

Caratterizzazione chimica e genetica della bottarga di muggine da diverse origini geografiche

ANDREA BARRA*[†], VINCENZO LUIGI GARAU [†], SANDRO DESSI[§],GIORGIA SARAIS[†],
ELISABETTA CERETTI[‡], MARCO ARLORIO[‡], JEAN DANIEL COISSON[‡] AND PAOLO CABRAS[†]

[†] Department of Toxicology, University of Cagliari, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari, Italy

[‡] Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (DISCAFF), Università degli Studi del Piemonte Orientale, via Bovio 6, 28100 Novara, Italy

[§] Department of Public Safety, Laboratorio di Igiene degli Alimenti, University of Cagliari, Via Porcell 4, 09124 Cagliari, Italy.

Riassunto

In questo studio è stata investigata la composizione chimica della bottarga di muggine da diverse origini geografiche. Sono stati studiati i grassi (~20%), le proteine (~50%), il contenuto di umidità (~22%) e di sale (~7%) su campioni di bottarga commerciali macinata (G) e intera (W). Tra i componenti di interesse nutrizionale gli acidi grassi -3 erano ~8%, lo squalene ~15 mg/100g, la vitamina E era ~8.5 mg/kg ed il colesterolo era ~300 mg/100g in media nei due prodotti commerciali. Le proprietà antiossidanti misurate con il test del DPPH ed espresso come Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), hanno mostrato un'attività sufficientemente buona dell'olio estratto (0.8-1.1 mmol Trolox/L) dall'alimento. I costituenti maggioritari dei campioni hanno mostrato una grande variabilità tuttavia sono state evidenziate solo poche differenze significative tra i due prodotti commerciali (G e W) o tra campioni di diverse origini geografiche. L'analisi statistica Principal Component Analysis (PCA) dei markers molecolari (DNA e proteine) non hanno permesso di differenziare campioni di diverse origini. Basandoci su questi risultati, i dati chimici e molecolari escludono la differenziazione dei campioni da diverse origini.

Introduzione

La bottarga dalla parola araba *botarikh*, è un tipico alimento a base di uova del pesce *Mugil cephalus*, noto agli egiziani ed alle altre popolazioni del mediterraneo fin dal 5000 a. C. La Sardegna ha una grande tradizione nella produzione e impiego della bottarga del *Mugil cephalus* pescato localmente. Negli ultimi anni questo prodotto ha ottenuto un enorme successo commerciale ed è stato esportato commercialmente all'estero.

La produzione di bottraga supera le 350 tonnellate/anno e questa espansione ha portato all'impiego di uova da differenti origini geografiche come USA, Brasile, Mauritania ed atlantico centro occidentale (Zona FAO 31). Da un punto di vista commerciale sono oggi disponibili prodotti trasformati con la metodica tradizionale ma impiegando uova di diverse origini geografiche. In breve la produzione industriale della bottarga parte dalle

uova crude del *Mugil cephalus* che vengono pulite, salate, essiccate e selezionate per essere vendute intere (W), o macinate (G).

La politica commerciale internazionale dell' UE è orientata verso la preservazione le mondo gastronomico Europeo dalla riproduzione indiscriminata, al fine di garantire gli alimenti tipici (1). In questo contesto è stato recentemente richiesto il marchio d'origine per la "Bottarga di Sardegna". A nostra conoscenza non c'è un lavoro che descriva in maniera esaustiva la composizione chimica della bottarga da *Mugil cephalus*.

La tecnica del Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) è stata impiegata per la caratterizzazione del DNA e porta ad una stima della variazione genetica di una determinata popolazione. Tale tecnica è stata applicata al pesce al fine di valutare il grado di polimorfismo (2,3,4). Non è mai stata studiata la caratterizzazione genetica del *Mugil cephalus* con l'impiego delle RAPD, tuttavia Murgia et al. 2002 (5) hanno impiegato le sequenze di DNA mitocondriale e primers specifici per identificare l'origine della bottarga da *Mugil cephalus*. In un altro studio sono stati impiegati i microsatelliti da *Mugil cephalus* di origine mediterranea (6). Il pattern proteico delle uova di *Mugil cephalus* è stato già caratterizzato (7), ma i patterns proteici non sono stati ancora impiegati come descrittori d'origine.

Gli scopi di questo lavoro sono quello di A) determinare la composizione chimica e nutrizionale della bottarga includendo i composti d'interesse salutistico come gli ω -3 la vitamina E, lo squalene ed il colesterolo, e B) di identificare eventuali differenze tra la bottarga ottenuta da uova di muggine sardo e di altre origini geografiche impiegando markers chimici genetici e proteici.

Materiali e metodi

Campioni. Sono stati analizzati un totale di 71 campioni commerciali di bottarga di *Mugil cephalus* W (n=42) e G (n=29) che sono stati conservati a -18 °C fino alle analisi

I campioni provenivano da diverse origini: Brasile (W=15; G=10), Mauritania (W=11;G=6), USA (W=6; G=5), zona FaO 31 (W=6; G=8), e Sardegna (W=5).

