



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη αντικατάστασης της λιπαρής φάσης τυριού με λιπαρά
εμπλουτισμένα με Βιταμίνη D »

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΦΗ ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ

ΕΙΡΗΝΗ Δ. ΚΑΡΒΟΥΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη αντικατάστασης της λιπαρής φάσης τυριού με λιπαρά εμπλουτισμένα με Βιταμίνη D »

“Study of replacing the fatty cheese phase with vitamin D-enriched fat”

ΕΙΡΗΝΗ Δ. ΚΑΡΒΟΥΝΗ

Τριμελής Επιτροπή

Ε. Τσακαλίδου (Καθηγήτρια ΓΠΑ, Επιβλέπουσα)

Α. Ξενάκης (Ερευνητής Α, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Μέλος)

Ε. Δροσινός (Καθηγητής ΓΠΑ, Μέλος)

*Αφιερωμένη στους γονείς μου και στην πολυαγαπημένη μου θεία,
που πάντα με στηρίζουν*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά το πέρας αυτής της πειραματικής μελέτης, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, Καθηγήτρια Έφη Τσακαλίδου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη καθοδήγηση της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας και για την τόσο σημαντική βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου Βιομηχανικής και Νανοτεχνολογίας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, τόσο ως μέλος της τριμελούς επιτροπής όσο και για το γεγονός ότι μου δόθηκε η ευκαιρία να πραγματοποιήσω στο Εργαστήριο του όλο το πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης και να μάθω νέες μεθόδους. Τον ευχαριστώ θερμά για τις χρήσιμες συμβουλές του, την καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας και τη διαρκή ενθάρρυνση του.

Επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Καθηγητή Ελευθέριο Δροσινό, για τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας μελέτης καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του αλλά και για τις παρατηρήσεις του στο κείμενο.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω προσωπικά τη Δρ. Μαρία Χατζηδάκη, μεταδιδακτορική συνεργάτιδα στο ΕΙΕ. Είναι εκείνη με την οποία σχεδιάσαμε μαζί την πορεία του πειράματος, βρίσκαμε λύσεις στις δυσκολίες που αντιμετώπιζα και με βοήθησε να κατανοώ και προσεγγίζω με ένα πιο αισιόδοξο τρόπο τα διάφορα πεδία της έρευνας. Την ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη της όλη αυτή την περίοδο καθώς μεγάλο μέρος του πειράματος οφείλεται στην καθοδήγησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα μέλη της ομάδας Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας για τη συνεργασία τους και τη βοήθεια που μου προσέφεραν στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τις Υποψήφιες Διδάκτορες Ευγενία Μήτσου, Ιωάννα Θεοχάρη, Σάλβη Δεμισλή και Εύα Βασιλειάδη τόσο στην εκπόνηση των πειραμάτων όσο και στην αντιμετώπιση των δυσκολιών που συνάντησα.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στην εταιρία «ΠΑΓΩΝΗΣ» και προσωπικά στην κ. Νατάσσα Παγώνη για την προμήθεια των πρώτων υλών και την άμεση ανταπόκριση της κάθε φορά που χρειαζόμουν υλικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Την ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία που είχαμε και την ξενάγηση στο τυροκομείο στις Ερυθρές Αττικής.

Τέλος, να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στον σύντροφό μου για την άπλετη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή σε όλο το χρονικό διάστημα του πειράματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας, το ενδιαφέρον του καταναλωτή στρέφεται ολοένα και περισσότερο σε ένα πιο υγιεινό τρόπο ζωής. Η βιομηχανία τροφίμων στην προσπάθεια της να καλύψει την ανάγκη αυτή, αναπτύσσει καινοτόμα προϊόντα που περιέχουν βιοδραστικές ουσίες, τα οποία προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην υγεία μας, τα λεγόμενα λειτουργικά τρόφιμα. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής μελέτης ήταν η δημιουργία ενός λειτουργικού τροφίμου με την ανάπτυξη νανοδιασπορών για τον εγκλωβισμό βιταμίνης D3 σε άπαχο πρόβειο γάλα.

Το πείραμα είχε δύο προσεγγίσεις με την πρώτη να αναφέρεται στην ανάπτυξη νανογαλακτώματος τύπου έλαιο-σε-νερό (O/W), στο οποίο πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση βιταμίνης D3 (χοληκαλσιφερόλη) που είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία όλων των οργανισμών. Οι νανοδιασπορές παρασκευάστηκαν με χρήση εδώδιμων επιφανειοενεργών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Ως επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν τα Tween 40, Tween 60, MILKOPRO 7067 ή μίγματα αυτών και ως ελαιώδης φάση το σογιέλαιο, ηλιέλαιο και ελαιόλαδο. Η παρασκευή και σταθεροποίηση των νανοδιασπορών έγινε με χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δομική μελέτη των νανο-σταγονιδίων στο χρόνο με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS), παρουσία και απουσία της βιοδραστικής ουσίας, δίνοντάς πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος της διεσπαρμένης φάσης (νανοσταγονίδια φυτικών ελαίων) καθώς και την ομοιογένεια και την σταθερότητα του συστήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη νανογαλακτώματος παρουσία βιταμίνης D3 (0,14μg /mL) σε άπαχο πρόβειο γάλα.

Η δεύτερη προσέγγιση, αναφέρεται στη δημιουργία ενός νανογαλακτώματος με το ίδιο το γάλα και την προσθήκη ζωικής κρέμας ως τη λιπαρή φάση του συστήματος με ή χωρίς βιταμίνη D και τη χρήση εδώδιμων επιφανειοενεργών MILKOPRO 7067. Η παρασκευή έγινε με χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης και ο δομικός χαρακτηρισμός και η σταθερότητα στον χρόνο μελετήθηκε με την τεχνική της DLS.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επετεύχθη σχηματισμός (O/W) νανογαλακτωμάτων με ενθυλάκωση βιταμίνης D3 και σταθερότητα μεγέθους σωματιδίων στα συστήματα σε σχέση με το χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, για την ομάδα συστημάτων με τα μίγματα επιφανειοενεργών (1:1) παρατηρήθηκε καλύτερη

σταθερότητα μεγέθους για το σύστημα με το σογιέλαιο και επιφανειοενεργό το Tween 40 στις 15 ημέρες. Για τα συστήματα με μεμονωμένα επιφανειοενεργά, φυτικά έλαια το σογιέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα και εγκλωβισμό Βιταμίνης D, παρατηρήθηκε ότι το σύστημα με ελαιόλαδο και Tween 40 συγκέντρωσης βιταμίνης $5,2 \times 10^{-5} \text{M}$, το μέγεθος των σταγονιδίων παρέμεινε σταθερό για 30 ημέρες. Ενώ, για συγκέντρωση βιταμίνης D $2,1 \times 10^{-5} \text{M}$ τα συστήματα με Tween 40 και σογιέλαιο ή ελαιόλαδο παρέμειναν σταθερά για 50 ημέρες. Ωστόσο, όταν ενσωματώθηκε ποσότητα του νανογαλακτώματος αυτού ενισχυμένο με βιταμίνη D στο πρόβειο άπαχο γάλα παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δύο φάσεων από την 1^η κιόλας ημέρα. Τέλος, για το σύστημα με το ίδιο το άπαχο πρόβειο γάλα και την προσθήκη 1% κρέμας γάλακτος και 5% MILKOPRO παρατηρήθηκε σταθερότητα μεγέθους των νανοσταγονιδίων για 8 ημέρες χωρίς να παρατηρηθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων.

Λέξεις κλειδιά: Άπαχο πρόβειο γάλα, Τυρί, Λειτουργικό τρόφιμο, Νανογαλάκτωμα, Ενθυλάκωση Βιταμίνης D3, Ομογενοποίηση, DLS

ABSTRACT

Nowadays, consumer interest is increasingly turning to a healthier lifestyle. The food industry, in an effort to meet this need, is developing innovative products containing bioactive substances that offer significant health benefits, so-called functional foods. With nanotechnology, nanoemulsions are developed to encapsulate desirable substances, such as vitamin D.

The purpose of this study was to create a functional food with the development of nanoparticles for vitamin D3 encapsulation in lean sheep's milk, with the aim of subsequent cheese-making.

The experiment had two approaches, with the first referring to the development of oil-in-water (O / W) nano-emulsification in which vitamin D3 encapsulation (cholecalciferol) was necessary for the proper functioning of all organisms. Nano-dispersions were prepared using edible surfactants widely used in the food industry. Surfactants Tween 40, Tween 60, MILKOPRO 7067 or mixtures thereof were used and soybean oil, sunflower oil and olive oil as an oil phase. The preparation and stabilization of nanodispersions was performed using a high pressure homogenizer. Subsequently, a dynamic study of the nano-droplets in time with the Dynamic Light Scattering (DLS) technique was carried out in the presence and absence of the bioactive substance, giving information on the size of the dispersed phase (vegetable oil nanoparticles) and the homogeneity and stability of the system. Subsequently, a nanoemulsion was added in the presence of vitamin D3 (0.14 $\mu\text{g} / \text{mL}$) in skim sheep's milk.

The second approach relates to the creation of a milk-based nanoemulsion and the addition of animal cream to the fatty phase of the system with or without vitamin D and the use of edible surfactants MILKOPRO 7067. The preparation was carried out using a high-pressure homogenizer and structural characterization and stability over time was studied with Dynamic Light Scattering (DLS) technique.

The results showed successful formation of (O / W) nanoemulsions with vitamin D3 encapsulation and were evaluated by the maintenance of size distribution for several days. In particular, for the group with surfactant mixtures (1: 1), greater stability of size was observed for the system with soybean oil and Tween 40 at 15 days. It was observed that the system with olive oil and Tween 40, vitamin concentration of $5.2 \times 10^{-5}\text{M}$, the droplet size remained stable for 30 days. Whereas,

vitamin enriched nanoemulsions with concentration 2.1×10^{-5} M, Tween 40 and soybean oil or olive oil remained stable for 50 days. However, when an amount of this vitamin D-enriched nanoemulsion was incorporated into sheep's milk, splitting of the two phases was observed from day 1. Finally, for the sheep's milk system itself and the addition of 1% cream and 5% MILKOPRO nanoparticle size stability was observed for 8 days without the two phases being separated.

Keywords: Skim Sheep's Milk, Cheese, Functional Food, Nanoemulsion, Vitamin D3 encapsulation, Homogenization, DLS

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Πρόβειο γάλα	12
1.1.1 Χημική σύσταση γάλακτος	13
1.1.2 Τεχνολογίες Γάλακτος.....	14
1.1.2.1 Παστερίωση.....	14
1.1.2.2 Ομογενοποίηση	15
1.1.4 Νομοθεσία	18
1.2 Διατροφική αξία	19
1.3 Βιταμίνη D.....	20
1.4 Λειτουργικά Τρόφιμα.....	23
1.5 Νανοτεχνολογία	26
1.5.1 Νανογαλακτώματα	28
1.5.1.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS)	31
1.5.1.2 Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων.....	32
1.6 Σκοπός μελέτης	33
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Υλικά.....	34
2.2 Μέθοδοι.....	35
2.3 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων	35
2.3.1 Ομάδα συστημάτων με Φυτικά έλαια (σογιέλαιο/ ελαιόλαδο), επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween60) και νερό.....	35
2.3.1.1 Ενθυλάκωση Βιταμίνης D	36
2.3.1.1.1 Παρασκευή πυκνού διαλύματος σε φυτικά έλαια	37
2.3.1.2 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων με βιταμίνη D3	37
2.3.2 Ομάδα συστημάτων με Φυτικά έλαια (σογιέλαιο/ ηλιέλαιο/ ελαιόλαδο), μίγμα επιφανειοενεργών (Tween 40/ Tween60 και MILKOPRO 7067) και νερό	39
2.3.3 Ομάδα συστημάτων με άπαχο γάλα, ζωική κρέμα και επιφανειοενεργά.....	40
2.5 Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH)	42
2.6 Δομική μελέτη νανογαλακτωμάτων	42
2.6.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).....	42
2.7 Ενσωμάτωση νανογαλακτώματος σε γάλα	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45

3.1 Ομάδα συστημάτων με φυτικά έλαια, επιφανειοενεργά και νερό.....	45
3.2 Ομάδα συστημάτων με φυτικά έλαια, μίγμα επιφανειοενεργών και νερό	57
3.3 Ομάδα συστημάτων με άπαχο γάλα, ζωική κρέμα και επιφανειοενεργά.....	67
3.3.1. Μετρήσεις με κατ' όγκο προσέγγιση	67
3.3.2 Μετρήσεις με κατά βάρος προσέγγιση.....	67
3.4 Δομική μελέτη νανογαλακτώματος.....	70
3.4.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	71
3.5 Ενσωμάτωση Νανογαλακτώματος στο Γάλα.....	71
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79
6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	79
6.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία.....	85

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πρόβειο γάλα

Η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος προέρχεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από αγελάδες (*Bos taurus*), βουβάλια (*Bubalus bubalis*), αίγες (*Capra hircus*), πρόβατα (*Ovis aries*) και καμήλες (*Camelus dromedarius* και *Camelus bactrianus*). Άλλα γαλακτοπαραγωγά είδη, όπως το άλογο (*Equus caballus*), το γαϊδουράκι (*Equus asinus*), το yak (*Bos grunniens*) και οι τάρανδοι, παράγουν λιγότερο από το 0,1% της παγκόσμιας προμήθειας γάλακτος, αλλά δεν υπάρχουν λεπτομερή και στατιστικά στοιχεία (Alichanidis *et al.*, 2016).

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAOSTAT, 2013), το αγελαδινό γάλα αντιπροσωπεύει το 85% της παγκόσμιας παραγωγής, το γάλα βουβάλου 10,7%, το αίγειο γάλα 2,4%, το πρόβειο γάλα 1,4% και το γάλα καμήλας 0,4%. Η σημασία κάθε τύπου μη αγελαδινού γάλακτος ποικίλλει σημαντικά μεταξύ περιοχών και χωρών. Πάνω από το 90% του βουβαλίσιου γάλακτος παράγεται στην Ινδία και το Πακιστάν και είναι η κύρια πηγή γάλακτος στη Νότια Ασία.

Παρόλο που τα βοοειδή επιβιώνουν σε πολλές περιοχές με διαφορετικό κλίμα, άλλα γαλακτοπαραγωγά είδη καθιστούν δυνατή τη παραγωγή γάλακτος σε αντίξοες συνθήκες που συχνά δεν μπορούν να υποστηρίξουν κανένα άλλο είδος. Τα πρόβατα παράγουν γάλα σε ημιάνυδρες περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο, οι αίγες σε περιοχές με άγονα εδάφη στην Αφρική, τα άλογα στις στέπες της Κεντρικής Ασίας, οι καμήλες στις άγονες εκτάσεις και οι βούβαλοι σε υγρές τροπικές περιοχές (Alichanidis *et al.*, 2016). Τα μικρά μηρυκαστικά (αιγοπρόβατα) μπορούν να προσαρμοστούν τόσο στο θερμό όσο και στο ψυχρό κλίμα.

Η παραγωγή γάλακτος από αίγες είναι η πιο διαδεδομένη στα μηρυκαστικά γαλακτοπαραγωγά ζώα. Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί αίγειου γάλακτος (50% του παγκόσμιου αίγειου γάλακτος) είναι η Ινδία, το Μπαγκλαντές και το Πακιστάν, ενώ περίπου το 55% του πρόβειου γάλακτος παγκοσμίως παράγεται στις Μεσογειακές χώρες και στα Βαλκάνια. Στις χώρες αυτές, εκτρέφονται μικρά μηρυκαστικά δίπλα στις αγελάδες. Το αιγοπρόβειο γάλα χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή

τυριού και ζυμωμένου γάλακτος και προτιμάται έναντι του αγελαδινού γάλακτος. Η απόδοση του γάλακτος και η διάρκεια της γαλακτικής περιόδου των προβάτων δεν είναι συγκρίσιμες με εκείνες των βοοειδών, αλλά η παραγωγή πρόβειου γάλακτος μπορεί να βελτιωθεί με διέγερση της άμελης (π.χ. αρκετές φορές την ημέρα). Η γενετική επιλογή των προβάτων δεν οδήγησε σε σημαντικές βελτιώσεις όσον αφορά την απόδοση γάλακτος και τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Οι κύριες φυλές προβάτων γαλακτοπαραγωγής περιλαμβάνουν τα Awassi, την East Friesian και την Lacaune.

1.1.1 Χημική σύσταση γάλακτος

Δεδομένου ότι οι διατροφικές και φυσιολογικές απαιτήσεις κάθε είδους είναι μοναδικές, υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών στη σύσταση του γάλακτος. Η ποσότητα και η σύσταση του γάλακτος σε οποιαδήποτε φυλή κάθε είδους ποικίλλει, ανάλογα από διάφορους παράγοντες όπως η ατομικότητα, το στάδιο γαλουχίας, η ηλικία, το σωματικό βάρος και ο τοκετός, η σύνθεση και η ποιότητα της τροφής, η εποχή, το περιβάλλον (θερμοκρασία και σχετική υγρασία), το διάστημα μεταξύ άμελης, τη διάρκεια ξηρής περιόδου και κύησης και, φυσικά, ασθένειες, ειδικά μαστίτιδα (Alichanidis *et al.*, 2016).

Η σύνθεση του γάλακτος καθορίζει τη θρεπτική του αξία, την καταλληλότητά του ως πρώτη ύλη για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων και άλλων προϊόντων διατροφής, καθώς και πολλές από τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες αυτών των προϊόντων. Μπορεί να γίνει γενική διάκριση μεταξύ σύνθεσης γάλακτος από μηρυκαστικά και μη μηρυκαστικά. Το γάλα από μηρυκαστικά περιέχει περισσότερα ολικά στερεά και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, λιπαρά και τέφρα (Medhammar *et al.*, 2012, Park *et al.*, 2007, Potocnik *et al.*, 2011, Salimei *et al.*, 2004, Sheng *et al.*, 2008, Simos *et al.*, 1991, Zhao *et al.*, 2015). Αντίθετα, η αναλογία λακτόζης είναι υψηλότερη στο ανθρώπινο γάλα (Ballard & Morrow, 2013). Μεταξύ των μηρυκαστικών, η τέφρα, το λίπος και η πρωτεΐνη είναι υψηλότερα στο πρόβειο γάλα. Το πρόβειο γάλα περιέχει υψηλότερα ολικά στερεά και κύρια θρεπτικά συστατικά από το αίγαιο και αγελαδινό γάλα (Πίνακας 1). Το πρωτόγαλα των προβάτων στην πρώιμη περίοδο μετά τον τοκετό διαθέτει επίσης υψηλότερα ποσοστά σε θρεπτικά συστατικά από το πρωτόγαλα αγελάδας: λίπος 13,0 % και 5,1 %, πρωτεΐνη 11,8 % και 7,1 %, λακτόζη 3,3 % και 3,6 %, μεταλλικά στοιχεία 0,9% και ολικά στερεά 28.9 % και 15,6 %, αντίστοιχα (Anifantakis, 1986).

Πίνακας 1: Μέση σύσταση θρεπτικών ουσιών σε αίγιο, πρόβιο, αγελαδινό και ανθρώπινο γάλα (Park, 2007)

Σύσταση (%)	Αίγιο	Πρόβιο	Αγελαδινό	Ανθρώπινο
Λίπος	3.8	7.9	3.6	4.0
Στερεά-Μη λιπαρά	8.9	12.0	9.0	8.9
Λακτόζη	4.1	4.9	4.7	6.9
Πρωτεΐνη	3.4	6.2	3.2	1.2
Καζεΐνη	2.4	4.2	2.6	0.4
Αλβουμίνη, σφαιρίνη	0.6	1.0	0.6	0.7
Μη πρωτεϊνικό άζωτο	0.4	0.8	0.2	0.5
Τέφρα	0.8	0.9	0.7	0.3
Θερμίδες / 100mL	70	105	69	68

1.1.2 Τεχνολογίες Γάλακτος

1.1.2.1 Παστερίωση

Η παστερίωση ορίζεται ως "η διαδικασία κατά την οποία το γάλα πρέπει να έχει θερμανθεί σε εξοπλισμό που λειτουργεί κανονικά στους 62,8 ° C για 30 λεπτά (Low Temperature Long Time) ή στους 71,7 ° C για 15 δευτερόλεπτα (High Temperature/Short Time παστερίωση) και διατηρείται συνεχώς σε ή πάνω από αυτή τη θερμοκρασία για τον συγκεκριμένο χρόνο" (USFDA, 2002a). Η θερμική διαδικασία έχει σχεδιαστεί για την εξάλειψη πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών από το νωπό γάλα με ελάχιστες χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές αλλαγές στο γάλα. Επί του παρόντος, το νωπό γάλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μόνο σε τυριά μακράς παλαίωσης που έχουν ωριμάσει για περισσότερες από 60 ημέρες πριν από την πώληση τους (USFDA, 2002b).

Το γάλα μπορεί να παστεριωθεί αποτελεσματικά είτε με τις διαδικασίες παστερίωσης σε δεξαμενή είτε με εναλλάκτες θερμότητας κατά τη διαδικασία της υψηλής θερμοκρασίας για σύντομο χρονικό διάστημα (High Temperature/Short Time- HTST). Η οργανοληπτική ανάλυση των γαλακτοκομικών προϊόντων έδειξε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ του παστεριωμένου γάλακτος με HTST και του νωπού γάλακτος (Young, 1986). Η φωσφατάση είναι το ένζυμο του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της διαδικασίας παστερίωσης, επειδή η ευαισθησία της στη θερμότητα είναι ισοδύναμη με την ανθεκτικότητα στη θερμότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *Coxiella burnetii* (Murthy *et al.*, 1992). Το πρόβειο γάλα έχει τρεις φορές μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου φωσφατάση από το αγελαδινό γάλα (Anifantakis, 1986). Ωστόσο, η αλκαλική φωσφατάση στο πρόβειο γάλα είναι πιο ευαίσθητη στη θέρμανση αλλά σε βαθμό που δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της δοκιμής φωσφατάσης για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικής της παστερίωσης (Anifantakis, 1986).

1.1.2.2 Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση του γάλακτος τυπικά πραγματοποιείται για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων λίπους ώστε να επιβραδυνθεί η αποκορύφωση στο γάλα. Με την ομογενοποίηση, τα μικύλια της καζεΐνης προσδένονται στην επιφάνεια των νέων μικρότερων σωματιδίων λίπους έτσι ώστε τα λιποσφαίρια που προκύπτουν να συμπεριφέρονται διαφορετικά από τα μητρικά. Ομογενοποιημένα λιποσφαίρια συσσωματώνονται με την καζεΐνη και δεσμεύονται στο δίκτυο της καζεΐνης κατά την προσθήκη πυτιάς (Lomholt & Qvist, 1999).

Το ομογενοποιημένο γάλα χρησιμοποιείται στη παραγωγή πόσιμου γάλακτος, γιαουρτιού, παγωτών και μερικών τυριών. Το πρόβειο γάλα έχει μέσο μέγεθος λιποσφαιρίων 3,99 μm σε σύγκριση με 4,42 μm του αγελαδινού γάλατος (Mehaia, 1995). Σε ειδικές περιπτώσεις, η κρέμα γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κάνει πιο έντονο το λευκό χρώμα και να ενισχύσει τη δομή σε γαλακτοκομικά προϊόντα υψηλότερης περιεκτικότητας σε λιπαρά (Rauschenberger, 2001). Επειδή η ομογενοποίηση τείνει να αυξάνει την πυκνότητα της πηκτής (gel) και να μειώνει τη συνέρση του ορρού γάλακτος στο πήγμα (Storry *et al.*, 1983), τυπικά δεν χρησιμοποιείται για ημίσκληρα και σκληρά τυριά. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση του «σώματος» και της υφής των τυριών με χαμηλά λιπαρά (Metzger & Mistry, 1994).

Αρκετοί ερευνητές (O'Connor & Fox, 1977, Raynal & Remeuf, 1998, Richardson & Creamer, 1976) έχουν αναφερθεί σε πειραματικές διαδικασίες για την απομάκρυνση του λίπους και την παραγωγή αποβουτυρωμένων προϊόντων από πρόβειο γάλα. Ωστόσο, καμία από αυτές τις μελέτες δεν ανέφερε την αποτελεσματικότητα της αφαίρεσης του λίπους. Ο Rauschenberger (2001) ανέφερε σχετικά με τις συνθήκες επεξεργασίας που είναι απαραίτητες για την παραγωγή αποβουτυρωμένου πρόβειου γάλακτος με περιεκτικότητα λίπους μικρότερη από 0,2 %, δυνάμεις φυγοκέντρωσης πάνω από 1200 x g και χαμηλές θερμοκρασίες για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό του λίπους στο πρόβειο γάλα σε κρέμα γάλακτος και αποβουτυρωμένο γάλα με λιγότερο από 0,2 % λίπος. Το φρέσκο πρόβειο γάλα παρουσίασε καλύτερο διαχωρισμό από το κατεψυγμένο μη επεξεργασμένο πρόβειο γάλα. Αποβουτυρωμένο γάλα με λιγότερο από 0,2 % λιπαρά είναι ιδανικό για την παραγωγή καλής ποιότητας άπαχου πρόβειου γάλακτος.

Η συγκέντρωση ολικών στερεών στο πρόβειο γάλα είναι ιδανική για την παρασκευή τυριών και γιαουρτιού. Στις σύγχρονες κλειστές δεξαμενές και με τον κατάλληλο μηχανολογικό εξοπλισμό, το γάλα με στερεά πάνω από 15-16 % έχει την τάση να έχει περιορισμένη συνένωση ορρού γάλακτος και υψηλότερη υγρασία στο τελικό τυρί. Ο υψηλότερος διατηρούμενος ορρός γάλακτος στο τυρί μπορεί να οδηγήσει σε όξινη και πικρή γεύση στο τελικό τυρί. Παραδοσιακά, το γάλα συμπυκνώνεται σε εξατμιστήρες κενού σε τελική συγκέντρωση ολικών στερεών 30-50 %. Η εξάτμιση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες γύρω στους 40 °C για να ελαχιστοποιηθεί η μετουσίωση πρωτεϊνών και βιταμινών λόγω θερμότητας (Bylund, 1995).

Για την εποχιακή αποθήκευση του κατεψυγμένου συμπυκνωμένου πρόβειου γάλακτος για τυροκομία, οι Voutsinas *et al.* (1995) συνιστούν τη χρήση της υπερδιήθησης (Ultra Filtration, UF). Με την UF, η πρωτεΐνη και το λίπος διατηρούνται με τη μεμβράνη και η λακτόζη, τα άλατα και το νερό διέρχονται διαμέσου της μεμβράνης στο διήθημα. Στην τυροκομία, η πρωτεΐνη και το λίπος βρίσκονται στο τυρόπηγμα και στο τυρί, ενώ η λακτόζη, τα άλατα και το νερό γενικά εξέρχονται στον ορρό του γάλακτος. Κατά συνέπεια, συμπυκνώνοντας το γάλα με UF, η απόδοση του τυριού δεν θα επηρεαστεί και δεν θα χρειαστεί να ψυχθεί. Με την UF, οι Voutsinas *et al.*, ήταν σε θέση να συμπυκνώσουν το πρόβειο γάλα σε ποσοστό μέχρι 26,5 % των συνολικών στερεών. Τα συμπυκνώματα UF έδειξαν σταθερότητα

πρωτεΐνης σε διάστημα έξι μηνών στην κατάψυξη στους -20°C . Η διαδικασία UF συγκεντρώνει τα βακτήρια στο νωπό γάλα, μαζί με την πρωτεΐνη και το λίπος. Ωστόσο, ο αριθμός των βακτηρίων και των κολοβακτηριδίων μειώθηκε κατά τη αποθήκευση στην κατάψυξη.

