

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Nika Mutak

6473/PT

ODREĐIVANJE PROTEINA U HRANI ZA DOJENČAD

ZAVRŠNI RAD

Modul: Analitika prehrambenih proizvoda

Mentor: prof.dr.sc. *Mirjana Hruškar*

Zagreb, 2016.

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji**

ODREĐIVANJE PROTEINA U HRANI ZA DOJENČAD

Nika Mutak, 6473/PT

Sažetak:

Majčino mlijeko je najbolja hrana za dojenčad, no ukoliko dojenje nije moguće, početna i prijelazna hrana za dojenčad predstavljaju njegovu adekvatnu zamjenu, u skladu s prehrambenim potrebama dojenčadi. Budući da je dojenčad posebna i izrazito osjetljiva populacijska skupina, nužne su redovite kontrole sastava, kvalitete i zdravstvene ispravnosti početne i prijelazne hrane za dojenčad. Cilj ovoga rada bio je odrediti udio proteina u uzorcima hrane za dojenčad, usporediti ih s deklaracijama proizvoda te utvrditi jesu li dobiveni rezultati u skladu s Pravilnikom o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13). U 12 uzoraka hrane za dojenčad domaćih i stranih proizvođača, dostupnih na hrvatskom tržištu, određen je udio proteina Kjeldahlovim postupkom. Udio proteina u 11 analiziranih uzoraka je bio u skladu s Pravilnikom i deklaracijom, dok je udio proteina u jednom uzorku na gornjoj granici udjela dozvoljenog Pravilnikom, a odstupanje od deklaracije je veće od dozvoljenog.

Ključne riječi: dojenčad, početna i prijelazna hrana za dojenčad, proteini

Rad sadrži: 29 stranica, 4 tablice, 61 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Hruškar

Pomoć pri izradi: Saša Ajredini, mag.ing. stručni suradnik

Rad predan: 8. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

DETERMINATION OF PROTEIN CONTENT IN FORMULA

Nika Mutak, 6473/PT

Abstract:

Breast milk is the best food for infants. However, if the breastfeeding is not possible, infant and follow-on formulas present its adequate replacement, in accordance with nutritional requirements of infants. Because infants are special and very sensitive population group, there is a need for continuous production system, quality and safety controls of infant and follow-on formulas. The aim of this work was to determine protein content of infant formula samples and to compare it with declared values and national regulations for infant and follow-on formulas (NN 39/13). Twelve samples of formula of domestic and foreign manufacturers that are available on Croatian market were analyzed. Kjeldahl method was applied for protein content determination. Obtained results had shown that protein content of eleven samples was in accordance with national regulations (NN 39/13) and declared values, while one sample had protein content on the upper level purposed by regulations, and was not in accordance to declared value.

Keywords: infants, infant and follow-on formula, proteins

Thesis contains: 29 pages, 4 tables, 61 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Mirjana Hruškar, Full Professor

Technical support and assistance: Saša Ajredini, BSc. Research Assistant

Thesis delivered: October 8th, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	
2.1. Povijesni razvoj hrane za dojenčad.....	2
2.2. Bitne karakteristike početne i prijelazne hrane za dojenčad.....	3
2.3. Sastav početne hrane za dojenčad.....	4
2.4. Proteini.....	6
2.4.1. Proteini u mlijeku.....	7
2.4.2. Usporedba proteina u majčinom mlijeku i hrani za dojenčad.....	7
2.4.3. Probavljivost majčinog mlijeka i hrane za dojenčad.....	8
2.5. Usporedba sastava majčinog mlijeka i hrane za dojenčad.....	9
2.5.1. Ugljikohidrati.....	10
2.5.2. Masti.....	10
2.5.3. Mineralne tvari.....	11
2.6. Posebni dodaci u hranu za dojenčad.....	12
2.6.1. Višestruko nezasićene masne kiseline (LC PUFA).....	12
2.6.2. Beta- palmitat.....	13
2.6.3. Probiotici i prebiotici.....	13
2.6.4. Nukleotidi.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1. Uzorci.....	16
3.2. Određivanje udjela vode u uzorcima početne hrane za dojenčad.....	17
3.2.1. Materijali.....	17
3.2.2. Metoda.....	17
3.3. Određivanje udjela proteina u uzorcima početne hrane za dojenčad.....	18
3.3.1. Materijali.....	18
3.3.2. Metoda.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	
4.1. Određivanje udjela vode u uzorcima početne hrane za dojenčad.....	21
4.2. Određivanje udjela proteina u uzorcima početne hrane za dojenčad.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA.....	25

