



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

FORTIFICAZIONE DI ALIMENTI LATTIERO-
CASEARI CON LA VITAMINA D
FORTIFICATION OF DAIRY PRODUCTS WITH
VITAMIN D

TIPO TESI: (compilativa)

Studente:

ELIA MANZOTTI

Elia Manzotti

Relatore:

PROF./NADIA RAFFAELLI

Nadia Raffaelli

Correlatore:

DOTT./MASSIMILIANO GASPARRINI

Massimiliano Gasparri

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

1. INTRODUZIONE	2
2.1 METABOLISMO DELLA VITAMINA D	2
2.2 FUNZIONI DELLA VITAMINA D	4
2.3 ASSUNZIONE GIORNALIERA RACCOMANDATA	4
2.4 CARENZA	5
3. STRATEGIE PER PROMUOVERE UNO STATUS ADEGUATO DI VITAMINA D NELLA COMUNITA'	8
4. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA FORTIFICAZIONE CON VITAMINA D DEGLI ALIMENTI	9
5. PRODOTTI CASEARI FORTIFICATI CON LA VITAMINA D	13
6. REGOLAMENTAZIONE EUROPEA SULLA FORTIFICAZIONE ALIMENTARE CON LE VITAMINE ED I MINERALI	14
7. METODI RELATIVI ALLA FORTIFICAZIONE CON LA VITAMINA D DEI PRODOTTI CASEARI	15
8. STABILITA' DELLA VITAMINA D FORTIFICATA NEI PRODOTTI CASEARI	17
8.1 LATTE	21
9. CONCLUSIONI	25
10. BIBLIOGRAFIA	26

1. INTRODUZIONE

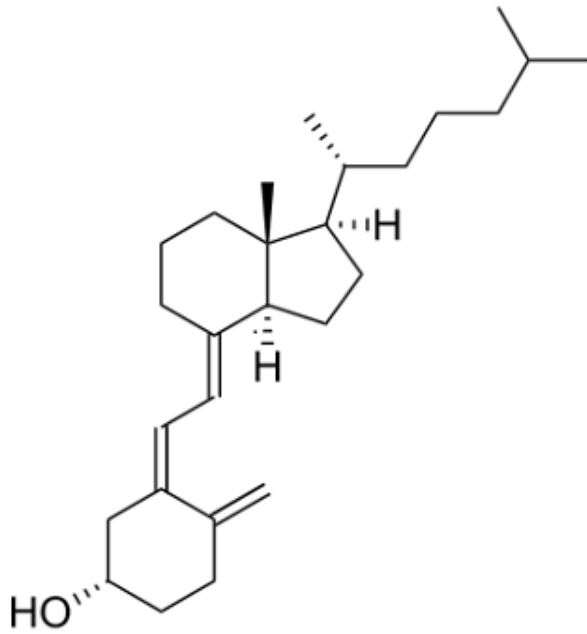
La vitamina D è una vitamina liposolubile essenziale che gioca un ruolo critico nella crescita delle ossa, nella mineralizzazione della cartilagine e nell'accumulo di massa ossea, oltre che nella prevenzione di malattie croniche quali il diabete, le malattie cardiovascolari (CVDs), le malattie autoimmuni, e il cancro (Pludowski et al., 2013). Una quantità sufficiente di questa vitamina può essere sintetizzata in maniera endogena nella pelle esposta direttamente alla radiazione ultravioletta (UVR; a lunghezze d'onda comprese nell'intervallo 290-315 nm) della luce del sole, in alternativa si può ottenere dalla dieta o tramite gli integratori (Zahedi-Rad et al., 2015a).

Al giorno d'oggi, c'è una domanda emergente per alimenti a basso contenuto calorico e a basso contenuto di grassi, con una minima quantità di acidi grassi saturi, sia in paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo (Huth & Park, 2012; Khordishian et al., 2018; Yousefi et al., 2018). Nei processi industriali per prodotti lattiero-caseari a basso contenuto di grassi, il grasso nel latte intero viene rimosso per produrre latticini a basso contenuto calorico e la vitamina D viene rimossa insieme alla separazione del grasso. Considerando le varie funzioni della vitamina D e la sua insufficiente assunzione in molte parti del mondo, si rende molto importante il suo ripristino e la sua fortificazione. In questa tesi viene discussa la fortificazione dei prodotti lattiero-caseari con la vitamina D.

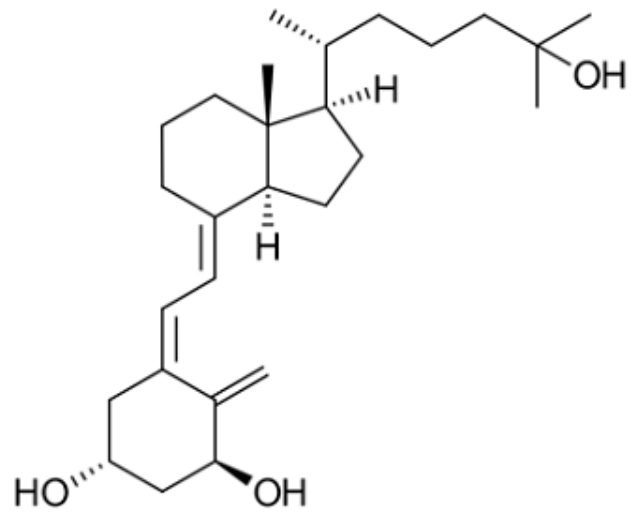
2.1 METABOLISMO DELLA VITAMINA D

La vitamina D comprende due forme, la vitamina D₂ e la vitamina D₃. La vitamina D₂ viene sintetizzata in seguito alla irradiazione con raggi UV-B dell'ergosterolo, che rappresenta il precursore naturale della vitamina nelle piante, nei funghi e negli invertebrati. Essa è quindi presente negli alimenti di origine vegetale. La vitamina D₃ viene sintetizzata nella pelle in seguito all'esposizione ai raggi solari del 7-deidrocolesterolo, un precursore del colesterolo. Pertanto questa vitamina è presente negli alimenti di origine animale. L'assunzione della vitamina D con l'alimentazione diventa essenziale quando la pelle non è sufficientemente esposta alle radiazioni UV-B. Una volta assunta con la dieta o sintetizzata sulla pelle, la vitamina D₃ viene idrossilata nel fegato in posizione 25 da un enzima denominato 25-idrossilasi- per formare 25-idrossivitamina D (25-OHD) (la forma maggiormente circolante, detta colecalciferolo). La 25(OH)D giunge nel rene, dove subisce un'ulteriore idrossilazione da parte dell'1-alfa-idrossilasi renale, arrivando a formare 1,25-idrossi-vitamina D₃ [1,25-(OH)₂D₃] (la forma attiva nota come calcitriolo) (Holick, 2003; Tratcher & Clarke, 2011). La vitamina D₃ di origine alimentare viene trasportata nel fegato, tramite una proteina di trasporto denominata "Vitamin D binding protein", e subisce la stessa attivazione della vitamina D₃ endogena.

Il calcitriolo si comporta come un ormone. Esso si legherà ad uno specifico recettore, che si trova nelle cellule dell'intestino tenue, andando in questo modo a regolare la trascrizione di specifici geni che regolano l'assorbimento intestinale di calcio e di fosforo. Oltre a ciò la forma attiva della vitamina D manifesta effetti sulle cellule ossee, indicando le cellule indifferenziate a diventare osteoclasti.



COLECALCIFEROLO (non attiva)



CALCITRIOLO (attiva)

Fig.1: Struttura di due forme della vitamina D3.

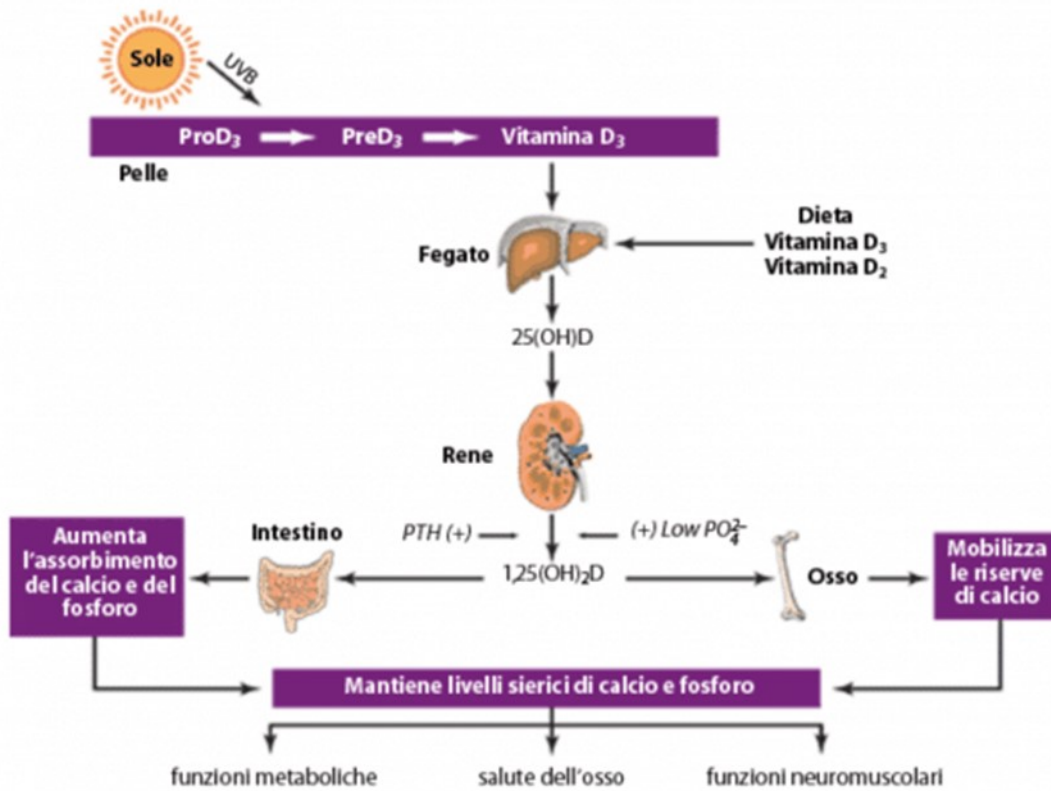


Fig.2: Biosintesi della vitamina D.

2.2 FUNZIONI DELLA VITAMINA D

Il calcitriolo migliora l'assorbimento di calcio e di fosforo necessari per la mineralizzazione delle ossa (funzioni calcemiche). Una significativa carenza di vitamina D negli adulti provoca l'osteomalacia, una malattia caratterizzata dalla incompleta mineralizzazione degli osteoidi, mentre nei bambini causa il rachitismo, con deformazione delle ossa. Oltre al ruolo nel corretto sviluppo dello scheletro, la vitamina D possiede delle funzioni non calcemiche, come la regolazione della crescita e della differenziazione cellulare, la regolazione del profilo lipidico nel sangue (Herafiward et al, 2013) e proprietà antiossidanti e antimicrobiche (Nikoyeh et al., 2013; Neyestani, 2013).

Inoltre, la carenza di vitamina D è associata al diabete di tipo 1 e di tipo 2, all'ipertensione, alla sclerosi multipla, ad altre malattie autoimmuni e ad alcuni tipi di cancro (Holick, 2004b).

2.3 ASSUNZIONE GIORNALIERA RACCOMANDATA

Il report del 2011 sul fabbisogno nutrizionale per la vitamina D dall'istituto di medicina (IOM), mostra che i livelli sierici di 25-idrossi-vitamina D di 16 ng mL⁻¹ (40 nmol L⁻¹) soddisfano metà dei fabbisogni della popolazione e livelli di almeno 20 ng mL⁻¹ (50 nmol L⁻¹), coprono all'incirca il 97,5% dei fabbisogni della popolazione [Secondo la dose giornaliera raccomandata (RDA: Recommended Daily Allowance): livello medio giornaliero di assunzione sufficiente per soddisfare i fabbisogni nutritivi nella maggior parte delle persone sane (97-98%)].