1.1.3 Τυρί

Παραδοσιακά τυριά από πρόβειο και αίγιο γάλα παράγονται κυρίως στα Βαλκάνια και στις χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Η περίοδος γαλακτοπαραγωγής αυτών των δύο μικρών μηρυκαστικών διαρκεί περίπου 7 μήνες. Λόγω της εποχικότητας της γαλακτοκομικής παραγωγής και της μεγάλης ζήτησης τυριού, σήμερα παράγονται και ορισμένα παραδοσιακά τυριά από αγελαδινό γάλα. Ωστόσο, οι οργανοληπτικές και άλλες ιδιότητες τους είναι διαφορετικές. Συγκεκριμένα, το χρώμα των τυριών άλμης που παραδοσιακά παρασκευάζονται από μικρά μηρυκαστικά ή βουβάλια είναι καθαρό λευκό, επειδή το γάλα αυτών των ειδών είναι επίσης λευκό λόγω της μετατροπής των καροτενοειδών σε βιταμίνη Α. Αυτό δεν συμβαίνει με το αγελαδινό γάλα, όπου μεταφέρονται τα καροτενοειδή από τη ζωοτροφή. Έτσι, το τυρί που παρασκευάζεται από αγελαδινό γάλα είναι υπόλευκο έως κιτρινωπό. Επειδή οι καταναλωτές αναμένουν λευκό τυρί, σε ορισμένες χώρες (και όταν επιτρέπεται) χρησιμοποιούνται "αποχρωματιστές" (χλωροφύλλη, διοξείδιο του τιτανίου) ή άλλες επεξεργασίες για να αποκρύψουν ή να εξαλείψουν το κιτρινωπό χρώμα (Alichanidis *et al.*, 2016).

Παραδοσιακά, η μεγαλύτερη αγορά πρόβειου γάλακτος σε ολόκληρο τον κόσμο αναφέρεται στην παραγωγή τυριού. Οι σημαντικές ποικιλίες τυριού που παράγονται στο κόσμο από πρόβειο γάλα περιλαμβάνουν το Pecorino Romano, το Manchego, το Ροκφόρ και την Φέτα. Πολλά από τα παραδοσιακά ευρωπαϊκά τυριά από πρόβειο γάλα υπόκεινται στο πλαίσιο της Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) και προστατεύονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Freitas & Malcata, 2000). Τα τυριά αυτά παράγονται σε συγκεκριμένες περιοχές, από συγκεκριμένες φυλές προβάτων και με καθορισμένες διαδικασίες παραγωγής. Ορισμένα τυριά πρόβειου γάλακτος μπορούν να παρασκευαστούν από νωπό γάλα, ενώ άλλα παράγονται από θερμισμένο ή παστεριωμένο γάλα.

Επειδή το πρόβειο γάλα περιέχει περίπου το διπλάσιο ποσοστό στερεών από το αγελαδινό και αίγιο γάλα, το μεγαλύτερο μέρος του χρησιμοποιείται για την

παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, για παράδειγμα, γιαούρτι και τυρί (Alichanidis *et al.*, 2016). Το πρόβειο γάλα έχει υψηλότερα ποσοστά σε λίπος, πρωτεΐνες και ολικά στερεά από το αγελαδινό ή αίγειο γάλα. Επειδή στο τυρόπηγμα περιέχεται κυρίως το λίπος και η καζεΐνη από το γάλα, το πρόβειο γάλα αποδίδει περισσότερο τυρί ανά μονάδα γάλακτος από το αγελαδινό και αίγειο γάλα (Anifantakis, 1986). Είναι επομένως σαφές ότι η απόδοση του τυριού σχετίζεται με την περιεκτικότητα του γάλακτος σε καζεΐνη και λίπος (Van Boekel, 1994). Η πλειονότητα της καζεΐνης και των λιπαρών του γάλακτος καθώς και το περισσότερο από το μισό του ασβεστίου διατηρούνται στο τυρόπηγμα και στο τελικό τυρί. Όλα τα καζεϊνικά κλάσματα του αγελαδινού γάλακτος υπάρχουν στο πρόβειο γάλα. Η δομή των μικκυλίων της καζεΐνης είναι παρόμοια στο αγελαδινό, αίγειο και πρόβειο γάλα. Ωστόσο, οι καζεΐνες στο πρόβειο γάλα είναι πλουσιότερες σε ασβέστιο από ότι η καζεΐνη του αγελαδινού (Alichanidis & Polychroniadou, 1996). Επειδή η περιεκτικότητα σε λιπαρά και η καζεΐνη είναι τα κρίσιμα συστατικά στο γάλα που διαμορφώνουν τη δομή του τυροπήγματος, η πήξη του γάλακτος θα επηρεάσει στην τελική παραγωγή και απόδοση του τυριού. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών του ορρού του γάλακτος, η λακτόζη και το νερό διαχωρίζονται με τη μορφή ορρού γάλακτος. Επειδή η υγρασία του τυριού είναι στην πραγματικότητα ο ορρός του γάλακτος, μικρές ποσότητες πρωτεϊνών ορρού γάλακτος και λακτόζης κατακρατούνται στο τελικό τυρί, ανάλογες με την περιεκτικότητα σε υγρασία. Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του πρόβειου γάλακτος και την αντίστοιχη απόδοση σε τυρί είναι: η φυλή των προβάτων, η εποχή ή γαλουχία, το σύστημα διαχείρισης, η διατροφή, η γενετική, η ποιότητα και αποθήκευση του γάλακτος (Wendorff, 2002).

1.1.4 Νομοθεσία

Η νομοθεσία για τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιλαμβάνεται στον κανονισμό της Επιτροπής (EC) No 2073/2005 για τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα (Ευρωπαϊκή Ένωση, 2005) και οι μέθοδοι ανάλυσης και αξιολόγησης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων περιλαμβάνονται επίσης στην ευρωπαϊκή νομοθεσία (EC No 273/2008, Ευρωπαϊκή Ένωση, 2008).

Οι ορισμοί που ομαδοποιούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα, δηλαδή το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση, το τυρί, τα διάφορα είδη γάλακτος, τη κρέμα, το βούτυρο και τις σκόνες, εμφανίζονται στον Codex Alimentarius (2013). Επιπλέον, ο Codex

Alimentarius περιλαμβάνει ατομικά πρότυπα για ορισμένες ποικιλίες τυριών που παράγονται όχι μόνο από αγελαδινό γάλα, αλλά και από γάλα βουβάλου (Harvati, Samsø, Emmental, Tilsiter, Saint-Paulin, Provolone, Cottage, Coulommiers, Camembert, Brie). Επιπλέον, υπάρχουν λεπτομερείς εθνικές νομοθεσίες και πρότυπα για τον τομέα των μη αγελαδινού γάλακτος (Alichanidis *et al.*, 2016).

1.2 Διατροφική αξία

Σήμερα το γάλα θεωρείται ως ένα πλήρες τρόφιμο και είναι ένα βασικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής τόσο για τα παιδιά όσο και για τους ενήλικες. Η μέση κατά κεφαλή κατανάλωση γάλακτος εκτιμάται σε 84,9 kg / έτος, αν και η κατανάλωση γάλακτος διαφέρει μεταξύ των αναπτυγμένων και των αναπτυσσόμενων περιοχών. Η κατανάλωση γάλακτος ανά κάτοικο στις αναπτυγμένες περιοχές υπολογίζεται στα 213,7 kg / έτος ενώ στις αναπτυσσόμενες περιοχές στα 55,2 kg / έτος (Gerosa and Skoet, 2013).

Το πρόβειο γάλα είναι μια εξαιρετική πηγή θρεπτικών ενώσεων για τον άνθρωπο και υπερέχει από το αγελαδινό γάλα στην πρόσληψη και των 10 απαραίτητων αμινοξέων. Δύο ποτήρια πρόβειου γάλακτος (500 g) θα παρείχαν τις καθημερινές διατροφικές απαιτήσεις των οκτώ από τα 10 απαραίτητα αμινοξέα, καθώς και τις ανάγκες σε ασβέστιο, φώσφορο και ριβοφλαβίνη (B2). Εκτός από το φυλλικό οξύ (B9), όλα τα επίπεδα βιταμινών είναι υψηλότερα στο πρόβειο από ότι στο αγελαδινό γάλα, όπως και τα περισσότερα ιχνοστοιχεία (Haenlein & Wendorff, 2006).

Το πρόβειο γάλα περιέχει υψηλότερα επίπεδα ολικών στερεών και κύρια θρεπτικά συστατικά από το αίγιο και αγελαδινό γάλα (Jooyandeh & Aberoumand, 2010). Έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος, ιξώδες, δείκτη διάθλασης, τιτλοδοτούμενη οξύτητα και χαμηλότερο σημείο πήξης από το αγελαδινό γάλα (Cosenza *et al.*, 2003). Το πρόβειο γάλα χαρακτηρίζεται ως ένα πολύ υψηλής ενέργειας γάλα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος, ασβέστιο, φώσφορο και μαγνήσιο από το αγελαδινό γάλα καθώς και από μικρότερα λιποσφαίρια από το αγελαδινό γάλα.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια, το πρόβειο και αίγιο γάλα είναι πλούσια σε κυτιδυλο-5'-μονοφωσφορικό (CMP), ουριδυλο-5'-μονοφωσφορικό (UMP) και αδενοσυλο-5'-μονοφωσφορικό (AMP). (Michaelidou, 2008, Raynal-Ljutovac *et al.* 2008). Το πρόβειο γάλα περιέχει 0,8-1,0 g τέφρας / 100 g. (Claeys *et*

al., 2014). Το γάλα όλων των γαλακτοπαραγωγών ειδών περιέχει υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου (Ca), με παρόμοια επίπεδα στο αγελαδινό, αίγιο, γάλα καμήλας και yak. Το πρόβειο γάλα και αυτό από βουβάλια περιέχει υψηλότερα επίπεδα Ca ενώ το γάλα γαϊδούρας και φοράδας περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα Ca από το αγελαδινό γάλα. Όλοι οι τύποι γάλακτος αποτελούν καλές πηγές Ca και η κατανάλωση 250 mL μπορεί να καλύψει τις απαιτήσεις για Ca για τις πιο ευάλωτες ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των ηλικιωμένων (άνω των 65 ετών), των οποίων η απαίτηση για ασβέστιο (Ca) είναι 1300 mg / ημέρα (FAO/WHO, 2004).

Όσον αφορά τις βιταμίνες, το πρόβειο γάλα έχει υψηλότερα ποσοστά συγκέντρωσης βιταμίνης A από το αγελαδινό γάλα. Η περιεκτικότητα του σε βιταμίνες είναι κατά κύριο λόγο υψηλότερη από ότι στο αγελαδινό και κατσικίσιο γάλα, εκτός από το καροτένιο. Η περιεκτικότητα σε υδατοδιαλυτές βιταμίνες του πρόβειου γάλακτος είναι γενικά σε υψηλότερα επίπεδα απ' ότι στο ανθρώπινο γάλα. Ωστόσο, με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα, το γάλα όλων των ειδών είναι μια φτωχή πηγή βιταμίνης D και τα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με τις βιταμίνες στο πρόβειο γάλα είναι ελλιπή (Jooyandeh & Aberoumand, 2010).

1.3 Βιταμίνη D

Οι βιταμίνες είναι σύνθετες οργανικές ενώσεις που χρειάζονται σε πολύ μικρές ποσότητες για πολλές από τις διεργασίες που διεξάγονται στο ανθρώπινο σώμα. Συνήθως απαιτούνται μόνο μερικά χιλιοστόγραμμα (mg) ή μικρογραμμάρια (μg) ανά ημέρα αλλά αυτές οι ποσότητες είναι απαραίτητες για την υγεία του ανθρώπου. Δεδομένου ότι οι περισσότερες βιταμίνες δεν μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό, πρέπει να παρέχονται από τη διατροφή. Οι βιταμίνες έχουν διάφορες λειτουργίες στο σώμα, μερικές είναι συν-παράγοντες ενζύμων, μερικές είναι αντιοξειδωτικές (εμποδίζουν το οξυγόνο να επηρεάσει αρνητικά το σώμα) και μια (βιταμίνη D) είναι προ-ορμόνη. Στην περίπτωση που οι ποσότητες βιταμινών στο σώμα είναι ανεπαρκείς λόγω κακής διατροφής ή κάποιου ιατρικού προβλήματος (π.χ. μη απορρόφηση), εμφανίζονται συμπτώματα που τελικά οδηγούν σε ασθένειες ανεπάρκειας (Arvanitoyannis & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2005).

Οι βιταμίνες είναι χημικώς ετερογενείς και ταξινομούνται ανάλογα με τη διαλυτότητα τους ως λιποδιαλυτές ή υδατοδιαλυτές. Οι βιταμίνες A, D, E και K

ανήκουν στην πρώτη ομάδα, ενώ οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνουν το σύμπλοκο Β ενώ και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (Alichanidis *et al.*, 2016).

Η βιταμίνη D είναι μία λιποδιαλυτή στεροειδής προ-ορμόνη που αποτελείται από συζευγμένα τριένια, ένα σύμπλεγμα ισομερών και μεταβολιτών, από τα οποία τα σπουδαιότερα είναι η D3 (χοληκαλσιφερόλη) και η D2 (εργοκαλσιφερόλη), που εμφανίζουν βιολογική δράση. Κύρια πηγή βιταμίνης D για τον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί η ακτινοβολία UVB που παράγεται από τον ήλιο και βοηθάει στην ενδογενή παραγωγή της. Η επαφή του δέρματος με ακτινοβολία UVB, επάγει την φωτόλυση της 7-δεϋδροχοληστερόλης προς την παραγωγή προβιταμίνης D3, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε βιταμίνη D3 με τη βοήθεια της θερμοκρασίας του δέρματος και ακολούθως υπόκειται σε 2 συνεχόμενες υδροξυλιώσεις. Επομένως, η βιταμίνη D3 παράγεται ενδογενώς και εφόσον υπάρχει καθημερινή έκθεση στον ήλιο. Είναι πιο σταθερή από την D2 πιθανώς λόγω της δομής της (η D2 έχει έναν επιπλέον διπλό δεσμό) και εμφανίζει τριπλάσια δραστικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό (Armas & Hollis, 2004), γι αυτό και προτιμάται για τον εμπλουτισμό των τροφίμων.

Η βιταμίνη D είναι αδιάλυτη στο νερό και διαλυτή στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, υδρογονάνθρακες, αλκοόλες και έλαια. Παρουσιάζει ευαισθησία όταν εκτεθεί στο φως, το οξυγόνο, σε υψηλές θερμοκρασίες (100°C) και σε όξινο περιβάλλον. Ισομερειώνεται προς άλλες αδρανείς δομές π.χ. με θέρμανση μετατρέπεται στην πρόδρομη ένωσή της, την προβιταμίνη D3. Απώλεια της ενεργής δομής της βιταμίνης λαμβάνει χώρα κατά την αποθήκευση των τροφίμων και μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με θερμοκρασίες ψύξης και έκθεση σε φως (Norman, 2003).

Πίνακας 2. Φυσικές ιδιότητες εργοκαλσιφερόλης D2 και χοληκαλσιφερόλης D3 (Norman, 2003)

	Χοληκαλσιφερόλη D3	Εργοκαλσιφερόλης D2
Μοριακό βάρος	384.62	396.63
Συντακτικός τύπος	$C_{27}H_{44}O$	$C_{28}H_{44}O$
Σημείο Τήξης (°C)	84-85	115-118
λ_{max} (nm)	264.5	264.5

Η ημερήσια συνιστώμενη δόση βιταμίνης D έχει αναφερθεί στα 10μg για υγιείς ενήλικες (Norman, 2003). Έλλειψη βιταμίνης D εμφανίζεται λόγω της ελλιπούς έκθεσης στον ήλιο ή περιορισμένης πρόσληψης από την διατροφή, κυρίως στα παιδιά και στους ηλικιωμένους, μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας, περιορισμένου μεταβολισμού της D3 στο συκώτι ή της 1,25-διυδροξυ-βιταμίνης D3 στα νεφρά. Επίσης, μειωμένη πρόσληψη της βιταμίνης D οφείλεται και στην υποβάθμισή της κατά την αποθήκευση του τροφίμου, λόγω της ευαισθησίας της στις συνθήκες όπου αυτό εκτίθεται. Ωστόσο, πολύ λίγα τρόφιμα περιέχουν φυσικά βιταμίνη D, όπως τα λιπαρά ψάρια (σολομός, σαρδέλες κ.α.), μερικά έλαια ψαριών (μουρουνέλαιο), οι κρόκοι των αυγών και τα μανιτάρια. Για το λόγο αυτό, έχουν εμπλουτισθεί διάφορα τρόφιμα με βιταμίνη D, όπως είναι το τυρί, το γάλα, οι μαργαρίνες, παιδικές τροφές κ.α.

Ασθένειες που συνδέονται με την έλλειψη της στον άνθρωπο είναι η οστεοπόρωση, οι καρδιακές παθήσεις, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος του Crohn, η υπέρταση, η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος κ.α. (Mahmoodania *et al.*, 2017, Holick, 2006, Holick & Chen, 2008).

Το γάλα των μικρών μηρυκαστικών καθώς και το γάλα βουβάλου περιέχει περισσότερη βιταμίνη A από το αγελαδινό γάλα ως συνέπεια της αποτελεσματικής μετατροπής των καροτενοειδών σε βιταμίνη A. Το πρόβειο γάλα είναι πλουσιότερο στις περισσότερες βιταμίνες από το γάλα άλλων μηρυκαστικών (ιδιαίτερα αγελάδων) ή ανθρώπου (Abd El-Salam και El-Shibiny, 2011, Park *et al.*, 2007). Το γάλα καμήλας έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C (Farah *et al.*, 1992). Η περιεκτικότητα σε βιταμίνες γάλακτος αλόγου είναι κατά μέσον όρο χαμηλότερη από εκείνη του γάλακτος μηρυκαστικών, με εξαίρεση τη βιταμίνη C στο γάλα αλόγου (Csapó *et al.*, 1995, Doreau and Martin-Rosset, 2002, Mittaine, 1962, Uniacke-Lowe, 2011). Οι υψηλότερες ποσότητες βιταμίνης D στο γάλα yak σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα σχετίζονται με το περιβάλλον βόσκησης, επειδή τα yaks που ζουν στο Θιβητιανό οροπέδιο εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία για μεγαλύτερες περιόδους (Ma *et al.*, 2013).

Πίνακας 3. Περιεκτικότητα σε βιταμίνες (μg / 100 g) γάλακτος από διαφορετικά θηλαστικά (κατά προσέγγιση συγκέντρωση και εύρος) (Alichanidis *et al.*, 2016).

	Αγελαδινό	Αίγιο	Πρόβειο	Καμήλας	Ανθρώπινο

Βιταμίνη Α	39 29–52	51 25–84	63 40–84	47 8–97	56 30–70
Βιταμίνη Β₁₂	0.4 0.2–0.9	0.16 0.06–1	0.7 0.6–0.7	1.6 0.1–8.5	0.07 0.01–0.10
Βιταμίνη C (mg/100g)	1.0 0–2	1.5 0.9–4.2	4.4 4.1–5	8.6 2.4–34	4.9 3.5–10
Βιταμίνη D	0.18 0.03–1.0	0.07 0.06–0.1	0.18	0.9 0.07–1.7	0.04 0.002– 0.06
Βιταμίνη E	122 70–299	58 30–120	110–120	89 18–150	360 80–800

1.4 Λειτουργικά Τρόφιμα

Η επιστήμη των λειτουργικών τροφίμων είναι η σύγκλιση δύο σημαντικών πεδίων στη ζωή μας - της διατροφής και της υγείας. Η σχέση μεταξύ τροφίμων και υγείας αναγνωρίζεται ως το θεμέλιο της προληπτικής διατροφής (Henry, 2010).

Τα λειτουργικά τρόφιμα έχουν γενικά οριστεί ως «τρόφιμα παρόμοια σε εμφάνιση με τα συμβατικά τρόφιμα που καταναλώνονται ως μέρος μιας κανονικής διατροφής και έχει αποδειχτεί να παρέχουν φυσιολογικά οφέλη και / ή να μειώνουν τον κίνδυνο χρόνιων ασθενειών πέρα από τις βασικές διατροφικές λειτουργίες» (Clydesdale, 1997).

Τα λειτουργικά τρόφιμα παρέχουν συγκεκριμένα φυσιολογικά οφέλη που τα διακρίνουν από τα συμβατικά τρόφιμα. Η λειτουργικότητα των λειτουργικών τροφίμων προέρχεται από βιοενεργά συστατικά και εξαρτάται από διάφορους τεχνολογικούς παράγοντες. Τα βιοενεργά συστατικά στα λειτουργικά τρόφιμα μπορούν π.χ. να βοηθήσουν στην πρόληψη (χρόνιων) ασθενειών ή να βελτιώσουν την απόδοση και την ευημερία του ατόμου πέραν του βασικού ρόλου τους στη διατροφική λειτουργία. Ως εκ τούτου, τα βιοδραστικά συστατικά μπορούν να θεωρηθούν συστατικά της διατροφής μας που ενισχύουν την υγεία. Η βιοδραστικότητα αναφέρεται στην εφαρμογή τροφικών ουσιών ή βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα, όπως πρεβιοτικά, προβιοτικά, φλαβονοειδή, φυτοστερόλες, φυτοστανόλες, βιοδραστικά πεπτίδια, βιοδραστικούς υδατάνθρακες κ.α. (Arvanitoyannis & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2005).

Ο όρος «λειτουργικά τρόφιμα» θεωρείται από πολλούς ένας όρος μάρκετινγκ (Henry, 2010) και δεν υπάρχει επίσημος ορισμός που να αναγνωρίζεται παγκοσμίως από τα ρυθμιστικά όργανα (International Life Sciences Institute, 2012). Όλα τα τρόφιμα είναι στην ουσία λειτουργικά, δεδομένου ότι παρέχουν ενέργεια και θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για τη διατήρηση της ζωής (Institute of Food Technologists, 2005). Ωστόσο, χρησιμοποιούνται διάφοροι ορισμοί για τα λειτουργικά τρόφιμα.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2012) ορίζει ως «ένα τρόφιμο που επηρεάζει επωφελώς μία ή περισσότερες στοχευόμενες λειτουργίες του σώματος πέρα από τις επαρκείς θρεπτικές επιδράσεις, με τρόπο που να είναι σχετικός είτε με τη βελτίωση της κατάστασης της υγείας και της ευημερίας ή / και τη μείωση του κινδύνου ασθένειας. Είναι μέρος ενός φυσιολογικού τρόπου διατροφής. Δεν είναι χάπι, κάψουλα ή οποιαδήποτε μορφή συμπληρώματος διατροφής».

Σύμφωνα με το International Food Information Council (2011) δίνεται ο ορισμός «τρόφιμα ή διαιτητικά συστατικά που μπορούν να προσφέρουν κάποιο όφελος στην υγεία πέρα από τη βασική διατροφή και μπορούν να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο στη μείωση ή στην ελαχιστοποίηση του κινδύνου ορισμένων ασθενειών και άλλων συνθηκών υγείας».

Ο Οργανισμός Υγείας του Καναδά (2012) αναφέρει ότι «ένα λειτουργικό τρόφιμο είναι ή μπορεί να είναι παρόμοιο σε εμφάνιση με ένα συμβατικό τρόφιμο, που καταναλώνεται ως μέρος μιας συνήθους διατροφής και αποδεικνύεται ότι έχει φυσιολογικά οφέλη και / ή μειώνει τον κίνδυνο χρόνιων ασθενειών πέρα από τις βασικές διατροφικές λειτουργίες».

Το Ιαπωνικό Υπουργείο Υγείας, Εργασίας και Πρόνοιας επισημαίνει ότι «το FOSHU (Food for Specified Health Uses) αναφέρεται σε τρόφιμα που περιέχουν συστατικά με λειτουργίες για την υγεία και έχουν επίσημα εγκριθεί ώστε να δέχονται τον ισχυρισμό των φυσιολογικών επιδράσεων στο ανθρώπινο σώμα. Το FOSHU προορίζεται να καταναλωθεί για τη διατήρηση της υγείας ώστε να χρησιμοποιείται από άτομα που επιθυμούν να ελέγχουν την υγεία τους, συμπεριλαμβανομένης της αρτηριακής πίεσης ή της χοληστερόλης στο αίμα».

Σύμφωνα με το Κέντρο Λειτουργικών Τροφίμων (Functional Food Center, 2015) ένας σύγχρονος ορισμός που ταξινομεί ένα λειτουργικό τρόφιμο έχει ως εξής: «φυσικά ή μεταποιημένα τρόφιμα που περιέχουν γνωστές ή άγνωστες βιολογικά δραστικές ενώσεις, οι οποίες σε καθορισμένες και αποτελεσματικές μη τοξικές ποσότητες παρέχουν κλινικά αποδεδειγμένο και τεκμηριωμένο όφελος για την υγεία, την πρόληψη, τη διαχείριση ή τη θεραπεία μιας χρόνιας ασθένειας» (Martirosyan & Singharaj, 2016, Martirosyan, & Singh, 2015).

Ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης ανάπτυξης της αγοράς, υπάρχει ένα μεγάλο φάσμα λειτουργικών τροφίμων που μπορεί να περιλαμβάνει: δημητριακά και παιδικές τροφές, αρτοσκευάσματα, γαλακτοκομικά προϊόντα, ειδικά γιαούρτια και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, προϊόντα κρέατος, ζωοτροφές κ.α. Αυτά τα λειτουργικά τρόφιμα προσφέρουν ποικίλα οφέλη και δρουν με διαφορετικούς τρόπους. Ένας τρόπος κατηγοριοποίησης του τρόπου λειτουργίας τους είναι ανάλογα τις βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, τη μείωση της χοληστερόλης, τις διαιτητικές ίνες, τα προβιοτικά, πρεβιοτικά και συνβιοτικά, τα αντιοξειδωτικά κ.α.

Παραδείγματα προϊόντων εμπλουτισμένων με βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, όπως ασβέστιο και φολικό οξύ, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως θρεπτικά συστατικά και αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Δεδομένης της επικράτησης της οστεοπόρωσης μεταξύ του αυξανόμενου ποσοστού ηλικιωμένων ατόμων στις ανεπτυγμένες χώρες, η βελτίωση της πρόσληψης ασβεστίου θεωρήθηκε ιδιαίτερα σημαντική σε αυτόν τον τομέα της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων. Η έρευνα έχει επικεντρωθεί όχι μόνο σε τρόπους αύξησης της πρόσληψης ασβεστίου αλλά και στην απορρόφηση αυτού. Άλλο παράδειγμα αφορά στην κατανάλωση διαιτητικών ινών που έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο ορισμένων μορφών καρκίνου, όπως η κατανάλωση πίτυρου σίτου που έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου. Στα προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες περιλαμβάνονται τα ζυμαρικά ολικής αλέσεως που έχουν τριπλάσιες ποσότητες ινών έναντι των κανονικών ζυμαρικών (Roberfroid, 2000).

Παρά την αυξημένη διείσδυση των λειτουργικών τροφίμων στην αγορά, ο όρος λειτουργικά τρόφιμα δεν έχει νομική σημασία στις Ηνωμένες Πολιτείες. Είναι επί του παρόντος ένας όρος μάρκετινγκ, παρά ένα ρυθμιστικό ιδίωμα. Έτσι, με μια συνεχώς διευρυνόμενη αγορά σε συνδυασμό με την έλλειψη ρυθμιστικής ορολογίας για τα λειτουργικά τρόφιμα, υπάρχουν σημαντικά ζητήματα για τους εγγεγραμμένους διαιτολόγους να μεταφέρουν αξιόπιστες πληροφορίες στους καταναλωτές και στους υπεύθυνους χάραξης διατροφικής πολιτικής, για να δραστηριοποιηθούν ενεργά στην έρευνα και την ανάπτυξη των λειτουργικών τροφίμων (Crowe & Francis, 2013).

1.5 Νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία, ορίζεται κυρίως ως ο κλάδος της επιστήμης που ασχολείται με την ανάπτυξη, μελέτη και χρήση λειτουργικών δομών που περιλαμβάνουν σωματίδια στη νανοκλίμακα. Το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη βιβλιογραφική αναφορά (National Nanotechnology Initiative) (Roco, 2007). Η ανάπτυξή της επέφερε σημαντικές εξελίξεις σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας όπως τα φάρμακα, τα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα αγροχημικά.

Οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στα τρόφιμα και τα γεωργικά συστήματα αναπτύσσονται πολύ γρήγορα. Μια σημαντική εφαρμογή της στα τρόφιμα και τη διατροφή είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων λειτουργικών συστατικών με βελτιωμένη υδατοδιαλυτότητα, θερμική σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα (Huang *et al.*, 2010).

Σύμφωνα με τον Aguilera (2000), η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη βιομηχανία τροφίμων μπορεί να επιφέρει διάφορα πλεονεκτήματα και ευκαιρίες, όπως η ανάπτυξη υποσχόμενων νανο-διαδικασιών, φιλικών προς το περιβάλλον ώστε να παράγονται προϊόντα με επιθυμητή υφή και γεύση, τρόφιμα και ποτά με χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες, με στόχο ένα πιο υγιεινό τρόπο ζωής. Επίσης, επισήμανε ότι υπάρχουν ακόμη ευκαιρίες που μπορούν να επιτευχθούν με προσεκτική μελέτη κατά τη δημιουργία των συστατικών, στην απορρόφηση και κατάποση των τροφίμων.

Με γνώμονα την αυξανόμενη καταναλωτική ζήτηση για υγιεινά προϊόντα διατροφής, οι ερευνητές εφαρμόζουν εργαλεία για την αντιμετώπιση των ζητημάτων που σχετίζονται με τον τομέα τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα για να μελετηθούν οι ιδιότητες προαγωγής της υγείας των

διαφόρων ουσιών και να αναπτυχθούν νέα συστήματα και μέθοδοι ενθυλάκωσης, προσπαθώντας να ενσωματώσουν λειτουργικά συστατικά στα τρόφιμα.

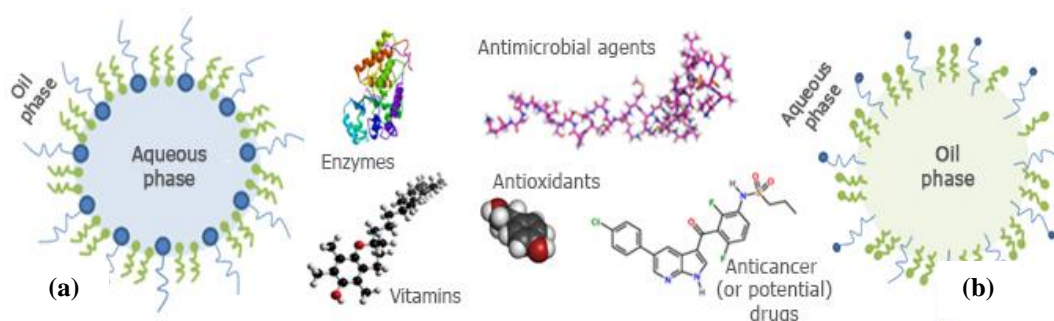
Για την βελτίωση της ποιότητας και της σταθερότητας των λειτουργικών τροφίμων, μια επιλογή είναι η ενθυλάκωση των λειτουργικών συστατικών με τη χρήση βρώσιμων πρώτων υλών «αναγνωρισμένων ως ασφαλών» (Generally Recognized As Safe, GRAS). Τα υλικά που ικανοποιούν αυτές τις απαιτήσεις μπορεί να περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες φυτών (π.χ. πηκτίνη, άμυλο, αραβικό κόμμι, καραγενάνη) ή μικροβιακής προέλευσης (δηλαδή κόμμι ξανθάνης, δεξτράνης), πρωτεΐνες τροφίμων (π.χ. πρωτεΐνες σόγιας, καζεΐνη, ζελατίνη, πρωτεΐνες βρώμης, πρωτεΐνες ορού γάλακτος), γαλακτωματοποιητές, όπως λεκιθίνη, Tweens, Spans, εστέρες σακχάρων, μονογλυκερίδια κ.ο.κ (Huang *et al.*, 2010).

Η ενθυλάκωση και η ελεγχόμενη απελευθέρωση των ενεργών συστατικών τροφίμων έχουν σημαντικές εφαρμογές στα τρόφιμα και στη διατροφή και μπορούν να επιτευχθούν με νανοτεχνολογικές προσεγγίσεις. Παρόλο που πολλά διαφορετικά συστήματα είναι πλέον διαθέσιμα για την ενσωμάτωση και διασπορά βιοδραστικών συστατικών στα λειτουργικά τρόφιμα (McClements *et al.*, 2009), οι *in vitro* ή *in vivo* ενδείξεις της βιολογικής τους αποτελεσματικότητας εξακολουθούν να είναι περιορισμένες.

Η χορήγηση δραστικών συστατικών στο ανθρώπινο σώμα απαιτεί τη χρήση ενός κατάλληλου φορέα για να ενσωματώσει την αποτελεσματική ποσότητα του δραστικού συστατικού και να τη μεταφέρει ανέπαφη στο κατάλληλο σημείο του σώματος. Είναι γνωστό ότι η διανομή αυτών των ουσιών επηρεάζεται σημαντικά από τις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η υδατοδιαλυτότητα, ο συντελεστής κατανομής, ο λιπόφιλος χαρακτήρας, η κρυσταλλική δομή κ.α. Τα ενεργά συστατικά που διαλύονται ελάχιστα στο νερό ή στα έλαια δημιουργούν πρόβλημα κατά τη διαδικασία της χορήγησης, της μεταφοράς και της επίτευξης των στόχων τους, με αποτέλεσμα τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Η δημιουργία, λοιπόν, ενός τέτοιου κατάλληλου μέσου αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές. Για να ξεπεραστεί η αστάθεια, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και για να ενισχυθεί η βιοδιαθεσιμότητα της δραστικής ουσίας, μία πολλά υποσχόμενη επιλογή είναι η ενθυλάκωση της εν λόγω ένωσης σε νανογαλάκτωμα (Huang *et al.*, 2010, Solans *et al.*, 2005).

1.5.1 Νανογαλακτώματα

Ως νανογαλακτώμα ορίζεται η κινητικά σταθερή κολλοειδής διασπορά που αποτελείται από δύο μη αναμιξίμα υγρά, με το ένα να διασπείρεται στο άλλο σε μορφή σταγονιδίων σφαιρικού σχήματος (droplets) ακτίνας κάποιων εκατοντάδων νανομέτρων. Το μέγεθος των σταγονιδίων αποτελεί και την βασική διαφορά των νανογαλακτωμάτων από τα συμβατικά γαλακτώματα. Η σταθεροποίηση γίνεται με την βοήθεια επιφανειοενεργών ουσιών. Τα νανογαλακτώματα παρασκευάζονται με έλαιο, νερό και επιφανειοενεργή ουσία. Συχνά είναι απαραίτητη η προσθήκη και συνεπιφανειοενεργών όπως είναι διάφορες αλκοόλες προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη σταθεροποίηση του συστήματος. Ανάλογα με τη φύση και την αναλογία των επιμέρους συστατικών, τα νανογαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο τύπους: νανογαλακτώματα νερού σε έλαιο (w/o) όπου η υδατική φάση είναι διεσπαρμένη μέσα σε ένα ή περισσότερα έλαια με μορφή σταγονιδίων και νανογαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w), όπου η ελαιώδης φάση διασπείρεται μέσα στη συνεχή υδατική φάση. Η δομή των σωματιδίων ενός o/w νανογαλακτώματος είναι η εξής: οι μη-πολικές «ουρές» των μορίων της επιφανειοενεργής ουσίας στρέφονται προς την υδρόφοβη μήτρα της λιπαρής φάσης, ενώ οι πολικές υδρόφιλες «κεφαλές» στρέφονται προς το υδατικό περιβάλλον που αποτελεί την συνεχή φάση. Τα σταγονίδια τείνουν να είναι σφαιρικά λόγω της εξαιρετικά μικρής ακτίνας και της μεγάλης επιφανειακής τάσης (Grumezescu, 2016).



Εικόνα 1: Τύποι νανογαλακτωμάτων (a) νερό-σε-έλαιο (w/o), (b) έλαιο-σε-νερό (o/w) και πιθανές ουσίες προς ενθυλάκωση (Πηγή: <http://www.eie.gr/nhrf/institutes/ibrb/programmes/biomimetics-gr.html>)

Τα επιφανειοενεργά είναι αμφίφιλα μόρια που περιέχουν μια υδρόφιλη πολική "κεφαλή" και μια υδρόφοβη "ουρά" που αποτελείται από μία ή περισσότερες αλυσίδες αλκυλίου (Myers, 2006). Αυτά τα μόρια προσανατολίζονται με την υδρόφιλη κεφαλή προς νερό και τις υδρόφοβες ουρές προς το έλαιο. Τα

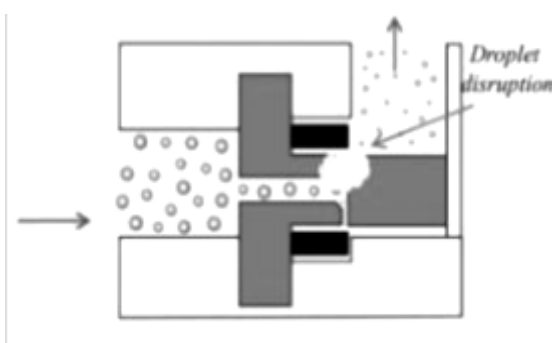
επιφανειοδραστικά, γνωστά στη βιομηχανία τροφίμων ως «γαλακτωματοποιητές» παίζουν βασικό ρόλο στη μείωση της διεπιφανειακής τάσης μεταξύ ελαίου και νερού. Οι γαλακτωματοποιητές ταξινομούνται ανάλογα με τη φύση τους σε (i) μη ιοντικά, (ii) αμφιτεριοντικά και (iii) ιοντικά μόρια. Μερικοί μη ιοντικοί γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι οι εστέρες σακχαρόζης (Glatter *et al.*, 2001) και τα μονογλυκερίδια λιπαρών οξέων (Gulik-Krzywicki & Larsson, 1984). Τα φωσφολιπίδια είναι από τους πλέον διαδεδομένους αμφιτεριοντικά γαλακτωματοποιητές (Aboofazeli *et al.*, 1994).

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρασκευής νανογαλακτωμάτων που χρησιμοποιούνται ανάλογα με τα υλικά του συστήματος και τις ιδιότητες που θέλουμε να του προσδώσουμε (π.χ. μέγεθος σταγόνων). Διαχωρίζονται σε μεθόδους υψηλής και σε μεθόδους χαμηλής ενέργειας (Tadros *et al.*, 2004). Για τις προσεγγίσεις υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούνται μηχανήματα, όπως ομογενοποιητές υψηλής πίεσης, τα οποία είναι ικανά να παράξουν ισχυρή μηχανική ενέργεια, ώστε να προκαλέσουν ομογενοποίηση των δύο φάσεων (ελαιώδους και υδατικής) και να οδηγήσουν στο σχηματισμό σταγόνων πολύ μικρού μεγέθους (Gutiérrez *et al.*, 2008), (Wooster, Golding, & Sanguansri, 2008). Οι τεχνικές υψηλής ενέργειας παρέχουν τη δυνατότητα καλύτερου ελέγχου του μεγέθους των σταγόνων της διεσπαρμένης φάσης και της σύστασης του νανογαλακτώματος. Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και περιλαμβάνει την κατανάλωση μηχανικής ενέργειας.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH) είναι ότι μπορούν να παραχθούν κολλοειδείς διασπορές μικρού μεγέθους (έως και 20 nm). Επίσης, το νανογαλάκτωμα εμφανίζει σταθερότητα ως προς την κροκίδωση και την συσσωμάτωση, ευελιξία στην επιλογή και τον έλεγχο του μεγέθους του σταγονιδίου, ευκολία χειρισμού, ποικιλία στη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών, και δυνατότητα εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα. Το μειονέκτημα τους είναι ότι ορισμένες ουσίες μπορεί να υποστούν υποβάθμιση της δράσης τους λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που αναπτύσσεται κατά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων. Αντίθετα, οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται στον αυθόρμητο σχηματισμό των κολλοειδών συστημάτων με απλή ανάμιξη των συστατικών τους ή και με ήπια ανάδευση (Qian & McClements, 2011).

Το προ-γαλάκτωμα διοχετεύεται στην είσοδο του ομογενοποιητή (inlet), μέσω μίας αντλίας προωθείται σε ένα θάλαμο και ακολούθως αναγκάζεται να διέλθει

από μία στενή βαλβίδα στο τέλος του θαλάμου. Καθώς το μίγμα διέρχεται από την βαλβίδα, με την εφαρμογή πίεσης, δέχεται έντονες δυνάμεις και έτσι διασπώνται τα μεγαλύτερα σταγονίδια προς μικρότερα. Οι δυνάμεις διάσπασης από την εφαρμογή πίεσης πρέπει να υπερνικήσουν τις διεπιφανειακές δυνάμεις που συγκρατούν τα σταγονίδια μεταξύ τους και να μειωθεί αρκετά η επιφανειακή τάση. Έπειτα το νανογαλάκτωμα παραλαμβάνεται στην έξοδο (outlet) της συσκευής σε δοχείο (Floury *et al.*, 2003). Το μίγμα προς ομογενοποίηση χρειάζεται να διέλθει αρκετές φορές από τον ομογενοποιητή ώστε να μειωθεί το μέγεθος των σωματιδίων στην νανοκλίμακα. Επομένως, οι φορές που διέρχεται το μίγμα από τον ομογενοποιητή και υφίσταται την πίεση, ορίζεται ως κύκλος ομογενοποίησης.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση κατά την Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH)

Το νανογαλάκτωμα είναι σύστημα κινητικά σταθερό και θερμοδυναμικά ασταθές για αυτό και απαιτείται προσφορά ενέργειας για την παρασκευή του (Chaarí *et al.*, 2018). Αποτέλεσμα της κινητικής σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων είναι η αποσταθεροποίηση και τελικά ο διαχωρισμός των φάσεων. Ο ρυθμός διαχωρισμού των δύο φάσεων εξαρτάται από την κινητική σταθερότητα του συστήματος, δηλαδή από το μέγεθος του «ενεργειακού φράγματος» που πρέπει να υπερνικηθεί ώστε το σύστημα να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση. Τα νανογαλακτώματα εμφανίζουν κινητική σταθερότητα ακόμα και για μήνες, αναλόγως των φυσικοχημικών φαινομένων που συμβαίνουν στο εκάστοτε σύστημα αλλά και της συνεχούς γρήγορης κίνησης των σταγονιδίων που υπόκεινται σε κίνηση Brown. Η συχνότητα της κίνησης αυτής που φέρνει κοντά ή απομακρύνει τα σταγονίδια, επηρεάζει την κινητική σταθερότητα. (McClements, 2012).

Πίνακας 4: Σύγκριση της θερμοδυναμικής σταθερότητας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των κολλοειδών διασπορών που παρασκευάζονται από έλαιο, νερό και επιφανειοενεργά. Οι οπτικές ιδιότητες εκφράζονται για τυπικά συστήματα ελαίου και

νερού όπου υπάρχει μια σημαντική αντίθεση στο δείκτη διάθλασης και η συγκέντρωση σωματιδίων είναι αισθητή (π.χ.> 0.1%) (Mason *et al.*, 2006).

Σύστημα	Ακτίνα σταγονιδίων	Θερμοδυναμική σταθερότητα	Συντελεστής επιφάνειας προς μάζα (m^2 / g σωματίδια)	Οπτικές ιδιότητες
Γαλάκτωμα	100 nm- 100 μm	Ασταθής	0,07-70	Θολό / αδιαφανής
Νανογαλάκτωμα	10-100 nm	Ασταθές	70-330	Διαυγές / Θολό

1.5.1.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) είναι μια ευέλικτη και χρήσιμη μέθοδος για τη *in situ* μελέτη της μορφής και του μεγέθους των νανασωματιδίων σε υγρά και τις κατανομές αυτών. Η μέθοδος αυτή παρέχει μία εκτίμηση της δομής του νανογαλακτώματος, προσδιορίζοντας το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης, της κατανομής (Polydispersity Index, PdI) αλλά και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Fanun *et al.*, 2011;Theochari *et al.*, 2017). Η τεχνική αυτή δηλαδή που μελετά την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων από το συνδυασμένο σήμα όλων των σωματιδίων που υπάρχουν στο δείγμα, παρέχει μια αξιόπιστη εκτίμηση της κατανομής του μεγέθους αυτών (Dalglish and Hallett, 1995, Le *et al.*, 2008). Η κατανομή της συχνότητας του διασκορπισμένου φωτός περιέχει πληροφορίες σχετικά με τη δυναμική των μορίων που περιλαμβάνει το σύστημα σκέδασης (Pecora, 2000). Η μέθοδος DLS συσχετίζει τις διακυμάνσεις της μέσης έντασης του διασκορπισμένου φωτός με την πάροδο του χρόνου μαζί με το μέγεθος των σωματιδίων στο εναιώρημα. Το κύριο μετρούμενο μέγεθος είναι ο συντελεστής διάχυσης D , ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της φαινομενικής διαμέτρου σωματιδίων d χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein (Belicciu & Moraru, 2009)

$$RH = kBT / 6\pi\eta D$$

Όπου:

- kB είναι η σταθερά του Boltzman
- T είναι η απόλυτη θερμοκρασία

- η είναι το ιξώδες της συνεχούς φάσης σε δεδομένη θερμοκρασία
- D είναι η σταθερά διάχυσης (Hassan, Rana, & Verma, 2015).

Δείκτης ομοιογένειας των κολλοειδών συστημάτων είναι το PDI (Polydispersity index), ή αλλιώς ο δείκτης πολυδιασποράς και μετρείται με το DLS. Σε συστήματα με πολλά διαφορετικά μεγέθη πληθυσμών σταγονιδίων το PDI προκύπτει έπειτα από μαθηματική επεξεργασία του σήματος που δίνει ο ανιχνευτής, του συντελεστή διάχυσης και της κατανομής των μεγεθών των πληθυσμών. Λαμβάνει τιμές από 0,01 έως 0,5. Σε τιμές μεγαλύτερες του 0,5 υπάρχει μαθηματική απόκλιση που προκαλεί σφάλμα κατά την μέτρηση (Hassan, *et al.*, 2014).

1.5.1.2 Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων

Τα νανογαλακτώματα έχουν μοναδικές ιδιότητες, όπως μικρό μέγεθος σταγονιδίων, εξαιρετική σταθερότητα σε σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα και είναι σχετικά διαφανή. Αυτές οι ιδιότητες τα καθιστούν μια ελκυστική επιλογή για εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων (Chatzidaki & Xenakis, 2019; Gupta *et al.*, 2016).

Τα καροτενοειδή έχουν οφέλη για την ανθρώπινη υγεία και ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων ως χρωστικές ουσίες. Η ενθυλάκωση τους σε o/w νανογαλακτώματα έχει σημαντικό ρόλο στο να αυξηθεί η χρήση τους ως λειτουργικές εφαρμογές στα τρόφιμα και ως συστήματα χορήγησης για την ενθυλάκωση, προστασία και μεταφορά αυτών. Η μορφή αυτή καροτενοειδών μπορεί να είναι ένας πιθανός τρόπος συντήρησης για τρόφιμα και άλλες εμπορικές εφαρμογές (Chaari *et al.*, 2018). Μια μελέτη με τη β-καροτίνη έδειξε ότι μπορεί να ενθυλακωθεί αποτελεσματικά σε νανογαλακτώματα (o/w) που περιείχαν διαφορετικά είδη φορέων λιπιδίων με μη ιονικά επιφανειοενεργά (Tween 20). Τα αποτελέσματά ήταν απόρροια για το σχεδιασμό συστημάτων χορήγησης για την ενθυλάκωση καροτενοειδών και άλλων λιπόφιλων βιοδραστικών συστατικών (Qian *et al.*, 2012). Ένα άλλο πρόσθετο που είναι εγκλωβισμένο στα νανογαλακτώματα είναι η κουρκουμίνη, ένας αντιφλεγμονώδης. Οι Yu & Huang, (2012) διερεύνησαν την πιθανή εφαρμογή σε νανογαλακτώματα για τη βελτίωση στην πέψη. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα νανογαλακτώματα που παρασκευάζονται με κουρκουμίνη στην ελαιώδη φάση επιτρέπουν ευκολότερη πέψη απ'ό, τι όταν η κουρκουμίνη λαμβάνεται

απευθείας, λόγω της εύκολης πέψης λιπιδίων (lipid digestion) στα νανογαλακτώματα σε σύγκριση με τη διαλυτοποίηση κουρκουμίνης.

Η χρήση συστημάτων παράδοσης (delivery systems) για την προστασία και την απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών και βιοδραστικών συστατικών αποτελεί ένα πεδίο μεγάλου ενδιαφέροντος για το βιομηχανικό κλάδο των τροφίμων και την επιστήμη (Shimoni, 2009).

1.6 Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η παρασκευή νανογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων σε βιταμίνη D με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, για την ενσωμάτωσή τους σε άπαχο πρόβειο γάλα. Η σταθερότητα μελετήθηκε με Δυναμική Σκέδαση Φωτός εστιάζοντας στο μέγεθος των παραγόμενων νανοσταγονιδίων και το χρονικό διάστημα στο οποίο αυτά παρέμειναν σταθερά με εγκλωβισμένη την βιταμίνη D, προκειμένου να επιτευχθεί ο σχεδιασμός ενός αποτελεσματικού λειτουργικού τροφίμου βασισμένου στη νανοτεχνολογία.

Ειδικότερα, οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι δύο.

1. Εμπλουτισμός λιπαρής φάσης πρόβειου γάλακτος με βιταμίνη D για τη δημιουργία «λειτουργικού τυριού»
2. Αντικατάσταση μέρους του λίπους του πρόβειου γάλακτος με φυτικά έλαια

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν πρώτες ύλες κάποιες υψηλής καθαρότητας και κάποιες ως δωρεά από τη βιομηχανία Παγώνης και ΕΛΑΪΣ. Πιο συγκεκριμένα, άπαχο πρόβειο γάλα, ως λιπαρή φάση για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων επιλέχθηκαν τα φυτικά έλαια σογιέλαιο, ηλιέλαιο και ελαιόλαδο εξευγενισμένα από την εταιρεία ΕΛΑΪΣ και κρέμα γάλακτος. Ως επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν το Polysorbate 40 (Tween 40) και το Polysorbate 60 (Tween 60) της εταιρίας Alfa Aesar ή MILKOPRO 7067. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μια συσκευασία του 1g βιταμίνης D3 (cholecalciferol,VD3) 98 % καθαρότητας, σε κρυσταλλική μορφή, από την εταιρία Sigma- Aldrich αποθηκευμένη υπό ψύξη. Η αναλυτική περιγραφή δίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Πρώτη ύλη	Προμηθευτής
Άπαχο Πρόβειο Γάλα	ΠΑΓΩΝΗΣ
Λιπαρή Φάση	
Κρέμα πρόβειου γάλακτος	ΠΑΓΩΝΗΣ
Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο	ΕΛΑΪΣ
Εξευγενισμένο Σογιέλαιο	ΕΛΑΪΣ
Εξευγενισμένο Ηλιέλαιο	ΕΛΑΪΣ
Επιφανειοενεργά	
MILKOPRO 7067	Vionova LTD
Polysorbate 40 (Tween 40)	Alfa Aesar
Polysorbate 60 (Tween 60)	Alfa Aesar
Βιταμίνη	
Βιταμίνης D3 (cholecalciferol,VD3) 98% καθαρότητας	Sigma- Aldrich

2.2 Μέθοδοι

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, όσο και για τη μελέτη των χαρακτηριστικών τους ήταν καίριας σημασίας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επιτυχής ενθυλάκωση της βιταμίνης D και να προσδιοριστούν οι δυνατότητες του συστήματος καθώς και οι τρόποι βελτιστοποίησης του. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα νανογαλακτώματα παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ομογενοποίησης υψηλής πίεσης και η δομική τους μελέτη πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (ΔΣΦ) που περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

2.3 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικούς κύκλους ομογενοποίησης στα συστήματα που ακολουθούν παρακάτω (από 5 έως 10 κύκλοι), εύρος πίεσης από 200 έως και 400 bar και μίγμα επιφανειοενεργών, ώστε να επιλεγούν τα συστήματα με τη μεγαλύτερη σταθερότητα. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν δύο (2) ομάδες νανογαλακτωμάτων διαφορετικής σύστασης προκειμένου να βρεθούν τα πλέον σταθερά και να χρησιμοποιηθούν για την νανοενθυλάκωση της βιταμίνης D. Και στις δύο περιπτώσεις διατηρήθηκε σταθερή η συνολική ποσότητα του ελαίου (6% κ.β) στο σύστημα ενώ διαφοροποιήθηκαν τα ποσοστά των επιφανειοενεργών. Πιο αναλυτικά:

2.3.1 Ομάδα συστημάτων με Φυτικά έλαια (σογιέλαιο/ ελαιόλαδο), επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween60) και νερό

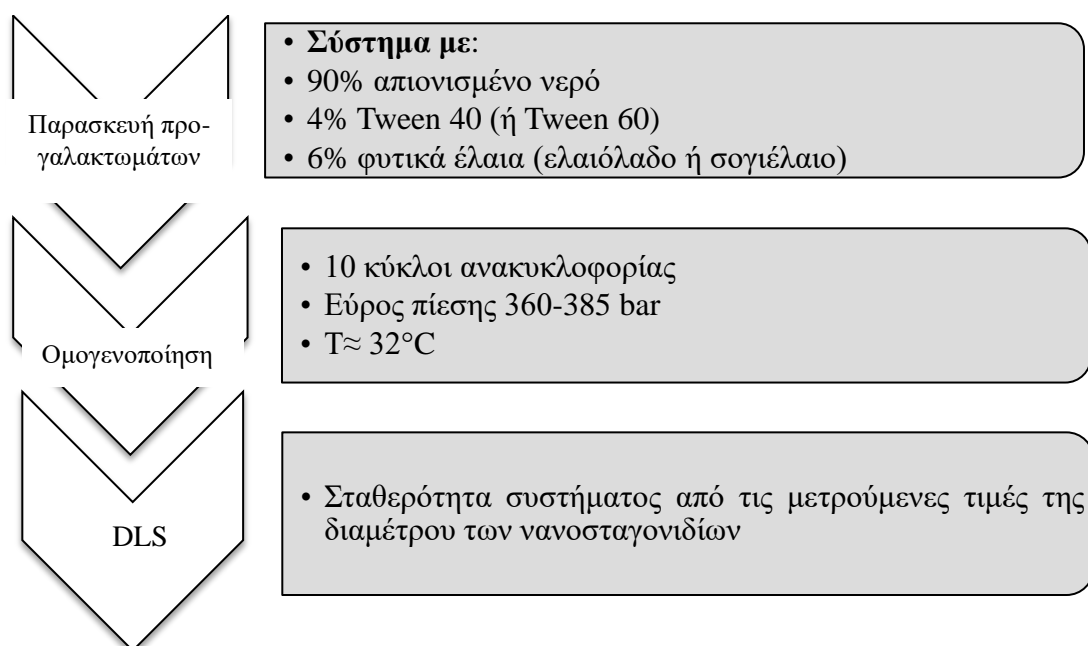
Για την πρώτη ομάδα συστημάτων, τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σογιέλαιο/ελαιόλαδο, Tween 40 ή Tween 60 και απιονισμένο νερό με 1 ppm σορβικό κάλιο. Τα ποσοστά που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Ποσότητες συστατικών στην ομάδα συστημάτων με φυτικά έλαια, νερό και επιφανειοενεργά

<i>Συστήματα</i>	<i>Απιονισμένο Νερό (g)</i>	<i>Φυτικά Έλαια (g)</i>	<i>Επιφανειοενεργά (g)</i> (Tween 40/ Tween 60)
1)	Σύστημα με 90% κ.β νερό, 4% κ.β. Tween 40 , 6% κ.β. Σογιέλαιο		
	225	15	10
2)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 4% κ.β. Tween 60 , 6% κ.β. Σογιέλαιο		
	225	15	10

3)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 4% κ.β. Tween 40 , 6% κ.β. Ελαιόλαδο		
	225	15	10
4)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 4% κ.β. Tween 60 , 6% κ.β. Ελαιόλαδο		
	225	15	10

Ελαιόλαδο/ Σογιέλαιο, Tween 40/ Tween 60, Νερό: παρασκευάστηκαν τέσσερα (4) προ-γαλακτώματα αποτελούμενα από τα επιμέρους συστατικά, μέσω μηχανικής ανάδευσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε φορά ζυγίζονταν 225 mL απιονισμένο νερό, 10 g επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween 60) και 15 g φυτικά έλαια (σογιέλαιο και ελαιόλαδο). Αρχικά, το νερό αναμιγνυόταν με ποσότητα Tween 40/ Tween 60 αντίστοιχα, και ακολουθούσε η προσθήκη ελαιολάδου (ή σογιέλαιο αντίστοιχα) ώστε να σχηματιστεί νανοδιασπορά επιθυμητής σύστασης. Στη συνέχεια, το προ-γαλάκτωμα, υποβάλλονταν σε ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (360-385bar) για 10 κύκλους, προκειμένου να επιτευχθεί η τελική νανοδιασπορά απουσία ή παρουσία της Βιταμίνης D.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε

2.3.1.1 Ενθυλάκωση Βιταμίνης D

Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκαν 0,002 g βιταμίνης D και διαλύθηκαν με ήπια ανάδευση σε 250mL σογιέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα, ώστε να προκύψει διάλυμα

συγκέντρωσης 0,0208 mM. Το διάλυμα αυτό ήταν πιο αραιό σε συγκέντρωση βιταμίνης D, καθώς υπολογίστηκε με βάση το τελικό προϊόν που είναι μια μερίδα τυριού, περίπου στα 33g. Τα διαλύματα βιταμίνης των φυτικών ελαίων αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των εμπλουτισμένων σε βιταμίνη νανογαλακτωμάτων. Από αυτά τα συστήματα με εγκλωβισμένη τη βιταμίνη D, ενσωματώθηκε μέρος του νανογαλακτώματος (10%) στο άπαχο πρόβειο γάλα.

