



Università degli studi di Pisa
Dipartimento di
Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Industriali

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale in
Biosicurezza e Qualità degli Alimenti

Tesi di laurea

**“Indagine molecolare per la valutazione della
qualità e dell’amplificabilità del DNA estratto da
preparazioni a base di surimi:
difficoltà e prospettive”**

Candidata:
Martina Marchetti

Relatori:
Prof.ssa Alessandra Guidi
Dott. Andrea Armani

Correlatore:
Dott. Lorenzo Castigliero

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RIASSUNTO/ABSTRACT | 5 |
| INTRODUZIONE | 7 |
| CAPITOLO 1. IL COMPARTO ITTICO | 7 |
| 1.1 Quadro generale sul comparto ittico | 7 |
| 1.2 Il comparto ittico italiano | 8 |
| 1.3 Problematiche del settore ittico | 9 |
| 1.3.1 Problematiche sanitarie | 10 |
| 1.3.2 Problematiche commerciali | 15 |
| 1.3.3 Problematiche ecologiche | 17 |
| CAPITOLO 2. I PRODOTTI TRASFORMATI | 18 |
| 2.1 Consumo di prodotti ittici trasformati | 18 |
| 2.2 Cosa sono i prodotti ittici trasformati? | 19 |
| CAPITOLO 3. IL SURIMI | 23 |
| 3.1 Cos'è il surimi? | 23 |
| 3.2 Come viene prodotto il surimi | 24 |
| 3.3 Preparati alimentari a base di surimi | 25 |
| 3.4 Caratteristiche nutrizionali del surimi | 27 |
| 3.5 Il mercato del surimi | 27 |
| 3.6 Surimi: problematiche igienico sanitarie e commerciali | 28 |
| CAPITOLO 4. SICUREZZA ALIMENTARE E NORMATIVA COMUNITARIA | 30 |
| 4.1 Rintracciabilità | 31 |
| 4.2 Analisi del rischio | 31 |
| 4.3 Pacchetto Igiene | 32 |
| 4.4 Etichettatura | 34 |
| 4.5 Etichettatura dei prodotti della pesca | 37 |
| 4.6 Etichettatura del surimi e delle preparazioni a base di surimi | 39 |
| CAPITOLO 5. ALLERGENI PRESENTI NEI PRODOTTI ITTICI | 42 |
| 5.1 Definizione di allergia e sintomi principali | 42 |
| 5.2 Incidenza delle allergie alimentari | 43 |
| 5.3 Prodotti ittici ed allergia | 43 |
| 5.4 Aspetti clinici | 45 |

| | |
|---|-----------|
| CAPITOLO 6. APPROCCIO MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE | 49 |
| 6.1 Tecniche di laboratorio per l'identificazione di specie | 49 |
| 6.2 La struttura del DNA | 51 |
| 6.3 Il DNA mitocondriale | 53 |
| 6.4 I geni mitocondriali | 54 |
| 6.5 Tecniche di estrazione del DNA | 55 |
| 6.6 Valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto | 56 |
| 6.7 Amplificazione del DNA: Polymerase Chain Reaction | 56 |
| 6.8 Applicazioni alternative della tecnica di PCR | 58 |
| 6.9 Elettroforesi | 59 |
| 6.10 Sequenziamento ed analisi post-PCR | 61 |
| CAPITOLO 7. SCOPO DELLA TESI | 67 |
| CAPITOLO 8. MATERIALI E METODI | 68 |
| 8.1 Raccolta dei campioni | 68 |
| 8.1.1 Campioni di riferimento | 68 |
| 8.1.2 Prodotti commerciali | 68 |
| 8.2 Estrazione del DNA totale | 68 |
| 8.3 Quantificazione spettrofotometrica e valutazione dell'integrità del DNA totale mediante elettroforesi su gel d'agarosio | 70 |
| 8.3.1 Misurazione della concentrazione del DNA estratto | 70 |
| 8.3.2 Elettroforesi del DNA totale su gel d'agarosio | 70 |
| 8.4 Valutazione dell'efficienza dei primers universali nell'amplificazione del DNA delle specie di riferimento | 70 |
| 8.4.1 Selezione dei primers | 70 |
| 8.4.2 Amplificazione | 71 |
| 8.5 Amplificazione dei campioni commerciali | 72 |
| 8.5.1 Sequenziamento ed analisi delle sequenze | 72 |
| CAPITOLO 9. RISULTATI E DISCUSSIONI | 73 |
| 9.1 Raccolta dei campioni | 73 |
| 9.1.1 Scelta delle specie di riferimento | 73 |
| 9.2 Prodotti commerciali | 74 |
| 9.2.1 Analisi delle informazioni riportate in etichetta | 74 |
| 9.3 Estrazione del DNA totale | 77 |
| 9.3.1 Campioni di riferimento | 77 |
| 9.3.2 Campioni commerciali | 78 |
| 9.4 Quantificazione spettrofotometrica, valutazione dell'integrità del DNA totale mediante elettroforesi su gel d'agarosio | 78 |

| | |
|---|------------|
| 9.4.1 Misurazione della concentrazione del DNA estratto | 78 |
| 9.4.2 Elettroforesi del DNA totale su gel d'agarosio | 79 |
| 9.5 Amplificazione del DNA delle specie di riferimento attraverso l'utilizzo di primers universali | 81 |
| 9.5.1 Selezione dei primers | 81 |
| 9.5.2 Amplificazione del gene <i>16S rRNA</i> | 82 |
| 9.5.3 Amplificazione del gene <i>COI</i> | 82 |
| 9.6 Amplificazione dei campioni commerciali | 84 |
| 9.7 Sequenziamento ed analisi delle sequenze | 85 |
| 9.7.1 Analisi delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene <i>16S rRNA</i> | 86 |
| 9.7.2 Analisi delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene <i>COI</i> | 88 |
| 9.8 Confronto con i database | 88 |
| 9.8.1 Confronto tra le analisi molecolari e le informazioni riportate in etichetta | 90 |
| 9.9 Difficoltà e prospettive nell'identificazione di specie in prodotti multispecie come le preparazioni a base di surimi | 95 |
| 9.9.1 Difficoltà | 95 |
| 9.9.2 Prospettive | 96 |
| CAPITOLO 10. CONCLUSIONI | 99 |
| APPENDICE | 100 |
| BIBLIOGRAFIA | 133 |
| RIFERIMENTI NORMATIVI | 143 |
| RINGRAZIAMENTI | 145 |

RIASSUNTO

Attualmente, a seguito dei cambiamenti dello stile di vita, i consumatori sono orientati verso prodotti ittici caratterizzati da praticità di preparazione (*ready to eat* e *ready to cook products*). Tra questi, le preparazioni a base di surimi, prodotti costituiti da pesce ricomposto addizionato con vari ingredienti. La perdita delle caratteristiche morfologiche che si verifica durante la produzione del surimi rende impossibile l'identificazione delle specie utilizzate tramite analisi morfologica: è quindi necessario ricorrere a metodiche di laboratorio basate sull'analisi del DNA. In questo lavoro, considerando le limitazioni associate all'uso di tecniche analitiche basate sul sequenziamento quando applicate a prodotti trasformati e multispecie, 40 preparazioni a base di surimi sono state analizzate al fine di valutare il livello di degradazione del DNA e la sua amplificabilità a mezzo di primers universali. In particolare, è stato testato un nuovo approccio (multi DNA *barcoding*) analizzando sia frammenti del gene mitocondriale che codifica per la subunità 16S ribosomiale, che frammenti del gene mitocondriale che codifica per la subunità I della Citocromo C Ossidasi, utilizzando 5 coppie di *primers* differenti (3 per il gene *COI* e 2 per il gene *16S*) per l'amplificazione di target di lunghezza variabile (da 655 a 139 pb). Tali *primers* sono stati preventivamente testati su 132 campioni di DNA derivanti da 45 specie di riferimento (41 di pesci e 4 di cefalopodi) valutando sia la percentuale di amplificazione che la concentrazione dei prodotti di PCR. Successivamente gli stessi *primers* sono stati utilizzati per amplificare e sequenziare i DNA estratti dai 40 campioni commerciali. Tutte le sequenze ottenute sono state confrontate con i database pubblici (BOLD e GenBank). I livelli di degradazione del DNA estratto da tali campioni sono stati quindi valutati in funzione dei risultati dell'amplificazione e del sequenziamento, valutando anche la lunghezza delle sequenze ottenute rispetto a quella dell'amplicone atteso. Le etichette di tutti i prodotti sono state analizzate alla luce delle normative vigenti. Le analisi effettuate hanno evidenziato che il 35% dei campioni analizzati mostrava un pattern di degradazione del DNA totale con frammenti inferiori alle 500 pb. Nonostante questo, l'utilizzo di più coppie di primers per l'amplificazione di frammenti di lunghezza differente (lunghi e corti) ha permesso di sequenziare tutti i prodotti di PCR ottenuti. Nel complesso, il 76% delle sequenze ottenute sono state ritenute utilizzabili. Dai risultati ottenuti dal confronto con i database il 18,5% dei campioni è risultato non conforme. Nonostante la metodica applicata abbia permesso di verificare le informazioni riportate sull'etichetta di alcuni prodotti le sue limitazioni non hanno permesso di valutare in maniera esaustiva la composizione di tutti i prodotti analizzati. Il presente lavoro conferma la valutazione della degradazione del DNA e la selezione dei primers quali step essenziali per superare i limiti associati all'analisi di prodotti trasformati e multispecie.

PAROLE CHIAVE: preparazioni a base di surimi, identificazione di specie, gene *16S rRNA*, gene *COI*, DNA *barcoding*, degradazione DNA.

ABSTRACT

Currently, as a result of lifestyle changes, consumers moved towards seafood products characterized by a convenient preparation (ready to eat and ready to cook products). Among these, surimi-based products are preparations made of reassembled fish, supplemented with various ingredients. The loss of morphological characteristics of this processed product makes the species identification by morphological analysis impossible. Thus, it is necessary to use laboratory methods based on DNA analysis. In this work, considering the limitations associated with the use of analytical techniques based on sequencing when applied to processed and multispecies products, 40 commercial surimi-based products were analyzed in order to assess the level of degradation and the amplificability of DNA using universal primers. In particular, a new approach (multi DNA barcoding) was tested, analyzing both fragments belonging to the mitochondrial gene encoding the mitochondrial 16s ribosomal RNA gene (16s rRNA) and fragments belonging to the mitochondrial gene encoding the subunit I of Cytochrome C oxidase (COI), using 5 different couples of primers (3 for the COI gene and 2 for the 16s rRNA gene) to amplify target of different lengths (from 655 to 139 pb). These primers were tested on 132 samples of DNA extracted from 45 reference species (41 fishes and 4 cephalopods), in order to evaluate both the amplification rate and the concentration of PCR products. Then, the same primers have been used to amplify and sequence DNA extracts from 40 commercial samples. All the sequences obtained were compared with public database (BOLD and GenBank). The levels of DNA degradation of these samples were assessed in the light of the amplification and sequencing output, also comparing the lengths of the obtained sequences with those of the expected amplicons. The label of each product was analyzed according to the regulations in force. The performed analysis showed a pattern of degradation of total DNA with fragments less than 500 pb in 35% of the samples. Despite this, using multiple couples of primers to amplify fragments of different lengths (long and short), all the PCR products were successfully sequenced. Overall, 76% of the obtained sequences have been considered usable. The comparison with the databases highlighted that 18.5% of the samples was non-compliant. Despite the method applied has allowed to verify the information on the label of some products, limits associated to the technique did not allow to completely evaluate the composition of all the products. The present work confirms the evaluation of the DNA degradation and the selection of the primers as an essential step to overcome the limitations associated to the analysis of processed and multispecies products.

KEYWORDS: surimi-based products, species identification, 16s rRNA gene, COI gene, DNA barcoding, DNA degradation

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1. IL COMPARTO ITTICO

1.1 QUADRO GENERALE SUL COMPARTO ITTICO

I prodotti ittici rivestono una grande importanza nella dieta dell'uomo, in quanto si caratterizzano per un elevato valore nutrizionale associato ad una notevole digeribilità. Infatti, tali prodotti rappresentano un'importante fonte proteica e di vari micronutrienti, indispensabili per una dieta equilibrata. Inoltre, nei Paesi in cui l'assunzione di proteine è bassa, sono proprio le proteine del pesce a rappresentare una componente fondamentale. Il prodotto ittico ha sempre rivestito un ruolo primario nell'alimentazione dell'uomo, ma la sua popolarità è sicuramente aumentata negli ultimi anni. Secondo il rapporto FAO pubblicato il 19 maggio 2014, infatti, la produzione complessiva da pesca di cattura e da acquacoltura è stata nel 2012 pari a 158 milioni di tonnellate – circa 10 milioni di tonnellate in più rispetto al 2010. L'acquacoltura, comprese la attività dei piccoli produttori, è la principale responsabile di questa crescita. La pesca di allevamento, infatti, ha il grande potenziale di rispondere all'aumentata domanda di cibo di una popolazione mondiale in crescita. La rinnovata attenzione nei confronti dei prodotti ittici deriva dal grande aumento della quantità di tali prodotti consumati dall'uomo, percentuale passata dal 70% del 1980 ad un livello record di oltre l'85% (136 milioni di tonnellate) nel 2012 (FAO, 2014). Allo stesso tempo, il consumo pro-capite di pesce è salito da 10 Kg nel 1960 a più di 19 Kg nel 2012 (FAO, 2014). Il pesce rappresenta, ormai, quasi il 17% del consumo di proteine a livello mondiale e in alcuni paesi costieri ed insulari può raggiungere addirittura il 70%. Inoltre, il pesce rimane tra i prodotti alimentari più scambiati al mondo, per un valore nel 2012 di quasi 130 miliardi di dollari (FAO, 2014). La pesca e l'acquacoltura giocano un ruolo sempre più importante per molte economie locali, ma, mentre la pesca di cattura è rimasta stabile nel 2012, con circa 80 milioni di tonnellate, l'acquacoltura è destinata a svolgere un ruolo sempre più importante, tanto da stimare per il 2021 un aumento del 33% dell'allevamento di pesci e crostacei (FAO, 2012). Inoltre, sempre per il 2021 è previsto che il 52% dei pesci destinati al consumo sarà rappresentato da pesci di allevamento, superando così i pesci catturati (FAO, 2012). A livello mondiale, Paesi che fino a qualche decennio fa erano produttori importanti, come la Francia, il Giappone e la Spagna stanno diminuendo la produzione, mentre a occupare quote di mercato sempre più rilevanti sono la Cina, l'Africa ed i paesi dell'America Latina e dei Caraibi (ISMEA, 2011).

Tra i produttori di pesce a livello mondiale svetta sicuramente la Cina, che, con i suoi allevamenti di carpe, pesci gatto, molluschi filtratori (cozze e vongole principalmente), produce più del 60% del pesce allevato al mondo e fornisce quasi un quinto del pesce da cattura che raggiunge le nostre tavole. Tra i primi quindici produttori compaiono per lo più Paesi asiatici, mentre a rappresentare l'Europa troviamo la Russia per la pesca da cattura e la Norvegia sia per la pesca in mare che per l'allevamento (soprattutto di salmoni). Un dato significativo riguarda proprio la produzione, che risulta essere molto concentrata a livello mondiale: più del 70% della pesca da cattura e più del 90% del pesce allevato sono prodotti da un numero ristretto di Paesi (ISMEA, 2011). In aumento negli ultimi anni gli scambi commerciali di gamberi e gamberetti, i prodotti più importanti nel commercio internazionale di prodotti ittici. La produzione dei gamberi, però, è risultata sempre più dipendente dall'acquacoltura, che nel 2005, ha fornito ben il 44% di gamberi e gamberetti (ISMEA, 2011). Analizzando le acque marine, tra le più produttive compaiono quelle dell'Oceano Pacifico e dell'Oceano Indiano, sui quali, infatti, si affacciano i Paesi asiatici che appaiono tra i principali produttori di pesce da cattura (ISMEA, 2010). Per quanto, invece, riguarda il Mar Mediterraneo ed il Mar Nero, la produzione, che nel 2011 era pari a 1,4 milioni di tonnellate, è scesa di quasi l'11% tra il 2011 ed il 2012 (FAO, 2014). Infine, è importante sottolineare come il settore ittico fornisca i mezzi di sussistenza a più del 10% della popolazione mondiale, e lavoro a circa il 4,4% dei lavoratori occupati nel settore primario, vale a dire più di 58 milioni di persone, per lo più provenienti dai paesi in via di sviluppo (FAO, 2014).

1.2 IL COMPARTO ITTICO ITALIANO

Per quanto riguarda la nostra penisola, il consumo di pesce fresco è calato nei primi undici mesi del 2013 del 3,5% su base annua. Questo, in un contesto che vede, per la prima volta dall'inizio del nuovo millennio, scendere il consumo ittico pro-capite sotto la soglia dei 20 Kg/annui (ISMEA, 2014). Questo taglio che interessa il settore del pesce fresco corrisponde a una riduzione del 20% in termini monetari (ISMEA, 2014). Oltre alla riduzione quantitativa, è stata registrata una significativa flessione della spesa corrispettiva (-13,2% nel periodo in esame), che ben incarna il crescente orientamento degli italiani verso prodotti più pratici ed economici. Per quanto riguarda la molluschicoltura, è stata registrata una decisa flessione nei consumi delle vongole veraci (-9.1% rispetto al 2011), mentre per i mitili la diminuzione è stata più contenuta (-2%) (ISMEA, 2014). Tra le specie di provenienza italiana resistono solo le trote, il cui consumo è cresciuto del 2,7% in

quantità e del 16% in valore, mentre si assiste, in generale, ad uno spostamento del consumatore verso prodotti secchi salati e affumicati, avvantaggiati dai significativi ribassi dei prezzi e da una maggiore conservabilità (FAO, 2014). Tra questi ultimi, la categoria più rappresentativa è il salmone affumicato, la cui fonte di approvvigionamento della materia prima è totalmente estera. Emerge, inoltre, un rilevante aumento degli acquisti oltrefrontiera di calamari e calamaretti freschi (+20.8% dello stesso periodo nel 2012), provenienti soprattutto dalla Spagna e dalla Slovenia. In crescita anche il prodotto congelato (+11,8%), in parte di provenienza iberica ma soprattutto dai Paesi asiatici (Thailandia, Cina, India, Vietnam) (ISMEA, 2014). Sempre tra i prodotti trasformati, i maggiori flussi in entrata hanno interessato anche i gamberi e gamberetti congelati, per i quali l'Argentina si conferma il principale paese fornitore, seguito dalla Spagna, e salmoni affumicati (inclusi i filetti) provenienti da Polonia, Lituania e Svezia. Orate e spigole che, dopo il salmone, sono tra i prodotti freschi più importati dall'Italia, registrano un leggero aumento nei quantitativi (+1% circa), a cui si accompagna una flessione del valore particolarmente importante per le spigole (-7,5%). Per queste due tipologie, la Grecia si conferma il principale mercato d'approvvigionamento, seguito da una Turchia emergente con oltre il 20% in più delle spedizioni in Italia rispetto al 2012 (ISMEA, 2014). Dunque, nonostante il pesce sia una delle componenti fondamentali della “dieta mediterranea” e il nostro Paese sia circondato dal mare, l'Italia ha una forte carenza di prodotti ittici, per cui si trova costretta ad importarne grandi quantità, che risultano essere approssimativamente il 50% della quantità consumata. Sulle nostre tavole, infatti, solo tre piatti a base di pesce su dieci sono di origine italiana. Infatti, secondo una recente indagine (Confcommercio Milano, 2014), l'Italia importa quattro volte più di quello che esporta: a fronte di 963 milioni di import sono 206 milioni le esportazioni di pesce. La maggior parte dei prodotti della pesca consumati sulle tavole degli italiani proviene da Grecia, Spagna e Francia, per un valore economico pari a oltre 150 milioni di euro (elaborazione EuroFishMarket su dati Istat 2008, 2009, 2010).

1.3 PROBLEMATICHE DEL SETTORE ITTICO

Numerose sono le problematiche che affliggono il comparto ittico. Infatti, le differenze che caratterizzano i diversi organismi (pesci, crostacei e molluschi), così come le peculiarità degli ambienti vita possono influenzare la loro conservabilità e pregiudicarne la salubrità. Inoltre, alcuni organismi possono produrre o accumulare tossine pericolose per l'uomo. Infine, l'aumento spregiudicato delle catture accompagnato da una drastica riduzione degli

stock selvatici della maggior parte delle specie di interesse commerciale, pregiudicano il commercio leale, favorendo le frodi e creando, inoltre, forti ripercussioni a livello ambientale.

1.3.1 Problematiche sanitarie

Le principali problematiche che interessano i prodotti ittici a livello igienico-sanitario sono legate alla presenza di microrganismi, tossine o composti nocivi per la salute umana. Per quanto riguarda la contaminazione microbica dei prodotti ittici, generalmente, la microflora presente nei prodotti ittici freschi rispecchia quella delle acque da cui essi provengono (Jay *et al.*, 2005). La flora microbica del pesce si può facilmente ritrovare nello strato mucoso esterno, nelle branchie e nell'intestino dei pesci d'allevamento. I pesci che vivono in acque dolci o calde presentano una popolazione microbica composta da un maggior numero di batteri gram positivi mesofili rispetto ai pesci che vivono in acque marine fredde, che, invece, presentano una microflora costituita soprattutto da batteri gram negativi (Jay *et al.*, 2005). È noto che, in condizioni normali, i prodotti ittici ospitano sulla cute e nelle branchie una flora microbica autoctona di tipo saprofita, particolarmente variegata, appartenente ai generi *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*, tipici componenti della flora batterica delle acque marine. Dal punto di vista sanitario essi non rappresentano una fonte di rischio a trasmissione alimentare, mentre agiscono da invasori secondari nella decomposizione precoce *post-mortem* del prodotto (Ceres, 2012). Per quanto riguarda l'induzione di patologie nell'uomo, alcune specie di *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Staphylococcus* sono state, in diverse occasioni, segnalate come responsabili; sono, poi, ampiamente documentati casi di gastroenteriti da *Vibrionaceae*, specialmente dopo il consumo, senza cottura, di pesci provenienti da mari caldi. Anche le contaminazioni del pesce da parte di spore botuliniche, provenienti dall'acqua o dai sedimenti fangosi, non sono un evento raro ed un piccolo numero di clostridi produttori di tossine botuliniche può albergare nell'intestino dei pesci (Shewan *et al.*, 2009). Rare enteriti umane sono, infine, dovute a *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides* (Sartory *et al.*, 2002). Sostanzialmente, però, il principale pericolo è legato alla presenza di *Lysteria monocytogenes*. Infatti, secondo i dati del report EFSA, nel 2010, 11 Paesi Membri hanno trasmesso dati sulla presenza di *Lysteria monocytogenes* in prodotti della pesca “*ready to eat*”, soprattutto pesce affumicato. I microrganismi, comunque, derivano anche dai processi di trasformazione che il prodotto stesso subisce. In generale, i prodotti ittici surgelati presentano una carica microbica più

bassa rispetto ai corrispondenti prodotti freschi (Nichols *et al.*, 2000). La presenza di determinati microrganismi è, a sua volta, determinante per la formazione di istamina, un composto azotato che appartiene alla famiglia delle ammine biogene ed ha un importante ruolo nel sistema immunitario dell'uomo. Nei prodotti della pesca origina proprio dall'attività di alcuni batteri – solitamente si tratta di gram negativi - che producono l'enzima istidina decarbossilasi che reagisce con l'amminoacido istidina, particolarmente presente in alcune specie di pesci. La decarbossilazione dell'istidina ad istamina avviene subito dopo il decesso dell'animale ed è un processo molto rapido che porta all'accumulo di grandi quantità di istamina. La rapidità con cui decorre tale processo è significativo perché, in tempi così brevi, non riescono a verificarsi i processi putrefattivi più evidenti dal punto di vista organolettico che renderebbero immangiabile il pesce (cattivo odore, perdita di consistenza dei tessuti, ecc..). Il pericolo per il consumatore che ingerisce alimenti con elevate quantità di istamina è la cosiddetta “sindrome sgombroide”. I sintomi possono essere: nausea, diarrea, vomito, rossore, prurito, cefalea e, nei casi più gravi, shock e collasso del sistema cardiovascolare. Le maggiori concentrazioni di istidina libera sono state riscontrate nel tessuto muscolare di alcune specie ittiche a carne rossa, quali tonno, sgombro, sardine ed aringhe (Alini *et al.*, 2006). Per quanto, invece, riguarda le specie ittiche a carne bianca, anche in questo caso si può riscontrare la presenza di istamina, ma le cause sono principalmente dovute a fattori ambientali, come un'imperfetta conservazione protratta per lunghi periodi di tempo (Alini *et al.*, 2006). Un ulteriore grave problema che affligge l'ambiente marino e, di conseguenza il settore ittico, è legato alla presenza delle biotossine algali. Nell'ultimo decennio, è stato registrato un aumento della contaminazione delle acque da parte di alghe potenzialmente tossiche (Ade *et al.*, 2007). La maggior parte delle tossine sono prodotte da alghe marine (fitoplancton) assunte direttamente dai prodotti della pesca che diventano, a loro volta, vettori di tossine per l'uomo. Sono note oltre 4000 specie di alghe marine, delle quali 70-80 producono tossine (Poletti *et al.*, 2003). Di norma la presenza di queste alghe è praticamente invisibile, ma quando queste raggiungono concentrazioni elevate danno luogo al fenomeno della “marea rossa”, essendo una parte di tali alghe di colore rosso bruno (Cattaneo e Bernardi, 2008). Tuttavia, anche in assenza di maree visibili, si possono avere molluschi con concentrazioni di tossine pericolose per l'uomo. Sono proprio i molluschi gli organismi a preoccupare maggiormente, poiché essendo filtratori sono in grado di trattenere tutte le particelle con dimensioni comprese tra 2 e 90 μm (Smith *et al.*, 1996). Le principali sindromi provocate da tali tossine sono:

- DSP (diarrhetic shellfish poisoning): causata da tossine prodotte da dinoflagellati dei generi *Dinophysis* e *Prorocentrum*. La patologia provoca gravi e prolungati disturbi gastrointestinali, quindi una profusa diarrea accompagnata da nausea e dolori addominali. I sintomi compaiono da 30 minuti ad alcune ore dopo l'ingestione di molluschi contaminati. E' l'unica intossicazione abbastanza comune in Italia. Le tossine responsabili della DSP sono resistenti alla cottura e comprendono l'acido okadaico e le corrispettive tossine associate dinofisitossine, yessotossine e pectenotossine. Si stima che la dose per produrre fenomeni diarroici negli adulti sia pari circa a 40 µg per l'acido okadaico e 35 µg per le dinofisitossine (Scoging, 1998).
- NSP (neurotoxic shellfish poisoning): sindrome di tipo neurotossico legata alle fioriture del dinoflagellato *Ptychodiscus brevis*. Il rischio per l'uomo deriva dall'ingestione di molluschi contaminati e dall'inalazione di aerosol contenente cellule o loro frammenti, in prossimità di aree interessate dalle fioriture. I principali sintomi sono: sensazione di paralisi alla bocca e alle dita, atassia, rallentamento del battito cardiaco, sensazione di caldo e freddo e lieve diarrea. La guarigione avviene in pochi giorni (Miguez *et al*, 1996);
- ASP (amnesic shellfish poisoning): la tossina responsabile di questa sindrome è risultata essere l'acido domoico, un amminoacido neurotossico relativamente raro, in grado di agire sui recettori dell'acido glutammico, uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale. Questa sindrome rappresenta attualmente anche per l'Italia un problema sanitario. Infatti, anche se nei mari del nostro Paese si registra l'assenza di acido domoico nei molluschi bivalvi non è tuttavia escluso il rischio che molluschi contaminati provenienti da altri Paesi provochino intossicazioni in Italia. I principali sintomi possono verificarsi dopo circa 24 ore dall'ingestione e comprendono nausea, vomito e diarrea. Dopo 48 ore dall'ingestione possono verificarsi confusione, perdita della memoria e disorientamento (Viviani *et al*, 1995);
- ciguatera: è un'intossicazione tipica delle regioni costiere tropicali e subtropicali, particolarmente dei Caraibi e delle isole del Pacifico. E' causata dall'ingestione di una grande varietà di pesci delle barriere coralline che contengono tossine accumulate lungo la catena alimentare. La ciguatossina è una tossina molto potente, la sua azione principale è quella di aumentare la permeabilità al sodio delle

membrane eccitabili, causandone le depolarizzazione. La ciguatera si presenta come una sindrome acuta, con vomito, diarrea, dolori addominali, disturbi neurologici, e, in alcuni casi, bradicardia o tachicardia (Bagnis, 1993);

- sindrome da palitossina: provocato da una tossina che agisce provocando citolisi, in seguito all'inibizione della pompa sodio – potassio. I sintomi sono di natura gastrointestinale, ma, spesso, si verificano spasmi muscolari, tachicardia, dispnea ed anemia emolitica (Fusetani *et al*, 1985);
- sindrome da azaspiracido: provocata da una tossina liposolubile, prodotta probabilmente da Dinoflagellate. E' in grado di causare danni al fegato, pancreas, timo, tessuti linfatici e tratto digestivo (Satake *et al*, 2001).

Il Regolamento CE 853/2004 fissa i limiti relativi a tali tossine e, in particolare, ha stabilito:

- PSP: 800 µg/Kg;
- ASP: 20 mg/Kg di acido domoico;
- acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 µg di equivalente acido okadaico/kg;
- yessotossine: 1 mg di equivalente yessotossine/Kg;
- azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/Kg.

Da sottolineare anche l'importanza rivestita dalla presenza nell'ecosistema marino di specie ittiche tossiche. Le principali appartengono alle famiglie dei Tetraodontidae, Diodontidae, Cantigasteridae, Molidae, Gempylidae. Il Regolamento CE 853/2004, infatti, sottolinea che non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi delle suddette famiglie. Questi pesci interessano l'aspetto sanitario per quanto riguarda il settore ittico, perché sono in grado di produrre la tetradotossina, una neurotossina molto più potente del cianuro. Questa tossina è in grado di bloccare la conduzione nervosa, provocando paralisi, vomito, diarrea, convulsioni e blocco cardiorespiratorio (Cariello e Chiretti, 2001). Inoltre, sempre il Regolamento CE 853/2004 contempla la famiglia Gempylidae, stabilendo che possono essere immessi sul mercato solo sottoforma di prodotti confezionati o imballati e devono essere opportunamente etichettati al fine di informare i consumatori sulle modalità di preparazione o cottura e sul rischio connesso alla presenza di sostanze con effetti gastrointestinali nocivi. I pesci appartenenti a questa famiglia producono la gempilotossina, una miscela di esteri di acidi grassi saturi. I sintomi della sindrome provocata da questa tossina sono di natura gastrointestinale e si manifestano

mediamente dopo 2 o 3 ore dall'ingestione. Le persone intossicate presentano diarrea, nausea, mal di testa, vomito (Mori *et al*, 1966). E' una tossina per cui non sono previsti limiti di tolleranza, ma la FDA raccomanda di evitare il consumo di questi pesci (*Ruvettus pretiosus* e *Lepidocybium flaavobrunneum*). Infine, i prodotti ittici presentano altri fattori di rischio, collegati essenzialmente alla presenza di:

- metalli pesanti: i principali sono mercurio, piombo, arsenico, cadmio, rame e zinco. Tali elementi vanno ad agire con meccanismi ed effetti diversi: il piombo provoca un disturbo della secrezione dell'ormone luteinizzante, il cadmio altera la funzione riproduttiva. Per quanto, invece, riguarda l'arsenico è noto che i principali effetti nocivi che si associano alla sua ingestione a lungo termine sono lesioni cutanee, tumori, effetti tossici sullo sviluppo, neurotossicità, malattie cardiovascolari, anormale metabolismo del glucosio e diabete. Inoltre, il cadmio cancerogeno può indurre disfunzioni renali, ossee e riproduttive (Adams *et al*, 2000). Nei prodotti ittici, inoltre, possiamo ritrovare il metilmercurio, che è la forma principale di mercurio presente nei pesci e nei frutti di mare. Sostanzialmente, nell'acqua il mercurio inorganico si trasforma, attraverso l'azione dei microrganismi, nella forma organica più tossica, il metilmercurio, che si accumula nei tessuti. Questo composto è particolarmente tossico per il sistema nervoso in fase di sviluppo ed è, inoltre, in grado di attraversare la placenta, comportando dunque seri rischi per lo sviluppo fetale. Anche il mercurio inorganico può essere presente nel pesce e nei frutti di mare, ma risulta meno tossico rispetto al metilmercurio (Adams e Moss, 2000). Sono state, dunque, fissate dosi settimanali tollerabili (TWI), che corrispondono a 4µg/Kg di peso corporeo, per quanto riguarda il mercurio inorganico, e a 1,3µg/Kg di peso corporeo per quanto riguarda il metilmercurio (EFSA, 2012).
- composti alogenati persistenti (PCBs, diossine): questi composti sono inquinanti industriali molto diffusi e persistenti nell'ambiente. In particolare, i policlorobifenili (PCBs) sono composti chimici sintetizzati attraverso la clorurazione diretta del difenile, mentre le diossine sono composti chimici aromatici policlorurati. Entrambi i composti, comunque, sono altamente tossici e sono in grado di provocare innumerevoli disturbi sia all'uomo che all'ambiente. Infatti, tali sostanze possono essere responsabili di processi patologici a carico di diversi organi ed apparati tra cui la cute, il sistema immunitario, il sistema riproduttivo, il sistema endocrino e quello nervoso. Inoltre, è certo che l'esposizione alle diossine predisponga fortemente le cellule alla trasformazione neoplastica (Adams e Moss, 2000).

1.3.2. Problematiche commerciali

Un ulteriore importante problema che colpisce, ormai da tempo, il settore ittico è rappresentato dalle frodi. Possiamo distinguere sostanzialmente le frodi alimentari in due gruppi: frodi di tipo sanitario e frodi di tipo commerciale. Rientrano nella prima categoria tutte le azioni intenzionate a rendere nocivo un alimento. In particolare, è accusato di frode sanitaria *"chiunque detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo, acque, sostanze o cose da altri avvelenate, adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica"*. (artt. 442 e 444 del Codice Penale). Alcuni esempi di frodi sanitarie sono la vendita o la somministrazione di pesci velenosi, il cattivo stato di conservazione, l'utilizzo di additivi non ammessi dalla normativa vigente, o, se ammessi, utilizzati in quantità superiori ai limiti consentiti, importazione di prodotti ittici soggetti a divieti sanitari, ecc.. Le frodi commerciali comprendono, invece, tutte le azioni che ledono i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore (Busato, 2010). Tali frodi si verificano quando *"chiunque, nell'esercizio di un'attività commerciale, ovvero in uno spaccio aperto al pubblico, consegna all'acquirente una cosa mobile per un'altra, ovvero una cosa mobile, per origine, provenienza, qualità o quantità, diversa da quella dichiarata o pattuita..."* (art. 515 del Codice Penale); in questo caso, dunque, non vi è alterazione della qualità dell'alimento tale da renderlo nocivo per la salute del consumatore, ma un illecito profitto a danno del consumatore a causa di false dichiarazioni circa la quantità o la provenienza. Le principali frodi commerciali sono la sostituzione di una specie pregiata con un'altra simile, ma di minor valore economico, vendita di prodotti scongelati per freschi e la vendita di prodotti di allevamento per prodotti pescati. In Italia, nel periodo di tempo febbraio 2013 – febbraio 2014, le frodi nella pesca si sono moltiplicate di oltre cinque volte, il valore dei sequestri dei prodotti ittici effettuati è infatti aumentato del 454% corrispondente all'importo record di 31,6 milioni di euro nel 2014 (Coldiretti Impresapesca, 2015). I prodotti ittici trasformati risultano tra i prodotti alimentari maggiormente colpiti da frodi perché la lavorazione del prodotto comporta la perdita delle componenti anatomiche e, quindi, l'impossibilità di identificare le specie ittiche utilizzate sulla base delle caratteristiche morfologiche (Busato, 2010). Le modifiche anatomiche, per esempio, rendono particolarmente difficile la distinzione tra due filetti di specie simili per colore e forma; per queste ragioni la sostituzione di specie è difficile da individuare anche per occhi esperti. Le porzioni pronte per il consumo sono soggette alla perdita dell'integrità anatomica o preparate utilizzando miscugli di diverse specie non sempre identificabili in modo chiaro (Perezani, 2007). La mancanza di aspetti anatomici e morfologici utili al

riconoscimento costringe al ricorso di metodiche di laboratorio per risalire alla specie di origine del prodotto esaminato (Linden, 1996). Una delle specie maggiormente sostituite, per esempio, è il Pollock d'Alaska (*Theragra chalcogramma*), le cui riserve risultano sfruttate e impoverite, da qui la necessità di utilizzare specie diverse nella preparazione di prodotti ittici trasformati, come il surimi (Keskin e Atar, 2012). Questa situazione, unita all'aumento dei prezzi dei prodotti ittici, ha portato ad un conseguente aumento del numero delle frodi, che sfruttano la sostituzione di una specie con altre dal minor valore economico (An *et al.*, 1988; Pepe *et al.*, 2007). Uno degli steps più importanti nel controllo della qualità del cibo, quindi, è diventata l'identificazione della specie di pesce utilizzata nel prodotto stesso. Studi effettuati sull'identificazione di specie nei prodotti ittici trasformati hanno rivelato, infatti, un'elevata percentuale di non corrispondenza tra la specie dichiarata in etichetta e quella effettivamente presente, a conferma, ancora una volta, che le frodi sostitutive sono tra le principali che colpiscono il mercato ittico. In un recente studio (Keskin e Atar, 2012), per esempio, sono stati analizzati campioni di surimi provenienti da Cina, Francia, Malesia, Tailandia, Turchia e Vietnam ed acquistati presso tre diverse città della Turchia. Tutti i prodotti dichiaravano in etichetta la presenza di una sola specie, "*Theragra chalcogramma*". L'analisi molecolare ha permesso di verificare che la percentuale di sostituzioni fraudolente di specie è stata pari all'86% e questo rappresenta un dato molto significativo. In un precedente studio, (Pepe *et al.*, 2007), sono stati analizzati 19 campioni di surimi, acquistati a Napoli, le cui etichette riportavano la sola presenza, ancora una volta, di "*Theragra chalcogramma*". In questo caso, l'84.2% dei prodotti analizzati erano costituiti da specie diverse da quella dichiarata in etichetta. Un ulteriore aspetto molto importante per quanto riguarda le frodi commerciali nel settore ittico è rappresentato dalla rapida crescita della comunità cinese, che ha un ruolo cruciale sul futuro del mercato globale: per quanto riguarda l'Italia, per esempio, è stato registrato un aumento dei prodotti importati dall'Asia, dove la legislazione in materia di sicurezza alimentare è spesso carente e lontana dai modelli presenti nella comunità occidentale. Un recente studio, infatti, ha analizzato prodotti ittici provenienti dalla comunità cinese di Prato, con l'intento di verificare se fosse effettivamente rispettata la legislazione europea a proposito di tracciabilità ed etichettatura. Questo studio ha dimostrato come l'83% di questi prodotti presentasse un'etichetta non conforme alla legislazione europea o comunque non corrispondente alle reali caratteristiche del prodotto (D'amico *et al.*, 2014).

1.3.3 Problematiche ecologiche

Un altro problema collegato al comparto ittico è sicuramente rappresentato dalla cosiddetta pesca intensiva: il 90% degli stock ittici mondiali è già pienamente o eccessivamente sfruttato e proprio questa è una delle più gravi minacce all'equilibrio degli ecosistemi marini. Questo sfruttamento comporta risvolti negativi anche per quanto riguarda l'industria ittica, che, negli ultimi decenni ha visto rallentare e, a volte, diminuire la quantità di pesce catturato in mare (FAO, 2014). La FAO stima che la percentuale di pesce pescato a livelli non sostenibili sia passata dal 10% al 29% del totale negli ultimi quarant'anni. Il problema della pesca intensiva sta raggiungendo livelli preoccupanti, tanto da far passare in secondo piano i danni ambientali legati all'inquinamento generato da flotte di pescherecci motorizzati che utilizzano carburanti altamente inquinanti. La pesca è in grado di danneggiare gli ecosistemi non solo quando è eccessiva, ma anche quando è condotta con sistemi distruttivi. Molte tecniche di pesca sono tutt'altro che selettive: oltre alla specie bersaglio, vengono catturati – e poi gettati in mare morti o morenti – molte altre specie ed esemplari giovani della stessa specie bersaglio. La cattura accidentale di mammiferi, uccelli marini, tartarughe, squali e di molte altre specie è ancora uno dei principali problemi in molte zone del mondo. L'acquacoltura stessa può rappresentare un ulteriore problema riguardante il settore ittico: infatti, gli allevamenti di pesci, molluschi e crostacei possono danneggiare gli ecosistemi con cui entrano in contatto attraverso vari canali. Le acque che escono dagli allevamenti contengono scarti, deiezioni e sostanze chimiche che vengono dispersi nell'ambiente, danneggiandolo. Un altro grave problema è quello della pesca pirata: dagli oceani al mar Mediterraneo, la pesca illegale, non dichiarata e non regolamentata sta flagellando l'ecosistema marino e comporta un impatto negativo sulle condizioni di vita, sulle economie locali e sull'approvvigionamento dei prodotti. Tale pratica provoca il depauperamento degli stock ittici, distrugge gli habitat marini, crea distorsioni nella concorrenza, pone in una condizione di svantaggio i pescatori onesti e indebolisce le comunità costiere, soprattutto nei paesi in via di sviluppo (FAO, 2013). Tra le forme più diffuse e dannose di pesca illegale ci sono la pesca pratica senza licenza, la pesca in aree vietate o in periodi vietati, la cattura diretta o indiretta di specie protette come delfini, squali e tartarughe marine, l'utilizzo di attrezzature vietate e la pesca di organismi sottotaglia. Anche in Italia la pesca illegale, non dichiarata e non regolamentata rappresenta un punto critico e nel 2011 il Paese si è trovato inserito, per la seconda volta consecutiva, nella lista nera della “*National Oceanic and Atmospheric Administration*” (FAO, 2013).

CAPITOLO 2. I PRODOTTI TRASFORMATI

2.1 CONSUMO DI PRODOTTI ITTICI TRASFORMATI

Se, da una parte, l'aumento del consumo dei prodotti ittici è stato favorito da un miglioramento della qualità e della freschezza dei prodotti a livello di commercializzazione, oltre che dalla convinzione che le carni dei prodotti ittici siano più magre e digeribili rispetto alle carni di consumo tradizionale, dall'altra è importante sottolineare come il pesce fresco, specialmente a partire dal 2013, sia diventato un lusso a cui in molti hanno dovuto rinunciare completamente (FAO, 2014). Infatti, il perdurare della crisi economica, che ha costretto le famiglie a tagliare sui consumi alimentari con evidenti ricadute anche sulla qualità dei prodotti acquistati, coinvolge a pieno titolo i prodotti ittici. E' stato evidenziato, infatti, un calo del 5% su base annua degli acquisti domestici dei prodotti ittici freschi, accompagnato anche da una riduzione di oltre il 6% del numero dei nuclei familiari acquirenti (Ismea Gfk-Eurisko, 2013). Infatti, il consumatore si sta indirizzando sempre di più verso i cibi pronti, a causa della pressante necessità di accorciare i tempi di preparazione dei pasti (Giaccone, 2006). I cambiamenti nello stile di vita e nelle abitudini alimentari dei consumatori hanno fatto registrare un aumento della domanda per i prodotti porzionati ed, in particolare, per i filetti ed i tranci, molto spesso venduti attraverso il canale dei supermercati o degli ipermercati sotto forma di vassoi preconfezionati (Unites States Department of Agriculture, USDA 2006). Il pesce intero, quindi, non è più il prodotto "finito" destinato ad essere venduto direttamente, ma, nella maggioranza dei casi, sta diventando una materia prima o un semilavorato che, dopo la cattura viene inviato ad un'industria per essere trasformato. Secondo i dati Istat elaborati da Ismea, la produzione industriale, la lavorazione e la conservazione di pesci, crostacei e molluschi ha mostrato, nella media del periodo gennaio – agosto 2014, un aumento del 2,4% rispetto al corrispondente periodo del 2013. Tra i prodotti trasformati, il tonno in scatola rimane in assoluto il principale prodotto esportato, con un aumento del 20,6% dei volumi inviati oltrefrontiera rispetto al periodo gennaio – luglio 2013 (in particolare verso la Grecia e la Germania). Si segnalano, inoltre, in netto incremento le forniture di filetti di trote refrigerati e del caviale. I primi otto mesi del 2014 hanno ulteriormente confermato la crescita del consumo dei prodotti ittici trasformati, in particolar modo di quelli surgelati. La domanda di conserve e semiconserve registra una crescita inferiore al 2%, mentre gli acquisti di secco, salato e affumicato segnano un incremento superiore al 12%. E' stato,

inoltre, registrato un aumento della tendenza all'acquisto di prodotti ittici pastellati e panati (nel 2011 +1,6% rispetto al 2010). Questo aumento è facilmente spiegabile se pensiamo alle condizioni di praticità di tali prodotti (pronti al consumo, non necessitano di operazioni preliminari quali eviscerazione, spinatura ecc.). Un'indagine condotta dal Centro Studi Sprim (2015) ha messo in evidenza come prodotti ittici trasformati come le conserve di pesce abbiano una qualità nutrizionale analoga a quella del pesce fresco e, nello stesso tempo, possono costare fino al 40% in meno rispetto ai pesci freschi maggiormente consumati. La Cina è il leader mondiale nell'esportazione di prodotti ittici e questo primato è, in parte, basato sulla successiva trasformazione di prodotti importati. Un recente studio ha, infatti, evidenziato come il 90% dei prodotti esportati dall'America verso la Cina siano stati, a loro volta, riesportati in altri Paesi. E' interessante notare come, spesso, tali prodotti venissero riesportati nuovamente verso l'America, dopo essere stati processati (Sánchez *et al.*, 2008). La problematica principale di questa grande esportazione è l'assenza di denominazioni specifiche delle specie presenti in questi prodotti esportati. Tutto ciò crea problemi nell'identificazione e tracciabilità dei prodotti ittici importati in Cina e processati per poi essere riesportati. Per esempio, per quanto riguarda il Pollock d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) sappiamo che questo prodotto viene catturato e congelato in Russia, esportato in Cina, dove viene scongelato, processato e nuovamente congelato. Successivamente, viene riesportato in Europa e in America (Pramod *et al.*, 2014). Uno dei prodotti ittici trasformati che si è rapidamente diffuso in tutto il mondo è sicuramente il surimi.