L'assunzione adeguata [AI: valore presupposto come adeguato per soddisfare i bisogni della popolazione] nell'infanzia è stimata essere di circa 400 IU al giorno (IU: Unità Internazionali, dove un'unità internazionale corrisponde a 0,025 µg di colecalciferolo, mentre un microgrammo di colecalciferolo corrisponde a 40 IU di vitamina D). Dopo il primo anno di età, l'RDA è stimata di essere di 600 IU al giorno per tutte le età, eccetto uomini e donne di 71 anni e più anziani (per i quali l'RDA è di 800 IU al giorno, Ross et al., 2011). Infatti la sintesi della vitamina nella pelle diminuisce all'aumentare dell'età. Nella tabella 1 sono mostrati i fabbisogni giornalieri espressi in microgrammi. Il livello massimo tollerabile di assunzione della vitamina D (ULs: l'assunzione giornaliera più alta del nutriente che è probabile non ponga alcun rischio) per soggetti dai 9 anni in su è di 4000 IU al giorno, ma è più basso per gli infanti (1-3 anni: 2500 IU al giorno) e bambini (4-8 anni: 3000 IU al giorno) (Polzonetti et al., 2020).

Age	Nutrient Intake (µg/Day)
0-3 months	8.5
4-6 months	8.5
7-9 months	7
10-12 months	7
1-3 years	7
>65 years	10
Pregnancy	10
Lactation	10

Tabella 1: Fabbisogni giornalieri di vitamina D

2.4 CARENZA

Lo status della vitamina D è determinato dai livelli di 25-idrossi vitamina D nel siero.

Sebbene non ci sia consenso sui livelli ottimali, la carenza di vitamina D è definita come livelli di 25-idrossivitaminina D minori di 20 ng mL⁻¹ (50 nmol L⁻¹), mentre i livelli di 25-idrossivitaminina D tra i 21 e i 29 ng mL⁻¹ indicano una carenza relativa di vitamina D. Infine, livelli maggiori o uguali a 30 ng mL⁻¹ sono considerati adeguati (Holick, 2008). Al giorno d'oggi ci sono tassi significativi di carenza/insufficienza di vitamina D, in particolar modo durante l'inverno, in differenti popolazioni in tutto il mondo; un miliardo di persone in ogni parte del mondo sono carenti o non hanno un apporto sufficiente di vitamina D (Mithal et al., 2009; Naeem, 2010).

I nostri antenati avevano uno status di vitamina D adeguato, a differenza nostra che a causa dell'urbanizzazione, del lavoro al coperto e delle condizioni ambientali (inquinamento dell'aria), sperimentiamo una notevole diminuzione della durata e dell'intensità dell'esposizione alla luce solare e quindi della sintesi endogena della vitamina. Lo status geografico (alte latitudini) e culturale (tipo di vestiti, veli) in molte regioni peggiorano queste condizioni (Holick, 2004a). Le evidenze epidemiologiche che collegano l'esposizione alla luce solare con il tumore della pelle portano ad una maggior applicazione delle creme solari protettive e ad un tempo di minor esposizione solare. Queste condizioni risultano in uno status più basso della vitamina D nella popolazione (Holick, 2004b).

Le persone a rischio di carenza da vitamina D sono neonati allattati al seno senza un'integrazione di vitamina D, bambini, donne in stato di gravidanza, persone anziane, persone senz'atletto e pazienti che usano farmaci immunosoppressivi. Le persone che vivono in città industriali o inquinate, e a latitudini più alte, persone con pelle scura, fumatori e donne con un alto indice di massa corporea (BMI), sono a più alto rischio di carenza di vitamina D (Zahedi-Rad et al., 2015b).

In uno studio del 2005 condotto in Olanda (Snijder et al., 2005), è stata valutata l'associazione dell'adiposità (determinata mediante misurazioni antropometriche così come assorbimetria a raggi X a doppia energia), con i livelli sierici di 25-idrossivitaminina D e di paratormone (PTH) in una popolazione di uomini e donne anziani (oltre 65 anni di età). Il PTH è un ormone prodotto dalle ghiandole paratiroidi, responsabile del mantenimento della concentrazione del calcio nel sangue e del suo assorbimento intestinale. Un eccessivo livello di PTH può determinare un maggiore afflusso di calcio negli adipociti, un aumento nella lipogenesi che favorisce così un aumento di peso. In questo studio, in 453 partecipanti sono stati determinati i livelli sierici di paratormone e di 25-idrossivitaminina D, allo stesso tempo sono stati misurati, tramite l'assorbimetria a raggi X a doppia energia, l'indice di massa corporea (BMI), il rapporto girovita-fianchi (WHR), lo spessore delle pliche cutanee e la percentuale totale di grasso corporeo (TBF%). Un'analisi di regressione lineare multipla è stata effettuata per studiare l'associazione tra le variabili relative all'adiposità e i livelli sierici di 25-OH-D e PTH. I risultati (tabella 2) hanno mostrato che un indice di massa corporea più alto, il girovita, lo spessore delle pliche cutanee e la % totale di grasso corporeo erano significativamente associati a livelli più bassi di vitamina D (i valori erano rispettivamente -0.136, -0.137, -0.140 e -0.261, tutti con P<0.05) e più alti di paratormone (0.166, 0.113, 0.114 e 0.287, tutti con P<0.05). Nei soggetti analizzati, l'8% degli uomini e il 14,4% delle donne presentavano un livello sierico di 25-idrossivitaminina D minore di 10 ng/ml (pari a 25 nmol/litro; indicatore di uno

stato carente di vitamina D), mentre il 44,7% degli uomini e il 56,1% delle donne avevano livelli sierici di 25-idrossivitamina D inferiori a 20 ng/ml (corrispondente a 50 nmol/litro; indicatore di uno stato insufficiente di vitamina D).

	Model 1				Model 2							
	Both sexes		Men		Women		Both sexes		Men		Women	
	sB	P	sB	P	sB	P	sB	P	sB	P	sB	P
25-OH-D												
BMI	-0.136	0.001	-0.080	0.182	-0.181	0.003	-0.096	0.020	-0.075	0.203	-0.093	0.122
WHR	-0.051	0.317	-0.081	0.176	-0.002	0.969	-0.037	0.453	-0.072	0.214	0.019	0.752
WC	-0.137	0.002	-0.125	0.036	-0.138	0.025	-0.109	0.010	-0.117	0.045	-0.079	0.182
Sum of skin folds	-0.140	0.004	-0.129	0.033	-0.119	0.054	-0.111	0.016	-0.129	0.029	-0.056	0.343
TBF	-0.185	0.000	-0.152	0.012	-0.186	0.002	-0.137	0.003	-0.130	0.028	-0.110	0.063
TBF%	-0.261	0.000	-0.170	0.004	-0.197	0.001	-0.194	0.001	-0.142	0.016	-0.123	0.038
PTH												
BMI	0.166	0.000	0.026	0.685	0.298	0.000	0.126	0.005	0.006	0.921	0.235	0.000
WHR	0.055	0.325	0.039	0.543	0.066	0.352	0.039	0.468	0.019	0.764	0.065	0.327
WC	0.113	0.019	0.038	0.553	0.193	0.005	0.071	0.126	0.007	0.911	0.141	0.029
Sum of skin folds	0.114	0.031	0.002	0.972	0.201	0.003	0.071	0.163	-0.030	0.653	0.156	0.016
TBF	0.199	0.000	0.108	0.096	0.255	0.000	0.146	0.003	0.072	0.262	0.189	0.003
TBF%	0.287	0.000	0.147	0.021	0.256	0.000	0.214	0.001	0.108	0.088	0.187	0.004

Tabella 2: associazioni di variabili di composizione corporea in relazione alla 25-idrossivitamina D(25-OH-D), ed in relazione al paratormone (PTH), in entrambi i sessi, e negli uomini e nelle donne separatamente. BMI (indice di massa corporea), WHR (rapporto girovita-fianchi), WC (girovita), TBF (totale grasso corporeo). Modello 1: valori normalizzati per età, stagione, fumo e per sesso nel caso di uomini e donne combinati. Modello 2: analogo al modello 1, normalizzati anche per PTH o 25-OH-D.

Lo studio evidenzia dunque la stretta correlazione tra i livelli plasmatici di 25-idrossivitamina D e paratormone e la condizione di obesità, suggerendo che l'obesità possa derivare anche da una carenza di questa vitamina.

In un altro studio del 2005, condotto in India (Sachan et al., 2005), sono state esaminate donne in stato di gravidanza per determinare condizioni di ipovitaminosi D e osteomalacia durante la gravidanza, correlando tali condizioni allo status materno di 25-idrossivitamina D, alle concentrazioni di paratormone e all'esposizione solare.

Nello studio, in 207 soggetti urbani e rurali con gravidanza a termine, sono stati analizzati i livelli sierici di calcio, di 25-idrossivitamina D, di fosfatasi alcalina termo-labile (HLAP-indicatore di osteomalacia biochimica a valori > 125 U/L) e di paratormone; la fosfatasi alcalina e la 25-idrossivitamina D sono state misurate anche nel sangue cordonale di 117 neonati.

I risultati riportati in tabella 3 mostrano che nei 29 soggetti affetti da osteomalacia (con valori di fosfatasi alcalina > 125 U/L), i valori di 25-idrossivitamina D, i livelli sierici di calcio e della 25-idrossivitamina D nel sangue cordonale, non differiscono rispetto ai soggetti in condizioni normali. Anche l'esposizione solare, in riferimento agli ultimi 3 mesi di gravidanza, non è differente tra il gruppo con osteomalacia e quello di controllo. Al contrario, i livelli di PTH plasmatici risultavano essere significativamente maggiori nelle donne affette da osteomalacia.

I risultati in tabella 4, presentati suddividendo i 207 soggetti in urbani e rurali, mettono in risalto come la significativa differenza in termini di esposizione solare sia negli ultimi 3 mesi di gravidanza, sia in riferimento agli ultimi 12 mesi, a netto favore delle donne rurali, non determini però una variazione nella condizione di ipovitaminosi tra i 2 gruppi analizzati: i valori di 25-OH-D sono infatti uguali.

In sintesi, prendendo in esame l'intera popolazione studiata, il 42% delle donne (88 soggetti) presentava dei livelli di 25-OH-D inferiori a 10 ng/mL, mentre 138 donne (il 67%) inferiori a 15 ng/mL: considerando che i valori normali sono compresi in un range tra 20 e 80 ng/mL, si evince che la quasi totalità delle donne in gravidanza presentava valori di 25-idrossivitamina D inferiori al limite minimo. Lo studio ha dunque messo in evidenza, l'elevata prevalenza di ipovitaminosi D tra le donne in stato di gravidanza, condizione che però coinvolge l'intera popolazione studiata, rurale e urbana, e non solo le donne affette da osteomalacia.

	Subjects with osteomalacia (n = 29)	Subjects without osteomalacia (n = 178)
Corrected serum calcium (mg/dL)	9.4 ± 0.6 ²	9.4 ± 0.7
Serum phosphorus (mg/dL)	3.6 ± 1.2	4.2 ± 1.7 ³
Serum 25(OH)D (ng/mL) ⁴	12.1 ± 8.0	14.3 ± 9.5
Maternal hypovitaminosis D [n (%)] ⁵	26 (89.7)	148 (83.1)
Serum PTH (pg/mL) ⁶	127 ± 180	74 ± 89 ⁷
Cord blood AP (U/L) ⁸	172 ± 200	114 ± 61
Cord blood 25(OH)D (ng/mL) ⁴	8.1 ± 7.4	8.5 ± 5.4
Daily calcium intake (mg/d) ⁹	813 ± 435	737 ± 466
Daily calcium intake <RDA [n (%)] ^{5,10}	22 (75.8)	138 (77.5)
Sun exposure score over past 3 mo (h/d × % BSA exposed)	4.9 ± 4.5	6.2 ± 6.0

1 Biochemical osteomalacia = heat-labile alkaline phosphatase >125 U/L. 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; PTH, parathyroid hormone; AP, alkaline phosphatase; RDA, recommended dietary allowance; BSA, body surface area.