1. UVOD

U prošlosti, majke koje nisu mogle dobiti svoju djecu zaposlile bi dojilje ili rjeđe pripremile same hranu za njihovu djecu. Priprema dječje hrane razlikovala se u svakoj regiji i ovisila je o ekonomskom statusu (1). U srednjem vijeku preporučalo se hranjenje dojenčadi isključivo majčinim mlijekom, a ukoliko nije bilo moguće majčinim, onda mlijekom zamjenske dojilje. Slična vjerovanja, poput hranjenja dojenčadi unaprijed prožvakanom hranom i recepturama od mlijeka, piva, vina, povrtnog ili mesnog temeljca i vode održala su se sve do novog vijeka i industrijske revolucije (2). Tehnološki napredak omogućio je da se sastav hrane za dojenčad stalno mijenja i prilagođava novim saznanjima o sastavu majčinog mlijeka i prehrani s ciljem da se zadovolje sve nutritivne potrebe dojenčadi (3).

Hrana za dojenčad je hrana koja služi kao potpuna zamjena za majčino mlijeko ili zamjena za 1 ili više mliječnih obroka. U hranu za dojenčad spadaju: hrana za nedonoščad, hrana za dojenčad u dobi od prvih 4 - 6 mjeseci starosti (početna hrana), hrana za dojenčad od 4 mjeseca starosti nadalje (prijelazna hrana) te dječja hrana koja služi za prehranu dojenčadi kao zamjena za 1 ili više mliječnih obroka (4). Osnovni sastav početne i prijelazne hrane za dojenčad mora zadovoljavati prehrambene potrebe zdrave dojenčadi koje su utvrđene općeprihvaćenim znanstvenim podacima (5).

Majčino mlijeko je po svom sastavu idealna hrana za prehranu dojenčadi. Iznimno, kada je dojenje iz opravdanih razloga onemogućeno, jedina adekvatna zamjena za prehranu dojenčadi su adaptirana mlijeka, odnosno početna i prijelazna hrana za dojenčad. Adaptacijom mliječnih pripravaka pokušavaju se zadovoljiti temeljni principi, a najzahtjevnija je upravo proteinska komponenta mlijeka. Proteini imaju u majčinom mlijeku mnogostruku funkciju, osim nutritivne uloge vrlo je važna imunološka obrambena funkcija, koja bitno razdvaja kvalitetu majčinog mlijeka od svih ostalih nadomjestaka (6).

Cilj ovoga rada bio je odrediti udio proteina u uzorcima hrane za dojenčad, domaćih i stranih proizvođača, nabavljenih na hrvatskom tržištu. Analizirane vrijednosti će se usporediti s vrijednostima na deklaracijama proizvoda i utvrditi jesu li u skladu s Pravilnikom o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13) (7).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Povijesni razvoj hrane za dojenčad