Standards impiegati. L'estere metilico dell'acido eptadecanoico, squalene, squalano, colesterolo, stigmaterolo, α - e γ -tocoferolo, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), e Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), erano standard analitici Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La miscela di esteri metili degli acidi grassi "FAME Mix" era Restek (Bellefonte, PA). Il N-esano, metanolo, cloroformio e Na₂SO₄, reagenti di grado analitico, erano Carlo Erba (Milano, Italia). L'acqua era distillata e filtrata attraverso un sistema Milli-Q (Millipore, Milano, Italia).

Metodiche analitiche. *Estrazione dei lipidi per la determinazione di acidi grassi, squalene, vitamina E, colesterolo, e attività antiossidante.* I lipidi sono stati estratti con il metodo di Bligh and Dyer (8). Gli estratti ottenuti sono stati conservati a -20°C prima delle analisi.

Composizione in acidi grassi e squalene. Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) sono stati preparati dagli estratti secondo la metodica AOAC (9) Ce 1b-89, ed espressi come % dopo normalizzazione delle aree dei picchi ottenuti in gas cromatografia. Il contenuto di squalene è stato determinato negli stessi estratti impiegando come standard interno lo squalano ed espresso come mg/100g di bottarga (peso secco). I diversi FAMES e lo squalene sono stati separati con un sistema gas cromatografico Carlo Erba HRGC 5160 Mega series equipaggiato con un autocampionatore (AS-800 CE instruments, Thermoquest, Milan, Italy) ed un detector a ionizzazione di fiamma (FID). È stata impiegata una colonna in silice fusa capillare DB-23 (23 % phenylmethylpolysiloxane, 60 m, 0.25 mm id; 0.25 μ m film thickness) (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). L'iniettore ed il detector erano a 240 °C. E' stato iniettato un microlitro di campione in split (1:100). La programmata di temperatura era la seguente: da 160 °C a 240 °C a 3 °C/min, e isoterma per 40 min. La pressione dell'azoto era 220 kPa and 75 kPa, quando usato come

carrier o gas di make up, rispettivamente. L' H₂ e l'aria avevano una pressione di 150 e 100 kPa, rispettivamente.

Colesterolo. Il colesterolo è stato determinato negli estratti lipidici secondo il metodo Botsoglu et al. (10) impiegando lo stigmasterolo come standard interno ed i risultati sono stati espressi come mg/100g di bottarga (peso secco).

Vitamina E. Per la determinazione della vitamina E è stato impiegato un HPLC LaChrom-Merk-Hitachi (Tokyo, Japan), D7000, equipaggiato con una pompa L-7100, un autocampionatore L-7200 ed un detector a fluorescenza L-7485 settati ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 290 nm e di emissione di 330 nm, in accordo con il metodo descritto da Brenes et al. (11). I tocoferoli (Vitamina E) sono stati separati su una colonna Spherisorb 5 µm ODS2 (460x25 mm Waters, Milano, Italia), eluiti in isocratica con acqua/acetonitrile (50:50, v/v). Il volume d'iniezione era 50 µL, ed il flusso era di 1 mL/min. Sono state costruite curve di calibrazione per i tocoferoli con coefficienti di correlazione da 0.995 a 0.999. I risultati sono stati espressi come mg/kg di bottarga (peso secco).

Attività antiossidante. L'attività antiossidante è stata determinata spettrofotometricamente con il metodo del DPPH sugli estratti lipidici. Il test del DPPH è stato condotto in accordo con la metodica di Brand-Williams et al. (12). In breve è stata preparata una soluzione standard stock di DPPH (0.4 mM) e di Trolox (20mM) 24 h prima degli esperimenti. Una soluzione standard diluita di DPPH (0.04mM) è stata preparata giusto prima degli esperimenti. Sono state preparate soluzioni standard di Trolox a diverse concentrazioni (0.1, 0.4, 1.0, 2.0, e 4.0 mmol Trolox/L) per costruire la retta di calibrazione del Trolox. Dieci microlitri di Trolox in diluizione standard o di olio sono stati dissolti in 3 mL di DPPH diluito (0.04 mM) ed agitato. Il bianco è stato preparato aggiungendo 10 µL of etil acetato al posto della soluzione diluita di Trolox o dei campioni. Dopo 1 h di incubazione al buio ed a temperatura ambiente, è stata misurata l'assorbanza verso il bianco a 517 nm impiegando uno spettrofotometro Cary 50 (Varian, Milano, Italia). I risultati sono stati espressi come Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) in mmol di Trolox/L.

Contenuto lipidico. I lipidi totali sono stati determinati nei campioni secondo la metodica ufficiale AOAC (9) con un Soxtherm-rapid extraction unit, (Gerhardt, Königswinter, Germany) impiegando come miscela estraente etere etilico/etere di petrolio (50:50). I risultati sono stati espressi come percentuale su peso secco.

Umidità. Il contenuto di umidità nei campioni è stato determinato in accordo con la metodica AOAC (9) pesando campioni fino a peso costante dopo essere stati in forno a 60 °C. I risultati sono stati espressi come percentuale su peso secco

Proteine. L'azoto totale è stato determinato nei campioni impiegando un digestore per metodo Kjeldahl Buchi K-424 associato ad un distillatore Buchi K314. Il contenuto di proteine è stato calcolato come N x 6.25. I risultati sono stati espressi come percentuale su peso secco

Sale. Il contenuto di cloruro di sodio è stato determinato con il metodo titrimetrico di Volhard descritto nel AOAC Official Method 937.09 (9). I risultati sono stati espressi come percentuale su peso secco.