2.3.1.1.1 Παρασκευή πυκνού διαλύματος σε φυτικά έλαια

Για την παρασκευή πυκνού διαλύματος συγκέντρωσης $5,2 \times 10^{-5}$ M, ζυγίστηκαν 0,002 g βιταμίνης D σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν με ήπια ανάδευση σε 100mL σογιέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα. Η παρασκευή του πυκνού διαλύματος βιταμίνης D αποσκοπούσε στη μελέτη ενός υψηλού ορίου ενθυλάκωσης της βιταμίνης D. Τα πυκνά διαλύματα βιταμίνης των φυτικών ελαίων αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος.

2.3.1.2 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων με βιταμίνη D3

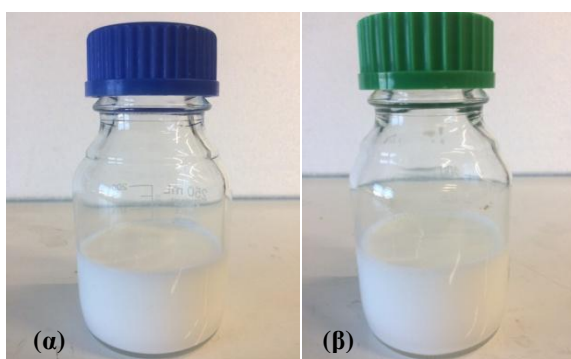
Από τα νανογαλακτώματα ο/w που συνολικά αναπτύχθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, επιλέχθηκαν και τα 4 συστήματα με σκοπό να δοκιμαστούν ως φορείς ενθυλάκωσης της βιταμίνης D3. Τα συστήματα ήταν σταθερά με το χρόνο, είχαν μικρή πολυδιασπορά και σχηματίστηκαν με χρήση μικρής ποσότητας επιφανειοενεργών ουσιών. Τα συστήματα που επιλέχθηκαν ήταν τα εξής (Πίνακας 7):

Πίνακας 7: Ποσότητες συστατικών από τα συστήματα που επιλέχθηκαν με φυτικά έλαια, νερό και επιφανειοενεργά

<i>Συστήματα</i>	<i>Απιονισμένο Νερό (g)</i>	<i>Φυτικά Έλαια (g)</i>	<i>Επιφανειοενεργά (g)</i> (Tween 40 ή Tween 60)
1)	90% κ.β.Νερό, 4% κ.β. Tween 40, 6% κ.β. Σογιέλαιο		
	225	15	10
2)	90% κ.β.Νερό, 4% κ.β. Tween 60, 6% κ.β. Σογιέλαιο		
	225	15	10
3)	90% κ.β.Νερό, 4% κ.β. Tween 40, 6% κ.β. Ελαιόλαδο		
	225	15	10

4)	90% κ.β.Νερό,4% κ.β. Tween 40, 6% κ.β .Ελαιόλαδο		
	225	15	10

Η διαδικασία παρασκευής των παραπάνω συστημάτων ήταν ίδια και για τα 4 συστήματα και είχε ως εξής: 10g Tween 40 (ή Tween60), 0,44g σογιέλαιου (ή ελαιολάδου) με βιταμίνη D, 14,56 g σογιέλαιου (ή ελαιολάδου) και 225 g απιονισμένου νερού προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η συνολική ποσότητα του προς ομογενοποίηση μίγματος ήταν 250 g. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 45-50 min ώστε να γίνει ένα προ-γαλάκτωμα. Η ανάδευση ήταν ήπια για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα, οι οποίες θα εμπόδιζαν την ομογενοποίηση. Έπειτα, ακολουθούσε ομογενοποίηση του μίγματος στον ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Τα πρώτα 30 mL περίπου απορρίπτονταν στην έξοδο του πρώτου κύκλου του δείγματος για να μην προστεθεί ανεπιθύμητη ποσότητα από το απιονισμένο νερό και παρέμεινε στον ομογενοποιητή. Συνεχιζόταν η ομογενοποίηση ως τα 380 bar περίπου και πραγματοποιούνταν συνολικά 10 κύκλοι. Το δοχείο, στο οποίο συλλεγόταν το νανογαλάκτωμα μετά από σε κάθε κύκλο ομογενοποίησης στην έξοδο του ομογενοποιητή, ήταν υπό ψύξη σε πάγο. Μετά την ομογενοποίηση το δοχείο με το νανογαλάκτωμα παρέμεινε στον πάγο για περίπου μία ώρα ώστε να πάρει τη θερμοκρασία δωματίου, καλυπτόταν εξωτερικά με αλουμινόχαρτο και συντηρούνταν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 7°C. Ακολουθούσε η δομική μελέτη όπως αναφέρεται και παρακάτω.



Εικόνα 3: Νανογαλακτώματα με εγλωβισμένη τη Βιταμίνη D για τα συστήματα με α) ελαιόλαδο και β) σογιέλαιο

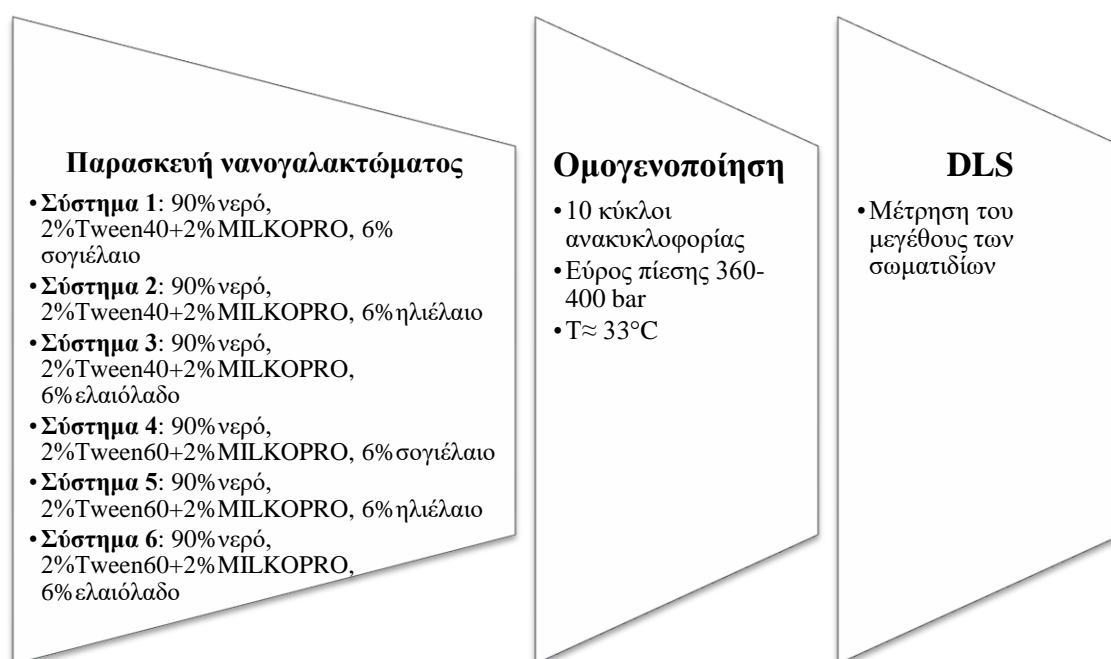
2.3.2 Ομάδα συστημάτων με Φυτικά έλαια (σογιέλαιο/ ηλιέλαιο/ ελαιόλαδο), μίγμα επιφανειοενεργών (Tween 40/ Tween60 και MILKOPRO 7067) και νερό

Η ομάδα αυτή παρασκευάστηκε με ομογενοποίητη υψηλής πίεσης (High Pressure Homogenizator, HPH) αποτελούμενη από σογιέλαιο, ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο, μίγμα πρωτεϊνών με αναλογία επιφανειοενεργών 1:1 από τα Tween 40 ή Tween 60 και MILKOPRO 7067 και απιονισμένο νερό με 1 ppm σορβικό κάλιο. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα επιμέρους συστήματα που αναπτύχθηκαν (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Ποσότητες συστατικών στην ομάδα συστημάτων με φυτικά έλαια, νερό και μίγμα επιφανειοενεργά

<i>Συστήματα</i>	<i>Απιονισμένο Νερό (g)</i>	<i>Φυτικά Έλαια (g)</i>	<i>Μίγμα Επιφανειοενεργών (g)</i>	
			Tween 40 ή Tween 60	MILKOPRO
1)	Σύστημα με 90% κ.β νερό, 2% κ.β. Tween 40 + 2% κ.β MILKOPRO, 6% κ.β. Σογιέλαιο			
	225	15	5	5
2)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 2% κ.β. Tween 60 + 2% κ.β MILKOPRO, 6% κ.β. Σογιέλαιο			
	225	15	5	5
3)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 2% κ.β. Tween 40 + 2% κ.β MILKOPRO, 6% κ.β. Ηλιέλαιο			
	225	15	5	5
4)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 2% κ.β. Tween 60 + 2% κ.β MILKOPRO, 6% κ.β. Ηλιέλαιο			
	225	15	5	5
5)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 2% κ.β. Tween 40 + 2% κ.β MILKOPRO, 6% κ.β. Ελαιόλαδο			
	225	15	5	5
6)	Σύστημα με 90% κ.β. Νερό, 2% κ.β. Tween 60 + 2% κ.β MILKOPRO, 6% κ.β. Ελαιόλαδο			
	225	15	5	5

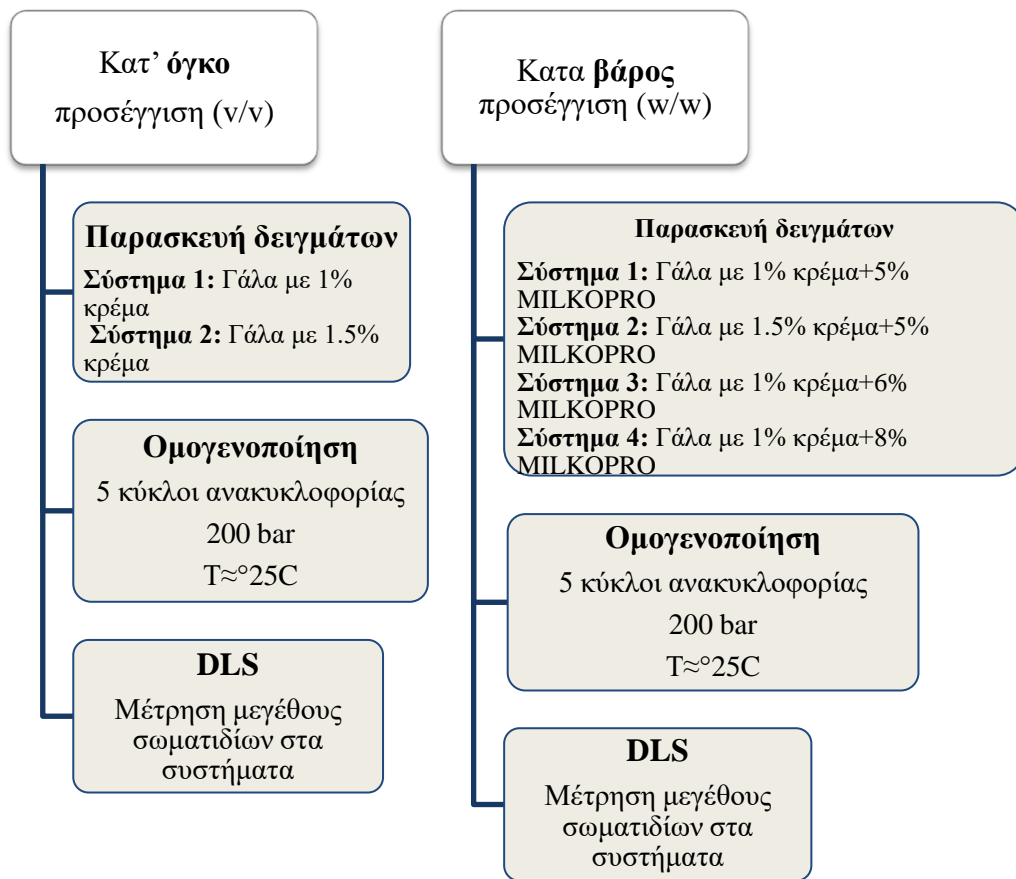
Η παρασκευή των νανογαλακτώματων έγινε ως εξής: Ζυγίστηκαν οι ποσότητες των 5 g Tween 40/ Tween 60 και 5 g MILKOPRO 7067 και προστέθηκαν 225g απεσταγμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 40-45 min και εν συνεχεία προστέθηκαν 15 g φυτικών ελαίων (σογιέλαιο, ηλιέλαιο, ελαιόλαδο) ώστε να σχηματιστεί ένα προ-γαλάκτωμα. Η συνολική ποσότητα του προς ομογενοποίηση μίγματος ήταν 250 g. Η ανάδευση ήταν ήπια για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα, οι οποίες θα εμπόδιζαν την ομογενοποίηση. Στη συνέχεια, ομογενοποίηση του μίγματος στον ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Εφαρμόστηκαν 10 κύκλοι ομογενοποίησης σε εύρος πίεση 360-400 bar. Τα δοχεία, στα οποία συλλέγονταν τα νανογαλακτώματα μετά από κάθε κύκλο ομογενοποίησης στην έξοδο του ομογενοποιητή, ήταν υπό ψύξη σε πάγο διότι η θερμοκρασία αυξανόταν κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε

2.3.3 Ομάδα συστημάτων με άπαχο γάλα, ζωική κρέμα και επιφανειοενεργά

Στο άπαχο γάλα (μετά από την αποκορύφωση του πλήρους γάλακτος), η λιπαρή φάση αποτελεί έως 0.1 % του τελικού όγκου. Με στόχο τη λιποπεριεκτικότητα του 1% και 1.5%, κατ' όγκο, προστέθηκε κρέμα γάλακτος στο άπαχο γάλα.



Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας

Πιο συγκεκριμένα στο 1^ο σκέλος της δεύτερης προσέγγισης, για 1 % κρέμα στα 250 mL γάλα υπολογίστηκαν οι ακόλουθες ποσότητες: 247,5 mL άπαχο γάλα και 2,5 mL κρέμα ενώ αντίστοιχα για 1.5% κρέμα χρειάστηκαν 246,25 m άπαχο γάλα και 3,75 mL κρέμα.

Στο 2^ο σκέλος της δεύτερης προσέγγισης του πειράματος έγινε και η προσθήκη επιφανειοενεργών στο μίγμα γάλακτος με κρέμα που ζυγίστηκαν κατά βάρος (w/w). Ο λόγος ο οποίος ακολουθήθηκε η διαδικασία αυτή (w/w), έγκειται στο γεγονός ότι η μέτρηση του όγκου της κρέμα δεν ήταν εύκολη κατά την επεξεργασία των πειραμάτων λόγω του μεγάλου ιξώδους της. Συνεπώς, για λόγους ακρίβειας και καλύτερης επαναληψιμότητας επελέγη η κατά βάρος προσέγγιση, η οποία βρέθηκε να είναι εύκολη στη διαχείριση της και επαναλήψιμη. Αναλυτικότερα οι κατά βάρος ποσότητες (Πίνακας 9):

Πίνακας 9: Ποσότητες συστατικών στην ομάδα συστημάτων με άπαχο γάλα, φυτική κρέμα και επιφανειοενεργά

Συστήματα	Επιφανειοενεργά(g)	Κρέμα(g)	Άπαχο γάλα(g)
-----------	--------------------	----------	---------------

1)	Σύστημα με 1 % κρέμα και 5 % επιφανειοενεργά		
	12.5	2.5	235
2)	Σύστημα με 1.5 % κρέμα και 5 % επιφανειοενεργά		
	12.5	3.75	233.75
3)	Σύστημα με 1% κρέμα και 6 % επιφανειοενεργά		
	15	2.5	232.5
4)	Σύστημα με 1% κρέμα και 8 % επιφανειοενεργά		
	20	2.5	227.5

2.5 Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH)

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, κατά την οποία ασκείται υψηλή πίεση σε ένα σύστημα διασποράς δύο μη αναμίξιμων συστατικών, όπως είναι το νερό και το λάδι, καθώς αυτό αντλείται μέσω μίας περιοριστικής βαλβίδας, μειώνοντας έτσι τη διάμετρο των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης, και οδηγώντας σε ομογενοποίηση. Η ισχυρή διατμητική πίεση έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολύ μικρών νανοσταγονιδίων (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2010; Sanguansri & Augustin, 2006).

Η επεξεργασία του νανογαλακτώματος της 1^{ης} προσέγγισης έγινε με τη χρήση ενός ομογενοποιητή υψηλής πίεσης PandaPlus 1000 (Gea, Niro Soavi, Parma, Italy). Το εύρος της πίεσης κυμαινόταν από 360-390 bar, με 10 κύκλους ανακυκλοφορίας και συνολική η ποσότητα στα 250 g. Για τη 2^η προσέγγιση με το μίγμα γάλα και κρέμας η πίεση ήταν στα 200 bar με 5 κύκλους ανακυκλοφορίας. Για την 1^ο σκέλος της πειραματικής προσέγγισης ο όγκος του δείγματος ήταν 250 mL ενώ για το 2^ο η κατά βάρος ποσότητα ήταν 250 g. Η θερμοκρασία των δειγμάτων στην έξοδο και στις δύο προσεγγίσεις ήταν στους 25° C.

2.6 Δομική μελέτη νανογαλακτωμάτων

2.6.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η χρήση του DLS έγινε για τη μελέτη της κατανομής του μεγέθους των διασκορπισμένων σταγονιδίων της λιπαρής φάσης στο νανογαλάκτωμα. Οι μετρήσεις

DLS πραγματοποιήθηκαν παρουσία και απουσία της Βιταμίνης D, απευθείας μετά την παρασκευή τους αλλά και σε διάφορες χρονικές στιγμές, παρέχοντας πληροφορίες για τη σταθερότητα των συστημάτων. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Zetasizer NanoZS (ZEN3600) (Malvern Instruments, UK), εξοπλισμένο με λέιζερ He-Ne στερεάς κατάστασης ($\lambda=633\text{nm}$) και με χρήση τεχνολογίας μη επεμβατικής οπισθοσκέδασης. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε τριπλέτες υπό γωνία σκέδασης 173° και κάθε μέτρηση να επαναλαμβάνεται έξι (6) φορές των 11 runs.

2.7 Ενσωμάτωση νανογαλακτώματος σε γάλα

Με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις παραπάνω μελέτες, τα συστήματα με 90% νερό, 4% Tween 40 και 6% κ.β. σογιέλαιο και αντίστοιχα ελαιόλαδο παρουσίασαν την καλύτερη σταθερότητα με τη βιταμίνη D και επιθυμητή κατανομή μεγεθών η οποία είναι απαραίτητη ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του εγκλωβισμένου συστατικού. Επομένως, αυτά τα δύο συστήματα επιλέχθηκαν για την ενσωμάτωση στο άπαχο πρόβειο γάλα.

Επιλέχθηκε το σύστημα με συγκέντρωση βιταμίνης $1.3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ στο νανογαλάκτωμα. Για μία περιεκτικότητα του τροφίμου σε νανογαλάκτωμα 10% v/v , προστέθηκαν 20 mL νανογαλακτώματος σε 180 mL άπαχου πρόβειου γάλακτος. Η περιεκτικότητα αυτή επιλέχθηκε με στόχο ένα ποτήρι γάλα $\sim 200 \text{ mL}$ να πλησιάζει την ημερήσια συνιστώμενη δόση βιταμίνης D των 10 μg , όπου η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί με περίπου 33g τυρί.

Η μάζα βιταμίνης D (VD) σε ένα ποτήρι γάλακτος των 200 mL που αποτελεί μία μερίδα, υπολογίζεται από την σχέση: (Walker *et.al.*, 2015)

$$M_{VD} = M_{Milk} \times \Phi_{VD/Oil} \times \Phi_{Oil/Nano} \times \Phi_{Nano/Milk}$$

Όπου:

M_{Milk} : μάζα γάλακτος σε μία μερίδα πρόσληψης (gr)

$\Phi_{VD/Oil}$: κλάσμα βιταμίνης D στην λιπαρή φάση του νανογαλακτώματος

$\Phi_{Oil/Nano}$: κλάσμα λιπαρής φάσης στο νανογαλάκτωμα

$\Phi_{Nano/Milk}$: κλάσμα νανογαλακτώματος στο ποτήρι γάλακτος

$$M_{VD}=207\text{g} \times 8.05 \times 10^{-6} \times 0.06 \times 0.1 = 9.998 \times 10^{-6} \text{gr} \approx 10\mu\text{g}$$

Πυκνότητα (d) γάλακτος στους 25°C=1,037g/mL

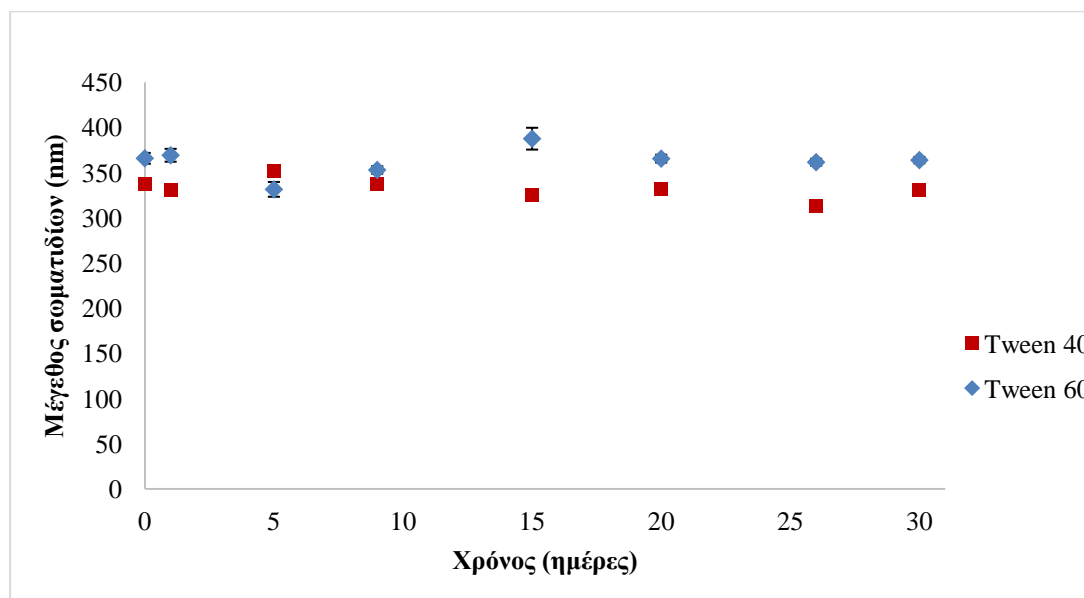
Στη συνέχεια, το εμπλουτισμένο γάλα μετρήθηκε ως προς την κατανομή μεγεθών με DLS για να ληφθεί μία εικόνα της νανοδιασποράς που παρασκευάστηκε στο γάλα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ομάδα συστημάτων με φυτικά έλαια, επιφανειοενεργά και νερό

Στα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν οι αναλογίες με 90% απιονισμένο νερό, 4% Tween 40 ή Tween 60 και 6% ραφινρισμένο σογιέλαιο ή ελαιόλαδο αντίστοιχα, με 10 κύκλους ανακυκλοφορία για εύρος πίεσης 360-380 bar, παρατηρήθηκε σταθερότητα του μεγέθους των σταγονιδίων περίπου στα 350 nm για 30 ημέρες χωρίς κάποια οπτική διαφορά, όπως επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις στο DLS.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους των δύο συστημάτων με και χωρίς προσθήκη βιταμίνης D με τους μέσους όρους τριών (3) ανεξάρτητων επαναλήψεων.

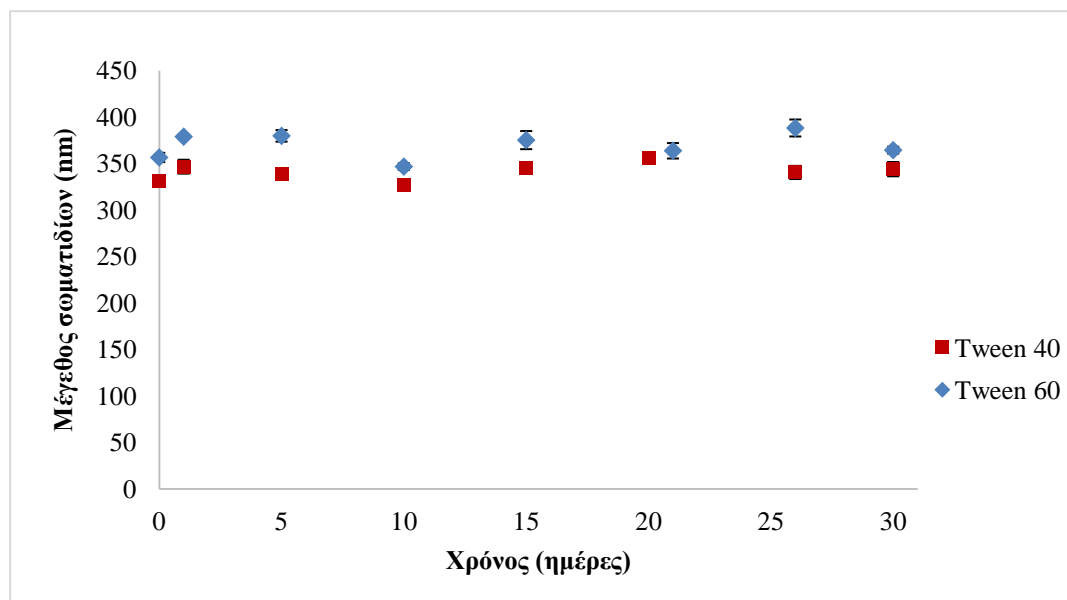


Διάγραμμα 1: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween 60) και 6% σογιέλαιο χωρίς βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Το Διάγραμμα 1, παρουσιάζει τη κατανομή του μεγέθους των νανοσταγονιδίων σε σχέση με το χρόνο για τα συστήματα με φυτικό έλαιο το σογιέλαιο και επιφανειοενεργά Tween 40 ή Tween 60, χωρίς προσθήκη βιταμίνης D. Παρατηρείται σταθερότητα και των δύο συστημάτων έως και 30 ημέρες. Το μέγεθος των σωματιδίων με το επιφανειοενεργό Tween 40 κυμαίνεται γύρω στα 340 nm περίπου, με μικρές αυξομειώσεις, ενώ για το σύστημα με Tween 60, φαίνεται να

ξεπερνά τα 350 nm καθώς παρατηρείται μια απότομη αύξηση μεγέθους την 15^η ημέρα, σχεδόν στα 400 nm.