Alternativa majčinom mlijeku spominje se i upotrebljava još od Kamenog doba, a naprave za prehranu dojenčadi pronađene su u grobnicama stare Grčke (8). U srednjem vijeku preporučalo se hranjenje dojenčadi isključivo majčinim mlijekom, a ukoliko nije moguće majčinim, onda mlijekom zamjenske dojilje. Vjerojatnost preživljavanja dojenčadi ovisila je isključivo o dojenju, a kada ono nije bilo moguće dojenčad je bila hranjena unaprijed prožvakanom hranom i recepturama od mlijeka, piva, vina, povrtnog ili mesnog temeljca i vode. Ove zamjene su bile neadekvatnog sastava, siromašne nutrijentima ili kontaminirane mikroorganizmima, što je uzrokovalo mnoge tegobe i visoku stopu smrtnosti dojenčadi (9). Razvoj hrane za dojenčad započeo je 1838. godine otkrićem spoznaje da kravlje mlijeko sadrži više proteina i manje ugljikohidrata od majčinog mlijeka. Mlijeko se tada počelo razrjeđivati, čime je stopa smrtnosti dojenčadi pala, ali kod dojenčadi se s vremenom nije vidio nikakav napredak. Sredinom 1860-ih stručnjaci započinju proučavati različite kombinacije kravljeg mlijeka, pšeničnog brašna i šećera, kako bi se smanjila stopa smrtnosti, proširio izbor prehrane i postigao napredak kod dojenčadi koja nije bila dojena (8). 1867. godine Leibig razvija prvu komercijalnu hranu za dojenčad koja se sastojala od pšeničnog brašna, slada i kalijevog bikarbonata pomiješanog s prethodno zagrijanim mlijekom, a nekoliko godina kasnije i prvu potpunu umjetnu hranu za dojenčad koja se miješala samo s vodom i nije bio potreban dodatak mlijeka jer je sadržavala mlijeko u prahu zahvaljujući otkriću metode za kondenzaciju mlijeka (2). 1885. godine Meigs u Sjedinjenim Američkim Državama i Biedet u Njemačkoj istovremeno otkrivaju točan sastav majčinog mlijeka potvrđujući tezu o malom udjelu proteina u usporedbi s kravljim mlijekom (9). Na početku dvadesetog stoljeća počinje se koristiti mlijeko u prahu kao temeljni sastojak hrane za dojenčad. Prva hrana za dojenčad sadržavala je mlijeko u prahu, vodu, ulje jetre bakalara, zbog adekvatne opskrbe vitaminima topljivima u mastima, te narančin sok ili sladilo poput meda. Tijekom šezdesetih godina dvadesetog stoljeća hrana za dojenčad postaje neophodna, zato jer je broj zaposlenih mladih žena bio sve veći. Moderna era hrane za dojenčad započinje razvojem komercijalne hrane za dojenčad na bazi kravljeg mlijeka s dodatkom životinjske i biljne masti kako bi se postigao lipidni sastav što sličniji majčinom mlijeku. U posljednjih 25 godina sastav hrane za dojenčad uvelike je napredovao kako bi što je moguće bolje oponašao sastav majčinog mlijeka te zamjenska mlijeka i hranu za dojenčad učinio adekvatnim izvorom svih potrebnih nutrijenata u prehrani dojenčadi (10).

2.2. Bitne karakteristike početne i prijelazne hrane za dojenčad

Sva hrana za dojenčad slična je po svojem sastavu, s obzirom na to da su količine makronutrijenata i mikronutrijenata, dodanih specijalnih nutrijenata i tvari te energetska vrijednost, određeni pravilnicima. Također, od velike su vrijednosti i stavovi i smjernice o prehrani zdrave dojenčadi koje su izdale strukovna udruženja - Američka akademija za pedijatriju (AAP) i Europsko udruženje za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (ESPGHAN). U cilju što boljeg imitiranja sastava majčinog mlijeka, hrana za dojenčad dijeli se prema udjelu proteina i označava se brojevima 0, 1 (početna hrana za dojenčad), 2, 3 i 4 (prijelazna hrana za dojenčad) (11). Početna hrana jest prerađena hrana za posebne prehrambene potrebe dojenčadi u prvim mjesecima života koja zadovoljava prehrambene potrebe dojenčadi do uvođenja odgovarajućeg dodatnog hranjenja. Zabranjeno je stavljati u promet ili predstavljati druge proizvode, osim početne hrane za dojenčad, kao proizvode koji sami po sebi zadovoljavaju prehrambene potrebe zdrave dojenčadi u prvim mjesecima života pa do uvođenja odgovarajućeg dodatnog hranjenja. Prijelazna hrana jest prerađena hrana za posebne prehrambene potrebe dojenčadi kada se uvodi odgovarajuće dodatno, sve raznolikije, pretežno tekuće hranjenje. Samo se početna i prijelazna hrana za dojenčad smatraju zamjenom za majčino mlijeko koja se smije davati zdravoj dojenčadi tijekom prvih mjeseci života (7). Početna mliječna hrana za dojenčad koja u naslovu sadrži broj 1 namijenjena je dojenčadi od 0-6 mjeseci. Ima manji udio proteina te prevladavaju proteini sirutke u odnosu na kazein. Sastavom je bolje prilagođena nezrelom organizmu malog dojenčeta, stoga se primjenjuju kao jedina hrana u prvim mjesecima života. Hrana koja u naslovu sadrži broj 2, 3 i 4 naziva se prijelazna hrana i namijenjena je dojenčadi od 6 do 12 mjeseci te maloj djeci starijoj od 12 mjeseci. Prijelazna mliječna hrana za dojenčad ili mliječni pripravci s brojem 2 i 3 daju se starijem dojenčetu, obično s navršениh šest mjeseci, istovremeno kada započinje i dohrana. U toj je hrani veći udio kazeina u odnosu na preteine sirutke (11, 12). Nakon navršene 1. godine u prehranu malog djeteta se može uvesti kravlje mlijeko, nikako prije jer kravlje mlijeko sadrži preveliki udio proteina i mineralnih tvari a premali udio laktoze, stoga nije adekvatna hrana za dojenčad (13). Kao dodatni izbor nude se komercijalna mlijeka prilagođena maloj djeci starijoj od 12 mjeseci. Prijelazna hrana označena s brojem 4 sadrži udio proteina približno sličan udjelu u kravljem mlijeku. Osim toga sadrži i višestruko veću koncentraciju željeza te nutritivni sastav optimiran za potrebe malog djeteta starijeg od 12 mjeseci (12). Započinje li naziv pripravka s "pre" ili se u naslovu nalazi 0, radi se o proizvodima namijenjenim prijevremeno rođenoj dojenčadi ili dojenčadi s niskom porođajnom masom. S obzirom na to da dojenče ubrzano raste, a organski su sustavi još nezreliji, ono ima svoje