2.2 COSA SONO I PRODOTTI ITTICI TRASFORMATI?

I cosiddetti “*prodotti trasformati*” vengono definiti dal Regolamento (CE) n.852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio come “*prodotti alimentari ottenuti dalla trasformazione di prodotti non trasformati. Tali prodotti possono contenere ingredienti necessari alla loro lavorazione o per conferire loro caratteristiche specifiche*”. In particolare, il Regolamento (CE) n. 853/2004 definisce i “*prodotti della pesca trasformati*” come quei “*prodotti trasformati risultanti dalla trasformazione di prodotti della pesca o dell'ulteriore trasformazione di detti prodotti trasformati*”. Quindi, sostanzialmente, i prodotti ittici trasformati sono quei prodotti della pesca che hanno subito uno o più procedimenti chimici o chimico-fisici quali salagione, essiccazione, affumicamento, marinatura, cottura, che si applicano a prodotti refrigerati o congelati. Questi prodotti hanno una durata di conservazione compresa tra i 2 ed i 6 mesi, a seconda del prodotto. In

generale i prodotti ittici trasformati possono derivare da pesci interi eviscerati, da filetti interi, da parti muscolari ridotte in pezzi o da altri visceri (gonadi per esempio). Le principali tecniche utilizzate nella trasformazione dei prodotti ittici sono:

- salagione: viene effettuata con soluzione salina, salamoia o sale marino, che svolge un'azione disidratante sui tessuti. Prodotti tipicamente italiani sono le sardine sotto sale o le alici, che vengono vendute in barili di legno disponendo uno strato di pesce e uno di sale, dal fondo sino alla cima del barile (Arcangeli *et al*, 2002);
- essiccazione: è una tecnica molto importante a livello industriale, specialmente per quanto riguarda la produzione dello stoccafisso, in cui il merluzzo, dopo le preliminari operazioni di eviscerazione, lavaggio, decapitazione e salagione, viene posto ad essiccare in moderni essiccatoi ad aria forzata fredda o calda per circa 2-3 mesi (Giuffrida *et al*, 2004);
- affumicamento: è una tecnica che spesso viene associata alla salagione ed all'essiccazione. E' un trattamento che prolunga la vita commerciale dell'alimento, conferendogli particolari gusti ed aromi. Sostanzialmente, consiste nel contatto tra il prodotto e il fumo di legna (caldo 80-100°C o freddo 25-30°C). In particolare, nel settore ittico per la produzione del fumo si impiegano piante che alla combustione producono fumo con scarsi componenti aromatici, per non influenzare la delicatezza delle carni (Arcangeli e Bicchieri, 2002);
- marinatura: è un trattamento che prevede una prima fase di precottura seguita da una fase di conservazione, dopo salatura, in aceto, in contenitori di legno, di vetro o in scatole sterilizzate. I principali prodotti marinati sono specie marine che vivono in acque salmastre come le anguille, le aringhe, le lamprede, i latterini e gli sgombri (Arcangeli e Bicchieri, 2002);
- cottura: questo trattamento ha l'obiettivo di determinare una parziale perdita di acqua, rassodare il tessuto muscolare ed eliminare buona parte del grasso. Inoltre, comporta una perdita di peso di circa il 25% (Di Matteo, 2008). Sostanzialmente esistono due tipi di cottura: a vapore o in acqua. Negli ultimi anni si sta sempre più diffondendo, all'interno degli stabilimenti di trasformazione, la cottura a vapore poiché presenta una serie di vantaggi: provoca un'iniziale coagulazione esterna delle proteine e minore perdita di nutrienti; permette un asciugamento e un successivo raffreddamento in 12 – 18 ore; conferisce una maggiore consistenza al prodotto; permette l'allontanamento, per condensazione, di ammine e solfuri e,

infine, consente una riduzione degli eventuali tempi di maturazione. La cottura in acqua, invece, determina una riduzione della compattezza del tessuto muscolare, comporta un asciugamento prolungato (oltre 24 ore) e una maggiore perdita di proteine e vitamine (Arcangeli *et al.*, 2003).

Nella categoria dei prodotti ittici trasformati rientrano anche le semiconserve e le conserve ittiche. Quest'ultime sono i prodotti alimentari conservati, la cui conservazione viene ottenuta con l'impiego combinato delle due seguenti tecniche: chiusura in contenitori ermetici ai liquidi, ai gas, ai microrganismi nelle normali condizioni d'impiego e di immagazzinamento e trattamento termico, od altro trattamento autorizzato, in grado di inattivare in modo irreversibile gli enzimi e di uccidere i microrganismi che possono alterare l'alimento o renderlo comunque non adatto all'alimentazione umana. Si tratta di prodotti sterili. Le semiconserve, invece, sono prodotti alimentari conservati la cui stabilità, oltre che dalla natura del prodotto e dal processo di conservazione adottato, è limitata dalle condizioni ambientali, a meno che non si faccia ricorso a particolari accorgimenti, basse temperature di immagazzinamento e mantenimento in atmosfere più o meno controllate (compresa la chiusura in recipienti). La principale differenza rispetto alle conserve è rappresentata dal fatto che quest'ultime, completamente isolate dall'ambiente esterno, sono sterili, cioè non contengono per qualsiasi motivo ed a qualsiasi titolo microrganismi, con le loro eventuali spore, nocivi alla salute dell'uomo. Per garantirne la conservabilità i principali mezzi naturali, soli od associati, per la preparazione di semiconserve sono rappresentati dalla temperatura, dal sale, dal fumo e dall'aceto con i quali si preparano prodotti come gli essiccati, i salati e gli affumicati per la cui produzione l'uomo, fino dai primordi della sua storia, ha fatto uso dei mezzi fornitigli dalla natura. Con il nascere dell'arte vasaria si sono aggiunti i marinati. A differenza dunque della conserva, che per definizione è un prodotto microbiologicamente sterile la cui conservabilità non è influenzata dall'ambiente esterno, invece la semiconserva necessita per rimanere stabile di almeno uno o più dei seguenti fattori: temperatura, salinità, attività dell'acqua, affumicatura, pH, additivi vari, i cui valori e combinazioni varieranno a seconda del prodotto alimentare utilizzato come materia prima. Tra i prodotti trasformati, si ritrovano i così detti "*convenience foods*" e si distinguono, a loro volta, in "*ready to eat*", quindi pronti per il consumo, e "*ready to cook*", cioè pronti per la cottura. Per quanto riguarda i prodotti della pesca, in questa categoria di alimenti di nuova generazione rientrano il surimi, le chele di granchio impanate, i filetti, i bocconcini, le crocchette, le insalate di mare precotte ecc..

Dal punto di vista igienico – sanitario i prodotti ittici trasformati vengono classificati in base al rischio (Huss et al, 1996) nel seguente modo:

- prodotti pronti al consumo (*ready to eat*), con $\text{pH} > 5$ e $a_w > 0,925$;
- prodotti *ready to eat* con $\text{pH} < 5$ o $a_w < 0,925$;
- prodotti appartenenti alla prima categoria e per i quali è previsto un trattamento di cottura e/o pastorizzazione;
- prodotti *ready to eat* per i quali è previsto un trattamento di sterilizzazione;
- prodotti *ready to eat* con $\text{pH} < 5$ e $a_w < 0,925$;
- prodotti pre-cotti, variamente salati e/o acidificati, consumati previa cottura.

A tal proposito, il Regolamento (CE) 2073 del 2005 definisce gli “*alimenti pronti*” come quei “*prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti*”.

CAPITOLO 3. IL SURIMI

3.1 COS'È IL SURIMI?

Il surimi è un prodotto costituito da un impasto crudo di polpa di pesce, che si ottiene dalla lavorazione del tessuto muscolare di varie specie ittiche. In particolare, secondo la definizione giuridica è una “preparazione a base di proteine muscolari di pesce” (Morena *et al*, 2010). A livello tecnologico il surimi fa parte dei “prodotti ricostituiti a base di carne”, proprio perché è ottenuto dal tessuto muscolare dei pesci. Il surimi è stato prodotto per la prima volta in Giappone più di mille anni fa, infatti si ritrova menzionato per la prima volta in un documento del 1115, che corrisponde al periodo Heian (790 – 1180) in Giappone (Aveni e Rana, 2006). Proprio dai giapponesi veniva utilizzato in varie pietanze della cucina tradizionale e, in particolare, veniva preparato tritando alcune specie di pesce al fine di ottenere un impasto che subiva, solo in un secondo momento, vari lavaggi con acqua. In tal modo si otteneva un residuo costituito da proteine miofibrillari insolubili, capaci di riorganizzarsi, dopo denaturazione per riscaldamento, in strutture reticolari di consistenza gelatinosa. Infatti, il tessuto muscolare dei pesci è costituito da fibre muscolari chiare e fibre muscolari scure (più ricche di lipidi e mioglobina) localizzate nelle regioni periferiche del corpo, in quantità diverse da specie a specie. Fra le proteine del muscolo, che si dividono in proteine miofibrillari, connettivali e sarcoplasmatiche, le più importanti per la produzione del surimi sono proprio le miofibrillari, per la loro capacità di organizzarsi in strutture ordinate (Civera *et al*, 1990). Solitamente, per la produzione del surimi è preferibile utilizzare pesci con un maggior contenuto di tessuto muscolare chiaro, poiché quelli con tessuto muscolare scuro presentano un elevato contenuto di lipidi facilmente ossidabili, che favoriscono il successivo decadimento della qualità del prodotto finito (Aveni e Rana, 2006). Inizialmente, essendo un prodotto facilmente deperibile, il surimi veniva prodotto quotidianamente, in funzione del pescato disponibile. Solo nel 1959, un gruppo di ricercatori giapponesi della Hokkaido Fisheries Research Station, scoprì accidentalmente una tecnica che permetteva di conservare il surimi più a lungo e, da quel momento, il consumo di surimi e dei suoi derivati si è diffuso in tutto il mondo (Sánchez *et al*, 2009). La specie più utilizzata per la preparazione del surimi è il merluzzo dell'Alaska (*Theragra chalcogramma*), una risorsa ittica abbondante, con carni dalle buone caratteristiche nutrizionali. In questi ultimi anni, però, la diminuzione del pescato e il conseguente aumento del prezzo sul mercato, hanno indotto i produttori di surimi ad

utilizzare altre specie, meno costose e di qualità inferiore, come nemipteri (*Nemipterus spp.*), merluzzi (*Merluccius spp.*), suri (*Trachurus spp.*), melù (*Micromesistius spp.*), pesce lucertola (*Saurida spp.*), *Priacanthus spp.*, naselli (*Macruronus spp.*), sgombri (*Pleurogrammus spp.*), sardine (*Sardina spp.*). Non solo pesci, ma anche cefalopodi come il calamaro gigante (*Dosidicus gigas*), vengono attualmente utilizzati nella produzione di surimi ed i produttori stanno valutando la possibilità di utilizzare specie di pesce allevato nella produzione del surimi (Vidal-Giraud e Chateau, 2007) (Tabella 1).

3.2 COME VIENE PRODOTTO IL SURIMI

Il processo produttivo del surimi e delle preparazioni alimentari a base di surimi, descritto nella Circolare Ministeriale numero 17 del 10/07/1989, può essere distinto in due diverse fasi: la prima si svolge generalmente sulle navi officina, la seconda a terra. L'operazione preliminare è la selezione del pescato: infatti, è indispensabile partire da una materia prima di buona qualità, fresca o conservata a 0°C per non più di 5 giorni. Inoltre, le specie catturate non devono trovarsi nella stagione riproduttiva, perché risultano più ricche di lipidi. Tale selezione viene eseguita manualmente su rulli trasportatori e, successivamente, viene fatto un primo lavaggio, per rimuovere fango, sabbia e detriti. La prima e vera propria fase della produzione del surimi comprende diversi stadi di preparazione. Qualora venga utilizzato pesce intero, questo, dopo accurata selezione, viene lavato, decapitato, eviscerato, eventualmente ridotto in filetti, tritato e lavato in acqua dolce a forte pressione. Il tessuto muscolare viene, poi, fatto passare attraverso rulli forati, che consentono la fuoriuscita delle parti molli, mentre le parti dure vengono eliminate. A questo punto, la pasta ottenuta viene nuovamente lavata con acqua dolce al fine di allontanare sangue, pigmenti, parte delle proteine solubili, dei grassi e del tessuto connettivo. Solitamente, sono necessari tre cicli di lavaggio, ognuno con una durata di circa 20 minuti. Successivamente, si procede con la rimozione dell'acqua in eccesso tramite filtrazione. Si ottiene così un semilavorato di consistenza pastosa, bianco, privo di sapore, povero di grassi (0,1% circa) e ricco di proteine (8-15%). All'impasto sono aggiunti crioprotettori (polifosfati, zuccheri e sale) per migliorare la conservazione alle temperature di congelamento/surgelazione a cui sarà sottoposto: tali composti, infatti, permettono la formazione controllata di cristalli di ghiaccio nella fase di congelamento e sono in grado di inibire le reazioni enzimatiche di decomposizione delle molecole organiche. I crioprotettori maggiormente utilizzati sono zuccheri, come il sorbitolo, o in alternativa, le maltodestrine o il trealosio, per il loro minimo potere dolcificante, e l'enzima transglutaminasi, che

migliora l'elasticità dell'impasto (Aveni e Rana, 2006; Civera *et al*, 1990; Morena *et al*, 2010). La seconda fase del processo inizia con l'arrivo del prodotto nello stabilimento di trasformazione, dove viene sottoposto al controllo della temperatura e delle caratteristiche organolettiche, microbiologiche e chimiche per la ricerca di eventuali composti nocivi o non autorizzati. Si procede quindi all'aggiunta di sostanze diverse (Morena *et al*, 2010), ognuna delle quali ha diverse finalità tecnologiche:

- la fecola di patate (amido) agisce come stabilizzante, in quanto migliora la conservabilità alle basse temperature, oltre ad assorbire l'umidità nelle fasi di produzione;
- l'albume d'uovo conferisce un colore più chiaro ed un aspetto lucido;
- i grassi vegetali favoriscono una tessitura compatta e migliorano la stabilità durante la cottura e le fasi di congelamento/scongelo;
- il sale, oltre a migliorare la conservazione, conferisce sapidità all'alimento che è piuttosto insapore (possono, infatti, essere aggiunti degli esaltatori della sapidità, come il glutammato);
- gli aromi sono addizionati per conferire il gusto, essendo il surimi insapore. La scelta dell'aroma varia in base al tipo di preparazione; tra i più utilizzati ci sono quello di granchio e di aragosta;
- i coloranti conferiscono la tipica colorazione arancione o rossa e solitamente si impiega la paprika non speziata.

A questo punto la pasta viene congelata a -30°C , in pani generalmente di 10 Kg, che possono poi essere modellati tramite un processo di estrusione in fogli che verranno tagliati successivamente in porzioni più piccole. Queste saranno successivamente cotte, sagomate nella forma desiderata (es. coda di aragosta, gamberetti, ecc...) e quindi confezionate sottovuoto. Dopo il confezionamento, è previsto un trattamento di pastorizzazione. Il processo di lavorazione descritto presenta delle varianti (soprattutto negli step finali) in base alla tipologia di preparazione gastronomica che viene prodotta.

3.3 PREPARATI ALIMENTARI A BASE DI SURIMI

Le preparazioni alimentari a base di surimi, secondo quanto previsto dalla Circolare Ministeriale numero 17 del 10/07/1989, sono rappresentate da "prodotti finiti, cotti o sterilizzati, pronti per il consumo, derivanti dalla miscelazione di pasta di pesce tritata (nella quantità di circa 60-65%) con altri ingredienti alimentari quali, ad esempio, amido di

patate, albume d'uovo, sale, zucchero, estratto di granchio/gambero, glutammato monosodico, paprika, ecc. e acqua (20-25%)". Generalmente, il surimi ed i suoi derivati si ritrovano in commercio sottoforma di cilindri, costituiti da più sfoglie di polpa di pesce, di colore arancione e bianco, anche se è possibile ritrovare prodotti a base di surimi di tipologia molto variabile. Mentre in Giappone il surimi viene consumato anche fresco, nel resto del mondo rappresenta una materia prima per l'industria di trasformazione e viene quindi impiegato per ottenere una vasta gamma di prodotti, anche molto differenti tra loro (Aveni e Rana, 2006). La pasta di surimi più compatta si presta alla realizzazione di preparati che imitano forma e sapore di crostacei più o meno pregiati, come aragosta, gambero o granchio. Alla fine degli anni 80 del secolo scorso, grazie alle sue proprietà addensanti, il surimi fu proposto come componente per la preparazione industriale di alimenti a base di carne (hamburger, polpette) in sostituzione dei più costosi composti leganti usati tradizionalmente (amido, carragenina, cellulosa ecc.). Infatti, era stato ipotizzato di ottenere, mediante trattamento con cloruro di sodio e bicarbonato di sodio, una pasta viscosa che, dopo ulteriori trattamenti, poteva essere utilizzata per sostituire fino al 60-70% della carne in hamburger, polpette e polpettoni (Aveni e Rana, 2006). Tuttavia, queste prospettive commerciali non si sono realizzate, per cui attualmente il surimi viene utilizzato soltanto per le preparazioni alimentari a base di pesce. Oltre agli impieghi citati che sono i più comuni, il surimi viene anche utilizzato per produrre alimenti analoghi al prosciutto di pesce e salumi, torte di pesce, impanati di vario tipo; può essere mescolato con il formaggio, con tonno, salmone e perfino impiegato per la produzione di snack. Questo dimostra le ottime qualità tecnologiche e la grande flessibilità di impiego di questa tipologia di alimento che, infatti, attrae sempre di più l'industria alimentare. Ciò è dimostrato anche dalla continua introduzione sul mercato di nuovi prodotti e ricette a base di surimi così come avvenuto negli ultimi anni. I preparati a base di surimi sono generalmente commercializzati refrigerati o surgelati, ma si prestano anche ad altre modalità di conservazione come la marinatura, la salamoia, l'atmosfera protettiva. La produzione industriale dei derivati del surimi prevedono un iniziale parziale scongelamento del blocco di surimi, che viene successivamente sminuzzato e miscelato a vari ingredienti ed estruso. Infine, dopo l'aggiunta del colorante, si ha la modellatura della pasta ed il prodotto viene cotto a vapore alla temperatura di 80°C e confezionato (Civera *et al.*, 1990).

3.4 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL SURIMI

Il surimi non rappresenta un alimento particolarmente pregiato, ma ha delle caratteristiche nutrizionali interessanti, sia per quanto riguarda la componente proteica che lipidica. Presenta infatti un'elevata percentuale di proteine (può arrivare al 15%) che costituisce anche una fonte di amminoacidi essenziali ed è caratterizzato da una bassa quantità di lipidi, rappresentati prevalentemente da acidi grassi polinsaturi (benefici per l'organismo) (Morena *et al*, 2010). Vitamine e sali minerali, invece, sono poco presenti, a causa dei numerosi lavaggi cui il prodotto è sottoposto durante il processo produttivo. Inoltre, per quanto riguarda la composizione amminoacidica, il surimi risulta particolarmente ricco di leucina, lisina, arginina, acido aspartico e glutammico (Civera *et al*, 1990). Rispetto al surimi, i derivati hanno generalmente un minore contenuto proteico ed una maggiore quantità di grassi e carboidrati, dovuta agli ingredienti aggiunti ed al tipo di conservazione (sott'olio, sott'aceto, ecc..).

3.5 IL MERCATO DEL SURIMI

La produzione e il consumo del surimi e dei suoi derivati rappresentano ancora un fenomeno tipico dei Paesi asiatici (Giappone, Thailandia e Repubblica di Corea), seguiti dagli USA. Tuttavia, negli ultimi anni, l'Europa si sta distinguendo soprattutto nell'industria della trasformazione di questo prodotto. A dimostrazione di ciò l'importazione del surimi semilavorato in Europa ha subito un incremento notevole. Dalle 20.546 tonnellate del 1999 si è passati alle 44.892 tonnellate del 2006 (+118,4 %) (FAO, 2007). I mercati di approvvigionamento principali sono rappresentati dagli USA, dal Cile e dai Paesi asiatici. Tra i maggiori importatori europei ci sono la Francia (con 14.494 tonnellate nel 2006), la Lituania (7.012) e la Spagna (10.408) (Morena *et al*, 2010) . Ciò è dovuto al fatto che in tali Paesi sono presenti la maggior parte degli stabilimenti europei specializzati nella trasformazione del semilavorato nel prodotto finito, il quale viene poi ceduto sul mercato comunitario. È interessante sottolineare che, per essere concorrenziali con i prodotti asiatici (che vantano un prezzo al dettaglio più basso), i produttori europei cercano di sviluppare sempre nuovi tipi di preparazioni gastronomiche per attirare i consumatori. Per quanto riguarda l'importazione del prodotto finito, in Europa si è assistito nel corso degli anni ad un progressivo aumento fino a toccare le 75.400 tonnellate del 2006 (rispetto alle 55.240 del 1999) (Morena *et al*, 2010). I maggiori importatori comunitari sono Spagna (16.000 tonnellate nel 2006), Francia (12.253) e Italia (10.600), con un aumento rispetto al 1999 degli ultimi due paesi, rispettivamente del +139 % e +50%. La

Spagna ha avuto un calo evidente (-22%), dovuto probabilmente ad un incremento della produzione interna, come dimostra un notevole aumento delle importazioni del prodotto semilavorato (+358% dal 1999). I tre Stati citati sono anche quelli dove si ha una maggior richiesta di prodotti a base di surimi: stime del 2006 attribuiscono ai Paesi EU un consumo di 132.200 tonnellate, con picchi appunto in Francia (52.200), Spagna (40.000) e Italia (11.000) (Vidal-Giraud e Chateau, 2007).

La richiesta è tale che, per soddisfarla, anche Paesi che hanno una produzione interna consistente (come Spagna e Francia) devono acquistare prodotti di origine asiatica. Per quanto riguarda le specie maggiormente utilizzate nella produzione di surimi, sappiamo che nel 2004 la produzione mondiale di surimi è stata di 600.00 tonnellate circa, impiegando principalmente come materia prima il merluzzo dell'Alaska (*Theragra chalcogramma*) per il 35-50% del totale, i nemipteri (*Nemipterus spp*) per il 25% e per la restante parte lo sgombro di Atka (*Pleurogrammus azonus*), i melù (*Micromesistius spp.*), i merluzzi (*Merluccius spp*) (Marsh, 2005). Attualmente l'Europa è leader mondiale nella trasformazione (60.000 tonnellate nel 2002) del surimi, con una decina di società produttrici o importatrici che dominano il mercato (Aveni e Rana, 2006). Per quanto riguarda l'Italia, la produzione di alimenti a base di surimi è iniziata nel 1991, grazie ad un contratto tra una società italiana ed una coreana (Zalke, 2005). La produzione italiana di derivati del surimi è rimasta costante negli ultimi anni, attestandosi intorno a 3500-4000 tonnellate, mentre le importazioni sono aumentate significativamente passando da circa 4.500 tonnellate nel 1996 a quasi 10.000 nel 2004, di cui il 30% come surimi ed il restante 70% come derivati (Clement, 2003). Le esportazioni italiane, invece, sono rimaste costanti a partire dal 1998 e dirette principalmente verso la Francia, il Belgio e la Germania (Aveni e Rana, 2006).

3.6 SURIMI: PROBLEMATICHE IGIENICO SANITARIE E COMMERCIALI

Il consumo di surimi, anche crudo, non presenta un significativo rischio microbiologico per la salute del consumatore in quanto durante la lavorazione viene sottoposto a cottura e dopo il confezionamento viene pastorizzato. Pertanto la presenza di eventuali parassiti o batteri prima di quest'ultimo trattamento non costituisce, di norma, un rischio elevato. Il surimi o le preparazioni a base di surimi possono diventare prodotti dannosi quando sono preparati con conservanti ed altri additivi non autorizzati o impiegati in concentrazioni superiori a quelle previste dalla normativa. Solitamente, comunque, il surimi ed i prodotti derivati presentano una qualità igienica abbastanza soddisfacente, proprio per i trattamenti

che il prodotto subisce. Perciò, è possibile considerare il surimi un alimento a basso rischio microbiologico. Diverse fonti bibliografiche affermano, comunque, che la flora dominante per il surimi e per i derivati è costituito da batteri Gram positivi, in particolare bacilli e micrococchi, la cui presenza non è correlabile, nella maggior parte dei casi, a problemi igienico-sanitari. Per quanto riguarda la qualità sanitaria del surimi e dei suoi derivati, deve essere considerata la possibile presenza di parassiti e di *Clostridium botulinum*, oltre alla presenza di contaminanti involontari (metalli pesanti, pesticidi, PCBs) o volontari (additivi e coloranti non consentiti) (Adams e Moss, 2000). Da non trascurare, infine, le frodi di cui il consumatore potrebbe cadere vittima. Quelle più frequenti sul surimi messe in luce dai controlli riguardano: aggiunta di olio di semi al posto di olio di oliva, utilizzo di aceto di vino sofisticato con acido acetico, impiego di materie prime non idonee, aggiunta di anidride solforosa (Aveni e Rana, 2006). Alcuni lavori scientifici hanno inoltre evidenziato l'utilizzo di specie (solitamente meno pregiate) diverse da quelle indicate in etichetta (Tabella 2).

Ciò, oltre a rappresentare una frode commerciale, implica problematiche sanitarie, soprattutto quando pesci e/o cefalopodi, entrambi annoverati fra gli allergeni che devono essere obbligatoriamente dichiarati dal Regolamento 1169/2011, non sono riportati in etichetta. Per approfondimenti si veda il capitolo 4 e 5.

CAPITOLO 4. SICUREZZA ALIMENTARE E NORMATIVA COMUNITARIA

Le frequenti frodi e gli episodi di crisi che si sono verificati negli ultimi anni in campo alimentare (BSE, diossine, residui, ecc..) hanno spinto l'Unione Europea a perfezionare il sistema normativo che riguarda la sicurezza alimentare. Attualmente, infatti, si parla di un sistema "*from farm to fork*", quindi in grado di garantire la sicurezza e tutte le informazioni necessarie al consumatore, lungo l'intero percorso di filiera. E' con il "Libro Verde sulla sicurezza alimentare" che la Commissione Europea mette in evidenza le carenze nella concezione ed applicazione della regolamentazione alimentare ed è proprio tale comunicazione a far nascere, nel 2000, il "Libro Bianco sulla sicurezza alimentare". Con questo documento ufficiale la Commissione Europea inizia a proporre un insieme di misure atte a rendere la sicurezza alimentare più coordinata ed omogenea. Tale provvedimento comunitario, infatti, nasce sia per garantire la sicurezza alimentare e tutelare i consumatori, ma propone anche una maggior comprensione e adattabilità della legislazione in campo alimentare. Tra le varie misure proposte dal Libro Bianco, le principali sono sicuramente:

- la creazione di un'Autorità alimentare autonoma, incaricata di elaborare pareri scientifici indipendenti su tutti gli aspetti che riguardano la sicurezza alimentare;
- la creazione di un campo giuridico in grado di coprire tutti i punti del percorso del prodotto alimentare, dal campo alla tavola;
- l'istituzione di sistemi di controllo armonizzati a livello nazionale;
- la creazione di un dialogo tra il consumatore e le autorità competenti.

Questi obiettivi si sono poi concretizzati con il Regolamento (CE) n.178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, che stabilisce i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare, volti ad assicurare la qualità degli alimenti destinati al consumo umano e dei mangimi ed a garantire la libera circolazione di alimenti sani e sicuri nel mercato interno. La legislazione alimentare dell'Unione europea (UE) protegge, inoltre, i consumatori dalle pratiche commerciali fraudolente o ingannevoli e mira a proteggere la salute e il benessere degli animali, la salute delle piante e l'ambiente. Tra le principali novità apportate da questo Regolamento troviamo sicuramente la creazione di un'Autorità europea per la sicurezza alimentare, la nascita di un sistema di allarme rapido per gli alimenti e per i mangimi (RASFF) e l'introduzione di un sistema di analisi del rischio. Il

punto più innovativo e significativo, però, è quello di prendere in considerazione l'intero percorso del prodotto alimentare, in modo da garantirne la sicurezza in tutti i punti della filiera alimentare. Il Regolamento CE n.178/2002 cita, infatti, come campo di applicazione *“tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e dei mangimi prodotti per animali destinati alla produzione alimentare”* (Art. 4.3). Questa definizione è molto significativa e sottolinea l'importanza di considerare l'intero percorso del prodotto alimentare.

4.1 RINTRACCIABILITÀ

Il Regolamento 178/2002 istituisce e rende obbligatorio il concetto di rintracciabilità di mangimi ed alimenti, definendolo come *“la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione”* (articolo 18). Tale Regolamento estende la rintracciabilità a tutti i prodotti alimentari ed ai mangimi. L'importanza della rintracciabilità è facilmente comprensibile, se pensiamo che ogni qualvolta si verifichi un'anomalia di un prodotto o una non conformità, proprio grazie alla rintracciabilità sarà possibile isolare immediatamente l'intera partita. Sostanzialmente, quindi, l'operatore del settore alimentare (OSA) deve essere in grado di identificare e rintracciare i suoi fornitori e clienti e deve dotarsi di strumenti che gli permettano di fornire tutte le informazioni necessarie per un eventuale ritiro dal mercato. Sempre a proposito di rintracciabilità, è necessario sottolineare come anche la direttiva UE 2011/91 del 13 Dicembre 2011 si occupi di questo argomento. Infatti, tale documento definisce l'obbligo di riportare in etichetta il lotto di appartenenza. Si tratta, sostanzialmente, di un codice alfanumerico designato dal produttore o dal confezionatore, che ne sono i diretti responsabili. Il numero di lotto è molto importante perché consente la rintracciabilità di una specifica partita di alimenti.

4.2 ANALISI DEL RISCHIO

Un altro punto significativo ed essenziale introdotto dal Regolamento 178/2002 è *“l'analisi del rischio”*. L'articolo 6 di tale Regolamento sottolinea proprio come la legislazione alimentare debba basarsi su tale principio. L'analisi del rischio è un processo che si fonda su prove scientifiche disponibili e comprende tre fasi:

1. **valutazione del rischio:** è una valutazione scientifica dei potenziali effetti nocivi

per la salute che risultano dall'esposizione del consumatore a pericoli trasmessi da un certo alimento. E' una fase che fa perno su elementi scientifici a disposizione e deve essere svolta in maniera indipendente, obiettiva e trasparente.

Questo processo è, a sua volta, diviso nelle seguenti fasi:

Individuazione del pericolo: ha lo scopo di stabilire in modo quantitativo la presenza e la natura di tale pericolo;

- Caratterizzazione del pericolo: è una valutazione qualitativa o quantitativa degli effetti avversi che possono essere ricondotti all'esposizione del rischio;
 - Valutazione dell'esposizione: è la valutazione qualitativa o quantitativa della probabilità di assunzione alimentare della fonte potenziale di rischio;
 - Caratterizzazione del rischio: è il processo che determina la stima quantitativa o qualitativa, tenendo conto dell'incertezza stimata, o la probabilità dell'evenienza e la severità del noto o potenziale effetto avverso sulla salute entro una certa popolazione, basandosi sulle precedenti fasi;
2. **gestione del rischio:** è il processo che consiste nell'esaminare alternative d'intervento, consultando le parti interessate, tenendo conto della valutazione del rischio e di altri fattori pertinenti e, se necessario, compiendo adeguate scelte di prevenzione e di controllo. Questa fase tiene conto dei risultati della valutazione del rischio, dei pareri dell'EFSA e del principio di precauzione;
 3. **comunicazione del rischio:** è lo scambio interattivo, nell'intero arco del processo di analisi del rischio, di informazioni e pareri riguardanti gli elementi di pericolo ed i rischi, i fattori connessi al rischio e la percezione del rischio, tra i responsabili della valutazione del rischio, i responsabili della gestione del rischio, i consumatori, le imprese alimentari e del settore dei mangimi, la comunità accademica ed altri soggetti interessati, come i media.

4.3 PACCHETTO IGIENE

Successivamente al Regolamento 178/2002, è nato il Pacchetto Igiene, un efficace strumento normativo, che completa il quadro giuridico in termini di sicurezza alimentare, precisando e introducendo requisiti igienico-sanitari e implementando il sistema dei controlli ufficiali sugli alimenti e sui mangimi. E' costituito essenzialmente da quattro Regolamenti:

- **Regolamento (CE) n 852/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29

aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari: riguarda tutti gli alimenti, promuove un approccio integrato "dal campo alla tavola" ed interessa tutti i livelli di produzione primaria, trasformazione, distribuzione. Assegna la responsabilità primaria dell'igiene degli alimenti agli operatori del settore alimentare; impone l'applicazione di procedure di gestione dei pericoli basata sui principi HACCP; esclude dal campo di applicazione la fornitura diretta di piccoli quantitativi di prodotti dal produttore al consumatore finale o a dettaglianti locali; introduce il principio di sussidiarietà; garantisce la flessibilità; prevede la possibilità che vengano fissati criteri di microrganismi e di temperature; prevede l'attribuzione di un numero di registrazione o di riconoscimento da parte delle Autorità competenti a tutti gli impianti che trattano gli alimenti (rintracciabilità); estende l'autocontrollo alla produzione primaria (non basato sull'HACCP);

- **Regolamento (CE) n 853/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale: promuove una legislazione unitaria per tutti i prodotti di origine animale. Si applica agli alimenti di origine animale non trasformati e trasformati, mentre non si applica ai prodotti composti. Esclude dal campo di applicazione la vendita al dettaglio, la fornitura di piccoli quantitativi di prodotti primari dal produttore al consumatore finale o a dettaglianti locali. E' un Regolamento importante perché porta ad una semplificazione spinta delle regole: scompaiono le deroghe per gli stabilimenti a limitata capacità produttiva e si ha l'introduzione di riconoscimenti per gli stabilimenti che trattano alimenti di origine animale, per i quali sono previsti requisiti subordinati alla verifica da parte delle Autorità competenti. Introduce norme specifiche per carni fresche di ungulati, pollame, lagomorfi e selvaggina, carne macinata, preparazioni di carne, prodotti a base di carne, molluschi bivalvi vivi e prodotti della pesca, latte crudo e prodotti a base di latte, uova e ovoprodotti, cosce di rana e lumache, grassi fusi, ciccioli, stomaci, vesciche e intestini, gelatine e collagene;
- **Regolamento 854/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano: sottolinea come l'esecuzione dei controlli ufficiali lasci impregiudicata la responsabilità legale, in via principale, degli operatori del settore alimentare per la sicurezza dei prodotti alimentari. Inoltre, stabilisce i criteri e le responsabilità per il riconoscimento degli

stabilimenti e per la conduzione dei controlli ufficiali sui prodotti alimentari di origine animale. I controlli ufficiali consistono in audit su “*good manufacturing process*” e HACCP. Sono previsti controlli specifici per carni fresche, molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte crudo;

- **Regolamento 882/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali destinati a verificare la conformità della normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali: costituisce un Regolamento quadro che definisce i criteri sulla cui base i singoli Stati membri devono organizzare i controlli ufficiali, senza fissare i criteri specifici, infatti non sono previsti allegati tecnici. Definisce gli obiettivi dei controlli ufficiali che devono verificare la conformità alle norme volte a prevenire, eliminare o ridurre a livelli accettabili i rischi per gli essere umani e gli animali o garantire pratiche commerciali leali. Interessa tutti gli alimenti per l'uomo e gli animali, nonché le norme in tema di benessere animale. Dispone norme per i laboratori accreditati secondo le norme ISO EN IEC 17025; fissa i principi per la predisposizione dei piani di emergenza di cui al Regolamento 178/2002; stabilisce i criteri per l'effettuazione dei controlli ufficiali sull'introduzione dei mangimi e degli alimenti provenienti dai Paesi terzi. Stabilisce, inoltre, i principi generali per il finanziamento dei controlli ufficiali.

Il Pacchetto Igiene è stato successivamente integrato con l'aggiunta di altri Regolamenti e direttive, di cui i principali sono le direttive 2002/99, 2004/41 e 2006/88 ed i Regolamenti 183/2005, 2073/2005, 2074/2005, 2075/2005, 2076/2005.

4.4 ETICHETTATURA

Il sistema dell'etichettatura rappresenta sicuramente un punto fondamentale per quanto riguarda la sicurezza alimentare. L'obiettivo, infatti, è quello di fornire al consumatore tutte le informazioni che riguardano un prodotto alimentare, garantendo la trasparenza e la chiarezza. L'etichettatura degli alimenti è stata disciplinata per la prima volta dalla Direttiva 79/112 CEE e negli anni successivi sono state apportate numerose modifiche, principalmente attraverso le Direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE, recepite in Italia attraverso il Decreto Legislativo 109/1992. Proprio tale Decreto definisce il termine “etichettatura” come un “*insieme delle menzioni, delle indicazioni, dei marchi di fabbrica o di commercio, delle immagini o dei simboli che si riferiscono al prodotto alimentare e che figurano direttamente sull'imballaggio o su un'etichetta appostavi o sul dispositivo di*

*chiusura o su carrelli, anelli o fascette legati al prodotto medesimo o, in mancanza, in conformità a quanto stabilito negli artt. 14, 16 e 17, sui documenti di accompagnamento del prodotto alimentare ”. La direttiva 79/112 CEE, è stata abrogata dalla Direttiva 2000/13 CE, che, fino a Dicembre 2011, ha rappresentato la normativa comunitaria di riferimento. La maggiore svolta, a proposito dell’etichettatura, si è verificata sicuramente con l’entrata in vigore, dal 13 Dicembre 2011, del Regolamento 1169, che stabilisce nuove regole per l’etichettatura degli alimenti ed armonizza i principi sull’informazione al consumatore. E’ costituito da 55 articoli, che forniscono indicazioni sul modo in cui va costruita un’etichetta e 15 allegati, che riguardano l’educazione alimentare. Tra le novità più interessanti introdotte dal Regolamento 1169 del 2011 troviamo sicuramente l’estensione del campo di applicazione a tutti i prodotti destinati al consumatore finale, compresi quelli che vengono preparati da ristoranti, mense e catering o venduti a distanza. Inoltre, assegna la responsabilità delle informazioni sugli alimenti “*all’operatore con cui il nome o con cui la ragione sociale è commercializzato il prodotto*” (articolo 8). L’articolo 9, invece, fornisce una serie di informazioni da dichiarare obbligatoriamente in etichetta, distinguendo tra i prodotti preimballati e non preimballati. Per quanto riguarda la prima categoria di prodotti, le informazioni da riportare obbligatoriamente in etichetta sono:*

- denominazione dell’alimento: comprende o è accompagnata da un’indicazione dello stato fisico nel quale si trova il prodotto o dello specifico trattamento che esso ha subito, nel caso in cui l’omissione di tale informazione potrebbe indurre in errore l’acquirente;
- elenco degli ingredienti: comprende tutti gli ingredienti dell’alimento, in ordine decrescente di peso, così come registrati al momento del loro uso nella fabbricazione dell’alimento. Gli ingredienti possono essere designati con la loro denominazione specifica oppure con la denominazione di categoria;
- qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico che provochi allergie o intolleranze usato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito: in questo caso, la denominazione della sostanza in causa deve essere evidenziata attraverso un tipo di carattere chiaramente distinto dagli altri ingredienti elencati. Inoltre, l’allegato 2 del Regolamento 1169 presenta una lista dei principali prodotti in grado di causare allergia o intolleranza: cereali contenenti glutine, crostacei, uova, pesce, arachidi, soia, latte, frutta a guscio, molluschi e tutti i prodotti a base dei suddetti ingredienti;

- la quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti: è espressa in percentuale e corrisponde alla quantità dell'ingrediente o degli ingredienti al momento della loro utilizzazione o nel prodotto finito;
- la quantità netta dell'alimento: è espressa utilizzando, a seconda dei casi, il litro, il centilitro, il millilitro, il chilogrammo o il grammo;
- il termine minimo di conservazione o la data di scadenza: il termine minimo di conservazione (TMC) è la data fino alla quale il prodotto alimentare conserva le sue proprietà specifiche in adeguate condizioni di conservazione. Viene sostituito dalla data di scadenza quando l'alimento in questione è particolarmente deperibile dal punto di vista microbiologico;
- le condizioni particolari di conservazione e/o le condizioni d'impiego: devono essere indicate per garantire una conservazione o un uso adeguato del prodotto alimentare;
- il nome o la ragione sociale e l'indirizzo dell'operatore del settore alimentare responsabile dell'etichettatura: il Regolamento 1169 non obbliga l'operatore a riportare la sede dello stabilimento di produzione e/o confezionamento;
- il Paese d'origine o il luogo di provenienza ove previsto: questa indicazione è obbligatoria se l'omissione di tale indicazione possa indurre in errore il consumatore in merito al Paese d'origine o al luogo di provenienza reali dell'alimento, in particolare se le informazioni che accompagnano l'alimento o contenute nell'etichetta nel loro insieme potrebbero altrimenti far pensare che l'alimento abbia un differente Paese d'origine o luogo di provenienza;
- le istruzioni per l'uso, per i casi in cui la loro omissione renderebbe difficile un uso adeguato dell'alimento: sono le informazioni necessarie al consumatore per preparare correttamente il prodotto alimentare in questione, quando quest'ultimo richieda passaggi aggiuntivi prima di essere consumato;
- dichiarazione nutrizionale: sarà obbligatoria a partire da Dicembre 2016. Prevede la dichiarazione obbligatoria di alcuni valori, quali valore energetico, grassi, acidi grassi saturi, carboidrati, proteine, zuccheri e sale, mentre acidi grassi monoinsaturi/polinsaturi, polioli, amido, fibre, sali minerali e vitamine sono considerati valori integrativi.

Per quanto, invece, riguarda i prodotti non preimballati, l'articolo 44 del Regolamento 1169/2011 sostiene che essi devono riportare obbligatoriamente in etichetta qualsiasi

ingrediente o coadiuvante tecnologico (elencato nell'allegato II o derivato da una sostanza o un prodotto elencato in detto allegato) che provochi allergie o intolleranze usato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito.

Per tutte le altre indicazioni, spetta agli Stati membri definire quali informazioni debbano essere menzionate obbligatoriamente.

Dunque, sostanzialmente, le principali novità introdotte dal Regolamento 1169/2011 sono:

- dimensioni minime prestabilite per i caratteri dell'etichetta;
- estensione dell'indicazione d'origine alle carni fresche, refrigerate e congelate suine, ovine, caprine e di pollame;
- un alimento congelato o surgelato venduto scongelato deve riportare sull'etichetta la parola "decongelato";
- la data di scadenza deve essere riportata su ogni singola porzione (imballaggi singoli) che compongono il prodotto multipack;
- evidenziazione degli allergeni con accorgimenti grafici specifici (spessore, colore, ecc.);
- la carne, le preparazioni a base di carne e i prodotti ittici surgelati o congelati non lavorati, devono indicare la data del congelamento (gg/mm/aa);
- gli alimenti confezionati devono avere una dichiarazione nutrizionale.