2 $\bar{x} \pm SD$ (all such values).

3,7 Significantly different from subjects with osteomalacia (Student's *t* test after log transformation of data and of proportions with chi-square test): ³*P* < 0.05,

⁷ *P* < 0.005.

4 Normal = 20–80 ng/mL.

5 Hypovitaminosis D = < 22.5 ng 25(OH)D/mL.

6 *n* = 157 (with osteomalacia, *n* = 24; without osteomalacia, *n* = 133). Normal = 9–55 pg/mL.

8 Normal = < 165 U/L.

9 Dietary plus supplemental calcium intake.

10 RDA = 1200 mg/d.

Tabella 3: Differenze negli indici biochimici e nell'assunzione giornaliera di calcio tra i soggetti con e senza osteomalacia biochimica.

	Urban women (n = 140)	Rural women (n = 67)
Sun exposure score over past 3 mo (h/d × % BSA exposed)	4.1 ± 3.2 ²	9.7 ± 8.1 ³
Sun exposure score over past 1 y (h/d × % BSA exposed)	7.5 ± 5.6	11.6 ± 8.4 ⁴
Daily calcium intake (mg/d) ⁵	842 ± 459	549 ± 40 ⁷
Daily calcium intake <RDA [n (%)] ^{5,6}	101 (72)	59 (88) ⁷
Daily vitamin D intake (IU/d)	16.4 ± 7.4	16.5 ± 7.7
HLAP (U/L) ⁸	87 ± 60	73 ± 31
Elevated HLAP [n (%)] ⁹	24 (17)	5 (7)
Serum 25(OH)D (ng/mL) ¹⁰	14.0 ± 9.5	14.1 ± 8.9
Maternal hypovitaminosis D [n (%)] ¹¹	118 (84)	56 (84)
Maternal PTH (pg/mL) ¹²	94 ± 127	57 ± 49

¹ BSA, body surface area; RDA, recommended dietary allowance; HLAP, heat-labile alkaline phosphatase; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; PTH, parathyroid hormone.

² $\bar{x} \pm SD$ (all such values).

^{3,4,7} Significantly different from urban women (Student's *t* test after log transformation of data and of proportions with chi-square test): ³*P* < 0.001, ⁴*P* = 0.005, ⁷*P* < 0.05.

⁵ Dietary plus supplemental calcium intake.

⁶ RDA = 1200 mg/d.

⁸ Normal = 30–125 U/L.

⁹ Elevated HLAP = > 125 U/L.

¹⁰ Normal = 20–80 ng/mL.

¹¹ Hypovitaminosis D = < 22.5 ng 25 (OH)D/mL.

¹² Normal = 9–55 pg/mL.

Tabella 4: Differenze negli indici biochimici e di esposizione solare nelle donne urbane e rurali.

3. STRATEGIE PER PROMUOVERE UNO STATUS ADEGUATO DI VITAMINA D NELLA COMUNITA'

Il modo più semplice per l'assunzione della vitamina D è l'esposizione diretta alla luce solare, ma l'energia ultravioletta è insufficiente nei giorni invernali, specialmente nelle latitudini più a nord (Webb et al., 1989). La promozione di uno stile di vita sano e la perdita di peso non sembrano essere efficaci nel promuovere la stabilizzazione della vitamina D e dei suoi metaboliti dal tessuto adiposo, né sembra essere utile aumentare il consumo di alimenti contenenti naturalmente la vitamina (Pilz e al., 2018).

Ci sono fonti dietetiche limitate di vitamina D, compresi l'olio di fegato di merluzzo e i pesci grassi come il salmone, i quali non sono usati comunemente nella dieta (Calvo et al., 2004). La miglior fonte dietetica di questa vitamina è l'olio di pesce, ma dovrebbe essere consumato almeno 3-4 volte a settimana per soddisfare l'assunzione giornaliera raccomandata (de Lourdes Samaniego-Vaesken et al., 2012; Holick & Chen, 2008). Nella carne il contenuto della vitamina è generalmente molto basso (Tabella 5) ed è correlato ai livelli di vitamina nei mangimi (Polzonetti et al., 2020).

Foodstuff	Vitamin D3 (µg/kg)	25(OH)-D-3 (µg/kg)
Beef steak	<0.5	0.8
Beef liver	<0.5	3.4
Beef kidney	1.3	3.0
Pork fillet	1.1	<0.6
Pork liver	4.0	4.4
Lamb leg steak	0.4	10.4
Chicken leg	3.0	<2.0
Chicken fillet	2.0	<2.0

Tabella 5: Contenuto di Vitamina D3 e 25-OH-D-3 nella carne.

D'altra parte, la miglior fonte di questa vitamina non è il cibo, dal momento che parte della vitamina viene rimossa durante la trasformazione alimentare. L'assunzione degli integratori di vitamina D è limitata perché l'integrazione non è praticata a livello popolare (O'Donnell et al., 2008). La fortificazione degli alimenti con la vitamina D potrebbe essere un approccio efficace e molti paesi hanno implementato sia obbligatoriamente sia volontariamente la fortificazione per superare la carenza da vitamina D (Calvo et al., 2004).

Secondo i pattern dietetici e le politiche di fortificazione, gli alimenti che vengono fortificati con la vitamina D variano da nazione a nazione. Studi in varie nazioni (Canada, Finlandia, Francia, Irlanda, Norvegia, Spagna, Svezia, Regno Unito e Stati Uniti) mostrano che i principali prodotti alimentari usati per la fortificazione con la vitamina D includono alimenti a base di cereali, pane, latte e prodotti derivati, latte di soia, margarine e grassi spalmabili, uova, pesce, oli vegetali e succhi di frutta (Burgaz et al., 2007; Calvo & Whiting, 2003; Garhuie et al., 2015; Gonzalez-Rodriguez et al., 2013; Gupta, 2014; Huybrechts et al., 2011; Johnson et al., 2005; Lamberg-Allardt et al., 2001; O'Mahoni et al., 2011; Spiro & Buttriss, 2014; Whiting et al., 2007).

4. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA FORTIFICAZIONE CON VITAMINA D DEGLI ALIMENTI

C'è un numero di studi limitato riguardo al ruolo effettivo della fortificazione alimentare con la vitamina D sul miglioramento dello status della vitamina D. In uno di questi studi (Laaksi et al., 2006), è stata valutata l'efficacia della politica nazionale della fortificazione alimentare con la vitamina D in merito allo status di vitamina D nei giovani uomini finlandesi, poiché l'insufficienza di vitamina D è comune nei paesi più a nord.

Tramite la proposta del ministero della salute e degli affari sociali, sono stati fortificati con la vitamina D la margarina e i derivati del latte. Lo studio si è concentrato su 196 persone che erano state prese come reclute nelle forze di difesa finlandesi per addestramento militare; nel gennaio 2003, prima dell'entrata in vigore della politica nazionale di fortificazione alimentare con la vitamina D, è stato scelto un campione rappresentativo delle reclute (96) per un esame sanitario. Allo stesso modo, un anno dopo nel gennaio 2004, dopo l'entrata in vigore della politica nazionale di fortificazione con la vitamina D, è stato scelto un altro campione rappresentativo delle reclute

(100) sempre per un esame sanitario. Le concentrazioni di 25-idrossivitamina D nel siero sono state determinate attraverso test immunoenzimatici sia nel gennaio 2003 che nel gennaio 2004, e quelle inferiori a 40 nmol/l sono state considerate come indicatore di insufficienza di vitamina D.

L'assunzione media giornaliera di latte e di margarina tra le reclute era rispettivamente di 8 dl e di 30 g; dopo la fortificazione, le reclute assumevano mediamente 7 µg di vitamina D giornaliera, che corrisponde a 280 IU (8 dl x 0,5µg/dl + 30g x 10µg/100), che a sua volta corrisponde al livello target del Ministero della Salute e degli Affari Sociali in Finlandia. I risultati sono mostrati nella tabella 6. Appare evidente come le concentrazioni medie di 25-idrossivitamina D nel siero siano aumentate a seguito della fortificazione: nel gennaio 2003 infatti 75 dei 96 soggetti analizzati presentava un valore di vitamina D inferiore a 40 nmol/L (78%), un anno dopo solo il 35% mostrava una carenza di vitamina D.

Lo studio ha evidenziato dunque che il programma di fortificazione nazionale ha migliorato sostanzialmente lo status di vitamina D dei giovani uomini finlandesi, anche se gli effetti a lungo termine sulla salute devono essere ancora dimostrati.

	January 2003	January 2004	
			Difference in means (95% CI) ^a
Number (total)	96	100	
Mean, nmol/l (±s.d.)	33.5 (9.2)	50.2 (20.3)	16.69 (12.27, 21.11)
25-OHD ₃ concentration			Prevalence Ratio (95% CI) ^b
<40.0 nmol/l	75 (78.1)	35 (35.0)	0.45 (0.34, 0.60)
40.0–59.9 nmol/l	20 (20.8)	41 (41.0)	1.97 (1.25, 3.11)
60.0–99.9 nmol/l	1 (1.0)	19 (19.0)	19.00 (2.59, 139.18)
≥100 nmol/l	— (0.0)	5 (5.0)	∞

^aChange from January 2003 to January 2004.

^bJanuary 2004 relative to January 2003 within each category 25-OHD₃.

Tabella 6: Percentuali di soggetti e livelli di 25-idrossivitamina D nei giovani uomini finlandesi prima e dopo la fortificazione con la vitamina D.

Un altro studio sui benefici della fortificazione alimentare con la vitamina D è quello di Bonjour et al., (2013), in cui è stata valutata l'efficacia della fortificazione alimentare degli yogurt con la vitamina D e con il calcio nella prevenzione del deterioramento osseo; l'obiettivo era quello di determinare se la fortificazione degli yogurt con la vitamina D e con il calcio esercitasse un effetto sinergico di abbassamento nel siero di paratormone e dei marcatori del riassorbimento osseo (come la fosfatasi acida tartrato resistente 5b o il telopeptide C-terminale) rispetto a prodotti caseari ipocalorici ed ipoproteici nelle donne anziane.

È stato condotto uno studio in doppio cieco randomizzato e controllato in 89 donne anziane residenti in case di riposo (età media 85 anni), della durata di 56 giorni; queste donne sono state distribuite in modo tale che consumassero 2 tipi di yogurt al giorno di 125 grammi a porzione, che fornivano o 10 µg (400 IU) di vitamina D3 e 800 mg di calcio (FY, yogurt fortificato), oppure 0 µg di vitamina D3 integrativa e 280 mg di calcio (CY, yogurt di controllo), durante le 8 settimane; le due porzioni di yogurt di 125 grammi ognuna fornivano quantità simili di proteine (FY, 7,8g; CY, 8,2g), di energia (FY 221 kcal; CY 248 kcal), di lipidi (FY 6,5g; CY 6,5g), e di carboidrati (FY 33g; CY 39g).

I risultati sono mostrati in tabella 7. Al cinquantaseiesimo giorno il livello di 25-idrossivitamina D nel siero è aumentato di circa il 25,3 nmol/L nei soggetti alimentati con lo yogurt fortificato (FY) rispetto a 5,2 nmol/L nei soggetti alimentati con quello di controllo (CY). I cambiamenti corrispondenti nel livello di paratormone sono stati rispettivamente di -28,6 ng/L e -8,0 ng/L; quelli relativi al livello di fosfatasi acida tartrato resistente 5b sono stati di -21,9% ± 4,3% (FY) e 3,0% ± 3,2% (CY); infine quelli relativi ai livelli di telopeptide C-terminale (CTX) sono stati -11,0% ± 9,7% (FY) e -3,0% ± 4,1% (CY).