Ceneri. Le ceneri sono state determinate calcinando a 550° C per 18 ore.

pH. 100 mg sono stati dispersi in 20 mL di acqua distillata ed il pH è stato misurato con un pH-metro 420 A Orion (Milano).

Tutte le analisi sono state effettuate in duplicato .

Analisi molecolari. *Campioni.* 5 campioni di bottarga w sono stati selezionati da ognuna delle seguenti aree per le analisi genetiche: USA, Sardegna, Brasile, e Mauritania. I campioni della zona FAO31 erano in quantità troppo esigua per tale analisi.

Estrazione del DNA genomico. Il DNA è stato estratto con in seguente metodo basato su tecnica SDS. In un vial sono stati frizzati in azoto liquido i campioni e polverizzati in mortaio. È stato aggiunto un volume di 500 µl di buffer di estrazione (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) ed i campioni sono stati lasciati in un

Thermomixer a 65 °C per un'ora. Dopo centrifugazione per 10 min a 14000 g, il supernatante è stato trasferito in un'altro vial ed il DNA è stato purificato con una estrazione con fenolo:cloroformio:isoamil alcol (25:24:1; v:v:v), seguito da una estrazione con cloroformio, e precipitato con etanolo assoluto. Il DNA è stato compattato dopo centrifugazione a 14000 g per 10 min e, dopo due lavaggi con etanolo al 70%, è stato lasciato asciugare e risospeso in 100 µl di buffer TE (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Amplificazione del DNA. Sono stati scelti arbitrariamente 13 primers decamerici tutti della Invitrogen (Milano, Italia) (**Tabella 1**). Gli esperimenti RAPD sono stati effettuati impiegando un termociclatore PE 9700 (Applied Biosystems, Monza, Italia) in accordo con le condizioni standardizzate seguenti. Per ogni campione sono stati preparati 25 µl di miscela di reazione contenete circa 25 ng di DNA, 1X buffer di reazione (500 mM KCl, 100 mM Tris, pH 9.0.), 0.8 mM di dNTPs mix, 0.2 µM di primer, 2.5 mM MgCl₂ e una unità di Taq polymerase (Labogen, Milano, Italia). Tutte le amplificazioni sono state effettuate con un programma termico che includeva un totale di 40 cicli da 40 s a 94 °C (denaturazione), 1 min a 32 °C (annealing), ed 1 min a 72 °C (estensione).

Rilevazione del DNA. Un'aliquota da 10 microlitri dei prodotti di amplificazione sono stati separati su gel di agarosio al 2%. La bande sono state visualizzate sotto lampada UV fluorescenza e analizzate impiegando un detector Fluor-S MultiImager dotato di software with Quantity One (Bio-Rad , Milan, Italy).

Analisi dei patterns proteici. 100 mg di campione sono stati estratti in un Thermomixer at 40 °C per 2 ore in 1 mL di buffer urea (Tris-glycine 0.1 M, urea 6 M). dopo centrifugazione per 20 min a 14000g e filtrazione (filtro 0.22 µm Millipore), 25 µL di supernatante sono stati aggiunti a 225 µL di etanolo assoluto e le proteine sono state fatte precipitare a 4 °C per 18 ore. Dopo centrifugazione per 10 min a 14000 g, l'etanolo è stato eliminato ed il pellet è stato disciolto 100 µL in buffer di Laemmli (4 % SDS, 20% glycerol, 0.004% bromphenol blue, 0.125 M Tris HCl pH 6.8). L'elettroforesi è stata condotta impiegando un gel precast SDS-PAGE (ExCelgel™ 2D homogeneous, 12,5 acrylamide from Pharmacia) in un sistema Multiphor II (Pharmacia). L'elettroforesi è stata fatta sviluppare a 300V-50 mA-30 W per 15 min, poi a 600V-50 mA- 30 W sotto blue Bromophenol. Il gel è stato fissato con acido acetico al 10% ed etanolo al 40% per 30 min, e dopo colorato con Coomassie Blue R-250 per 30 min per rivelare le bande. Sono stati usati per l' analisi del gel i software Fluor-S Multimager e Quantity One (Bio-Rad). Le bande dei gel sono state espresse come percentuale relativa ed impiegate come variabili per l'analisi statistica.

Analisi statistica. L'analisi della varianza (ANOVA) dei dati chimici è stata effettuata con il software GenStat v. 7.1 (VSN International Ltd., Herts, U.K.) impiegando il trattamento dei dati "unbalanced treatment structure design" con $p \leq 0.01$, seguito da LSD test. La Principal Component Analysis (PCA) dei dati molecolari è stata effettuata con il software statistical R (R Development Core Team, 2008).