4.5 ETICHETTATURA DEI PRODOTTI DELLA PESCA

Per quanto riguarda l'etichettatura dei prodotti della pesca, alle indicazioni proposte dal Regolamento 1169/2011 si integrano alcune normative verticali, che, quindi, sono valide esclusivamente per questo tipo di prodotti. Le principali sono:

- **Regolamento CE 1224/2009:** istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca;
- **Regolamento CE 404/2011:** reca le modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1224/2009 del Consiglio che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca;
- **Regolamento UE 1379/2013:** è relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, recante modifica ai regolamenti (CE) n. 1184/2006 e (CE) n. 1224/2009 del Consiglio e che abroga il regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio. E' entrato in vigore dal 13 dicembre 2014;
- **Regolamento CE 1420/2013:** dal 13/12/2014 ha abrogato il Reg CE 2065/2001.

Per quanto riguarda i prodotti della pesca confezionati sul luogo di vendita, secondo il Regolamento 1379/2013 è obbligatorio dichiarare:

- la denominazione commerciale della specie e il suo nome scientifico: ogni Stato membro ha una lista di denominazioni con le quali i prodotti della pesca sono autorizzati ad essere commercializzati sul proprio territorio;
- il metodo di produzione: è necessario indicare se si tratta di un prodotto pescato in acque dolci o salate o se è allevato;
- la zona di cattura/ Paese di allevamento: è necessario indicare la zona FAO di cattura, a cui corrisponde una zona geografica;
- la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci: sciabiche, reti da traino, reti da imbrocco e reti analoghe, reti da circuizione e reti da raccolta, ami e palangari, draghe, nasse e trappole;
- se il prodotto è scongelato;
- il termine minimo di conservazione, se appropriato.

A questi Regolamenti, si affianca il Decreto Legislativo 109/92, che impone la dichiarazione della denominazione dell'alimento, gli ingredienti, la modalità di conservazione e la percentuale di glassatura.

Per quanto, invece, riguarda i prodotti preimballati, secondo il Regolamento 1379 del 2013 è obbligatorio dichiarare:

- la denominazione commerciale della specie ed il suo nome scientifico;
- il metodo di produzione;
- la zona in cui il prodotto è stato catturato o allevato e la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci;
- se il prodotto è scongelato;
- il termine minimo di conservazione.

Inoltre, soltanto per i prodotti della pesca preimballati è obbligatorio riportare in etichetta tutte le indicazioni previste dall'articolo 9 dell'1169/2011, mentre sia i prodotti della pesca preimballati che non preimballati devono obbligatoriamente riportare in etichetta l'eventuale presenza di sostanze allergizzanti.

Inoltre, il Regolamento 1379/2013 impone, per i prodotti della pesca destinati al consumatore finale ma commercializzati in una fase precedente alla vendita, l'indicazione, sull'imballaggio della partita o sui documenti di accompagnamento, di:

- numero di identificazione di ogni partita (lotto);

- numero di identificazione esterno e nome del peschereccio o nome dell'unità di produzione in acquacoltura;
- codice FAO alfa 3 di ogni specie;
- data raccolta/produzione/congelamento;
- quantitativi di ciascuna specie in chilo grammi di peso netto o, se del caso, numero di individui;
 - nome e indirizzo dei fornitori;
 - informazioni ai consumatori previste all'art. 35 del Reg.(CE) n. 1379/2013: denominazione commerciale, denominazione scientifica, pertinente zona geografica e metodo di produzione, termine minimo di conservazione se appropriato, se scongelato.

4.6 ETICHETTATURA DEL SURIMI E DELLE PREPARAZIONI A BASE DI SURIMI

L'etichettatura diventa uno strumento ancora più importante quando abbiamo a che fare con i prodotti trasformati, poiché contengono, spesso, una grande varietà di ingredienti molto diversi tra loro. Il capo IV del Regolamento 1379/2013 ha stabilito le norme sull'informazione dei consumatori, applicate dal 13 Dicembre 2014. In particolare, l'articolo 35 prevede che, fatto salvo il Regolamento (UE) n. 1169/2011, i seguenti prodotti della pesca e dell'acquacoltura:

- a) pesci vivi; pesci freschi o refrigerati, pesci congelati, filetti di pesce ed altra carne di pesci (anche tritata), freschi, refrigerati o congelati;
- b) pesci secchi, salati o in salamoia; pesci affumicati, anche cotti prima o durante l'affumicatura; farine, polveri e agglomerati in forma di pellets di pesce, atti all'alimentazione umana;
- c) crostacei, anche sgusciati, vivi, freschi, refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; crostacei non sgusciati, cotti in acqua o al vapore, anche refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia; farine, polveri e agglomerati in forma di pellets di crostacei, atti all'alimentazione umana;
- d) alghe;

indipendentemente dall'origine e dal loro metodo di commercializzazione, possono essere offerti per la vendita al consumatore finale o a una collettività solo a condizione che un contrassegno o un'etichettatura adeguati indichino:

- a) la denominazione commerciale della specie e il suo nome scientifico;

- b) il metodo di produzione, in particolare mediante i termini "...pescato..." o "...pescato in acque dolci..." o "...allevato...";
- c) la zona in cui il prodotto è stato catturato o allevato e la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci;
- d) se il prodotto è stato scongelato;
- e) il termine minimo di conservazione, se appropriato.

Inoltre, il requisito di cui alla lettera d) non si applica:

- a) agli ingredienti presenti nel prodotto finito;
- b) agli alimenti per i quali il congelamento costituisce una fase tecnologicamente necessaria del processo di produzione;
- c) ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura precedentemente congelati per ragioni di sicurezza sanitaria, conformemente all'allegato III, sezione VIII, del regolamento (CE) n. 853/2004;
- d) ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura che sono stati scongelati prima di essere sottoposti ad affumicatura, salatura, cottura, marinatura, essiccazione o ad una combinazione di uno di questi processi.

E' interessante notare come queste diciture siano obbligatorie per quanto riguarda l'etichetta dei pani congelati di surimi, che raggiungeranno successivamente i produttori delle preparazioni a base di surimi, ma non sono obbligatorie nelle etichette dei prodotti a base di surimi che ritroviamo comunemente al supermercato. Tali prodotti, infatti, sottostanno, come tutti i prodotti alimentari, al Regolamento 1169 del 2011. In particolare, tale Regolamento si occupa dei prodotti della pesca trasformati con l'allegato VI, specificando che *“i prodotti e le preparazioni a base di carne nonché i prodotti della pesca che possono sembrare costituiti da un unico pezzo di carne o di pesce ma che in realtà sono frutto dell'unione di diverse parti attuata grazie ad altri ingredienti tra cui additivi ed enzimi alimentari oppure mediante sistemi diversi, recano l'indicazione di seguito illustrata: «carne ricomposta» e «pesce ricomposto»”*.

E' necessario sottolineare che, prima che entrasse in vigore il Regolamento 1169 del 2011, l'allegato I del decreto legislativo n.109/1992 prevedeva che qualora il pesce fosse un ingrediente di un altro prodotto alimentare la cui denominazione non richiamasse una precisa specie, era possibile indicarlo genericamente, nell'elenco degli ingredienti, con il termine "pesce": è il caso del surimi, ottenuto da diverse specie di pesce. Nell'etichettatura di questo prodotto, infatti, non era obbligatoria l'indicazione percentuale della quantità di pesce utilizzato, dato che il prodotto finito ne è essenzialmente costituito; la percentuale

era necessaria, invece, per il surimi impiegato come ingrediente composto in un'altra preparazione nella cui etichetta fosse evidenziato (es.: “a base di surimi” o “con surimi”), quantificando anche la specie di pesce qualora questa fosse indicata (Circolare 31 Marzo 2000, n.165).

CAPITOLO 5. ALLERGENI PRESENTI NEI PRODOTTI ITTICI

Nonostante il pesce venga consumato dall'uomo da tempo immemorabile e sia ormai dimostrato che rappresenti una risorsa nutrizionale di grande importanza, soprattutto dal punto di vista proteico, è necessario sottolineare come costituisca anche il terzo più frequente allergene, dopo uovo e latte vaccino, in gran parte d'Europa (Dello Iacono *et al.*, 2010). Sono proprio alcune delle proteine presenti nei prodotti ittici ad agire da potenti allergizzanti, in grado di scatenare anche gravi shock anafilattici (Asher *et al.*, 2006).

5.1 DEFINIZIONE DI ALLERGIA E SINTOMI PRINCIPALI

L'allergia alimentare è una forma specifica di intolleranza ad alimenti o a componenti alimentari che attiva il sistema immunitario (Andrè, 2004). Un allergene (proteina presente nell'alimento, che nella maggior parte delle persone è del tutto innocua) innesca una catena di reazioni del sistema immunitario tra cui la produzione di anticorpi. Gli anticorpi determinano il rilascio di sostanze chimiche organiche, come l'istamina, che provocano vari sintomi quali: prurito, raffreddore, tosse o affanno. Le allergie agli alimenti o ai componenti alimentari sono spesso ereditarie e vengono, in genere, diagnosticate nei primi anni di vita. Generalmente, il sistema immunitario protegge il corpo dalle proteine estranee dannose, scatenando una reazione per eliminarle (Barrie, 1999). L'allergia, quindi, è essenzialmente "un'alterazione immunitaria" in cui una sostanza normalmente innocua viene percepita come una minaccia e attaccata dalle difese immunitarie dell'organismo. In una vera reazione allergica, l'organismo produce anticorpi (proteine che si legano specificamente ad altre proteine chiamate antigeni - in questo caso allergeni - per disattivarle ed eliminarle dal corpo) (Blades, 2006). La categoria di anticorpi che prende il nome di immunoglobuline E (IgE) reagisce con l'allergene scatenando un'ulteriore reazione con i mastociti (cellule dei tessuti) e i basofili (un tipo di cellula ematica). I mastociti si trovano sotto la superficie cutanea e nelle membrane che rivestono il naso, l'apparato respiratorio, gli occhi e l'intestino. Rilasciano una sostanza chiamata istamina o altre sostanze come le prostaglandine che provocano reazioni allergiche. Le reazioni negative sono immediate e di solito localizzate. Alcune reazioni allergiche impiegano varie ore o addirittura giorni a manifestarsi dopo l'esposizione ad una proteina estranea. In questo caso si parla di "reazioni di ipersensibilità ritardata" (Andrè *et al.*, 1994; Henriksen *et al.*, 2000). Fortunatamente, la maggior parte delle risposte allergiche indotte dagli alimenti è relativamente lieve, ma in un numero limitato di persone si verifica una reazione

violenta che può essere letale e che prende il nome di anafilassi. A volte la reazione anafilattica può manifestarsi nel giro di qualche minuto dall'esposizione e richiede cure mediche immediate (Hefle, 2006).

5.2 INCIDENZA DELLE ALLERGIE ALIMENTARI

Le stime effettive sull'incidenza delle allergie alimentari sono decisamente inferiori alla percezione della gente. Anche se una persona su tre crede di soffrirne, in realtà le allergie alimentari sono scarsamente diffuse (Robinson e Ferguson, 2002). Sulla base di test clinici in doppio cieco (assunzione alternata dell'alimento e di un placebo, in forma non riconoscibile, senza che né il paziente né il medico conoscano la sequenza di somministrazione), è stato stimato che le allergie alimentari si manifestano solo nell'1-2% circa della popolazione adulta. L'incidenza è più elevata tra i bambini piccoli, con una stima tra il 3 e il 7%. Fortunatamente, l'80-90% di tali soggetti supera l'ipersensibilità al raggiungimento del terzo anno di età. Mentre le allergie infantili all'uovo e al latte vaccino possono scomparire, le allergie alle noci, ai legumi, al pesce e ai molluschi tendono a protrarsi per tutta la vita (Warhurst, 2000; Sutas *et al.*, 2008).

5.3 PRODOTTI ITTICI ED ALLERGIA

L'allergia al pesce ha giocato un ruolo preminente nella storia delle reazioni avverse agli alimenti, essendo l'allergene del pesce il primo con cui Prausnitz e Kustner dimostrarono la possibilità di trasferire passivamente le reazioni allergiche mediante iniezione del siero di un soggetto allergico nella cute di un soggetto normale; il fattore sierico in grado di realizzare ciò, negli anni successivi, sarebbe stato identificato nelle IgE (Valsecchi *et al.*, 2012). Nel 1960, Aas pubblicò il più ampio studio sull'allergia al pesce, dimostrando che l'attività allergenica risiede nel muscolo, ma, recentemente, sono stati sollevati dubbi sul fatto che alcuni prodotti come la gelatina del pesce, ottenuta dalla cute e dalle ossa, possano contenere attività allergenica dovuta al collagene (Kuehn *et al.*, 2009). Ciò può rappresentare un problema qualora la gelatina del pesce sia usata nei vaccini o sia contenuta come allergene nascosto in altri alimenti. Infatti, sono stati descritti casi di anafilassi per involontaria ingestione di questo alimento nascosto nei cibi (Dello Iacono *et al.*, 2010). All'interno della categoria dei prodotti ittici, sono i crostacei ed i molluschi a destare le maggiori preoccupazioni, per quanto riguarda il problema delle allergie. Si tratta di prodotti ittici ricchi di zinco, rame, glucosamina cloridrato e iodio, in quantità variabili in funzione della modalità con la quale vengono consumati, cioè se vivi, refrigerati,

congelati o sottoposti a conservazione. Il consumo di questi prodotti ittici ed il riconoscimento del loro valore nutrizionale, oltre all'avvento di nuovi stili alimentari, caratterizzati da alto consumo di crostacei e molluschi in differenti tipologie di prodotto (fresco, surgelato, trasformato) ha implicato la comparsa con maggiore frequenza di reazioni allergiche tra i consumatori (La Grutta *et al.*, 2011). E' stato, inoltre, dimostrato che i tassi di prevalenza di allergia a crostacei e molluschi sono notevolmente più bassi nei bambini rispetto agli adulti, con valori rispettivamente di 0,5% contro 2,5%, (Boyce *et al.*, 2010). E' stato riscontrato che il maggiore allergene di crostacei e molluschi è rappresentato dalla tropomiosina, che appartiene a una famiglia di proteine altamente conservate e strettamente correlate con isoforme multiple presenti nelle cellule muscolari e non muscolari di tutte le specie di vertebrati e invertebrati, che insieme alla miosina ed alla actina, contribuisce alla contrazione muscolare e al supporto meccanico della cellula. Questa proteina è molto interessante anche perché rappresenta un allergene comune a due *phylum* del regno animale: quello degli artropodi e quello dei molluschi. E', quindi, responsabile della cross-reattività tra crostacei, acari, insetti e nematodi, ed è quindi considerato il principale panallergene che sensibilizza per via inalatoria o per ingestione individui predisposti (Panzani *et al.*, 2010). Oltre a ciò, l'alto grado di identità di sequenza tra le tropomiosine delle differenti specie conferma che è il principale panallergene responsabile della cross-reattività tra i crostacei e tra quest'ultimi (*Metapenaeus ensis*, **Met e 1**, tropomiosina del gambero) ed i molluschi (*Todarodes pacificus*, **Tod p 1**, tropomiosina del calamaro) (Wild e Lehrer, 2005). L'estrema diffusione della tropomiosina giustifica la frequente evenienza per l'uomo di venirne a contatto e di sviluppare una risposta immune, in alcuni casi di tipo IgE mediato e, quindi, di poter sviluppare successivamente reazioni allergiche con manifestazioni cliniche evidenti. D'altra parte, le tropomiosine presentano tra di loro un'omologia di sequenza più o meno elevata, comportando la possibilità che le cross-reattività possano assumere un significato clinico consistente (Jeong *et al.*, 2004). Di conseguenza, più è elevata la percentuale di somiglianza tra le due molecole e maggiore è la probabilità di rilevanza clinica della cross-reattività. L'iniziale sensibilizzazione alle tropomiosine può avvenire sia attraverso la via digestiva, e in quel caso l'allergene appartiene più di frequente ai crostacei o ai molluschi, oppure attraverso la via respiratoria, nei confronti delle tropomiosine degli acari ed insetti. In tutti i casi, l'iniziale sensibilizzazione può comportare l'insorgenza di cross-reattività verso altre tropomiosine simili (Leung *et al.*, 1996; Torres Borrego *et al.*, 2003). Un altro aspetto molto importante, è che la tropomiosina è un componente termostabile, quindi la

cottura dell'alimento non è in grado di disattivare il suo potenziale allergenico.

5.4 ASPETTI CLINICI

Nella valutazione dei quadri clinici da allergia alle tropomiosine occorre considerare alcuni importanti elementi: innanzitutto, vi è un'ampia e diversificata possibilità di venire a contatto con le tropomiosine naturali, in quanto esse sono presenti in numerose specie animali, dai crostacei agli insetti; inoltre, sulla base dei differenti livelli di omologia vi sono diversi gradi di cross-reattività tra crostacei (aragosta, granchio, ecc.), aracnidi (acari della polvere), insetti (scarafaggi) e molluschi (seppie, ecc.). Pur sapendo che le tropomiosine sono i principali allergeni presenti nei crostacei e nei molluschi e ne rappresentano la causa più frequente di allergia, c'è da sottolineare che in questi organismi esistono altri allergeni, quali, ad esempio, la arginasi chinasi. Ciò può spiegare l'assenza di reazioni per la tropomiosina in diversi casi di soggetti allergici ai crostacei, che è stata avvalorata da un recente articolo nel quale la sensibilizzazione verso la tropomiosina è stata riscontrata soltanto in circa il 50% dei 100 soggetti allergici ai gamberetti, a conferma che in questi prodotti vi siano altre molecole allergeniche non ancora identificate (Jeong *et al.*, 2013). Per quanto riguarda la frequenza dell'allergia ai crostacei e molluschi, è possibile affermare che questa varia con l'età e le abitudini alimentari. Nella casistica raccolta dalla Commissione AAADA (Allergia Alimentare, Anafilassi, Dermatite Atopica) della "Società Italiana di Allergologia ed Immunologia", su 216 casi di anafilassi e reazioni allergiche generalizzate ad alimenti, 21 erano riferite a prodotti ittici, e di queste 15 (6,9%) erano dovuti a pesci, 4 (1,9%) a gamberetti e 2 (0,9%) a molluschi (La Grutta *et al.*, 2011). In una casistica cinese di 114 bambini con dermatite atopica, i gamberetti erano la terza causa più frequente di sensibilizzazione allergica e l'aragosta la quinta (Hoffman *et al.*, 2011). Negli USA, è stato evidenziato che l'allergia ai crostacei ed ai molluschi in età pediatrica è presente nel 0,8% dei soggetti, più frequente dell'allergia ai pesci (Daul *et al.*, 2004). I più comuni frutti di mare responsabili di allergia clinica sono nell'ordine gamberetto, granchio, aragosta, vongole, ostriche, cozze (Reese *et al.*, 2011). Le manifestazioni allergiche ai crostacei e ai molluschi appaiono simili a quelle segnalate anche per altri alimenti. Nel 10% dei casi le reazioni cliniche si presentano al solo contatto o all'inalazione e nella maggior parte dei casi si evidenziano entro 2 ore dall'assunzione dell'alimento, anche se talvolta sono segnalate a distanza di 8 ore, in particolare per il granchio della neve (*snow crab*), per la seppia e per la patella. I sintomi variano individualmente da semplici eruzioni orticarioidi ad eventi acuti, gravi e talvolta mortali

come la anafilassi o la anafilassi da esercizio fisico. In una casistica di 30 soggetti allergici ai gamberetti, la manifestazione allergica più comune è stato il prurito generalizzato (nel 90% dei casi), seguito dall'orticaria e l'angioedema delle labbra e della lingua, ma il 42% aveva anche sintomi polmonari (Daul *et al.*, 2004). Le reazioni multiple sono abbastanza comuni: il 42,2% dei casi riferisce di aver avuto da 2 a 5 reazioni e il 15,2% oltre 6 reazioni. In questi casi i sintomi più frequenti sono l'orticaria e l'angioedema, presenti rispettivamente in circa il 60 e il 70% dei casi, seguiti da dispnea (55%), fastidio orale (50%), prurito orale (40%), capogiri e malessere (35%), wheezing (30%), vomito, diarrea e tosse (20%) (Sicherer *et al.*, 2004). L'allergia ai molluschi può essere causa anche di dermatite atopica grave e resistente alla terapia. Nell'adolescente e nell'adulto l'allergia può manifestarsi in modo così marcato da rendersi evidente anche per la sola inalazione o per contatto, specialmente nei lavoratori dei prodotti ittici (James *et al.*, 2007; Kandyil *et al.*, 2009). Inoltre, è importante ricordare che le tropomiosina con i suoi epitopi allergenici può essere addirittura presente nei vapori in seguito alla cottura dell'alimento (Crespo *et al.*, 1995). Per quanto riguarda il pesce è noto che il principale allergene sia la parvalbumina, una proteina sarcoplasmatica, appartenente al gruppo delle proteine muscolari trasportanti il Calcio. Essa può essere suddivisa in due distinte isoforme, alfa e beta. Nel pesce, la forma allergenica beta è considerata un panallergene cross-reattivo (Jankins *et al.*, 2009). Sono state purificate e caratterizzate 39 parvalbumine che agiscono come allergeni. Allo stato attuale, possiamo determinarne solo due:

- **-rGad c1** *Gadus callarias* (parvalbumina del merluzzo);
- **-rCyp c1** *Cyprinus carpio* (parvalbumina della carpa).

E' stato dimostrato che il contenuto di parvalbumina nelle specie di pesce più frequentemente consumate varia considerevolmente ed è dal 20 al 60% più bassa nei campioni sottoposti a trattamento (Audicana *et al.*, 2000).

I pesci ossei quali merluzzo, rombo e pesce spada hanno due tipi di muscoli: i muscoli bianchi a rapida contrazione e i muscoli rossi o scuri per il nuoto prolungato. I muscoli bianchi hanno un maggior contenuto di parvalbumina rispetto ai muscoli rossi. Pertanto in un pesce in continua attività (ad es. nel pesce spada) si hanno più muscoli rossi, quindi il contenuto in parvalbumina è più basso e i pazienti possono probabilmente tollerarlo meglio rispetto ad altri pesci (Bernhisel-Broadbent *et al.*, 2002). Anche per quanto riguarda il pesce, possono verificarsi fenomeni di cross-reattività. Infatti, le specie all'interno dei pesci Gadiformi (es. merluzzo e nasello) e all'interno degli Sgombroidi (es. sgombro e tonno) sembrano condividere componenti allergenici (Crespo *et al.*, 2002). E' probabile,

infine, che pazienti allergici al pesce possano tollerare alcune specie di pesce ed essere allergici ad altre specie. Ciò nonostante, una cross-reattività è fortemente possibile tra specie di pesce quando è coinvolto l'allergene parvalbumina (Hansen *et al.*, 2002). E' comunque, interessante notare come non tutti i casi di allergia al pesce siano Ig-E mediati: sono stati, infatti, riportati casi di allergia non Ig-E mediati, come la "sindrome della enterocolite allergica", un'allergia alimentare tipica dell'età pediatrica.

CAPITOLO 6. APPROCCIO MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

La peculiarità di un mercato come quello ittico, che vede la commercializzazione di un numero elevato di specie e che, di conseguenza, porta gli operatori del settore alimentare (OSA) e le autorità di controllo a dover lavorare con prodotti in apparenza simili, ma di ben diverso valore commerciale, ha aumentato l'interesse intorno all'indagine sistematica delle specie marine, indirizzando la ricerca verso la determinazione di criteri che permettano l'individuazione delle specie con un margine di sicurezza ben definito (Muciaccia, 1982). Inoltre, non sono da sottovalutare le difficoltà riscontrate dalle autorità competenti nell'identificazione delle specie, dovute anche alla maggiore presenza nel mercato di prodotti trasformati, diversi dal pesce intero, come appunto il surimi. Infatti, sempre più frequentemente, i prodotti ittici vengono commercializzati già preparati e pronti per il consumo, non rendendo sempre possibile il riconoscimento della specie in base alle sole caratteristiche morfologiche (Galimberti *et al.*, 2013). L'aspetto più importante di questo contesto è essenzialmente di tipo sanitario: evitare che specie tossiche circolino all'interno del nostro mercato (Armani *et al.*, 2012). Infatti, in seguito alla globalizzazione dei mercati e alla conseguente importazione da ogni parte del mondo di prodotti ittici, deve essere posta particolare attenzione al rischio sanitario connesso al consumo di questi prodotti (Galimberti *et al.*, 2013). Da qui la necessità di specifiche tecniche di laboratorio che siano di supporto all'ispettore sanitario e diventino garanzia per il consumatore. In questo scenario complesso, l'unica metodica che, attualmente in Italia, ha valore a livello legale nell'identificazione di specie è l'analisi morfologica delle caratteristiche anatomiche macroscopiche del pesce intero, secondo chiavi dicotomiche proposte dalla *Food and Agriculture Organization* (FAO). Tale metodo di riconoscimento delle specie ittiche, però, non è più sufficiente a garantire la tutela del consumatore. In virtù dell'ampia differenziazione dell'offerta di prodotto trasformato che caratterizza il mercato, è fondamentale identificare in maniera inequivocabile e rapida le specie oggetto di commercializzazione, anche quando le caratteristiche morfologiche identificative non sono più presenti. Si rende pertanto necessario il ricorso a tecniche di laboratorio che siano di supporto all'ispettore sanitario e diventino garanzia per il consumatore (Busato, 2010).

6.1 TECNICHE DI LABORATORIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

Esiste una grande varietà di tecniche utilizzate in laboratorio per l'identificazione di specie, tutte molto diverse tra loro e, soprattutto, in grado di sfruttare target diversi. Tra le procedure comunemente utilizzate troviamo, innanzitutto, quelle che sfruttano l'analisi sulle proteine e che, quindi, prevedono l'impiego di metodiche che si basano sulla differenza dei pattern elettroforetici generati da proteine di specie diverse (Bonnefoi *et al.*, 1986). L'elettroforesi bidimensionale e la focalizzazione isoelettrica sono le metodiche più utilizzate per la visualizzazione di tali patterns (Lundstrom, 1980). L'isoelettrofocalizzazione si fonda sul semplice presupposto che le proteine sarcoplasmatiche idrosolubili sono differenti per numero ed abbondanza relativa nelle varie specie animali; questa loro differenza può essere evidenziata ponendole in un gel di poliacrilammide, sotto l'influenza di un campo elettrico in modo tale che migrino in funzione della loro carica elettrica, fino a raggiungere il punto di neutralità (Righetti, 1988). Con questa tecnica le proteine vengono separate in un campo elettrico lungo il quale viene stabilito un gradiente di pH. Infatti, la loro separazione avviene sulla base del loro punto isoelettrico, che è il pH distintivo per ogni tipo di proteina, in cui la proteina stessa non ha carica netta. La regione anodica (+) corrisponde alla regione più acida e quella catodica (-) a quella più basica. Gli estremi di pH sono scelti sulla base dei punti isoelettrici dei componenti da separare (Zuccherato, 2005). Questa metodica applicata al riconoscimento di specie ha ormai raggiunto un livello di affidabilità e di ripetibilità tali da poter essere adottata come metodica ufficiale e riconosciuta in ambito europeo (Renon *et al.*, 2002). L'analisi IEF, comunque, comporta delle difficoltà legate alla variabilità dell'espressione proteica nei diversi tessuti. L'elettroforesi bidimensionale, invece, è una metodica che separa le proteine in funzione della loro carica e dimensione. Il processo prevede due fasi distinte, ognuna delle quali sfrutta delle proprietà caratteristiche della proteina per ottenere la separazione. La separazione relativa alla prima dimensione è eseguita in modalità di focalizzazione isoelettrica (IEF), per cui le proteine sono differenziate grazie ad un gradiente di pH e ad un campo elettrico opportuno, in base al valore del loro punto isoelettrico; la seconda dimensione, invece, separa le proteine in base al loro peso molecolare, ovvero utilizzando un SDS-PAGE. Questa serie di separazioni ortogonali è in grado di differenziare in un unico esperimento le centinaia di proteine contenute in una miscela complessa, per fornire come risultato un'immagine a due dimensioni (Westermier e Marouga, 2005; Ong e Pandey, 2001).

Le proteine, però, vanno facilmente incontro a denaturazione in seguito a trattamenti termici (Asensio *et al.*, 2001), e a processi di riscaldamento, come la sterilizzazione dei prodotti alimentari trasformati. Ecco perché le analisi sulle proteine si sono rivelate poco utili per l'identificazione di specie, soprattutto per quanto riguarda i prodotti trasformati. Altre analisi utilizzate nel settore ittico sono l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ed il test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), ma entrambe, risultano essere poco affidabili, proprio a causa della denaturazione che possono subire le proteine durante i processi trasformativi del prodotto (Asensio *et al.*, 2008). In questo quadro complesso, la comunità scientifica si sta sempre più indirizzando verso l'utilizzo di altre molecole target come il DNA (Carvalho *et al.*, 2011). Infatti, l'analisi del DNA ha due vantaggi: è una molecola estremamente stabile ed è sempre uguale, qualsiasi sia il tessuto analizzato (Galimberti *et al.*, 2013). Pertanto l'analisi del DNA si profila come la più efficace analisi, in quanto si sfrutta una molecola molto stabile nell'ambiente, che presenta un profilo identico in tutte le cellule e manifesta una sufficiente variabilità interspecifica, tale da consentire l'identificazione di specie. Inoltre, l'analisi del DNA può essere applicata ai prodotti alimentari trasformati, poiché i processi produttivi e i trattamenti non alterano completamente la struttura della sequenza nucleotidica che si vuole esaminare (Cèsspedes *et al.*, 2011). Le tecniche di analisi degli acidi nucleici sono basate sostanzialmente sull'utilizzo di marcatori molecolari e sono in grado di rilevare le differenze (polimorfismi) in regioni omologhe tra individui diversi appartenenti alla medesima specie. Le differenze tra individui a livello di sequenza nucleotidica del DNA costituiscono un insieme di marcatori genetici con elevate potenzialità discriminanti e rappresentano un sistema di analisi comparativa dei genomi con alto livello di dettaglio. Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico, rilevabile con sonde o inneschi specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in maniera caratteristica ed inequivocabile il tratto cromosomico con cui si identifica (Adams *et al.*, 1991). Pertanto, i marcatori molecolari si basano direttamente sulla rilevazione di polimorfismi nella sequenza nucleotidica del DNA che costituisce il patrimonio ereditario di ciascun individuo (Dallas, 1988). Tali polimorfismi possono essere dovuti ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc. I marcatori molecolari presentano diversi aspetti positivi (Michelmore *et al.*, 1991):

- basandosi su differenze nella sequenza nucleotidica del DNA, non subiscono l'interferenza dell'ambiente;

- possono interessare qualsiasi regione del genoma, che sia trascritta o meno (quindi anche introni e regioni di regolazione), e consentono pertanto di rilevare differenze anche tra individui geneticamente molto simili ma distinguibili fenotipicamente.

6.2 LA STRUTTURA DEL DNA

Il DNA (acido deossiribonucleico) è una macromolecola biologica che riveste un ruolo cruciale per la vita, dal momento che contiene le informazioni genetiche di un individuo vivente, informazioni che possono essere codificate e che sono indispensabili per la sintesi delle proteine negli organismi viventi. Il DNA è un acido nucleico, perché è localizzato essenzialmente nel nucleo delle cellule, mentre il suo corrispettivo extra nucleico è detto RNA (acido ribonucleico). L'RNA ha la funzione di portare le informazioni del DNA al di fuori del nucleo (J.D. Watson *et al.*, 2009). Formalmente, il DNA può essere considerato un polimero, di cui ogni monomero, detto nucleotide, è composto da tre parti (Mathews *et al.*, 2004):

- uno zucchero pentoso (zucchero ciclico a cinque atomi di carbonio): il ribosio nel caso dell'RNA e il 2-deossiribosio nel caso del DNA (la differenza è che quest'ultimo in posizione 2 non ha un gruppo –OH ma un semplice –H);
- un gruppo fosfato;
- una base azotata. Esistono due tipi di base azotata: ad anello doppio (purine) o ad anello singolo (pirimidine). Negli acidi nucleici si trovano due purine, l'adenina e guanina, e tre tipi di pirimidine, citosina, timina (solo nel DNA) e uracile (solo nell'RNA). Queste basi sono indicate con la loro lettera iniziale maiuscola: A, G, C, T, U. Se una molecola è composta da una base purinica o pirimidinica e da un zucchero pentoso, l'unità chimica viene indicata come nucleoside. Il legame avviene tra l'atomo C-1' dello zucchero e l'atomo di azoto in posizione 9 della purina, oppure, per la guanina, in posizione 1. Se viene aggiunto un gruppo fosfato al nucleoside (legato al C-5'), la molecola viene indicata come nucleotide, che prende nome dalla base azotata che contiene. A sua volta, il legame tra due mononucleotidi (legame fosfodiesterico) consiste in un gruppo fosfato legato a due zuccheri attraverso le funzioni alcoliche dei due zuccheri. Ogni legame coinvolge una funzione sul C-5' e una sul C-3', pertanto è possibile individuare per ogni catena di acido nucleico un'estremità C-5' e una C-3'. A seconda del numero di mononucleotidi legati tra di loro, si può avere un di/tri/n-nucleotide. Brevi catene

formate da 20 nucleotidi legati insieme si chiamano oligonucleotidi. Catene ancora più lunghe vengono indicate con il nome di polinucleotidi.

Il DNA è una molecola ad altissimo peso molecolare, dell'ordine dei 10^6 - 10^9 dalton, in quanto è composto da migliaia di nucleotidi, che possono combinarsi tra di loro a formare un numero elevato di combinazioni (precisamente, 4^N con N il numero di nucleotidi presenti) (Mathews *et al.*, 2004). Questa incredibile varietà di strutture è la chiave del ruolo del DNA nella codifica e nella trasmissione delle informazioni genetiche, che possono essere espresse a partire da sole 4 unità di base. Negli anni '50, pur essendo nota la composizione chimica delle basi del DNA e le loro percentuali relative, rimaneva aperto il problema della struttura di questo polimero biologico. Nel 1953, James Watson e Francis Crick, basandosi sui dati cristallografici di Rosalind Franklin, proposero un modello di struttura del DNA che si rivelò corretto. Le caratteristiche principali del modello sono le seguenti (Klung *et al.*, 2006):

- è formato da due catene polinucleotidiche avvolte intorno a un'asse centrale, formando una doppia elica destrorsa;
- le due catene sono antiparallele, cioè le loro orientazioni da C-5' a C-3' corrono in direzioni opposte. La natura antiparallela del DNA è resa necessaria dalla rigidità della catena, che è caratterizzata da definiti angoli e lunghezze di legame e se le due catene corressero parallele l'accoppiamento non sarebbe così semplice;
- le basi delle due catene sono distanziate l'una dall'altra di 3,4 Å, e sono rivolte verso l'interno dell'elica, perpendicolarmente all'asse dell'elica e impilate una sull'altra;
- le basi sono accoppiate una all'altra e sono legate da ponti a idrogeno. In particolare, questi accoppiamenti sono univoci, e sono A=T (A=U nell'RNA), e G≡C, e sono garantiti dalla natura chimica delle basi azotate, in quanto A e T possono dare due legami a idrogeno, mentre le altre basi ne danno tre;
- ogni giro completo dell'elica è lungo 34 Å, quindi in ogni catena si trovano 10 basi per giro;
- il diametro della catena esterna è di 2 nm, mentre la lunghezza può raggiungere i 9 cm;
- in ogni segmento della molecola, si rendono visibili lungo l'asse, in alternanza, un solco maggiore e uno minore.

Il DNA si organizza in nucleosomi, cioè si avvolge strettamente intorno a proteine basiche dette istoni. Una catena di DNA, organizzata in polinucleosomi, si organizza poi in anse su una struttura polisaccarica detta *scaffold*, che costituisce lo scheletro del cromosoma, quella parte di nucleo nella quale è possibile individuare un preciso gene (Brown, 2007). Ogni gene è responsabile di una particolare caratteristica fisica di un individuo. In questa maniera una sequenza molto lunga viene impaccata in uno spazio contenuto come quello del nucleo cellulare. La doppia elica può essere separata nei due filamenti che la compongono (la separazione dei filamenti è detta denaturazione) sottoponendola a un trattamento che rompe i legami a idrogeno in condizioni di pH molto acido o molto alcalino, o aumentando opportunatamente la temperatura (Mathews et al., 2004). Con il termine espressione genica si intende il processo attraverso cui l'informazione contenuta in un gene (sequenza di DNA) viene copiata in RNA messaggero per poi essere tradotta in una macromolecola funzionale, tipicamente una proteina, durante il processo di traduzione (Klung et al., 2006). Il ruolo del gene che codifica una determinata proteina è quello di specificare la natura e l'ordine degli aminoacidi che la compongono. I geni variano in lunghezza fra loro e spesso sono composti da migliaia di basi; solo una parte di queste sequenze di basi (dette esoni) è in grado di codificare le proteine, mentre la restante parte, apparentemente non codificante (introni) sembra avere un ruolo decisivo di controllo (Bossier, 2009).

6.3 IL DNA MITOCONDRIALE

Il genoma mitocondriale è una molecola circolare a doppio filamento di DNA ed è presente in diverse copie all'interno dei mitocondri, organelli specializzati della cellula presenti in alcune migliaia di copie. Si ritrova in tutti gli esseri viventi, ad eccezione dei batteri, delle alghe azzurre e di alcune cellule, come i globuli rossi. Il DNA mitocondriale (mtDNA) ha la funzione di regolare l'attività dei mitocondri, che, a loro volta, presiedono all'attività energetica della cellula. Il DNA mitocondriale consiste in due catene circolari, una pesante (H, con prevalenza di basi puriniche A e G) e una leggera (L, con prevalenza di basi pirimidiniche C e T). La catena H contiene la maggioranza dei geni e sono, quasi tutti, codificanti. Essi codificano per 2 subunità ribosomiali (16s e 23s), 22 RNA di trasporto e 13 proteine (Avice, 1986), 6 delle quali sono enzimi o porzioni di enzimi coinvolti nella fosforilazione ossidativa come il citocromo b (cyt b), la subunità I-III della citocromo C ossidasi (COI-III) e la subunità 6 e 8 del complesso ATPasico (*ATPase6* e *ATPase8*). I geni sono privi di introni e solo la regione di 1024 bp denominata D-loop (D come

“dislocazione”, in quanto le catene H ed L sono qui distaccate per la presenza di DNA quiescente) non contiene geni ma è deputata alla regolazione dell’mtDNA. Il mtDNA è aploide a trasmissione uniparentale materna (Cann *et al.*, 1992) ed è caratterizzato, nella maggior parte dei casi, dall’assenza di fenomeni di ricombinazione e, quindi, a livello intraspecifico, si può assimilare ad un clone. In una cellula, sia il DNA nucleare sia quello mitocondriale sono potenzialmente disponibili per scopi legati all’identificazione di specie. Il mtDNA è preferibile poichè presenta dimensioni minori del DNA nucleare (mediamente 14-18 Kb, con eccezioni sino ai 60-64 Kb) ed un tasso di sostituzione nucleotidica maggiore rispetto al genoma nucleare e quindi presenta maggiori zone polimorfiche a livello interspecifico, facilitando l’identificazione di specie strettamente correlate (Anderson *et al.*, 1981). Altro vantaggio del mtDNA risiede nella sua notevole resistenza intrinseca alla denaturazione dovuta alla sua conformazione circolare. Risulta perciò particolarmente adatto all’analisi di matrici alimentari sottoposte a trattamenti termici (Folmer *et al.*, 1994). Inoltre è presente in abbondanza nelle cellule: vi sono, infatti, diverse copie di mtDNA nelle cellule, in numero variabile da 100 a 10.000, e questo facilita la ricerca di DNA presente in minime quantità o a partire da bassissime quantità di tessuto oggetto d’indagine (Avisé *et al.*, 1987).

6.4 I GENI MITOCONDRIALI

I geni mitocondriali maggiormente utilizzati sono sia quelli che codificano per le subunità dell’RNA ribosomiale (*12srRNA-16srRNA*) sia quelli che codificano per le 3 subunità della Citocromo C Ossidasi (in particolare per la Citocromo C Ossidasi I - *COI*) e per il citocromo b (*cyt b*) (Saccone *et al.*, 1999). Le caratteristiche peculiari di ciascuno di questi geni sono:

- *COI*: è considerato da molti autori come il marker di scelta per la differenziazione di specie, grazie al suo enorme potenziale rispetto ad altri geni mitocondriali (Hebert *et al.*, 2003). Anche le sequenze nucleotidiche più corte (100 – 200 pb) possono consentire un’accurata identificazione (Hajibabaei *et al.*, 2006). Inoltre, esiste una grande gamma di primers universali per l’amplificazione di questo gene (Kochzius, 2010; Ward *et al.*, 2005);
- *Cytb*: è caratterizzato da una minore variazione intraspecifica rispetto alla variazione interspecifica, perciò risulta idoneo per l’identificazione di numerosi organismi (Barlett e Davidson, 1992). La caratteristica importante di questo gene è che presenta alcune regioni non variabili (Armani *et al.*, 2011), che hanno permesso

la progettazione di primers universali che consentono l'amplificazione di frammenti di diversi lunghezze;

- *16S RNA*: è un gene altamente conservato, ciò facilita l'utilizzo di primers universali, ma permette anche il disegno di nuovi primers per l'amplificazione dello stesso frammento di DNA da un più alto numero di specie, filogeneticamente anche distanti tra loro. Perciò, viene spesso utilizzato anche per verificare lo stato di degradazione del DNA stesso (Armani *et al.*, 2012).

Essenzialmente, la maggior parte delle analisi filogenetiche, si basano sulle sequenze del *COI* e del *cytb*.

6.5 TECNICHE DI ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA da tessuto è una fase molto importante, perché dalla qualità e dalla quantità del DNA estratto dipendono poi tutte le successive fasi (Wink, 2006). La tecnica di estrazione di DNA dipende da alcuni aspetti:

- tipo di acido nucleico che vogliamo isolare (DNA o RNA);
- matrice di partenza (tessuto fresco, tessuto conservato, tessuto sottoposto a trattamenti chimico-fisici);
- applicazioni post-estrazione: PCR, real-time PCR, clonaggio, ecc.

Indipendentemente dalla tecnica scelta per l'estrazione del DNA, è necessario sottolineare che, per quanto riguarda i prodotti trasformati, questi avranno subito vari trattamenti, come l'utilizzo di alte temperature, che possono aver, in parte, danneggiato o degradato il DNA. E' ovvio, quindi, che lo scopo principale di questa fase di estrazione sia quello di ottenere DNA in quantità sufficiente e, soprattutto, di buona qualità e, in particolar modo, ci riferiamo all'assenza di particolari composti che possono agire da inibitori nelle successive fasi applicative (Wilson, 1997). Il percorso di estrazione prevede solitamente quattro fasi:

- lisi delle cellule: è una fase molto delicata, perché è necessario evitare un eccessivo danneggiamento dell'acido nucleico che vogliamo estrarre. I metodi tradizionali si basano su trattamenti che includono la digestione enzimatica e la digestione meccanica, come sminuzzamento manuale con l'ausilio di forbici o di particolari biglie metalliche (*beads*) (Armani *et al.*, 2014);
- inattivazione delle nucleasi cellulari: per quanto riguarda il DNA, viene utilizzata una proteasi, detta proteasi K, isolata da un fungo saprofito *Tritirachium album*, che digerisce le proteine associate al DNA stesso e inattiva le nucleasi cellulari;

- separazione e recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il lisato cellulare: una delle metodiche classiche prevede l'utilizzo del fenolo e del cloroformio. Il fenolo è un agente denaturante delle proteine, mentre il cloroformio, oltre a completare la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi. Attualmente, però, viene utilizzato spesso il metodo "*salting out*": questa tecnica sfrutta l'utilizzo di alte concentrazioni di sale che provocano una diminuzione della solubilità delle proteine con conseguente loro precipitazione. Questo metodo prevede l'utilizzo di un tampone di lisi e di una proteasi, che provocano una degradazione proteica. Il successivo utilizzo di sali, come l'acetato di sodio, provoca la precipitazione delle proteine;
- precipitazione: avviene con l'utilizzo di etanolo ed isopropanolo. Dopo lavaggio con etanolo, è possibile procedere con la valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto.

