



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



PROGRAMMA OPERATIVO REGIONALE FSE 2014-2020



Centrale
del latte
Vicenza

REPORT: Analisi dell'attività antiossidante durante la *shelf life* di bevande vegetali a base di AVENA

Il lavoro si inserisce in un Progetto di collaborazione tra il Dipartimento di Scienze Biomediche (Università degli Studi di Padova) e la Centrale del Latte di Vicenza e si sviluppa nell'ambito di una più vasta collaborazione che comprende il Programma Operativo Regionale Fondo Sociale Europeo F.S.E. 2014-2020: Codice progetto 2105-50-11-2018, dal titolo: *La ricerca di base a supporto dell'azienda: realizzazione di un functional food e di nuovi nutraceutici per il benessere del consumatore.*

Laura Moretto ^a, Federica Tonolo ^a, Giulia Foffano ^a, Marco Bellamio ^b

Referente progetto: Maria Pia Rigobello ^a

Referente azienda partner: Emiliano Feller ^b

^a Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova, via Ugo Bassi 58/b, 35131 Padova

^b Centrale del Latte di Vicenza s.p.a., via A. Faedo 60, 36100 Vicenza

Abstract Negli ultimi anni l'interesse verso matrici vegetali alternative al latte è in aumento. Un esempio è l'avena, che presenta differenze nella composizione rispetto alla matrice di soia. Infatti è ricca in carboidrati e oltre a lipidi e proteine contiene anche molecole bioattive fra cui i β -glucani con attività benefiche.

In questo progetto sono state analizzate bevande di avena durante tutta la vita a scaffale, di durata di circa dodici mesi e anche oltre la data di scadenza. Lo scopo è quello di verificare eventuali cambiamenti dal punto di vista antiossidante nel tempo e studiare il comportamento lipidico e proteico. Le bevande sono state fornite con la formulazione commerciale dalla Centrale del Latte di Vicenza secondo le modalità previste dal progetto. I prodotti analizzati, come riportato nella parte sperimentale, si presentano stabili dal punto di vista del potere antiossidante durante tutta la *shelf life* e attraverso le analisi dell'ossidazione proteica e lipidica non sono stati rilevati cambiamenti notevoli anche oltre la data di scadenza. Tuttavia la matrice è pochissimo soggetta a perossidazione lipidica se confrontata con altre matrici alimentari come la bevanda di soia.



1 INTRODUZIONE

Le bevande vegetali alternative al latte sono di vario tipo e comprendono matrici come soia, avena, cocco, con composizioni e caratteristiche differenti. La prima è la più studiata, mentre l'avena è una delle matrici vegetali più emergenti anche nelle diete vegetariane o vegane (Sethi S et al., 2016).

La maggior parte della composizione dell'avena comprende carboidrati, in particolare amido. Le proteine invece sono 11-15% e includono globuline dette avenaline, albumine, prolamine e gluteline. Inoltre l'avena presenta lipidi, vitamine e minerali tra cui i più rappresentativi sono potassio e fosforo. Questo cereale è benefico per la dieta umana per la presenza di vari fitochimici come composti fenolici tra cui acidi fenolici e flavonoidi e anche fitoestrogeni detti lignani. Un importante gruppo di componenti bioattive sono i β -glucani, fibre solubili formate da monomeri di D-glucosio legati da legami β -glicosidici. Altri esempi di composti bioattivi sono i carotenoidi, la vitamina E e i fitosteroli. Effetti benefici dovuti al consumo di avena sono attribuiti principalmente ai β -glucani ed esempi sono la riduzione del rischio di malattie croniche e la promozione della salute del tratto digestivo (Chu Y, 2014; Rasane P, 2015; Gangopadhyay N, 2015).

2 PROGETTO

Nel corso del progetto sono stati analizzati diversi lotti di bevande a base di avena durante tutta la vita a scaffale, di durata di circa dodici mesi. **Lo scopo dell'analisi è la valutazione di variazioni dell'attività antiossidante e del comportamento lipidico e proteico nel tempo.** Nella tabella sottostante sono specificati i valori nutrizionali medi per 100 mL di prodotto come indicati nell'etichetta delle bevande di avena in commercio:

AVENA	Valori nutrizionali medi per 100 ml
Energia	200 kJ-48 Kcal
Grassi	1.1 g
di cui acidi grassi saturi	0.2 g
Carboidrati	7.9 g
di cui zuccheri	5.9 g
Fibre	1.4 g
Proteine	0.8 g
Sale	0.1 g
Riboflavina vit. B2	0.21 μ g
Vitamina B12	0.38 μ g
Vitamina D	0.75 μ g
Calcio	120 mg

3 CAMPIONI E LOTTI ANALIZZATI: SCHEMA DI LAVORO

La Centrale del Latte di Vicenza ha fornito diversi lotti di bevande di avena con tempi di *shelf life* differenti. È stata progettata l'attività (*time sheet*) suddividendo i campioni consegnati in modo da eseguire quattro esperimenti totali programmati nel seguente modo:

Esperimento	Campioni analizzati nel tempo (mesi)							
Dicembre (A)	0	2	4	6	8	10	12	14
Febbraio (B)	0	2	4	6	8	10	12	14
Aprile (C)	0	2	4	6	8	10	12	14
Giugno (D)	0	2	4	6	8	10	12	14

Per ognuno dei **quattro esperimenti** sono stati analizzati **8** diversi campioni di bevanda di avena alla volta, di cui ognuno si trova intervallato dal successivo di due mesi di *shelf life*. Sono stati presi in considerazione quindi più lotti con vita a scaffale differente, **dal mese 0 (produzione) fino al mese 14, cioè oltre la data di scadenza (mesi di shelf life: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)**. Per ogni lotto analizzato è stata utilizzata una confezione differente nell'esperimento successivo, considerando due mesi di *shelf life* in più.