Risultati e discussione

Dati di composizione chimica. (i) *Composizione.* La **Tabella 2** riporta i dati di pH, umidità, sale, ceneri, lipidi, e proteine per i prodotti W e G. Il pH medio dei campioni era 5.5. Il contenuto di umidità era in media 21.1 e 23.7 % per prodotti G e W, rispettivamente. Normalmente le uova crude di *Mugil cephalus* posseggono in media il 50 % di umidità. In media le ceneri erano 8.0% e 7.6% per prodotti G e W, rispettivamente, mentre il sale era 6.9 % per entrambi i prodotti. La quantità di sale e ceneri nelle uova crude è ~ 2.5%, e ciò indica che il processo di salagione contribuisce notevolmente (più del 90 %) al totale delle ceneri. Il contenuto lipidico era 23.5 e 16.2 % per prodotti G e W, rispettivamente. Le Proteine erano il 50% in media per tutti i campioni con un *range* dal 35 al 65%. Il

contenuto di umidità era normalmente più elevato nei prodotti W, come era lecito, giacché i prodotti G possono perdere acqua facilmente. I campioni sardi erano differenti da quelli della Mauritania per il contenuto di sale e lipidi e da quelli della zona FaO 31 e Brasile per il contenuto di lipidi ed umidità rispettivamente.

(ii) *Composizione in acidi grassi.* La **Tabella 3** mostra la composizione in acidi grassi dei campioni commerciali da diverse origini geografiche. Vengono date le medie generali degli acidi grassi saturi (SAFA) (~32%), monoinsaturi (MUFA) (~20%) e polinsaturi (PUFA) (~38%). Mentre i composti non identificati sono ~10 %, tuttavia erano composti presenti in bassa percentuale.

I SAFAs più abbondanti erano il C16:0 (~15%) ed il C17:0 (~9%). Il C17:0 è stato identificato come marker chimico del *Mugil cephalus* (13).

Tra i MUFA, il C18:1 (*n*-9) (~5%) era leggermente più abbondante del C18:1 (*n*-7) (~4%) e leggermente meno abbondante del C24:1 (~6%). Ben il trentotto per cento degli acidi grassi era rappresentato da -3. Questa percentuale è sovrapponibile a quella dei PUFAs, tra cui il maggioritario era il C22:6 (DHA, 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid) ed il C20:5 (EPA, 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid). Il contenuto di acidi grassi - può anche essere espresso come ~8% (peso secco) dei prodotti commerciali in media. Questo valore è maggiore rispetto alla percentuale riportata sul caviale (4.8%) (14) o sulle uova di *Morone saxatilis* (15) 1.3%. L'elevato contenuto in PUFA è importate in quanto sono essenziali per il loro ruolo nutrizionale (13). Nonostante ci siano alcune differenze tra i singoli composti nei due tipi di prodotto commerciali e nei campioni commerciali di diverse origini geografiche, non si rivelano differenze confrontando le somme delle diverse classi di acidi grassi.

(iii) *Squalene.* Lo squalene è un idrocarburo noto per la sua attività antiossidante (13). La quantità di squalene rilevata nei campioni era in media nei due prodotti commerciali 15 mg/100g ma questo basso contenuto non è in grado di esercitare una buona attività antiossidante. Inoltre non sono state evidenziate differenze significative tra prodotti G o W e solo i campioni W degli USA si differenziavano dai corrispondenti della zona FaO **Tabella 3**.

(iv) *Colesterolo.* Il colesterolo è uno degli steroli che caratterizzano i grassi animali. Il contenuto di colesterolo era pari a 212 e 314 mg/100g per i prodotti W e G, rispettivamente (**Tabella 3**). Il contenuto di colesterolo nei prodotti W del Brasile e della Mauritania era inferiore di quello dei corrispondenti prodotti G. I campioni W della Mauritania contenevano una quantità significativamente inferiore di colesterolo rispetto ai corrispondenti campioni della zona FaO, mentre i campioni della Sardegna erano diversi solo da quelli della Mauritania.

(v) *Vitamina E.* La vitamina E, generalmente espressa come soma di tocoferoli, esercita la sua attività antiossidante come un *radical scavenger* nel processo di perossidazione lipidica (16). La **Tabella 4** riporta il contenuto di vitamina E in campioni W e G. Entrambi e tocoferol sono stati identificati nei campioni ma il -tocoferolo era un centinaio di volte inferiore rispetto all' -tocoferolo, mentre il -tocoferolo non è stato rilevato. La quantità di vitamina E era ~ 8.5 ppm nei campioni W e G in media e non sono state rilevate differenze significative ad eccezione dei campioni W della Mauritania. Aro et al. (17) riportano il basso contenuto di vitamina E in aringa salata che subisce un processo di trasformazione simile a quello della bottarga. Esperimenti preliminari hanno mostrato che avviene una perdita di vitamina E (riduzione di 5-6) durante la trasformazione delle uova di muggine per ottenere la bottarga (dati non mostrati). Questo porta ad ipotizzare che il processo di trasformazione riduca significativamente il contenuto di vitamina E.