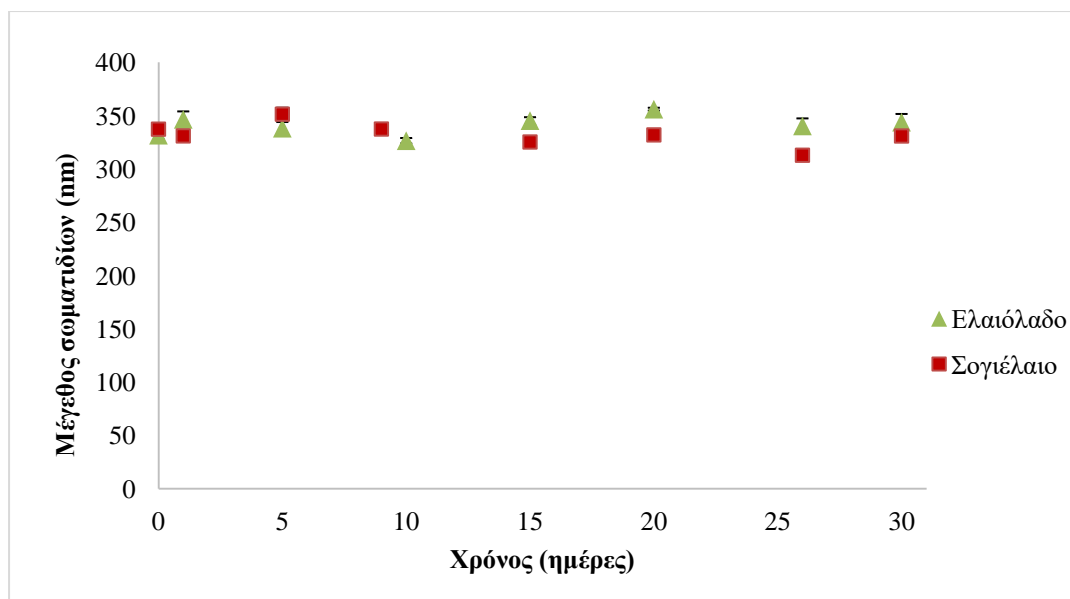
Συνεπώς, καλύτερη σταθερότητα παρουσιάζεται με το επιφανειοενεργό Tween 40 σε σύγκριση με το επιφανειοενεργό Tween 60 καθώς και μικρότερο μέγεθος σωματιδίων.



Διάγραμμα 2: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween 60) και 6% ελαιόλαδο χωρίς βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Στο παραπάνω Διάγραμμα 2, παρουσιάζεται πόσο σταθερό παραμένει το μέγεθος των σωματιδίων σε σύγκριση με το χρόνο για συστήματα με ελαιόλαδο και επιφανειοενεργά Tween 40 ή Tween 60 χωρίς προσθήκη βιταμίνης D. Και εδώ φαίνεται να διατηρούνται σταθερά μέχρι την 30^η ημέρα. Πιο συγκεκριμένα, για το σύστημα με το επιφανειοενεργό Tween 40, πάρθηκαν μετρήσεις με το μέγεθος να είναι κοντά στα 350 nm, ενώ με το επιφανειοενεργό Tween 60, το μέγεθος ήταν εμφανώς μεγαλύτερο φτάνοντας κοντά στα 400 nm.

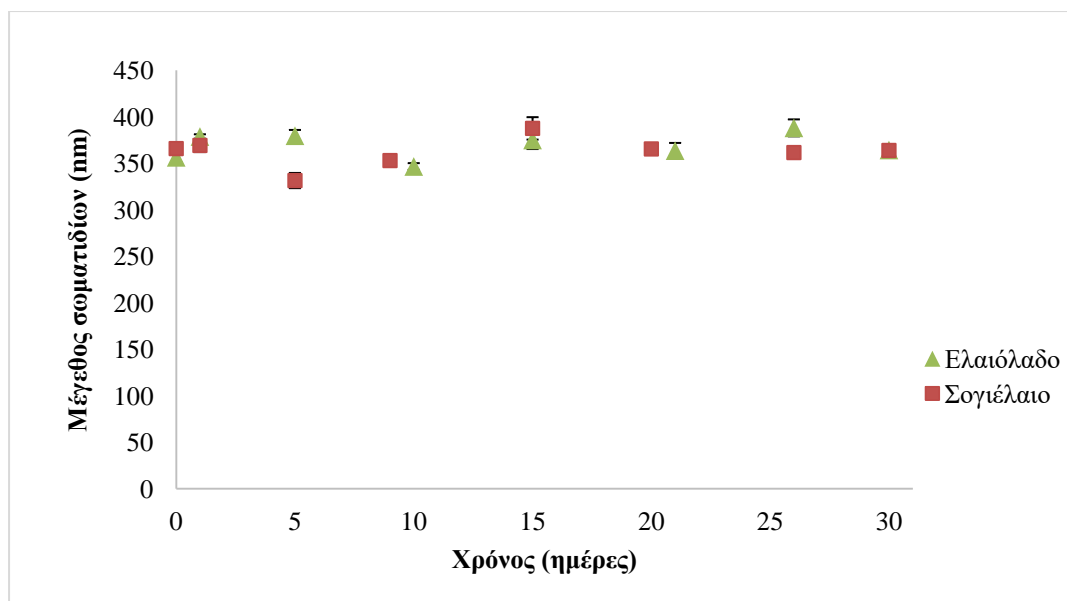
Για το σύστημα με το Tween 60, παρατηρούνται αυξομειώσεις στις μετρούμενες τιμές μεγέθους, σε σύγκριση με το σύστημα με το επιφανειοενεργό Tween 40.



Διάγραμμα 3: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40) και 6% ελαιόλαδο ή σογιέλαιο αντίστοιχα χωρίς βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους των νανοσταγονιδίων για τα νανογαλακτώματα σε σχέση με το χρόνο για τα συστήματα με Tween 40 και ελαιόλαδο ή σογιέλαιο χωρίς βιταμίνη D. Η διάρκεια σταθερότητας των συστημάτων είναι 30 ημέρες. Για το σύστημα με ελαιόλαδο, το μέγεθος των σωματιδίων είναι μεγαλύτερο, κοντά στα 350 nm, ενώ για το σογιέλαιο γύρω στα 330 nm.

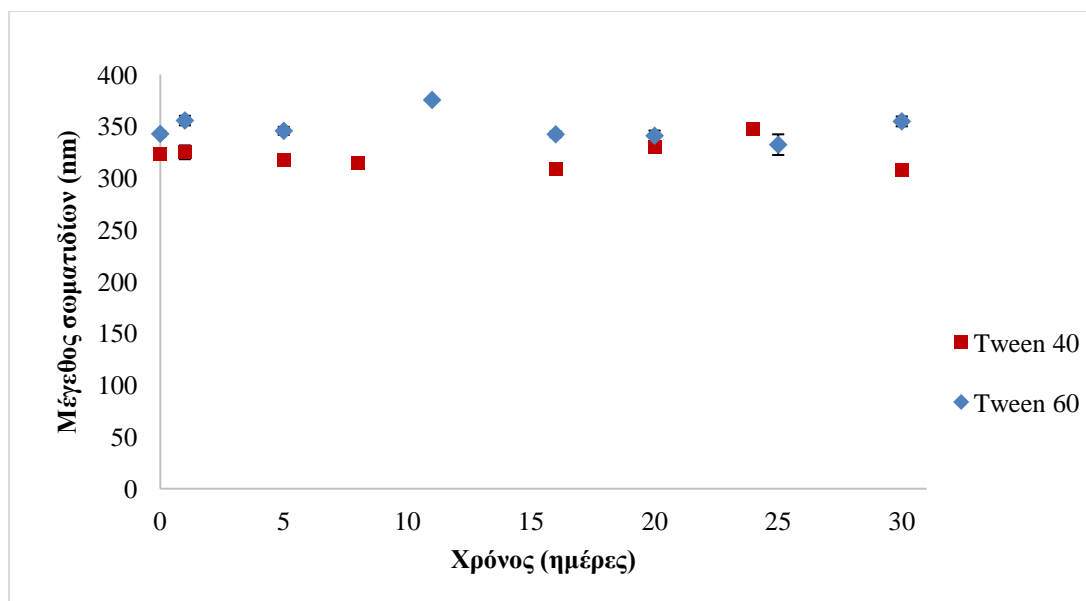
Συγκρίνοντας με βάση τα φυτικά έλαια και για επιφανειοενεργό Tween 40, παρατηρούμε ότι το σύστημα με σογιέλαιο παρουσιάζει καλύτερη σταθερότητα, με μικρότερες αυξομειώσεις μεγέθους απ' ό,τι με ελαιόλαδο.



Διάγραμμα 4: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 60) και 6% ελαιόλαδο ή σογιέλαιο αντίστοιχα χωρίς βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 4 εμφανίζεται η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων των νανογαλακτωμάτων με την πάροδο του χρόνου για τα συστήματα με Tween 60 και ελαιόλαδο ή σογιέλαιο χωρίς βιταμίνη D. Η σταθερότητα των συστημάτων μετρήθηκε στις 30 ημέρες. Και για τα δύο συστήματα με Tween 60, παρατηρούνται εμφανείς αυξομειώσεις στο μέγεθος των σωματιδίων. Φαίνεται για το ελαιόλαδο το μέγεθος να είναι κοντά στα 370 nm, ενώ για το σογιέλαιο περίπου στα 350 nm.

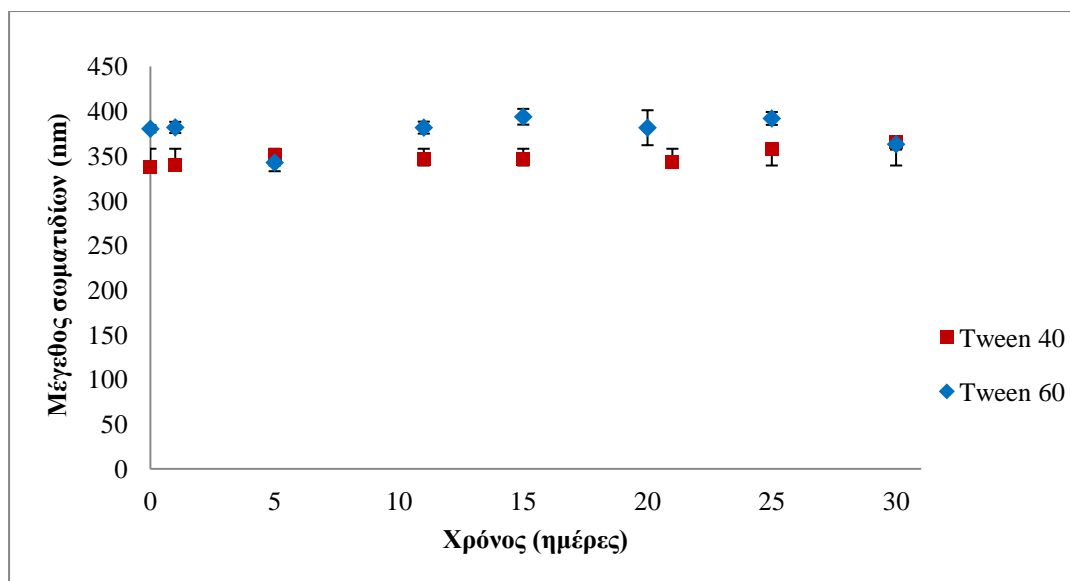
Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα (1, 2, 3 και 4) συμπεραίνουμε ότι για τα συστήματα χωρίς βιταμίνη D παρατηρήθηκε σταθερότητα στο μέγεθος των νανοσταγονιδίων για 30 ημέρες. Με το επιφανειοενεργό Tween 40, τα συστήματα είχαν μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με το Tween 60, ενώ το φυτικό έλαιο σογιέλαιο παρουσίασε καλύτερη σταθερότητα μεγέθους, μικρότερες αυξομειώσεις από ότι το ελαιόλαδο.



Διάγραμμα 5: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween 60) και 6% σογιέλαιο με βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση.

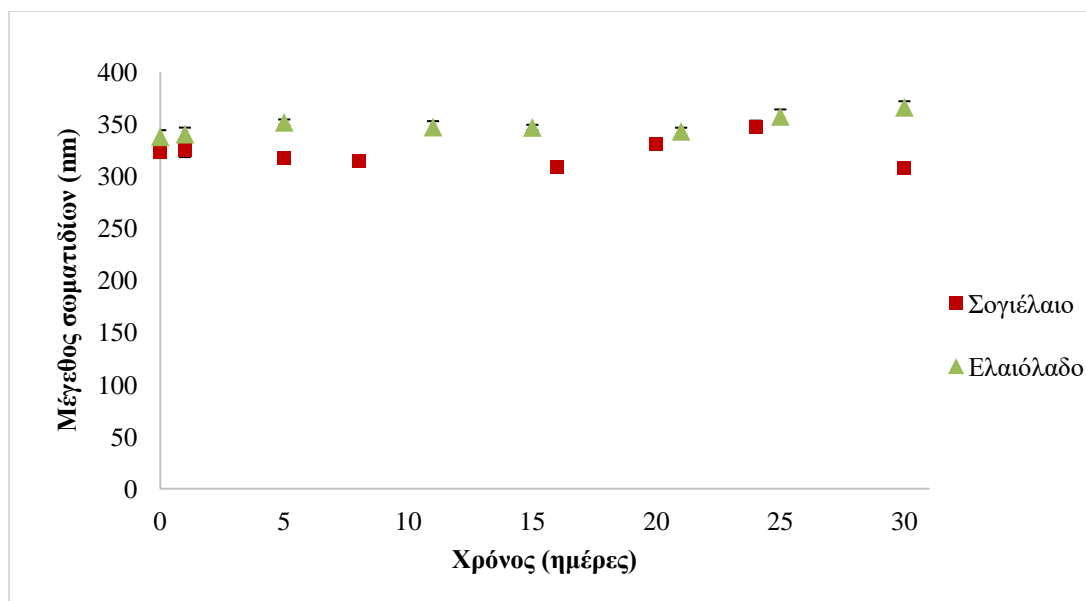
Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των νανοσταγονιδίων σε σχέση με το χρόνο με προσθήκη βιταμίνης D για τα συστήματα με φυτικό έλαιο το σογιέλαιο και επιφανειοενεργά Tween 40 ή Tween 60. Παρατηρείται σταθερότητα και των δύο συστημάτων έως και 30 ημέρες. Το μέγεθος των σωματιδίων με το επιφανειοενεργό Tween 40 κυμαίνεται για τις πρώτες 10 ημέρες γύρω στα 330 nm περίπου, και αυξάνεται σταδιακά ώσπου την 25^η ημέρα αγγίζει την τιμή 350 nm. Για το σύστημα με Tween 60, το μέγεθος είναι εμφανώς μεγαλύτερο από το Tween 40 για τις πρώτες ημέρες να φτάνει τα 350 nm και να αυξάνεται απότομα την 11^η ημέρα στα 370 nm και στη συνέχεια να διατηρείται περίπου στην τιμή των 350 nm.

Επομένως, για τα συστήματα με βιταμίνη D και φυτικό έλαιο το σογιέλαιο, καλύτερη σταθερότητα παρουσιάζεται με το επιφανειοενεργό Tween 40 σε σύγκριση με το επιφανειοενεργό Tween 60 καθώς και μικρότερο μέγεθος σωματιδίων.



Διάγραμμα 6: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40/ Tween 60) και 6% ελαιόλαδο με βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση.

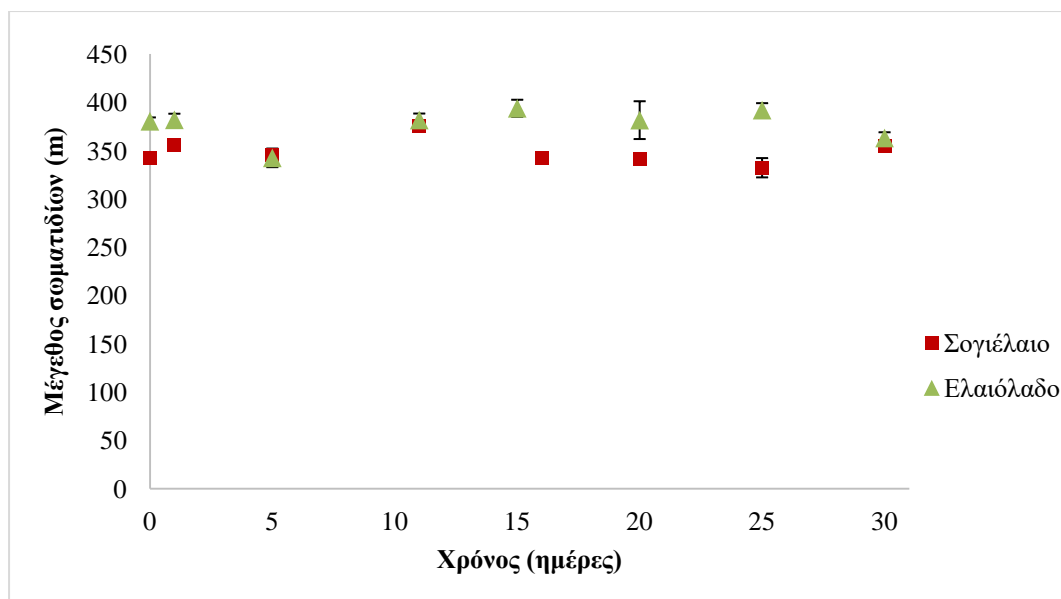
Στο Διάγραμμα 6, παρουσιάζεται πόσο σταθερό παραμένει το μέγεθος των σωματιδίων σε σύγκριση με το χρόνο για συστήματα με ελαιόλαδο και επιφανειοενεργά Tween 40 ή Tween 60 με εγκλωβισμό βιταμίνης D. Φαίνονται να διατηρούνται σταθερά μέχρι την 30^η ημέρα όπου μετά παρατηρήθηκε οπτικά διαχωρισμός των δύο φάσεων. Πιο συγκεκριμένα, για το σύστημα με το επιφανειοενεργό Tween 40, οι μετρήσεις που πάρθηκαν έδειξαν το μέγεθος να είναι κοντά στα 350 nm και σταθερότητα με την πάροδο του χρόνου, χωρίς να αυξάνεται σημαντικά το μέγεθος. Αντίθετα με το επιφανειοενεργό Tween 60, το μέγεθος είναι εμφανώς μεγαλύτερο καθώς φτάνει κοντά στα 400nm και παρατηρείται σταδιακή αύξηση με το πέρασ των ημερών, εκτός από την 5^η ημέρα που έπεσε απότομα στα 340 nm.



Διάγραμμα 7: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40) και 6% σογιέλαιο ή ελαιόλαδο με βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων σε σχέση με το χρόνο για τα συστήματα με Tween 40 και ελαιόλαδο ή σογιέλαιο και βιταμίνη D. Η διάρκεια σταθερότητας των συστημάτων είναι 30 ημέρες, όπου μετά τα συστήματα διαχωρίστηκαν οπτικά. Για το σύστημα με ελαιόλαδο, το μέγεθος των σωματιδίων είναι μεγαλύτερο, κοντά στα 350 nm, ενώ για το σογιέλαιο γύρω στα 330 nm με σταδιακή αύξηση να φτάνει τα 350 nm

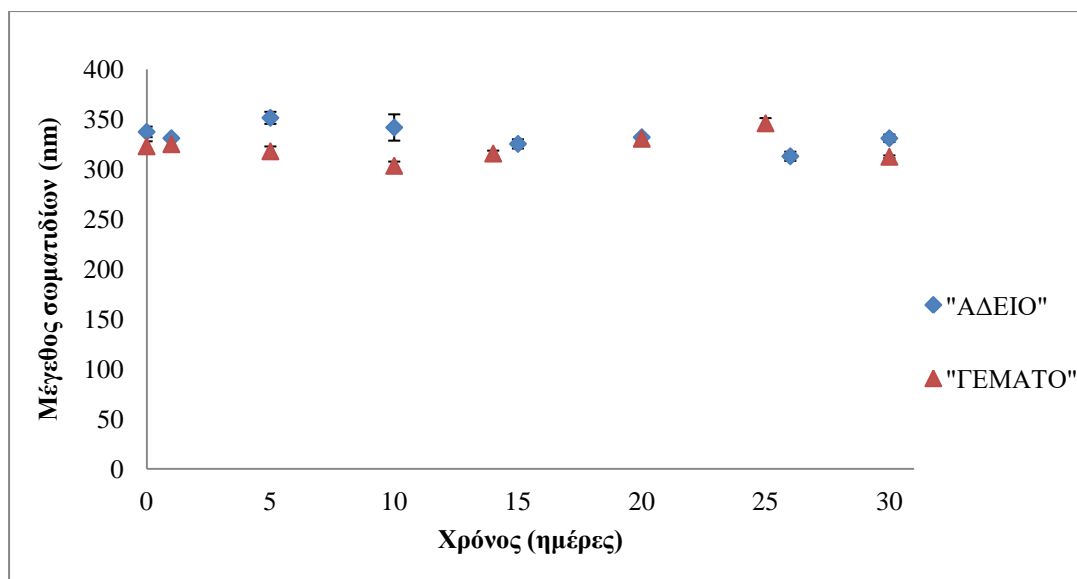
Συγκρίνοντας, με βάση τα φυτικά έλαια και για επιφανειοενεργό Tween 40 και προσθήκη βιταμίνης D, παρατηρούμε ότι το σύστημα με ελαιόλαδο παρουσιάζει καλύτερη σταθερότητα, με μικρότερες αυξομειώσεις μεγέθους απ' ό,τι με σογιέλαιο, ωστόσο δεν είναι αξιοσημειώτες οι διαφορές μεταξύ των φυτικών ελαίων.



Διάγραμμα 8: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 60) και 6% σογιέλαιο ή ελαιόλαδο με βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση.

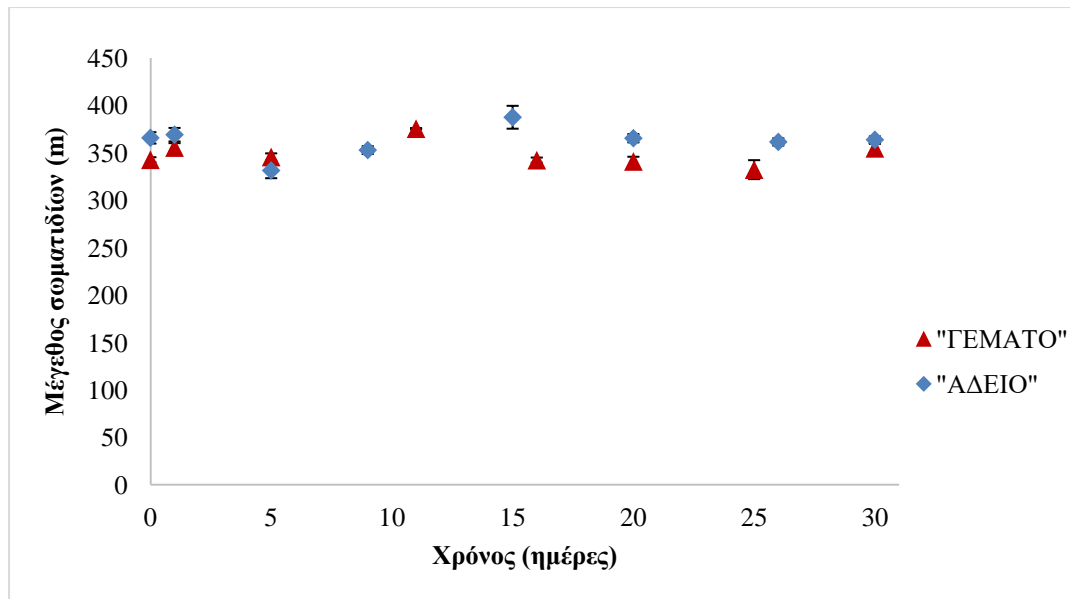
Στο Διάγραμμα 8 εμφανίζονται οι μετρήσεις της κατανομής του μεγέθους σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων με την πάροδο του χρόνου για τα συστήματα με Tween 60, ελαιόλαδο ή σογιέλαιο και βιταμίνης D. Η σταθερότητα των συστημάτων μετρήθηκε με τη τεχνική DLS έως τις 30 ημέρες. Για το σύστημα με σογιέλαιο, παρατηρείται σταθερότητα στο μέγεθος των σωματιδίων στα 350 nm περίπου. Για το ελαιόλαδο το μέγεθος αυξομειώνεται και είναι εμφανώς μεγαλύτερο από το σογιέλαιο. Φτάνει έως και τα 400 nm με μια απότομη μείωση την 5^η ημέρα στα 350 nm.

Με βάση τα Διαγράμματα (5, 6, 7 και 8) με βιταμίνη D, συμπεραίνουμε ότι και στα συστήματα αυτά, παρατηρήθηκε σταθερότητα στο μέγεθος των νανοσταγονιδίων για 30 ημέρες. Με το επιφανειοενεργό Tween 40, τα συστήματα είχαν μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με το Tween 60 και καλύτερη σταθερότητα. Όσον αφορά τα φυτικά έλαια, το σογιέλαιο παρουσίασε καλύτερη σταθερότητα, με μικρότερες αυξομειώσεις και μέγεθος από ότι το ελαιόλαδο στην πάροδο του χρόνου.



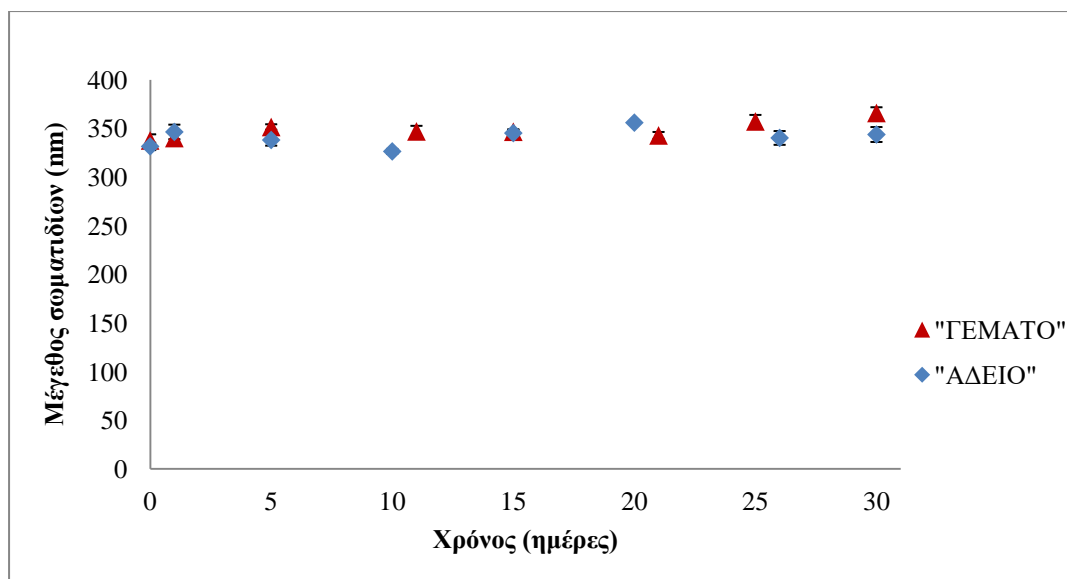
Διάγραμμα 9: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40) και 6% σογιέλαιο με και χωρίς βιταμίνη D. Μήτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Το Διάγραμμα 9 παρουσιάζει την σταθερότητα των συστημάτων με σογιέλαιο και επιφανειοενεργό Tween 40 με και χωρίς Βιταμίνη D σε σχέση με το χρόνο. Και για τα δύο συστήματα παρατηρούνται αυξομειώσεις στο μέγεθος των σωματιδίων με το εύρος να κυμαίνεται από 300 έως 350 nm. Αναλυτικότερα, για το «γεμάτο» σύστημα διακρίνεται σταθερότητα μέχρι την 14^η ημέρα και στη συνέχεια το μέγεθος σταδιακά αυξάνεται έως και 350 nm την 25^η ημέρα. Αντίθετα για το «άδειο» σύστημα φαίνεται να είναι μεγάλο το μέγεθος των σταγονιδίων από τις πρώτες μέρες και στη συνέχεια, κατά τη 15^η ημέρα να παρατηρείται μια μείωση μεγέθους, όπου τελικά την 30^η ημέρα είναι εμφανής ο διαχωρισμός των δύο φάσεων με αύξηση του μεγέθους.