Tutti i lotti di bevanda di avena analizzati durante la *shelf life* alla fine di tutto il progetto sono riportati di seguito:

Mese	A	B	C	D
0	L18319	L19009	L19080	L19136
2	L18257	L18319	L19009	L19080
4	L18193	L18257	L18319	L19009
6	L18138	L18193	L18257	L18319
8	L18074	L18138	L18193	L18257
10	L18018	L18074	L18138	L18193
12	L17320	L18018	L18074	L18138
14	/	L17320	L18018	L18074

4 MATERIALI

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS), acetato di etile, acido acetico, acido cloridrico (HCl), acido fosforico (H₃PO₄), acido gallico, acido solforico (H₂SO₄), acido tiobarbiturico (TBA), butilidrossitoluene (BHT), Carbonato di Sodio (Na₂CO₃), cumene idroperossido, difenilpicrilidrazile (DPPH), dinitrofenilidrazina (DNPH), Ditiotreitolo (DTT), emina, etanolo, etere di petrolio, Idrossido di Sodio (NaOH), metanolo, n-butanolo, Nonidet, Ortoftalaldeide (OPA), Reattivo di Folin Ciocalteu, Sodio docecil solfato (SDS), Trizma Base, Trolox C (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), Urea.

5 METODI

Nella prima parte del progetto sono state messe a punto le metodiche per analizzare tutti i campioni.

Per alcuni saggi sono state prese in considerazione le bevande di avena come tali, mentre per altri sono stati ottenuti degli estratti idroalcolici del prodotto iniziale.

Le bevande vegetali a base di avena sono risultate differenti dal punto di vista della consistenza e della composizione rispetto alle matrici fermentate come lo yogurt, il Flora Plus e il dessert vegetale a base di soia. Infatti non è stato possibile ottenere un estratto di tipo acquoso utilizzando le bevande a base di avena in quanto presentano un contenuto di lipidi e di glucidi poco solubili. Seguendo la letteratura del settore è stato fatto uno studio testando diversi solventi e si è deciso di procedere utilizzando l'etanolo all'80%.

Pertanto, ove previsto dalla sperimentazione, si è proceduto con la diluizione dei campioni iniziali delle bevande nel solvente scelto, centrifugati e filtrati in modo da ottenere gli estratti idroalcolici. Successivamente sono state perfezionate le metodiche classiche per la valutazione complessiva dei campioni. Di seguito sono riassunte le metodiche utilizzate per tutte le analisi condotte.

5.1 Campioni

Durante ogni esperimento le confezioni contenenti le bevande sono state mescolate per inversione 30 volte in modo da omogenizzare il contenuto. Per ogni test le bevande, conservate a temperatura ambiente secondo le modalità indicate, sono state analizzate fresche prelevando il prodotto direttamente dalla confezione originale. Le bevande, una volta aperte, sono state conservate a 4°C fino al completamento dei test, per circa 4-5 giorni.

Per valutare l'attività antiossidante sono state prese in considerazione **7 analisi** diverse qui di seguito riassunte:

- ✓ **Misura del pH**
- ✓ **Saggio dell'ABTS**
- ✓ **Saggio del DPPH**
- ✓ **Determinazione del contenuto di fenoli totali**
- ✓ **Perossidazione lipidica**
- ✓ **Frammentazione proteica**
- ✓ **Ossidazione proteica**

Nei 4 esperimenti finali (A, B, C, D) per ognuno dei test ciascun campione è stato valutato in doppio, per un totale di **16 campioni di avena** analizzati durante ogni saggio. Nei saggi di determinazione della perossidazione lipidica e di ossidazione proteica l'analisi è avvenuta in quadruplo, in quanto due campioni sono stati valutati come tali e due dopo stimolazione chimica indotta in laboratorio. Ad ogni esperimento quindi sono stati valutati circa **150 campioni** derivanti dalla bevanda di avena iniziale, per un totale di circa **600 campioni analizzati di avena** alla fine di tutto il progetto.

5.2 Misura del pH

Le bevande di avena come tali sono state diluite 1:1 in acqua e per ogni campione è stata eseguita una misurazione del pH in doppio tramite pH-metro (sensiON™+ PH31).

5.3 Estratti idroalcolici per l'analisi del potere antiossidante

Per ottenere un estratto all'80% di etanolo ciascuna bevanda iniziale è stata mescolata per inversione 30 volte, al fine di omogenizzare il campione. Sono stati pesati 0.5 g di bevanda e diluiti in 9.5 mL di etanolo all'80%. Dopo aver mescolato alla ruota per 30 minuti i campioni diluiti sono stati centrifugati a 20000 g per 20 minuti a 4 °C e poi filtrati con filtri a pieghe di carta Whatman Chr 1. Gli estratti sono stati utilizzati per le prove successive e poi conservati a -20 °C.

5.3.1 Saggio dell'ABTS

Il saggio dell'ABTS consiste nella determinazione del radicale cationico 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS) e permette di studiare la capacità degli estratti idroalcolici di eliminare il radicale attraverso una metodica in cinetica. Dapprima viene preparata una soluzione di ABTS 7 mM e potassio persolfato 2.46 mM e posta al buio per 18 ore al fine di stabilizzare il radicale ABTS⁺. In dettaglio 0.02 mL di estratto idroalcolico ottenuto dalla bevanda di avena vengono fatti reagire con 1 mL di radicale diluito 1:88 in PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 X. La lettura spettrofotometrica viene eseguita in cinetica per 20 minuti a 734 nm (Cary 60 UV-Vis). In presenza di antiossidanti dalla soluzione color verde si forma un prodotto incolore. È stata costruita una retta di taratura con concentrazioni crescenti di Trolox C (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) sciolto in dimetilsolfossido (DMSO) e i risultati vengono espressi come capacità antiossidante in equivalenti di Trolox o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

5.3.2 Saggio del DPPH

Il saggio del DPPH presenta lo stesso principio del saggio dell'ABTS ma utilizza un differente radicale, il difenilpicrilidrazile (DPPH·).