6.6 VALUTAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEL DNA ESTRATTO

Tale valutazione viene eseguita sfruttando un'aliquota del campione e la lettura viene fatta per via spettrofotometrica. In particolare, per avere una stima della quantità del DNA estratto, è necessario valutare l'assorbanza del campione a 260 nm, mentre per la valutazione qualitativa vengono presi in considerazione i valori di assorbanza a 230 e 280 nm. Il rapporto fra l'assorbanza a 260 e gli altri due valori fornisce un'indicazione sulla purezza del DNA: un DNA puro dovrebbe avere un rapporto compreso tra 1,8 e 2,0. La valutazione delle sostanze contaminanti deve essere presa in considerazione al momento della scelta delle procedure successive a cui sarà sottoposta la soluzione contenente gli acidi nucleici; infatti, una contaminazione da proteine o da fenolo produce, da un lato, una sovrastima della concentrazione degli acidi nucleici, dall'altro un disturbo nell'attività degli enzimi che saranno impiegati per le successive analisi (Focà e Lamberti, 2003).

6.7 AMPLIFICAZIONE DEL DNA: POLYMERASE CHAIN REACTION

La PCR è una tecnica utilizzata per aumentare la quantità di una determinata sequenza di DNA. Quindi, a partire anche da una sola copia della sequenza di DNA, sarà possibile amplificarla in maniera selettiva. Con questo metodo siamo in grado di riprodurre centinaia di milioni di copie di DNA, tutte uguali tra loro e alla sequenza target.

Questa tecnica è suddivisa in tre essenziali steps (Scialpi e Mengoni, 2008):

- denaturazione: il DNA stampo viene denaturato ad una temperatura di 95°C per 30-60 secondi ad ogni ciclo di amplificazione. In questo modo, avviene la separazione della doppia elica di DNA nelle sue due catene, perché si ha la rottura dei legami idrogeno tra le basi azotate. E' opportuno ricordare che temperature troppo basse, così come cicli troppo brevi, potrebbero non essere sufficienti a denaturare la doppia elica, riducendo così l'efficienza della reazione;
- appaiamento (*annealing*) dei primers con il DNA stampo a singola elica: la temperatura di *annealing* utilizzata, di solito, è di 55°C, ma a volte, si preferisce ridurla a 45-48°C. Nonostante esista la possibilità di diminuire la temperatura di *annealing* ciclo dopo ciclo, solitamente tale valore viene mantenuto costante per tutta la durata della reazione. È noto che una temperatura di *annealing* troppo bassa porta all'appaiamento dei primers con sequenze non perfettamente complementari, con conseguente amplificazione di frammenti non specifici, mentre una temperatura di *annealing* troppo alta provoca un'instabilità delle molecole di primers con il DNA stampo, con una conseguente perdita di resa. Di solito la temperatura di *annealing*, quindi, viene fissata ad un valore inferiore di 3-5°C rispetto alla temperatura di fusione delle molecole di primers. E' importante sottolineare che la Taq polimerasi non risente delle alte temperature utilizzate durante l'intera reazione. Infatti, tale enzima ha un'attività specifica a 37°C ed un massimo a 70°C;
- estensione da parte del Taq polimerasi tramite l'aggiunta di nucleotidi (dNTP), con sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo: durante questa fase, viene utilizzata una temperatura compresa tra 68°C e 72°C. Per quanto riguarda il tempo necessario per l'estensione, questo viene calibrato sulla base della lunghezza dello stampo da amplificare. Il numero di cicli totali durante i quali si ripetono questi tre steps è compreso tra 30 e 45, anche perché è noto che durante le fasi finali della reazione il prodotto tenda a diminuire in quanto si verifica una degradazione di alcuni reagenti.

Dunque, i componenti essenziali per la reazione di PCR sono:

- DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi) che catalizza la sintesi di DNA a partire da un frammento stampo;
- Coppia di oligonucleotidi, detti primers, che innescano la sintesi del DNA;

- Desossinucleotidi trifosfati (dNTP), utilizzati per sintetizzare il nuovo filamento di DNA;
- Cofattori della DNA polimerasi, come $MgCl_2$;
- *Buffer*, che mantiene le condizioni ideali per la DNA polimerasi;
- DNA stampo con la sequenza da amplificare.

I tre steps avvengono nella provetta contenente un'aliquota del DNA estratto (opportunamente diluito) ed i vari reagenti elencati sopra. Tale provetta viene, successivamente, posizionata all'interno di un apposito termociclatore, che esegue automaticamente i cambi di temperatura necessari. I primers sono tra i componenti più importanti della mix di reazione. Nel caso in cui sia necessario progettare i primers, è utile ricordare che questi devono avere una lunghezza compresa tra 18 e 22 paia di basi; non devono contenere lunghi tratti di polinucleotidi ed è importante evitare i tratti che potrebbero dare “*self-annealing*”. Inoltre, si deve tener conto di disegnare un primer forward sull'elica senso del DNA e un primer reverse sull'elica opposta (quindi antisenso), in modo da delimitare la regione da amplificare.

Per quanto, riguarda i primers degenerati, questi sono caratterizzati da una sequenza che non è determinata univocamente, ma contiene una o più posizioni in cui possono essere presenti più nucleotidi in miscela. Vengono utilizzati per amplificare sequenze di DNA ignote da un organismo, utilizzando per il disegno del primer la sequenza nota omologa proveniente da un altro organismo o dallo stesso organismo.

I primers universali, invece, sono progettati per legarsi a regioni di DNA che di solito sono conservate tra gruppi di specie e per amplificare un frammento di DNA che mostra variazioni intraspecifiche (Carrera *et al.*, 2000).

6.8 APPLICAZIONI ALTERNATIVE DELLA TECNICA DI PCR

La tecnica di PCR convenzionale è una tecnica qualitativa; solo assumendo particolari accorgimenti può arrivare a essere semi-quantitativa. Infatti, non è possibile correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di DNA stampo presente inizialmente, perché nella fase finale l'efficienza della reazione può essere variabile (Campbell *et al.*, 2008). Uno sviluppo della tecnica di PCR consiste nella real-time PCR. La real-time PCR, o qPCR (PCR quantitativa), consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare un'analisi quantitativa della quantità di DNA stampo iniziale.

Il segnale quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da fluorofori, cioè coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori possono intercalarsi al DNA in maniera aspecifica, oppure fungere da marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze. Le informazioni che si ottengono con questa tecnica sono quindi maggiori rispetto a quelle di una classica PCR (Scialpi e Mengoni, 2008). Un'altra tecnica che rappresenta l'evoluzione della classica reazione di PCR è la multiplex PCR. Essenzialmente, questa metodica consiste nell'amplificazione simultanea di differenti sequenze di DNA durante la stessa reazione, grazie all'ausilio di più coppie di primers. I primers devono generalmente avere un valore di 10^7 molare in eccesso rispetto al DNA. Se questo rapporto è troppo basso si ha una riduzione della resa della reazione di PCR (Markoulatos *et al.*, 2002). Uno dei principali problemi nell'utilizzo di questa tecnica è che la presenza di più coppie di primers aumenta la possibilità di ottenere prodotti di amplificazione artefatti ed, inoltre, aumenta la possibilità di ottenere dimeri di primers (Armani *et al.*, 2014). Il vantaggio di questo metodo, tuttavia, è il considerevole risparmio di sforzo e tempo quando si analizzano differenti regioni bersaglio. Nella PCR-RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) il prodotto di amplificazione viene sottoposto all'azione di enzimi di restrizione, che sono in grado di riconoscere una sequenza specifica di nucleotidi e di tagliare in quel punto specifico. Si ha, così, la produzione di frammenti di lunghezza diversa, detti polimorfici (Guidi *et al.*, 2008). Tale polimorfismo è dovuto alla variabilità specie-specifica nelle sequenze di DNA di determinate regioni. I frammenti prodotti sono successivamente separati in base alla loro lunghezza attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio. La loro visualizzazione permette di valutare quale polimorfismo sia presente nel campione analizzato.

6.9 ELETTROFORESI

L'elettroforesi è una tecnica analitica e separativa, basata sul movimento di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido, per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso (Mathews *et al.*, 2004). Gli elettrodi possono essere denominati anche condensatori e sono due lastre parallele elettricamente cariche. Le particelle si spostano verso il catodo se hanno carica positiva e verso l'anodo se hanno carica negativa; nel primo caso il processo è detto cataforesi, nel secondo anaforesi. In altre parole, per elettroforesi si intende una tecnica usata in vari campi (da quello medico a quello chimico) che separa particelle elettricamente cariche immerse in una

soluzione elettrolita sottoposta alla forza di un campo elettrico generalmente costante. Molecole come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e quindi, ad ogni valore di pH, sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche. Sotto l'influenza di un campo elettrico, le molecole cariche poste in un liquido migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che possiedano una carica positiva o negativa. Questa tecnica, quindi, è necessaria per separare ed identificare i frammenti di DNA, una volta che questi sono stati amplificati con la PCR. L'elettroforesi tradizionale viene solitamente eseguita su mezzi di supporto anti-convectivi come poliacrilamide o gel di agarosio. La matrice di gel ideale dovrebbe avere la misura dei pori regolabile e regolare, essere inerte chimicamente e non presentare elettroosmosi. I gel di agarosio sono usati soprattutto quando sono necessarie analisi di molecole di grandi dimensioni (grandi frammenti di DNA a singolo e doppio filamento e proteine). L'agarosio è un polisaccaride lineare ed è uno dei costituenti dell'agar, una miscela di polisaccaridi isolati da alcune specie di alghe rosse, e viene normalmente utilizzato a concentrazioni dell' 1% e 3%. Il gel viene formato sospendendo dell'agarosio in polvere in un tampone acquoso portato quindi all'ebollizione e lasciato raffreddare a temperatura ambiente per formare un gel rigido. La misura dei pori è funzione della concentrazione iniziale di agarosio: si ottengono pori larghi utilizzando basse concentrazioni, mentre pori più piccoli sono ottenuti con concentrazioni più elevate. A seconda della concentrazione di agarosio (e quindi delle dimensioni dei pori) possono essere separate molecole di DNA di misure diverse, solitamente in un range tra 100 b e 20 kb (Paolella *et al.*, 2000). Solitamente, per la separazione di campioni di DNA, si realizza l'elettroforesi su gel di agarosio in un apparato a configurazione orizzontale con il gel immerso nella soluzione buffer. Il gruppo fosfato di ciascun nucleotide porta una singola forte carica negativa, che è molto più grande di ciascuna delle cariche presenti sulle basi. In tal modo il rapporto carica su massa di tutti i polinucleotidi è indipendente dalla composizione della base (Mathews *et al.*, 2004). Si dimostra, inoltre, che il rapporto carica su massa è circa lo stesso per tutti i polinucleotidi e quindi, in un campo elettrico, migrerebbero con la stessa mobilità verso l'elettrodo. Ne consegue che il principale fattore di separazione per gli acidi nucleici è l'effetto "setaccio" molecolare: le molecole piccole si muoveranno più velocemente di quelle più grandi incontrando minor difficoltà nel passare attraverso i pori del gel. La separazione avviene, quindi, grazie al differente peso molecolare che hanno i vari frammenti di DNA all'interno del campione e alla loro forma. Si ottiene già una buona separazione per molecole che hanno peso molecolare che differisce dell'1% (Paolella *et*

al., 2000). Quando la separazione è completata, il DNA è visualizzato bagnando il gel in una soluzione diluita di tintura di bromuro di etidio (EtBr) fluorescente. Il bromuro di etidio tende a legarsi al DNA e quindi, dopo che il gel viene lavato per eliminare la tintura non legata, se stimolato da raggi ultravioletti (300-350 nm) emette una luce a 500-650 nm, evidenziando la presenza di DNA. E' necessario ricordare che il bromuro di etidio è una sostanza cancerogena, pertanto va maneggiata con cautela, usando i guanti e operando sotto cappa se si adoperano le polveri. Per questo motivo sono stati recentemente sviluppati altri tipi di colorazioni, che utilizzano Gel Red, sali di argento, blu di metilene. Il gel con le bande fluorescenti viene, infine, fotografato. Per poter stabilire la lunghezza delle varie specie molecolari presenti nel campione è conveniente posizionare sul gel, accanto al campione, un marcatore. Nel caso del DNA si tratta di una serie di frammenti di lunghezza nota e definita. Al termine dell'elettroforesi, il confronto tra la mobilità del campione rispetto al marcatore, permetterà di determinare con buona approssimazione le caratteristiche del campione. La fase successiva consiste nella purificazione dei prodotti di PCR, che ha lo scopo di rimuovere i primers, i nucleotidi non incorporati, sali ed enzimi.

6.10 SEQUENZIAMENTO ED ANALISI POST-PCR

Il sequenziamento è la tecnica che ci fornisce l'esatta sequenza dei nucleotidi che compongono l'acido nucleico, quindi serve per ottenere informazioni dirette sui prodotti di PCR. La reazione di sequenziamento ad oggi maggiormente utilizzata nei laboratori è quella basata sul metodo di Sanger, nel quale è prevista un'ulteriore amplificazione del frammento d'interesse con quella che viene definita "PCR di sequenziamento". Questa tecnica prevede l'utilizzo di dideossinucleotidi marcati (ddNTP) con quattro fluorocromi diversi. Questi ddNTPs vengono incorporati e ciò interrompe l'azione della polimerasi con conseguente formazione di una molecola fluorescente. Tale incorporazione è casuale e ciò permette la formazione di frammenti di lunghezza diversa, a seconda del ddNTP che è stato incorporato. Successivamente, viene eseguita la lettura dei prodotti di amplificazione con un fascio laser e avremo la formazione di picchi caratterizzati da differenti lunghezze d'onda per ogni dideossinucleotide-fluorocromo. L'altezza di un picco dipende dall'intensità con cui un gruppo di molecole risponde all'eccitazione laser. La successiva lettura dei picchi permette di risalire all'esatta disposizione dei nucleotidi sulla sequenza (Sanger *et al.*, 1977). Una volta completato il sequenziamento, i dati verranno analizzati nella fase computerizzata di analisi bioinformatica. Il sequenziamento sta alla base della metodica FINS, spesso utilizzata nel comparto ittico per l'identificazione di numerose

specie (Espineira *et al.*, 2008; Pepe *et al.*, 2007; Lago *et al.*, 2012). La tecnica FINS fu descritta per la prima volta da Barlett e Davidson nel 1992 e consiste nell'amplificare tramite la reazione di PCR uno specifico frammento di DNA, determinarne la sequenza nucleotidica e confrontarla con quelle presenti nel database, utilizzando l'analisi filogenetica. La filogenetica molecolare studia le relazioni evolutive gerarchiche tra organismi (detti anche taxa) utilizzando, appunto, dati molecolari. Queste relazioni sono tipicamente descritte attraverso alberi filogenetici, cioè grafici costituiti da nodi, rami e foglie. Le foglie (nodi esterni) sono etichettate con le specie o le sequenze note che si vogliono confrontare; i nodi interni rappresentano ipotetici predecessori incogniti degli oggetti iniziali. I rami definiscono le relazioni in termini di discendenza evolutiva (Felsenstein, 2004). Una categoria di metodi per la costruzione di alberi si basa sull'osservazione che gli alberi stessi possono essere rappresentati dalle distanze. Tali metodi sono detti metodi-distanza e cercano di convertire la distanza tra due sequenze in alberi filogenetici. La filogenetica molecolare si basa, sostanzialmente, sul concetto che gli "errori" nella trasmissione genetica sono alla base dei processi evolutivi che, a partire da una forma primitiva, hanno prodotto nel tempo l'enorme diversità delle forme di vita attuali. Anche se l'apparato di replicazione è molto accurato è possibile che, sebbene con una probabilità molto piccola, si verifichino degli errori, ovvero mutazioni della sequenza di DNA che possono poi essere eventualmente "fissati" in tutta la popolazione degli individui di quella specie o in una larga frazione di essa. Oltre alla sostituzione di un nucleotide con un altro, lungo la sequenza di DNA, possono intervenire altri cambiamenti dovuti all'inserzione o alla delezione di tratti più o meno lunghi di DNA, oppure a riarrangiamenti di vario tipo. Questo spiega perchè gli organismi viventi, pur discendendo da un unico progenitore comune, posseggono genomi di dimensioni molto diverse tra loro, da alcuni milioni di nucleotidi nei batteri a circa tre miliardi nell'uomo (Valle *et al.*, 2003). Attualmente, anche il metodo BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) è molto utilizzato: dall'originaria formulazione ad oggi, ha rappresentato un validissimo strumento d'analisi, che numerosi server bioinformatici consentono di utilizzare on-line per ricerche nelle principali banche dati. Sono state sviluppate numerose applicazioni, basate sul metodo BLAST, ma ottimizzate per il tipo di ricerca, sonda e database nei quali si intenda cercare sequenze omologhe. Gli algoritmi di BLAST sono stati progressivamente potenziati, implementando nuove funzioni che consentono, ad esempio, di adottare matrici definite sulla base del set dei dati in analisi o di integrare l'analisi di similarità con quella per pattern. Il principale server che ospita pagine dedicate a BLAST è quello dell'NCBI (sito

web www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Filippini, 2002). L'algoritmo BLAST rappresenta un processo euristico che identifica molto rapidamente sequenze simili tra loro, avente la specifica caratteristica di assegnare anche un valore di significatività statistica alla corrispondenza trovata (Altschul *et al.*, 1997). Questo valore ("*expect value*", o valore "E") corrisponde al numero di confronti tra due sequenze con un punteggio di somiglianza uguale o superiore che si potrebbero trovare, in quella particolare banca dati, solo per effetto del caso; quanto più è piccolo quel valore, tanto più la corrispondenza è significativa (Lenzi e Strippoli, 2010). Infine, per quanto riguarda le tecniche basate sul sequenziamento e successivo confronto con una banca dati di sequenze di riferimento, una delle maggiori svolte è sicuramente dovuta a Paul Hebert, un ricercatore dell'università di Guelph in Ontario (Canada), che propose una tecnica chiamata "DNA *barcoding*", per l'identificazione di specie. Questa tecnica utilizza brevi sequenze di DNA come fossero i codici a barre dei prodotti che ritroviamo comunemente al supermercato. Ogni specie, quindi, può essere etichettata grazie a quella sequenza specifica di DNA. Il grosso vantaggio di questa metodica è che quella sequenza può essere utilizzata, successivamente, come riferimento per identificare una nuova specie. Un aspetto importante di questa tecnica innovativa è la costruzione di veri e propri database pubblici, contenenti tutte le sequenze delle specie già identificate. Questo permette di inserire una sequenza di DNA appartenente ad una specie ignota all'interno del database stesso e tale sequenza verrà confrontata con le altre già depositate. Ci sono alcuni geni che risultano più appropriati di altri per la metodica del DNA *barcoding*. In particolare, il gene ideale dovrebbe avere alcune caratteristiche:

- essere sufficientemente conservato per essere amplificato, ottenendo molte copie di un gene, essenziali per poter procedere con il sequenziamento con primers uguali;
- essere abbastanza divergente da consentire di identificare e distinguere specie strettamente imparentate;
- non avere una lunghezza superiore a 650 basi nucleotidiche, che risulta essere ideale affinché un gene sia sequenziato rapidamente e senza errori.

La tecnica del DNA *barcoding* si basa sull'uso di primers universali per amplificare una regione di 650 paia di basi del gene mitocondriale *COI* (citocromo ossidasi subunità I), che viene, appunto, utilizzata come un codice a barre per la maggior parte delle specie animali (Hebert *et al.*, 2003; Savolainen *et al.*, 2005). Questa regione viene, dunque, sequenziata per ottenere il DNA *barcode* della specie analizzata, che verrà, successivamente, confrontato con la sequenza del campione di riferimento per ottenere l'identificazione di

specie. Un elemento essenziale per il DNA *barcoding* è la costruzione di una biblioteca di consultazione pubblica contenenti sequenze ottenute da esemplari di riferimento che possono essere usate per identificare le specie sconosciute. Uno dei più importanti è GenBank, database realizzato dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e accessibile all'indirizzo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Questo database, tuttavia, non risulta adatto nella sicura identificazione di specie in ambito ispettivo basata sull'analisi BLAST, in quanto non è prevista alcuna forma di controllo sulle informazioni inserite. Per far fronte a ciò sono nate diverse iniziative con l'obiettivo di costituire banche dati sicure dal punto di vista dei controlli delle sequenze depositate. Il consorzio del *Barcoding of Life* (BOLD), per esempio, si pone l'obiettivo di raccogliere le sequenze del gene della citocromo-ossidasi subunità I (*COI*), eletto a "target ufficiale" in quanto particolarmente promettente per l'identificazione delle specie animali. Questo gene, infatti, presenta una variabilità limitata nell'ambito della stessa specie, mentre il grado di variabilità aumenta in individui appartenenti a specie diverse. Il BOLD è accessibile dal sito www.boldsystem.org. Per poter essere depositate in questo database le sequenze geniche devono rispettare alcuni requisiti: devono derivare da una regione specifica del gene; devono rispettare gli standard qualitativi; ci deve essere un collegamento tra la sequenza ed il campione d'origine (Hanner *et al.*, 2007). Inoltre, rispetto ai classici database, BOLD presenta condizioni più stringenti per il deposito delle sequenze. Infatti, le sequenze che vengono depositate nel sistema devono riportare sia informazioni relative al campione (nome della specie, codice identificativo assegnato dall'istituto che detiene il tessuto o l'organismo di riferimento, dati relativi alla raccolta, colui che ha morfologicamente identificato l'esemplare) che informazioni relative alla sequenza (sequenze non inferiori a 500 pb, primers utilizzati per l'amplificazione, trace files delle sequenze). Il gene *COI* si è dimostrato un gene universale e affidabile per l'identificazione di varie specie di pesci, sia marini (Ward *et al.*, 2005) che di acqua dolce (Steinke *et al.*, 2005). La tecnica del DNA *barcoding* presenta uno svantaggio quando viene applicato a prodotti contenenti una miscela di specie, perché non riesce a discriminare la specie presente in minor quantità o la specie la cui sequenza di DNA ha minor affinità per i primers utilizzati. Infatti, un recente studio (Helyar *et al.*, 2014), ha dimostrato che, ripetendo l'estrazione di DNA ed il sequenziamento a partire dallo stesso campione, ma utilizzando aliquote prelevate in punti differenti del prodotto, è possibile ritrovare specie diverse. Dopo anni in cui il "Sanger sequencing" ha rappresentato il *gold standard* della diagnostica genetica molecolare mondiale, le tecniche di nuova generazione (*Next Generation Sequencing* - NGS, detta

anche *second generation sequencing*) si stanno diffondendo in molti settori (Tuschl *et al.*, 2009). La NGS è anche chiamata *high-throughput sequencing* (sequenziamento ad alta resa) perché, a differenza del sequenziamento tradizionale col metodo Sanger, consente di sequenziare moltissimi frammenti in parallelo. Esistono diversi sistemi NGS, sviluppati da varie compagnie. Tutti questi sistemi, tuttavia, condividono almeno tre passi fondamentali: la preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta *sequencing library*), la reazione di amplificazione e la reazione di sequenziamento (Shendure e Ji, 2008). Nonostante le sue potenzialità l'NGS non è ancora stato applicato al comparto dell'ispezione degli alimenti mentre risulta essere utilizzato soprattutto per la diagnosi di malattie genetiche ereditarie, per la ricerca contro il cancro e per studi di metagenomica (Vitale, 2012). Ad esempio, la sua applicazione potrebbe essere di grande ausilio nel caso delle preparazioni a base di surimi nelle quali sono presumibilmente utilizzate più specie di pesce, come dimostrato dal recente lavoro di Galal-Khallaf *et al.*, 2016, in cui però è stata utilizzata la metodica del clonaggio. Questa tecnica prevede tre principali steps: in primis, il frammento target viene amplificato tramite la reazione di PCR. Successivamente, i prodotti di PCR vengono clonati, con l'ausilio di diversi kit che si ritrovano attualmente in commercio: essenzialmente, si ha una fase di combinazione tra i prodotti di PCR e un vettore di clonaggio, seguita da una fase di trasformazione utilizzando cellule competenti (per esempio di *Escherichia coli*). Le cellule vengono, poi, coltivate su opportuni terreni selettivi, al fine di selezionare solo quelle contenenti il costrutto. Infine, i cloni vengono sequenziati. Questa tecnica, tuttavia, risulta dispendiosa, in termini economici e di tempo, infatti risulta poco utilizzata per quanto riguarda l'identificazione di specie (Teletchea, 2008).

Infine, da ricordare l'utilizzo di DNA *microarrays* (Landi e Blohm, 2008), strumenti diagnostici costituiti da una superficie solida composta da vetro o silicone alla quale sono state applicate migliaia di sequenze oligonucleotidiche. Ogni sequenza genetica rappresenta una porzione di un gene o di una parte del genoma di un organismo e agisce come sonda, ovvero permette l'ibridizzazione con un sequenza genetica target. Possono essere quindi utilizzate sequenze in grado di rilevare porzioni di DNA tipiche di una specie. Il DNA estratto da un prodotto ittico di specie sconosciuta viene marcato con sostanze fluorescenti e, se presente sul *microarray*, si legherà alla sonda complementare per andare poi incontro a ibridazione. Le sequenze genetiche legate al *microarray* rimarranno adese anche dopo aver eseguito una serie di lavaggi e, poiché sono marcate con sostanze fluorescenti, potranno essere svelate mediante strumenti in grado di percepire il

segnale luminoso e quantificarlo. Il punto di forza di questa tecnica è che, mentre la maggior parte delle tecniche basate sull'amplificazione e sequenziamento del DNA permettono l'identificazione di una o poche specie, questa consiste proprio nel poter indagare contemporaneamente riguardo la presenza di un gran numero di differenti sequenze genetiche, quindi di eseguire l'equivalente di migliaia di test in tempi molto brevi. Inoltre, i DNA *microarrays* risultano particolarmente efficaci rispetto ad altre tecniche analitiche per la verifica dell'etichettatura di prodotti costituiti da una grande varietà di specie ittiche perché, grazie alla loro capacità di eseguire più test contemporaneamente, consentono di ottenere risultati in tempi molto rapidi. Attualmente, però, una delle limitazioni maggiori per l'impiego dei *microarrays* è rappresentata dalla disponibilità di sonde specifiche affidabili. Non sempre, infatti, le sequenze oligonucleotidiche disegnate in laboratorio manifestano una capacità di ibridazione sufficiente quando applicate "sul campo" e questo influisce negativamente sulle caratteristiche diagnostiche della tecnica. Inoltre, questa metodica presenta dei costi molto elevati, per cui, attualmente, risulta essere poco utilizzata per quanto riguarda l'identificazione di specie.

CAPITOLO 7. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni la popolarità dei prodotti ittici è sicuramente aumentata, grazie a molteplici fattori che hanno modificato il contesto socio culturale. In particolare, la necessità di accorciare i tempi di preparazione dei pasti, ha indirizzato il consumatore verso cibi già pronti, caratterizzati da prezzi modesti e da praticità di utilizzo. Tra i prodotti ittici, i *ready to eat* e *ready to cook* sono potenzialmente più soggetti a frodi, poiché le condizioni di produzione comportano una perdita delle caratteristiche anatomiche e, quindi, rendono impossibile l'identificazione morfologica delle specie utilizzate. Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di effettuare una valutazione della qualità del DNA estratto a partire da 40 preparazioni a base di surimi. In particolare, attraverso una corsa elettroforetica è stata valutato il livello di degradazione del DNA estratto mentre, la metodica del DNA *barcoding*, utilizzata per l'analisi del gene *16S rRNA* e del gene *COI*, è stata utilizzata per valutare l'amplificabilità del DNA. Infine, è stata effettuata un'analisi delle etichette alla luce della normativa vigente.

CAPITOLO 8. MATERIALI E METODI

8.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

8.1.1 *Campioni di riferimento*

122 campioni di tessuto di pesci e 10 di cefalopodi, conservati in etanolo, essiccati o liofilizzati, provenienti da esemplari identificati a livello di genere o di specie sulla base delle caratteristiche morfologiche, o su base molecolare, sono stati gentilmente forniti da Istituti di Ricerca e Musei o raccolti in precedenti studi (Tabella 3). In totale, i campioni analizzati appartenevano a 41 specie (fino a 5 esemplari per specie), 27 generi e 19 famiglie per quanto riguarda i pesci e a 4 specie, 3 generi e 2 famiglie per quanto riguarda i cefalopodi.

8.1.2 *Prodotti commerciali*

In totale sono stati raccolti 40 prodotti a base di surimi, costituiti da un numero variabile di unità (da 3 a 10). 19 sono stati acquistati presso esercizi commerciali al dettaglio, mentre 21 sono stati raccolti dal personale PIF di Livorno, da partite di prodotti in entrata da Paesi Terzi. Ad ogni prodotto è stato attribuito un codice interno e tutte le informazioni riportate sull'etichetta sono state registrate ed analizzate in funzione della normativa in vigore (Regolamento 1169/2011) (Tabella 4). Successivamente, un'aliquota di tessuto è stata prelevata e stoccata a -20°C fino all'estrazione del DNA.

8.2 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE

I campioni conservati in etanolo, quelli essiccati e liofilizzati hanno subito un pretrattamento di lavaggio/reidratazione, utilizzando un tampone a base di NaH_2PO_4 a pH 8 per una durata di 15 minuti a temperatura ambiente, in agitazione continua su un agitatore tipo Vortex-Genie®, digital (Scientific industries, Inc. NY, 11716 USA). Successivamente l'estrazione del DNA totale è stata condotta secondo il protocollo proposto da Armani *et al.*, (2014). Nel caso dei campioni di riferimento, l'estrazione è stata effettuata a partire da circa 100 mg, quando possibile in doppio.

Nel caso dei campioni commerciali, l'estrazione è stata effettuata a partire da circa 200 mg di tessuto prelevati da 5 differenti unità che costituivano ogni singolo prodotto. Nel caso di prodotti costituiti da meno di 5 unità tutte le unità sono state campionate. Per i campioni

commerciali l'estrazione è stata condotta in doppio. Di seguito sono riportati le soluzioni e i reagenti utilizzati e le fasi del protocollo estrattivo in forma schematica.

Soluzioni e reagenti:

Buffer di Lisi: Tris base 500 mM , EDTA 100 mM,, NaCl 100mM, SDS 2%

Tampone Fosfato:NaH₂PO₄ 300mM pH 8.0

Proteinasi K 20mg/ml

Acetato di Sodio 4 M pH 8.3

Isopropanolo puro

Etanolo 70%, 100%

Protocollo estrattivo:

- 1) Preparazione del campione, omogeneizzazione e digestione enzimatica: in una provetta da 2 ml sono stati aggiunti 100 µl di buffer di lisi, 100 µl di NaH₂PO₄ e 10 µl di proteinasi K 20 mg/ml ogni 100 mg di tessuto. Sono state aggiunte 10 *beads* (Armani *et al.*, 2014) ogni 200 mg di campione. I campioni sono stati posti in agitazione continua su termoblocco T-shaker (EuroClone S.p.A., Milano, Italia) per 50' a 60°C; a termine del periodo di incubazione il digesto è stato centrifugato a 15-16000x g per 2' per separare il surnatante liquido dai detriti cellulari;
- 2) *Salting out* delle proteine: misurato il volume, la fase liquida è stata trasferita in una nuova provetta da 2 ml e sono stati aggiunti 0,5 volumi di Acetato di sodio 4M; il campione è stato poi mescolato, lasciato a RT (temperatura ambiente) per 5' e infine centrifugato a 15-16000x g per 5';
- 3) Precipitazione del DNA: il volume del surnatante è stato raccolto e misurato; sono poi stati aggiunti 0,8 volumi di isopropanolo; il campione è stato mescolato, lasciato a RT per 10' ed infine centrifugato nuovamente a 15-16000x g per 10';
- 4) Lavaggio del DNA e allontanamento dei sali residui: il surnatante è stato allontanato per inversione della provetta ed il *pellet* di DNA è stato lavato con Etanolo al 70%; il campione è stato poi centrifugato a 15000x g per 5'. E' stato poi effettuato un ciclo di lavaggio finale con Etanolo al 100%;
- 5) Asciugatura e solubilizzazione del DNA totale estratto: le provette sono state poste in stufa a 50-70 °C per far evaporare l'etanolo residuo prima di risospendere il *pellet* in H₂O deionizzata sterile (Molecular grade DNasi,-RNasi, proteasi free).

8.3 QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA E VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' DEL DNA TOTALE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO.

8.3.1 Misurazione della concentrazione del DNA estratto

La quantità di DNA estratta da tutti i campioni (riferimento e commerciali) è stata valutata attraverso uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, US), misurando l'assorbanza a 260 nm. Il grado di purezza del DNA è stato valutato in base al rapporto di assorbanza a 260/280 nm e a 260/230 nm.

8.3.2 Elettroforesi del DNA totale su gel d'Agarosio

1 µg di DNA totale estratto dai campioni commerciali è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio 1% (GellyPhorLE® Euroclone, Life Sciences Division PV, Italia), colorato con GelRed™ Nucleid Acid Gel Stain 10000X w. solution (Biotium, Hayward, CA, USA). La corsa elettroforetica è stata effettuata con un voltaggio di 200V, per 50 minuti. I campioni sono stati osservati tramite transilluminazione UV. Il livello di frammentazione del DNA è quindi stato valutato tramite comparazione con i marker molecolari Standard SharpMass™ 50DNA ladder e SharpMass™ 1-DNA ladder (Euroclone, Life Sciences Division, PV, Italia). I campioni di DNA sono stati classificati in 4 categorie, in base al pattern del loro DNA: <250 pb, compresi tra 250 pb e 500 pb, compresi tra 500 pb e 1000 pb e >1000 pb.

8.4 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DEI PRIMERS UNIVERSALI NELL'AMPLIFICAZIONE DEL DNA DELLE SPECIE DI RIFERIMENTO

8.4.1 Selezione dei primers.

I primers valutati in questa fase (Tabella 5) possono essere distinti in due categorie in funzione della lunghezza dell'amplicone ottenibile:

Primers per l'ottenimento di un frammento lungo (> di 500 pb):

- Palumbi, 1996, (P1), per l'ottenimento di un frammento di lunghezza di circa 650 pb del gene mitocondriale *16S*
- Handy *et al.*, 2011, (H), per l'ottenimento di un frammento di lunghezza pari a 655 pb del gene mitocondriale *COI*;
- Mikkelsen *et al.*, 2006, (M) per l'ottenimento di un frammento di lunghezza pari a

650 pb del gene mitocondriale *COI*.

Primers per l'ottenimento di un frammento breve (< di 500 pb):

- 16S *PC*,(P2) per l'ottenimento di un frammento di lunghezza pari a 350 pb del gene mitocondriale *16S* (Armani *et al.*, 2012);
- Revshort1 (Armani *et al.*, 2015) + forward (Handy *et al.*, 2011), (SH), per l'ottenimento di un frammento di lunghezza pari a 139 pb del gene mitocondriale *COI*.

8.4.2 Amplificazione

Tutti i campioni di DNA ottenuti dai campioni identificati sono stati amplificati utilizzando i primers sopra riportati. In particolare, per quanto riguarda la coppia di primers P1 e la coppia di primers P2, il protocollo seguito è stato il seguente: 20 µl di volume finale di reazione contenente 2 µl di buffer 10x (5Prime, Gaithersburg, USA), 200 µM di ogni dNTP, 250 nM di primers, 25 ng/µL di BSA, 1,25 U di PerfectTaq DNA Polymerase, 100 ng di DNA totale ed acqua (*DNase free*) fino a raggiungimento del volume. Per quanto riguarda, invece, le coppie di primers H e M, il protocollo seguito è stato il seguente: 20 µl di volume finale di reazione contenente 2 µl di buffer 10X (5Prime, Gaithersburg, USA), 200 µM di ogni dNTP, 300 nM di primers, 25 ng/µl di BSA, 1,25 U di PerfectTaq DNA Polymerase, 100 ng di DNA totale ed acqua (*DNase free*) fino a raggiungimento del volume. Per la coppia di primers SH, il protocollo seguito è stato il seguente: 20 µl di volume finale di reazione contenente 2 µl di buffer 10x (5Primer, Gaithersburg, USA), 100 µM di ogni dNTP, 300 nM di primers, 25 ng/µl di BSA, 1,25 U di PerfectTaq DNA Polymerase, 100 ng di DNA ed acqua (*DNase free*) fino a raggiungimento del volume.

I programmi di amplificazione per ciascuna coppia di primers utilizzata sono riportati in Tabella 6. La presenza degli amplificati attesi è stata verificata mediante corsa elettroforetica di 5 µl di prodotto di PCR su gel di agarosio al 2%, confrontando la lunghezza dei frammenti con la scala dell'indicatore Standard SharpMass TM50-DNA (Euroclone, Life Sciences Division, PV, Italia).

I risultati dell'amplificazione ottenuti con ogni coppia di primers sono stati utilizzati per calcolare:

- tasso di amplificazione: numero di bande ottenute / numero di campioni di DNA amplificati;
- intensità della banda (concentrazione dell'amplicone): mediante comparazione con

le bande del marcatore. Una concentrazione di circa 10 ng/ μ L è stata assunta come soglia minima per la sequenziabilità dell'amplicone.

8.5 AMPLIFICAZIONE DEI CAMPIONI COMMERCIALI

Il DNA estratto da 5 unità di ogni prodotto (ad eccezione di due prodotti, che erano costituiti rispettivamente da 3 e 4 unità), per un totale di 197 campioni, è stato inizialmente amplificato utilizzando la coppia di primers universali P1, utilizzando il protocollo descritto nella sezione 8.4.2, indipendentemente dal livello di degradazione osservato dopo corsa elettroforetica del DNA totale (Tabella 7). I prodotti di PCR risultati flebili o non visibili sono stati nuovamente amplificati con la coppia di primers P2, (350 pb), utilizzando il programma di amplificazione descritto in tabella 6. Inoltre, per 20 campioni è stato amplificato anche un frammento del gene *COI*, utilizzando la coppia di primers H. In particolare, lo stesso frammento del DNA di 6 di questi campioni è stato amplificato anche con la coppia di primers M. Infine, per 4 campioni le cui sequenze erano risultate non utilizzabili ai fini dell'identificazione, è stato amplificato un frammento del gene mitocondriale *COI*, di lunghezza pari a 139 pb, utilizzando la coppia di primers SH.

8.5.1 Sequenziamento ed analisi delle sequenze.

I prodotti di PCR sono stati stoccati a -80°C fino all'invio ad un laboratorio esterno (<http://www.htseq.org/>), che ha provveduto alla purificazione ed al sequenziamento. Successivamente, i prodotti di PCR appartenenti a 6 campioni (SUR16.3; SUR 28.1; SUR 11.2; SUR 31.1; SUR 14.4; SUR 18.4), le cui sequenze non sono risultate utilizzabili ai fini dell'identificazione, sono stati inviati ad un secondo laboratorio esterno (<https://www.gatc-biotech.com/>). Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il programma Clustal W in MEGA versione 6 (Tamura *et al.*, 2013), e corrette manualmente dopo un'analisi visiva. Infine, sono state confrontate con le sequenze disponibili sui database (PubMed e BOLD), per la verifica dell'identità di specie. Valori di identità del 100% sono stati utilizzati come *threshold* di avvenuta identificazione per il gene *16S rRNA* e valori del 98% per il gene *COI* (Armani *et al.*, 2014). Inoltre, le sequenze ottenute sono state analizzate in funzione della loro lunghezza, assumendo 500 pb, corrispondenti al 76% della lunghezza massima ottenibile, come valore soglia per il gene mitocondriale *COI* (Handy *et al.*, 2011) e utilizzando lo stesso valore soglia per calcolare il numero delle paia basi per il gene mitocondriale *16S rRNA* (430 pb).

CAPITOLO 9. RISULTATI E DISCUSSIONI

9.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

9.1.1 Scelta delle specie di riferimento

Le specie di riferimento utilizzate nel presente studio sono state selezionate consultando la bibliografia riguardante la produzione di surimi (Tabella 1). Da questa analisi è emerso che 60 specie di pesce e 5 specie di cefalopode possono essere utilizzate per questa tipologia di produzione. Tra le famiglie maggiormente utilizzate troviamo: Gadidae, Merluccidae, Cichlidae, Pleuronectidae, Salmonidae, Carangidae, Hexagrammidae, Clupeidae, Cyprinidae, Mullidae, Priacanthidae, Sphyrnaeidae, Sciaenidae, Nemipteridae, Trichiuridae, Anoplopomatidae, Sparidae, Nototheniidae, Chirocentridae, Synodontidae, Muraenesocidae, Pomacentridae, Stromateidae, Sebastidae. Fino al 1980, la specie più utilizzata in assoluto per la produzione di surimi era *Theragra chalcogramma* (famiglia Gadidae), perché caratterizzata da un abbondante contenuto di miosina, che contiene la componente miofibrillare, responsabile delle proprietà fisiche del prodotto finito (Keskin e Atar, 2012). Successivamente, a causa della riduzione degli stock di questa specie e della crescente richiesta di surimi da parte dei consumatori, l'industria di trasformazione ha iniziato a valutare la possibilità di utilizzare specie diverse, spesso di minor valore economico e nutrizionale. Le nuove tecnologie sviluppate nel settore alimentare, infatti, hanno permesso l'utilizzo di una grande varietà di specie differenti (Vidal-Giraud e Chateau, 2007). Attualmente più del 50% della produzione totale di surimi prevede l'utilizzo di almeno una delle seguenti specie: *Nemipterus japonicus*, *Saurida undosquamis*, *Merluccius productus*, *Trachurus japonicus*, *Macruronus novaezelandiae*, *Priacanthus spp.*, *Pleurogrammus monoptygius*, *Sardina pilchardus*, *Micromesistius poutassou*, *Peprilus medius*. L'utilizzo contemporaneo di più specie nelle preparazioni a base di surimi è stata recentemente dimostrata nel lavoro di Galal-Khallaf *et al.*, 2016. Nel presente lavoro, inoltre, oltre alle specie riportate in bibliografia, sono state selezionate altre specie appartenenti allo stesso genere delle specie fraudolentemente sostituite, ritrovate nei precedenti lavori (*Gadus morhua*, *Merluccius gayi*, *Sardinella aurita*, *Chelidonichthys lucerna*) (Tabella 2). In totale sono stati raccolti 122 campioni appartenenti a 41 specie di pesci e 10 campioni appartenenti a 4 specie di cefalopodi (Tabella 3). Per quanto riguarda i campioni di pesce, 7 specie erano di acqua dolce e 34 di acqua salata. In particolare, abbiamo raccolto il 61% (37 specie su 60) delle specie di pesce

e l'80% (4/5) delle specie di cefalopodi tra quelle indicate dalla bibliografia come le più utilizzate per la produzione di surimi.

9.2 PRODOTTI COMMERCIALI

Per surimi intendiamo un impasto crudo di polpa di pesce, dal colore bianco, quasi del tutto privo di sapore e odore, che si ottiene dalla lavorazione del tessuto muscolare di varie specie ittiche (Circolare Ministeriale n.17 del 10 luglio 1989). Il processo di produzione del surimi prevede che la pasta ottenuta a partire dal tessuto muscolare dei pesci subisca una serie di lavaggi con acqua dolce per allontanare sangue, pigmenti e residui del tessuto connettivo. In un secondo momento, l'allontanamento dell'acqua in eccesso permette di ottenere un semilavorato di consistenza pastosa, al quale verranno addizionati ulteriori ingredienti, quali albume d'uovo, fecola di patate, coloranti, grassi vegetali e crioprotettori. La pasta così ottenuta viene successivamente sottoposta ad un processo di estrusione che porterà alla formazione di porzioni sempre più piccole. Il surimi, rappresenta un'ottima materia prima per la preparazione di una vastissima gamma di alimenti molto richiesti dal mercato, le così dette "preparazioni alimentari a base di surimi". Nel presente studio, sono stati analizzati 40 campioni commerciali di tali preparazioni: in particolare, 19 sono stati acquistati presso supermercati o punti vendita della grande distribuzione, mentre altri 21 campioni sono stati gentilmente forniti dal PIF di Livorno, nell'ambito di un progetto in corso con il Dipartimento di Scienze Veterinarie.