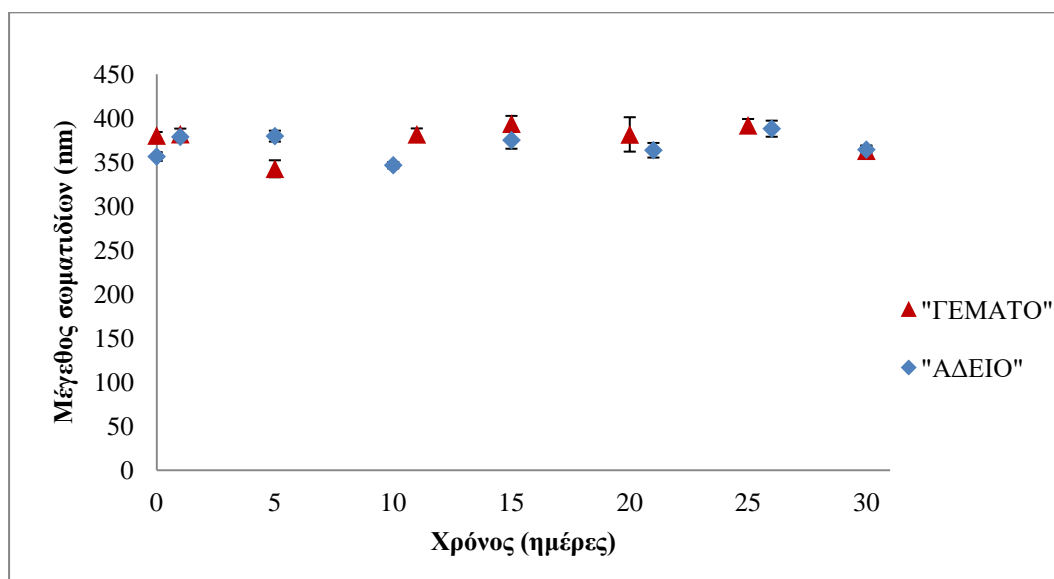
Διάγραμμα 10: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 60) και 6% σογιέλαιο με και χωρίς βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζεται πως κατανέμεται το μέγεθος των σωματιδίων από τα νανογαλακτώματα για τα συστήματα με σογιέλαιο, Tween 60 με και χωρίς βιταμίνη D. Παρατηρούνται διακριτές αυξομειώσεις στο μέγεθος των νανοσταγονιδίων για το σύστημα χωρίς τη βιταμίνη D, («άδειο») με το μέγεθος να είναι στα 330 nm την 5^η ημέρα, στα 390 nm την 15^η ημέρα και 360 nm την 30^η ημέρα. Για το «γεμάτο» σύστημα, το μέγεθος είναι κοντά στα 350 nm κατά την πάροδο του χρόνου, με την 5^η ημέρα να φτάνει στα 330 nm. Διακρίνεται καλύτερη σταθερότητα σε σχέση με το «άδειο» σύστημα και με μικρότερες αυξομειώσεις μεγέθους.



Διάγραμμα 11: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοεργά (Tween 40) και 6% ελαιόλαδο με και χωρίς βιταμίνη D. Μήτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Για το Διάγραμμα 11, όπου φαίνεται η κατανομή του μεγέθους σωματιδίων των νανογαλακτωμάτων για τα συστήματα με ελαιόλαδο, Tween 40 με και χωρίς προσθήκη βιταμίνης D, παρατηρείται ότι οι διαφορές μεταξύ «άδειου» και «γεμάτου» συστήματος είναι μικρές σε σχέση με το χρόνο. Και για τα δύο συστήματα παραμένουν σταθερά στο πέρας των μετρήσεων χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικές αυξομειώσεις στο μέγεθος των σταγονιδίων. Το «γεμάτο» σύστημα με εγκλωβισμό βιταμίνης D, είναι κοντά στα 350 nm, ενώ για το σύστημα χωρίς βιταμίνη, το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ των 340 nm.



Διάγραμμα 12: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 60) και 6% ελαιόλαδο με και χωρίς βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση.

Στο παραπάνω Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται η κατανομή του μέγεθος των σωματιδίων από τα νανογαλακτώματα για τα συστήματα με ελαιόλαδο, Tween 60 με και χωρίς βιταμίνη D. Για το «γεμάτο» σύστημα παρατηρείται σταθερότητα κατά τη διάρκεια του χρόνου στα 380 nm περίπου με τη μόνο αξιολογημένη παρατήρηση την 5^η ημέρα το μέγεθος να πέφτει κάτω από τα 350 nm. Για το «άδειο» σύστημα διακρίνονται αυξομειώσεις στο μέγεθος των νανοσταγονιδίων κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Κατά τη 10^η ημέρα το μέγεθος μειώνεται κοντά στα 350 nm, ενώ σταδιακά τις επόμενες μέρες αυξάνεται στα 370 nm, με μια ελάχιστη πτώση την 20^η ημέρα και ξανά αύξηση μεγέθους την 26^η ημέρα.

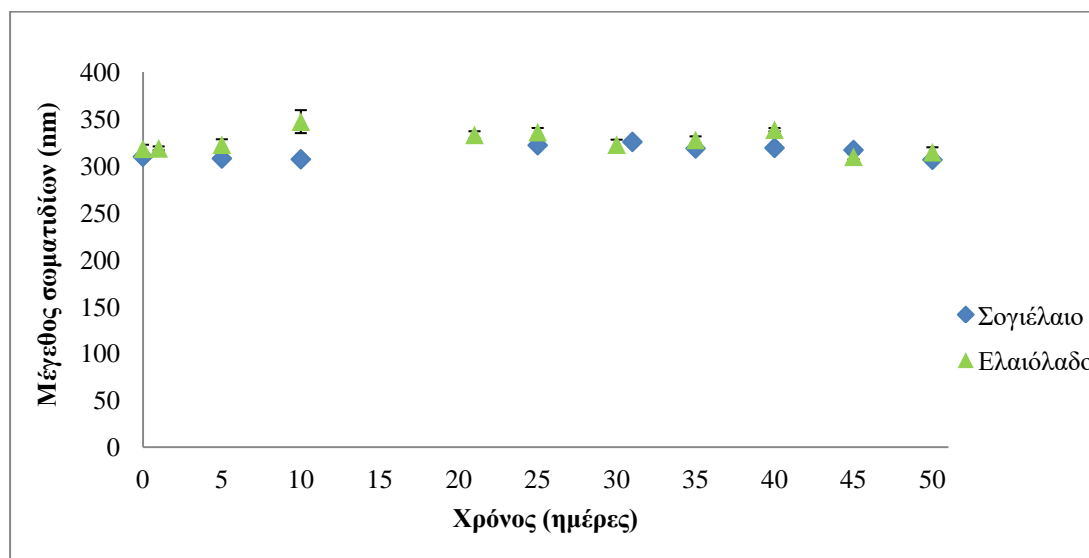
Συνεπώς, για το σύστημα με ελαιόλαδο και Tween 60, καλύτερη σταθερότητα φάνηκε με προσθήκη βιταμίνης D, από ότι με το «άδειο» σύστημα. Όσον αφορά το μέγεθος, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές για το «γεμάτο» σύστημα, καθώς αποδίδεται στην προσθήκη βιταμίνης D.

Με βάση επομένως τα παραπάνω Διαγράμματα (9, 10, 11 και 12) με και χωρίς βιταμίνη D, συμπεραίνουμε ότι καλύτερη σταθερότητα στο μέγεθος των νανοσταγονιδίων παρατηρήθηκε για τα συστήματα με εγκλωβισμό βιταμίνης D για 30 ημέρες. Αυτό δικαιολογείται με το γεγονός ότι η βιταμίνη D επιδρά με τη δυναμική μεσεπιφάνειας στην κolloειδής διασπορά (Golfomitsou *et al.*, 2018) Με το επιφανειοενεργό Tween 40, τα συστήματα είχαν μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με το Tween 60 και ήταν πιο σταθερά στο χρόνο και για τα δύο φυτικά έλαια, σογιέλαιο και ελαιόλαδο.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις, επιλέγει το σύστημα με επιφανειοενεργό το Tween 40 και με σογιέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα για τον εγκλωβισμό της βιταμίνης D και την ενσωμάτωση μέρους του νανογαλακτώματος στο άπαχο πρόβειο γάλα.

Το Διάγραμμα 13, παρουσιάζει την κατανομή του μεγέθους των νανοσταγονιδίων σε σχέση με το χρόνο για τα συστήματα με συγκέντρωση βιταμίνης $1.3 \times 10^{-6} \text{M}$, επιφανειοενεργό Tween 40 και φυτικά έλαια σογιέλαιο και ελαιόλαδο. Για το σύστημα με σογιέλαιο παρατηρείται σταθερότητα του μεγέθους των

σταγονιδίων στα 330 nm περίπου για διάρκεια 50 ημερών όπου μετά επήλθε οπτικός διαχωρισμός των δύο φάσεων. Αντίστοιχα για το ελαιόλαδο, πάρθηκαν τιμές για το μέγεθος των σωματιδίων της διεσπαρμένης φάσης για 50 ημέρες όπου και παρατηρήθηκε σταθερότητα στο διάστημα αυτό. Συγκριτικά με τα δύο φυτικά έλαια, το ελαιόλαδο παρουσίασε μεγαλύτερο μέγεθος σταγονιδίων από το σογιέλαιο και αυξομειώσεις κατά το διάστημα μετρήσεων. Αύξηση φαίνεται την 10^η ημέρα, με το μέγεθος να φτάνει στα 400 nm και στη συνέχεια να διατηρείται περίπου στα 335 nm.



Διάγραμμα 13: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για το σύστημα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (Tween 40) και 6% σογιέλαιο ή ελαιόλαδο αντίστοιχα με βιταμίνη D. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

3.2 Ομάδα συστημάτων με φυτικά έλαια, μίγμα επιφανειοενεργών και νερό

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές του μεγέθους των σταγονιδίων (nm) της διεσπαρμένης φάσης στα συστήματα νανογαλακτωμάτων και οι τυπικές αποκλίσεις αυτών όπως μετρήθηκαν με το DLS. Στα συστήματα με την κατά βάρος προσέγγιση αποτελούμενα από 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (MILKO PRO) και 6% σογιέλαιο και ηλιέλαιο αντίστοιχα, καθώς και με μίγμα επιφανειοενεργών με 2% MILKO PRO + 2% Tween 60 και 6% σογιέλαιο ή ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο καθώς και με Tween 40 αντίστοιχα, παρατηρήθηκε σταθερότητα σε σχέση με το χρόνο για περίπου 15 ημέρες και στη συνέχεια διαχωρισμός των δύο φάσεων. Στη συνέχεια ακολουθούν και διαγράμματα αυτών.

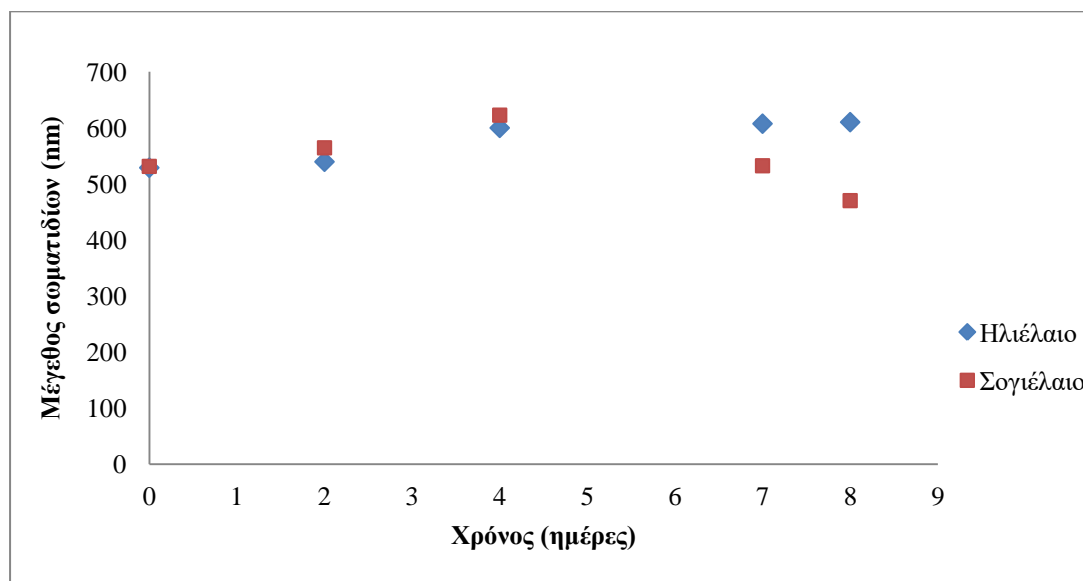
Πίνακας 7. Μέγεθος διασκορπισμένων σταγονιδίων (nm) της λιπαρής φάσης στο νανογαλάκτωμα με κατά βάρος προσέγγιση των δειγμάτων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργά (MILKO PRO) και 6% σογιέλαιο και ηλιέλαιο αντίστοιχα, και με μίγμα επιφανειοενεργών με 2% MILKO PRO + 2% Tween 60 και 6% σογιέλαιο ή ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο καθώς και με Tween 40 αντίστοιχα.

ΜΕΓΕΘΟΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ (nm)												
ΗΜΕΡΑ												
Δείγμα	0	1η	2η	3η	4 ^η	7 ^η	8η	9η	10η	11η	14η	15η
4% επιφανειοενεργά + 6% σογιέλαιο ΑΔΕΙΟ	531.4	549.86	564.5	492.53	622.8	532.47	470.27	433.36	429.6	423.97	416.37	409.33
4% επιφανειοενεργά + 6% ηλιέλαιο ΑΔΕΙΟ	529	628.17	539.63	562.5	600.07	607.53	610.32	545.02	446.27	444.22	391.03	471.77
2% MILKO + 2% Tween60, 6% σογιέλαιο M.O ΑΔΕΙΟ	291.97 ±3.62	293.72 ±2.01	273.58 ±4.07	297.3 ±0.72	304.17 ±8.47	298.66 ±6.89	290.81 ±4.94	281.14 ±3.3	259.7 ±5.73	287.42 ±4.21	300 ±4.83	301.84 ±3.77
2% MILKO + 2% Tween60, 6% ηλιέλαιο M.O ΑΔΕΙΟ	306.37 ±4.15	291.33 ±2.98	295.48 ±4.57	299.07 ±6.53	324.53 ±11.72	302.67 ±7.14	292.19 ±4.67	309.7 ±4.43	301.9 ±4.21	331.4 ±5.88	361.81 ±8.26	352.78 ±9.06
2% MILKO + 2% Tween 60, 6% ελαιόλαδο M.O ΑΔΕΙΟ	297.57 ±3.52	306.12 ±5.5	292.57 ±4.93	292.09 ±7.62	285.27 ±6.33	280.8 ±5.18	316.13 ±7.47	293.4 ±4.37	314.5 ±14.77	298.9 ±3.28	288.5 ±6.35	394.87 ±3.1

2% MILKO + 2%Tween 40, 6% σογιέλαιο Μ.Ο ΑΔΕΙΟ	288.22 ±4.94	274.67 ±4.08	271.52± 3.73	263.77± 5.07	268.77 ±3.57	263.58 ±2.73	294.07 ±2.79	286.82 ±9.97	270.82 ±3.3	292 ±1.87	290.87 ±4.1	332.93 ±6.26
2% MILKO + 2%Tween 40, 6% ηλιέλαιο Μ.Ο ΑΔΕΙΟ (2)	277.25	293.38	282.72	269.05	269.97	268.89	283.46	317.28				
2% MILKO + 2%Tween 40, 6% ελαιόλαδο Μ.Ο ΑΔΕΙΟ (3)	317.46 ±4.63	302.65 ±6.09	297.1 ±1.65	285.31 ±1.97		335.14 ±3.23	324.93 ±5.33	365.47 ±3.75	309.87 ±6.13		349.2 ±6.71	336.53 ±15.89

Διαγράμματα Σταθερότητας (Mean Droplet Size)

Το Διάγραμμα 14 αναφέρεται στην κατανομή του μετρούμενου μεγέθους των σωματιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργό (MILKOPRO 7067) και 6% σογιέλαιο ή ηλιέλαιο αντίστοιχα, με μία επανάληψη χωρίς προσθήκη βιταμίνης D. Σημειώθηκε σταθερότητα στο μέγεθος και για τα δύο συστήματα μέχρι 8 ημέρες.

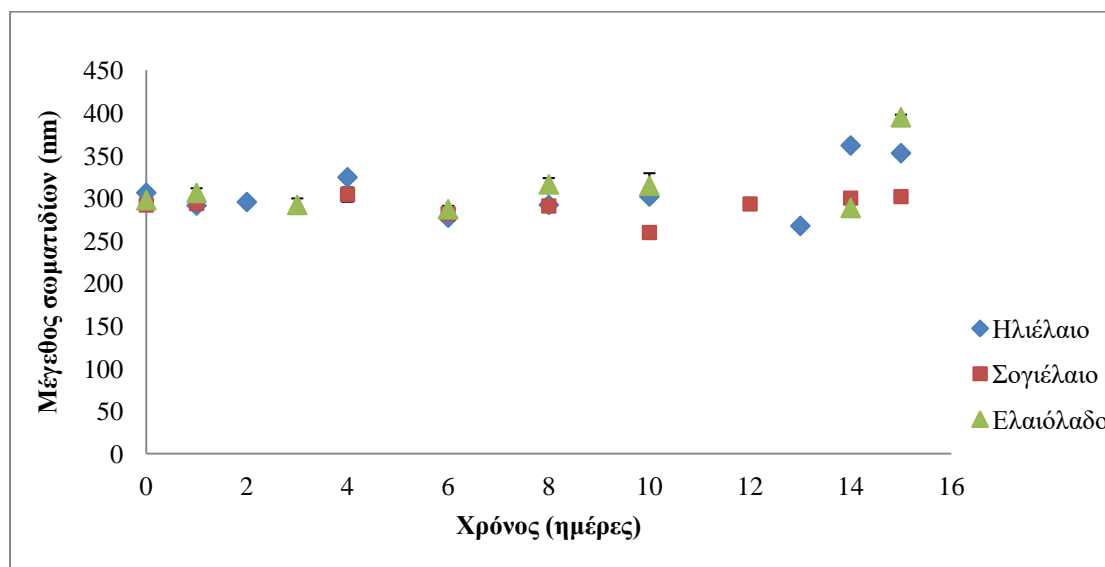


Διάγραμμα 14: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για το σύστημα με 90% νερό, 4% επιφανειοενεργό (MILKO PRO) και 6% σογιέλαιο ή ηλιέλαιο με μια (1) επανάληψη. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS.

Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα με φυτικό έλαιο το σογιέλαιο, είχε μέγεθος νανοσταγονιδίων κοντά στα 530nm τις πρώτες μέρες ενώ φαίνεται μια απότομη αύξηση την 4^η ημέρα με το μέγεθος να ξεπερνά τα 600 nm. Σταδιακά, το μέγεθος ελαττώνεται τις επόμενες μέρες και μετρήθηκε στα 500 nm περίπου την 7^η ημέρα. Από την 8^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκε οπτικός διαχωρισμός των δύο φάσεων, όπου και ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις.

Για το σύστημα με φυτικό έλαιο το ηλιέλαιο, παρατηρήθηκε ότι το αρχικό μέγεθος των νανοσταγονιδίων ήταν γύρω στα 520 nm τις δύο πρώτες μέρες, και στη συνέχεια ακολούθησε σταδιακή αύξηση μεγέθους στα 600 nm μέχρι και την 8^η ημέρα. Το συγκεκριμένο σύστημα παρέμεινε σταθερό στο χρόνο και μετά την 8^η ημέρα διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις, που επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις με το DLS.

Συνεπώς από τα δύο συστήματα με το επιφανειοενεργό MILKO PRO, καλύτερη σταθερότητα σε σχέση με το χρόνο παρουσιάζει εκείνο με το ηλιέλαιο. Ωστόσο, το συμπέρασμα δεν θεωρείται αξιόπιστο καθώς στο πείραμα είχε πραγματοποιηθεί μόνο μια επανάληψη.



Διάγραμμα 15: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60) και 6% ηλιέλαιο ή σογιέλαιο ή ελαιόλαδο αντίστοιχα χωρίς βιταμίνη D (Άδεια). Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Στο παραπάνω Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους με την πάροδο του χρόνου σε τρία (3) διαφορετικά συστήματα με το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων επαναλήψεων χωρίς προσθήκη βιταμίνης D. Τα συστήματα αποτελούνται από 90% νερό, μίγμα επιφανειοενεργών με 2% MILKOPRO 7067 και 2% Tween 60 (1:1) και 6% σογιέλαιο ή ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο αντίστοιχα. Τα συστήματα παρέμειναν σταθερά μέχρι και τη 14^η ημέρα.

Πιο συγκεκριμένα, για το σύστημα με σογιέλαιο, παρατηρούμε ότι παρέμεινε σταθερό το μέγεθος των σωματιδίων στα 300nm περίπου με μικρές αυξομειώσεις μέχρι και τη 15^η ημέρα. Απότομη πτώση φαίνεται να υπάρχει κατά τη 10^η ημέρα με τιμή μεγέθους στα 250nm.

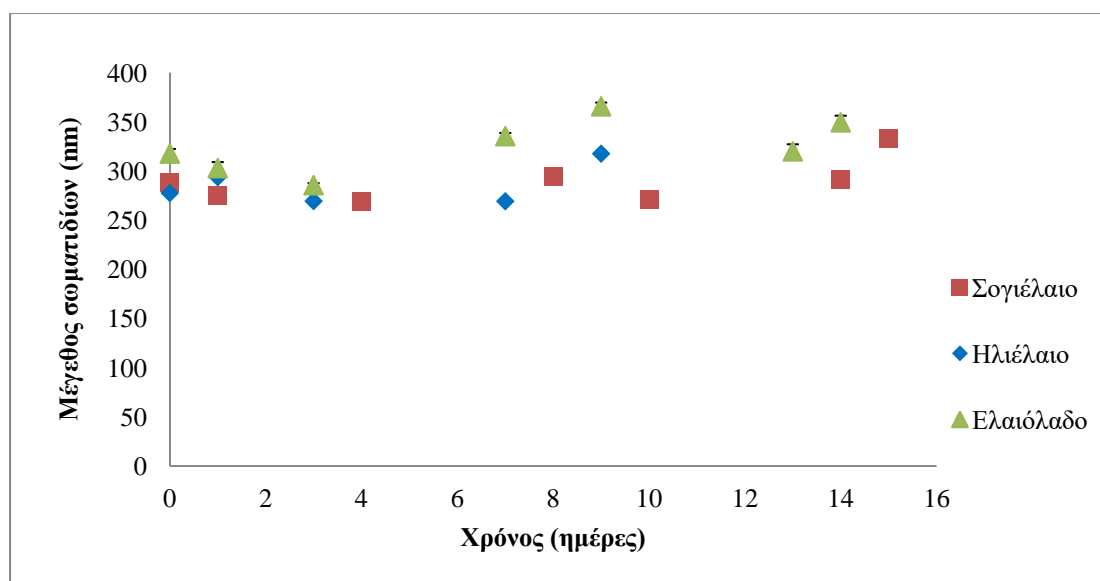
Για το σύστημα με ηλιέλαιο, είναι πιο εμφανείς οι διακυμάνσεις των τιμών στο μέγεθος των σωματιδίων. Φαίνεται να υπάρχουν αυξομειώσεις από την 4^η ημέρα με αύξηση του μεγέθους στα 320nm και σταδιακή μείωση έως τη 14^η που

παρατηρείται έντονη αύξηση στα 360 nm και τελικά οπτικός διαχωρισμός των δύο φάσεων, όπου και απορρίφθηκε το δείγμα αυτό.

Όσον αφορά το σύστημα με ελαιόλαδο, φαίνεται μια σταθερότητα του μεγέθους των νανοσταγονιδίων από την 1^η έως την 14^η ημέρα να κυμαίνεται κοντά στα 300 nm. Ωστόσο από την 15^η ημέρα παρατηρείται απότομη αύξηση του μεγέθους καθώς αγγίζει σχεδόν τα 400 nm και να καταλήγει σε διαχωρισμό των δύο φάσεων.

Συγκρίνοντας τα 3 συστήματα με τα διαφορετικά φυτικά έλαια και μίγμα επιφανειοενεργών με Tween 60 και MILKO PRO, καταλήγουμε στο ότι καλύτερη σταθερότητα μεγέθους παρατηρήθηκε στα συστήματα με φυτικό έλαιο το σογιέλαιο και ελαιόλαδο, όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα αλλά μικρότερο μέγεθος σωματιδίων στο σύστημα με το σογιέλαιο.

Στο παρακάτω Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των νανογαλακτωμάτων σε τρία (3) διαφορετικά συστήματα για 15 ημέρες με το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων επαναλήψεων χωρίς προσθήκη βιταμίνης D για τα συστήματα με το σογιέλαιο και ελαιόλαδο, ενώ για το ηλιέλαιο το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων. Η 3^η επανάληψη απέτυχε παρά τις πολλές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν. Τα συστήματα αποτελούνται από 90% νερό, μίγμα επιφανειοενεργών με 2% MILKOPRO 7067 και 2% Tween 40 (1:1) και 6% σογιέλαιο ή ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο αντίστοιχα.



Διάγραμμα 16: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60) και 6% ηλιέλαιο ή σογιέλαιο ή ελαιόλαδο

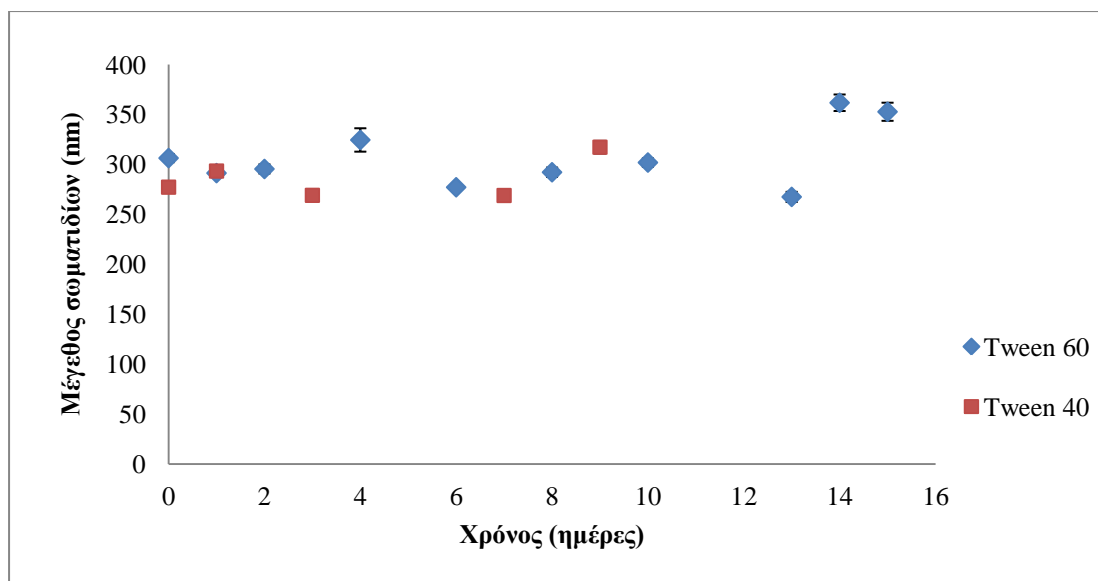
αντίστοιχα χωρίς βιταμίνη D (Άδεια). Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση.