Nel ventottesimo giorno, queste differenze erano meno accentuate ma altrettanto significative; le modifiche tempo-dipendenti del livello di 25-idrossivitamina D nel siero erano molto più evidenti nel gruppo dell'FY che in quello dell'CY. Dopo il ventottesimo giorno, erano rispettivamente di 20,4 ± 2,6 e di 4,0 ± 2,4 nmol/L nell'FY e nell'CY, mentre dal ventottesimo al cinquantaseiesimo giorno i cambiamenti nella 25-idrossivitamina D nel siero erano 4,7 ± 1,0 e 0,5 ± 0,5 nell'FY e nell'CY. Il maggior incremento di 25-idrossivitamina D nel siero era associato ad una maggior diminuzione del livello di paratormone, di fosfatasi acida tartrato resistente 5b e di telopeptide C-terminale, tra il giorno 56 e il giorno 0, in maniera più marcata nel gruppo FY piuttosto che in quello di controllo. In conclusione, lo studio ha dimostrato che la fortificazione dei prodotti caseari con la vitamina D3 e con il calcio fornisce una maggior prevenzione dal riassorbimento osseo rispetto ad alimenti equivalenti non fortificati.

	CY Group				FY Group				p ^b	p ^c	p ^d	p ^e
	d 0, n = 27	d 28, n = 27	d 56, n = 27	d 56 - d, 0, n = 27	d 0, n = 31	d 28, n = 31	d 56, n = 29	d 56 - d 0, n = 29				
Ca, mmol/L	2.31 (0.02)	ND	2.29 (0.02)	-0.03 (0.02)	2.31 (0.02)	ND	2.31 (0.02)	0.00 (0.01)	.271	NA	NA	NA
Pi, mmol/L	1.14 (0.03)	ND	1.24 (0.03)	0.10 (0.02)	1.17 (0.03)	ND	1.25 (0.03)	0.08 (0.03)	.763	NA	NA	NA
Albumin, g/L	35.4 (0.8)	ND	35.3 (0.94)	-0.16 (0.75)	37.0 (0.6)	ND	36.6 (0.83)	-0.328 (0.60)	.861	NA	NA	NA
Prealbumin, g/L	0.23 (0.01)	ND	0.22 (0.01)	-0.011 (0.008)	0.23 (0.01)	ND	0.24 (0.01)	0.003 (0.006)	.143	NA	NA	NA
25OHD, nmol/L	16.2 (0.6)	20.1 (2.6)	21.4 (2.7)	5.2 (2.5)	19.2 (1.2)	39.5 (3.3)	44.6 (2.5)	25.3 (1.8)	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
PTH, ng/L	53.4 (6.3)	48.4 (5.1)	46.3 (4.6)	-7.1 (2.9)	60.8 (7.1)	42.1 (3.2)	32.4 (1.8)	-28.6 (7.2)	.0035	<.0001	.5134	<.0001
CTX, µg/L	0.53 (0.06)	0.50 (0.05)	0.49 (0.05)	-0.033 (0.023)	0.43 (0.03)	0.40 (0.04)	0.35 (0.05)	-0.073 (0.044)	.055	.0061	.0307	.0785
TRAP5b, U/L	3.66 (0.20)	3.56 (0.13)	3.65 (0.15)	-0.01 (0.13)	3.89 (0.27)	3.39 (0.25)	2.82 (0.17)	-1.06 (0.26)	.0209	.0003	.0222	<.0001
BAP, µg/L	20.2 (1.2)	19.4 (1.3)	20.1 (1.8)	-0.1 (1.2)	18.9 (1.2)	18.9 (1.6)	17.5 (1.8)	-1.4 (1.4)	.0766	.0200	.0229	.2047
P1NP, µg/L	12.1 (0.5)	12.3 (0.6)	12.4 (0.5)	0.3 (0.3)	11.6 (0.4)	11.6 (0.4)	12.1 (0.4)	0.5 (0.2)	.5922	.0709	.4425	.5661
IGF-I, µg/L	71.1 (4.8)	70.1 (4.3)	65.2 (5.1)	-5.8 (2.9)	84.9 (9.9)	90.8 (13.8)	81.8 (11.6)	-3.2 (10.7)	.6344	.0212	.5514	.4885

Abbreviations: NA, not applicable; ND, not determined; Pi, inorganic phosphate.

a All biochemical values are means (SEM). Reference values are as follows: Ca, 2.20–2.60 mmol/L; inorganic phosphate, 0.85–1.40 mmol/L; albumin, 35–50 g/L; prealbumin, 0.10–0.40 g/L; 25OHD, 48–145 nmol/L; PTH, 10–46 ng/L; CTX, 0.11–0.74 µg/L; TRAP5b, 2.40–6.85 U/L; BAP, 4–15 µg/L; P1NP, 19–83 µg/L; and IGF-I, 56–191 µg/L. At day 0, none of the difference between CY and FY group was significant (Mann-Whitney *U* test) with *P* ranging from .130 to .932.

b Probability level calculated by the Mann-Whitney *U* test for difference between CY and FY groups for day 56 – day 0 changes.

c Probability level by repeated-measures ANOVA for difference in time course (day 0 to day 56).

d Probability level by repeated-measures ANOVA for difference between type of yogurt.

e Probability level by repeated-measures ANOVA for interaction between time course (day 0 to day 56) and type of yogurt.

Tabella 7: Livelli di varie molecole nel siero dei partecipanti all'inizio dello studio (giorno 0) e dopo 4 (giorno 28) e 8 (giorno 56) settimane di consumo di yogurt fortificato (FY) o di controllo (CY).

Un ulteriore studio relativo alla fortificazione alimentare con la vitamina D è quello di Jafari del 2016, il cui obiettivo è stato quello di valutare gli effetti del consumo di yogurt magro fortificato

con la vitamina D in considerazione allo status glicemico, agli indici antropometrici, all'infiammazione e al rimodellamento osseo nelle donne in post menopausa diabetiche. In uno studio randomizzato in doppio cieco controllato con placebo in gruppi paralleli, 59 donne in post menopausa che avevano il diabete di tipo 2 hanno ricevuto yogurt fortificato (FY; 2000 IU di vitamina D in 100 grammi al giorno) o yogurt naturale (PY) per 12 settimane; gli indici glicemici, antropometrici, infiammatori e di rimodellamento osseo sono stati esaminati all'inizio dello studio e dopo le 12 settimane.

I risultati, mostrati in tabella 8, hanno rivelato che, mentre all'inizio l'80% dei soggetti aveva una carenza o un'insufficienza di vitamina D, il livello di 25-idrossivitamina D nel siero è aumentato significativamente nel gruppo che consumava lo yogurt fortificato, e al termine dello studio nessun soggetto presentava carenza di vitamina D, con la percentuale di coloro che avevano uno status sufficiente di vitamina D cresciuta dal 20% al 50%. Al contrario, lo status di vitamina D nel gruppo che consumava yogurt naturale era peggiorato, con la percentuale dei soggetti con uno status sufficiente di vitamina D che era calata dal 20,7% al 3,4%

In tabella 9 vediamo come i livelli di 25-OH-D siano aumentati nel gruppo FY e al contrario subiscono una riduzione nel gruppo di controllo; discorso inverso per quanto riguarda il PTH, questo a dimostrazione degli effetti positivi del consumo di yogurt fortificato.

Per quanto riguarda invece i marcatori glicemici e quelli di rimodellamento osseo (Tabella 7), i primi sono migliorati significativamente nei soggetti che consumavano yogurt fortificato mentre sono peggiorati nel gruppo di quelli che consumavano yogurt naturale; in merito ai secondi, sono calati nel gruppo FY rispetto all'inizio dello studio, invece nel gruppo PY i valori finali di questi marcatori sono aumentati. Infine riguardo agli indici antropometrici e di infiammazione, nel primo caso sono diminuiti considerevolmente nel gruppo FY, rispetto all'inizio dello studio, i valori finali del girovita, del rapporto vita-fianchi e di massa grassa, mentre il peso, il BMI (body mass index) e la circonferenza dei fianchi non sono cambiati di molto; nel secondo caso invece non sono state notate differenze considerevoli tra i due gruppi.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che il consumo giornaliero di yogurt fortificato con 200 IU di vitamina D per 12 settimane ha migliorato oltre allo status di vitamina D dei soggetti, anche i marcatori glicemici, gli indici antropometrici, quelli infiammatori, e i marcatori di rimodellamento osseo nelle donne in post menopausa che avevano il diabete di tipo 2.

Group	Before intervention				After intervention			
	Deficient ^a	Insufficient ^b	Sufficient ^c	P ^f	Deficient ^a	Insufficient ^b	Sufficient ^c	P ^f
PY ^d [n (%)]	10(34.5)	13(44.8)	6(20.7)	0.915	12(41.4)	16(55.2)	1(3.4)	<0.001
FY ^e [n (%)]	9(30)	15(50)	6(20)		0(0)	15(50)	15(50)	
Total [n (%)]	19(32.2)	28(47.5)	12(20.3)		12(20.3)	31(52.5)	16(27.1)	

^a Participant with serum 25(OH)D < 50 nmol/l.

^b Participant with serum 25(OH)D between 50 and 75 nmol/l.

^c Participant with serum 25(OH)D > 75 nmol/l.

^d Plain yogurt.

^e Fortified yogurt.

^f Denotes the significance of differences in vitamin D categories between 2 groups before and after the intervention (chi-square test).

Tabella 8: Distribuzione dei partecipanti in base allo status di vitamina D prima e dopo l'intervento

Variable	FY ^a group			PY ^b group		
	Before	After	P ^c	Before	After	P ^c
25(OH)D (nmol/l)	62.23 ± 4.5	86.83 ± 4.87	<0.001	62.72 ± 4.27	56.13 ± 2.89	0.270
PTH (pg/ml)	54.86 ± 2.7	46.70 ± 2.38	0.010	53.58 ± 3.15	56.75 ± 3.13	0.129
<i>Glycemic markers</i>						
FSG (mg/dl)	168.80 ± 4.48	166.67 ± 5.45	0.177	167.48 ± 2.78	170.62 ± 2.66	0.004
Fasting serum insulin (mU/l)	7.71 ± 1.23	5.17 ± 0.46	0.029	8.78 ± 1.08	11.20 ± 1.04	0.032
HOMA-IR	3.23 ± 0.50	2.13 ± 0.20	0.020	3.58 ± 0.42	4.72 ± 0.44	0.016
HOMA-B	95.28 ± 16.00	64.27 ± 5.98	0.039	109.70 ± 14.53	135.02 ± 13.08	0.074
QUICKI	0.331 ± 0.004	0.348 ± 0.004	0.001	0.327 ± 0.005	0.312 ± 0.005	0.018
HbA _{1c} (%)	7.16 ± 0.23	7.24 ± 0.22	0.744	7.08 ± 0.30	7.58 ± 0.23	0.029
<i>Lipid profile</i>						
Triglycerides (mg/dl)	133.56 ± 10.05	129.10 ± 9.80	0.046	144.96 ± 11.81	149.21 ± 14.92	0.961
Cholesterol (mg/dl)	182.23 ± 8.49	180.77 ± 8.65	0.296	189.96 ± 7.48	191.34 ± 7.15	0.597
LDL (mg/dl)	108.00 ± 6.70	107.33 ± 6.66	0.475	106.20 ± 5.86	120.34 ± 10.31	0.035
HDL (mg/dl)	52.93 ± 1.96	55.93 ± 1.87	0.074	49.03 ± 1.62	50.28 ± 1.77	0.217
<i>Anthropometric indexes</i>						
Weight (kg)	67.10 ± 2.06	66.54 ± 2.13	0.257	69.30 ± 1.87	69.42 ± 2.04	0.799
BMI (kg/m ²)	28.00 ± 0.82	27.84 ± 0.80	0.352	29.30 ± 0.72	29.56 ± 0.76	0.087
WC (cm)	97.60 ± 1.48	96.54 ± 1.46	<0.001	96.45 ± 1.24	96.54 ± 1.23	0.226
HC (cm)	102.20 ± 1.24	102.03 ± 1.24	0.063	102.24 ± 1.40	102.14 ± 1.40	0.319
WHR	0.95 ± 0.006	0.94 ± 0.006	<0.001	0.94 ± 0.004	0.94 ± 0.004	0.290
FM (%)	36.80 ± 0.70	33.91 ± 1.03	<0.001	37.22 ± 0.76	37.90 ± 0.77	0.248
<i>Blood pressure markers</i>						
SBP (mm Hg)	128.31 ± 1.40	128.97 ± 1.28	0.484	128.50 ± 1.50	129.30 ± 1.63	0.473
DBP (mm Hg)	75.12 ± 3.50	75.45 ± 3.51	0.547	81.93 ± 0.94	81.90 ± 1.17	0.958
<i>Inflammatory markers</i>						
hs-CRP (mg/l)	1.32 ± 0.19	0.98 ± 0.04	0.074	1.07 ± 0.05	1.21 ± 0.10	0.201
Omentin (ng/l)	88.69 ± 9.54	122.84 ± 15.12	0.001	99.96 ± 14.73	93.79 ± 14.55	0.289
<i>Bone markers</i>						
sBAP (IU/l)	84.13 ± 12.60	78.46 ± 11.07	0.210	78.05 ± 9.70	87.68 ± 7.69	0.107
sNTX (nmol/l)	57.15 ± 5.95	36.63 ± 5.38	<0.001	52.73 ± 6.67	59.82 ± 6.77	0.001