(vi) *TEAC.* I risultati del test del DPPH sono riportati in **Tabella 4**. Gli estratti hanno mostrato un'attività antiossidante che variava tra 0.8 e 1.1 mmol/L per prodotti G e W rispettivamente. È stata rilevata solo una differenza statistica tra campioni G e W del Brasile, ma nessuna differenza tra campioni di diversa origine geografica. Questi valori sono in accordo con dati di letteratura che riguardano l'olio di arachidi (0.61 mmol/L) e

quello d'oliva (1.79 mmol/L) (18). I prodotti qui studiati sono stati sottoposti a varie manipolazioni (lavaggio, salaggione, essiccamento, e/o macinazione), e questo può giustificare la grossa perdita di antiossidanti durante la lavorazione. In ogni caso una certa attività antiossidante è mantenuta ma non è dovuta al basso contenuto di tocoferoli o squalene.

Dati molecolari. (i) *analisi dei pattern Proteici.* Il pattern proteico della bottarga è stato analizzato con la SDS-PAGE (12% acrilamide) dopo estrazione in buffer urea. I pattern ottenuti sono presentati in **Figura 1**. Le Bande possono essere identificate in accordo con i risultati di Amano et al. (7). In particolare quelle a 90-110 kDa (kDalton) sono le catene pesanti note come lipovitelline (yolk proteins: Yp1, Yp2, Yp3) derivate dalla vitellogenina. Le catene leggere della stessa proteina sono a 30 kDa. La proteina Yp4, è una variante proteolitica che consta della lipovitellina e fosvitina della vitellogenina A, esibisce principalmente catene pesanti (attorno a 110 kDa) e un'altra banda a 54 kDa. La banda a 15 kDa è da attribuire alla Yp5 e Yp6, identificate come la componente β' derivata dalle vitellogenine A e B (7). Data la grande similitudine dei pattern proteici per tutti i campioni, la PCA di questi dati non ha permesso di effettuare una differenziazione (dati non mostrati).

(ii) *Analisi genetica.* È noto che la riproducibilità della tecnica RAPD dipende dagli effetti di diversi parametri sui profili delle bande (19). Così sono stati condotti esperimenti preliminari per valutare questi effetti e standardizzare la metodica.

Tutti i random primer impiegati hanno dato amplificazioni eccellenti su tutti i campioni testati. Solo 5 primers (A3, A4, A7, A8, A9) hanno dato però prodotti polimorfici ed il numero di bande ottenute per primer variava da 7 a 24. Un totale di 58 amplificazioni sono state ottenute ed usate per le analisi statistiche.

Prima dell'analisi statistica con PCA sono stati assegnati alle bande dei valori arbitrari in forma binaria dando "1" per la presenza della banda, e "0" per la assenza. Bande che si sono mostrate una volta all'interno del replicato non sono state considerate. Le bande sono state trascritte in una apposita matrice. Sono state effettuate molte analisi statistiche con la PCA. La **Figura 2** mostra i risultati della principal components bi-dimensionale (2 PC) che esprime il 29.2 % della varianza totale. La PC tri-dimensionale PC (3 PC) dava solo il 40.1 % della varianza totale. PC superiori fino ad un massimo di 10 e le loro combinazioni bi-dimensionali (esp. 2 PC versus 4 PC) non hanno differenziato meglio i campioni. Dunque i risultati non rivelano polimorfismo genetico nei campioni relazionati alla diversa origine geografica.

Conclusioni

I risultati presentati in questo studio permettono una valutazione chimica dei principali nutrienti (lipidi, ~20%; proteine, ~50%; umidità, ~22% e sale ~7%), e dei più rilevanti composti importanti da un punto di vista salutistico come gli ω -3, lo squalene, la vitamina E ed il colesterolo, della bottarga da *Mugil cephalus*. Gli ω -3 sono molto abbondanti se confrontati con il contenuto di altre uova di pesce. Il colesterolo è abbondante ma questo è normale essendo le uova un tipico alimento ricco di colesterolo. I composti ad azione antiossidante (squalene e Vitamina E) erano in bassa quantità, e questo è probabilmente dovuto al processo di trasformazione. I maggiori costituenti dei campioni variavano notevolmente, ma solo poche differenze statistiche sono state trovate tra prodotti G o W o tra campioni di diversa origine. Questo non permette di differenziare i prodotti W da quelli G, o campioni di diversa origine geografica in base alla composizione chimica.

Le tecniche molecolari hanno evidenziato simili profili proteici e genetici e anche questo non permette di differenziare i campioni di diverse origini. I nostri risultati indicano che la bottarga ottenuta da uova di *Mugil cephalus* della Sardegna non può essere distinta da quella ottenuta con uova di diversa origine geografica.