9.2.1 Analisi delle informazioni riportate in etichetta

Le informazioni riportate sulle etichette (Tabelle 4a e 4b) sono state analizzate alla luce della normativa vigente. In particolare, considerando che la normativa sull'etichettatura dei prodotti della pesca (Regolamento 1379 del 2013) si applica soltanto al surimi, ma non alle preparazioni a base di surimi, le etichette sono state analizzate soltanto in funzione del Regolamento 1169 del 2011. Tale Regolamento rappresenta, infatti, la normativa vigente applicata a tutti i prodotti alimentari e, quindi, anche alle preparazioni alimentari a base di surimi. Purtroppo, per quanto riguarda i prodotti raccolti presso il PIF, l'elenco degli ingredienti era disponibile solo per 15 etichette sul totale di 21 prodotti. Secondo l'articolo 9 del Regolamento 1169 del 2011, debbono essere riportate obbligatoriamente sulle etichette dei prodotti alimentari: 1) la denominazione dell'alimento, 2) l'elenco degli ingredienti, 3) la presenza di sostanze in grado di provocare allergia, 4) la quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti, 5) la quantità netta dell'alimento, 6) il termine

minimo di conservazione o la data di scadenza, 7) il nome o la ragione sociale e dall'indirizzo dell'operatore del settore alimentare responsabile dell'etichetta, 8) il paese d'origine o il luogo di provenienza ove previsto (non nel nostro caso) e 9) le istruzioni per l'uso (per i casi in cui la loro omissione renderebbe difficile un uso adeguato dell'alimento). Secondo l'articolo 17 di tale Regolamento *“la denominazione dell'alimento è la sua denominazione legale. In mancanza di questa, la denominazione dell'alimento è la sua denominazione usuale; ove non esista o non sia utilizzata una denominazione usuale, è fornita una denominazione descrittiva”*. Il 10% (4/40) dei prodotti presentava esclusivamente una denominazione descrittiva dell'alimento, quale, per esempio, *“preparazione alimentare a base di pesce e all'aroma di granchio”*. Il 2,5% (21/40) dei prodotti presentava esclusivamente una denominazione commerciale dell'alimento, quale, ad esempio, *“bastoncini di surimi”*. Il 22,5% (9/40) dei prodotti presentava una denominazione commerciale dell'alimento, seguita da una denominazione descrittiva, quale, ad esempio, *“bastoncini di surimi (preparazione alimentare a base di polpa di pesce al sapore di granchio)”*. Infine, il 15% (6/40) dei prodotti presentava in etichetta la dicitura *“preparazione alimentare a base di surimi”*. Inoltre, come previsto dall'allegato VI del Regolamento 1169 del 2011, *“la denominazione dell'alimento comprende o è accompagnata da un'indicazione dello stato fisico nel quale si trova il prodotto o dello specifico trattamento che esso ha subito”* il 42,5% (17/40) dei prodotti presentava tale informazione. In particolare, il 29,4% (5/17) di tali prodotti recava in etichetta la dicitura *“prodotto congelato”*, un ulteriore 29,4% di tali prodotti recava in etichetta la dicitura *“prodotto surgelato”*, il 17,6% (3/17) recava in etichetta la dicitura *“prodotto refrigerato”*, il restante 23,5% (4/17) era equamente suddiviso tra 4 categorie: *“prodotto stoccato in salamoia”*, *“prodotto sott'olio”*, *“prodotto marinato in olio di semi di girasole”* e *“prodotto impanato”*. Nel restante 57,5% (23/40) dei prodotti la denominazione dell'alimento non era accompagnata da una descrizione dello stato fisico del prodotto. Per quanto riguarda la dichiarazione di qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico in grado di provocare allergie o intolleranze, è importante sottolineare che pesci, molluschi e crostacei figurano tra le sostanze allergizzanti elencate nell'Allegato II del Regolamento 1169 del 2011 e pertanto devono essere messi in chiaro, con caratteri in grassetto o con un colore diverso per renderli più evidenti e distinguibili dagli altri ingredienti. Il 58,8% (20/34) dei prodotti acquistati presso vari supermercati presentava tra gli ingredienti la dicitura *“pesce”* sempre evidenziata in grassetto, il 38,2% (13/34) si limitava a dichiarare in etichetta la presenza di *“surimi”* e, tra questi prodotti, il 38,4% (5/13) evidenziava tale dicitura in grassetto, mentre

il restante 61,5% (8/13) non evidenziava in nessun modo la dicitura “surimi”. Inoltre, il 2,9% (1/34) dei prodotti riportava nello specifico la specie ittica utilizzata (“*Pollack d’Alaska*”), non evidenziata come allergene. Tuttavia, la sola dicitura “surimi” risulta poco chiara nei confronti del consumatore allergico ad una sola categoria di prodotti. Infatti, non è detto che un consumatore medio sappia che il surimi è costituito da polpa di pesce. Inoltre, nonostante la Circolare Ministeriale n.17 del 10 luglio 1989 definisca il surimi come “*un impasto crudo di polpa di pesce*”, negli ultimi anni, anche i cefalopodi vengono utilizzati nella preparazione di questo prodotto. Pertanto, la sola dizione “surimi” potrebbe risultare fuorviante per quei consumatori esclusivamente allergici ai cefalopodi ma non al pesce (Panzani *et al.*, 2010). A tal proposito ricordiamo che il 15,8% (3/19) dei prodotti acquistati dichiarava in etichetta la presenza di cefalopodi, sempre evidenziata in grassetto. Il 29,4% (10/34) dei prodotti presentava in etichetta la quantità percentuale riferibile all’ingrediente espresso come “pesce”; il 64,7% (22/34) a quello espresso come “surimi”, mentre il 2,9% (1/34) a quello della specie ittica utilizzata. Infine, un ulteriore 2,9% di tali prodotti non dichiarava nessuna percentuale riferibile all’ingrediente “pesce”, “surimi” o alla specie utilizzata. La dichiarazione della percentuale di surimi risulta conforme all’articolo 22 del Regolamento 1169 del 2011. Tale articolo, infatti, dichiara che “*l’indicazione della quantità di un ingrediente o di una categoria di ingredienti utilizzati nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento è richiesta quando tale ingrediente o categoria di ingredienti figura nella denominazione dell’alimento o è generalmente associato a tale denominazione dal consumatore*”. Nel complesso, le 34 etichette analizzate dichiaravano una percentuale di surimi compresa tra un minimo del 25% ed un massimo del 78%. Tra le informazioni da riportare obbligatoriamente in etichetta, secondo il Regolamento 1169 del 2011, ritroviamo anche il paese e le generalità del responsabile dell’etichetta. A tal proposito, la sede del produttore (che coincideva con il responsabile dell’etichetta) risultava nel 2,5% (1/40) dei prodotti la Corea, nel 2,5% l’Italia, nel 5% (2/40) dei prodotti il Belgio, nel 7,5% (3/40) la Lituania, nel 7,5% (3/40) la Spagna, nel 20% (8/40) la Francia, nel 35% (14/40) la Thailandia. Questi dati sottolineano che, nonostante la produzione ed il consumo di surimi rappresentino un fenomeno tipico dei Paesi asiatici, specialmente negli ultimi anni, l’Europa si sta distinguendo per quanto riguarda l’industria di trasformazione di questo prodotto. Nonostante non sia obbligatorio riportare per i prodotti della pesca trasformati la denominazione scientifica della specie utilizzata, il 67,5% (27/40) dei prodotti riportava tale informazione ed inoltre il 48,1% (13/27) forniva anche l’area FAO di cattura. Infine, in conformità all’allegato VI del

Regolamento 1169 del 2011, tutti i campioni avrebbero dovuto riportare in etichetta la dicitura “*pesce ricomposto*”, ma solo il 5% (2/40) dei prodotti forniva tale informazione. Come sottolineato nel paragrafo 9.1.1, la specie più utilizzata, per molto tempo, per la produzione del surimi è stata *Theragra chalcogramma*. A conferma di ciò, gli studi precedenti (Pepe *et al.*, 2007; Keskin e Atar, 2012), hanno analizzato prodotti commerciali le cui etichette dichiaravano la presenza della sola specie *Theragra chalcogramma*, utilizzando di conseguenza tecniche come il DNA *barcoding* indirizzate alla ricerca di una singola specie. Nel presente lavoro, il 37% (10/27) dei campioni riportava in etichetta la presenza di una sola specie. In particolare, solo il 14,8% (4/27) dei campioni riportava in etichetta la presenza esclusiva di *Theragra chalcogramma*, l’11,1% (3/27) dei campioni riportava in etichetta la presenza esclusiva di *Nemipterus japonicus* ed un ulteriore 11,1% (3/27) era equamente suddiviso tra *Nemipterus bleekeri*, *Nemipterus virgatus* e *Nemipterus nemurus*. Il restante 62,9% (17/27) dei campioni riportava in etichetta la presenza di più specie. In particolare, il 29,6% (8/27) dei prodotti riportava in etichetta la presenza di *Nemipterus* sp., il 3,7% (1/27) dei prodotti riportava in etichetta la presenza di *Nemipterus* sp. e *Portunus* sp., l’11,1% (3/27) dei prodotti riportava in etichetta la presenza di *Nemipterus* sp. e *Priacanthus* sp., il 7,4% (2/27) dei prodotti riportava in etichetta la presenza di *Priacanthus* sp., *Nemipterus* sp. e *Theragra chalcogramma*, un ulteriore 7,4% dei prodotti riportava in etichetta la presenza di *Nemipterus* sp., *Portunus* sp. e *Carcinus maenus* ed, infine, il 3,7% dei prodotti riportava in etichetta la presenza di *Theragra chalcogramma*, *Nemipterus* sp., *Priacanthus* sp., *Pollachius virens*, *Gadus macrocephalus*, *Pennatia* sp. e *Synodus saurus*.

9.3 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE

9.3.1 Campioni di riferimento

Per quanto riguarda i campioni identificati, è stata eseguita un'estrazione che ha sfruttato la metodica “*salting out*”, seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 8.2. L'estrazione, quando possibile, è stata condotta in doppio: questo ci ha permesso di scegliere, per ciascun campione di DNA estratto, quello che presentava una migliore qualità. Per quanto, invece, riguarda i campioni conservati in etanolo, liofilizzati ed essiccati, questi hanno subito un preliminare trattamento con un tampone a base di NaH_2PO_4 a pH 8, con lo scopo di reidratare il tessuto.

9.3.2 Campioni commerciali.

Considerando le limitazioni associate alla tecnica del DNA *barcoding* in prodotti multispecie (Huxley-Jones *et al.*, 2012; Galal-Khallaf *et al.*, 2016; Helyar *et al.*, 2014), in questo lavoro di tesi è stata posta particolare attenzione al campionamento. Infatti, anche se la miscela di polpa di pesce (surimi) utilizzata per la produzione dovrebbe avere una composizione omogenea nell'impasto, effettuare il campionamento in punti diversi del prodotto potrebbe facilitare l'estrazione di DNA appartenenti a specie differenti. A tale proposito, un recente lavoro ha dimostrato che, ripetendo l'estrazione del DNA a partire dallo stesso campione, ma utilizzando aliquote prelevate in punti differenti, sono stati ottenuti risultati diversi in seguito al sequenziamento (Helyar *et al.*, 2014).

Considerando, quindi, il processo di produzione del surimi, che vede la formazione dei classici bastoncini a partire dall'estrusione di un singolo pane, nel presente lavoro il campionamento è stato effettuato a partire da 5 diverse unità che corrispondono, quindi, a 5 campionamenti diversi della stessa matrice. Le singole unità, dunque, derivavano dallo stesso pane, ma si trovavano in punti diversi dello stesso. Per i campioni commerciali abbiamo seguito lo stesso protocollo di estrazione utilizzato per i campioni di riferimento, ma con l'ausilio delle *beads*, che hanno favorito la digestione (Armani *et al.*, 2014).

9.4 QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA E VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' DEL DNA TOTALE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO.

9.4.1 Misurazione della concentrazione del DNA estratto.

Per quanto riguarda i campioni di riferimento e, in particolar modo i tessuti freschi, in generale, le letture spettrofotometriche effettuate sul DNA hanno mostrato una buona qualità dell'estratto (Tabella 9a). Infatti, la concentrazione media di DNA è risultata pari a 2089,2 ng/ μ l (range tra 165 ng/ μ l e 2782 ng/ μ l), con una resa media pari a 0,8 (range tra 0,04 e 3,6), mentre il rapporto 260/280 è risultato, in media, pari a 2,03 (range tra 1,59 e 2,17) ed il rapporto 260/230 è risultato, in media, pari a 1,83 (range tra 1,02 e 2,23). Per quanto, invece, riguarda i campioni di riferimento conservati in etanolo o liofilizzati, nonostante, in generale, la concentrazione del DNA estratto sia stata soddisfacente, spesso la qualità di tale DNA non è stata ottimale. Per quanto riguarda i campioni commerciali la concentrazione di DNA estratto è risultata, nella maggior parte dei casi, soddisfacente (Tabella 9b): in particolare, la concentrazione media è risultata pari a 621,6 ng/ μ l (range tra

123,0 ng/μl e 1967,0 ng/μl), con una resa media pari a 0,16 (range tra 0,03 e 0,6), mentre il rapporto 260/280 è risultato, in media, pari a 2,00 (range tra 1,65 e 2,15). Il rapporto 260/230, invece, è risultato, in media, pari a 1,56 (range tra 0,78 e 2,02). Per quanto riguarda la qualità del DNA dei campioni commerciali è necessario sottolineare che il rapporto 260/280 è quasi sempre risultato ottimale, in quanto compreso tra 1,8 e 2,0. Il rapporto 260/230, invece, è risultato leggermente inferiore rispetto a quello standard, che dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2,4 (Armani *et al.*, 2014). Questo potrebbe essere causato dalla presenza di sostanze quali carboidrati o peptidi (Puchooa, 2004). Tutto ciò è comprensibile se pensiamo che le preparazioni a base di surimi sono prodotti ricchi di vari ingredienti quali amidi, fecola di patate, albume d'uovo e grassi vegetali che, evidentemente, non è stato possibile allontanare del tutto con il protocollo di estrazione seguito. Questo dato, inoltre, risulta in linea con uno studio precedente (Armani *et al.*, 2012), dove il rapporto di assorbanza 260/230 del DNA di campioni di crocchette di pesce è risultato, in media, pari a 1,60. E' possibile affermare, comunque, che la metodica di estrazione seguita ha dato buoni risultati e, nonostante si stiano diffondendo in commercio kit pronti per l'estrazione di DNA da matrici alimentari, che sono stati utilizzati anche in alcuni lavori precedenti (Keskin e Atar, 2012; Helyar *et al.*, 2014; Galal-Khallaf *et al.*, 2016) il nostro protocollo ha soddisfatto le aspettative. Infatti, tutti i campioni sono stati successivamente amplificati senza difficoltà (vedi sezione 9.5.2).

9.4.2 Elettroforesi del DNA totale su gel d'Agarosio

La degradazione del DNA rappresenta uno dei maggiori ostacoli nell'identificazione di specie nei prodotti ittici trasformati. Infatti, diversi studi hanno messo in evidenza che il DNA estratto dai prodotti trasformati risulta essere più degradato rispetto a prodotti non trasformati. Ciò è probabilmente causato dai vari trattamenti a cui i prodotti sono sottoposti, che comprendono l'utilizzo di alte temperature, bassi pH, alte pressioni, che causano degradazione enzimatica, depurinazione ed idrolisi (Evans, 2007). Inoltre, è noto che il DNA di molti prodotti trasformati non solo è degradato (Tabella 8), ma è anche presente in piccole quantità. Questo si traduce in una drastica riduzione del numero dei frammenti di DNA con dimensioni adatte per le analisi molecolari (Teletchea *et al.*, 2009). Uno studio (Quinteiro *et al.*, 1998) ha dimostrato che, durante il processo di inscatolamento del pesce, il DNA subisce una discreta degradazione: frammenti di DNA di dimensione compresa tra 100 bp e 200 bp sono stati ottenuti dal tonno in scatola, mentre il DNA estratto da tonno congelato aveva una dimensione compresa tra 100 bp e 20.000 bp.

Un ulteriore studio (Carrera *et al.*, 2000) ha dimostrato che la degradazione del DNA provocata dal processo di affumicamento a freddo non previene l'amplificazione dei frammenti di DNA con dimensioni fino a 1 kb. Al contrario, il DNA è risultato molto degradato dai processi di sterilizzazione. I prodotti ittici non trasformati (come i filetti), solitamente, sono caratterizzati da un DNA inalterato e presente in discrete quantità. In questo caso, dunque, diventa possibile amplificare frammenti di DNA di grandi dimensioni (1-2 kb) (Teletchea *et al.*, 2009). Nonostante ciò, un recente studio (Xiong *et al.*, 2016) ha evidenziato una parziale frammentazione anche del DNA di prodotti ittici non processati (congelati). Questo potrebbe essere causato dalle condizioni non ottimali di trasporto e manipolazione dei campioni. Inoltre, studi precedenti (Meyer *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 1997; Hold *et al.*, 2001), hanno effettivamente dimostrato la presenza di DNA in alimenti processati, anche se la qualità e la quantità del DNA stesso possono essere condizionati dal processamento e dalla conservazione degli alimenti. Per esempio, uno studio (Marmioli *et al.*, 2009) ha dimostrato che la temperatura ed il pH sono i principali fattori che influenzano la degradazione del DNA durante la produzione del pane, mentre un altro studio (Klein *et al.*, 1998) ha dimostrato che il DNA viene completamente rimosso durante la produzione di zucchero. Tutti questi dati indicano l'importanza di una valutazione preliminare all'amplificazione, per valutare, appunto, il livello di degradazione del DNA. L'assenza di tale valutazione potrebbe, infatti, far pensare che un eventuale fallimento nell'amplificazione derivi dalla presenza di composti inibitori (Xiong *et al.*, 2016) e non da una degradazione del DNA stesso. Per quanto riguarda i lavori precedenti che hanno applicato metodiche molecolari basate sul DNA per l'identificazione di specie in prodotti a base di surimi (Pepe *et al.*, 2007; Huxley-Jones *et al.*, 2012; Keskin e Atar, 2012; Helyar *et al.*, 2014; Galal-Khallaf *et al.*, 2016) nessuno si è soffermato su questo tipo di analisi. Pertanto, nel presente lavoro, tutti i campioni commerciali sono stati sottoposti ad una preliminare corsa elettroforetica che ha, dunque, permesso di verificare il livello di degradazione del loro DNA. Questo tipo di valutazione rappresenta, infatti, un semplice ausilio che permette di indirizzare la scelta dei primers, anche se è necessario sottolineare che non sempre il livello di degradazione del DNA riflette la sua amplificabilità in termini di lunghezza dei frammenti: questo significa che non sempre i risultati della corsa elettroforetica del DNA totale daranno corrispondenza in termini di lunghezza dell'amplicone. Nel presente lavoro, in seguito a corsa elettroforetica, il DNA di ciascuno dei prodotti commerciali è stato classificato all'interno di 4 categorie, in base alla lunghezza del frammento di DNA: <250 pb, compresa tra 250 pb e 500 pb, compresa tra

500 pb e 1000 pb e >1000 pb. In particolare, il 7,1% (14/197) dei campioni è rientrato nella categoria <250 pb, il 27,9% dei campioni (55/197) nella categoria compresi tra 250 pb e 500 pb, il 38,6% dei campioni (76/197) nella categoria compresi tra 500 pb e 1000 pb, il 26,4% dei campioni (52/197) nella categoria >1000 pb (Tabella 7).

9.5 AMPLIFICAZIONE DEL DNA DELLE SPECIE DI RIFERIMENTO ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI PRIMERS UNIVERSALI

9.5.1 Selezione dei primers.

Nel presente lavoro, sono stati selezionati come target due geni mitocondriali (*16S rRNA* e *COI*), amplificati tramite cinque coppie di primers universali (Tabella 5). I due geni mitocondriali target, in relazione alle loro comprovate capacità discriminatorie, sono tra i più utilizzati per l'identificazione di specie per quanto riguarda il comparto ittico. Sostanzialmente, è stato selezionato il gene mitocondriale *16S rRNA* poiché è caratterizzato da un elevato grado di conservazione e ciò aumenta la probabilità di ottenere un'amplificazione anche in specie filogeneticamente distanti tra loro (Armani *et al.*, 2012). Il gene *COI*, invece, è stato selezionato sia perché indicato come target elettivo per la creazione di un database universale per la classificazione di tutti gli organismi animali (Ward *et al.*, 2009), sia perché è caratterizzato da un potenziale discriminatorio maggiore rispetto agli altri geni mitocondriali (Hebert *et al.*, 2003). Inoltre, tale gene è caratterizzato da una buona variabilità interspecifica e da una bassa variabilità intraspecifica, oltre all'assenza di introni, ad una limitata esposizione ad eventi di ricombinazione ed alla disponibilità di siti di *annealing* per primers robusti ed universali (Folmer *et al.*, 1994). Tutti i campioni di DNA di riferimento sono stati amplificati utilizzando le 5 coppie di primers, per valutare le performances di amplificazione di tali primers sui campioni (successo di amplificazione e concentrazione degli ampliconi) (Tabelle 10 e 11). In particolare, i primers utilizzati permettevano l'amplificazione di un frammento definito "lungo" (coppie P1, H ed M) oppure di un frammento corto (coppie P2 ed SH).

La coppia di primers P1 per l'amplificazione di un frammento del gene *16S rRNA* è stata selezionata poiché in un precedente lavoro è stata messa in luce la sua capacità di amplificare lo stesso frammento genico in diverse categorie di animali (non soltanto pesci, ma anche mammiferi ed uccelli) (Armani *et al.*, 2016). Per quanto riguarda le due coppie di primers, utilizzate entrambe per l'amplificazione dello stesso frammento del gene mitocondriale *COI*, è necessario sottolineare che la scelta di utilizzare due coppie diverse si è resa necessaria poiché, mentre la coppia di primers universali H risulta molto

performante nell'amplificazione di un frammento del gene *COI* dei pesci, la stessa performance non viene registrata nell'amplificazione di quello stesso frammento da DNA dei cefalopodi e molluschi in generale (Armani *et al.*, 2015). Dunque, è stata testata l'altra coppia di primers M: questa fornisce buoni risultati sui cefalopodi, ma, allo stesso tempo, riesce ad amplificare anche il frammento di DNA di alcune specie di pesci, anche se con affinità spesso molto inferiore rispetto ai cefalopodi.

9.5.2 Amplificazione del gene *16S rRNA*

La coppia di primers P1, utilizzata per l'amplificazione di un frammento del gene *16S rRNA* è riuscita ad amplificare il DNA di tutte le specie di pesce e il DNA di tutte le specie di cefalopodi (amplificabilità del 100%), restituendo prodotti di PCR con una concentrazione media di DNA pari a 20,3 ng/μl, (range tra 10 ng/μl e 25 ng/μl), superiore al limite richiesto per il sequenziamento (Tabella 11). Questo dato conferma che il gene mitocondriale *16S rRNA* è effettivamente caratterizzato da un elevato grado di conservazione tra specie diverse. La coppia di primers P2, è riuscita ad amplificare il DNA di tutte le specie di pesci e il DNA di tutte le specie di cefalopodi, ma mentre per i pesci sono stati ottenuti prodotti di PCR con una concentrazione media di DNA pari a 17 ng/μl (range tra 10 ng/μl e 25 ng/μl), per tutte le specie di cefalopodi sono stati ottenuti prodotti di PCR di concentrazione pari a 5 ng/μl, quindi inferiori al limite richiesto per il sequenziamento. E', quindi, possibile dedurre che esiste la necessità di disegnare primers in grado di amplificare, con una maggiore efficienza, un frammento del gene mitocondriale *16S rRNA* dei cefalopodi, di lunghezza inferiore a quello amplificato dalla coppia di primers P1, da utilizzare in caso di prodotti trasformati.

9.5.3 Amplificazione del gene *COI*

La coppia di primers H per il gene *COI* ha restituito una percentuale di amplificabilità pari al 100% per quanto riguarda le specie di pesce, restituendo prodotti di PCR con una concentrazione media pari a 20,2 ng/μl (range tra 10 ng/μl e 30 ng/μl), mentre non è riuscita ad amplificare il DNA delle specie di cefalopodi testate. Questo dato conferma che la coppia di primers H risulta efficiente nella sola amplificazione di DNA proveniente da campioni di pesce, mentre non è in grado di amplificare DNA appartenente a cefalopodi (Armani *et al.*, 2014). Perciò, visto che tale coppia di primers universali non è in grado di amplificare il frammento di DNA di organismi appartenenti a *taxa* diversi (Carrera *et al.*, 2000), è stata selezionata la coppia di primers M, che è riuscita ad amplificare il DNA di

tutte le specie di cefalopodi testate, restituendo così una percentuale di amplificabilità del 100% e prodotti di PCR con concentrazioni pari a 25 ng/μl mentre, per quanto riguarda le specie di pesce, tale percentuale si è attestata al 75%, poiché la coppia di primers utilizzata è riuscita ad amplificare il DNA di 31 specie sulle 41 totali, restituendo 23 prodotti di PCR con una concentrazione media pari a 13,1 ng/μl (range tra 10 ng/μl e 20 ng/μl) e 8 prodotti di PCR con una concentrazione media pari a 5,5 ng/μl (range tra 5 ng/μl e 7 ng/μl), inferiore al limite richiesto per il sequenziamento. Infine, la coppia di primers SH è riuscita ad amplificare il DNA appartenente a 38 specie di pesce, su un totale di 41, restituendo una percentuale di amplificabilità del 92% e 36 prodotti di PCR con una concentrazione media pari a 17,4 ng/μl (range tra 10 ng/μl e 25 ng/μl). Soltanto 2 prodotti di PCR avevano concentrazioni inferiori al limite richiesto per il sequenziamento. Questi dati confermano le potenzialità del primer reverse Revshort1, disegnato inizialmente per esemplari appartenenti alla famiglia degli Sparidi, nell'amplificare organismi appartenenti a *taxa* diversi e distanti filogeneticamente (Armani *et al.*, 2015). Tale coppia di primers è riuscita ad amplificare anche il DNA di una delle quattro specie di cefalopodi testate, ma il prodotto di PCR risultante aveva una concentrazione pari a 5 ng/μl, quindi non sequenziabile. Nei lavori precedenti (Pepe *et al.*, 2007; Keskin e Atar, 2012; Huxley-Jones *et al.*, 2011), le coppie di primers universali utilizzate non sono state testate preventivamente sul DNA delle specie target, mentre nel lavoro di Galal-Khallaf *et al.*, 2016, i primers usati, pur essendo stati sviluppati analizzando il gene *COI* di 1566 specie tra mammiferi, pesci, uccelli ed insetti (Meusnier *et al.*, 2008) non sono mai stati testati su nessuna delle specie di pesci e cefalopodi riportati in bibliografia come le più utilizzate per la produzione del surimi.

Il presente studio dimostra, invece, come coppie di primers diverse, utilizzate per l'amplificazione di frammenti di più geni target di lunghezza differente, abbiano affinità diversa per le specie di pesci e cefalopodi considerate e dunque, a seconda della coppia di primers utilizzata o del gene target selezionato è possibile ottenere risultati differenti. Ciò conferma la necessità di condurre studi preliminari basati sulle performance di primers diversi, soprattutto nel caso di prodotti costituiti da una miscela di specie, come nel caso del surimi e la necessità di sviluppare nuovi primers universali per pesci e cefalopodi per l'amplificazione di frammenti corti da DNA degradato.

9.6 AMPLIFICAZIONE DEI CAMPIONI COMMERCIALI.

Tutti i campioni commerciali sono stati, inizialmente, amplificati con la coppia di primers P1 selezionata sulla base dei test preliminari effettuati sul DNA delle specie di riferimento, indipendentemente dal livello di degradazione osservato tramite la corsa elettroforetica del DNA totale. Questo perché, come spiegato nel paragrafo 9.3.2, non sempre esiste una corrispondenza tra il livello di degradazione del DNA e la sua amplificabilità. La successiva corsa elettroforetica dei prodotti di PCR ha mostrato che tale amplificazione ha dato buoni risultati per quanto riguarda il 57,8% dei campioni (114/197). Per il restante 42% dei campioni (83/197), tale amplificazione è risultata insufficiente, per cui è stato necessario ricorrere all'utilizzo della coppia di primers P2. Comunque, il 90,4% (47/52) dei campioni il cui DNA mostrava un pattern superiore al 1000 pb, è stato amplificato senza difficoltà dalla coppia di primers P1, mentre il 7,7% (4/52) di tali campioni ha richiesto l'utilizzo di una nuova coppia di primers, P2, in grado di amplificare un frammento di circa 350 pb. Inoltre, il 2% dei campioni (1/52), nonostante avesse esibito un limitato livello di degradazione, non è stato amplificato da nessuna delle due coppie di primers utilizzate. L'88,1% dei campioni (67/76) che avevano mostrato un pattern di DNA totale compreso tra 500 pb e 1000 pb, è stato amplificato con la coppia di primers P1, mentre l'11,8% (9/76) ha richiesto l'utilizzo della coppia di primers P2. Tutti i campioni (55/55) il cui DNA aveva mostrato un pattern di DNA totale compreso tra 250 pb e 500 pb e tutti i campioni (14/14) il cui DNA aveva mostrato un pattern di DNA totale inferiore a 250 pb, sono stati amplificati dalla coppia di primers P2 (Tabella 12). Sostanzialmente, soltanto il 6,5% dei campioni (13/197) non ha mostrato nessun tipo di corrispondenza tra il pattern del DNA totale e la successiva amplificazione. Alla luce di questo dato, è possibile affermare che il sistema di valutazione seguito ha soddisfatto le aspettative. In particolare, nel caso dei campioni il cui DNA mostrava un pattern superiore alle 500 pb, ma che non è stato possibile amplificare con la coppia di primers P1, è possibile che tale DNA fosse comunque danneggiato. Infatti, è noto che l'utilizzo di trattamenti che prevedono l'esposizione ad elevate temperature può danneggiare la doppia elica di DNA. Tra i danni più frequenti ritroviamo l'ossidazione delle basi e la deaminazione della citosina (Evans, 2007). Infine, per 20 campioni commerciali per i quali era stato ottenuto un prodotto di PCR con la coppia di primers P1, è stato amplificato un frammento del gene mitocondriale *COI*, di lunghezza attesa pari a 655 pb, utilizzando la coppia di primers universali H. L'amplificazione di tutti i 20 campioni sfruttando tale coppia di primers è risultata soddisfacente. Considerando che di questi 20 campioni, 3 dichiaravano in etichetta la

presenza di cefalopodi, si è deciso di amplificare il loro DNA utilizzando la coppia di primers M. Infine altri 3 campioni scelti in maniera random, sono stati amplificati con questa coppia di primers. Tale coppia di primers è riuscita ad amplificare 4 campioni su 6 (66,6%). Inoltre, per 4 campioni commerciali, le cui sequenze ottenute con la coppia di primers H erano risultate non utilizzabili, è stato amplificato un frammento del gene mitocondriale *COI* di lunghezza pari a 139 pb, sfruttando la coppia di primers SH. L'amplificazione del DNA di tutti i 4 campioni è risultata soddisfacente. Complessivamente, i dati acquisiti sono stati ritenuti soddisfacenti, soprattutto alla luce dei risultati ottenuti negli studi precedenti. Infatti, nel lavoro di Galal-Khallaf *et al.*, 2016, l'amplificazione di un frammento di circa 650 pb del gene mitocondriale *16S rRNA* ha restituito il 65% di prodotti di PCR non utilizzabili. Questo è stato imputato all'elevato livello di degradazione del DNA. Nel lavoro di Huxley-Jones *et al.*, 2011, il 22% dei campioni testati non ha restituito prodotti di PCR utilizzabili, in seguito all'amplificazione di un frammento di circa 650 pb del gene mitocondriale *COI*. Nel presente studio, invece, l'utilizzo di due coppie di primers diverse (P1 E P2) ha permesso di amplificare il 99,4% dei campioni (196/197), a conferma, ancora una volta, della necessità di selezionare i primers. Nel complesso per il 73% dei campioni commerciali che avevano esibito un limitato livello di degradazione del DNA (pattern superiore a 500 pb) è stato possibile amplificare un frammento lungo del gene 16S rRNA o del gene *COI*, mentre per il 6,5% di tali campioni è stato amplificato un frammento più corto del gene 16S rRNA o del gene *COI*.

9.7 SEQUENZIAMENTO ED ANALISI DELLE SEQUENZE.

Sono stati inviati al sequenziamento i seguenti prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA dei campioni commerciali:

- 45 prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers P1;
- 45 prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers P2;
- 20 prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers H;
- 4 prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers M.

Inoltre, sono stati inviati presso un secondo laboratorio di sequenziamento i seguenti prodotti di PCR:

- 6 prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers P1;
- 4 prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers SH.

Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il programma Clustal W in MEGA versione 6 (Tamura *et al.*, 2013) e corrette manualmente dopo un'analisi visiva. Successivamente, ciascuna sequenza è stata confrontata con quelle presenti nel database NCBI per quanto riguarda le sequenze del gene mitocondriale *16S rRNA* e con quelle presenti in entrambi i database NCBI e BOLD per quanto riguarda le sequenze del gene mitocondriale *COI*. Nel complesso, il 76% (94/124) delle sequenze è stato ritenuto utilizzabile.

9.7.1 Analisi delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene *16S rRNA*

Tra i 45 campioni amplificati con la coppia di primers P1 e inviati al sequenziamento, 21 avevano un pattern di DNA totale superiore alle 1000 pb e tutti sono stati sequenziati senza problema, restituendo una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari all'84,5% (Tabelle 13a e 13b). Gli altri 24 campioni inviati al sequenziamento avevano mostrato un pattern del DNA totale compreso tra 500 pb e 1000 pb e tutti sono stati sequenziati senza problema. In particolare, le sequenze ottenute avevano una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari all'83,2%. Tra i 45 campioni amplificati con la coppia di primers P2, 3 avevano mostrato un pattern del DNA totale superiore a 1000 pb e sono stati sequenziati senza problema, mostrando una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari al 76,4%. Altri 4 campioni avevano mostrato un pattern del DNA totale compreso tra 500 pb e 1000 pb, ma le sequenze ottenute non sono risultate utilizzabili ai fini dell'identificazione di specie. Inoltre, di 30 campioni il cui DNA aveva un pattern compreso tra 250 pb e 500 pb e che sono stati inviati al sequenziamento, 17 sono stati sequenziati senza problema ed hanno mostrato una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari all'87,1%, mentre gli altri 13 hanno restituito sequenze non utilizzabili. Infine, di 8 campioni il cui DNA aveva un pattern inferiore a 250 pb, solo 1 è stato sequenziato senza difficoltà, restituendo, tra l'altro, una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari all'86,3%, mentre gli altri 7 hanno restituito sequenze non utilizzabili. È necessario sottolineare che, mentre per il gene *COI* sequenze più corte di 500 pb, corrispondenti a una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari al 76,3%, sono considerate poco informative ai fini dell'identificazione (Handy *et al.*, 2011), questo valore soglia non è mai stato definito per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*. Pertanto, abbiamo utilizzato lo stesso valore soglia proposto per il gene *COI* e calcolato il numero delle paia basi corrispondenti prendendo come riferimento la sequenza di *Theragra Chalcogramma* (EF119324), ottenendo, così, un valore pari a 430 pb. Alla luce

di questo dato, l'88,8% (40/45) delle sequenze ottenute dall'amplificazione del frammento del gene mitocondriale *16S rRNA* con la coppia di primers P1, è stato ritenuto utilizzabile ai fini dell'identificazione. Per quanto, invece, riguarda le sequenze ottenute dall'amplificazione del frammento corto del gene mitocondriale *16S rRNA* con la coppia di primers P2, il valore soglia è risultato pari a 228 pb. Alla luce di questo dato, il 71,4% (15/21) delle sequenze è stato ritenuto utilizzabile ai fini dell'identificazione. Sostanzialmente, il tasso di successo totale del sequenziamento per questi campioni è stato pari al 73,3%. In base ai risultati ottenuti, i prodotti di PCR di 6 campioni commerciali sono stati inviati ad un secondo laboratorio esterno. In particolare, 2 di questi campioni avevano restituito sequenze non utilizzabili (SUR 14.4; SUR 18.4), altri 2 avevano restituito sequenze corte rispetto a quelle attese (SUR 11.2; SUR 31.1) e gli ultimi 2 avevano restituito sequenze medio-lunghe (SUR 16.3; SUR 28.1). Le sequenze appartenenti ai campioni SUR 14.4 e SUR 18.4, che erano risultati non utilizzabili ai fini dell'identificazione, hanno restituito una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto alla lunghezza attesa pari al 41,3%. Nonostante queste sequenze siano state ritenute utilizzabili, a differenza di quanto emerso dopo il sequenziamento eseguito dal primo laboratorio, è necessario sottolineare che la lunghezza di tali sequenze non è, comunque, risultata ottimale. La differenza tra i risultati ottenuti dai due diversi laboratori potrebbe evidenziare che cambiamenti nella reazione di sequenziamento, condotta da diversi laboratori, possono comportare un piccolo miglioramento nella qualità delle sequenze. Le sequenze appartenenti ai campioni SUR 11.2 e SUR 31.1 hanno restituito una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto alla lunghezza attesa pari al 37,5%, confermando i dati che avevamo acquisito con il primo sequenziamento. Infine, le sequenze appartenenti ai campioni SUR 16.3 e SUR 28.1 hanno restituito una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto alla lunghezza attesa pari al 69%, confermando i dati che avevamo acquisito con il primo sequenziamento. È interessante notare come, per quanto riguarda il campione SUR 16.3, mentre la sequenza acquisita dal primo laboratorio ha restituito un'identità del 96% per *Priacanthus blochii* e per *Priacanthus sagittarius* e del 95% per *Priacanthus prolixus*, la sequenza acquisita dal secondo laboratorio ha restituito un'identità del 100% per *Theragra chalcogramma*. In questo caso è possibile che i diversi reagenti o le diverse condizioni con cui è stata condotta la reazione di sequenziamento nei due differenti laboratori abbiano portato a differenti risultati. Sostanzialmente, il tasso di successo totale di sequenziamento per questi campioni è risultato pari al 100%.

9.7.2 Analisi delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene COI

Tra i 20 campioni amplificati con la coppia di primers H ed inviati al sequenziamento, 10 avevano mostrato un pattern del DNA totale superiore a 1000 pb (Tabelle 13a e 13b). Di questi 10, 8 sono stati sequenziati senza difficoltà ed hanno restituito una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari al 79,1%, mentre le altre 2 sequenze ottenute non erano utilizzabili. Gli altri 10 campioni avevano un pattern del DNA totale compreso tra 500 pb e 1000 pb: 6 di questi campioni sono stati sequenziati senza problema ed hanno restituito una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari al 68,5%, mentre gli altri 4 non hanno restituito sequenze utilizzabili. Considerato il valore soglia del 76,3% per quanto riguarda il gene *COI*, il 64,2% (9/14) delle sequenze è stato ritenuto utilizzabile ai fini dell'identificazione. Alla luce dei risultati ottenuti, è stato deciso di inviare, presso un secondo laboratorio di sequenziamento, i 4 prodotti di PCR, che non avevano restituito sequenze utilizzabili a seguito dell'amplificazione con la coppia H e che sono stati ottenuti dalla riamplicazione con la coppia SH. In particolare, i campioni analizzati mostravano un pattern del DNA totale compreso tra 500 pb e 1000 pb. Tutti i 4 campioni sono stati sequenziati senza problema ed hanno restituito una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto all'attesa pari al 100%. Tra i 4 campioni amplificati con la coppia di primers M, 3 mostravano un pattern del DNA totale superiore a 1000 pb e sono stati sequenziati senza problema, restituendo una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto alla lunghezza attesa pari al 79,4%. 1 campione con pattern del DNA totale compreso tra 500 pb e 1000 pb è stato sequenziato, restituendo una media percentuale della lunghezza effettiva rispetto a quella attesa pari all'88,4%. In questo caso, il tasso di successo totale del sequenziamento per questi campioni è stato pari al 78,5%.

9.8 CONFRONTO CON I DATABASE

Utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 99 e 100% per 49 sequenze (77,7%). Di queste, 4 (8,1%) sono state identificate in modo inequivocabile a livello di specie, restituendo identità del 100% per *Merluccius productus* (SUR 40.3; SUR 40.4; SUR 40.5) e per *Theragra chalcogramma* (SUR 34.2). Le restanti 45 sequenze hanno restituito un'identità compresa tra il 91% ed il 99% con le sequenze di più specie: questo risultato potrebbe essere attribuito alla scarsa variabilità del gene mitocondriale *16S rRNA*. Infatti, tale gene è caratterizzato da un elevato grado di conservazione, anche tra specie

filogeneticamente distanti tra loro: questo comporta una maggiore difficoltà nella discriminazione a livello interspecifico. Inoltre, anche la scarsa qualità delle sequenze potrebbe aver influenzato i risultati ottenuti. Per quanto riguarda i dati acquisiti dal secondo sequenziamento di 6 campioni, utilizzando l'analisi BLAST è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 99 e 100% per 5 sequenze (83,3%). Di queste solo 1 sequenza (20%) è stata identificata in modo inequivocabile a livello di specie, restituendo un'identità del 100% per *Theragra chalcogramma*, mentre le restanti 4 sequenze hanno restituito identità superiore al 96% per più specie.

Utilizzando l'analisi ID su BOLD, per quanto riguarda il frammento lungo del gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 98 e 100% per 17 sequenze (94,4%). Di queste, solo 2 (11,7%) sono state identificate in modo inequivocabile a livello di specie, restituendo un'identità del 99,82-100% per *Theragra chalcogramma* (SUR 34.2) e del 99-100% per *Merluccius productus* (SUR 14.1). Le restanti 15 sequenze hanno restituito un'identità superiore al 98% con le sequenze di più specie. Considerando che il gene *COI* è caratterizzato da un elevato potere discriminatorio e da una buona variabilità interspecifica, questi dati sono risultati discordanti rispetto alle aspettative, ma è necessario sottolineare che potrebbero essere messi in relazione alla mancanza di sequenze di riferimento o a sequenze non correttamente identificate già documentate in letteratura (Armani *et al.*, 2015). Infatti, un dato interessante è che, utilizzando l'analisi ID su BOLD, il 50% (9/18) delle sequenze hanno restituito identità superiore al 98% per *Theragra chalcogramma* e per *Arctogadus glacialis*, per il quale, però, è stata depositata una sola sequenza nel database. Inoltre, questa specie non è mai stata riportata in bibliografia come utilizzata per la produzione di surimi, quindi questo dato risulta poco attendibile. Utilizzando l'analisi BLAST, sempre per quanto riguarda il gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 99 e 100% per 17 sequenze (94,4%). Di queste, 7 (41,1%) sono state identificate in modo inequivocabile a livello di specie, restituendo un'identità del 99-100% per *Theragra chalcogramma* (SUR 3.1; SUR 5.1; SUR 7.3; SUR 15.1; SUR 32.1; SUR 33.1) e per *Merluccius productus* (SUR 14.1). Le restanti 10 sequenze hanno restituito identità superiori al 99% per più specie. Questo conferma la non conformità per quanto riguarda la sequenza depositata come *Arctogadus glacialis*. Pertanto, anche le 9 sequenze possono essere considerate identificate a livello di specie come *Theragra chalcogramma*. Utilizzando l'analisi ID su BOLD, per quanto riguarda il frammento corto del gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 98 e 100%

per tutte le 4 sequenze analizzate (100%). Di queste, solo 1 (25%) è stata identificata in modo inequivocabile a livello di specie, restituendo un'identità pari al 97,8-98,5% per *Priacanthus macracanthus*. Le restanti 3 sequenze hanno restituito identità superiori al 98% per più specie. Utilizzando l'analisi BLAST è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 99 e 100% per 2 sequenze (50%). Nessuna di queste è stata identificata in modo inequivocabile a livello di specie, poiché entrambe hanno mostrato identità superiore al 99% per più specie (*Gadus morhua* e *Theragra chalcogramma*). Le restanti 2 sequenze hanno mostrato identità inferiori al 99% rispettivamente per *Nemipterus randalli* e *Priacanthus macracanthus*. Nel complesso, i dati acquisiti evidenziano una difficoltà per alcune famiglie nell'identificazione specie-specifica, in linea con quanto riportato in studi precedenti (Armani *et al.*, 2015).