Inizialmente viene preparata una soluzione di DPPH 0.2 mM, diluita a 0.1 mM in metanolo, e conservata al buio. La soluzione è di color viola e in presenza di antiossidanti il radicale viene ridotto con la formazione di un prodotto incolore, dovuto alla cessione di un atomo di idrogeno al radicale da parte della molecola antiossidante.

Per la metodica 0.2 mL di estratto idroalcolico vengono fatti reagire con 0.8 mL di soluzione di DPPH 0.1 mM attraverso un test in cinetica allo spettrofotometro a 517 nm (Cary 60 UV-Vis) per 30 minuti. I valori finali vengono calcolati come percentuale di DPPH *scavenging* con la seguente formula:

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controllo}} - \text{Abs}_{\text{campione}}}{\text{Abs}_{\text{controllo}}} * 100$$

5.3.3 Determinazione del contenuto di fenoli totali

La determinazione dei fenoli totali è un metodo colorimetrico che permette di quantificare il contenuto di composti fenolici nel campione, importanti antiossidanti presenti in diverse matrici

alimentari. Viene utilizzato il reattivo di Folin Ciocalteu di colore giallo, che vira a blu in modo proporzionale alla quantità di residui fenolici contenuti nell'estratto idroalcolico.

Per la determinazione del contenuto di fenoli totali 1 mL di estratto preparato come descritto nel paragrafo 5.3 viene fatto reagire con 1 mL di Reattivo di Folin Ciocalteu diluito 1:2 in acqua. Dopo un'attesa di 3 minuti a temperatura ambiente vengono aggiunti 2 mL di carbonato di sodio (Na_2CO_3) al 10% per 15 minuti a temperatura ambiente. Il campione viene poi centrifugato a 6000 g per 5 minuti e 1 mL di surnatante viene letto alla lunghezza d'onda di 750 nm tramite spettrofotometro (UV/VIS Lambda 2, Perkin Elmer). I valori ottenuti vengono espressi come equivalenti di acido gallico (GAE) (mg/100 mL prodotto) in base alla retta di taratura costruita con standard di acido gallico concentrato 1 mg/mL.

5.4 Determinazione della perossidazione lipidica

La capacità antiossidante può essere studiata anche indirettamente attraverso la valutazione del deterioramento lipidico delle bevande attraverso la determinazione della malondialdeide, un prodotto di degradazione della reazione di perossidazione lipidica. Questo composto è stato esaminato nelle bevande come tali e anche in quelle stimolate artificialmente con due induttori della reazione di perossidazione lipidica.

In dettaglio 0.2 g di bevanda di avena vengono pesati e stimolati con 0.005 mL di cumene idroperossido 0.5 M ed emina 1 mM per 30 minuti a temperatura ambiente oppure analizzati come tali. Vengono aggiunti 3.9 mL di acido solforico (H_2SO_4) 0.1 N e 0.5 mL di acido fosfotungstico (PTA) al 10% e i campioni vengono centrifugati a 4000 g per 10 minuti dopo aver mescolato vigorosamente. Di seguito il pellet viene riprecipitato nuovamente con gli acidi come descritto precedentemente. Dopo un'altra centrifuga al pellet vengono aggiunti 0.2 mL di Nonidet al 5%, 0.04 mL di BHT all'1%, 2.8 mL di acqua e 1 mL di acido tiobarbiturico (TBA) allo 0.67% (in acido acetico e acqua 1:1) per 1 ora in bagnetto termico a 95 °C. Questo passaggio è necessario per far reagire la malondialdeide presente nei campioni con l'acido tiobarbiturico, l'indicatore della reazione. Infatti, trascorso il tempo necessario, i campioni vengono raffreddati, centrifugati e mescolati con n-butanolo. Come risultato finale viene valutata la fluorescenza dell'addotto colorato rosa che si forma alla fine della reazione con eccitazione a 530 nm ed emissione a 590 nm attraverso un lettore di piastre (TECAN Infinite M200 Pro).

5.5 Proteolisi: determinazione della frammentazione proteica spontanea

Per valutare la proteolisi del campione 1 mL di bevanda come tale viene precipitata con 2 mL di acido tricloroacetico (TCA) all'1% freddo e 1 mL di acqua. Dopo aver miscelato al vortex il campione viene filtrato con filtri a pieghe di carta Whatman Chr 1 e con filtri da 0.22 μm . Successivamente 0.15 mL di filtrato reagiscono con 3 mL di reattivo OPA (ortoftalaldeide) costituito da sodio tetraborato 0.1 M, sodio dodecil solfato (SDS) 0.1 %, ortoftalaldeide 5.96 mM e ditiotreitolo (DTT) 5.97 mM. Dopo un'attesa di 2 minuti a temperatura ambiente la lettura spettrofotometrica viene eseguita a 340 nm (UV/VIS Lambda 2, Perkin Elmer).

5.6 Ossidazione delle proteine: contenuto di gruppi carbonilici

La componente proteica delle bevande vegetali di avena necessita di un'estrazione per depurarla dalla componente lipidica che interferisce con i saggi. Pertanto, dopo un attento studio e una serie di test di laboratorio, è stata messa a punto una metodica che permette di ottenere la parte proteica isolata. Come primo passaggio si procede alla rimozione dei grassi dalla bevanda attraverso l'utilizzo di un'estrazione con un solvente, l'etere di petrolio (pentano + esano).