Από το Διάγραμμα 16, με το φυτικό έλαιο σογιέλαιο, παρατηρείται μια σταθερότητα στο μέγεθος των σωματιδίων στα 270 nm περίπου, με μικρές αυξομειώσεις μέχρι και τη 14^η ημέρα. Από τη 15^η ημέρα φαίνεται να υπάρχει αύξηση του μεγέθους που να ξεπερνά τα 300 nm και τελικά διαχωρισμός των δύο φάσεων, όπου και ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις για το σύστημα αυτό.

Για το σύστημα με ηλιέλαιο, και τις δύο επαναλήψεις, παρατηρείται σταθερότητα στο μέγεθος των σωματιδίων πάνω από τα 250 nm περίπου, με πολύ μικρές αυξομειώσεις μέχρι και τη 8^η ημέρα, ενώ από την 9^η το μέγεθος των σωματιδίων αυξάνεται και ξεπερνά τα 300 nm ώσπου διαχωρίζονται οι φάσεις και το δείγμα απορρίπτεται.

Τέλος για το σύστημα με ελαιόλαδο, παρατηρείται μια αυξομείωση στις μετρούμενες τιμές του μεγέθους των σωματιδίων από 300 έως 360 nm περίπου. Αύξηση στο μέγεθος μετρήθηκε την 7^η ημέρα στα 340 nm και τη 9^η ημέρα να ξεπερνά τα 350 nm και στη συνέχεια σταδιακή μείωση. Από τη 13^η ημέρα πάλι φαίνεται να υπάρχει αύξηση του μεγέθους στα 315 nm περίπου και τελικά να διαχωρίζεται το σύστημα τη 15^η ημέρα.

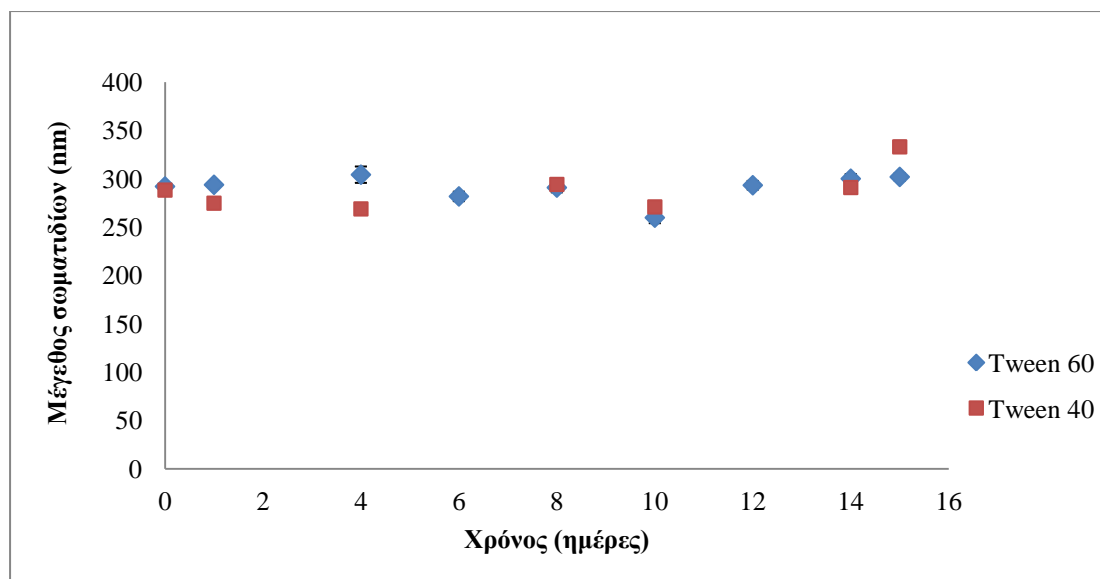
Από το Διάγραμμα 16, εξάγεται το συμπέρασμα ότι από τα 3 συστήματα με τα διαφορετικά φυτικά έλαια (σογιέλαιο, ηλιέλαιο, ελαιόλαδο), καλύτερη σταθερότητα σε σχέση με το χρόνο φαίνεται να έχει το σύστημα με το σογιέλαιο. Το σύστημα με το ηλιέλαιο απορρίφθηκε λόγω μη επαναληψιμότητας της 3^{ης} μέτρησης και μη σταθερότητας στη πάροδο του χρόνου. Το σύστημα με ελαιόλαδο παρουσίασε διακύμανση στο μέγεθος με αρκετές αυξομειώσεις και μη σταθερότητα σε σχέση με το χρόνο.



Διάγραμμα 17: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60/ Tween40) και 6% ηλιέλαιο χωρίς βιταμίνη D (Άδεια). Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση για το σύστημα με Tween 60, ενώ στην περίπτωση με Tween 40 μέσοι όροι 2 μετρήσεων.

Το Διάγραμμα 17 παρουσιάζει την κατανομή του μεγέθους για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60/ Tween40) και 6% ηλιέλαιο χωρίς βιταμίνη D με το πέρας των ημερών. Από το Διάγραμμα παρατηρείται ότι το σύστημα με Tween 40, διατηρείται σταθερό μέχρι και την 9^η ημέρα με δύο επαναλήψεις και μέγεθος σωματιδίων κοντά στα 270 nm. Από την 9^η ημέρα και μετά, το μέγεθος αυξάνεται σημαντικά και τελικά παρατηρείται οπτικός διαχωρισμός. Για το σύστημα με μίγμα επιφανειοενεργών Tween 60 και MILKOPRO και ηλιέλαιο, είναι εμφανείς οι αυξομειώσεις στο μέγεθος των σωματιδίων. Την 4^η ημέρα μετρήθηκε τιμή μεγέθους στα 330 nm, στη συνέχεια παρατηρήθηκε μείωση στα 270 nm περίπου και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση, με απότομη μείωση την 13^η ημέρα στα 260 nm. Την 14^η ημέρα το μέγεθος έφτασε τα 360 nm και τελικά επήλθε διαχωρισμός του συστήματος.

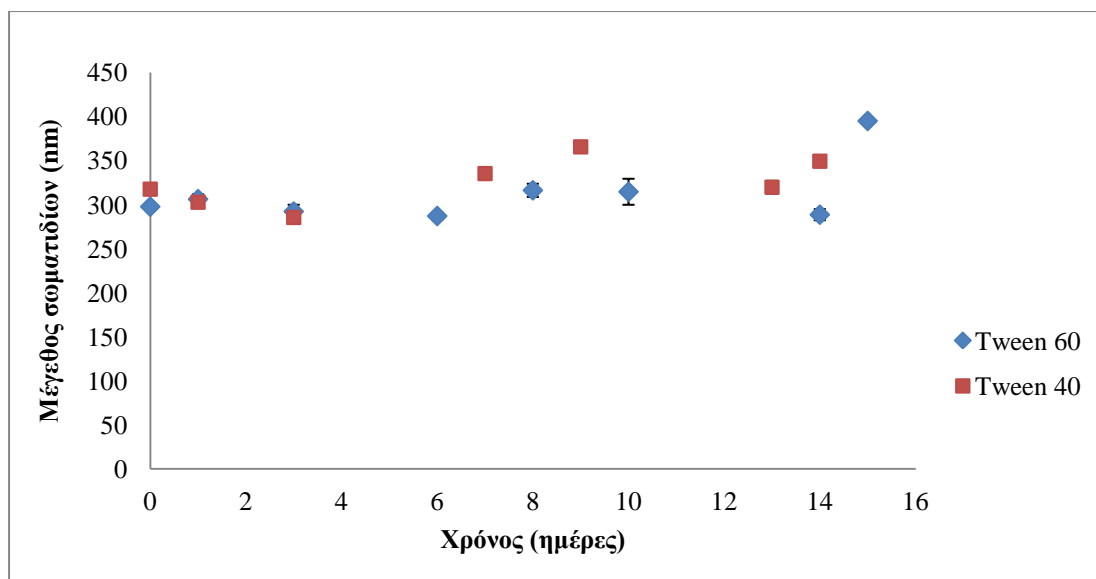
Από τα παραπάνω δύο συστήματα, εκείνο με το επιφανειοενεργό Tween 40 δεν κρίνεται αξιόπιστο για να θεωρηθεί σταθερό σε σχέση με το χρόνο, καθώς πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις με σταθερότητα έως την 9^η ημέρα.



Διάγραμμα 18: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60/ Tween40) και 6% σογιέλαιο χωρίς βιταμίνη D (Άδεια). Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Από το Διάγραμμα 18 απεικονίζεται η κατανομή του μεγέθους των νανογαλακτωμάτων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60/ Tween40) και 6% σογιέλαιο χωρίς προσθήκη βιταμίνης D σε σχέση με το χρόνο για 15 ημέρες. Παρατηρείται σταθερότητα στο μέγεθος των σωματιδίων με το Tween 40 στα 280 nm περίπου μέχρι και τη 14^η ημέρα. Από τη 15^η ημέρα το μέγεθος αυξάνεται και ξεπερνά τα 300 nm και τελικά παρατηρείται διαχωρισμός των δύο φάσεων, όπου και ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις για το σύστημα αυτό. Για το σύστημα με μίγμα επιφανειοενεργών Tween 60 και MILKO PRO, παρατηρούνται αυξομειώσεις στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, όπου τη 10^η ημέρα το μέγεθος «πέφτει» στα 250 nm και στη συνέχεια αυξάνεται σταδιακά στα 300 nm μέχρι και τη 15^η ημέρα, όπου και διαχωρίζονται οι δύο φάσεις του συστήματος.

Συγκρίνοντας τα δύο συστήματα, θεωρούνται σταθερά στην πάροδο του χρόνου, με μεγαλύτερο μέγεθος τιμών να παρουσιάζει το σύστημα με το επιφανειοενεργό Tween 60.



Διάγραμμα 19: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60/ Tween40) και 6% ελαιόλαδο χωρίς βιταμίνη D (Αδεια). Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μέσοι όροι 3 μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους στα συστήματα με 90% νερό, 4% μίγμα επιφανειοενεργών (MILKOPRO+Tween 60/ Tween40) και 6% ελαιόλαδο χωρίς βιταμίνη D με το πέρας των ημερών στις 15. Από τις εμφανιζόμενες τιμές παρατηρείται ότι το σύστημα με Tween 40, παρουσιάζει αυξομειώσεις, με μείωση κατά την 3^η ημέρα στα 280 nm και σταδιακή αύξηση του μεγέθους την 9^η ημέρα στα 360 nm και τελικά μείωση την 13^η ημέρα στα 310 nm. Για το αντίστοιχο σύστημα με Tween 60, οι αυξομειώσεις στις τιμές δεν είναι τόσο έντονες, ωστόσο το εύρος κυμαίνεται από 270 έως 310nm, με άνοδο τιμών κατά την 8^η ημέρα και μείωση τη 14^η ημέρα στα 280 nm.

Από τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι καλύτερη σταθερότητα για το σύστημα με ελαιόλαδο από τα δύο επιφανειοενεργά φαίνεται να έχει το Tween 60 καθώς παρουσιάζει και μικρότερο μέγεθος από το σύστημα με Tween 40. Τελικά από την ομάδα των συστημάτων με μίγμα επιφανειοενεργών (1:1) και φυτικά έλαια (σογιέλαιο, ηλιέλαιο, ελαιόλαδο), στα οποία μελετήθηκε η σταθερότητα του μεγέθους των νανοσταγονιδίων σε σχέση με το χρόνο στις 15 περίπου ημέρες, συμπεραίνουμε ότι περισσότερο σταθερό παρέμεινε το σύστημα που περιείχε το σογιέλαιο και λιγότερο σταθερό εκείνο με το ηλιέλαιο.

3.3 Ομάδα συστημάτων με άπαχο γάλα, ζωική κρέμα και επιφανειοενεργά

3.3.1. Μετρήσεις με κατ' όγκο προσέγγιση

Οι μετρήσεις των δειγμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Για το δείγμα 1% κρέμα χωρίς βιταμίνη D πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις. Στις δύο πρώτες μετρήσεις καταγράφηκε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων του γαλακτος από τη 14^η μέρα σε σύγκριση με την 3^η μέτρηση που παρατηρήθηκε αύξηση από τη 2^η κιόλας ημέρα. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται και για το δείγμα 1% κρέμα με βιταμίνη D, στο οποίο η 1^η μέτρηση έγινε μέχρι και την 13^η ημέρα ενώ η 2^η μέτρηση μέχρι την 1^η μέρα, γεγονός που οδηγεί στην μη επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

Για τα δείγματα 1.5% κρέμα τόσο με βιταμίνη D όσο και χωρίς υπήρξαν κάποια τεχνικά προβλήματα κατά τη διάρκεια του πειράματος στο στάδιο της ανάδευσης με αποτέλεσμα οι μετρήσεις καταγράφηκαν μέχρι τη 2^η μέρα για το 1.5% κρέμα με βιταμίνη D και για το δείγμα χωρίς βιταμίνη D μέχρι την 1^η ημέρα.

Γενικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με τη χρήση συστάσεων κατ' όγκο (v/v) παρατηρήθηκε αστάθεια των δειγμάτων η οποία μπορεί να οφείλεται στη δυσκολία χειρισμού των δειγμάτων λόγω του υψηλού ιξώδους της κρέμας. Για το λόγο αυτό, η προσέγγιση αυτή εγκαταλείφτηκε και τα πειράματα συνεχίστηκαν με συστάσεις κατά βάρος (w/w).

3.3.2 Μετρήσεις με κατά βάρος προσέγγιση

Στη συνέχεια, στα δείγματα (άπαχο γάλα και κρέμα) προστέθηκε μείγμα πρωτεϊνών, τα οποία θα μπορούσαν να δράσουν ως επιφανειοδραστικές ουσίες και να βελτιώσουν την ομογενοποίηση των συστατικών στη φάση ανάμειξης τους πριν τη χρήση ομογενοποιητή (προ-γαλάκτωμα).

Πιο συγκεκριμένα, στο δείγμα με 1% κρέμα προστέθηκε (5%) μείγμα πρωτεϊνών (MILKOPRO 7067) απουσία και παρουσία της βιταμίνης D. Για το «άδειο» σύστημα, έγινε μέτρηση μέχρι την 5^η ημέρα και το πείραμα επαναλήφθηκε μόνο μία φορά. Για το αντίστοιχο δείγμα με την προσθήκη της βιταμίνης D, για το οποίο πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα, είχαμε δύο διαφορετικά αποτελέσματα όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Η 1^η επανάληψη του «γεμάτου» συστήματος (1 και 5 % w/w ενισχυμένη κρέμα και μείγμα πρωτεϊνών αντίστοιχα) διήρκησε μια μέρα ενώ στη 2^η παρατηρήθηκε μακροσκοπικά ότι το

δείγμα είχε «πήξει» λόγω σφάλματος του ομογενοποιητή. Στη 2^η επανάληψη του πειράματος το δείγμα μετρήθηκε μέχρι και την 8^η μέρα.

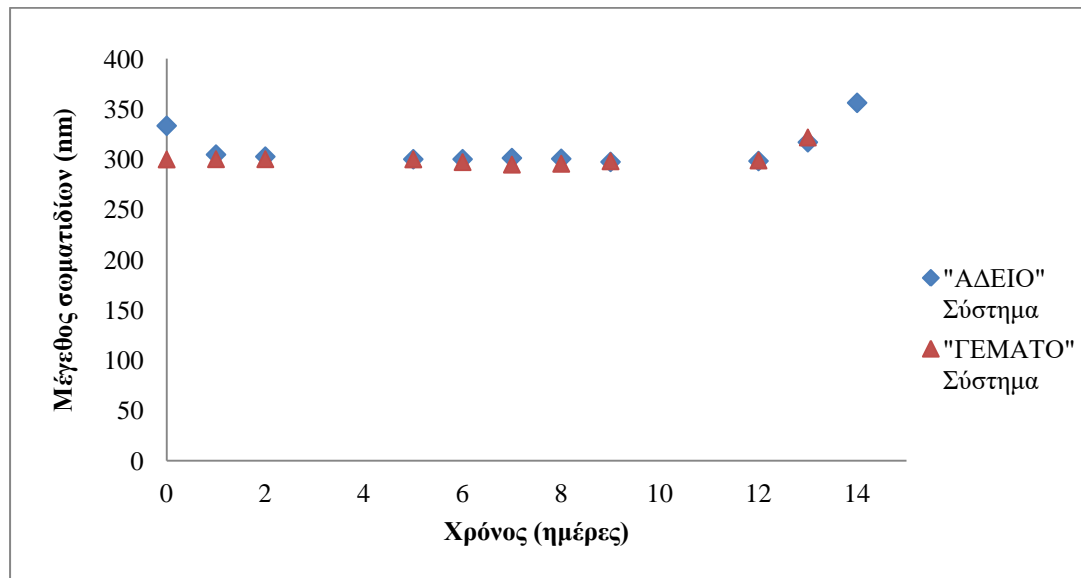
Αντίστοιχα, κατασκευάστηκαν δείγματα με 1 % κρέμα και 6 ή 8 % w/w μείγμα πρωτεϊνών τα οποία μετρήθηκαν και αυτά ως και την όγδοη μέρα από τη μέρα παρασκευής τους με συντήρηση στο ψυγείο.

Πίνακας 8. Μέγεθος διασκορπισμένων σταγονιδίων (nm) της λιπαρής φάσης στο νανογαλάκτωμα με κατ' όγκο προσέγγιση των δειγμάτων για τα συστήματα με 1% O/O κρέμα χωρίς και με Βιταμίνη D και της ομάδας συστημάτων με κατά βάρος προσέγγιση για 1% κρέμα ΑΔΕΙΟ με 6% και 8% επιφανειοενεργά αντίστοιχα και με 1% κρέμα ΑΔΕΙΟ και με Βιταμίνη D με 5% επιφανειοενεργά.

ΜΕΓΕΘΟΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ (nm)											
ΗΜΕΡΕΣ											
<i>Δείγμα</i>	0	1^η	2^η	5^η	6^η	7^η	8^η	9^η	12^η	13^η	14^η
1% κρέμα ΑΔΕΙΟ	333.24	304.57	302.55	299.97	300	301.11	300.4	297.3	298.16	316.85	356.1
1% κρέμα Βιταμίνη D	299.75	300	300	299.8	297.1	294.6	295.45	297.9	298.71	321.63	
1.5% κρέμα ΑΔΕΙΟ	286.5										
1.5% κρέμα Βιταμίνη D	283.63	293.28	322.08								
1% κρέμα ΑΔΕΙΟ + 5% επιφανειοενεργά	410.63	495.88									
1% κρέμα Βιταμίνη D + 5% επιφανειοενεργά	591.8	602.13		614.35	614.88	613.03	609.01				
1% κρέμα ΑΔΕΙΟ + 6% επιφανειοενεργά	522.95	575.5		664	670.73	687.91	692.03				
1% κρέμα ΑΔΕΙΟ + 8%	618.6	654.43		666.05	659.6	660.45	666.78				

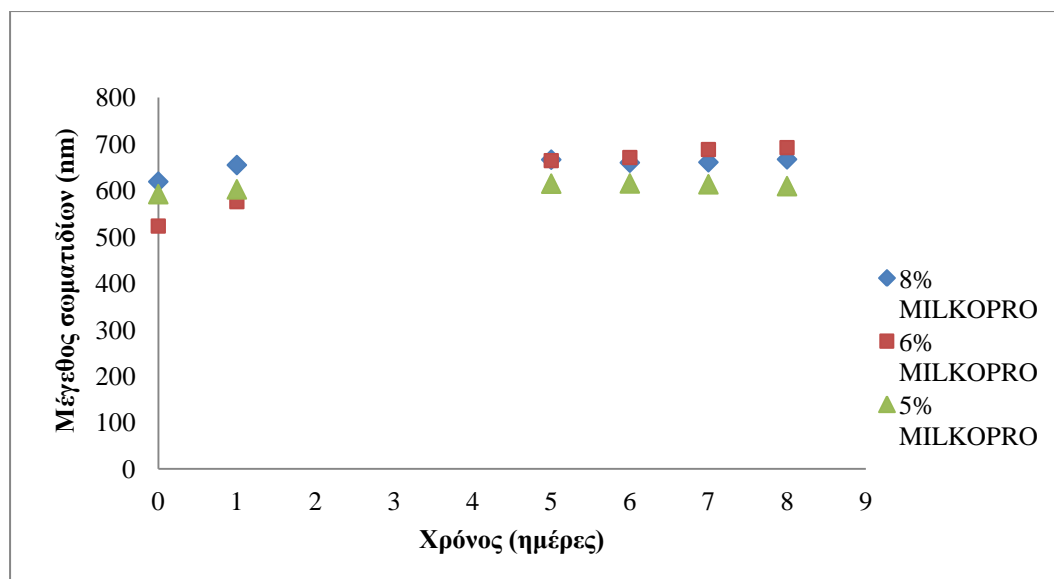
επιφανειο ενεργά											
------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Διαγράμματα Σταθερότητας (mean droplet size)



Διάγραμμα 19: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για συστήματα με προσθήκη 1 % (v/v) κρέμας με και χωρίς Βιταμίνη D σε άπαχο γάλα. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μία μέτρηση.

Στο Διάγραμμα 19 που αναφέρεται για το δείγμα γάλακτος με 1% κρέμα κατ'όγκο με και χωρίς ενσωμάτωση βιταμίνης D, παρατηρούμε ότι μέχρι και την 12^η μέρα για τα δύο συστήματα το μέγεθος των σωματιδίων παραμένει σταθερό κοντά στα 300 nm. Ανοδική πορεία φαίνεται να υπάρχει μετά την 13^η ημέρα όπου και παρατηρήθηκε οπτικά διαχωρισμός των δύο φάσεων και τα δείγματα απορρίφθηκαν.



Διάγραμμα 20: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για τα συστήματα με προσθήκη 1 % (w/w) κρέμας ενισχυμένη με Βιταμίνη D σε άπαχο γάλα και 5%, 6% και 8% επιφανειοενεργά αντίστοιχα. Μέτρηση σταγονιδίων με τη τεχνική DLS. Οι τιμές δίνονται ως μία μέτρηση.

Στο παραπάνω Διάγραμμα 20 για το σύστημα με 1% κρέμα κατά βάρος ενισχυμένο με βιταμίνη D και την προσθήκη 5%, 6% και 8% επιφανειοενεργών (MILKOPRO 7067) αντίστοιχα, παρατηρείται ότι το μέγεθος των σωματιδίων παραμένει σταθερό μέχρι και την 8^η μέρα που μετρήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση με την προσθήκη 5% επιφανειοενεργών, το μέγεθος των σωματιδίων είναι σταθερό στα 600 nm έως και την 8^η ημέρα. Για το δείγμα με 6% επιφανειοενεργά, παρατηρούμε ότι ξεκινάει από 500 nm και σταδιακά αυξάνεται στα 690 nm, ενώ για το σύστημα με την προσθήκη 8% επιφανειοενεργών το μέγεθος των σωματιδίων είναι την 1^η ημέρα στα 600 nm και φτάνει έως τα 690 nm περίπου. Ωστόσο, για την τελευταία περίπτωση, παρατηρήθηκε ότι στο δείγμα αλλοιώθηκαν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά καθώς είχε έντονη οσμή και αλλαγή χρώματος, οπότε και απορρίφθηκε ως σύστημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της παρουσίας επιφανειοδραστικών ουσιών που είναι μίγμα πρωτεϊνών το μέγεθος των σταγονιδίων φαίνεται να επηρεάζεται, δηλαδή να αυξάνεται με προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας τους.

3.4 Δομική μελέτη νανογαλακτώματος

Το σύστημα που τελικά επιλέχθηκε για μελέτη και ανάπτυξη, καθώς και για την ενθυλάκωση της Βιταμίνης D, αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- Έλαιο (Oil): 6% Εξευγενισμένο ελαιόλαδο (διεσπαρμένη φάση)

- Επιφανειοενεργά (Surfactants): 4% Tween 40 (ή Tween 60)
- Υδατική φάση (Aqueous phase): 90% Απιονισμένο νερό

Για την παρασκευή των «άδειων» και των «γεμάτων» νανογαλακτωμάτων, χρειάστηκε αρχικά μηχανική ανάδευση και ακολούθησαν 10 κύκλοι ομογενοποίησης σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) αμέσως μετά την παρασκευή των συστημάτων, αλλά και ανά τακτά χρονικά διαστήματα για να εξεταστεί η συμπεριφορά τους κατά την αποθήκευση.

3.4.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Προκειμένου να εξεταστεί η διάμετρος των νανοσταγόνων, η ομοιομορφία των συστημάτων αλλά και η σταθερότητά τους στην πάροδο του χρόνου, πραγματοποιήθηκε μελέτη Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), παρουσία και απουσία Βιταμίνης D.

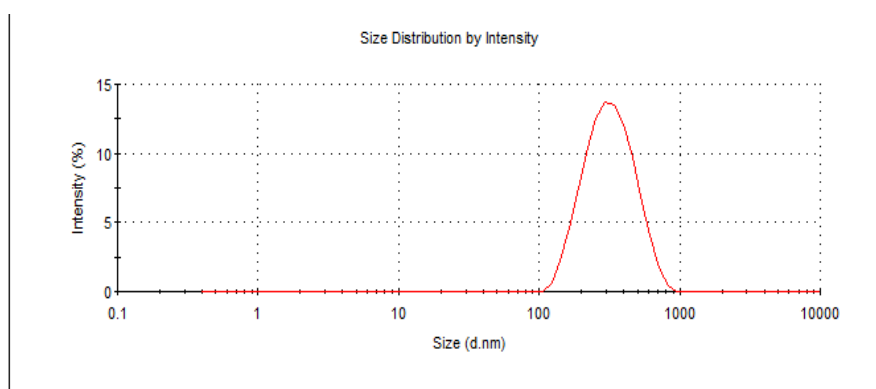
3.5 Ενσωμάτωση Νανογαλακτώματος στο Γάλα

Με την ενσωμάτωση του νανογαλακτώματος ενισχυμένο με βιταμίνη D στο γάλα και την διατήρησή του υπό ψύξη, πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές περιπτώσεις πειραμάτων. Στην 1^η περίπτωση ποσότητα από το νανογαλάκτωμα ενισχυμένο με βιταμίνη D με σογιέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα, ενσωματώθηκε στο άπαχο πρόβειο γάλα. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για το κάθε σύστημα. Στη 2^η περίπτωση, ποσότητα νανογαλακτώματος ενισχυμένο με βιταμίνη D με ελαιόλαδο ενσωματώθηκε στο γάλα και στη συνέχεια ακολούθησε ομογενοποίηση με 5 κύκλους ανακυκλοφορίας στα 200 bar. Έγινε μόνο μία επανάληψη.

Παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δύο φάσεων την 1^η κιόλας ημέρα και στις δύο περιπτώσεις. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με DLS αμέσως μετά την παρασκευή τους. Από τις μετρήσεις αυτές βρέθηκαν πληθυσμοί σταγονιδίων έως και 330 nm για την περίπτωση με ομογενοποίηση του ίδιου του νανογαλακτώματος με ελαιόλαδο και γάλα στους 5 κύκλους ανακυκλοφορίας. Στην περίπτωση με ενσωμάτωση του νανογαλακτώματος στο γάλα με ελαιόλαδο το μέγεθος των σωματιδίων την ημέρα παρασκευής τους (day 0) ήταν 368 nm και για σογιέλαιο 338

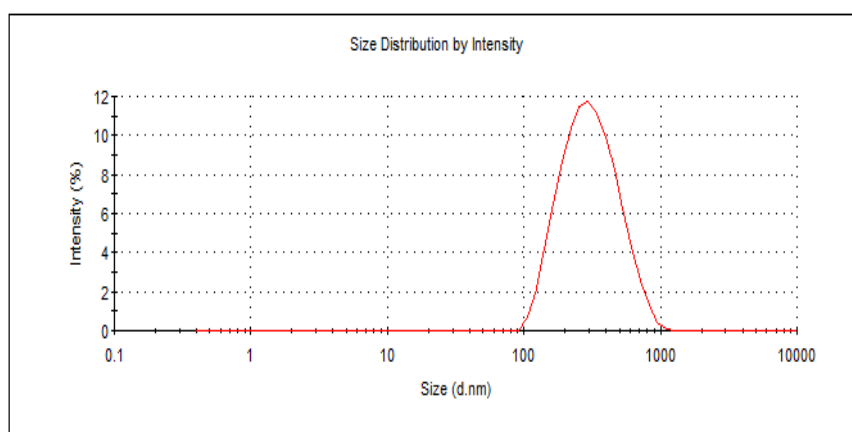
nm. Από την 1^η ημέρα, παρατηρήθηκε οπτικά διαχωρισμός των δυο φάσεων και το μέγεθος να αυξάνεται για το ελαιόλαδο 370 nm και σογιέλαιο 369 nm.