specifične prehrambene potrebe i potrebno mu je mlijeko drugačijeg sastava (11). Sastav majčina mlijeka mijenja se ovisno o dobi djeteta zato što su potrebe dojenčeta tijekom njegova rasta i razvoja različite. Ključni sastojak koji se mijenja upravo su proteini pa se tako i hrana za dojenčad dijeli prema udjelu proteina i omjeru pojedinih sastojaka (14). Energetske i nutritivne potrebe dojenčeta rapidno se mijenjaju tijekom njegove prve godine života, zbog čega dolazi do promjene sadržaja gotovo svake sastavnice majčinog mlijeka (15). Majčino mlijeko u početku sadrži izrazito visoku koncentraciju proteina jer su oni potrebni dojenčadi zbog ubrzanog rasta, a kroz nekoliko mjeseci kada brzina njihovog rasta opada, smanjuje se i koncentracija proteina (14).

2.3. Sastav početne hrane za dojenčad

Sva hrana za dojenčad slična je po svojem sastavu, s obzirom na to da su količine nutrijenata, dodanih specijalnih tvari te energetska vrijednost, određeni pravilnicima (11). Ona ne smije sadržavati niti jednu tvar u količini koja bi mogla ugroziti zdravlje dojenčadi. Početna hrana za dojenčad proizvodi se od izvora proteina kao i drugih sastojaka za koje je na temelju opće prihvaćenih znanstvenih saznanja potvrđeno da su primjereni za prehranu dojenčadi, a pri proizvodnji potrebno je poštivati zabrane i ograničenja vezane uz uporabu sastojaka navedenih u Pravilniku. Početna hrana za dojenčad ne smije sadržavati ostatke pojedinih pesticida u razinama višim od 0,01 mg/kg u proizvodu koji je spreman za konzumaciju ili pripremljen prema uputama proizvođača. Za određivanje razina ostataka pesticida primjenjuju se opće prihvatljive analitičke metode. Energetska vrijednost početne hrane za dojenčad smije se kretati između 250 kJ/100 mL (60 kcal/100 mL) i 295 kJ/100 mL (70 kcal/100 mL). Udio proteina razlikuje se ovisno o njihovom izvoru. Kao izvor proteina u hrani za dojenčad može se koristiti kravlje mlijeko, hidrolizati proteina te izolati proteina soje sami ili u mješavini s proteinima kravljega mlijeka. Količina proteina u početnoj hrani za dojenčad proizvedenoj od proteina kravljega mlijeka smije biti u granicama od 0,45 g/100 kJ (1,8 g/100 kcal) do 0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal), u početnoj hrani za dojenčad proizvedenoj od hidrolizata proteina od 0,45 g/100 kJ (1,8 g/100 kcal) do 0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal), a u početnoj hrani za dojenčad proizvedenoj od izolata proteina soje od 0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal) do 0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal). Za jednaku energetska vrijednost početna hrana mora sadržavati raspoloživu količinu svake esencijalne i uvjetno esencijalne aminokiseline, koja je najmanje jednaka količini sadržanoj u referentnom proteinu, odnosno majčinom mlijeku. Aminokiseline se smiju dodavati samo radi poboljšanja prehrambene vrijednosti proteina i samo u količinama potrebnima u tu svrhu. Ako se u početnu hranu za dojenčad dodaje taurin