9.8.1 Confronto tra le analisi molecolari e le informazioni riportate in etichetta

Nel complesso, per il 67,5% (27/40) dei prodotti, è stato possibile confrontare i risultati delle analisi molecolari con le informazioni riportate nelle rispettive etichette (Tabella 14). Nel dettaglio, per il 18,5% (5/27) di tali prodotti è stato possibile parlare di *mislabeled*, visto che le analisi molecolari effettuate non hanno confermato le specie dichiarate in etichetta. Infatti, nonostante le limitazioni associate alla metodica utilizzata, tali specie dovrebbero essere quelle presenti in maggior quantità nel prodotto finito e quindi quelle più facilmente amplificabili. Inoltre, i primers selezionati avevano restituito l'amplicone atteso quando testati sul DNA di riferimento di *Nemipterus* spp. I prodotti risultati non conformi erano tutti compresi tra quelli forniti dal PIF di Livorno, ma è necessario ricordare che solo il 31,5% (6/19) dei prodotti acquistati presso supermercati dichiarava in etichetta le specie presenti e solo per questi quindi è stato possibile verificarne la veridicità. Infatti, come detto precedentemente, tali informazioni non sono obbligatorie per le preparazioni a base di surimi. L'80% (4/5) dei prodotti *mislabeled* (SUR 14, SUR 15, SUR 16, SUR 18), dichiarava in etichetta la presenza di *Nemipterus* sp., ma il sequenziamento effettuato ha restituito identità nei confronti di specie diverse. Per quanto riguarda il sub campione SUR 14.1, utilizzando l'analisi BLAST, per il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 99% per *Chelidonichthys lucerna* e *Chelidonichthys gurnardus*, mentre utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 99-100% per *Merluccius productus*. Analizzando il campione SUR 14.4 tramite analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità del 99% per *Chelidonichthys*

Lucerna e *Chelidonichtys gurnardus* e del 98% per *Chelidonichtys capensis* e *Chelidonichtys cuculus*. Questi ultimi dati sono stati confermati dall'analisi BLAST, per il gene mitocondriale *16S rRNA* del campione SUR 14.5. I dati acquisiti potrebbero indicare che il campione analizzato fosse effettivamente costituito da una miscela di specie e, quindi, utilizzando due target genici diversi è stato possibile evidenziare la presenza di specie diverse. Per quanto riguarda il campione SUR 15, sono state analizzate tre aliquote dello stesso prodotto, SUR 15.1, SUR 15.3 e SUR 15.5. Utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, il campione SUR 15.1 ha restituito identità di specie pari al 99% per *Theragra chalcogramma* e *Theragra finmarchica* e del 98% per *Gadus morhua*. Utilizzando, invece, l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 99-100% per *Theragra chalcogramma* e questo dato è stato confermato dall'analisi ID su BOLD, che ha restituito identità di specie pari al 99,8% anche per *Arctogadus glacialis*, per il quale, però, è depositata una sola sequenza. I campioni SUR 15.3 e SUR 15.5 hanno restituito, tramite analisi BLAST per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, un risultato identico a quanto emerso per il campione SUR 15.1. I dati acquisiti indicano che, con buona probabilità, il campione SUR 15 contenesse effettivamente *Theragra chalcogramma*.

Per quanto riguarda il campione SUR 16, sono state analizzate tre diverse aliquote del prodotto (SUR 16.3, SUR 16.4 e SUR 16.5). Utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 96% per *Priacanthus blochii* e *Priacanthus sagittarius* e del 95% per *Priacanthus prolixus*, per tutte le tre aliquote del prodotto. Data la percentuale di identità non è stato possibile raggiungere l'identificazione specie-specifica. Ciò nonostante percentuali superiori al 95% sono comunque indicative dell'appartenenza del campione al genere *Priacanthus*. Un dato interessante è rappresentato dal risultato del sequenziamento fornito da un secondo laboratorio esterno, per quanto riguarda il campione SUR 16.3. Infatti, a differenza del primo sequenziamento, in questo caso, l'analisi BLAST per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA* ha restituito identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma*. Questo dato potrebbe indicare che il prodotto analizzato fosse costituito da una miscela di specie e, quindi, la reazione di sequenziamento effettuata da due diversi laboratori, potrebbe aver messo in evidenza la presenza di due specie diverse. Per quanto riguarda il campione SUR 18, è stato possibile analizzare una singola aliquota del prodotto (SUR 18.4). Utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 97% per *Priacanthus sagittarius* e del

96% per *Priacanthus blochii*, *Priacanthus prolixus* e *Priacanthus arenatus*. Anche in questo caso, pur in assenza del raggiungimento di identificazione specie-specifica, è possibile confermare l'appartenenza del campione al genere *Priacanthus*.

Alla luce di questi dati, è possibile affermare che, nonostante le informazioni derivanti dall'analisi di frammenti genici diversi e da aliquote diverse dello stesso campione, talvolta siano risultati discordanti tra loro, tuttavia nessuno dei dati acquisiti ha messo in evidenza la presenza di *Nemipterus sp.* all'interno del prodotto analizzato, a differenza di quanto dichiarato in etichetta.

Per quanto riguarda il restante 20% (1/5) dei campioni *mislabeled* (SUR 34), utilizzando l'analisi BLAST per il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma*. Utilizzando l'analisi BOLD per il gene mitocondriale *COI*, tale risultato è stato confermato, mentre l'analisi BLAST ha restituito identità di specie del 100% sia per *Theragra chalcogramma* che per *Theragra finmarchica*. Infine, per questo campione, sono state analizzate anche le sequenze che derivano dall'amplificazione di un frammento del gene mitocondriale *COI* utilizzando la coppia di primers M. Anche in questo caso, l'analisi BLAST del gene mitocondriale *COI*, ha restituito identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma* e per *Theragra finmarchica* (per la quale, però, sono depositate solo due sequenze e non è riportata in bibliografia tra le specie più utilizzate per la produzione di surimi), mentre l'analisi BOLD ha restituito identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma* e *Arctogadus glacialis*, per il quale, però, è depositata una sola sequenza. Nel complesso, i dati acquisiti dall'analisi di geni target diversi sono risultati concordanti tra loro ed hanno permesso di dichiarare la non conformità del prodotto, che dichiarava in etichetta la presenza di *Nemipterus sp.*, *Portunus sp.* e *Carcinus maenus*.

Un dato interessante viene fornito anche dai campioni SUR 36 e SUR 37. In particolare, per quanto riguarda il campione SUR 36, utilizzando l'analisi BLAST del gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 99% per *Nemipterus bathybius*, mentre l'etichetta dichiarava la presenza di *Nemipterus nemurus* e *Nemipterus japonicus*. Per quanto riguarda il campione SUR 37, sono state analizzate tre diverse aliquote del campione (SUR 37.3, SUR 37.4, SUR 37.5). Per tutte le tre aliquote, l'analisi BLAST del gene mitocondriale *16S rRNA* ha restituito identità di specie pari al 99% per *Nemipterus bathybius*, mentre l'etichetta dichiarava la presenza di *Nemipterus japonicus*. Nonostante i risultati apparentemente discordanti emersi per questi campioni, non è possibile parlare di *mislabeled*, visto che la denominazione commerciale del genere

Nemipterus prevista dall'elenco ufficiale delle denominazioni in lingua italiana (Decreto MIPAAF 31/01/2008) corrisponde genericamente a "Nemiptero", includendo, dunque, tutte le specie appartenenti al genere.

I campioni SUR 10, SUR 24, SUR 32 e SUR 33 dichiaravano in etichetta la sola presenza di *Theragra chalcogramma*. Per quanto riguarda il campione SUR 10, utilizzando l'analisi BLAST, per il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% per *Theragra finmarchica* (per la quale, però, sono depositate solo due sequenze), al 99% per *Theragra chalcogramma*, *Gadus morhua*, *Merlangius merlangus*, *Merluccius poutassou*, *Microgadus proximus*, *Boreogadus saida* e *Gadus macrocephalus* e al 98% per *Gadus ogac*. Per quanto riguarda il campione SUR 24, utilizzando l'analisi BLAST per il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma* e *Theragra finmarchica* ed al 99% per *Gadus morhua*. Per quanto riguarda il campione SUR 32, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma* e *Theragra finmarchica*, al 99% per *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus*, *Gadus ogac*, *Merlangius merlangus* e *Micromesistius poutassou*, al 98% per *Brosme brosme* e *Molva molva*. Utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma*, confermata dall'analisi BOLD, che, però, ha restituito un'identità di specie pari al 100% anche per *Arctogadus glacialis* (per il quale è depositata una sola sequenza). Infine, per quanto riguarda il campione SUR 33, utilizzando l'analisi BLAST per il gene mitocondriale *16S rRNA*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% *Theragra chalcogramma* e *Theragra finmarchica*, al 99% per *Gadus morhua* e *Microgadus proximus*, al 98% per *Gadus macrocephalus*. Utilizzando l'analisi BLAST, per quanto riguarda il gene mitocondriale *COI*, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma*, confermata dall'analisi ID su BOLD, che, però, ha restituito un'identità di specie pari al 100% anche per *Arctogadus glacialis*. Un dato interessante è fornito dall'analisi BLAST e BOLD, per quanto riguarda il frammento del gene mitocondriale *COI* ottenuto dall'amplificazione tramite la coppia M. In questo caso, infatti, è stata ottenuta un'identità di specie pari al 99-100% per *Merluccius productus*, *Merluccius gayi* e *Merluccius angustimanus*. Questo risultato potrebbe confermare innanzitutto la miscela di specie che compongono il surimi e, ancora più importante, il fatto che utilizzando coppie di primers diverse sia possibile evidenziare la presenza di specie diverse. Pertanto, considerando le limitazioni associate alla metodica utilizzata non è possibile stabilire se i campioni analizzati non contenessero altre specie.

A tal proposito, anche i campioni SUR 40.3 e SUR 21 hanno fornito risultati interessanti. Infatti, per quanto riguarda il campione SUR 40.3, l'analisi BLAST per il gene mitocondriale *16S rRNA* ha restituito identità di specie pari al 100% per *Merluccius productus*, mentre l'analisi BLAST per il gene mitocondriale *COI* ha restituito identità di specie pari al 99% per *Merluccius productus* e *Merluccius gayi*. Questo dato è stato confermato dall'analisi ID su BOLD, che, però, ha restituito identità di specie pari al 98,99% anche per *Merluccius angustimanus*. Tuttavia, l'analisi BLAST per quanto riguarda il frammento di DNA ottenuto dall'amplificazione con la coppia di primers M, ha restituito identità di specie pari al 100% per *Theragra chalcogramma* e per *Theragra finmarchica* e l'analisi ID su BOLD ha restituito identità di specie pari al 99,82-100% per *Theragra chalcogramma* e per *Arctogadus glacialis* (per il quale, però, come già detto, è depositata una sola sequenza). Per quanto, invece, riguarda il campione SUR 21, che dichiarava in etichetta la presenza di *Nemipterus japonicus*, sono state analizzate tre aliquote (SUR 21.1; SUR 21.2; SUR 21.3). In questo caso, per le aliquote SUR 21.2 e SUR 21.3, l'analisi BLAST per il gene mitocondriale *16S rRNA*, ha restituito identità di specie pari al 98% per *Nemipterus bathybius*, al 95% per *Nemipterus virgatus* e al 92-95% per *Nemipterus japonicus*. Tuttavia, per l'aliquota SUR 21.1, l'analisi BLAST per quanto riguarda il gene mitocondriale *16S rRNA*, ha restituito identità di specie pari al 95% per *Priacanthus Sagittarius* ed al 94% per *Priacanthus hamrur* e *Priacanthus prolixus*. Anche per questi campioni, è possibile affermare che l'approccio molecolare utilizzato nel presente studio ha fornito dati utili per l'identificazione di più specie presenti nel prodotto finite. Infine, per quanto riguarda i 4 campioni di DNA amplificati con la coppia M, il 25% (1/4) (SUR 2) dichiarava in etichetta la presenza di "cefalopodi", ma, nonostante la coppia di primers utilizzata sia caratterizzata da una buona affinità verso tali specie (dimostrata anche dall'amplificazione dei DNA di riferimento), le analisi molecolari effettuate non hanno restituito identità nei confronti dei cefalopodi.

Un dato interessante è fornito dai paesi produttori. Infatti, nonostante nessuno dei lavori precedenti (Pepe *et al.*, 2007; Keskin e Atar, 2012; Huxley-Jones *et al.*, 2012; Helyar *et al.*, 2014; Galal-Khallaf *et al.*, 2016) abbia fornito risultati di questo tipo, nel presente studio il 100% dei prodotti risultati non conformi proveniva da paesi asiatici e, in particolar modo, il 40% (2/5) dalla Cina ed il 60% (3/5) dalla Thailandia.

9.9 DIFFICOLTÀ E PROSPETTIVE NELL'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE IN PRODOTTI MULTISPECIE COME LE PREPARAZIONI A BASE DI SURIMI.

9.9.1 Difficoltà

Il presente lavoro di tesi ha messo in evidenza una serie di difficoltà legate all'analisi di matrici complesse (prodotti trasformati e multispecie). Innanzitutto, il primo limite riscontrato a carico di questi prodotti, è rappresentato dal fatto che essi non sottostanno al Regolamento 1379 del 2013. Questo implica che informazioni essenziali, quali la dichiarazione delle specie utilizzata, (denominazione scientifica e commerciale), non sono rese obbligatorie e ciò può sicuramente favorire la sostituzione di specie. Tale mancanza normativa può, inoltre, incoraggiare la così detta pesca Illegale, Non dichiarata e Non regolamentata (INN) cioè la pesca che avviene al di fuori di qualsiasi regolamentazione. Ciò si tradurrebbe in conseguenze estremamente negative per l'ecosistema marino. Il secondo considerevole limite è rappresentato dal livello di degradazione del DNA di prodotti quali surimi. Tali prodotti, infatti, subiscono differenti processi di trasformazione, (esposizione ad elevate temperature), che possono differire a seconda della tecnologia produttiva utilizzata. Pertanto, i danni a carico del DNA possono essere differenti a seconda del prodotto considerato e si rende quindi necessario condurre uno studio preliminare per verificare lo stato di degradazione del DNA. Questa analisi, infatti, può indirizzare l'operatore nella scelta dei primers da utilizzare.

Infatti, è necessario considerare che un'amplificazione non riuscita non deriva necessariamente dalla presenza di composti in grado di inibire la reazione di PCR, ma anche un da un elevato livello di degradazione del DNA.

Inoltre, è utile ricordare che i trattamenti a cui sono esposti i prodotti trasformati non provocano esclusivamente una frammentazione del DNA, ma sono in grado di apportare ulteriori danni, tra i quali ritroviamo frequentemente l'ossidazione delle basi e la deaminazione della citosina. Questo potrebbe inficiare non solo l'amplificabilità del DNA, ma anche la qualità delle sequenze ottenute.

Un altro aspetto messo in evidenza dal presente studio è la necessità di testare i primers selezionati su tutte le specie target che potrebbero essere utilizzate per la produzione di questa tipologia di prodotto. Questo passo è essenziale perché, come dimostrato in questo lavoro, coppie diverse di primers hanno una diversa efficienza nei confronti delle specie utilizzate. Quindi, l'utilizzo di una coppia di primers, non preliminarmente testata, potrebbe amplificare il frammento di DNA della specie presente nel prodotto in maggior quantità, o semplicemente della specie per cui presenta una maggiore affinità. Nel caso di

prodotti multispecie, dunque, la tecnica del DNA *barcoding* dovrebbe prevedere l'utilizzo di più coppie di primers in grado di amplificare diversi frammenti genici. Le informazioni derivanti da più geni target potrebbero restituire dati maggiormente affidabili, ma non in grado di assicurare la discriminazione di tutte le specie presenti. Comunque, le modifiche apportate al protocollo di campionamento, pur non permettendo di identificare tutte le specie presenti nel prodotto, hanno permesso di aumentare le potenzialità della metodica utilizzata. Ovviamente, fra le principali limitazioni associate a tale metodica il fatto che non risulta in grado di determinare le proporzioni delle diverse specie all'interno della miscela. Tuttavia, è possibile affermare che, nel caso in cui i risultati molecolari non corrispondano a quanto riportato in etichetta, è possibile parlare di mislabeling. Infatti, soprattutto per quei prodotti che dichiarano la presenza di un'unica specie, questa dovrebbe costituire la percentuale maggiore del prodotto. Pertanto, le analisi molecolari effettuate dovrebbero permettere di ottenere le sequenze di tale specie. Infine, la preventiva valutazione dei primers sul DNA di esemplari di riferimento impiegati per la preparazione del surimi permette di escludere l'ipotesi di una mancanza di affinità nei confronti di determinate specie.

9.9.2 Prospettive

Alla luce delle limitazioni evidenziate è necessario valutare procedure alternative per l'identificazione di specie in matrici complesse.

Un aspetto fondamentale da prendere in considerazione è sicuramente la qualità del DNA. Al di là della scelta di una metodica estrattiva che permetta di ottenere un DNA privo di sostanze ad azione inibitrice sulla reazione di amplificazione, è di fondamentale importanza considerare le alterazioni a carico della catena del DNA. Pertanto, l'utilizzo di enzimi in grado di riparare la doppia elica di DNA potrebbe rappresentare una strategia in grado di migliorare la qualità del DNA stesso, che, spesso, non risulta ottimale nel caso dei prodotti trasformati. A tal proposito, uno dei danni più frequenti a carico del DNA è rappresentato dalla deaminazione della citosina, in cui questa base azotata perde il gruppo amminico, trasformandosi in uracile. Questo cambiamento può essere riparato dall'enzima uracil-DNA-glicosilasi, che è in grado di rimuovere l'uracile (Evans e Nichols, 2008). Un ulteriore danno che, spesso, colpisce la molecola di DNA è rappresentato dall'ossidazione delle basi. In particolare, per esempio, si ha la modificazione della base guanina, che genera la 8 – ossiguanina. Questa base modificata viene riconosciuta ed escissa dall'enzima 8 – ossiguanina DNA glicosilasi. Inoltre, attualmente in commercio esistono

veri e propri kit, costituiti da enzimi di riparazione e da DNA polimerasi, da usare proprio nel caso in cui il DNA da analizzare sia danneggiato: durante la prima fase del processo, avverrà la riparazione dei danni a carico della doppia elica di DNA, grazie alla presenza degli enzimi di riparazione e solo in un secondo momento l'enzima DNA polimerasi condurrà l'amplificazione (Robertson *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda la tecnica molecolare da utilizzare questa dovrebbe essere selezionata con accuratezza.

La PCR multiplex potrebbe costituire una tecnica potenzialmente applicabile, poiché consente l'amplificazione simultanea dello stesso frammento genico appartenente a specie diverse, tramite l'utilizzo di più coppie di primers. L'impiego di questa tecnica, tuttavia, prevede una conoscenza preliminare di tutte le specie presenti nel prodotto finito e le loro percentuali e, come nel caso del surimi, non sempre questo è possibile. Inoltre, anche se recentemente è stata messa a punto una Decaplex PCR (Marin *et al.*, 2015), normalmente il numero di specie che possono essere discriminate contemporaneamente da questa metodica è limitato. Ad esempio, nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto due tecniche per l'identificazione di specie di meduse e di rane pescatrici che permettevano di identificare 5 e 7 specie rispettivamente (Armani *et al.*, 2014; Armani *et al.*, 2015). Pertanto, l'applicazione di questa tecnica potrebbe permettere l'identificazione solo di alcune delle specie potenzialmente utilizzabili (Tabella 1).

Anche il clonaggio potrebbe essere una tecnica utilizzabile nel caso di prodotti multispecie (Galal-Khallaf *et al.*, 2016), ma in questo caso il problema principale è che i prodotti di PCR clonati derivano dall'amplificazione di un singolo frammento genico selezionato. Come per il DNA *barcoding*, quindi, la scelta della coppia di primers per amplificare quel frammento target può comportare l'amplificazione preferenziale della specie presente in maggior quantità della miscela o di quella più affine ai primers usati. Inoltre, il clonaggio risulta una tecnica dispendiosa a livello economico.

Tra le tecniche di nuova generazione, la NGS (*next generation sequencing*), nonostante non sia ancora stata applicata al comparto dell'ispezione degli alimenti, potrebbe fornire risultati interessanti per quanto riguarda l'identificazione di specie. La principale potenzialità di tale tecnica, infatti, risiede nella possibilità di sequenziare moltissimi frammenti di DNA in parallelo e ciò si tradurrebbe in un notevole risparmio di tempo. Un recente studio (Bertolini *et al.*, 2015) che ha utilizzato tale tecnica per l'identificazione di specie all'interno di una miscela di DNA, ha, però, messo in evidenza la necessità di utilizzare più coppie di primers per l'amplificazione del frammento genico selezionato.

Questo approccio, infatti, potrebbe evitare che si verificano fenomeni di inibizione a carico della PCR o di competizione tra le diverse specie presenti. Tale studio ha previsto una fase preliminare di amplificazione di miscele di DNA provenienti da specie diverse, testate in varie proporzioni e anche questo potrebbe rappresentare un problema, nel caso in cui non si abbiano a disposizione dati sulle potenziali specie presenti nel prodotto finito. Il lavoro di Bertolini *et al.*, 2015, infatti, ha testato miscele di DNA provenienti da 13 specie animali, mentre nel surimi sono 41 le specie di pesce maggiormente utilizzate per la sua produzione, a cui si vanno ad aggiungere 4 specie di cefalopodi. Alla luce di questi dati, seppur capace di identificare più specie, la tecnica NGS risulterebbe comunque laboriosa e, soprattutto, dispendiosa in termini economici.

CAPITOLO 10. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha evidenziato una serie di limiti nell'analisi di prodotti trasformati multispecie. In particolare, i nostri risultati sottolineano la necessità di effettuare studi preliminari per la valutazione del livello di degradazione del DNA e dell'efficienza di amplificazione dei primers. Nonostante le difficoltà associate all'utilizzo della tecnica del DNA *barcoding*, per il 7,4% (2/27) dei prodotti è stato possibile evidenziare la presenza di più specie, grazie all'analisi di aliquote diverse dello stesso prodotto o di frammenti genici target diversi. Quest'ultimo risultato non esclude, comunque, la presenza di altre specie all'interno del prodotto, potenzialmente presenti in quantità minori oppure meno affini ai primers selezionati. In conclusione, per il 18,5% (5/27) dei prodotti per i quali erano fornite etichette con informazioni volontarie, è stato possibile parlare di *mislabeling*. Infatti, nonostante in etichetta fosse dichiarata la presenza di *Nemipterus* sp., le analisi molecolari effettuate sulle sequenze non hanno restituito identità nei confronti di tale specie.

APPENDICE

| Famiglia | Denominazione scientifica | Denominazione commerciale in lingua inglese | Denominazione commerciale in lingua italiana | Fonte |
|-----------------|------------------------------------|--|---|---------------------------------|
| Gadidae | <i>Theragra chalcogramma</i> | Alaska pollock | Pollack d'Alaska | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| | <i>Melanogrammus aeglefinus</i> | Haddock | Eglefino | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| | <i>Micromesistius poutassou</i> | Northern blue whiting | Melù | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| Merluccidae | <i>Macruronus novaezelandiae</i> | Hoki | Nasello azzurro | |
| | <i>Merluccius productus</i> | Pacific whiting | Nasello del Pacifico | |
| | <i>Merluccius hubbsi</i> | Argentine hake | Nasello | |
| | <i>Merluccius capensis</i> | South African hake | Nasello sudafricano | |
| | <i>Macruronus magellanicus</i> | Patagonian grenadier | Nasello della Patagonia | |
| Cichlidae | <i>Oreochromis mossambicus</i> | Mozambique tilapia | Tilapia del Mozambico | Rawdkuen <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>Oreochromis niloticus</i> | Nile tilapia | Tilapia nilotica | |
| | <i>Oreochromis aureus</i> | Blue tilapia | Tilapia | |
| Pleuronectidae | <i>Atheresthes stomias</i> | Arrowtooth flounder | Halibut del Pacifico | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| | <i>Atheresthes evermanni</i> | Kamchatka flounder | Halibut del Pacifico | |
| Salmonidae | <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> | Pink salmon | Salmone del Pacifico | Park and Morrissey, 2000 |
| | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Rainbow trout | Trota iridea | |
| | <i>Oncorhynchus keta</i> | Chum salmon | Salmone keta | |
| Carangidae | <i>Trachurus japonicus</i> | Japanese jack mackerel | Sugarello giapponese | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| | <i>Trachurus picturatus</i> | Blue jack mackerel | Sugarello pittato | |
| Hexagrammidae | <i>Pleurogrammus azonus</i> | Atka mackerel | Non riportata | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| | <i>Pleurogrammus monopterygius</i> | Atka mackerel | Non riportata | |
| Clupeidae | <i>Clupea pallasii</i> | Pacific herring | Aringa | Reppond <i>et al.</i> , 1995 |
| | <i>Sardina pilchardus</i> | Sardine | Sardina | Bentis <i>et al.</i> , 2005 |

| | | | | |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------|---|
| | <i>Clupea harengus</i> | Atlantic herring | Aringa | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| Cyprinidae | <i>Cyprinus carpio</i> | Common carp | Carpa | Jafarpour and Gorczyca, 2008; Luo <i>et al.</i> , 2001; Yuan <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>Ctenopharyngodon idella</i> | Grass carp | Carpa erbivora | |
| | <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | Silver carp | Carpa argentata | |
| | <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> | Bighead carp | Carpa testagrossa | |
| Mullidae | <i>Upeneus tragula</i> | Freckled goatfish | Triglia tropicale | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| | <i>Parupeneus indicus</i> | Indian goatfish | Non riportata | |
| | <i>Parupeneus multifasciatus</i> | Manybar goatfish | Non riportata | |
| | <i>Pseudupeneus prayensis</i> | West African goatfish | Non riportata | |
| Priacanthidae | <i>Priacanthus sagittarius</i> | Bigeye snapper | Catalufa | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| | <i>Priacanthus arenatus</i> | Bigeye | Catalufa | |
| | <i>Priacanthus hamrur</i> | Crescent Tail Bigeye | Non riportata | |
| | <i>Priacanthus prolixus</i> | Elongate Bulleye | Non riportata | |
| | <i>Priacanthus macracanthus</i> | Red bigeye | Non riportata | |
| Sphyraenidae | <i>Sphyraena sphyraena</i> | European barracuda | Barracuda europeo | Benjakul <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Sphyraena barracuda</i> | Great barracuda | Grande barracuda | |
| | <i>Sphyraena japonica</i> | Japanese barracuda | Barracuda giapponese | |
| Sciaenidae | <i>Larymichthys poliactys</i> | Redlip croaker | Non riportata | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| | <i>Larymichthys crocea</i> | Croceine croaker | Non riportata | |
| Nemipteridae | <i>Nemipterus japonicus</i> | Japanese threadfin bream | Nemiptero | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| | <i>Nemipterus virgatus</i> | Golden threadfin bream | Nemiptero | |
| | <i>Nemipterus bleekeri</i> | Non riportata | Nemiptero | |
| | <i>Nemipterus hexodon</i> | Ornate threadfin bream | Nemiptero | |
| | <i>Nemipterus furcosus</i> | Fork-tailed threadfin bream | Nemiptero | |
| Trichiuridae | <i>Trichiurus lepturus</i> | Largehead hairtail | Pesce coltello | Guenneugues and Morrissey, 2005 |

| | | | | |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|--|
| Anoplopomatidae | <i>Anoplopoma fimbria</i> | Sablefish | Carbonaro dell'Alaska | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| Sparidae | <i>Eyynn timeria</i> | Yellowback seabream | Non riportata | |
| | <i>Eyynn cardinalis</i> | Threadfin porgy | Non riportata | |
| | <i>Parargyrops edita</i> | Red-fin pargo | Non riportata | |
| Nototheniidae | <i>Dissostichus eleginoides</i> | Patagonian toothfish | Nototenide della Patagonia | |
| Chirocentridae | <i>Chirocentrus dorab</i> | Dorab wolf-herring | Non riportata | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| Synodontidae | <i>Saurida wanieso</i> | Lizardfish | Pesce lucertola | Benjakul <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Saurida undosquamis</i> | Brushtooth lizardfish | Pesce lucertola | |
| Muraenesocidae | <i>Muraenosox cinereus</i> | Dagger-tooth pike conger | Non riportata | Guenneugues and Morrissey, 2005 |
| | <i>Congresox talabonoides</i> | Indian pike conger | Non riportata | |
| Pomacentridae | <i>Pomacentrus philippinus</i> | Philippine damsel | Non riportata | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| Stromateidae | <i>Peprilus medius</i> | Pacific harvestfish | Non riportata | |
| Sebastidae | <i>Helicolenus dactylopterus</i> | Blackbelly rosefish | Scorfano di fondale | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| | | | | |
| Ommastrephidae | <i>Dosidicus gigas</i> | Humboldt squid | Calamaro di Humboldt | Vidal-Giraud and Chateau, 2007; Sanchèz-Alonso <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>Ommastrephes bartramii</i> | Neon flying squid | Non riportata | Choi and Kim, 2012 |
| Loliginidae | <i>Doryteuthis pealeii</i> | Longfin inshore squid | Calamaro | Guenneugues and Ianelli, 2014 |
| | <i>Doryteuthis opalescens</i> | Opalescent inshore squid | Non riportata | |
| | <i>Doryteuthis gahi</i> | Patagonian Squid | Calamaro atlantico | |

Tab. 1: Specie ittiche riportate in bibliografia come le più utilizzate per la produzione di surimi.

| Famiglia | Denominazione scientifica | Denominazione commerciale in lingua inglese | Denominazione commerciale in lingua italiana | Fonte | Reperimento (%) |
|-----------------|----------------------------------|--|---|--|---|
| Gadidae | <i>Micromesistius poutassou</i> | Northern blue whiting | Melù | Keskin and Atar, 2012; Pepe <i>et al.</i> , 2007 | 2 – Keskin and Atar; 5 – Pepe <i>et al.</i> |
| | <i>Micromesistius australis</i> | Southern blue whiting | Melù australe | Keskin and Atar, 2012 | 2 – Keskin and Atar |
| | <i>Theragra finnmarchica</i> | Norway pollock | Non riportata | Huxley-Jones <i>et al.</i> , 2012 | 1 – Huxley-Jones <i>et al.</i> |
| | <i>Gadus ogac</i> | Greenland cod | Merluzzo della Groenlandia | | 1 – Huxley-Jones <i>et al.</i> |
| Merlucciidae | <i>Merluccius productus</i> | Pacific whiting | Nasello del Pacifico | Keskin and Atar, 2012; Pepe <i>et al.</i> , 2007 | 20 – Keskin and Atar; 36 – Pepe <i>et al.</i> |
| | <i>Merluccius gayi</i> | Peruvian hake | Nasello del Pacifico | | 4-Keskin and Atar; 10-Pepe <i>et al.</i> |
| | <i>Merluccius australis</i> | Southern hake | Nasello australe | | 2 – Keskin and Atar; 5 – Pepe <i>et al.</i> |
| | <i>Merluccius capensis</i> | South African hake | Nasello suafricano | Keskin and Atar, 2012 | 2 – Keskin and Atar |
| | <i>Merluccius merluccius</i> | European hake | Nasello | | 4 – Keskin and Atar |
| | <i>Merluccius hubbsi</i> | Argentine hake | Nasello atlantico | | Huxley-Jones <i>et al.</i> , 2012; Pepe <i>et al.</i> , 2007 |
| Clupeidae | <i>Sardinella fimbriata</i> | Fringescale sardinella | Alaccia asiatica | Galal-Khallaf <i>et al.</i> , 2015 | 52 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| | <i>Sardinella albella</i> | White sardinella | Alaccia asiatica | | 4 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| | <i>Sardinella jussieu</i> | Mauritian sardinella | Non riportata | | 14 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| Mullidae | <i>Upeneus tragula</i> | Freckled goatfish | Triglia tropicale | Keskin and Atar, 2012 | 2 – Keskin and Atar |
| Priacanthidae | <i>Priacanthus macracanthus</i> | Red bigeye | Non riportata | | 2 – Keskin and Atar |
| Sciaenidae | <i>Pennahia anea</i> | Bigeye croaker | Non riportata | | 4 – Keskin and Atar |
| | <i>Argyrosomus japonicus</i> | Japanese meagre | Non riportata | | 4 – Keskin and Atar |
| | <i>Argyrosomus inodorus</i> | Mild meagre | Non riportata | 4 – Keskin and Atar | |
| Nemipteridae | <i>Nemipterus japonicus</i> | Japanese threadfin bream | Nemiptero | Keskin and Atar, 2012 | 2 – Keskin and Atar |
| | <i>Nemipterus furcosus</i> | Fork-tailed threadfin bream | Nemiptero | | 2 – Keskin and Atar |
| | <i>Nemipterus peronii</i> | Notchedfin threadfin bream | Nemiptero | | 4 – Keskin and Atar |

| | | | | | |
|---------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Nemipterus mesoprion</i> | Mauvelip threadfin bream | Nemiptero | Huxley-Jones <i>et al.</i> , 2012 | 1 – Huxley-Jones <i>et al.</i> |
| | <i>Nemipterus bathybius</i> | Yellow threadfin bream | Nemiptero | Galal-Khallaf <i>et al.</i> , 2015 | 5 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| Sparidae | <i>Diplodus sargus</i> | White seabream | Sarago maggiore | Keskin and Atar, 2012 | 2 – Keskin and Atar |
| | <i>Parargyrops edita</i> | Red-fin pargo | Non riportata | Pepe <i>et al.</i> , 2007 | 5 – Pepe <i>et al.</i> |
| Synodontidae | <i>Synodus variegatus</i> | Variegated lizardfish | Pesce lucertola | Keskin and Atar, 2012 | 4 - Keskin and Atar |
| | <i>Synodus indicus</i> | Indian lizardfish | Pesce lucertola | | 4 - Keskin and Atar |
| | <i>Synodus synodus</i> | Diamond lizardfish | Pesce lucertola | | 4 - Keskin and Atar |
| | <i>Saurida elongata</i> | Slender lizardfish | Pesce lucertola | Galal-Khallaf <i>et al.</i> , 2015 | 14 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| Pomacentridae | <i>Pomacentrus philippinus</i> | Philippine damsel | Non riportata | Pepe <i>et al.</i> , 2007 | 10 – Pepe <i>et al.</i> |
| Pangasiidae | <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> | Iridescent shark | Pangasio | Galal-Khallaf <i>et al.</i> , 2015 | 38 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| Engraulidae | <i>Thryssa setirostris</i> | Longjaw thryssa | Non riportata | | 5 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| Rhinobatidae | <i>Rhinobatos jimbaranensis</i> | Jimbaran shovelnose ray | Non riportata | | 5 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| Triglidae | <i>Chelidonichthys kumu</i> | Bluefin gurnard | Gallinella australe | | 14 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |
| | <i>Lepidotrigla japonica</i> | Non riportata | Non riportata | | 5 - Galal-Khallaf <i>et al.</i> |

Tab 2: Specie ittiche identificate all'interno delle preparazioni a base di surimi.

| Famiglia | Specie | Area cattura | Istituto ricerca |
|----------------|------------------------------------|---------------------|--|
| Gadidae | <i>Theragra chalcogramma</i> | FAO 67 | White – NOAA Fisheries, Alaska Fisheries Science Center |
| | <i>Gadus morhua</i> | NV | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Melanogrammus aeglefinus</i> | NV | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Micromesistius poutassou</i> | FAO 37.2.1 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Merlucciidae | <i>Merluccius hubbsi</i> | NV | Dr. Acutis - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino |
| | <i>Merluccius gayi</i> | NV | Dr. Acutis - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino |
| | <i>Merluccius productus</i> | FAO 67 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| Cichlidae | <i>Oreochromis niloticus</i> | Vietnam Mekong | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Oreochromis mossambicus</i> | | Penman Institute of Aquaculture, University of Stirling – Scotland |
| | <i>Oreochromis aureus</i> | Lago Manzala Egitto | Penman Institute of Aquaculture, University of Stirling – Scotland |
| Pleuronectidae | <i>Atheresthes stomias</i> | FAO 67 | Bentley – University of Kansas – Biodiversity Institute |
| | | FAO 61 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Atheresthes evermanni</i> | FAO 67 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| Salmonidae | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Allevato in Italia | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Oncorhynchus keta</i> | FAO 67 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| | <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> | FAO 61 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| Carangidae | <i>Trachurus japonicus</i> | NV | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Trachurus picturatus</i> | NV | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Hexagrammidae | <i>Pleurogrammus monopterygius</i> | FAO 67 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| Clupeidae | <i>Clupea harengus</i> | | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Clupea pallasii</i> | FAO 67 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| | <i>Sardina pilchardus</i> | FAO 37.1.3 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |

| | | | |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------|--|
| | <i>Sardinella aurita</i> | FAO 37.1.3 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Cyprinidae | <i>Cyprinus carpio</i> | Allevato in Bulgaria | Stratev – Department of Food Hygiene and Control, Veterinary Legislation and Management |
| | <i>Ctenopharyngodon idella</i> | Allevato in Polonia | Korwin-Kossakowski – The Stanislaw Sakowicz Inland Fisheries Institute in Olsztyn, Pond Fishery Department in Zabieniec, Poland |
| | <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | Allevato in Polonia | Korwin-Kossakowski – The Stanislaw Sakowicz Inland Fisheries Institute in Olsztyn, Pond Fishery Department in Zabieniec, Poland |
| | <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> | Allevato Repubblica Ceca | Korwin-Kossakowski – The Stanislaw Sakowicz Inland Fisheries Institute in Olsztyn, Pond Fishery Department in Zabieniec, Poland |
| Mullidae | <i>Upeneus tragula</i> | FAO 61 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Pseudupeneus prayensis</i> | FAO 34.3.1 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Priacanthidae | <i>Priacanthus macracanthus</i> | FAO 61 | Department of Biology - chinese University of Hong Kong |
| Sphyraenidae | <i>Sphyraena sphyraena</i> | NV | Dr. Acutis - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino |
| Sciaenidae | <i>Larymichthys polyactis</i> | NV | Dr. Acutis - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino |
| | <i>Larymichthys crocea</i> | NV | Dr. Acutis - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino |
| Nemipteridae | <i>Nemipterus japonicus</i> | FAO 61 | Department of biology - chinese University of Hong Kong |
| | <i>Nemipterus virgatus</i> | FAO 61 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Nemipterus furcosus</i> | FAO 61 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Trichiuridae | <i>Trichiurus lepturus</i> | FAO 67 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Anoplopomatidae | <i>Anoplopoma fimbria</i> | FAO 67 | Maslenikov- University of Washington Fish Collection School of Aquatic and Fishery Sciences and Burke Museum of Natural History and Culture |
| Sparidae | <i>Eynniss cardinalis</i> | FAO 61 | Shao – Biodiversity Research Center Academia Sinica – Nankang, Taipei, Taiwan |
| | <i>Eynniss tumifrons</i> | FAO 61 | Shao – Biodiversity Research Center Academia Sinica – Nankang, Taipei, Taiwan |
| Nothoteniidae | <i>Dissostichus eleginoides</i> | FAO 61 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Triglidae | <i>Chelidonichthys lucerna</i> | NV | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Ommastrephidae | <i>Dosidicus gigas</i> | FAO 57 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Ommastrephes bartramii</i> | FAO 57 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| Loliginidae | <i>Doryteuthis pealeii</i> | FAO 21 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |
| | <i>Doryteuthis gahi</i> | FAO 41 | Fishlab – Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università di Pisa |

Tab. 3: Campioni di riferimento morfologicamente identificati raccolti in questo studio.

| PUNTO VENDITA | COD. INT. | PAESE PRODUTTORE | DESCRIZIONE | INGREDIENTI | SPECIE DICHIARATA/E |
|----------------------|-----------|------------------|---|---|--|
| Grande distribuzione | SUR 1 | BELGIO | Bastoncini di surimi al sapore di granchio Prodotto stoccato in salamoia | PESCE 37% , Additivi E452, E635, Estratto di paprika (E160), amido di grano e tapioca modificato, zucchero, sale, olio di palma, albume d' uovo . | <i>Nemipterus sp.</i> , <i>Priacanthus sp.</i> |
| Grande distribuzione | SUR2 | SPAGNA | Surimi al sapore di granchio Prodotto congelato | SURIMI 38%, (PESCE,CEFALOPODI), acqua, amido di mais, amidi modificati, olio di semi di girasole, sale, albume d' uovo . | ND |
| Grande distribuzione | SUR3 | FRANCIA | Affettato di mare prodotto refrigerato | POLPA DI PESCE 38% , acqua, fecole di grano, olio di colza, albume, zucchero, sale, stabilizzanti: sorbitolo e polifosfati; aroma naturale: crostacei e grano. Colorante: estratto di paprika. | ND |
| Vendita al dettaglio | SUR4 | THAILANDIA | Preparazione alimentare a base di pesce e all'aroma di granchio Prodotto congelato | SURIMI 25%, (polpa di pesce bianco tritata); zucchero, stabilizzanti (E450, 451,452), acqua, amido di frumento , amido di tapioca, zucchero, sale, olio di palma, proteine della soia , estratto di granchio , aroma di granchio , E635(glutammato), albume d' uovo , colorante E160. | <i>Nemipterus</i> (FAO57/71), <i>Priacanthus sp</i> (FAO 57/71) |
| Grande distribuzione | SUR5 | LITUANIA | Bastoncini di surimi Prodotto congelato | SURIMI 38%(Polpa di pesce , stabilizzante sorbitolo e polifosfati); acqua, amido di frumento , albume d' uovo , olio di colza, proteine della soia , sale, zucchero, amido acetilato, aroma (crostacei), esaltatore di sapidità (glutammato monosodico, inoasinato disodico), uovo intero, estratto di paprika, acido carminico. | ND |
| Grande distribuzione | SUR6 | FRANCIA | “Bastoncini di surimi” Prodotto refrigerato | Polpa di pesce , acqua, amido di grano, albume d' uovo reidratato, olio di colza, zucchero, sale, aromi naturali (crostacei, molluschi, pesce); colorante: estratto di paprika. | ND |
| Grande distribuzione | SUR7 | FRANCIA | Bastoncini al tonno Prodotto refrigerato | SURIMI 43%(Polpa di pesce di cui 9% Tonno), acqua, albume d' uovo , fecole (di cui grano), oli vegetali (colza e girasole) Stabilizzanti: sorbitolo, polifosfati, zucchero, sale. Colorante: paprika, carmino. Tracce di crostacei | ND |
| Grande distribuzione | SUR8 | BELGIO | Preparazione a base di pesce al sapore di Granchio | SURIMI 43%(Polpa di pesce e stabilizzanti : sorbitolo E420, polifosfati E452); acqua, amido, albume d' uovo , olio di colza, proteine della soia , sale zucchero, amido acetilato, esaltatori E621, 631, E635; uovo intero. Coloranti: E160c, E120. | ND |
| Grande distribuzione | SUR9 | FRANCIA | Bastoncini al sapore di granchio | Pesce 38% , acqua, amido, fecola di patate, albume d' uovo reidratato, olio di colza, zucchero, sale, aromi, estratto di paprika. | ND |

| | | | | | |
|-------------------------------------|--------|----------|---|--|--|
| Piccola distribuzione specializzata | SUR10 | COREA | Imitazione coda d'aragosta | POLLACK D'ALASKA 55,78%; acqua, amido di frumento , albume d' uovo , estratto di aragosta, alcol di riso, sale, zucchero, olio di semi di soia , colorante naturale: paprika. | <i>Theragra chalcogramma</i> |
| Piccola distribuzione specializzata | SUR11 | LITUANIA | Bastoncini di surimi al sapore di granchio | SURIMI 38%, acqua, amido, albume d' uovo , olio di colza, proteine della soia , sale, zucchero, amido acetilato di tapioca e patate, aroma di granchio, uovo intero, E621, E631, E635, E160, E120. | ND |
| Grande distribuzione | SUR12 | FRANCIA | Bastoncini di surimi sott'olio | SURIMI 62%, amido, olio vegetale, proteine della soia , carragenina, olio di semi di girasole. | ND |
| Grande distribuzione | SUR13 | LITUANIA | Bastoncini di surimi sapore di granchio | PESCE 40%, amido di frumento , amido di mais, olio di soia , bevanda di riso, proteine della soia , glutammato monosodico, estratto di paprika, sale, acqua, zucchero. | <i>Nemipterus bleekeri</i> (FAO 61) |
| Grande distribuzione | SUR 23 | FRANCIA | Bastoncini di surimi [preparazione alimentare a base di polpa di pesce al sapore di granchio] | Polpa di pesce 38%, acqua, amidi di grano e fecola di patate, albume d' uovo reidratato, olio di colza, zucchero, sale, aromi, crostacei , cefalopodi , paprika. | Merluzzo di Alaska, <i>Nemipterus</i> sp., Catalufa, Merluzzo carbonaro, Merluzzo nordico, <i>Pennatia</i> sp., pesce lucertola. |
| Grande distribuzione | SUR 24 | ITALIA | Surimi marinato in olio di semi di girasole | SURIMI 78%, acqua, albume d' uovo , amido di frumento, zucchero, sale, aroma di gambero, estratto di gambero, alcol di riso, olio di semi di soia , paprika, olio di semi di girasole, aceto di vino, aromi naturali. | Pollack d'Alaska |
| Grande distribuzione | SUR 25 | SPAGNA | Bastoncini di surimi surgelati, preparazione alimentare a base di pesce al sapore di granchio | SURIMI 38%, polpa di pesce , acqua, amido, albume d' uovo , olio di colza, proteine della soia , sale, zucchero, amido modificato, aroma, uovo intero. | ND |
| Grande distribuzione | SUR 27 | FRANCIA | Bastoncini di surimi, specialità a base di pesce, sapore granchio | Polpa di pesce 38%, acqua, amidi di grano e fecola di patate, albume d' uovo reidratato, olio di colza, zucchero, sale, aromi (contiene crostacei , molluschi , pesce), colorante: estratto di paprika. | ND |

| | | | | | |
|----------------------|--------|---------|---|--|----|
| Grande distribuzione | SUR 28 | SPAGNA | Chele al sapore di granchio impanate | SURIMI 38% [pesce, cefalopodi (molluschi)], acqua, pangrattato (farina di riso, destrosio, sale, estratto di paprika), amido e farina di mais, chele di granchio, olio di semi di girasole, amidi modificati, proteine vegetali, zucchero, albume d' uovo , sale, addensante E415, aroma di granchio, glutammato monosodico, aromi e coloranti (estratto di paprika, F171) | ND |
| Grande distribuzione | SUR 40 | FRANCIA | Bastoncini di surimi, Preparazione a base di carne di pesce | Carne di pesce 38%, amido, bianco d' uovo reidratato, olio di colza, stabilizzanti: sorbitolo, polifosfati, aroma di crostacei , sale, zucchero, proteine di soia , amido di tapioca modificato, colorante: estratto di paprika. | ND |