Τα διαγράμματα DLS δείχνουν την μέση υδροδυναμική διάμετρο των σταγονιδίων και την κατανομή των πληθυσμών κατ'όγκο. Συσχετίζουν την μέση διάμετρο τους με τον σχετικό όγκο τους. Παρέχεται έτσι μία αναλυτική κατανομή των πληθυσμών, συναρτήσει του όγκου τους στο νανογαλάκτωμα. Παρακάτω, παρουσιάζεται η κατανομή μεγεθών, όπως μετρήθηκε με το DLS, την 1^η μέρα παρασκευής του:



Εικόνα 4: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων στο άπαχο γάλα με ενσωμάτωση νανογαλακτώματος (ελαιόλαδο) εμπλουτισμένο με Βιταμίνη D και ομογενοποίησης κατά την ημέρα παρασκευής (day 0). Μέτρηση από DLS.

Από το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 4) φαίνεται ότι υπάρχει ένας μοναδικός πληθυσμός νανοσταγονιδίων με αρκετά μεγάλη ομοιογένεια (PdI = 0.183).



Εικόνα 5: Κατανομή μεγέθους σταγονιδίων για το άπαχο πρόβειο γάλα. Μέτρηση από DLS.

Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται η κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων για το άπαχο πρόβειο γάλα, σε κλίμακα νανόμετρων από μέτρηση που πάρθηκε από τον αναλυτή DLS. Διακρίνεται ένας πληθυσμός σωματιδίων με το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) να είναι 0.186.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αναπτύχθηκαν εδώδιμα νανογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (o/w) και διερευνήθηκε η δυνατότητα χρήσης τους ως φορείς ενθυλάκωσης βιταμίνης D3. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η σταθερότητα του μεγέθους των νανοσταγονιδίων του ελαίου στη διάρκεια του χρόνου και η ενσωμάτωση του νανογαλακτώματος σε άπαχο πρόβειο γάλα. Αναλυτικότερα, ακολουθήθηκαν δύο προσεγγίσεις. Στην 1^η, παρασκευάστηκε o/w νανογαλακτώμα με νερό, φυτικά έλαια (σογιέλαιο, ελαιόλαδο) και επιφανειοενεργά (Tween 40, Tween 60) εμπλουτισμένο με βιταμίνη D με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης για εύρος πίεσης από 360-380 bar και με 10 κύκλους ανακυκλοφορίας. Η μελέτη σταθερότητας πραγματοποιήθηκε με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (ΔΣΦ) με το μέγεθος των νανοσταγονιδίων να είναι έως και 360 nm με εγκλωβισμένη την βιταμίνη D και 320 nm χωρίς αυτή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επετεύχθη σταθερότητα για περίπου 30 ημέρες για τα νανογαλακτώματα με και χωρίς τη βιταμίνη D συγκέντρωσης $5,2 \times 10^{-5} \text{ M}$. Για συγκέντρωση βιταμίνης D $2,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ τα συστήματα με Tween 40 και σογιέλαιο ή ελαιόλαδο παρέμειναν σταθερά για 50 ημέρες. Ωστόσο, όταν ενσωματώθηκε ποσότητα του νανογαλακτώματος αυτού ενισχυμένο με βιταμίνη D στο πρόβειο άπαχο γάλα παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δύο φάσεων από την 1^η κιόλας ημέρα. Για την ομάδα συστημάτων με μίγμα επιφανειοενεργών (1:1) και φυτικά έλαια, παρατηρήθηκε καλύτερη σταθερότητα μεγέθους με το σογιέλαιο και για επιφανειοενεργό το Tween 40 στις 15 περίπου ημέρες. Για το ελαιόλαδο σημειώθηκε μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων και με το ηλιέλαιο μη σταθερότητα στη διάρκεια του χρόνου.

Η 2^η προσέγγιση αναφέρεται σε νανογαλακτώμα με το ίδιο το άπαχο πρόβειο γάλα ως συνεχή φάση και την προσθήκη ζωικής κρέμας ως διεσπαρμένη φάση. Για τη προσέγγιση αυτή υπήρξαν δύο σκέλη, όπου στον 1^ο η σύσταση ήταν κατ' όγκο (v/v) και στο 2^ο κατά βάρος (w/w), όπου προστέθηκαν και επιφανειοδραστικές ουσίες (MILKOPRO 7067) σε ποσοστά 5%, 6% και 8% αντίστοιχα. Η παρασκευή των συστημάτων πραγματοποιήθηκε με ομογενοποιητή υψηλής πίεσης στα 200 bar με 5 κύκλους ανακυκλοφορίας και ακολούθως, μελετήθηκε ο δομικός χαρακτηρισμός των νανο-σταγονιδίων στο χρόνο με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), παρουσία και απουσία της βιταμίνης D. Για την περίπτωση κατ' όγκο σύστασης το μέγεθος των νανοσταγονιδίων χωρίς βιταμίνη D κυμαινόταν στα 490 nm ενώ με

παρουσία της έφτασε έως και 610 nm. Τα συστήματα με την προσθήκη ενός ποσοστού επιφανειοενεργών παρέμειναν σταθερά στο χρόνο και οι μετρήσεις πάτηκαν μέχρι και την 8^η ημέρα χωρίς να παρατηρηθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων. Ωστόσο, για το σύστημα με ποσοστό 8% επιφανειοενεργού (MILKO PRO) παρατηρήθηκε αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως έντονη οσμή και διαφοροποίηση στο χρώμα, όπου και απορρίφθηκε.

Σε μια πρόσφατη μελέτη των Golfomitsou *et al.*, (2018), όπου παρασκευάστηκε νανογαλάκτωμα τύπου έλαιο-σε-νερό (O/W) με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (800-1000 bar) και με 10 κύκλους ανακυκλοφορίας, πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση βιταμίνης D3 και στη συνέχεια ενσωματώση σε πλήρες παστεριωμένο γάλα έδειξε ότι δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δύο φάσεων και οποιαδήποτε οπτική διαφοροποίηση του τροφίμου για 10 ημέρες. Το μέγεθος των ναοσταγονιδίων, όπως μετρήθηκε με την τεχνική του DLS ήταν γύρω στα 470 nm. Στο πείραμα χρησιμοποίησαν ως επιφανειοδραστικές ουσίες Tween 20 και μίγμα αυτού με λεκιθίνη σε αναλογία 3:1 και ως λιπαρή φάση το σογιέλαιο σε διάφορα ποσοστά καθώς και μίγμα του με βούτυρο κακάο. Από τις μετρήσεις με DLS παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός πληθυσμού ναοσταγονιδίων στο εμπλουτισμένο με βιταμίνη D παστεριωμένο γάλα εμπορίου. Επιτεύχθηκε λοιπόν σταθερότητα του εμπλουτισμένου με βιταμίνη D3 γάλακτος, χωρίς διαχωρισμό των δύο φάσεων και άλλη οπτική αλλαγή για 10 ημέρες, με περιεκτικότητα βιταμίνης τέτοια, ώστε ένα ποτήρι γάλακτος ~200mL να περιέχει την ημερήσια συνιστώμενη δόση βιταμίνης D.

Σε μια άλλη μελέτη, οι Guttoff *et al.*, (2015) παρασκεύασαν νανογαλάκτωμα με βιταμίνης D με αυθόρμητη γαλακτοματοποίηση. Διερεύνησαν την επίδραση της βιταμίνης D και των τριγλυκεριδίων μεσαίας αλυσίδας (Medium Chain Triglycerides, MCT) σε διάφορες αναλογίες επιφανειοδραστικού προς το έλαιο, τα επιφανειοενεργά Tween 20,40,60,80 και 85. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανογαλακτώματα με μικρό μέγεθος σταγονιδίων ($d < 200$ nm) θα μπορούσαν να σχηματιστούν χρησιμοποιώντας Tween 80 σε αναλογία επιφανειοδραστικού προς έλαιο ≥ 1 σε υψηλές ταχύτητες ανάδευσης (800 rpm). Τα συστήματα αυτά ήταν ασταθή στη θέρμανση ($T=80$ ° C). Η θερμική σταθερότητα θα μπορούσε να αυξηθεί με την επιλογή ενός κατάλληλου συν-επιφανειοενεργού (δωδεκυλοθειικό νάτριο).

Σύμφωνα με τους Polychniatou, & Tzia, (2014) τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι είναι δυνατόν να παρασκευασθούν σταθερά νανογαλακτώματα w/o με ραφινρισμένο ελαιόλαδο χωρίς την προσθήκη συν-επιφανειοενεργού αλλά με εδώδιμα μη ιοντικά επιφανειοδραστικά. Από τα επιφανειοδραστικά που μελετήθηκαν, με εξαίρεση το Tween 60, τα συστήματα παρουσίασαν ικανοποιητική σταθερότητα και ιδιότητες. Ειδικότερα, από τις μελετώμενες επιφανειοδραστικές ουσίες, το Span 20, το Tween 40 και το Tween 20 βρέθηκαν να είναι το πιο αποτελεσματικά ως προς τη σταθεροποίηση του νανογαλακτώματος σύμφωνα με τη μελέτη % του δείκτη σταθερότητας γαλακτώματος (Emulsion Stability Index, ESI). Τις χαμηλότερες τιμές μέσης διαμέτρου από τα γαλακτώματα παρουσίασαν τα συστήματα με Tween 40, Tween 80 και Span 20. Ειδικότερα, το ελάχιστο μέγεθος σταγονιδίου που μετρήθηκε ήταν 45 nm με την προσθήκη 4% w/w Tween 40, ενώ τα επιφανειοενεργά Span 20 και Tween 20 παρουσίασαν υψηλότερες απόλυτες τιμές του ζ-δυναμικού, υψηλό ESI% και χαμηλότερη θολρότητα υποδεικνύει παρατεταμένη σταθερότητα. Το χρώμα των νανογαλακτωμάτων συσχετίστηκε περισσότερο με τον τύπο του επιφανειοδραστικού και όχι με το λόγο.

Τα νανογαλακτώματα αποτελούν ένα από τα πιο υποσχόμενα συστήματα για τη βελτίωση της διαλυτότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και της λειτουργικότητας των υδρόφοβων ενώσεων. Η βιομηχανία τροφίμων επιδιώκει να χρησιμοποιεί αυτά τα συστήματα για την ενσωμάτωση, π.χ. λιπόφιλων λειτουργικών ενώσεων σε μήτρες τροφίμων. Ενώ υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες τεχνικές για την παραγωγή και τον χαρακτηρισμό των νανογαλακτωμάτων, μερικές από αυτές έχουν αποδειχθεί πιο κατάλληλες από άλλες. Εν ολίγοις, το DLS μπορεί να καθορίσει γρήγορα τη υδροδυναμική διάμετρο των νανοσταγονιδίων σε ένα νανογαλακτώμα, το δυναμικό zeta μπορεί να υποδεικνύει τη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων και η μικροσκοπία cryo-TEM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του σχήματος της διεσπαρμένης φάσης. Η εφαρμογή των νανογαλακτωμάτων στον τομέα των τροφίμων εξακολουθεί να θέτει προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν τόσο από άποψη παραγωγικής διαδικασίας, ιδιαίτερα το κόστος τους, όσο και από τον χαρακτηρισμό τόσο των παραγόμενων νανογαλακτωμάτων όσο και των συστημάτων τροφίμων στα οποία θα εφαρμοστούν από θέμα ασφάλειας και αποδοχής του προϊόντος (Silva *et al.*, 2012).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη δοκιμάστηκε η ενθυλάκωση της βιταμίνης D3 (χοληκαλσιφερόλη) σε εδώδιμα νανογαλακτώματα, ώστε αυτά να ενσωματωθούν σε άπαχο πρόβειο γάλα και στη συνέχεια προς τυροκόμηση με σκοπό τον εμπλουτισμό τυριού με βιταμίνη D.

Η μελέτη αυτή είχε δύο προσεγγίσεις όπου στην 1^η τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν ήταν τύπου έλαιο-σε-νερό (o/w) και είχαν ως συστατικά επιφανειοενεργά και φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων και ως εκ τούτου είναι ασφαλή, μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα. Ως επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν Tween 40, Tween 60 και μίγματα αυτών με MILKOPRO 7067 (1:1) και ως ελαιώδη φάση το ελαιόλαδο, σογιέλαιο και ηλιέλαιο. Η παρασκευή των νανοδιασπορών έγινε με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (360-390bar) στους 10 κύκλους ανακυκλοφορίας και παρατηρήθηκε σταθεροποίηση ενός (1) μήνα, χωρίς οπτικό διαχωρισμό των δύο φάσεων. Η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των επιφανειοενεργών και ελαίων στην κατανομή των μεγεθών των νανοσταγονιδίων και στην σταθερότητα τους στον χρόνο μελετήθηκε με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη νανογαλακτώματος παρουσία βιταμίνης D3 σε άπαχο πρόβειο γάλα με περιεκτικότητα βιταμίνης τέτοια, ώστε ένα ποτήρι γάλακτος ~200mL να περιέχει την ημερήσια συνιστώμενη δόση. Ωστόσο, παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δύο φάσεων από την 1^η κιόλας ημέρα και δεν επιτεύχθηκε σταθερότητα του εμπλουτισμένου με βιταμίνη D3 γάλακτος.

Κατά τη 2^η προσέγγιση της μελέτης, παρασκευάστηκε ένα νανογαλάκτωμα με το ίδιο το άπαχο πρόβειο γάλα και την προσθήκη ζωικής κρέμας ως τη λιπαρή φάση. Στη προσέγγιση αυτή έγινε χρήση συστάσεων κατ' όγκο (v/v) και κατά βάρος (w/w), όπου προστέθηκαν και επιφανειοδραστικές ουσίες (MILKOPRO 7067). Οι νανοδιασπορές παρασκευάστηκαν και σταθεροποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης στα 200 bar με 5 κύκλους ανακυκλοφορίας και ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δομική μελέτη των νανο-σταγονιδίων στο χρόνο με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS), παρουσία και απουσία της βιταμίνης D με το μέγεθος των νανοσταγονιδίων να κυμαίνεται έως και 610 nm με εγκλωβισμένη την βιταμίνη D και 490 nm χωρίς αυτή. Τα συστήματα με

την προσθήκη ενός ποσοστού επιφανειοενεργών παρέμειναν σταθερά στο χρόνο και οι μετρήσεις πάθησαν μέχρι και την 8^η ημέρα χωρίς να παρατηρηθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων.

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης καταλήγουμε στο ότι θα χρειαστεί η βιομηχανία τροφίμων να πραγματοποιήσει το τελικό στάδιο που είναι η διαδικασία της τυροκόμισης ώστε να συμπεράνουμε εάν το πείραμα είχε επιτυχία καθώς ήταν ένα δύσκολο εγχείρημα. Παρόλο τις χρήσιμες και ελπιδοφόρες πληροφορίες, η μελέτη αυτή παρέχει προοπτικές για περαιτέρω έρευνα. Θα χρειαστεί να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα και βελτιστοποιήσεις για την ενσωμάτωση της βιταμίνης D στα συστήματα ναογαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Abd El-Salam, M.H., El-Shibiny, S., (2011). A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science and Technology* 97, 663–699.

Aguilera, J. M. (2000). Microstructure and food product engineering. *Food Technology*, 54(11), 56-65.

Anifantakis, E.M. (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk. Pages 42–53 in Proceedings, IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk. Sept. 23–25, 1985, Athens, Greece, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, Bulletin No. 202.

Alichanidis, E., Moatsou, G., & Polychroniadou, A. (2016). Composition and properties of non-cow milk and products. In *Non-Bovine Milk and Milk Products* (pp. 81-116). Academic Press.

Alichanidis, E., & Polychroniadou, A. (1996). Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. In *Production and utilization of ewe and goat milk, Crete (Greece), 19-21 Oct 1995*. International Dairy Federation.

Anifantakis, E.M., (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cows' milk. International Dairy Federation Bulletin No 202, 42–53.

Arvanitoyannis, I. S., & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, M. (2005). Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(5), 385-404.

Ballard, B., Morrow, A.L., (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America* 60, 49–74.

Beliciu, C. M., & Moraru, C. I. (2009). Effect of solvent and temperature on the size distribution of casein micelles measured by dynamic light scattering. *Journal of dairy science*, 92(5), 1829-1839.

Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing systems. AB. S-221 86. *Lund, Sweden*, 18-23.

Chaari, M., Theochari, I., Papadimitriou, V., Xenakis, A., & Ammar, E. (2018). Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro-and nano-emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 219-227.

Chatzidaki, M. D., & Xenakis, A. (2019). Food Soft Nano-Dispersions for Bioactive Delivery: General Concepts and Applications.

Chatzidaki, M. D. (2016). *Formulation and characterization of W/O nano-dispersions for bioactive delivery applications*(Doctoral dissertation, Örebro university).

Clydesdale, F. M. (1997). A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutrition reviews*, 55(12), 413-422.

Codex Alimentarius, (2013). Milk and Milk products, second ed. FAO/WHO Food Standards

Crowe, K. M., & Francis, C. (2013). Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(8), 1096-1103.

Csapó, J., Stefler, J., Martin, T.G., Makray, S., Csapó-Kiss, Z., (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *International Dairy Journal* 5, 393–402.

Cosenza, G., Gallo, D., Illario, R., Di Gregorio, P., Senese, C., Ferrara, L., & Ramunno, L. (2003). A MvaI PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat α -lactalbumin locus. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 355-357.

Doreau, M., Martin-Rosset, W., (2002). Dairy animals: horse. In: Roginski, H., Fuquay, J.A., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK, pp. 630–637.

European Commission. Functional foods. Accessed October 24, 2012. (ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/kbbe/docs/functional-foods_en.pdf.)

European Union, 2005. Regulation (EC) No 2073/2005 of the European Parliament and of the Council of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L338, 48, 1–26.

European Union, 2008. Commission Regulation (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Union* L88, 51, 1–115.

FAOSTAT, 2013. Statistics Division of Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Available from <http://faostat3.fao.org/download/Q/QL/E> (accessed September 2015).

Farah, Z., Rettenmaier, R., Atkins, D., (1992). Vitamin content of camel milk. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 62, 30–33.

Freitas, C., & Malcata, F. X. (2000). Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83(3), 584-602.

- Golfomitsou, I., Mitsou, E., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2018). Development of food grade O/W nanoemulsions as carriers of vitamin D for the fortification of emulsion based food matrices: a structural and activity study. *Journal of Molecular Liquids*, 268, 734-742.
- Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., Chen, S.W., Dong, M.L., Ren, F.Z., (2007). Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution and amino acid profile of donkey milk. *Journal of Dairy Science* 90, 1635–1643.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841.
- Institute of Food Technologists. Functional foods: Opportunities and challenges. March 2005. Accessed October 24, 2012.
- International Food Information Council. Functional foods. Published July 2011. Accessed October 24, 2012
- International Life Sciences Institute. Perspectives on ILSI's international activities on functional foods. May 2009. Accessed October 24, 2012.
- Gibson, G. R., & Williams, C. M. (2005). *Functional foods*. IFIS Publishing.
- Grumezescu, A. (Ed.). (2016). *Emulsions* (Vol. 3). Academic Press.
- Haenlein, G. F., & Wendorff, W. L. (2006). Sheep milk. *Handbook of milk of non-bovine mammals*, 137-194.
- Hardy, G., & Marin, A. (2000, April). The nutritional value of sheep milk: a natural supplement for clinical nutrition. In *Proceedings, International Symposium, Development Strategy for the Sheep and Goat Dairy Sector, Nicosia, Cyprus, Brit. Sheep Dairy News* (Vol. 17, pp. 23-24).
- Hassan, P. A., Rana, S., & Verma, G. (2014). Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir*, 31(1), 3-12. Health Canada. Policy paper—Nutraceuticals/functional foods and health claims on foods. Published November 1998. Accessed October 24, 2012
- Henry, C. J. (2010). Functional foods.
- Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of food science*, 75(1), R50-R57.
- Japan Ministry of Health, Labour, and Welfare. Food for specialized health uses. Accessed October 24, 2012.
- Le, T. T., Saveyn, P., Hoa, H. D., & Van der Meeren, P. (2008). Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic

light scattering and nanoparticle tracking analysis. *International Dairy Journal*, 18(12), 1090-1096

Li, H., Ma, Y., Li, Q., Wang, J., Cheng, J., Xue, J., Shi, J., (2011). The chemical composition and nitrogen distribution of Chinese yak (Maiwa) milk. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 4885–4895.

Lomholt, S. B., & Qvist, K. B. (1999). The formation of cheese curd. *Technology of cheesemaking*, 3, 66-98.

Ma, Y., He, S., Li, H., (2013). Yak milk. In: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. J. Wiley & Sons, Ltd, Oxford, England, pp. 627–643.

Mahmoodani, F., Perera, C. O., Fedrizzi, B., Abernethy, G., & Chen, H. (2017). Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food chemistry*, 219, 373-381.

Mao, L., Xu, D., Yang, J., Yuan, F., Gao, Y., & Zhao, J. (2009). Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. *Food Technology and Biotechnology*, 47(3), 336-342.

Martini, M., Altomonte, I., Salari, F., Caroli, A.M., (2014b). Monitoring nutritional quality of Amiata donkey milk: effects of lactation and productive season. *Journal of Dairy Science* 97, 6819–6822.

Martirosyan, D. M., & Singharaj, B. Health Claims and Functional Food: The Future of Functional Foods under FDA and EFSA Regulation.

Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional foods in health and disease*, 5(6), 209-223.

Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., and Graves, S.M. (2006). Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 18(41):R635–R666

McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.

McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8(6), 1719-1729.

McClements, D. J. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in colloid and interface science*, 174, 1-30.

Medhammar, E., Wijesmha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Nilsson, E., Charrondiere, U.R., Burlingame, B., (2012). Composition of milk from minor dairy animals and

- buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 445–474.
- Mehaia, M. A. (1995). The fat globule size distribution in camel, goat, ewe, and cow milk. *Milchwissenschaft. Milk Science International*, 50, 260-263.
- Metzger, L. E., & Mistry, V. V. (1994). A New Approach Using Homogenization of Cream in the Manufacture of Reduced Fat Cheddar Cheese. 1. Manufacture, Composition, and Yield. *Journal of Dairy Science*, 77(12), 3506-3515.
- Mittaine, J., (1962). Milk other than cows' milk. In: WHO/ FAO, Milk Hygiene. World Health Organization monograph, Geneva, pp. 681–694.
- Myers, D. (2006). *Surfactant science and technology*. John Wiley & Sons.
- Murthy, G.K., D.H. Kleyn, T. Richardson, and R.M. Rocco. 1992. Alkaline phosphatase methods. Pages 413–431 in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th ed. T.R. Marshall (ed.). Am. Publ. Health Assoc., Inc., Washington, DC
- Nollet, L. M., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., & Hui, Y. H. (2012). *Food biochemistry and food processing*. John Wiley & Sons.
- O'connor, P., & Fox, P. F. (1977). The proteins and salts of some non-bovine milks. *Journal of Dairy Research*, 44(3), 607-609.
- Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88–113.
- Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of nanoparticle research*, 2(2), 123-131.
- Polychniatou, V., & Tzia, C. (2014). Study of formulation and stability of co-surfactant free water-in-olive oil nano-and submicron emulsions with food grade non-ionic surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 79-88.
- Potocnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., Cividini, A., (2011). Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo* 61, 107–113.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135(3), 1440-1447.
- Raynal, K., & Remeuf, F. (1998). The effect of heating on physicochemical and renneting properties of milk: a comparison between caprine, ovine and bovine milk. *International Dairy Journal*, 8(8), 695-706.
- Rauschenberger, S. L. (2001). *Development of the process technology for improved ovine milk products*. University of Wisconsin--Madison.

- Roco, M. C. (2007). National nanotechnology initiative-past, present, future. *Handbook on nanoscience, engineering and technology*, 2.
- Roberfroid, M. B. (2000). Defining functional foods. *Functional foods*, 9.
- Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Polidori, P., Varisco, G., (2004). Composition and characteristics of ass's milk. *Animal Research* 53, 67–78
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A., ... & Vicente, A. A. (2011). Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. *Journal of Food Engineering*, 102(2), 130-135.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854-867.
- Simos, E., Voutsinas, L.P., Pappas, C.P., (1991). Composition of milk of native Greek goats in the region of Metsovo. *Small Ruminant Research* 4, 47–60.
- Sheng, Q., Li, J., Alam, M.S., Fang, X., Guo, M., (2008). Gross composition and nutrient profile of Chinese yak (Maiwa) milk. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 568–572.
- Shimoni, E. (2009). Nanotechnology for foods: delivery systems. In *Global issues in food science and technology* (pp. 411-424). Academic Press.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nanoemulsions. *Current opinion in colloid & interface science*, 10(3-4), 102-110.
- Storry, J. E., Grandison, A. S., Millard, D., Owen, A. J., & Ford, G. D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research*, 50(2), 215-229.
- Theochari, I., Goulielmaki, M., Danino, D., Papadimitriou, V., Pintzas, A., & Xenakis, A. (2017). Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: the case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 350-356. Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (Eds.). (2016). *Non-bovine milk and milk products*. Academic Press.
- Uniake-Lowe, T., (2011). Studies on Equine Milk and Comparative Studies on Equine and Bovine Milk Systems (Ph.D. thesis). University College Cork, Cork.
- USFDA. 2002a. Part 131—Milk and cream. Code of Federal Regulations, Title 21, Food and Drugs. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
- USFDA. 2002b. Part 133—Cheeses and related cheese products. Code of Federal Regulations, Title 21, Food and Drugs. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.

Van Boekel, M. A. J. S. (1994). Transfer of milk components into cheese: scientific considerations. In *Proc. IDF Seminar, Cork, Ireland 1993: Factors affecting yield of cheese and systems for its control. IDF Special Issue no 9402, Brussel*(pp. 19-28).

Vo-Dinh, T., Griffin, G. D., Alarie, J. P., Cullum, B., Sumpter, B., & Noid, D. (2000). Development of nanosensors and bioprobes. *Journal of Nanoparticle Research*, 2(1), 17-27.

Voutsinas, L. P., Katsiari, M. C., Pappas, C. P., & Mallatou, H. (1995). Production of brined soft cheese from frozen ultrafiltered sheep's milk. Part 1. Physicochemical, microbiological and physical stability properties of concentrates. *Food Chemistry*, 52(3), 227-233.

Walker, R., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food & function*, 6(1), 41-54.

Wendorff, B. (2002). Milk composition and cheese yield. Pages 104–117 in *Proc. of 8th Great Lakes Dairy Sheep Symp.*, Dept. of Anim. Sci., Univ. of Wisconsin, Madison.

Young, P. (1986). Pasteurization of sheep milk. *Sheep Dairy News*, 3(1), 1-3.

Yu, H., & Huang, Q. (2012). Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(21), 5373-5379.

Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61-68.

Zhao, D., Bai, Y., Niu, Y., (2015). Composition and characteristics of Chinese Bactrian camel milk. *Small Ruminant Research* 127, 58–67.

6.2 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

<http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/small-ruminants/en/>

http://www.hcsc.gc.ca/fnan/labeletiquet/claimsreclam/nutrafunct_foodsnutrafonct_alimenteng.php#2.