Bibliografia

- 1) Schirone, M.; Vergara, A.; D'Annunzio, T.; Ianieri, A. Evoluzione della normativa comunitaria dei prodotti a marchio DOP, IGP, STG. *Ind. Alimentari*. **2007**, XLVI, 1125-1133.
- 2) Bardakci, F.; Skibinski, D.O.F. Application of the RAPD technique in Tilapia-fish – species and subspecies identification. *Heredity* **1994**, 73, 117-123.
- 3) Borowsky, R.L.; McClelland, M.; Cheng, R.; Welsh, J. Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates – the Xiphophorus model. *Molec. Biol. Evolut.* **1995**, 12, 1022-1032.
- 4) Mamuris, Z.; Apostolidis, A.P.; Theodorou, A.J.; Triantaphyllidis, C. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Biol.* **1998**, 132, 171-178.
- 5) Murgia, R.; Tola, G.; Archer, S. N.; Vallerga, S.; Hirano, J. Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (Bottarga). *Mar. Biotechnol.* **2002**, 4, 119-126.
- 6) Miggiano, E.; Lyons, R.E.; Li, Y.; Dierens, L.M.; Crosetti, D.; Sola, L. Isolation and characterization of microsatellite loci in the striped mullet, *Mugil cephalus*. *Mol. Ecol. Notes* **2005**, 5, 323-326.
- 7) Amano, H.; Fujita, T.; Hiramatsu, N.; Shimizu, M.; Sawaguchi, S.; Matsubara, T.; Kagawa, H.; Nagae, M.; Sullivan, C.V.; Hara, A. Egg yolk protein in gray mullet (*Mugil cephalus*): purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J. Exp. Zool.* **2007**, 307, 324-341.
- 8) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. of Biochem. and Phys.* **1959**, 37, 911-917.
- 9) AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, **1996**.
- 10) Botsoglu, N.; Fletouris, D.; Psomas, I.; Mantis, A. Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and -tocopherol in eggs. *J. of AOAC Int.* **1998**, 81, 1177-1183.
- 11) Brenes, M.; Gracia, A.; Dobarganes, M. C.; Velasco, J.; Romero, C. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5962-5967.
- 12) Brand-Williams, W.; Culier, M.E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss.u.-Technol.* **1995**, 28, 25-30.
- 13) Pigott, G. M.; Toker, B. W. Fish oils. In *Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition*. Second edition, **2003**, Vol. 4, pp 2491-2501.
- 14) Gessnes, J.; Wirth, M.; Kirschbaum, F.; Kruger, A.; Patriche, N. Caviar composition in wild and cultured sturgeons-impact of food sources on fatty acid composition and contaminant load. *J. Appl. Ichthyol.* **2002**, 18, 665-672.

- 15) Harrel, M. R.; Curry Woods III, L. Comparative fatty acid composition of eggs from domesticated and wild striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*. **1995**, 133, 225-233.
- 16) Visoli, F.; Galli, C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.* **1998**, 56, 142-147.
- 17) Aro, T. L.; Larmo, P. S.; Backman, C. H.; Kallio, H.; Tahvonen, R. L. Fatty acids and fat-soluble vitamins in salted herring (*Clupea harengus*) products *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1482-1488.
- 18) Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* **2003**, 133, 2812-2819.
- 19) Meunier, J.R.; Grimont, P.A. Factors affecting reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA-fingerprinting. *Res. Microbiol.* **1993**, 144, 373-379.

Tabella 1. Random Primers impiegati.

Primer code	Sequences (5'→3')
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTG
A3	AGTCAGCCAC
A4	AATCGGGCTG
A5	AGGGGTCTTG
A7	GAAACGGGTG
A8	GTGACGTAGG
A9	GGGTAACGCC
A12	TCGGCGATAG
B1	GTTTCGCTCC
B2	TGATCCCTGC
C1	TTCGAGCCAG
C4	GATGACCGCC

Tabella 2. Composizione della bottarga da *Mugil cephalus*.

Origine	pH		umidità ^a		ceneri ^a		Sale ^a		Lipidi ^a		Proteine ^a	
	G	W	G	W	G	W	G	W	G	W	G	W
FAO 31 media	5.5a	5.6a	24.6a	31.4b	9.3a	9.5a	8.1a	6.8a	25.7a	21.3a	49.6a	43.0a
Brazil media	5.7a	5.6a	21.4a	22.4a [#]	7.2a	6.8a	7.7a	6.8a	18.8a	14.2a	50.1a	48.9a
Mauritania media	5.3a	5.6a	16.8a [#]	28.1b	8.2a	8.7a	6.7a	8.0a	28.6a	20.8a	56.9a	49.6a
USA media	5.3a	5.3a	19.1a	23.2a	7.2a	6.7a	6.2a	5.8a	26.7a	16.9a	49.5a	48.2a
Sardegna media	-	5.3	-	29.5 [*]	-	5.6	-	4.3 [§]	-	13.3 ^{§ #}		47.7
totale media ± SD ^b	5.5±0.4	5.6±0.4	21.1±4.1	23.7±5.6	8.0±2.9	7.6±1.1	6.9±1.7	6.9±1.1	23.5±7.1	16,2±7.3	51.8±7.7	49.5±7.5

^a Espresso come % su peso secco; ^bSD=deviazione standard. G=macinato; W=intero. Lettere minuscole indicano confronto tra colonne tra prodotti G e W. I dati marcati con letter diverse sono significativamente diversi ($P \leq 0.01$) con LSD test. I dati marcati con “*”, “#” o “§” sono diversi significativamente dai corrispondenti del Brasile, zona FAO 31 o Mauritania rispettivamente.

Tabella 3. acidi grassi, squalene e colesterolo in campioni commerciali di bottarga da *Mugil cephalus*.