All presented values are means ± SEs.

^a Fortified yogurt.

^b Plain yogurt.

^c P values denote significance of within-group changes (paired t-test).

Tabella 9: Confronto tra i valori iniziali e finali delle variabili di studio.

5. PRODOTTI CASEARI FORTIFICATI CON LA VITAMINA D

Le concentrazioni di vitamina D naturale nel latte intero variano da 0,34 a 0,84 IU g⁻¹ di grasso, e il latte non fortificato non è una fonte significativa di questa vitamina (Tabella 10) (Murphy et al., 2001; Polzonetti et al., 2020).

Foodstuff	Vitamin D
Whole milk	0.1
Cheese, cheddar	0.3–0.6
Yogurt	0.1
Butter	1.5
Egg yolk	4.9–5.4
Mushrooms, chanterelle	5.3–14.2
Cod liver oil	210–250
Salmon, wild	13.1–24.7
Salmon, farmed	6.0
Herring	5.7–15.4
Cod	Trace–2.6
Sole	Trace–2.8

Tabella 10: Contenuto di vitamina D in diversi alimenti

Una parte significativa di vitamina D nel latte crudo viene persa durante la sterilizzazione o la pastorizzazione e nella rimozione della crema di latte durante il processo di separazione.

Il latte fortificato ed i prodotti caseari sono una delle varie fonti frequentemente più usate di vitamina D, a causa dell'alto consumo, della popolarità e dei benefici salutari (Calvo et al., 2004). Vari prodotti caseari sono stati fortificati con la vitamina D, come il latte, il formaggio e i lattici fermentati.

6. REGOLAMENTAZIONE EUROPEA SULLA FORTIFICAZIONE ALIMENTARE CON LE VITAMINE ED I MINERALI

La fortificazione alimentare con le vitamine ed i minerali viene definita dal regolamento (CE) numero 1925/2006 del 20 dicembre 2006 sull'aggiunta di vitamine e di minerali e di talune altre sostanze agli alimenti; in particolar modo la vitamina D può essere aggiunta agli alimenti sotto forma di colecalciferolo e di ergocalciferolo. Il regolamento si pone come scopo l'armonizzazione delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati Membri concernenti l'aggiunta di vitamine e di minerali e di talune altre sostanze di altro tipo agli alimenti, per assicurare il funzionamento efficace del mercato interno e per garantire al tempo stesso la tutela dei consumatori. Il regolamento si applica senza andare a pregiudicare le disposizioni specifiche della normativa comunitaria in materia di:

- a) Alimenti destinati ad un'alimentazione particolare e, in assenza di disposizioni specifiche, i requisiti in materia di composizione di tali prodotti resi necessari di particolari bisogni nutrizionali delle persone cui sono destinati;
- b) Nuovi alimenti e nuovi ingredienti alimentari;
- c) Alimenti geneticamente modificati;
- d) Additivi alimentari ed aromi;
- e) Pratiche e trattamenti enologici autorizzati.

Per quanto riguarda l'aggiunta di vitamine e minerali, si possono aggiungere solamente quelli elencati negli allegati 1 e 2 in conformità a questo regolamento; inoltre le vitamine e i minerali in forma biodisponibile per il corpo umano si possono aggiungere agli alimenti a prescindere dal fatto che siano presenti in tali alimenti o meno, tenendo conto di quanto segue:

- a) Carezza di un o più vitamine e/o minerali nella popolazione o in gruppi specifici della popolazione che possa essere dimostrata mediante prove cliniche o subcliniche della carezza stessa o indicata da stime di bassi livelli di assunzione di sostanze nutritive;
- b) Possibilità di migliorare lo status nutritivo della popolazione o di gruppi specifici di popolazione e/o compensare le eventuali carenze negli apporti dietetici di vitamine o minerali;
- c) Evoluzione di conoscenze scientifiche generalmente accettabili riguardo al ruolo nutrizionale delle vitamine e dei minerali e ai conseguenti effetti sulla salute.

Le vitamine e i minerali non possono essere aggiunti a: prodotti alimentari non trasformati, compresi, a titolo esemplificativo e non limitativo, frutta, verdura, carne, pollame e pesce; bevande con tenore alcolico superiore all'1.2% in volume, fatta eccezione, in deroga all'articolo 3, paragrafo 2, per i prodotti:

- a) di cui all'articolo 44, paragrafi 6 e 13 del regolamento (CE) del consiglio n. 1493/1999 del 17 maggio 1999 relativo all'organizzazione comune del mercato vitivinicolo

- b) commercializzati prima dell'adozione di questo regolamento
- c) che sono stati notificati alla Commissione da uno Stato membro in conformità dell'articolo 11, e a condizione che non vi siano indicazioni a carattere nutrizionale o sanitario.

Per quanto concerne invece le condizioni per l'aggiunta di vitamine e minerali, la quantità totale di vitamina o di minerale presente per qualunque scopo nell'alimento venduto non deve superare le quantità massime fissate secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2. Le quantità massime di vitamine e minerali aggiunte vengono stabilite considerando vari elementi che sono: i livelli di sicurezza più elevati stabiliti per le vitamine ed i minerali in seguito ad una valutazione scientifica dei rischi basata su dati scientifici generalmente riconosciuti, tenendo conto, se del caso, dei differenti livelli di sensibilità dei vari gruppi di consumatori; l'apporto di vitamine e di minerali da altre fonti alimentari; le assunzioni di riferimento di vitamine e minerali per la popolazione e, nel caso queste ultime siano vicine ai livelli più elevati di sicurezza, si tiene conto, dove necessario, anche del contributo dei singoli prodotti al regime alimentare globale della popolazione in generale o di sottogruppi di popolazione, e del profilo nutrizionale del prodotto stabilito in base alle disposizioni del regolamento (CE) n. 1924/2006.

Nell'etichettatura, nella pubblicità e nella presentazione degli alimenti ai quali sono stati aggiunti minerali e vitamine non devono figurare diciture che affermino o sottintendano il fatto che una dieta equilibrata e variata non possa apportare quantità adeguate di sostanze nutritive, e inoltre esse non devono trarre in errore o ingannare il consumatore riguardo al valore nutritivo dell'alimento che può risultare in seguito all'aggiunta di tali sostanze nutritive. L'etichettatura nutrizionale dei prodotti a cui sono stati aggiunti minerali e vitamine disciplinate da questo regolamento è obbligatoria e le informazioni da fornire consistono in quanto specificato all'articolo 4, paragrafo 1, gruppo 2, della direttiva 90/496/CEE e nelle quantità totali di vitamine e minerali qualora essi siano aggiunti all'alimento; l'etichettatura dei prodotti ai quali sono stati aggiunti vitamine e minerali può inoltre contenere una dicitura che indichi tale aggiunta alle condizioni di cui al regolamento (CE) 1924/2006.

7. METODI RELATIVI ALLA FORTIFICAZIONE CON LA VITAMINA D DEI PRODOTTI CASEARI

Vari metodi sono stati utilizzati per la fortificazione dei prodotti caseari con la vitamina D. Inizialmente, il latte veniva fortificato o mediante irraggiamento diretto o alimentando le mucche con lievito irradiato. Nel 1940 è stato sviluppato un metodo basato sulla supplementazione diretta del latte con un concentrato di vitamina: quest'ultimo metodo è considerato il più sicuro, efficace e ben accettato dalle industrie (Macdonald, 2010; Murphy et al., 2001).

Murphy e Newcomer (2001), hanno evidenziato alcune considerazioni per quanto riguarda la fortificazione con la vitamina D: (1) i concentrati di vitamina D devono essere aggiunti prima del processo di pastorizzazione, (2) in sistemi di pastorizzazione continui (breve tempo ad alta temperatura: HTST), l'aggiunta di quantità misurate di vitamina D deve essere continua, la pompa dosatrice deve essere connessa al pannello di controllo HTST per essere chiusa durante la corrente deviata e la modalità di riciclo del prodotto per garantire che la vitamina D sia aggiunta solo nello scorrimento in avanti; (3) la quantità di vitamina usata deve essere registrata e controllata con la

concentrazione nel prodotto fortificato per assicurare che sia utilizzata una dose accurata di concentrato; (4) i prodotti fortificati devono essere testati da un laboratorio certificato FDA.

La vitamina D potrebbe essere aggiunta ai prodotti tramite un'iniezione misurata o tramite addizioni manuali (Hicks et al., 1996). Il produttore può usare entrambi questi metodi per l'aggiunta di vitamina D nel latte, e se sono utilizzati correttamente, danno entrambi un buon recupero. Il punto dell'aggiunta di un concentrato di vitamina D e il metodo usato per l'aggiunta dipendono dal tipo di concentrato vitaminico. I concentrati vitaminici a base di olio devono essere aggiunti dopo la standardizzazione del prodotto (processo in cui i principi nutritivi come lipidi, proteine e carboidrati precedentemente separati vengono aggiunti nuovamente in una quantità ben precisa e definita affinché il prodotto alimentare abbia una determinata concentrazione di essi).

I concentrati vitaminici a base di acqua devono essere aggiunti prima della separazione dei grassi (Murphy & Newcomer, 2001). Aggiungere i concentrati vitaminici dopo la separazione/standardizzazione e prima dell'omogeneizzazione aiuterà la dispersione e stabilizzerà le vitamine. La vitamina D è liposolubile ed ha il potenziale di diventare più concentrata nella porzione grassa del latte (Murphy & Newcomer, 2001; Patterson et al., 2010).

Per un'aggiunta misurata di vitamine, sono necessari: (1) disponibilità di pompe dosatrici, (2) tubi per alimenti, (3) valvole di controllo a rilascio rapido e pulibili e (4) serbatoi vitaminici calibrati. È importante notare che, una volta che un sistema di misura viene completamente installato, la pompa dovrebbe essere calibrata usando l'intero sistema di distribuzione (tubo, valvole di controllo, serbatoio etc.). Indipendentemente dal fatto che il sistema abbia o meno controlli a microprocessore o controlli manuali, tutte le tarature dovrebbero essere verificate utilizzando un cilindro graduato certificato e un cronometro (Murphy & Newcomer, 2001).