Per questo scopo 2 mL di bevanda di avena vengono mescolati con 6 mL di etere di petrolio (rapporto 1:3) *over night*. Successivamente dopo la rimozione del solvente le bevande vengono poste ad un ciclo di liofilizzazione per ottenere un estratto sgrassato. Da 5 mg di questo vengono determinati i gruppi carbonilici, sia in campioni come tali sia in campioni stimolati con 0.006 mL di cumene idroperossido 0.5 M e 0.006 mL di emina 1 mM.

In particolare vengono dissolti i liofilizzati in 0.1 mL di volume finale di acqua e vengono aggiunti 0.5 mL di Urea 5M-NaOH 50 mM. I carbonili dei campioni vengono derivatizzati con 0.1 mL di dinitrofenilidrazina (DNPH) 6 mM in HCl 4 N per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Trascorsa l'incubazione vengono aggiunti 0.575 mL di una Master Mix costituita dal buffer Tris/acetato 0.8/0.8 M a pH 10 e 0.075 mL di SDS 250 mM. Poi viene condotta una tripla estrazione con acetato di etile: etere di petrolio in rapporto 5:2. In dettaglio vengono aggiunti 1.25 mL della soluzione e i campioni vengono centrifugati a 4000 g per 5 minuti. La parte superiore di solvente viene rimossa e quella inferiore viene risospesa nuovamente con altro solvente. Al terzo lavaggio viene eseguita la lettura spettrofotometrica a 370 nm (UV/VIS Lambda 2, Perkin Elmer) e i valori finali vengono espressi come nmoli di carbonili/mg di proteine presenti nel campione finale. Le proteine vengono calcolate con un test di determinazione proteica utilizzando il metodo di Bradford a 575 nm (UV/VIS Lambda 2, Perkin Elmer).

6 RISULTATI

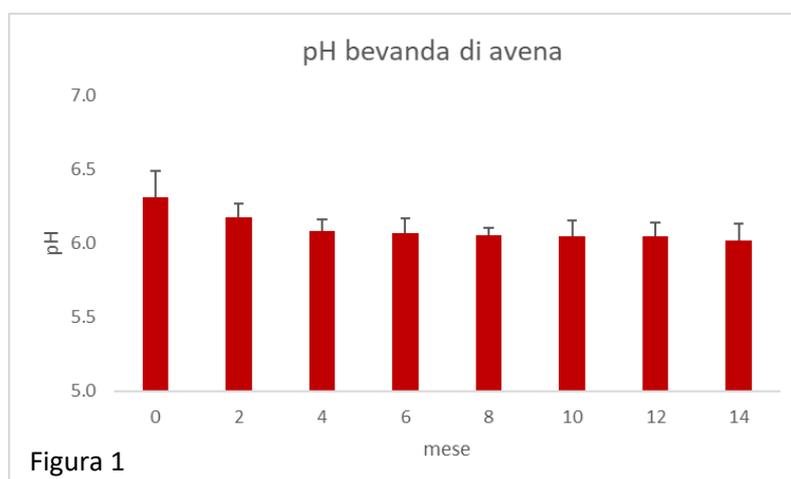
Sono riportati qui di seguito i risultati con tabelle e grafici riguardanti l'analisi delle bevande di avena. Sono stati eseguiti in **totale 4 esperimenti (A, B, C, D)** sui lotti di bevande di avena con mesi di *shelf life* dal mese 0 (produzione) al 14, **ogni due mesi (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)**. In ognuno dei test tutti i campioni sono stati valutati minimo in doppio o in quadruplicato ed è stata infine calcolata la media finale dei 4 esperimenti con la relativa deviazione standard.

6.1 pH

Nella Tabella 1 e Figura 1 sono indicati i dati relativi alle medie delle misure del pH di tutte le bevande di avena analizzate come tali.

Tabella 1.

Mese	A	B	C	D	pH
0	6.24	6.10	6.44	6.49	6.32 ± 0.18
2	6.28	6.12	6.09	6.23	6.18 ± 0.09
4	6.05	6.14	6.16	5.98	6.08 ± 0.08
6	6.08	5.98	6.21	6.02	6.07 ± 0.10
8	6.13	6.02	6.03	6.04	6.05 ± 0.05
10	6.12	6.10	6.09	5.89	6.05 ± 0.11
12	6.01	6.06	6.18	5.95	6.05 ± 0.10
14	/	5.92	6.15	5.99	6.02 ± 0.12



La bevanda a base di avena presenta un pH medio di partenza intorno al 6.3, come riportato in Tabella 1 e Figura 1 e si mantiene abbastanza stabile durante la *shelf life* e oltre la scadenza, anche se un decremento di 0.3 unità si registra nel corso dei 12 mesi.

6.2 Valutazione dell'attività antiossidante: saggi ABTS e DPPH

I due test ABTS e DPPH valutano la capacità di eliminazione di radicali in campioni di estratti idroalcolici ottenuti come descritto nel paragrafo 5.3 dalle bevande di avena. Sono tra i test maggiormente utilizzati *in vitro* per determinare la capacità antiossidante di una matrice alimentare. Per l'ABTS i valori nella Tabella 2 e nella Figura 2 sono indicati come capacità antiossidante in equivalenti di Trolox o TEAC (μM Trolox/mL prodotto) in base alla retta di taratura costruita con standard di Trolox C.

Tabella 2.

