 79, 47–54.

- Zaky, A.S., Tucker, G.A., Daw, Z.Y., Du, C., 2014. Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Res.* 14, 813–825.
- Zeng, X., He, L., Guo, X., Deng, L., Yang, W., Zhu, Q., Duan, Z., 2017. Predominant processing adaptability of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from Chinese traditional low-salt fermented whole fish. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 141–151.