Nella fortificazione manuale, è necessario registrare la quantità di latte processato, il tipo e la quantità di concentrato di vitamina D aggiunto, il tempo di mescolamento prima della pastorizzazione e qualsiasi informazione rilevante (Murphy & Newcomer, 2001). Le inconsistenze della fortificazione potrebbero portare ad una concentrazione variabile di vitamina D. La standardizzazione potrebbe diminuire queste variazioni. È richiesta un'ulteriore ricerca per garantire pratiche ottimali di fortificazione per ogni prodotto caseario.

La fortificazione può avvenire mediante omogeneizzazione diretta di un'emulsione di vitamina D nel latte, usando una preparazione a base di olio o a base di acqua, o un'emulsione food-grade, che utilizza emulsionanti quali proteine, fosfolipidi, tensioattivi. Il miglior "carrier" per la vitamina D è un'emulsione a base di olio (Kazmi et al., 2007; Upreti et al., 2002; Wagner et al., 2008; Pawlik et al., 2016).

Infine, l'incapsulamento liposomiale, che sfrutta la capacità dei liposomi di intrappolare al loro interno sostanze nutritive idrosolubili o liposolubili, mantenendo al contempo una barriera protettiva che circonda gli ingredienti interni biologicamente attivi, rappresenta una innovazione tecnologica per l'introduzione di micronutrienti nel latte e nei prodotti derivati (Khanniri et al., 2015).

8. STABILITA' DELLA VITAMINA D FORTIFICATA NEI PRODOTTI CASEARI

La stabilità è uno dei problemi più importanti nella fortificazione dei prodotti caseari. La vitamina aggiunta deve rimanere attiva fino alla fine del tempo di conservazione del prodotto, come dichiarato nell'etichetta. La vitamina D3 è stata largamente accettata per la fortificazione dei prodotti caseari (Greenbaum, 1973; Upreti et al., 2002); i risultati hanno dimostrato che la vitamina D3 è più stabile delle altre forme di vitamina D nei prodotti caseari durante la lavorazione e la conservazione.

Nello studio di Kazmi del 2007, è stata analizzata la fortificazione ed il mantenimento della vitamina D3 aggiunta a vari tipi di matrici, come il Cheddar, lo yogurt e il gelato, usando due metodi di incorporazione: la vitamina D3 cristallina pre-sciolta e un'emulsione di vitamina D3.

Per la fortificazione con la vitamina D3 cristallina, è stata preparata una soluzione di vitamina D, di 40000 IU/ml, sciogliendo 100 mg di vitamina D3 cristallina in 10 ml di etanolo al 95%; un millilitro di questa soluzione è stato mescolato con 3 ml di burro fuso per produrre una concentrazione di vitamina D di 100000 IU/ml, e la miscela è stata aggiunta al latte destinato alla produzione di un determinato prodotto caseario ad una concentrazione appropriata.

Per la fortificazione con la vitamina D3 pre-emulsionata, 2 ml di vitamina D3 in emulsione sono stati mescolati con 2 ml di burro fuso per ottenere una concentrazione finale di 100000 IU/ml. La miscela è stata poi omogeneizzata per 5 minuti a 27000 rpm, ed anche in questo caso è stata poi aggiunta al latte destinato alla produzione di un dato prodotto caseario alla concentrazione appropriata.

I risultati (Tabella 11) hanno mostrato che non si sono registrate perdite significative durante la produzione del formaggio; infatti per entrambi i metodi utilizzati di fortificazione sono stati ottenuti recuperi del 95-97% al termine delle 12 settimane di conservazione. Si può dunque concludere che le trasformazioni che avvengono durante la produzione di un formaggio come il Cheddar non sono dannose per il mantenimento del contenuto di vitamina D3.

Time (weeks)	Retention (%)	
	Crystalline vitamin D	Emulsified vitamin D
0	100	100
2	95.2±6.5	97.2±1.2
4	92.4±6.4	100.7±1.4
8	93.8±5.6	98.0±2.2
12	93.7±3.8	100.9±0.8

Tabella 11: Ritenzione della vitamina D3 nel Cheddar fortificato con vitamina D3 cristallina o in emulsione in funzione del tempo di conservazione a 4°C.

Per quanto riguarda lo yogurt (Tabella 12), la concentrazione di vitamina D non è stata significativamente influenzata dall'acidificazione del latte e dallo stoccaggio a 4°C, infatti i recuperi di vitamina D3 nello yogurt, in confronto alla concentrazione inizialmente aggiunta al latte (50000 IU/kg), erano rispettivamente del 96,6% ± 1,5% per la vitamina D cristallina e del 97,8% ± 1,5% per la vitamina D in emulsione. Non ci sono state differenze significative nel recupero tra le due forme; si è verificata una piccola perdita del 3% circa di vitamina D3 durante la produzione dello yogurt con entrambe le forme, e ciò indica che la perdita osservata è dovuta ad una proprietà inerente della vitamina D. Anche in questo caso è stata confermata la stabilità della vitamina D3 nello yogurt conservato per un tempo di 4 settimane, ed è stata evidenziata un'alta ritenzione (95%-103%).

Time (weeks)	Retention (%)	
	Crystalline vitamin D	Emulsified vitamin D
0	100	100
1	101.7±3.5	102.5±3.8
2	99.2±0.7	97.1±3.5
3	98.5±2.6	95.0±3.6
4	102.1±4.2	99.9±5.7

Tabella 12: ritenzione della vitamina D3 nello yogurt fortificato con vitamina D3 cristallina o in emulsione in funzione di un tempo di stoccaggio di 4 settimane a 4°C.

Nella produzione del gelato, la vitamina D3 è stata aggiunta alla miscela di gelato prima del mescolamento e del congelamento, ed il recupero di vitamina D3 nel gelato contenente entrambe le forme di vitamina D è stato rispettivamente del 99,8% ± 0,1% per la forma cristallina e del 99,3% ± 1,0% per la forma in emulsione, e ciò indica che non c'è stata perdita di vitamina D3 durante la preparazione del gelato (Tabella 13). I campioni di gelato sono stati conservati per 4 settimane a -25°C in una cella frigorifera, e una volta esaminati, non hanno mostrato alcuna degradazione della vitamina, con una ritenzione dal 98% al 100%.

Time (weeks)	Retention (%)	
	Crystalline vitamin D	Emulsified vitamin D
0	100	100
1	99.7±0.5	99.2±1.8
2	100.7±2.8	99.6±1.7
4	98.7±1.7	99.4±0.9

Tabella 13: ritenzione della vitamina D3 nel gelato fortificato con vitamina D3 cristallina o in emulsione in funzione di un tempo di stoccaggio di 4 settimane a -25°C.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che il Cheddar, lo yogurt ed il gelato rappresentano alimenti che possono essere fortificati con la vitamina D3.

Nello studio di Banville et al., (2000), è stata testata la fortificazione del Cheddar con la vitamina D ad una concentrazione di 400 IU/l usando tre differenti metodi di addizione del latte destinato alla produzione casearia: l'aggiunta di una emulsione idrosolubile di vitamina D3 disponibile in commercio (Vitex D); l'omogeneizzazione di vitamina D cristallina liposolubile in una porzione di crema di latte che così fortificata viene aggiunta al latte crudo prima della pastorizzazione, ed infine l'aggiunta di una preparazione di Vitex-D intrappolata in liposomi. Sono stati misurati il recupero della vitamina D nella cagliata, le perdite nel siero e la stabilità della vitamina D durante la preparazione del formaggio e la stagionatura per oltre un periodo di sette mesi. Si è osservato che il metodo di aggiunta di vitamina D non ha inciso particolarmente sulla composizione dei formaggi sperimentali (in termini di proteine, lipidi, umidità e sale), che è risultata molto simile a quella dei formaggi di controllo preparati senza la vitamina D (Tabella 14). Il recupero di vitamina D nel formaggio è stato significativamente più alto quando la vitamina D veniva intrappolata nei liposomi ($61,5 \pm 5,4$), rispetto alla vitamina D omogeneizzata nella crema ($40,5 \pm 2,2$), e alla Vitex D ($42,7 \pm 1,7$). Nei formaggi usati per la sperimentazione, la quantità di vitamina D rimaneva stabile per 3-5 mesi di stagionatura indipendentemente del metodo di addizione utilizzato, ma in seguito diminuiva, in maniera più evidente utilizzando la vitamina D incapsulata nei liposomi (Figura 3). Dopo sette mesi di stagionatura, la concentrazione di vitamina D era molto simile in tutti i formaggi sperimentali, e corrispondeva approssimativamente al 60%, all'89% e all'84% di quella misurata dopo la produzione dei formaggi fortificati con l'incapsulamento liposomiale, la crema e la Vitex D.

	Control	Vitex-D	Vitamin D in cream	Liposomes	LSD
Protein (% w/w)					
x	25.34	25.75	25.34	25.73	0.85
SD	0.63	0.62	0.40	0.09	
Fat (% w/w)					
x	31.10	30.92	30.83	31.17	1.00
SD	0.57	0.62	0.96	0.77	
Moisture (% w/w)					
x	38.47AB	38.91AB	39.47A	38.03B	1.38
SD	0.73	1.25	0.14	0.73	
Salt (% w/w)					
x	1.69	1.69	1.62	1.58	0.11
SD	0.20	0.18	0.16	0.15	

^aReported data are means and SDs of triplicate experiments.

AB Means ($n = 3$) within the same row without a common letter differ ($P < 0.05$). Lack of a letter in a row indicates no significant differences among means.

Tabella 14: Composizione chimica dei formaggi fortificati e di controllo.

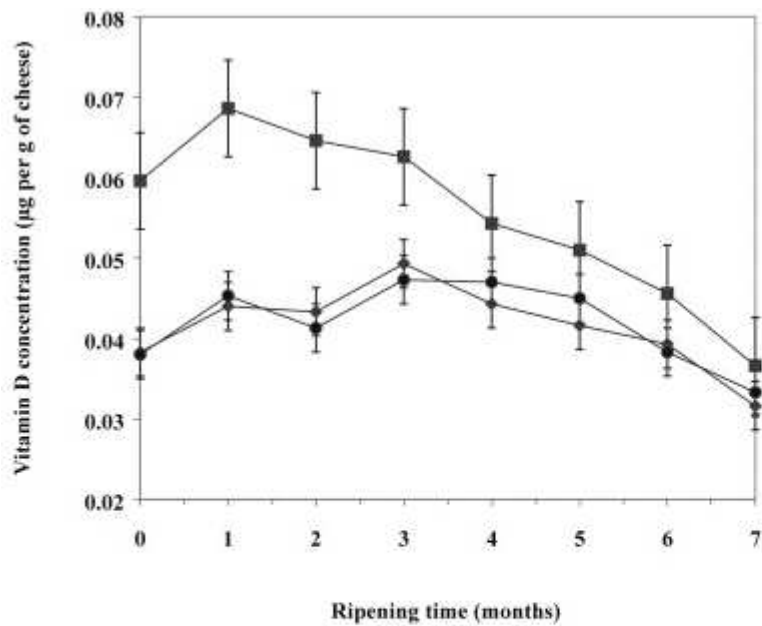


Fig. 2. Changes of vitamin D concentration in experimental cheeses during 7 months of ripening: Vitex-D (♦), vitamin D in cream (•), and liposomes (■).

Fig.3: Stabilità della vitamina D nei formaggi durante i 7 mesi di stagionatura.

8.1 LATTE

A causa del suo elevato consumo, il latte rappresenta un carrier importante per la fortificazione con la vitamina D (Fulgoni et al., 2007; Koushki et al., 2016; Moore et al., 2004; Patterson et al., 2010). In questo modo, il latte può essere considerato come una delle fonti dietetiche di vitamina D.