Mese	A	A (2)	B	C	D	TEAC (μM Trolox/mL prodotto)
0	98.88	105.15	112.80	115.01	110.51	108.47 \pm 6.49
2	101.49	96.57	109.91	103.23	112.30	104.70 \pm 6.39
4	95.58	102.67	102.34	106.80	99.89	101.46 \pm 4.12
6	93.67	114.03	106.22	116.91	95.39	105.24 \pm 10.55
8	134.16	121.80	107.18	98.02	92.50	110.73 \pm 17.16
10	81.35	81.06	118.89	94.06	100.89	95.25 \pm 15.71
12	81.70	84.20	99.90	111.88	100.83	95.70 \pm 12.59
14	/	/	103.89	87.53	103.34	98.25 \pm 9.29

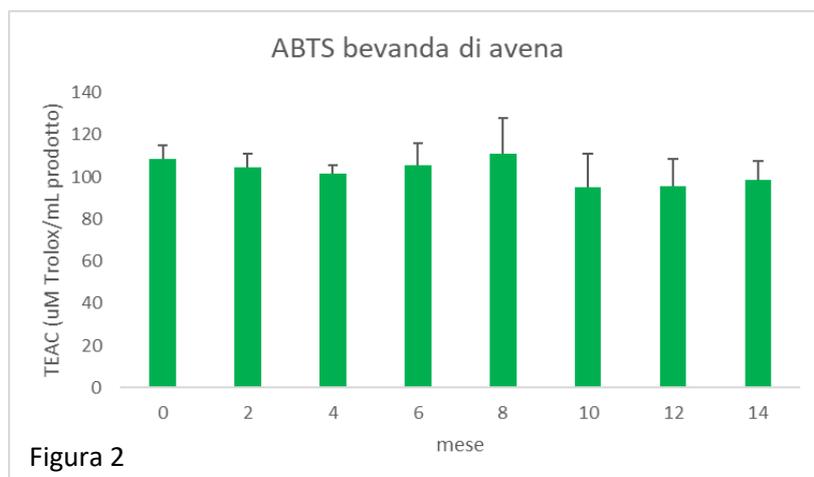


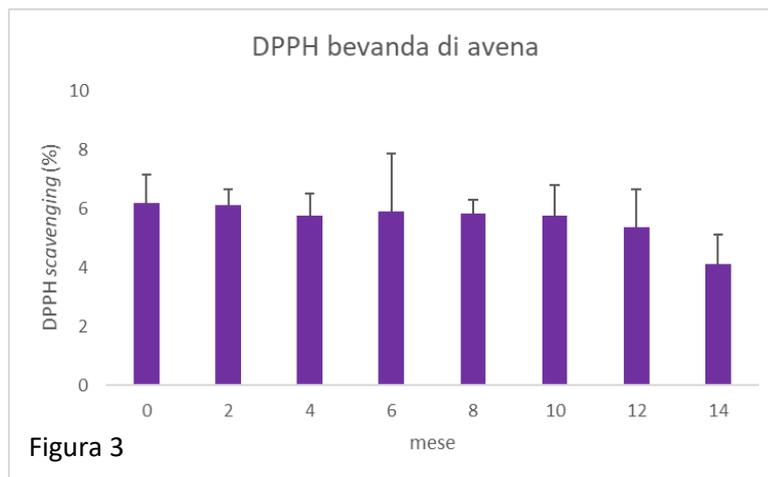
Figura 2

Dalle medie di tutti gli esperimenti non si osservano cambiamenti nella capacità antiossidante espressa come TEAC, anzi questa si mantiene molto stabile anche nei due mesi successivi alla data di scadenza.

È stato deciso di procedere con un altro saggio per verificare quanto ottenuto da questo metodo, attraverso il saggio del DPPH. I dati nella Tabella 3 e nella Figura 3 sono espressi come percentuale di DPPH *scavenging*, come descritto nel paragrafo 5.3.2.

Tabella 3.

Mese	A	B	C	D	DPPH scavenging (%)
0	6.18	5.55	7.56	5.53	6.21 ± 0.95
2	6.66	5.83	6.49	5.53	6.13 ± 0.53
4	6.01	5.71	6.56	4.78	5.76 ± 0.74
6	6.51	5.79	8.01	3.31	5.91 ± 1.96
8	5.48	5.75	6.51	5.59	5.83 ± 0.46
10	5.22	5.60	7.26	4.91	5.75 ± 1.05
12	5.67	4.04	7.02	4.69	5.35 ± 1.30
14	/	4.92	2.97	4.44	4.11 ± 1.01



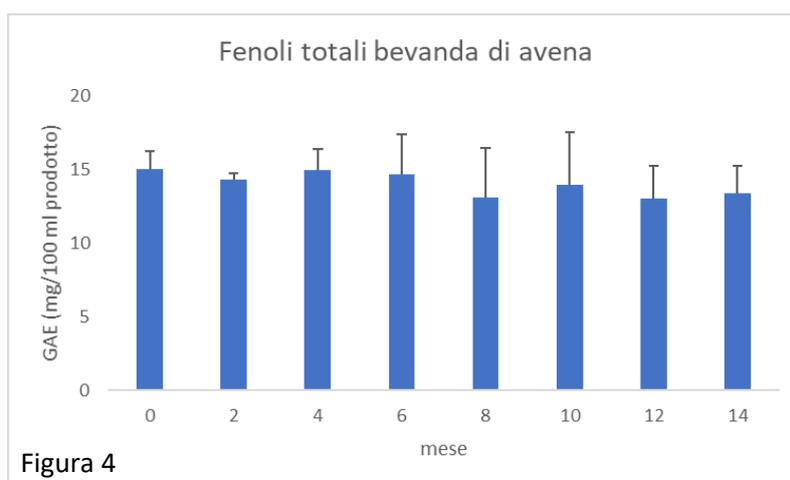
Dalle medie ottenute si può osservare che la capacità antiossidante espressa come percentuale di DPPH scavenging rimane stabile durante tutta la vita a scaffale. Una considerazione importante da notare è la diminuzione di questa dopo il dodicesimo mese quindi in corrispondenza della data di scadenza, aspetto non riscontrato attraverso il saggio dell'ABTS.