Tab. 4a: Informazioni relative ai prodotti commerciali inclusi nello studio acquistati al dettaglio in esercizi commerciali di piccola e grande distribuzione.
 COD. INT: codice interno assegnato presso il nostro laboratorio.
 ND: non dichiarata

| CODICE ORIGINALE | COD. INT. | PAESE PRODUTTORE | DESCRIZIONE | INGREDIENTI | SPECIE DICHIARATA/E |
|------------------|-----------|------------------|--|---|-------------------------------------|
| PIF2 | SUR14 | CINA | Bastoncini surimi al sapore di granchio | SURIMI 44% , amido di frumento , olio di semi di soia , aroma di granchio, estratto di granchio, albume d' uovo , fecola di patate | <i>Nemipterus</i> sp. |
| PIF3 | SUR15 | CINA | Imitazione code di gambero IQF surgelate | SURIMI 54%, albume d' uovo , amido di frumento , proteine di soia , olio di semi di soia , distillato di riso dolcificato, aroma di gambero, estratto di gambero. | <i>Nemipterus</i> sp. |
| PIF5 | SUR16 | THAILANDIA | Surimi a forma di pescetti, polpa di pesce, imitazione di carne di granchio formato da proteine muscolari di pesce | SURIMI 35%, olio di palma, amido di tapioca modificato, albume d' uovo , proteine di soia , estratto di granchio. | <i>Nemipterus</i> sp. |
| PIF7 | SUR17 | CINA | Imitazione di code di aragosta surgelata, preparazione a base di surimi (pesce ricomposto) | SURIMI 42%, E420, zucchero, stabilizzanti: E450,E451; acqua, amido di frumento , farina di frumento , olio di semi di soia , zucchero, sale, aroma di aragosta (0,2%), estratto di aragosta (0,6%) E621. Coloranti: E170 (carbonato di calcio), E160c (estratto di paprika). | <i>Nemipterus</i> sp. (FAO 61 e 71) |

| | | | | | |
|--------|--------|------------|---|--|--|
| PIF14 | SUR18 | THAILANDIA | Preparazione a base di pesce imitazione code di gambero | SURIMI 54% , zucchero, stabilizzanti (E450,451,452), acqua, amido di frumento , amido di patata, sale, olio di palma, proteine della soia , aroma di aragosta, estratto di granchio, albume d'uovo , coloranti E170,E160c. | <i>Nemipterus</i> sp (FAO 57 e 71) |
| PIF 40 | SUR19 | INDIA | Preparazione alimentare surgelata a base di pesce | SURIMI polpa di pesce Nemiptero 26,38%, zucchero, stabilizzanti E451, E450, acqua, pastella [acqua, amido di mais, amido di frumento , amido di tapioca, sale, addensante E412, proteine isolate dalla soia , colorante E160], panatura [farina di frumento , sale, zucchero, lievito, conservante E260, antiossidante E307, amido di mais, amido di tapioca, chele vere di granchio, olio di semi di soia , albume d' uovo in polvere, estratto di granchio]. | <i>Nemipterus japonicus</i> pescato Oceano Indiano (FAO 51) |
| PIF41 | SUR20 | INDIA | Imitazione di code di gambero surgelate | SURIMI 44%, amido di frumento , olio di semi di soia , aroma di granchio, estratto di granchio, albume d' uovo , fecola di patate, paprika. | <i>Nemipterus</i> spp. |
| PIF44 | SUR21 | THAILANDIA | Imitazione surimi tagliati surgelati – preparazione alimentare surgelata a base di pesce | SURIMI polpa di pesce Nemiptero 31,95%, zucchero, acqua, amido di frumento , amido modificato di tapioca, amido di mais, sale, estratto di granchio, olio di semi di soia , albume d' uovo in polvere. | <i>Nemipterus japonicus</i> Oceano Indiano (FAO 51) |
| PIF45 | SUR22 | THAILANDIA | Preparazione alimentare a base di pesce, imitazione code di gambero congelate | SURIMI 43% pasta di pesce tritata, zucchero, acqua, amido di frumento, amido di tapioca, sale, albume d' uovo , olio di palma, aroma aragosta [crostacei]. | <i>Nemipterus</i> sp. PescatoOceano Indiano (FAO 57) , <i>Priacanthus</i> sp. (FAO 57 e 71) |
| PIF 60 | SUR 26 | CINA | Preparazione alimentare a base di pesce impanata e congelata al sapore di granchio con vera chela | SURIMI 45%, zucchero, uova , stabilizzante E452, farina di frumento , soia , lievito, sale, colorante, estratto di paprika E160, acqua, pastella, proteine della soia , amido di frumento , amido di mais, distillato di riso, olio di soia , estratto di granchio 0,95%, esaltatore di sapidità, glutammato monosodico E621, chele di granchio 0,064%, aroma di granchio 0,03%. | <i>Nemipterus virgatus</i> , Oceano Pacifico (FAO 61) |
| PIF 96 | SUR 29 | THAILANDIA | Imitazione di chele di granchio | NON DISPONIBILE | <i>Nemipterus</i> sp., |
| PIF 97 | SUR 30 | THAILANDIA | Bastoncini a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Nemipterus</i> sp, <i>Portunus</i> sp., |

| | | | | | |
|---------|--------|------------|--|---|---|
| PIF 103 | SUR 31 | THAILANDIA | Imitazione di chele di granchio | Panatura 54%, acqua, mix per tempura (farina di frumento , amido di mais, olio di palma, amido di tapioca modificato, lievito in polvere, sale), SURIMI 46% , zucchero, stabilizzanti E450, 451, 452, amido di patate, albume d'uovo , estratto di granchio (crostacei, soia) | <i>Nemipterus</i> sp., (FAO 57 e 71) |
| PIF 104 | SUR 32 | THAILANDIA | Surimi a forma di chele di granchio delle nevi per sushi | SURIMI 53% , sorbitolo E420, zucchero, stabilizzanti E450, 451, acqua, amido di tapioca modificato, sale, amido di frumento , albume d'uovo , estratto di granchio (crostacei, soia), aroma di granchio (crostacei), esaltatori di sapidità E635 | <i>Theragra Chalcogramma</i> (FAO 67) |
| PIF 105 | SUR 33 | THAILANDIA | Imitazione di polpa di granchio | Acqua, SURIMI 30%, sorbitolo E420, zucchero, stabilizzante E450, amido di frumento , amido di tapioca modificato, sale, olio di palma, estratto di granchio (crostacei, soia), albume d'uovo . | <i>Theragra Chalcogramma</i> , (FAO 67) |
| PIF 107 | SUR 34 | THAILANDIA | Preparazione alimentare a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Nemipterus</i> sp., <i>Portunus</i> sp., <i>Carcinus maenus</i> |
| PIF 108 | SUR 35 | THAILANDIA | Preparazione alimentare a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Nemipterus</i> sp., <i>Portunus</i> sp., <i>Carcinus maenus</i> |
| PIF 109 | SUR 36 | VIETNAM | Preparazione alimentare a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Nemurus</i> sp., <i>Nemipterus japonicus</i> (FAO 71) |
| PIF 115 | SUR 37 | INDIA | Preparazione alimentare a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Nemipterus japonicus</i> (FAO 51) |
| PIF 118 | SUR 38 | THAILANDIA | Preparazione alimentare a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Priacanthus</i> sp., <i>Nemipterus</i> sp., <i>Theragra chalcogramma</i> |
| PIF 120 | SUR 39 | THAILANDIA | Preparazione alimentare a base di surimi | NON DISPONIBILE | <i>Priacanthus</i> sp., <i>Nemipterus</i> sp., <i>Theragra chalcogramma</i> |

Tab. 4b: Informazioni relative ai prodotti commerciali inclusi nello studio forniti dal PIF di Livorno.

COD. INT.: codice interno assegnato presso il nostro laboratorio.

| Codice | Reference | Sequenza | Lunghezza (pb) | T° melting (°C) |
|--------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| P1 | Palumbi, 1996 | 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' | 20 | 51,2 |
| | | 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' | 22 | 62,1 |
| P2 | Armani <i>et al.</i> , 2012 | 5'-TGCCCGTGCAGAAGCGG-3' | 17 | 60,0 |
| | | 5'-CAACATCGAGGTCGTAAACCC-3' | 21 | 59,8 |
| M | Mikkelsen, 2006 | 5'-ACAAATCAYAARGAYATYGG-3' | 20 | 51,2 |
| | | 5'-TTCAGGRTGNCCRAARAAYCA-3' | 21 | 56,9 |
| H | Handy, 2011 | 5'-CTCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC-3' | 45 | 71,7 |
| | | 5'-ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA-3' | 43 | 72,3 |
| SH | Handy, 2011 | 5'-CTCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC-3' | 45 | 71,7 |
| | Armani <i>et al.</i> , 2015 | 5'-GGYATNACTATRAAGAAAATTATTAC-3' | 26 | 54,5 |

Tab. 5: Primers utilizzati nel presente studio.

P1: coppia di primers disegnata per l'amplificazione di un frammento di circa 650 pb del gene mitocondriale 16S rRNA

P2: coppia di primers disegnata per l'amplificazione di un frammento di 350 pb del gene mitocondriale 16S rRNA

M: coppia di primers disegnata per l'amplificazione di un frammento di 650 pb del gene mitocondriale COI

H: coppia di primers disegnata per l'amplificazione di un frammento di 655 pb del gene mitocondriale COI

SH: coppia di primers disegnata per l'amplificazione di un frammento di 139 pb del gene mitocondriale COI

| | P1 | P2 | H | M | SH |
|--------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Attivazione Taq | 94°C per 3 min | 94°C per 3 min | 94°C per 3 min | 94°C per 3 min | 94°C per 3 min |
| n° di cicli | 40 | 40 | 45 | 45 | 45 |
| Denaturazione | 94°C per 25 sec | 94°C per 30 sec | 94°C per 30 sec | 94°C per 30 sec | 94°C per 25 sec |
| Annealing | 57,5°C per 15 sec | 53°C per 20 sec | 55°C per 30 sec | 47°C per 30 sec | 51°C per 20 sec |
| Extension | 72°C per 2 sec | 72°C per 30 sec | 72°C per 40sec | 72°C per 30sec | 72°C per 10 sec |
| Elongation finale | 72°C per 10 min | 72°C per 10 min | 72°C per 10 min | 72°C per 10 min | 72°C per 5 min |

Tab. 6: Programmi di amplificazione di ciascuna coppia di primers utilizzata nello studio.

| PRODOTTO COMMERCIALE | CODICE | PATTERN DNA TOT (pb) | PRODOTTO DI PCR | |
|----------------------|----------|----------------------|-----------------|--------|
| | | | LUNGHEZZA (pb) | PRIMER |
| SURIMI 1 | SUR1.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR1.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR1.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR1.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR1.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 2 | SUR 2.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 2.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 2.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 2.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 2.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI3 | SUR 3.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 3.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 3.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 3.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 3.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 4 | SUR 4.1 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 4.2 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 4.3 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 4.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 4.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 5 | SUR 5.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 5.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 5.3 | >1000 | ~350 | P2 |
| | SUR 5.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 5.5 | >1000 | ~350 | P2 |
| SURIMI 6 | SUR 6.1 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 6.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 6.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 6.4 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 7 | SUR 7.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 7.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 7.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 7.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 7.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 8 | SUR 8.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 8.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 8.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 8.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 8.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 9 | SUR 9.1 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 9.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 9.3 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 9.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 9.5 | >500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 10 | SUR 10.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 10.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 10.3 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 11 | SUR 11.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 11.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 11.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 11.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 11.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 12 | SUR 12.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 12.2 | >1000 | ~350 | P2 |

| | | | | |
|-----------|----------|-------|------|----|
| | SUR 12.3 | >1000 | ~350 | P2 |
| | SUR 12.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 12.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 13 | SUR 13.1 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 13.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 13.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 13.4 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 13.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 14 | SUR 14.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 14.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 14.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 14.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 14.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 15 | SUR 15.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 15.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 15.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 15.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 15.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 16 | SUR 16.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 16.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 16.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 16.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 16.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 17 | SUR 17.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 17.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 17.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 17.4 | <500 | ~350 | P1 |
| | SUR 17.5 | <500 | ~350 | P1 |
| SURIMI 18 | SUR 18.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 18.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 18.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 18.7 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 18.8 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 19 | SUR 19.1 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 19.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 19.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 19.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 19.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 20 | SUR 20.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 20.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 20.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 20.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 20.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 21 | SUR 21.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 21.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 21.3 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 21.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 21.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 22 | SUR 22.1 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 22.2 | >500 | ~350 | P2 |
| | SUR 22.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 22.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 22.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 23 | SUR 23.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 23.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 23.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 23.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 23.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 24 | SUR 24.1 | >500 | ~650 | P1 |

| | | | | |
|-----------|----------|-------|------|-------------------|
| | SUR 24.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 24.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 24.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 24.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 25 | SUR 25.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 25.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 25.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 25.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 25.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 26 | SUR 26.1 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 26.2 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 26.3 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 26.4 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 26.5 | <250 | ~350 | P2 |
| SURIMI 27 | SUR 27.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 27.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 27.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 27.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 27.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 28 | SUR 28.1 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 28.2 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 28.3 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 28.4 | >500 | ~650 | P1 |
| | SUR 28.5 | >500 | ~650 | P1 |
| SURIMI 29 | SUR 29.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 29.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 29.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 29.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 29.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 30 | SUR 30.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 30.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 30.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 30.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 30.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 31 | SUR 31.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 31.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 31.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 31.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 31.5 | >1000 | ~650 | Non amplificabile |
| SURIMI 32 | SUR 32.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 32.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 32.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 32.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 32.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 33 | SUR 33.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 33.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 33.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 33.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 33.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 34 | SUR 34.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 34.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 34.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 34.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 34.5 | >1000 | ~650 | P1 |
| SURIMI 35 | SUR 35.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 35.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 35.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 35.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 35.5 | <500 | ~350 | P2 |

| | | | | |
|-----------|----------|-------|------|----|
| SURIMI 36 | SUR 36.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 36.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 36.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 36.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 36.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 37 | SUR 37.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 37.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 37.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 37.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 37.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 38 | SUR 38.1 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 38.2 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 38.3 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 38.4 | <500 | ~350 | P2 |
| | SUR 38.5 | <500 | ~350 | P2 |
| SURIMI 39 | SUR 39.1 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 39.2 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 39.3 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 39.4 | <250 | ~350 | P2 |
| | SUR 39.5 | <250 | ~350 | P2 |
| SURIMI 40 | SUR 40.1 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 40.2 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 40.3 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 40.4 | >1000 | ~650 | P1 |
| | SUR 40.5 | >1000 | ~650 | P1 |

Tab .7: Risultati corsa elettroforetica ed amplificabilità dei campioni commerciali inclusi nello studio.

| SPECIE | MISURAZIONE SPETTROFOTOMETRICA | | | RESA |
|------------------------------------|--------------------------------|----------|----------|------|
| | CONC. MEDIA ng/µl | A260/280 | A260/230 | |
| <i>Theragra chalcogramma</i> | 916,8 | 2,08 | 1,64 | ND |
| <i>Gadus morhua</i> | 1902 | 2,11 | 1,70 | 0,57 |
| <i>Melanogrammus aeglefinus</i> | 1621 | 2,10 | 1,82 | 0,32 |
| <i>Micromesistius poutassou</i> | 1403,0 | 2,10 | 1,73 | 0,28 |
| <i>Merluccius hubbsi</i> | ND | ND | ND | ND |
| <i>Merluccius gayi</i> | ND | ND | ND | ND |
| <i>Merluccius productus</i> | 347,1 | 2,05 | 1,29 | 1,4 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | 1131,2 | 2,19 | 2,06 | 0,25 |
| <i>Oreochromis mossambicus</i> | 1270,0 | 2,03 | 1,72 | 2,19 |
| <i>Oreochromis aureus</i> | 893,9 | 2,06 | 2,15 | 2,55 |
| <i>Atheresthes stomias</i> | 1253,3 | 2,08 | 1,98 | 0,58 |
| <i>Atheresthes evermanni</i> | 229,7 | 1,50 | 1,37 | 1,12 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 1586,0 | 2,10 | 1,98 | 0,82 |
| <i>Oncorhynchus keta</i> | 490,15 | 1,59 | 1,59 | 3,6 |
| <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> | 806,5 | 2,10 | 2,16 | 1,65 |
| <i>Trachurus japonicus</i> | 1860,0 | 2,02 | 1,95 | 0,65 |
| <i>Trachurus picturatus</i> | 695,5 | 2,17 | 2,25 | 0,34 |
| <i>Pleurogrammus monopterygius</i> | 188,8 | 2,44 | 1,35 | 1,23 |
| <i>Clupea harengus</i> | 117,0 | 2,02 | 1,97 | 0,04 |
| <i>Clupea pallasii</i> | 225,3 | 1,96 | 1,80 | 0,60 |
| <i>Sardina pilchardus</i> | 2159,0 | 2,03 | 1,98 | 0,47 |
| <i>Sardinella aurita</i> | 1522,5 | 2,00 | 2,02 | 0,30 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 1227,5 | 2,11 | 2,00 | 0,05 |
| <i>Ctenopharyngodon idella</i> | 1655,3 | 2,09 | 1,98 | 0,89 |
| <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | 1242,8 | 2,11 | 2,06 | 1,72 |
| <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> | 855,2 | 1,97 | 1,06 | 1,31 |
| <i>Upeneus tragula</i> | 294,6 | 1,92 | 1,08 | 0,06 |
| <i>Pseudupeneus prayensis</i> | 651,3 | 2,05 | 2,02 | 0,12 |
| <i>Priacanthus macracanthus</i> | 1533,4 | 2,15 | 1,98 | 0,61 |
| <i>Sphyræna sphyræna</i> | ND | ND | ND | ND |
| <i>Larymichthys polyactis</i> | ND | ND | ND | ND |
| <i>Larymichthys crocea</i> | ND | ND | ND | ND |
| <i>Nemipterus japonicus</i> | 649,7 | 2,10 | 1,83 | 0,81 |
| <i>Nemipterus virgatus</i> | 1052,0 | 2,13 | 1,91 | 0,15 |
| <i>Nemipterus furcosus</i> | 328,0 | 2,08 | 1,98 | 0,05 |
| <i>Trichiurus lepturus</i> | 524,3 | 2,01 | 1,75 | 0,25 |
| <i>Anoplopoma fimbria</i> | 765,2 | 2,02 | 1,89 | 0,89 |
| <i>Evynnis cardinalis</i> | 78,5 | 1,89 | 1,65 | 0,75 |
| <i>Evynnis tumifrons</i> | 223,2 | 1,87 | 2,02 | 0,12 |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 1425,4 | 2,02 | 1,87 | 0,85 |
| <i>Chelidonichthys lucerna</i> | 2220,0 | 2,02 | 1,98 | 0,33 |
| <i>Dosidicus gigas</i> | 1602,7 | 2,02 | 2,00 | 0,83 |
| <i>Ommastrephes bartramii</i> | 2344,8 | 2,12 | 1,96 | 0,94 |
| <i>Doryteuthis pealeii</i> | 1424,0 | 2,11 | 2,08 | 0,37 |
| <i>Doryteuthis gahi</i> | 1985,6 | 1,95 | 1,87 | 0,50 |

Tab 8a: Valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto dai campioni di riferimento. CONC.MEDIA: concentrazione media di DNA valutata tramite lettura spettrofotometrica. A260/280; A260/230: rapporto di assorbanza acquisito tramite lettura spettrofotometrica

| PRODOTTO COMMERCIALE | CODICE | MISURAZIONE SPETTROFOTOMETRICA | | | RESA | PATTERN DNA TOT (pb) |
|-------------------------|----------|--------------------------------|----------|----------|------|----------------------|
| | | CONC. MEDIA ng/µl | A260/280 | A260/230 | | |
| SURIMI 1 Pesce: 37% | SUR1.1 | 272,0 | 2,01 | 1,43 | 0,05 | <500 |
| | SUR1.2 | 375,0 | 1,98 | 1,44 | 0,08 | <500 |
| | SUR1.3 | 337,0 | 2,02 | 1,45 | 0,08 | <500 |
| | SUR1.4 | 368,0 | 2,00 | 1,44 | 0,10 | <500 |
| | SUR1.5 | 497,0 | 1,98 | 1,41 | 0,13 | <500 |
| SURIMI 2 Pesce: 38% | SUR 2.1 | 195,0 | 1,86 | 0,93 | 0,04 | >500 |
| | SUR 2.2 | 478,0 | 1,83 | 1,05 | 0,10 | >500 |
| | SUR 2.3 | 163,0 | 1,96 | 0,90 | 0,03 | >500 |
| | SUR 2.4 | 710,0 | 2,01 | 1,20 | 0,14 | >1000 |
| | SUR 2.5 | 564,0 | 2,02 | 1,18 | 0,11 | >1000 |
| SURIMI3 Pesce: 38% | SUR 3.1 | 964,0 | 2,10 | 1,80 | 0,16 | >500 |
| | SUR 3.2 | 902,0 | 2,08 | 1,74 | 0,15 | >500 |
| | SUR 3.3 | 1010,0 | 2,07 | 1,70 | 0,17 | >500 |
| | SUR 3.4 | 1022,0 | 2,06 | 1,69 | 0,17 | >500 |
| | SUR 3.5 | 975,0 | 2,09 | 1,84 | 0,16 | >500 |
| SURIMI 4 Pesce: 25% | SUR 4.1 | 551,0 | 2,00 | 1,68 | 0,22 | ~500 |
| | SUR 4.2 | 507,0 | 1,98 | 1,43 | 0,20 | ~500 |
| | SUR 4.3 | 442,0 | 2,03 | 1,72 | 0,18 | ~500 |
| | SUR 4.4 | 405,0 | 2,05 | 1,70 | 0,16 | >500 |
| | SUR 4.5 | 421,0 | 2,01 | 1,60 | 0,17 | >500 |
| SURIMI 5 Pesce: 38% | SUR 5.1 | 1330,0 | 2,09 | 1,84 | 0,44 | >1000 |
| | SUR 5.2 | 706,0 | 2,12 | 1,75 | 0,24 | >1000 |
| | SUR 5.3 | 765,0 | 2,12 | 1,83 | 0,26 | >1000 |
| | SUR 5.4 | 784,0 | 2,10 | 1,74 | 0,26 | >1000 |
| | SUR 5.5 | 514,0 | 1,98 | 1,81 | 0,17 | >1000 |
| SURIMI 6 Pesce: - | SUR 6.1 | 422,0 | 1,88 | 1,15 | 0,10 | >500 |
| | SUR 6.2 | 355,0 | 1,83 | 1,00 | 0,10 | >500 |
| | SUR 6.3 | 341,0 | 1,84 | 1,01 | 0,09 | >500 |
| | SUR 6.4 | 389,0 | 1,85 | 1,09 | 0,10 | >500 |
| SURIMI 7 Pesce: 43% | SUR 7.1 | 267,0 | 1,89 | 1,18 | 0,08 | >500 |
| | SUR 7.2 | 518,0 | 1,91 | 1,24 | 0,16 | >500 |
| | SUR 7.3 | 359,0 | 1,91 | 1,20 | 0,11 | >500 |
| | SUR 7.4 | 298,0 | 1,87 | 1,05 | 0,09 | >500 |
| | SUR 7.5 | 454,0 | 1,92 | 1,30 | 0,14 | >500 |
| SURIMI 8 Pesce: 43% | SUR 8.1 | 1019,0 | 1,97 | 1,68 | 0,29 | >1000 |
| | SUR 8.2 | 780,0 | 2,02 | 1,70 | 0,26 | >1000 |
| | SUR 8.3 | 869,0 | 2,03 | 1,73 | 0,31 | >1000 |
| | SUR 8.4 | 533,0 | 1,98 | 1,62 | 0,19 | >1000 |
| | SUR 8.5 | 524,0 | 1,94 | 1,64 | 0,19 | >1000 |
| SURIMI 9 Pesce: 38% | SUR 9.1 | 401,0 | 1,88 | 1,26 | 0,14 | >500 |
| | SUR 9.2 | 403,0 | 1,74 | 0,96 | 0,13 | >500 |
| | SUR 9.3 | 453,0 | 1,79 | 1,13 | 0,15 | >500 |
| | SUR 9.4 | 333,0 | 1,73 | 0,97 | 0,11 | >500 |
| | SUR 9.5 | 399,0 | 1,65 | 0,82 | 0,13 | >500 |
| SURIMI 10 Pesce: 56% | SUR 10.1 | 1801,0 | 2,11 | 2,02 | 0,48 | >500 |
| | SUR 10.2 | 1469,0 | 2,11 | 1,97 | 0,38 | >500 |
| | SUR 10.3 | 1454,0 | 2,12 | 1,95 | 0,37 | >500 |
| SURIMI 11 Pesce: 38% | SUR 11.1 | 528,0 | 2,06 | 1,84 | 0,14 | >1000 |
| | SUR 11.2 | 558,0 | 2,04 | 1,67 | 0,15 | >1000 |
| | SUR 11.3 | 753,0 | 2,08 | 1,61 | 0,17 | >1000 |
| | SUR 11.4 | 560,0 | 2,05 | 1,68 | 0,11 | >1000 |
| | SUR 11.5 | 489,0 | 2,07 | 1,75 | 0,10 | >1000 |

| | | | | | | |
|-------------------------|----------|--------|------|------|------|-------|
| SURIMI 12 Pesce: 62% | SUR 12.1 | 1142,0 | 2,08 | 1,43 | 0,35 | >1000 |
| | SUR 12.2 | 653,0 | 2,03 | 1,26 | 0,18 | >1000 |
| | SUR 12.3 | 830,0 | 2,15 | 1,41 | 0,25 | >1000 |
| | SUR 12.4 | 526,0 | 2,00 | 1,43 | 0,16 | >1000 |
| | SUR 12.5 | 1034,0 | 1,93 | 0,97 | 0,26 | >1000 |
| SURIMI 13 Pesce: 40% | SUR 13.1 | 182,0 | 1,88 | 1,26 | 0,04 | <250 |
| | SUR 13.2 | 128,0 | 1,82 | 1,31 | 0,03 | <500 |
| | SUR 13.3 | 465,0 | 1,82 | 1,55 | 0,09 | >500 |
| | SUR 13.4 | 180,0 | 1,98 | 1,56 | 0,04 | <250 |
| | SUR 13.5 | 193,0 | 1,78 | 1,18 | 0,06 | >500 |
| SURIMI 14 Pesce: 44% | SUR 14.1 | 294,0 | 2,05 | 1,65 | 0,09 | >500 |
| | SUR 14.2 | 223,0 | 2,08 | 1,65 | 0,07 | >500 |
| | SUR 14.3 | 268,0 | 1,99 | 1,48 | 0,09 | >500 |
| | SUR 14.4 | 267,0 | 2,07 | 1,63 | 0,08 | >500 |
| | SUR 14.5 | 201,0 | 2,08 | 1,71 | 0,07 | >500 |
| SURIMI 15 Pesce: 54% | SUR 15.1 | 1070,0 | 2,08 | 1,70 | 0,27 | >500 |
| | SUR 15.2 | 882,0 | 2,10 | 1,86 | 0,22 | >500 |
| | SUR 15.3 | 1081,0 | 2,08 | 1,75 | 0,27 | >500 |
| | SUR 15.4 | 893,0 | 2,08 | 1,68 | 0,22 | >500 |
| | SUR 15.5 | 904,0 | 2,07 | 1,71 | 0,23 | >500 |
| SURIMI 16 Pesce: 35% | SUR 16.1 | 743,0 | 2,07 | 1,63 | 0,15 | >500 |
| | SUR 16.2 | 425,0 | 2,00 | 1,64 | 0,11 | >500 |
| | SUR 16.3 | 334,0 | 2,01 | 1,71 | 0,09 | >500 |
| | SUR 16.4 | 441,0 | 2,01 | 1,71 | 0,12 | >500 |
| | SUR 16.5 | 360,0 | 2,02 | 1,72 | 0,07 | >500 |
| SURIMI 17 Pesce: 42% | SUR 17.1 | 1145,0 | 2,03 | 1,71 | 0,23 | <500 |
| | SUR 17.2 | 890,0 | 1,98 | 1,54 | 0,15 | <500 |
| | SUR 17.3 | 384,0 | 1,95 | 1,47 | 0,11 | <500 |
| | SUR 17.4 | 367,0 | 1,96 | 1,48 | 0,09 | <500 |
| | SUR 17.5 | 418,0 | 1,96 | 1,48 | 0,12 | <500 |
| SURIMI 18 Pesce: 54% | SUR 18.1 | 896,0 | 2,09 | 1,71 | 0,07 | >500 |
| | SUR 18.3 | 938,0 | 2,11 | 1,75 | 0,23 | >500 |
| | SUR 18.4 | 807,0 | 2,11 | 1,75 | 0,17 | >500 |
| | SUR 18.7 | 1044,0 | 2,05 | 1,62 | 0,09 | >500 |
| | SUR 18.8 | 1100,0 | 2,07 | 1,65 | 0,07 | >500 |
| SURIMI 19 Pesce: 26% | SUR 19.1 | 184,0 | 1,73 | 1,78 | 0,11 | <250 |
| | SUR 19.2 | 171,0 | 1,80 | 1,93 | 0,17 | <500 |
| | SUR 19.3 | 146,0 | 1,73 | 1,76 | 0,19 | <500 |
| | SUR 19.4 | 187,0 | 1,82 | 1,97 | 0,16 | <500 |
| | SUR 19.5 | 123,0 | 1,81 | 1,95 | 0,21 | <500 |
| SURIMI 20 Pesce: 44% | SUR 20.1 | 131,0 | 1,92 | 1,87 | 0,26 | <500 |
| | SUR 20.2 | 288,0 | 1,85 | 1,93 | 0,04 | <500 |
| | SUR 20.3 | 239,0 | 1,96 | 1,80 | 0,04 | >500 |
| | SUR 20.4 | 272,0 | 1,93 | 1,80 | 0,04 | >500 |
| | SUR 20.5 | 168,0 | 1,92 | 1,98 | 0,05 | >500 |
| SURIMI 21 Pesce: 32% | SUR 21.1 | 126,0 | 1,89 | 1,79 | 0,03 | <500 |
| | SUR 21.2 | 274,0 | 1,86 | 1,91 | 0,03 | <500 |
| | SUR 21.3 | 221,0 | 1,89 | 1,96 | 0,06 | <250 |
| | SUR 21.4 | 221,0 | 1,94 | 1,94 | 0,05 | <500 |
| | SUR 21.5 | 177,0 | 1,92 | 1,91 | 0,06 | <500 |
| SURIMI 22 Pesce: 43% | SUR 22.1 | 579,0 | 1,93 | 1,94 | 0,04 | >500 |
| | SUR 22.2 | 498,0 | 1,95 | 1,90 | 0,03 | >500 |
| | SUR 22.3 | 731,0 | 2,02 | 1,84 | 0,07 | >500 |
| | SUR 22.4 | 432,0 | 1,97 | 1,91 | 0,06 | >500 |
| | SUR 22.5 | 408,0 | 1,92 | 1,95 | 0,06 | >500 |
| SURIMI 23 Pesce: 38% | SUR 23.1 | 955,0 | 2,02 | 1,95 | 0,05 | >500 |
| | SUR 23.2 | 1043,0 | 2,02 | 1,91 | 0,12 | >500 |
| | SUR 23.3 | 900,5 | 2,01 | 1,92 | 0,12 | >500 |
| | SUR 23.4 | 879,0 | 2,03 | 1,97 | 0,19 | >500 |

| | | | | | | |
|-------------------------|----------|--------|------|------|------|-------|
| | SUR 23.5 | 915,0 | 2,04 | 1,87 | 0,11 | >500 |
| SURIMI 24 Pesce: 78% | SUR 24.1 | 792,0 | 2,02 | 1,38 | 0,11 | >500 |
| | SUR 24.2 | 541,0 | 1,94 | 1,34 | 0,19 | >500 |
| | SUR 24.3 | 975,0 | 2,04 | 1,23 | 0,20 | >500 |
| | SUR 24.4 | 741,0 | 2,00 | 1,32 | 0,21 | >500 |
| | SUR 24.5 | 787,0 | 2,03 | 1,33 | 0,18 | >500 |
| SURIMI 25 Pesce: 38% | SUR 25.1 | 731,0 | 2,07 | 1,90 | 0,18 | >1000 |
| | SUR 25.2 | 1068,0 | 2,09 | 1,71 | 0,25 | >1000 |
| | SUR 25.3 | 1057,0 | 2,10 | 1,77 | 0,21 | >1000 |
| | SUR 25.4 | 954,0 | 2,10 | 1,77 | 0,19 | >1000 |
| | SUR 25.5 | 1400,0 | 2,07 | 1,71 | 0,28 | >1000 |
| SURIMI 26 Pesce: 45% | SUR 26.1 | 189,0 | 1,92 | 1,06 | 0,06 | <250 |
| | SUR 26.2 | 146,0 | 1,90 | 0,95 | 0,05 | <250 |
| | SUR 26.3 | 212,0 | 1,89 | 1,16 | 0,07 | <250 |
| | SUR 26.4 | 365,0 | 1,89 | 1,29 | 0,13 | <250 |
| | SUR 26.5 | 125,0 | 1,87 | 0,78 | 0,05 | <250 |
| SURIMI 27 Pesce: 38% | SUR 27.1 | 1509,0 | 1,95 | 1,46 | 0,60 | <500 |
| | SUR 27.2 | 530,0 | 1,95 | 1,54 | 0,21 | <500 |
| | SUR 27.3 | 420,0 | 1,94 | 1,49 | 0,15 | <500 |
| | SUR 27.4 | 774,0 | 2,00 | 1,48 | 0,29 | <500 |
| | SUR 27.5 | 806,0 | 2,02 | 1,56 | 0,30 | <500 |
| SURIMI 28 Pesce: 38% | SUR 28.1 | 721,0 | 2,10 | 1,86 | 0,12 | <500 |
| | SUR 28.2 | 375,0 | 2,03 | 1,75 | 0,05 | >500 |
| | SUR 28.3 | 449,0 | 2,01 | 1,66 | 0,06 | >500 |
| | SUR 28.4 | 459,0 | 2,05 | 1,92 | 0,08 | >500 |
| | SUR 28.5 | 368,0 | 2,02 | 1,81 | 0,07 | >500 |
| SURIMI 29 Pesce: ND | SUR 29.1 | 437,0 | 1,98 | 1,53 | 0,12 | <500 |
| | SUR 29.2 | 455,0 | 1,96 | 1,45 | 0,12 | <500 |
| | SUR 29.3 | 437,0 | 1,97 | 1,48 | 0,12 | <500 |
| | SUR 29.4 | 318,0 | 1,99 | 1,65 | 0,08 | <500 |
| | SUR 29.5 | 140,0 | 2,07 | 1,73 | 0,04 | <500 |
| SURIMI 30 Pesce: ND | SUR 30.1 | 542,0 | 2,04 | 1,31 | 0,14 | <500 |
| | SUR 30.2 | 711,0 | 1,88 | 1,23 | 0,19 | <500 |
| | SUR 30.3 | 447,0 | 2,00 | 1,70 | 0,12 | <500 |
| | SUR 30.4 | 431,0 | 1,94 | 1,51 | 0,11 | <500 |
| | SUR 30.5 | 509,0 | 2,00 | 1,38 | 0,14 | <500 |
| SURIMI 31 Pesce: 46% | SUR 31.1 | 999,0 | 2,06 | 1,60 | 0,20 | >1000 |
| | SUR 31.2 | 1112,0 | 2,09 | 1,63 | 0,26 | >1000 |
| | SUR 31.3 | 1183,0 | 2,06 | 1,52 | 0,32 | >1000 |
| | SUR 31.4 | 561,0 | 2,01 | 1,67 | 0,11 | >1000 |
| | SUR 31.5 | 1145,0 | 2,08 | 1,62 | 0,23 | >1000 |
| SURIMI 32 Pesce: 53% | SUR 32.1 | 1967,0 | 2,09 | 1,94 | 0,40 | >1000 |
| | SUR 32.2 | 764,4 | 2,12 | 1,84 | 0,18 | >1000 |
| | SUR 32.3 | 1252,0 | 2,11 | 1,93 | 0,29 | >1000 |
| | SUR 32.4 | 1262,0 | 2,12 | 1,97 | 0,30 | >1000 |
| | SUR 32.5 | 1256,0 | 2,10 | 1,88 | 0,29 | >1000 |
| SURIMI 33 Pesce: 30% | SUR 33.1 | 793,0 | 2,12 | 1,53 | 0,16 | >1000 |
| | SUR 33.2 | 813,0 | 2,12 | 1,53 | 0,16 | >1000 |
| | SUR 33.3 | 896,0 | 2,13 | 1,55 | 0,24 | >1000 |
| | SUR 33.4 | 853,0 | 2,10 | 1,45 | 0,22 | >1000 |
| | SUR 33.5 | 410,0 | 2,02 | 1,42 | 0,08 | >1000 |
| SURIMI 34 Pesce: ND | SUR 34.1 | 1081,0 | 2,13 | 1,92 | 0,21 | >1000 |
| | SUR 34.2 | 1110,0 | 2,13 | 1,92 | 0,22 | >1000 |
| | SUR 34.3 | 722,0 | 2,15 | 1,88 | 0,15 | >1000 |
| | SUR 34.4 | 1654,0 | 2,12 | 2,00 | 0,33 | >1000 |
| | SUR 34.5 | 1042,6 | 2,15 | 1,95 | 0,21 | >1000 |
| SURIMI 35 Pesce: ND | SUR 35.1 | 886,0 | 1,99 | 1,26 | 0,24 | <500 |
| | SUR 35.2 | 887,0 | 2,10 | 1,74 | 0,22 | <500 |
| | SUR 35.3 | 1447,0 | 2,08 | 1,62 | 0,08 | <500 |

| | | | | | | |
|-------------------------|----------|----------|-------|------|------|-------|
| | SUR 35.4 | 893,0 | 2,10 | 1,74 | 0,21 | <500 |
| | SUR 35.5 | 406,0 | 2,01 | 1,46 | 0,22 | <500 |
| SURIMI 36 Pesce: ND | SUR 36.1 | 340,0 | 1,94 | 1,12 | 0,15 | <500 |
| | SUR 36.2 | 233,0 | 1,97 | 1,19 | 0,33 | <500 |
| | SUR 36.3 | 295,0 | 1,96 | 1,22 | 0,21 | <500 |
| | SUR 36.4 | 171,0 | 2,00 | 1,17 | 0,24 | <500 |
| | SUR 36.5 | 351,0 | 1,95 | 1,19 | 0,18 | <500 |
| | | SUR 37.1 | 274,0 | 1,88 | 1,03 | 0,34 |
| SURIMI 37 Pesce: ND | SUR 37.2 | 364,0 | 1,88 | 1,03 | 0,18 | <500 |
| | SUR 37.3 | 195,0 | 1,87 | 1,06 | 0,08 | <500 |
| | SUR 37.4 | 330,0 | 1,83 | 1,05 | 0,07 | <500 |
| | SUR 37.5 | 370,0 | 1,84 | 1,97 | 0,05 | <500 |
| | | SUR 38.1 | 923,0 | 2,02 | 1,49 | 0,08 |
| SURIMI 38 Pesce: ND | SUR 38.2 | 869,0 | 2,00 | 1,56 | 0,05 | <500 |
| | SUR 38.3 | 949,0 | 2,04 | 1,57 | 0,09 | <500 |
| | SUR 38.4 | 1059,0 | 2,03 | 1,55 | 0,06 | <500 |
| | SUR 38.5 | 679,0 | 2,02 | 1,53 | 0,07 | <500 |
| | | SUR 39.1 | 731,0 | 2,10 | 1,76 | 0,04 |
| SURIMI 39 Pesce: ND | SUR 39.2 | 549,0 | 2,04 | 1,54 | 0,07 | < 250 |
| | SUR 39.3 | 545,0 | 2,03 | 1,56 | 0,09 | < 250 |
| | SUR 39.4 | 740,0 | 2,03 | 1,45 | 0,18 | < 250 |
| | SUR 39.5 | 525,0 | 2,03 | 1,61 | 0,20 | < 250 |
| | | SUR 40.1 | 322,0 | 1,90 | 1,29 | 0,22 |
| SURIMI 40 Pesce: 38% | SUR 40.2 | 322,0 | 1,93 | 1,31 | 0,28 | >1000 |
| | SUR 40.3 | 374,0 | 1,96 | 1,48 | 0,18 | >1000 |
| | SUR 40.4 | 330,0 | 1,95 | 1,38 | 0,19 | >1000 |
| | SUR 40.5 | 340,0 | 1,93 | 1,33 | 0,11 | >1000 |

Tab 8b: Valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto dai campioni commerciali inclusi nello studio.

CONC.MEDIA: concentrazione media di DNA valutata tramite lettura spettrofotometrica.