Nello studio di Hanson & Metzger del 2010, è stato valutato l'effetto dell'aumento della vitamina D tramite la fortificazione (250 IU per porzione) del latte HTST (High Temperature Short Time) con il 2% di grasso e del latte al cioccolato UHT (Ultra High Temperature) con il 2% di grasso, sulle caratteristiche sensoriali e sulla stabilità della vitamina D durante la lavorazione e lo stoccaggio.

Sono state preparate tre repliche di latte pastorizzato HTST con il 2% di grasso e di latte al cioccolato UHT pastorizzato con il 2% di grasso, ognuna delle quali conteneva, per tutti i prodotti, un gruppo di controllo (senza la fortificazione con la vitamina D), un gruppo di trattamento con 100 IU di vitamina D per porzione (quantitativo normalmente utilizzato per la fortificazione con la vitamina D negli Stati Uniti) ed infine un gruppo di trattamento con 250 IU di vitamina D per porzione. In tutte le fortificazioni è stato usato un concentrato di vitamina D solubile in acqua fredda. Il latte HTST con il 2% di grasso è stato conservato per 21 giorni, e l'analisi del livello di vitamina D è stata fatta prima della pastorizzazione del latte e durante i giorni 0, 14 e 21, mentre l'analisi sensoriale è stata condotta durante il quattordicesimo giorno. Il latte al cioccolato UHT con il 2% di grasso è stato conservato per 60 giorni, ed anche qui l'analisi del livello di vitamina D è

stata fatta prima della pastorizzazione e durante i giorni 0, 40 e 60, mentre quella sensoriale è stata condotta al quarantesimo giorno. L'analisi sensoriale di ogni prodotto è stata eseguita attraverso un test a triangolo replicato utilizzando un panel di 30-35 giudici del Centro Sensoriale (Dipartimento di Scienze Alimentari e di Nutrizione, Università del Minnesota), per individuare delle differenze nell'insieme degli attributi sensoriali di controllo e nei campioni di latte HTST con il 2% di grasso fortificati con la vitamina D dopo 14 giorni di conservazione in frigorifero. Ciascun giudice ha ricevuto 2 test a triangolo; in un test, il latte fortificato (100 IU) era il campione originale, mentre nell'altro il latte di controllo era il campione originale. La stessa cosa è stata fatta per il latte fortificato con 250 IU di vitamina D contro quello di controllo e per il latte fortificato con 100 IU contro quello di 250 IU. A ciascun giudice è stato chiesto di identificare il campione originale. La natura del campione originale e l'ordine dei campioni in ciascun set erano stati bilanciati. Per l'analisi dei dati, è stata usata una distribuzione normale, così come un'approssimazione per una distribuzione binomiale. La probabilità di ottenere entrambi i test a triangolo corretti era di 1/9. Le statistiche sono state fatte ad un livello di significatività del 5% e le stesse procedure sono state utilizzate per il latte al cioccolato UHT con il 2% di grasso. I test a triangolo per ogni prodotto sono stati replicati per gli stessi lotti di latte HTST con il 2% di grasso e per il latte al cioccolato UHT con il 2% di grasso.

Per quanto riguarda il latte HTST con il 2% di grasso, non c'erano differenze significative ($P>0,05$) tra i vari trattamenti riguardo alla sua composizione, infatti il contenuto medio di lipidi, di proteine e di solidi totali variava rispettivamente dall'1,96 al 2,06%, dal 3,09 al 3,10% e dal 10,54 al 10,57%; inoltre non c'erano differenze significative ($P>0,05$) nel contenuto di vitamina D nel trattamento con 100 IU o in quello con 250 IU prima e dopo la pastorizzazione. Il livello di vitamina D in ogni trattamento al giorno 0 dello stoccaggio era vicino a quelli target di fortificazione (100 e 250 IU per porzione), in aggiunta non c'era alcun cambiamento significativo ($P>0,05$) nel livello di vitamina D durante il periodo di stoccaggio di 21 giorni (Tabella 15). In merito ai risultati dell'analisi sensoriale del latte HTST condotte durante il quattordicesimo giorno di stoccaggio, non sono state trovate differenze significative ($P>0,05$) tra i vari trattamenti (Tabella 16).

Treatment	Day 0		Day 14		Day 21	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	<10	—	<10	—	<10	—
100 IU ¹ /serving	110	4.73	111	2.00	111	2.52
250 IU ¹ /serving	275	2.65	281	7.57	279	3.00

1

Values reported as international units (IU) of vitamin D per serving.

Tabella 15: contenuto di vitamina D (medio delle 3 repliche) del latte HTST con il 2% di grasso durante i 21 giorni di stoccaggio a 4°C.

Replicate	Control vs. 250 IU			Control vs. 250 IU			100 IU vs. 250 IU		
	No. correct ¹	Z-score	P-value	No. correct	Z-score	P-value	No. correct	Z-score	P-value
1	4	0.10	0.43	5	0.68	0.24	3	0.48	0.66
2	2	-1.07	0.87	5	0.68	0.25	6	1.26	0.19
3	3	-2.23	1.00	5	0.68	0.23	4	0.10	0.42

1

Indicates number of judges correctly selecting the odd sample in both triangle tests; 30 judges were used in all replicates.

Tabella 16: analisi sensoriale (test a triangolo) del latte HTST con il 2% di grasso nel quattordicesimo giorno di stoccaggio in frigorifero a 4°C.

Per quanto riguarda il latte al cioccolato UHT con il 2% di grasso, non sono state individuate differenze significative ($P > 0,05$) tra i trattamenti nella sua composizione, infatti il contenuto medio di grassi e di proteine tra i trattamenti variava rispettivamente dal 2,04 al 2,06% e dal 3,33 al 3,38%; inoltre non c'erano differenze significative ($P > 0,05$) nel contenuto di vitamina D nel trattamento con 100 IU (o nei trattamenti con 250 IU prima e dopo la pastorizzazione. In ciascun trattamento il livello di vitamina D nel giorno 0 dello stoccaggio era vicino ai livelli target della fortificazione 100 e 250 IU), ed inoltre non c'era alcun cambiamento significativo ($P > 0,05$) del livello di vitamina D durante il periodo di stoccaggio di 60 giorni (Tabella 17). Riguardo ai risultati dell'analisi sensoriale del latte al cioccolato UHT con il 2% di grassi condotta durante il quarantesimo giorno di stoccaggio, non sono state trovate differenze significative tra i vari trattamenti (Tabella 18).

Treatment	Day 0		Day 40		Day 60	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	<10	—	<10	—	<10	—
100 IU ¹ /serving	106	3.61	105	6.24	103	6.66
250 IU ¹ /serving	265	19.97	254	24.42	251	9.61

1

Values reported as international units (IU) of vitamin D per serving.

Tabella 17: contenuto di vitamina D (medio delle 3 repliche) del latte UHT con il 2% di grasso durante i 60 giorni di stoccaggio a 4°C.

Replicate	Control vs. 100 IU			Control vs. 250 IU			100 IU vs. 250 IU		
	No. correct ¹	Z-score	P-value	No. correct	Z-score	P-value	No. correct	Z-score	P-value
1	3	-0.48	0.74	4	0.10	0.52	7	1.84	0.07
2	5	0.60	0.25	5	0.60	0.25	3	-0.54	0.68
3	5	0.60	0.25	5	0.60	0.25	2	-1.11	0.87

1

Indicates number of judges correctly selecting the odd sample in both triangle tests; 34, 31, and 31 judges were used in replicates 1, 2, and 3, respectively.

Tabella 18: Analisi sensoriale (test a triangolo) del latte al cioccolato UHT con il 2% di grassi nel quarantesimo giorno di stoccaggio in frigorifero a 4°C.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che: 1) la fortificazione con la vitamina D a 250 IU per porzione era stabile durante la shelf-life del latte HTST con il 2% di grassi e del latte UHT al cioccolato con il 2% di grassi e che 2) l'aumento della fortificazione da 100 a 250 IU per porzione non ha inciso sulle proprietà sensoriali di questi prodotti.

9. CONCLUSIONI

La vitamina D rappresenta un nutriente essenziale per la salute umana grazie alle diverse funzioni che svolge sia a livello osseo (funzioni calcemiche) sia nella prevenzione di malattie croniche quali il diabete, le malattie cardiovascolari, fino al cancro. La vitamina D può essere sintetizzata nella pelle a seguito dell'esposizione alla radiazione ultravioletta oppure può essere assunta tramite gli alimenti. Considerando la facilità dell'instaurarsi dell'ipovitaminosi sia per la presenza di bassi livelli di tale vitamina negli alimenti più consumati sia per la riduzione della sua sintesi con l'aumentare dell'età, sia per la perdita della vitamina durante i vari processi di trasformazione degli alimenti, risulta sempre più importante garantire un adeguato apporto di vitamina D attraverso processi di fortificazione di prodotti alimentari. Tra questi, il latte ed i prodotti caseari sono alcuni tra i prodotti frequentemente più fortificati con la vitamina D, a causa dell'alto consumo, della popolarità e dei loro benefici salutari. Attualmente la fortificazione dei prodotti caseari con la vitamina D viene realizzata attraverso l'aggiunta diretta di un concentrato di vitamina D nel latte. La vitamina D può essere aggiunta tramite un'iniezione misurata o tramite addizioni manuali. La fortificazione può avvenire anche mediante l'incapsulamento liposomiale della preparazione vitaminica. Il problema principale potrebbe essere rappresentato dalla stabilità della vitamina D nei prodotti fortificati: gli studi raccolti hanno però evidenziato come il latte ed i prodotti caseari rappresentano alimenti che possono essere fortificati con la vitamina D3 garantendo la stabilità della vitamina D durante le varie fasi di produzione e lo stoccaggio. Anche la shelf-life dei vari prodotti viene garantita (Kazmi, 2007; Hanson & Metzger, 2010, Banville et al., 2000). In sintesi, la fortificazione dei prodotti lattiero-caseari con la vitamina D può essere considerata un'ottima strategia per promuovere uno status adeguato di vitamina D nella comunità, contrastando così l'insorgere di patologie correlate ad una sua insufficiente assunzione.

10. BIBLIOGRAFIA

- Banville C, Vuilleumard JC & Lacroix C (2000). Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. *International Dairy Journal*, 10, pp. 375-382
- Bonjour, J. P., Benoit, V., Payen, F., & Kraenzlin, M. (2013). Consumption of yogurts fortified in vitamin D and calcium reduces serum parathyroid hormone and markers of bone resorption: a double-blind randomized controlled trial in institutionalized elderly women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(7), 2915–2921. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1274>
- Burgaz, A., Akesson, A., Oster, A., Michaëlsson, K., & Wolk, A. (2007). Associations of diet, supplement use, and ultraviolet B radiation exposure with vitamin D status in Swedish women during winter. *The American journal of clinical nutrition*, 86(5), 1399–1404. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1399>
- Calvo, M. S., & Whiting, S. J. (2003). Prevalence of vitamin D insufficiency in Canada and the United States: importance to health status and efficacy of current food fortification and dietary supplement use. *Nutrition reviews*, 61(3), 107–113. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.marr.107-113>
- Calvo, M. S., Whiting, S. J., & Barton, C. N. (2004). Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6 Suppl), 1710S–6S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1710S>
- de Lourdes Samaniego-Vaesken, M., Alonso-Apperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2012). Vitamin food fortification today. *Food & nutrition research*, 56, 10.3402/fnr.v56i0.5459. <https://doi.org/10.3402/fnr.v56i0.5459>
- Fulgoni, V., 3rd, Nicholls, J., Reed, A., Buckley, R., Kafer, K., Huth, P., DiRienzo, D., & Miller, G. D. (2007). Dairy consumption and related nutrient intake in African-American adults and children in the United States: continuing survey of food intakes by individuals 1994-1996, 1998, and the National Health And Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(2), 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.11.007>
- Gahrue H, Eskandari MH, Mesbahi G, & Hanifpour MA (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4, pp. 1-8