6.3 Fenoli totali

Come terzo test è stata quindi determinata la quantità di fenoli totali contenuta negli estratti idroalcolici delle bevande di avena, come riportato nella Tabella 4 e nella Figura 4. I risultati sono espressi come equivalenti di acido gallico (GAE) in milligrammi di acido gallico/100 mL di prodotto. L'acido gallico è la molecola antiossidante presa come riferimento per questo saggio.

Tabella 4.

Mese	A	B	C	D	GAE (mg/100 mL prodotto)
0	16.51	15.44	13.91	14.37	15.06 ± 1.16
2	14.56	14.73	13.91	14.15	14.34 ± 0.38
4	16.26	15.90	13.25	14.43	14.96 ± 1.39
6	15.61	18.04	13.33	11.84	14.70 ± 2.71
8	14.20	17.34	9.93	10.92	13.09 ± 3.37
10	15.58	17.59	9.18	13.46	13.95 ± 3.60
12	15.40	12.74	10.16	13.87	13.04 ± 2.21
14	/	13.32	11.44	15.28	13.35 ± 1.92



I valori di GAE ottenuti per le bevande di avena si sono dimostrati costanti durante tutta la *shelf life*, indice di ulteriore conferma della stabilità della capacità antiossidante valutata attraverso i saggi precedenti. Dopo il quattordicesimo mese non si notano variazioni nel contenuto di fenoli totali.

6.4 Determinazione della perossidazione lipidica

L'attività antiossidante dei campioni di avena è stata studiata anche indirettamente attraverso lo studio della perossidazione lipidica. È stata infatti dosata la malondialdeide, uno dei prodotti di degradazione della reazione della lipoperossidazione.

I valori di fluorescenza/mL di prodotto sono stati ottenuti su campioni come tali (Tabella 5A e Figura 5A) e su campioni stimolati con due induttori, il cumene idroperossido e l'emina (Figura 5B e 5B).

Come si può osservare già il prodotto di partenza ha una perossidabilità minima, soprattutto se confrontata con altre matrici come ad esempio la bevanda di soia, in quanto la bevanda di avena è meno ricca di acidi grassi insaturi. Inoltre quando la bevanda di avena viene sottoposta ad uno stress ossidativo indotto si nota una perossidabilità estremamente limitata e almeno da 10 a 30 volte inferiore, sempre in paragone con la bevanda a base di soia analizzata con la medesima sperimentazione e agli stessi tempi di invecchiamento.

Tabella 5A.

Mese	A	B	B	C	C	D	D	Fluorescenza (u.a.)/mL prodotto
0	2905	1180	1685	1645	2325	1945	1970	1951 ± 549
2	1870	1590	2695	1870	2260	1945	1730	1994 ± 372
4	3105	995	1960	2085	1290	1835	1715	1855 ± 671
6	1675	1625	2260	1590	2225	2470	2135	1997 ± 359
8	3245	1445	1825	2080	2470	1220	2095	2054 ± 672
10	1325	745	2735	1465	1415	1930	/	1603 ± 672
12	975	/	965	1460	1735	990	1165	1215 ± 317
14	/	/	1295	1110	875	1975	1560	1363 ± 424

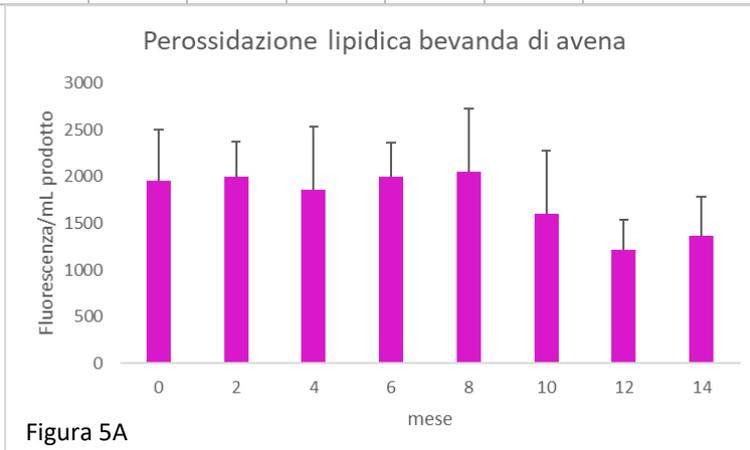
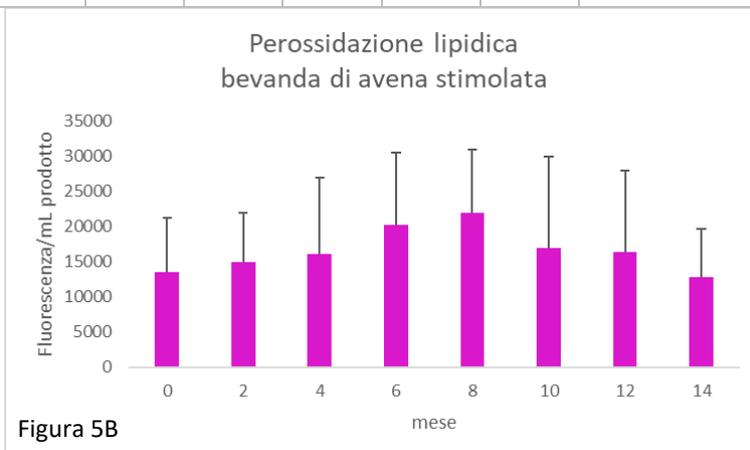


Tabella 5B.