A260/280; A260/230: rapporto di assorbanza acquisito tramite lettura spettrofotometrica

ND: non dichiarata

| Matricce | Pattern DNA totale | Fonte |
|--|---------------------------|--------------------------------|
| Tonno in scatola | 100-200 pb | Quinteiro <i>et al.</i> , 1998 |
| Tonno congelato | 100-20.000pb | |
| Filetti freschi | 1-2 kb | Teletchea <i>et al.</i> , 2005 |
| Prodotti a base di medusa (in salamoia) | 50-250 pb | Armani <i>et al.</i> , 2014 |
| Prodotti a base di medusa (ready to eat) | 1 kpb | |
| Prodotti a base di merluzzo (congelati) | <500 pb | Xiong <i>et al.</i> , 2016 |
| Prodotti ittici etnici processati | <200 pb | Armani <i>et al.</i> , 2015 |
| Prodotti ittici etnici congelati | >500 pb | |
| Campioni ittici conservati in etanolo | 100-1 kpb | Armani <i>et al.</i> , 2015 |
| Campioni ittici cotti | <300 pb | |
| Cefalopodi processati | 200 pb | Chapela <i>et al.</i> , 2002 |
| Olio di oliva | 250 pb | Pafundo <i>et al.</i> , 2005 |
| Ketchup, purea, salsa di pomodoro | 400 pb | Hemmer <i>et al.</i> , 2002 |
| Farina di mais Bt-176 (bollita per 5 min, a pH 2-3) | <1900 pb | Hupfer <i>et al.</i> , 1998 |
| Farina di mais Bt-176 (bollita per 60 minuti, a pH8,5-9,5) | >1900 pb | |
| Latte di soia (dopo trattamento a caldo) | <1000 pb | Bauer <i>et al.</i> , 2003 |
| Carne suina (dopo trattamento per 10 min a 121°C) | 300 pb | Ebbehøj and Thomsen, 1991 |

Tab. 9: Livello di degradazione del DNA riportati in bibliografia per diverse matrici alimentari.

| PRIMERS | TASSO DI AMPLIFICAZIONE | |
|---------|-----------------------------|----------------------------------|
| | SPECIE PESCI DI RIFERIMENTO | SPECIE CEFALOPODI DI RIFERIMENTO |
| P1 | 100% (41/41) | 100% (4/4) |
| P2 | 100% (41/41) | 100% (4/4) |
| H | 100% (41/41) | 0% (0/4) |
| SH | 92% (38/41) | 25% (1/4) |
| M | 75% (31/41) | 100% (4/4) |

Tab 10: *Tasso di amplificazione (numero di bande ottenute/numero di campioni di DNA amplificati) calcolato per tutte le specie di pesci e cefalopodi di riferimento inclusi nello studio utilizzando primers diversi.*

| SPECIE | | CONCENTRAZIONE PRODOTTI DI PCR (ng/μl) | | | | |
|--------|-------------------------|--|----|----|----|----|
| | | P1 | P2 | H | M | SH |
| 1 | <i>T. chalcogramma</i> | 25 | 20 | 20 | 10 | 25 |
| 2 | <i>G. morhua</i> | 25 | 20 | 15 | 0 | 25 |
| 3 | <i>M. aeglefinus</i> | 25 | 20 | 20 | 15 | 25 |
| 4 | <i>M.poutassou</i> | 20 | 20 | 20 | 20 | 25 |
| 5 | <i>M.hubbsi</i> | 20 | 20 | 20 | 20 | 15 |
| 6 | <i>M.productus</i> | 25 | 15 | 25 | 20 | 25 |
| 7 | <i>M. gayi</i> | 25 | 15 | 20 | 20 | 25 |
| 8 | <i>A. stomias</i> | 15 | 15 | 20 | 0 | 7 |
| 9 | <i>A. evermanni</i> | 15 | 15 | 10 | 0 | 7 |
| 10 | <i>P. monopterygius</i> | 15 | 15 | 15 | 10 | 20 |
| 11 | <i>T. japonicus</i> | 25 | 15 | 15 | 7 | 20 |
| 12 | <i>T. picturatus</i> | 25 | 15 | 10 | 15 | 15 |
| 13 | <i>S. sphyraena</i> | 15 | 15 | 10 | 5 | 0 |
| 14 | <i>L.crocea</i> | 20 | 20 | 15 | 15 | 20 |
| 15 | <i>L. polyactis</i> | 20 | 20 | 15 | 5 | 10 |
| 16 | <i>N. japonicus</i> | 15 | 15 | 15 | 5 | 10 |
| 17 | <i>N. furcosus</i> | 25 | 15 | 25 | 20 | 25 |
| 18 | <i>N.virgatus</i> | 25 | 15 | 25 | 20 | 25 |
| 19 | <i>O. aureus</i> | 25 | 25 | 25 | 20 | 20 |
| 20 | <i>O. mossambicus</i> | 25 | 25 | 20 | 10 | 20 |
| 21 | <i>O. niloticus</i> | 25 | 25 | 25 | 20 | 20 |
| 22 | <i>T.lepturus</i> | 20 | 15 | 15 | 0 | 15 |
| 23 | <i>U.tragula</i> | 20 | 15 | 25 | 15 | 20 |
| 24 | <i>P. prayensis</i> | 20 | 15 | 15 | 5 | 15 |
| 25 | <i>C. lucerna</i> | 20 | 15 | 25 | 20 | 20 |
| 26 | <i>P. macracanthus</i> | 10 | 15 | 15 | 5 | 15 |
| 27 | <i>E.cardinalis</i> | 10 | 10 | 15 | 15 | 15 |
| 28 | <i>E. tumifrons</i> | 10 | 10 | 20 | 5 | 15 |
| 29 | <i>C. harengus</i> | 10 | 20 | 30 | 0 | 20 |
| 30 | <i>C. pallasii</i> | 10 | 20 | 30 | 0 | 20 |
| 31 | <i>S. aurita</i> | 20 | 20 | 25 | 0 | 20 |
| 32 | <i>S. pilchardus</i> | 20 | 20 | 30 | 0 | 0 |
| 33 | <i>O. gorbuscha</i> | 25 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| 34 | <i>O. keta</i> | 25 | 15 | 15 | 0 | 20 |
| 35 | <i>O. mykiss</i> | 25 | 20 | 25 | 7 | 20 |
| 36 | <i>A. fimbria</i> | 15 | 20 | 20 | 15 | 25 |
| 37 | <i>D. eleginoides</i> | 20 | 10 | 15 | 10 | 15 |
| 38 | <i>C. carpio</i> | 25 | 20 | 25 | 10 | 25 |
| 39 | <i>C. idella</i> | 25 | 20 | 25 | 10 | 10 |
| 40 | <i>H.molitrix</i> | 25 | 10 | 30 | 15 | 10 |
| 41 | <i>H. nobilis</i> | 25 | 10 | 30 | 10 | 10 |
| 42 | <i>D. gigas</i> | 20 | 5 | 0 | 25 | 5 |
| 43 | <i>D.paelei</i> | 15 | 5 | 0 | 25 | 0 |
| 44 | <i>D. gahi</i> | 25 | 5 | 0 | 25 | 0 |
| 45 | <i>O. bartramii</i> | 20 | 5 | 0 | 25 | 0 |

Tab 11: Concentrazione prodotti di PCR ottenuta dopo amplificazione del DNA delle specie di riferimento, stima effettuata per comparazione con marker molecolare SHARPMASS 50® (Euroclone SPA, Figino al Pero, Milano.)

In rosso evidenziati i prodotti di PCR le cui concentrazioni sono risultate inferiori al limite richiesto per il sequenziamento.

| PATTERN DNA TOT (pb) | PRODOTTO DI PCR | | PERCENTUALE DI CAMPIONI |
|-------------------------|-------------------|--------|----------------------------|
| | LUNGHEZZA (pb) | PRIMER | |
| x>1000 | 650 | P1 | 90,4% |
| | 350 | P2 | 7,7% |
| 500<x>1000 | 650 | P1 | 87,8% |
| | 350 | P2 | 12,1% |
| 250<x>500 | 650 | P1 | 1,8% |
| | 350 | P2 | 98,2% |
| x<250 | 650 | P1 | 0% |
| | 350 | P2 | 100% |

Tab 12: Prodotti commerciali: confronto tra pattern di frammentazione e successo di amplificazione, utilizzando le due coppie di primers relativi al target 16S rRNA (Palumbi, 1996 e Armani et al., 2012).

| | Pattern DNA totale (pb) | Invio al sequenziamento | | Analisi sequenze | | Media lungh.seq/lungh. max attesa (%) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------|------------------|---------------------------------------|
| | | Frammento | N° sequenze | Utilizzabili | Non utilizzabili | |
| Target 16S rRNA | X>1000 | P1 | 21 | 21 | 0 | 84,5 |
| | | P2 | 3 | 3 | 0 | 76,4 |
| | 500<x>1000 | P1 | 24 | 24 | 0 | 83,2 |
| | | P2 | 4 | 0 | 4 | |
| | 250<x>500 | P1 | 0 | 0 | 0 | |
| | | P2 | 30 | 17 | 13 | 87,1 |
| | X<250 | P1 | 0 | 0 | 0 | |
| | | P2 | 8 | 1 | 7 | 86,3 |
| | Totale | | 90 | 66 | 24 | |
| | Successo analisi (%) | | 73,33 | | | |
| | | | | | | |
| Target COI | X > 1000 | H | 10 | 8 | 2 | 79,1 |
| | | M | 3 | 3 | 0 | 79,4 |
| | 500<x>1000 | H | 10 | 6 | 4 | 68,5 |
| | | M | 1 | 1 | 0 | 88,4 |
| | | SH | 4 | 4 | 0 | 100 |
| | Totale | | 28 | 22 | 6 | |
| | Successo analisi (%) | | 78,5 | | | |

Tab.13a: Risultati dell'analisi di sequenziamento effettuata presso primo laboratorio.

| | Pattern DNA totale (pb) | Invio al sequenziamento | | Analisi sequenze | | Media lungh. Seq/lungh. Max attesa (%) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------|------------------|--|
| | | Frammento | N° sequenze | Utilizzabili | Non utilizzabili | |
| Target <i>16S rRNA</i> | x>1000 | P1 | 2 | 2 | 0 | 37,5 |
| | x>500 | P1 | 4 | 4 | 0 | 39,4 |
| | Totale | | 6 | 6 | 0 | |
| | Successo analisi | | | 100 | | |

Tab. 13b: Risultati dell'analisi di sequenziamento effettuata presso secondo laboratorio.

| CODICE | SPECIE DICHIARATA/E | RISULTATI SEQUENZIAMENTO | TARGET |
|----------|--|--|------------------------------------|
| SUR 1.1 | <i>Nemipterus sp.</i> , <i>Priacanthus sp</i> | <i>Priacanthus arenatus</i> , <i>Priacanthus sagittarius</i> , <i>Priacanthus blochii</i> 95% | 16S rRNA |
| SUR 1.2 | | | |
| SUR 1.3 | | | |
| SUR 2.3 | ND | <i>Merluccius productus</i> 99-100%; <i>Merluccius gayi</i> , <i>Merluccius australis</i> , <i>Merluccius angustimanus</i> 99% | 16S rRNA |
| | | <i>Merluccius productus</i> 99-100%; <i>Merluccius angustimanus</i> , <i>Merluccius gayi</i> 99% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius angustimanus</i> 99,44-100%; <i>Merluccius productus</i> 99,81-100%; <i>Merluccius gayi</i> 98,49-98,87% | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| | | <i>Merluccius productus</i> 99-100%; <i>Merluccius gayi</i> 99% | COI (coppia M, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius angustimanus</i> 99,30-100%, <i>Merluccius productus</i> 99,81-100%; <i>Merluccius gayi</i> 98,9% | COI (coppia M, analisi ID su BOLD) |
| SUR 3.1 | ND | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100%; <i>Gadus finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> , <i>Gadus macrocephalus</i> , <i>Micromesistius poutassou</i> 99% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99,8-100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 5.1 | ND | <i>Theragra chalcogramma</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> , <i>Merlangius merlangus</i> , <i>Micromesistius poutassou</i> , <i>Boreogadus saida</i> 99% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99,8-100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 5.3 | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> 99%, <i>Merlangius merlangus</i> , <i>Micromesistius poutassou</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 6.2 | ND | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100%; <i>Gadus morhua</i> , <i>Merlangius merlangus</i> , <i>Micromesistius poutassou</i> , <i>Microgadus proximus</i> , <i>Boreogadus saida</i> 99%; <i>Gadus macrocephalus</i> 98-99%; <i>Gadus ogac</i> 98% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> 99% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 7.3 | ND | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Gadus morhua</i> , <i>Merlangius merlangus</i> , <i>Micromesistius poutassou</i> 99% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99,8-100% (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 8.1 | ND | <i>Oncorhynchus gorboscha</i> 99-100%; <i>Oncorhynchus keta</i> , <i>Oncorhynchus clarkii</i> 99%; <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Oncorhynchus masou</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 8.2 | | | |
| SUR 8.3 | | | |
| SUR 10.1 | <i>Theragra chalcogramma</i> | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100%, (<i>Theragra finmarchica</i> 2 sequenze 100%); <i>Gadus morhua</i> , <i>Merlangius merlangus</i> , | 16S rRNA |
| SUR 10.2 | | | |
| SUR 10.3 | | | |

| | | | |
|----------|-----------------------------|--|--|
| | | <i>Micromesistius poutassou</i> , <i>Microgadus proximus</i> , <i>Boreogadus saida</i> 99%; <i>Gadus macrocephalus</i> 98-99%; <i>Gadus ogac</i> 98% | |
| SUR 11.1 | ND | <i>Merluccius productus</i> , <i>Merluccius gayi</i> 99%; <i>Merluccius merluccius</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 11.2 | | <i>Merluccius productus</i> 99-100%; <i>Merluccius angustimanus</i> , <i>Merluccius gayi</i> , <i>Merluccius australis</i> 99%; <i>Merluccius bilinearis</i> , <i>Merluccius hubbsi</i> , <i>Merluccius merluccius</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 11.4 | | <i>Merluccius productus</i> , <i>Merluccius gayi</i> , <i>Merluccius australis</i> 99% | 16S rRNA |
| | | <i>Merluccius productus</i> 100%; <i>Merluccius angustimanus</i> , <i>Merluccius gayi</i> 99% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius angustimanus</i> 99,39-100% ; <i>Merluccius productus</i> 99,69-100%; <i>Merluccius gayi</i> 99,06% | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 12.1 | ND | <i>Oncorhynchus gorbusha</i> 99-100%, <i>Oncorhynchus keta</i> 99%; <i>Oncorhynchus masou</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 12.2 | | | |
| SUR 12.3 | | | |
| SUR 14.1 | Nemipterus sp. | <i>Chelidonichthys lucernus</i> , <i>Chelidonichthys gurnardus</i> 99% | 16S rRNA |
| | | <i>Merluccius productus</i> 99-100% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius productus</i> 99-100% | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 14.4 | | <i>Chelidonichthys lucernus</i> , <i>Chelidonichthys gurnardus</i> , <i>Chelidonichthys capensis</i> , <i>Chelidonichthys cuculus</i> 99% | 16S rRNA |
| SUR 14.5 | | <i>Chelidonichthys lucerna</i> , <i>Chelidonichthys gurnardus</i> , <i>Chelidonichthys capensis</i> , <i>Chelidonichthys cuculus</i> 99% | 16S rRNA |
| SUR 15.1 | Nemipterus sp. | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra finmarchica</i> 99%; <i>Gadus morhua</i> 98% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99-100% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99,8-100%; <i>Arctogadus glacialis</i> 99,8% | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 15.3 | | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra finmarchica</i> 99%; <i>Gadus morhua</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 15.5 | | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra finmarchica</i> 99%; <i>Gadus morhua</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 16.3 | Nemipterus sp. | <i>Priacanthus blochii</i> , <i>Priacanthus sagittarius</i> 96%; <i>Priacanthus prolixus</i> 95% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100% | 16S rRNA (sequenziamento presso secondo laboratorio) |
| | | <i>Priacanthus blochii</i> , <i>Priacanthus sagittarius</i> 96%; <i>Priacanthus prolixus</i> 95% | 16S rRNA |
| SUR 16.4 | | | |
| SUR 16.5 | | | |
| SUR 18.4 | Nemipterus sp. | <i>Priacanthus sagittarius</i> 97%; <i>Priacanthus blochii</i> , <i>Priacanthus arenatus</i> , <i>Priacanthus prolixus</i> 96% | 16S rRNA |
| SUR 19.3 | <i>Nemipterus japonicus</i> | <i>Nemipterus bathybius</i> 98%; <i>Nemipterus virgatus</i> 95%; <i>Nemipterus japonicus</i> 92% | 16S rRNA |
| SUR 20.2 | Nemipterus sp. | <i>Nemipterus bathybius</i> 99%; <i>Nemipterus virgatus</i> , <i>Nemipterus japonicus</i> 95%; <i>Nemipterus hexodon</i> 94% | 16S rRNA |
| SUR 20.3 | | <i>Nemipterus bathybius</i> 99%; <i>Nemipterus virgatus</i> , <i>Nemipterus hexodon</i> 97%; <i>Nemipterus japonicus</i> 95% | 16S rRNA |
| SUR 21.1 | <i>Nemipterus japonicus</i> | <i>Priacanthus sagittarius</i> 95%; <i>Priacanthus</i> | 16S rRNA |

| | | | |
|----------|---|---|------------------------------------|
| | | <i>hamrur, Priacanthus prolixus</i> 94% | |
| SUR 21.2 | | <i>Nemipterus bathybius</i> 98%; <i>Nemipterus virgatus</i> 95%, <i>Nemipterus japonicus</i> 92-95% | 16S rRNA |
| SUR 21.3 | | <i>Nemipterus bathybius</i> 98%; <i>Nemipterus virgatus</i> 95%, <i>Nemipterus japonicus</i> 92-95% | 16S rRNA |
| SUR 22.4 | <i>Nemipterus</i> sp. <i>Priacanthus</i> sp. | <i>Priacanthus arenatus</i> 99%; <i>Priacanthus prolixus</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 23.1 | Merluzzo di Alaska, <i>Nemipterus</i> sp., Catalufa, Merluzzo carbonaro, Merluzzo nordico, <i>Pennatia</i> sp., pesce lucertola. | <i>Theragra chalcogramma, Theragra finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> 99% | 16S rRNA |
| SUR 23.2 | | | |
| SUR 23.3 | | | |
| SUR 24.5 | <i>Pollack d'Alaska</i> | <i>Theragra chalcogramma, Theragra finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> 99% | 16S rRNA |
| SUR 25.1 | ND | <i>Merluccius productus</i> 100%; <i>Merluccius gayi, Merluccius bilinearis</i> 99%; <i>Merluccius angustimanus</i> 98-99%; <i>Merluccius merluccius, Merluccius hubbsi</i> 98% | 16S rRNA |
| | | <i>Merluccius productus</i> 100%, <i>Merluccius gayi, Merluccius angustimanus</i> 99% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius productus</i> 99,81-100%, <i>Merluccius gayi</i> 98,7-99,02%, <i>Merluccius angustimanus</i> 99,35-100% | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| | | <i>Merluccius productus</i> 100%; <i>Merluccius gayi, Merluccius bilinearis</i> 99%; <i>Merluccius angustimanus</i> 98-99%; <i>Merluccius merluccius, Merluccius capensis, Merluccius hubbsi</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 25.2 | | | |
| SUR 25.3 | | | |
| SUR 27.2 | ND | <i>Theragra chalcogramma, Theragra finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> 99%; <i>Gadus macrocephalus, Gadus ogac, Pollachius virens</i> 98% | 16S rRNA |
| SUR 27.3 | | | |
| SUR 27.4 | | | |
| SUR 28.1 | ND | <i>Theragra chalcogramma, Theragra finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua, Arctogadus glacialis, Micromesistius poutassou, Merlangius merlangus</i> 99% | 16S rRNA |
| SUR 31.1 | <i>Nemipterus</i> sp. | <i>Nemipterus marginatus</i> 98-99%; <i>Nemipterus bathybius</i> 96%; <i>Nemipterus japonicus</i> 98% | 16S rRNA |
| | | <i>Nemipterus marginatus</i> 98% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Nemipterus marginatus</i> 97,52%; <i>Nemipterus japonicus</i> 90-92% | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 31.3 | | <i>Nemipterus japonicus, Nemipterus marginatus</i> 95%; <i>Nemipterus bathybius</i> 94% | 16S rRNA |
| SUR 32.1 | <i>Theragra Chalcogramma</i> | <i>Theragra chalcogramma, Theragra finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua, Microgadus proximus</i> 99%; <i>Gadus macrocephalus, Gadus ogac, Merlangius merlangus</i> 98-99%; <i>Brosme brosme, Molva molva</i> 98% | 16S rRNA |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100% | COI (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | COI (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| SUR 32.2 | | <i>Theragra chalcogramma, Theragra</i> | 16S rRNA |

| | | | |
|----------|---|---|---|
| SUR 32.3 | | <i>finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> 99%; <i>Gadus macrocephalus</i> , <i>Gadus ogac</i> , <i>Merlangius merlangus</i> , <i>Micromesistius</i> <i>poutassou</i> 98-99% | |
| SUR 33.1 | <i>Theragra Chalcogramma</i> | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra</i> <i>finmarchica</i> 100%; <i>Gadus morhua</i> , <i>Microgadus proximus</i> 99%; <i>Gadus</i> <i>macrocephalus</i> 98% | <i>16S rRNA</i> |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100% | <i>COI</i> (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | <i>COI</i> (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| | | <i>Merluccius productus</i> 99-100%; <i>Merluccius gayi</i> 99% | <i>COI</i> (coppia M, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius angustimanus</i> 99,54-100%, <i>Merluccius productus</i> 99,77-100%, <i>Merluccius gayi</i> 99,31% | <i>COI</i> (coppia M, analisi ID su BOLD) |
| SUR 34.2 | <i>Nemipterus</i> sp., <i>Portunus</i> sp., <i>Carcinus maenus</i> | <i>Theragra chalcogramma</i> 100% | <i>16S rRNA</i> |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra</i> <i>finmarchica</i> 100% | <i>COI</i> (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99,82- 100% | <i>COI</i> (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra</i> <i>finmarchica</i> 100% | <i>COI</i> (coppia M, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | <i>COI</i> (coppia M, analisi ID su BOLD) |
| | | | |
| SUR 35.1 | | | |
| SUR 35.2 | | | |
| SUR 35.3 | | <i>Nemipterus bathybius</i> 91% | <i>16S rRNA</i> |
| SUR 36.3 | <i>Nemipterus nemurus</i> , <i>Nemipterus japonicus</i> | <i>Nemipterus bathybius</i> 99% | <i>16S rRNA</i> |
| SUR 37.3 | <i>Nemipterus japonicus</i> | | |
| SUR 37.4 | | | |
| SUR 37.5 | | | <i>16S rRNA</i> |
| SUR 40.3 | ND | <i>Merluccius productus</i> 100% | <i>16S rRNA</i> |
| | | <i>Merluccius productus</i> , <i>Merluccius gayi</i> 99% | <i>COI</i> (coppia H, analisi BLAST) |
| | | <i>Merluccius productus</i> 100%, <i>Merluccius</i> <i>angustimanus</i> , <i>Merluccius gayi</i> 98,99% | <i>COI</i> (coppia H, analisi ID su BOLD) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> , <i>Theragra</i> <i>finmarchica</i> 100% | <i>COI</i> (coppia M, analisi BLAST) |
| | | <i>Theragra chalcogramma</i> 99,82-100%; (<i>Arctogadus glacialis</i> 1 sequenza 100%) | <i>COI</i> (coppia M, analisi ID su BOLD) |
| SUR 40.4 | | | |
| SUR 40.5 | | <i>Merluccius productus</i> 100% | <i>16S rRNA</i> |

Tab. 14: Confronto tra le informazione riportate sulle etichette dei prodotti commerciali e le analisi molecolari effettuate.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnik, M.H., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F. (1991) - *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and the human genome project*. Science, 252: 1651-1656;
- Ade P., Funari E., Poletti R. (2003). *Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine*, Ann. Ist. Super. Sanità; 39(1):53-68;
- Alini D. A., Bassoni M. S., Biancardi M., Magnani V., Martinotti R. G. (2006). *The scombroid syndrome (Histamine Fish Poisoning): a review*. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria: Numero 38;
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G. (1981). *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature. 290(5806):457-465;
- André, F., André, C., Colin, L., Cacaraci, F., Cavagna, S. (1994). *Role of new allergens and of allergens consumption in the increased incidence of food sensitisations in France*. Toxicology, 93:77-83;
- Andrews, A. (1986). *Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications*, Oxford University Press;
- Arcangeli, G., Baldrati, G., Pirazzoli, P. (2002). *La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione*. Ed.SSICA;
- Arcangeli, G., Bicchieri, M. (2002). *Il pesce*, 14, 49-59;
- Arcangeli, G., Corrain, C., Boscolo, S., Fasolato, L., Manfrin, A., Monne, I., Paparella, A., Giorgini, S. (2007). *Prodotti ittici trasformati. Così si identificano le specie*. Alimenti & bevande; 11/12: 50-58;
- Armani A, Tinacci L, Xiong X, Titarenko E, Castigliero L and Guidi A. (2013). *Development of a simple and cost-effective bead-milling method for DNA extraction from fish muscles*. Food Anal. Methods, pagine 946-955;
- Armani A., Castigliero L., Tinacci L., Gandini G., Gianfaldoni D., Guidi A. (2012). *A rapid PCR-RFLP method for the identification of Lophius species*. European food research and Technology 235(2): 253-263.
- Armani A., Tinacci L., Xiong X., Castigliero L., Gianfaldoni D., Guidi A. (2014).

- Fish species identification in canned pet food by BLAST and Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) analysis of short fragments of the mitochondrial 16s ribosomal RNA gene (16S rRNA).* Food control, volume 50, pagine 821-830;
- Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D. and Guidi, A. (2010). *Molecular characterization of icefish, (Salangidae family), using direct sequencing of mitochondrial cytochrome b gene.* Food Control, volume 22, pagine 888-895;
 - Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2015). “*Two alternative multiplex PCRs for the identification of the seven species of anglerfish (Lophius spp.) using an end-point or a melting curve analysis real-time protocol.*” Food Chemistry 166, 1–9;
 - Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012) “*Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of Sardina pilchardus), Rossetto (Aphia minuta), and Icefish in fresh, marinated and cooked products*”, Food Chemistry, 133, 184-192;
 - Armani, A., Giusti, A., Castigliero, L., Rossi, A., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2014). *Pentaplex PCR As Screening Assay for Jellyfish Species Identification in Food Products.* Journal of agricultural and food chemistry, 62(50), 12134-12143;
 - Armani, A., Giusti, A., Guardone, L., Castigliero, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2015). “*Universal primers used for species identification of foodstuff of animal origin: effects of oligonucleotide tails on PCR amplification and sequencing performance*”, Food Anal. Methods, 1-11;
 - Armani, A., Guardone, L., Castigliero, L., D’Amico, P., Messina, A., Malandra, R., Guidi, A. (2015). *DNA and Mini-DNA Barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market.* Food Control, 50, 589-596;
 - Armani, A., Guardone, L., La Castellana, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A., Castigliero, L. (2015). *DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market.* Food control, volume 55, pagine 206-214;
 - Asensio, L. (2007). *Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry.* Food control;

- Audicana, M. T., García, M., Del Pozo, M.D., Diez, J., Muñoz, D., Fernández, E., Echenagusia, M. (2000). *Clinical manifestations of allergy to Anisakis simplex*. *Allergy*;55(S59):28-33;
- Audicana, M.T., Kennedy, M.W. (2008). *Anisakis simplex: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity*. *Clin Microbiol Rev*;21:360-79;
- Aveni, M., Rana, R. (2006). *Il surimi e i suoi derivati: aspetti tecnici, economici e tutela del consumatore*, Industrie alimentari XLV, pagine 743-752;
- Aveni, M., Rana, R. (2006). *Surimi and surimi seafood: technological and economical aspects and customer's safety*, Industrie Alimentari XLV, pagine 743-759;
- Avise, J.C. (1986). *Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals*. *Philosophical Transaction of the Royal Society London B*. 312:325-342;
- Barrie, S. (1999). *Food allergies*. In *Textbook of Natural Medicine*. Edited by Pizzorno, J. E. Jr and Murray, M. T. Second edition, pp 453-460;
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P., Hertel, C. (2003). *"The effect of processing parameters on DNA degradation in food"*, *European Food Research Technology*, 217:338–343;
- Bentivogli, D., Vianello, G., Boschi, M.P. (2009). *Radici della terra*, capitolo 2;
- Bernhisel-Broadbent, J., Scanlon, S.M., Sampson, H.A. (1992). *Fish hypersensitivity - In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients*. *J Allergy Clin Immunol*;89:730-737;
- Bertolini, F., Ghionda, M. C., D'Alessandro, E., Geraci, C., Chiofalo, V., Fontanesi, L. (2015). *"A Next Generation Semiconductor Based Sequencing Approach for the Identification of Meat Species in DNA Mixtures"*, *PLOSE ONE*;
- Biondaro, S. (2013). *Applicazione della Real-Time PCR per l'identificazione di specie carnee in alimenti*. Tesi di laurea in Biotecnologie per l'Alimentazione, Università di Padova.
- Blades, M. (1996). *Food allergy and food intolerance*. *Food Science and Technology Today*, 10(2):82-86;
- Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, W.A. (2010). *Guide-lines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States*. Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol*;126(Suppl1):51-58;
- Brown, T.A. (2007). *Biotecnologie molecolari, principi e tecniche*, Ed. Zanichelli,

pp.176-178;

- Busato, S. (2010). *Frodi alimentari per sostituzione di specie: identificazione di specie in prodotti ittici mediante tecnica pyrosequencing*. Tesi di laurea in Biotecnologie e per l'alimentazione, Università di Padova;
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Simon, E.J. (2008). “*L'essenziale di biologia*”, terza edizione, Pearson Benjamin Cummings;
- Cann, R. L., Stoneking, M., Wilson, A. C. (1992). *Mitochondrial DNA and human evolution*, Nature; 325: 31-36;
- Cattaneo P., Bernardi C. (2010). *Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi*, Food in, numero 1, capitolo 2;
- Ceres, C. (2010). *Valutazione della conservabilità in diverse matrici alimentari*, capitolo 2;
- Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, I., Asensio, L., Hernandez, P.E and Martin, R. (1998). *Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome b gene*. Journal of food science, 63, 206-209;
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Calo-Mata, P., Perez-Martin, R. I., Rehbein, H., Hold, G. L., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Rosa, C., Santos, A. T. (2002). *Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS)*. J. Food Sci. 67 (5);
- Civera T., Parisi E., Bisio C., Giaccone V., Sibour M. (1990). “*Un alimento per il futuro: il surimi*” Industrie alimentari 29 (279);
- Civera, T., Parisi, E., Bisio, C., Giaccone, V., Sibour, M. (2006). *Un alimento per il futuro: il surimi*. Industrie alimentari XLV;
- Colavita, G. (2008). *Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale*, capitolo 8;
- Crespo, J.F., Pascal, C., Dominguez, C. (1995). *Allergic reactions associated with airborne fish particles in IgE-mediated fish hypersensitive patients*. Allergy;50:257-61;
- D'Amico, P., Armani, A., Castigliengo, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012). “*Seafood traceability issues in Chinese food business activities in the light*

- of the European provisions*". Food Control 35(1), 7-13;
- Dallas, G.F. (1988) - *Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by " hybridization with a human minisatellite probe*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 6831-6835;
 - Dalmaso, A., Bottero, M.T. (2008). *Identificazione di specie in prodotti ittici*. Industrie Alimentari; 47: 117–121;
 - Daul, C.B., Slattery, M., Reese, G. (1994). *Identification of the major brown shrimp (Penaeus aztecus) allergen as the muscle protein tropomyosin*. Int Arch Allergy Immunol;105:49-55;
 - Dello Iacono, I., Limongelli, M.G., Parente, C., Varricchio, E., Basilicata, A.M., Vetrano, G. (2010). *Allergia al pesce e cross-reazioni*, Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica, pagine 14-20;
 - Ebbehøj, F. K., Thomsen, D. P. (1991). *Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization*. Meat Sci. 30, 221234;
 - EFSA, (2012). *Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food*. Available from URL <http://www.efsa.europa.eu/it/press/news/121220>;
 - FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Available from URL <http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>;
 - FAO, (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Available from URL <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>;
 - Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Borrell, J.Y., Vazquez, E.G. (2016). *Towards more sustainable surimi? PCR-cloning approach for DNA barcoding reveals the use of species of low trophic level and aquaculture in Asian surimi*. Food control, volume 61, pagine 62-69;
 - Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., Labra, M. (2013): *DNA Barcoding as a new tool for food traceability*. Food Research International, 50(1):55-63;
 - Ghiretti, F., Cariello, L. (1984). *Gli animali marini velenosi e le loro tossine*, Piccin, ISBN 978-88-299-0271-2;
 - Giaccone, V. (2006). *Cibi pronti – il futuro della sicurezza alimentare*, Ingegneria

Alimentare;

- Giuffrida, A. (2003). *Application of risk management to the production chain of intensively reared fish*. Veterinary Research Communications. 27 Suppl.1, 491-496;
- Hamdan, M., Righetti, P. (2005). *Proteomics today*, Wiley;
- Hansen, T.K., Bindslev-Jensen, C., Skov, P.S., Poulsen, L.K. (1997). *Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species*. Ann Allergy;78:187-194;
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S., DeWaard, J.R. (2003). *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*. Biological Sciences 270 (1): 96–99;
- Hefle, S. L. (1996). *The chemistry and biology of food allergens*. Food Technology, March, 86-92;
- Helyar S.J., Hywel, D. L., De Bruyn, M., Leake, J., Bennett, N., Carvalho, G.R. (2014). *Fish Product Mislabelling: Failings of Traceability in the Production Chain and Implications for Illegal, Unreported and Unregulated (IUU) Fishing*. Plose One, volume 9, issue 6;
- Hemmer, W. (2002). “*Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*”, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss Science Foundation, Basel, Switzerland;
- Henriksen, C., Eggesbo, M., Halvorsen, R., Botten, G. (2000). *Nutrient intake among two-year-old children on cow's milk restricted diets*. Acta Paediatrica, 89(3):272-278;
- Hoffman, D.R., Day, E.D., Miller, J.S. (1981). *The major heat-stable allergen of shrimp*. Ann Allergy;47:17-22;
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.H. (1998). “*Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction*”, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung, 206:203-207;
- Huxley-Jones, E., Shaw, J.L.A., Fletcher, C., Parnell, J., Watts, P.C. (2012). *Use of DNA barcoding to reveal species composition of convenience seafood*. Conservation Biology. Volume 26, numero 2, pagine 367-371;
- ISMEA, (2010). *Panel pesca ed acquacoltura*. Available from URL <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/5103>;
- ISMEA, (2011). *Report ittico: analisi e dati di settore 2011 e 2012*. Available from

- URL <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/7868>;
- ISMEA, (2014). *Il comportamento dei consumatori infrequenti di pesce*. Available from <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9631>;
 - James, K.J., Bishop, A.G., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, G., Ferretti, E., Satake, M., Yasumoto, T. (1999). *Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish*. J Chromatogr A; 844:53-65;
 - Jay, M.J., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*, capitolo 5;
 - James, J.M., Crespo, J.F. (2007). *Allergic reactions to foods by inhalation*. Curr Allergy Asthma Rep;7:167-74;
 - Jeong, K.Y., Yum, H.Y., Lee, I.Y. (2004). *Molecular cloning and characterization of Tropomyosin, a major allergen of Chironomus kiiensis, a dominant species of nonbiting midges in Korea*. Clin Diagn Lab Immunol;11:320-4;
 - Kandyil, S.M., Davis, C.M. (2009). *Shellfish allergy*. Pediatr Allergy Immunol;20:408-14;
 - Keskin E., Atar H. H. (2012). *Molecular identification of fish species from surimi-based products labeled as Alaskan pollock*. Journal of applied Ichthyology 28, 811–814;
 - Klung, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. (2006). *Concepts of genetics*, 8TH edition, Prentice Hall;
 - Kuehn, A., Hilger, C., Hentges, F. (2009). *Anaphylaxis provoked by ingestion of marshmallows containing fish gelatin*. J Allergy Clin Immunol;123: 708-9;
 - La Grutta, S., Calvani, M., Bergamini, M., Pucci, N., Asero, R. (2011). *Allergia alla Tropomiosina: dalla diagnosi molecolare alla pratica clinica*, Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica, pagine 20-38;
 - Landi, M., Blohm, D. (2008). *DNA microarrays for identifying fishes*, Marine Biotechnology 10 (2), pp. 207-217;
 - Lee C.M. (1984). “*Surimi process technology*” Food Tecn.38 (11);
 - Leung, P.S., Chow, W.K., Duffey, S. (1996). *IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen*. J Allergy Clin Immunol;98:954-61;

- Marin, A., Villegas-Llerena, C., Fujimoto, T., Arai, K. (2015). “*Novel decaplex PCR assay for simultaneous detection of scallop species with species-specific primers targeting highly variable 5' end of the 16S rRNA gene*”. *Aquaculture Research*.
- Martìn-Sánchez, A.M., Navarro, C., Pèrez-Alvarez, J.A., Kuri, V. (2009). *Alternatives for Efficient and Sustainable Production of Surimi: A Review*, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, volume 8;
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2004): *Biochimica*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana;
- Melis, M. (2014). *Additivi e tossici negli alimenti*, seconda edizione, capitolo 11;
- Meusnier, I., Singer, G., Landry, J., Hickey, D., Hebert, P., Hajibabaei, M. (2008). “*A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis*”, *BMC Genomics*;
- Michelmores, R.W., Paran, I., Kesseli, E.V. (1991) - *Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828-9832;
- Miguez A, Fernandez ML, Fraga S. (1996). *First detection of domoic acid in Galicia*. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.), p. 143-145;
- Morena, V., Saccares, S., Marozzi, S., Condoleo, R. (2010). *Il surimi in Europa: un prodotto in continua ascesa*. *Il pesce*, 2;
- Muciaccia, M. (1992). *Il riconoscimento di code di rana pescatrice e code di specie ittiche consimili*. *Il pesce*, 2-19;
- Nichols D.J., Shaw M.K., Ledward D.A. (1970). *Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfmyoglobin formation in prepacked chilled beef*. *Appl. Microbiol*, 19. Pagine 937-939;
- Ong, S., Pandey, A. (2001). «*An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics.*», *Biomol Eng*, vol. 18, pp. 195-205;
- Otranto, D., Gasser, R.B., Morris, G.M. (2012). *La biologia molecolare applicata alla parassitologia veterinaria*;
- Pafundo, S., Agrimonti, C., Marmiroli, N. (2005). *Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms*. *J. Agric. Food Chem.*53:6995-7002;
- Panzani, R.C., Ariano, R. (2001). *Arthropods and invertebrates allergy (with the*

- exclusion of mites): the concept of panallergy. Allergy;56:1-22;*
- Park, J. W. (2014). *Surimi and surimi seafood*, third edition, capitolo 1;
 - Pepe T., Trotta M., Di Marco I., Anastasio A., Bautista J.M., Cortesi M.L. (2007). *Fish Species Identification in Surimi-Based Products*, Journal of agricultural and food chemistry, 55, 3681–3685;
 - Perezani A., Zambon M., Fasolato L., Tepedino V., Arcangeli G. (2007). *Identificare il pesce in modo sicuro*. Regione Veneto, Piano Sicurezza Alimentare 2005-2007 della Regione Veneto;
 - Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H. (1998) *Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna*. J Agric Food Chem 46:1662–1669;
 - Reese, G., Ayuso, R., Lehrer, S.B. (1999). *Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen*. Int Arch Allergy Immunol;119:247-58;
 - Robinson, J., Ferguson, A. (1992). *Food sensitivity and the nervous system*. Nutrition Research Reviews, 5:203-223;
 - Sartory D., Bonadonna, L., Delattre, J.M., Gosling, P., Janda, M., Van der Kooij, D. (2012). *Aeromonas* In: Guidelines for drinking-water quality. Addendum Microbiological agents in drinking water, pp.1-17;
 - Shendure, J., Hanlee, J. (2008). *Next-generation DNA sequencing*, Nature Biotechnology, vol. 26, pp. 1135-1145;
 - Shewan J.M. (1961). *The microbiology of sea-water fish*. In: Borgstrom G. (Ed.). Fish as food. New York & London: Academic Press;
 - Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A. (2004). *Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey*. J Allergy Clin Immunol;114:159-65;
 - Teletchea, F. (2009). *Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications*. Rev Fish Biol Fisheries;19:265–293;
 - Teletchea, T., Maudet, C., Hänni, C. (2005). *Food and forensic molecular identification: update and challenges*. Trends Biotech 23:359–366;
 - Vidal-Giraud, B., Chateau, D. (2007). *World surimi market*, capitolo 2;
 - Vitale, G. (2012). *Analisi critica di tecniche di sequenziamento di nuova generazione*. Tesi di laurea in Ingegneria dell'Informazione, Università di Padova;

- Viviani R. (1983). *Le diverse fioriture di fitoplancton, dal 1978 al 1982, nell'area del mare Adriatico settentrionale prospiciente la costa dell'Emilia-Romagna*. In: Atti del Convegno Eutrofizzazione dell'Adriatico, p.79-87;
- Ward, R.D., Hanner, R., Hebert, P.D. (2009). *The campaign to DNA barcode all fishes*, FISH-BOL. J.Fish Biol. 74(2): 329-56.
- Warhurst, G. (2000). *Do you go nuts about nuts?* Food Science and Technology Today, 14(3):134-137;
- Watson, J.D., Levine, M., Gann, A., Losick, R., Baker, T.A., Bell, S.P. (2009). *“Biologia molecolare del gene”*, Zanichelli sesta edizione;
- Westermerie, R., Marouga, R. (2005). *«Protein detection methods in proteomics research.»* Biosci Rep, vol. 25, pp. 19-32;
- Wild, L.G., Lehrer, S.B. (2005). *Fish and shellfish allergy*. Curr Allergy Asthma Rep;5:74-9;
- Xiong, X., Guardone, L., Giusti, A., Castigliero, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A., Armani, A. (2016). *DNA barcoding reveals chaotic labeling and misrepresentation of cod (鳕, Xue) products sold on the Chinese market*. Food control, volume 60, pagine 519-532;
- Yasumoto T, Nakaijma I, Bagnis R, Adachi R. (1977). *Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of Ciguatera*. Bull Jpn Soc Sci Fish; 43:1021-6;
- Yoon I.H., Matches J.R. (1988). *“Growth of pathogenic bacteria on imitation-crab”* J. Food Sci 53;
- Zalke, J. (2005). *Global markets for surimi-based products*, Marketing 67-72.

RIFERIMENTI NORMATIVI

- DIRETTIVA 2011/91/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 13 dicembre 2011 relativa alle diciture o marche che consentono di identificare la partita alla quale appartiene una derrata alimentare.
- DIRETTIVA 2000/13/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO, del 20 marzo 2000, relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità
- REGOLAMENTO (UE) N. 1379/2013 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO dell'11 Dicembre 2013 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, recante modifica ai regolamenti (CE) n.1184/2006 e (CE) n.1124/2009 del Consiglio e che abroga il regolamento (CE) n.104/2000 del Consiglio.
- REGOLAMENTO (UE) N.1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 25 Ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n.1924/2006 e (CE) n.1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n.608/2004 della Commissione.
- REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.
- REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

- **REGOLAMENTO (CE) N. 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 1224/2009 DEL CONSIGLIO** del 20 novembre 2009 che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca, che modifica i regolamenti (CE) n. 847/96, (CE) n. 2371/2002, (CE) n. 811/2004, (CE) n. 768/2005, (CE) n. 2115/2005, (CE) n. 2166/2005, (CE) n. 388/2006, (CE) n. 509/2007, (CE) n. 676/2007, (CE) n. 1098/2007, (CE) n. 1300/2008, (CE) n. 1342/2008 e che abroga i regolamenti (CEE) n. 2847/93, (CE) n. 1627/94 e (CE) n. 1966/2006
- **REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 404/2011 DELLA COMMISSIONE** dell'8 aprile 2011 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1224/2009 del Consiglio che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca.
- **REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 1420/2013 DELLA COMMISSIONE** del 17 dicembre 2013 che abroga i regolamenti (CE) n. 347/96, (CE) n. 1924/2000, (CE) n. 1925/2000, (CE) n. 2508/2000, (CE) n. 2509/2000, (CE) n. 2813/2000, (CE) n. 2814/2000, (CE) n. 150/2001, (CE) n. 939/2001, (CE) n. 1813/2001, (CE) n. 2065/2001, (CE) n. 2183/2001, (CE) n. 2318/2001, (CE) n. 2493/2001, (CE) n. 2306/2002, (CE) n. 802/2006, (CE) n. 2003/2006, (CE) n. 696/2008 e (CE) n. 248/2009 in seguito all'adozione del regolamento (UE) n. 1379/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.

RINGRAZIAMENTI

Giunta, finalmente, al traguardo, sono molte le persone che hanno contribuito al raggiungimento di questo obiettivo e che desidero ringraziare. Innanzitutto, ringrazio la Prof.ssa Alessandra Guidi, il Dott. Lorenzo Castiglio e il Dott. Andrea Armani, per avermi dato la possibilità di svolgere il tirocinio presso il “Fishlab”, per il sostegno e la disponibilità, che non mi hanno mai fatto mancare, nonostante i loro numerosissimi impegni. Un ringraziamento di cuore va a tutto lo staff del “Fishlab”: Lara, Lisa, Alice, Priscilla, Xiong e Hassan, per avermi accolto con il sorriso dal mio primo giorno in laboratorio e per avermi costantemente motivata. In particolare, mi sento di ringraziare Lara, per avermi seguito durante tutto il percorso del tirocinio, con pazienza infinita, e, soprattutto, per avermi trasmesso la passione per questo settore. Alla fine di questo percorso, sento di poter affermare che i mesi di tirocinio trascorsi presso il Fishlab siano stati tra i più intensi (e faticosi, lo ammetto!!) della mia carriera universitaria, perché mi hanno permesso di crescere a livello professionale e personale. Ringrazio i miei amici di sempre, quelli che hanno condiviso tutto con me, dal diploma alla laurea, per esserci sempre stati; le amiche del mitico “BQA”, Camilla, Anita, Maria e Giulia, per aver condiviso con me le infinite ore di lezione, le ansie per gli esami e le risate delle pause pranzo! Un grazie di cuore al mio fidanzato Lorenzo, per sostenermi da 8 anni a questa parte e per aver ascoltato interminabili racconti su PCR, DNA e surimi! Un ringraziamento speciale va a mia sorella Sara, per il sostegno e l’aiuto che non mi ha fatto mancare e ai miei genitori, per essere sempre stati la motivazione principale in tutto quello che ho fatto, per avere appoggiato tutte le mie scelte, per avermi aiutato e sostenuto incondizionatamente. Infine, una dedica speciale va ai miei nonni, Pia e Silvio, che continuano ad accompagnarmi e sostenermi e che, ne sono sicura, sarebbero molto orgogliosi di me.