Acidi grassi ^a	Origin											
	FaO 31		USA		Brasile		Mauritania		Sardegna		media ± SD ^d	
	G	W	G	W	G	W	G	W	G	W	G	W
C14:0	1.0a	1.0a	0.9a	0.8a	0.9a	1.1a	0.8a	1.4a	-	1.7	0.9±0.1	1.0±0.2
C16:0	12.1a	13.5a	16.4 [#]	19.4a [#]	15.1a	15.8a	11.0a	15.1b	-	16.5	13.7±2.5	15.9±2.5
C17:0	9.8a	11.2a	5.8a [#]	6.8a [#]	11.8a [†]	7.9b [#]	14.6a ^{#†}	6.1b [#]	-	10.8 [§]	10.5±3.7	8.1±2.3
C18:0	6.5a	5.8a	7.4a	7.7a	7.1a	7.2a	5.3a	8.0b	-	5.5	6.5±0.9	7.2±1.0
C20:0	0.9* ^{§†}	t ^c	t	t	t	0.8 ^{#†}	t	0.4 ^{#†}	-	0.6 ^{#†}	0.6±0.4	0.6±0.3
ü SAFA	30.3a	31.5a	30.5a	34.7a	34.9a	32.8a	31.7a	30.8a	-	35.2	32.2±1.5	32.8±0.3
C14:1	1.6a	0.4b	0.7a	0.6a	0.7a	0.8a	0.9a	0.3b	-	0.4*	1.0±0.4	0.5±0.2
C16:1	3.2a	2.9a	4.1a	3.3a	3.4a	4.1a	4.1a	4.0a	-	5.0	3.7±0.5	3.5±0.5
C18:1n-9	4.9a	4.5a	5.1a	4.9a	4.8a	5.3a	5.2a	4.7a	-	6.2	5.0±0.2	4.8±0.3
C18:1n-7	4.2a	4.4a	4.5a	3.0a	4.2a	4.0a	4.2a	4.0a	-	5.1	4.2±0.2	3.8±0.6
C20:1	t	t	t	t	t	0.3 ^{#†}	t	0.3 ^{#†}	-	0.6 ^{#†}	-	0.3±0.3
C24:1	7.7a	6.1b	5.8a	3.8b* ^{#§}	5.7a	6.2a	5.4a	7.0b	-	5.2	6.1±1.1	5.7±1.4
ü MUFA	21.6a	18.3a	20.2a	15.6a	18.8a	20.7a	19.8a	20.3a	-	22.4	20.3±1.1	18.6±1.2
C18:2	0.7a	0.7a	0.9a	0.6b	0.7a	0.7a	1.3a	0.5b	-	1.1 [§]	0.9±0.3	0.7±0.3
C18:3 -3	0.9a	0.7a	1.0	0.6a	0.8a	0.8a	0.5a	0.4a	-	0.7	0.8±0.2	0.6±0.2
C20:4 -3	3.2a	4.5a	4.2a	3.0b	3.5a	4.0a	4.2a	2.6b* [#]	-	3.2	3.8±0.5	3.7±1.2
C20:3	1.9	0.8a	1.4a	0.2b	0.8a	0.6b	0.7a	0.3b	-	0.1* [#]	1.1±0.7	0.4±0.2
C20:5 -3	11.0a	8.0a	9.2a	8.9a	9.7a	9.4a	9.7a	10.5a	-	8.0	9.9±0.8	9.2±1.0
C22:6D -3	24.8a	26.3a	25.2a	27.9a	22.0a	24.2a	22.6a	22.2a [†]	-	22.0 [†]	23.7±1.5	25.1±2.5
ü PUFA	40.3a	40.6a	40.8a	41.0a	36.4a	38.8a	37.5a	36.1a	-	35.2	38.8±2.1	39.1±2.2
ü ü -3	39.5a	40.0a	39.6a	39.6a	35.8a	38.1a	36.5a	35.6a	-	33.9	37.9±1.9	38.3±2.0
ü non identificati	8.8a	9.6a	7.6a	9.0a	8.9a	9.2a	11.6a	7.6a	-	8.1	9.3±1.7	8.9±1.0
colesterolo ^b	307a	302a	298a	273a	268a	200b	304a	184b [#]	-	277 [§]	314±109	212±61
squalene ^b	19a	15a	18a	19a*	14a	10a	15a	17a	-	12	17±2	13±5

^a espresso come media % su peso secco; ^b espresso come mg/100g su peso secco; ^ct= tracce (< 0.1%); G=macinato; W=intero. ^dSD= deviazione standard. Lettere minuscole indicano confronto tra colonne tra prodotti G e W. I dati marcati con letter diverse sono significativamente diversi (P ≤ 0.01) con LSD test. I dati marcati con “*”, “#”, “§”, “o”, “†” sono diversi significativamente dai corrispondenti del Brasile, FAO 31, Mauritania o USA rispettivamente.