Mese	A	B	B	C	C	D	D	Fluorescenza (u.a.)/mL prodotto
0	11365	6350	13180	30170	13670	11365	8390	13499 ± 7793
2	9150	8565	19395	22715	17180	21925	6000	14990 ± 6930
4	12700	7730	16150	34575	27265	8520	5480	16060 ± 10938
6	9610	13475	17190	40230	24255	23180	13545	20212 ± 10306
8	14870	11795	18430	37560	30025	22690	18480	21979 ± 9010
10	6650	10545	18345	35870	2060	27870	/	16890 ± 13023
12	7540	5075	5155	35820	25045	21120	14815	16367 ± 11618
14	/	5680	7575	12860	9350	23920	17310	12783 ± 6839



La stabilità nella capacità antiossidante si è confermata anche con la valutazione del contenuto di malondialdeide, che stima la reazione di degradazione lipidica. La fluorescenza dei campioni diminuisce alla fine della *shelf life*.

6.5 Studi a livello proteico

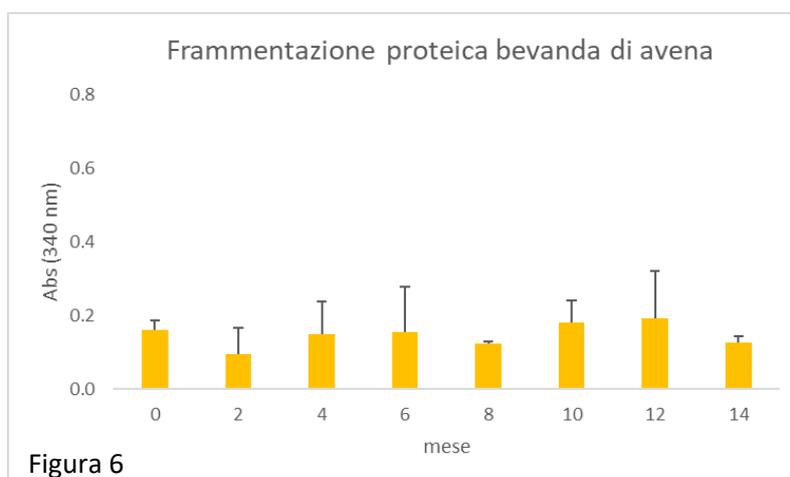
Come studi a livello proteico è stata valutata la frammentazione l'ossidazione proteica nel tempo.

6.5.1 Frammentazione proteica

I dati dell'assorbanza relativi all'analisi della frammentazione proteica (paragrafo 5.5) sono indicati nella Tabella 6 e nella Figura 6.

Tabella 6.

Mese	A	B	C	Assorbanza (340 nm)
0	0.16	0.14	0.19	0.16 ± 0.02
2	0.06	0.04	0.18	0.09 ± 0.07
4	0.24	0.07	0.14	0.15 ± 0.09
6	0.29	0.06	0.12	0.15 ± 0.12
8	0.12	0.12	0.13	0.12 ± 0.00
10	0.25	0.15	0.14	0.18 ± 0.06
12	0.33	0.09	0.16	0.19 ± 0.13
14	/	0.12	0.14	0.13 ± 0.02



Come si può notare la frammentazione proteica della bevanda di avena è risultata molto bassa, soprattutto in confronto di altre matrici come ad esempio la bevanda di soia. Non si osservano cambiamenti notevoli nei valori di assorbanza nel corso di tutte le analisi condotte.

6.5.2 Ossidazione proteica

I valori espressi in nmoli di gruppi carbonilici/mg proteine relativi all'analisi dell'ossidazione proteica (paragrafo 5.6) sono riportati nella Tabella 7 e nella Figura 7 rispettivamente per campioni come tali (A) e per campioni sottoposti a stimolazione chimica indotta in laboratorio (B).

Tabella 7A.

Mese	A	B	C	D	nmoli carbonili/mg proteine
0	362.3	450.2	298.8	834.1	486.4 ± 239.9
2	370.1	277.7	301.4	586.3	383.9 ± 140.5
4	307.8	357.6	284.7	735.3	421.3 ± 211.4
6	304.7	475.9	233.1	742.5	439.1 ± 226.4
8	200.6	535.2	254.4	563.7	388.5 ± 187.5
10	370.9	310.8	221.9	602.3	376.5 ± 162.5
12	359.2	643.1	247.2	434.1	420.9 ± 166.8
14	/	702.6	224.4	270.8	399.3 ± 263.6

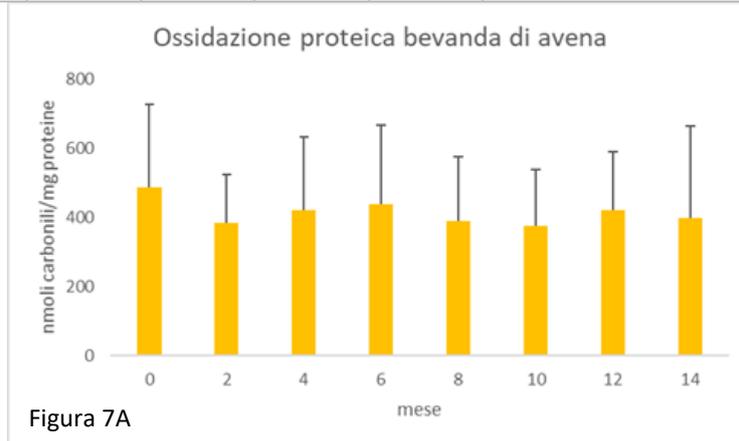


Figura 7A

Tabella 7B.