- González-Rodríguez, L. G., Aparicio, A., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2013). Omega 3 and omega 6 fatty acids intake and dietary sources in a representative sample of Spanish adults. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 83(1), 36–47. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000143>
- Greenbaum SB (1973). Vitamin D: A review of its form, stability, availability, and action *Feedstuffs*, 45, pp. 32-33
- Hanson, A. L., & Metzger, L. E. (2010). Evaluation of increased vitamin D fortification in high-temperature, short-time-processed 2% milk, UHT-processed 2% fat chocolate milk, and low-fat strawberry yogurt. *Journal of dairy science*, 93(2), 801–807. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2694>
- Heravifard, S., Neyestani, T. R., Nikooyeh, B., Alavi-Majd, H., Houshiarrad, A., Kalayi, A., Shariatzadeh, N., Zahedirad, M., Tayebinejad, N., Salekzamani, S., Khalaji, N., & Gharavi, A. (2013). Regular consumption of both vitamin D- and calcium- and vitamin D-fortified yogurt drink is equally accompanied by lowered blood lipoprotein (a) and elevated apoprotein A1 in subjects with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 32(1), 26–30. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.767659>
- Hicks, T., Hansen, A. P., & Rushing, J. E. (1996). Procedures used by North Carolina dairies for vitamins A and D fortification of milk. *Journal of dairy science*, 79(2), 329–333. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76367-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76367-1)
- Holick M. F. (2003). Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of cellular biochemistry*, 88(2), 296–307. <https://doi.org/10.1002/jcb.10338>
- Holick M. F. (2004a). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6 Suppl), 1678S–88S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1678S>
- Holick M. F. (2004b). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*, 79(3), 362–371. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.3.362>
- Holick M.F. (2008). Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357, pp. 266-281
- Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*, 87(4), 1080S–6S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.1080S>

- Huth, P. J., & Park, K. M. (2012). Influence of dairy product and milk fat consumption on cardiovascular disease risk: a review of the evidence. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 3(3), 266–285 <https://doi.org/10.3945/an.112.002030>
- Huybrechts, I., Lin, Y., De Keyzer, W., Sioen, I., Mouratidou, T., Moreno, L. A., Slimani, N., Jenab, M., Vandevijvere, S., De Backer, G., & De Henauw, S. (2011). Dietary sources and sociodemographic and economic factors affecting vitamin D and calcium intakes in Flemish preschoolers. *European journal of clinical nutrition*, 65(9), 1039–1047. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.71>
- Jafari, T., Faghihimani, E., Feizi, A., Iraj, B., Javanmard, S. H., Esmailzadeh, A., Fallah, A. A., & Askari, G. (2016). Effects of vitamin D-fortified low fat yogurt on glycemic status, anthropometric indexes, inflammation, and bone turnover in diabetic postmenopausal women: A randomised controlled clinical trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 35(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.02.014>
- Johnson, J. L., Mistry, V. V., Vukovich, M. D., Hogie-Lorenzen, T., Hollis, B. W., & Specker, B. L. (2005). Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. *Journal of dairy science*, 88(7), 2295–2301. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72907-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72907-6)
- Kazmi SA, Vieth R & Rousseau D (2007). Vitamin D3 fortification and quantification in processed dairy products. *International Dairy Journal*, 17, pp. 753-759
- Khanniri, E., Bagheripoor-Fallah, N., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., Khosravi-Darani, K., & Mohammad, R. (2016). Application of Liposomes in Some Dairy Products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 484–493. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779571>
- Khorshidian N, Yousefi M, Shadnoush M, & Mortazavian AM (2018). An overview of β -glucan functionality in dairy products. *Current Nutrition & Food Science*, 14, pp. 280-292.
- Koushki, M., Koohy-Kamaly, P., Azizkhani, M., & Hadinia, N. (2016). Microbiological quality of pasteurized milk on expiration date in Tehran, Iran. *Journal of dairy science*, 99(3), 1796–1801. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10400>
- Laaksi, I. T., Ruohola, J. P., Ylikomi, T. J., Auvinen, A., Haataja, R. I., Pihlajamäki, H. K., & Tuohimaa, P. J. (2006). Vitamin D fortification as public health policy: significant improvement in vitamin D status in young Finnish men. *European journal of clinical nutrition*, 60(8), 1035–1038. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602414>

- Lamberg-Allardt, C. J., Outila, T. A., Kärkkäinen, M. U., Rita, H. J., & Valsta, L. M. (2001). Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland: could this be a concern in other parts of Europe?. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(11), 2066–2073. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.2066>
- MacDonald BH (2010). The role of milk in the diet. M.W. Griffith (Ed.), Improving the safety and quality of milk, *Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK*, pp. 3-27
- Mithal, A., Wahl, D. A., Bonjour, J. P., Burckhardt, P., Dawson-Hughes, B., Eisman, J. A., El-Hajj Fuleihan, G., Josse, R. G., Lips, P., Morales-Torres, J., & IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group (2009). Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 20(11), 1807–1820. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0954-6>
- Moore, C., Murphy, M. M., Keast, D. R., & Holick, M. F. (2004). Vitamin D intake in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(6), 980–983. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.03.028>
- Murphy, S. C., & Newcomer, C. (2001). Guideline for vitamin A and D fortification of fluid milk. http://phpa.dhmh.maryland.gov/OEHFP/OFPCHS/Milk/Shared%20_Documents/DPC053_Vitamin_AD_Fortification_Fluid_Milk.pdf.
- Murphy, S. C., Whited, L. J., Rosenberry, L. C., Hammond, B. H., Bandler, D. K., & Boor, K. J. (2001). Fluid milk vitamin fortification compliance in New York State. *Journal of dairy science*, 84(12), 2813–2820. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74737-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74737-6)
- Naeem Z. (2010). Vitamin D deficiency- an ignored epidemic. *International journal of health sciences*, 4(1), V–VI
- Neyestani T. R. (2013). Vitamin D and skin cancer: Meet sunshine half-way. R. Watson, S. Zibadi (Eds.), *Bioactive dietary factors and plant extracts in preventive dermatology*, Humana Press, New York, NY, USA, pp. 257-268
- Nikooyeh, B., Neyestani, T. R., Tayebinejad, N., Alavi-Majd, H., Shariatzadeh, N., Kalayi, A., Zahedirad, M., Heravifard, S., & Salekzamani, S. (2014). Daily intake of vitamin D- or calcium-vitamin D-fortified Persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: evidence for antioxidative properties of vitamin D. *Journal of human*

nutrition and dietetics: the official journal of the British Dietetic Association, 27 Suppl 2, 276–283. <https://doi.org/10.1111/jhn.12142>

- O'Donnell, S., Cranney, A., Horsley, T., Weiler, H. A., Atkinson, S. A., Hanley, D. A., Ooi, D. S., Ward, L., Barrowman, N., Fang, M., Sampson, M., Tsertsvadze, A., & Yazdi, F. (2008). Efficacy of food fortification on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations: systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, 88(6), 1528–1534. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26415>
- O'Mahony, L., Stepien, M., Gibney, M. J., Nugent, A. P., & Brennan, L. (2011). The potential role of vitamin D enhanced foods in improving vitamin D status. *Nutrients*, 3(12), 1023–1041. <https://doi.org/10.3390/nu3121023>
- Patterson, K. Y., Phillips, K. M., Horst, R. L., Byrdwell, W. C., Exler, J., Lemar, L. E., & Holden, J. M. (2010). Vitamin D content and variability in fluid milks from a US Department of Agriculture nationwide sampling to update values in the National Nutrient Database for Standard Reference. *Journal of dairy science*, 93(11), 5082–5090. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3359>
- Pawlik, A., Kurukji, D., Norton, I., & Spyropoulos, F. (2016). Food-grade Pickering emulsions stabilised with solid lipid particles. *Food & function*, 7(6), 2712–2721. <https://doi.org/10.1039/c6fo00238b>
- Pilz, S., März, W., Cashman, K. D., Kiely, M. E., Whiting, S. J., Holick, M. F., Grant, W. B., Pludowski, P., Hilgsmann, M., Trummer, C., Schwetz, V., Lerchbaum, E., Pandis, M., Tomaschitz, A., Grubler, M. R., Gaksch, M., Verheyen, N., Hollis, B. W., Rejnmark, L., Karras, S. N., ... Zittermann, A. (2018). Rationale and Plan for Vitamin D Food Fortification: A Review and Guidance Paper. *Frontiers in endocrinology*, 9, 373. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00373>
- Pludowski, P., Holick, M. F., Pilz, S., Wagner, C. L., Hollis, B. W., Grant, W. B., Shoenfeld, Y., Lerchbaum, E., Llewellyn, D. J., Kienreich, K., & Soni, M. (2013). Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence. *Autoimmunity reviews*, 12(10), 976–989. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.02.004>
- Polzonetti, V., Pucciarelli, S., Vincenzetti, S., & Polidori, P. (2020). Dietary Intake of Vitamin D from Dairy Products Reduces the Risk of Osteoporosis. *Nutrients*, 12(6), 1743. <https://doi.org/10.3390/nu12061743>
- Ritu, G. & Gupta, A. (2014). Vitamin D deficiency in India: prevalence, causalities and interventions. *Nutrients*, 6(2), 729–775. <https://doi.org/10.3390/nu6020729>
- Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., Gallagher, J. C., Gallo, R. L., Jones, G., Kovacs, C. S., Mayne, S. T., Rosen, C. J., & Shapses, S. A. (2011). The 2011 report on dietary reference intakes for

calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(1), 53–58. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2704>

- Sachan, A., Gupta, R., Das, V., Agarwal, A., Awasthi, P. K., & Bhatia, V. (2005). High prevalence of vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in northern India. *The American journal of clinical nutrition*, 81(5), 1060–1064. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.5.1060>
- Snijder, M. B., van Dam, R. M., Visser, M., Deeg, D. J., Dekker, J. M., Bouter, L. M., Seidell, J. C., & Lips, P. (2005). Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(7), 4119–4123. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0216>
- Spiro, A., & Buttriss, J. L. (2014). Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition bulletin*, 39(4), 322–350. <https://doi.org/10.1111/nbu.12108>
- Thacher T. D. (2011), B.L. Clarke. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clinic Proceedings*, 86, pp. 50-60
- Upreti, P., Mistry, V. V., & Warthesen, J. J. (2002). Estimation and fortification of vitamin D3 in pasteurized process cheese. *Journal of dairy science*, 85(12), 3173–3181. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74405-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74405-6)
- Wagner, D., Rousseau, D., Sidhom, G., Pouliot, M., Audet, P., & Vieth, R. (2008). Vitamin D3 fortification, quantification, and long-term stability in Cheddar and low-fat cheeses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7964–7969. <https://doi.org/10.1021/jf801316q>
- Webb, A. R., DeCosta, B. R., & Holick, M. F. (1989). Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 68(5), 882–887. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-5-882>
- Whiting, S. J., Green, T. J., & Calvo, M. S. (2007). Vitamin D intakes in North America and Asia-Pacific countries are not sufficient to prevent vitamin D insufficiency. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 103(3-5), 626–630. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.067>

- Yousefi, M., Khorshidian, N. and Hosseini, H. (2018), "An overview of the functionality of inulin in meat and poultry products", *Nutrition & Food Science*, Vol. 48 No. 5, pp. 819-835. <https://doi.org/10.1108/NFS-11-2017-0253>
- Zahedi Rad, M., Nikooyeh, B., Kalayi, A., Shariatzadeh, N., & Neyestani, T. (2015a). Vitamin D Status Of Tehran Taxi Drivers: How Efficient Is The Occupational Exposure To Sun? A Case-Control Study. *Nutrition And Food Sciences Research*, 2(2), 23-28. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=431279>
- Zahedirad M, Nikooyeh B & Neyestani TR (2015b). The epidemic of poor vitamin D status among 9–12 years old children in Tehran, 2008, using HPLC: Need for an urgent action. *Nutrition and Food Sciences Research*, 2, pp. 15-20