Tabella 4. e -tocoferolo in campioni commerciali di Bottarga di *Mugil cephalus* da differenti origini ed attività antiossidante dei suoi estratti lipidici.

	origine	α-tocoferolo ^a		γ-tocoferolo ^a		TEAC ^b	
		G	W	G	W	G	W
^a sono riportate le medie dei risultati espressi in mg/kg su peso secco; ^b espresso come mmol/L di Trolox riferito all'olio estratto; ^c SD= deviazione standard. G=macinato;	FAO 31	0.1a	0.1a	9.5a	12.6a	0.8a	1.2a
	Brazil	0.2a	0.2a	5.3a	5.2a	1.3a	0.6b
	Mauritania	0.04a	0.07a	3.3a	12.2b	1.2a	0.7a
	USA	0.1a	0.3b	7.9a	6.4a	0.9a	0.6a
	Sardinia	-	0.1	-	7.8	-	0.7
	total mean ± SD ^c	0.2±0.2	0.1±0.1	8.8±5.9	8.3±4.9	1.1±0.4	0.8±0.3

W=intero. Lettere minuscole indicano confronto tra colonne tra prodotti G e W. I dati marcati con letter diverse sono significativamente diversi ($P \leq 0.01$) con LSD test. I dati marcati con diverse lettere sono diversi significativamente ($P \leq 0.01$) con LSD test.

Figura 1. SDS-PAGE Fingerprints delle proteine estratte da campioni commerciali di bottarga da diverse origini geografiche

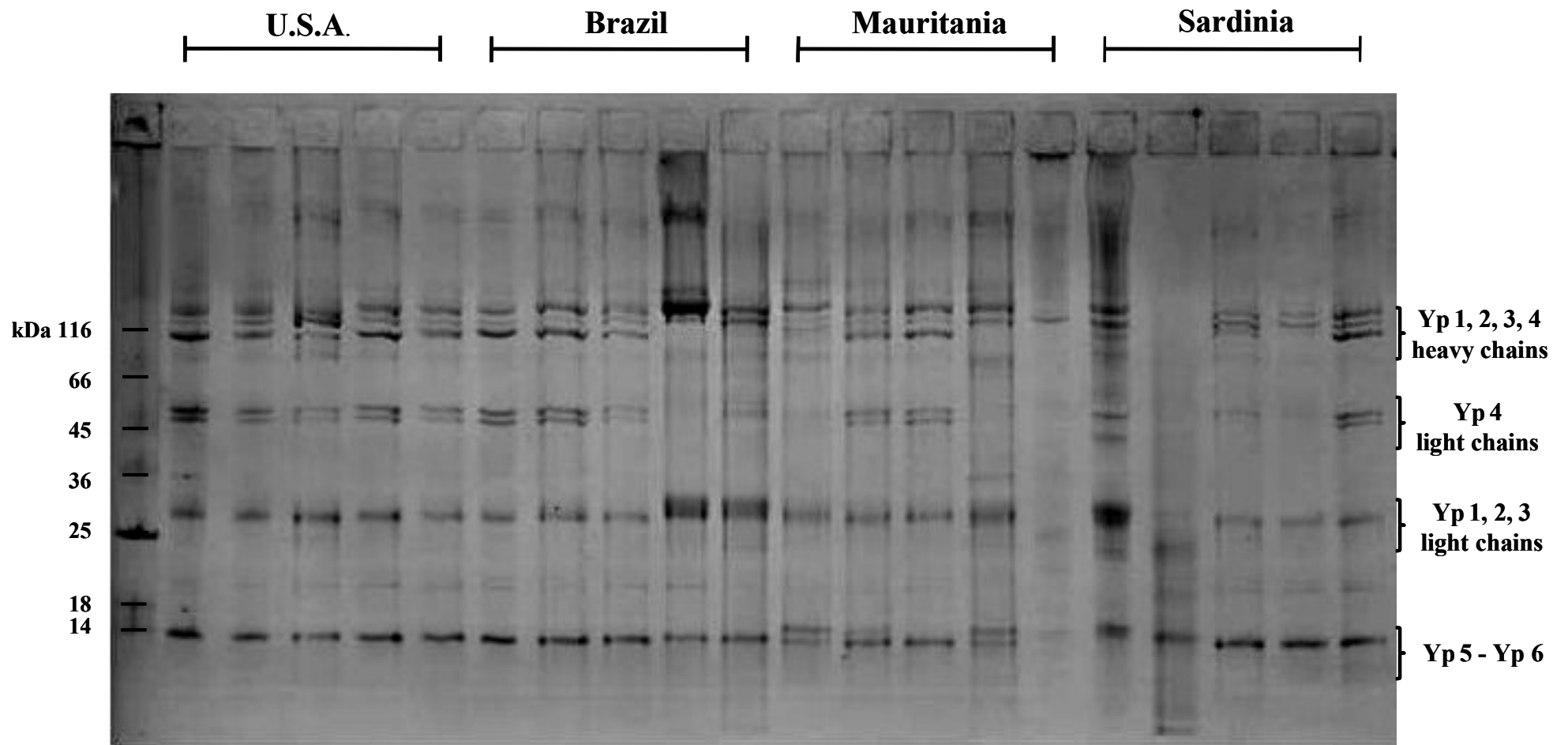


Figura 2. PCA scores plot dell'informazione ottenuta usando 5 Five Primers RAPD (29.2 % della variazione totale) .