Mese	A	B	C	D	nmoli carbonili/mg proteine
0	590.4	303.0	713.2	281.8	472.1 ± 213.6
2	470.2	291.5	586.0	359.5	426.8 ± 129.1
4	688.1	484.1	480.9	261.7	478.7 ± 174.1
6	292.9	420.3	365.0	452.7	382.7 ± 70.0
8	680.0	364.4	631.0	191.0	466.6 ± 230.1
10	539.3	334.5	470.7	307.3	413.0 ± 110.4
12	501.3	274.7	462.0	433.1	417.8 ± 99.4
14	/	348.5	534.5	303.1	395.4 ± 122.6

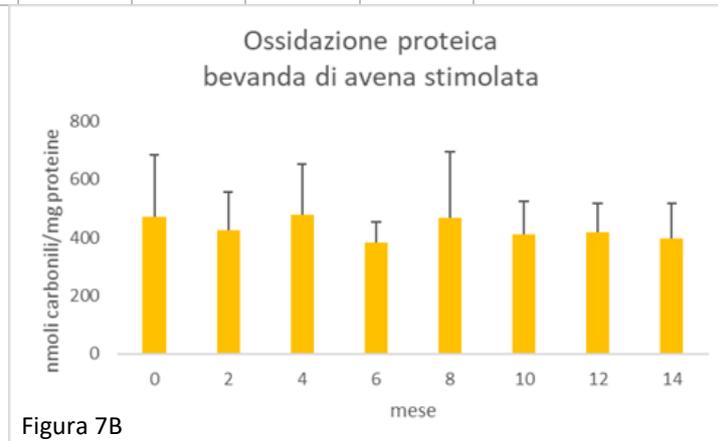


Figura 7B

I valori ottenuti dopo stimolazione indotta sono simili a quelli osservati nei campioni di bevande come tali, indice che il prodotto non ha subito una stimolazione sufficiente per indurre un danno visibile. In entrambi i casi (A e B) non si riscontrano notevoli variazioni nell'ossidazione proteica nel tempo e oltre la data di scadenza. Da notare che le proteine della bevanda a base di avena possono andar incontro ad un maggior processo ossidativo se il paragone viene fatto con la bevanda di soia. Quindi la composizione proteica è determinante per queste analisi.

7 CONCLUSIONI

Da quanto riportato dalle analisi delle bevande di avena si può concludere che:

- La bevanda a base di avena ha mostrato un pH di circa 6.0, stabile durante la *shelf life* e oltre la data di scadenza.
- Il potere antiossidante analizzato attraverso il saggio ABTS si è dimostrato molto stabile nel tempo, tuttavia con il test del DPPH è stata notata una diminuzione a partire dal dodicesimo mese.
- La stabilità dell'attività antiossidante durante la vita a scaffale si è confermata anche attraverso la determinazione del contenuto di fenoli totali.
- La componente lipidica non ha subito cambiamenti di perossidazione nel tempo ma diminuzioni verso la fine della vita a scaffale. L'entità della perossidazione lipidica è estremamente ridotta soprattutto se confrontata con altre matrici (vedi Report sulla bevanda a base di soia).
- Per quanto riguarda lo studio delle proteine le analisi non hanno rivelato variazioni notevoli nella frammentazione proteica, che mantiene valori molto bassi nel corso dello studio condotto.
- Inoltre le proteine non si sono ossidate durante il tempo di analisi e dopo la data di scadenza, in quanto il contenuto di gruppi carbonilici si è rivelato stabile.

8 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI PER LE PRINCIPALI METODOLOGIE

- Chen H, Qiu S, Gan J, Li Z, Nirasawa S, Yin L. New insights into the antioxidant activity and components in crude oat oil and soybean oil. *J Food Sci Technol*. 2016, 53(1):808-15.
- Chu Y. *Oats nutrition and technology*, 2014
- Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, Catignani G L. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66, 1219-1227.
- Citta A, Folda A, Scalcon V, Scutari G, Bindoli A, Bellamio M, Feller E, Rigobello M P. Oxidative changes in lipids, proteins and antioxidants in yogurt during the shelf life. *Food Science & Nutrition*, 2017, 5, 1079-1087.
- Gangopadhyay N, Hossain MB, Rai D K, Brunton N P. A Review of Extraction and Analysis of Bioactives in Oat and Barley and Scope for Use of Novel Food Processing Technologies. *Molecules*, 2015; 20(6):10884-909.
- Georgiou CD, Zisimopoulos D, Argyropoulou V, Kalaitzopoulou E, Salachas G, Grune T. Protein and cell wall polysaccharide carbonyl determination by a neutral pH 2,4-dinitrophenylhydrazine-based photometric assay. *Redox Biol*. 2018, 17:128–142.
- Rasane P Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J Food Sci Technol*. 2015, 52(2):662-75.
- Rawri R K, Bharathi K, Jayaveera K N, Asdaq S M B. In vitro antioxidant activities of avena sativa (oats) alcoholic seed extracts, *International Journal of Pharmaceutical Archive-2(5)*, 2013, 125-128.
- Sethi S, Tyagi S K, Anurag R K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J Food Sci Technol*. 2016, 53(9):3408-3423.
- Sochor J, Rovolova M, Krystofova O, et al. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *Molecules*, 2010, 15(12):8618–8640.
- Tonolo F, Moretto L, Folda A, Scalcon A, Bindoli A, Bellamio M, Feller E, Rigobello M P. Antioxidant Properties of Fermented Soy during Shelf Life. *Plant Foods Hum Nutr*. 2019, doi: 10.1007/s11130-019-00738-6.
- Tonolo F, Moretto L, Ferro S, Folda A, Scalcon V, Sandre M, Fiorese F, Marin O, Bindoli A, Rigobello M P. Insight into antioxidant properties of milk-derived bioactive peptides in vitro and in a cellular model. *J Pept Sci*. 2019, 25(5), doi: 10.1002/psc.3162.
- Tsopmo A, Cooper and Jodayree S. Enzymatic Hydrolysis of Oat Flour Protein Isolates to Enhance Antioxidative Properties. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(4): 206-212, 2010.
- Wong, Peng Leong L, Hoe J, Koh W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 2006, 99(4):775-783.
- Xu B J and Chang S K C. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *J Food Sci*. 2007, 72(2):S159-66.