njegov sadržaj ne smije biti veći od 2,9 mg/100 kJ (12 mg/100 kcal), a količina kolina smije se kretati između 1,7 mg/100 kJ (7 mg/100 kcal) i 12 mg/100 kJ (50 mg/100 kcal). Najmanja dozvoljena količina masti u početnoj hrani za dojenčad je 1,05 g/100 kJ (4,4 g/100 kcal), a najveća 1,4 g/100 kJ (6 g/100 kcal). Zabranjena je upotreba sezamovog ulja i ulja sjemena pamuka. Sadržaj zasićenih masnih kiselina, laurinske i miristinske kiseline, smije iznositi najviše 20 % ukupnog sadržaja masti, trans - masnih kiselina ne smije prekoračiti 3 % ukupnoga sadržaja masti, a sadržaj eruka kiseline ne smije prekoračiti 1 % ukupnoga sadržaja masti. Količina linolne kiseline smije se kretati između 70 mg/100 kJ (300 mg/100 kcal) i 285 mg/100 kJ (1200 g/100 kcal), alfa - linolenske kiseline ne smije biti manja od 12 mg/100 kJ (50 mg/100 kcal), a odnos te dvije esencijalne masne kiseline mora biti veći od 5 i manji od 15. U početnu hranu za dojenčad smiju se dodavati dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline s 20 i 22 atoma ugljika, ali njihov sadržaj ne smije prekoračiti 1 % ukupnoga sadržaja masti za n-3 dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina i 2 % ukupnoga sadržaja masti za n-6 dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina (1 % ukupnoga sadržaja masti za arahidonsku kiselinu (20:4 n-6)). Sadržaj eikosapentaenske kiseline (EPA, 20:5 n-3) ne smije prekoračiti sadržaj dokosaheksaenske kiseline (DHA, 22:6 n-3), a sadržaj dokosaheksaenske kiseline ne smije prekoračiti sadržaj n-6 dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina. Sadržaj fosfolipida u početnoj hrani za dojenčad ne smije biti veći od 2 g/L, a količina inozitola smije se kretati između 1 mg/100 kJ (4 mg/100 kcal) i 10 mg/100 kJ (40 mg/100 kcal). Od ugljikohidrata smiju se upotrebljavati: laktoza, čiji udio smije iznositi najviše 1,1 g/100 kJ (4,5 g/100 kcal) osim za početnu hranu u kojoj izolati proteina soje predstavljaju više od 50 % ukupnoga sadržaja proteina, saharoza koja se smije dodati samo početnoj hrani za dojenčad proizvedenoj od hidrolizata proteina i to u količini koja ne prelazi 20 % ukupnog sadržaja ugljikohidrata, glukoza koja se također smije dodati samo početnoj hrani za dojenčad proizvedenoj od hidrolizata proteina u količini koja nije veća od 0,5 g/100 kJ (2 g/100 kcal), maltoza, maltodekstrini, glukozni sirup ili osušeni glukozni sirup te aktivirani i želatinirani škrob čija količina smije biti najviše 2 g/100 mL ili 30 % od ukupnog sadržaja ugljikohidrata. Fruktos - oligosaharidi i galakto - oligosaharidi mogu se dodati početnoj hrani za dojenčad ako njihov sadržaj ne prekorači 0,8 g/100 mL u kombinaciji 90% oligogalaktozil - laktoze i 10% oligofruktosil - saharoze velike molekularne težine. Najmanja dozvoljena količina ugljikohidrata u početnoj hrani za dojenčad je 2,2 g/100 kJ (9 g/100 kcal), a najveća 3,4 g/100 kJ (14 g/100 kcal). Od mineralnih tvari smiju se dodati: natrij, kalij, klorid, kalcij, fosfor, magnezij, željezo, cink, bakar, jodselen, mangan i fluorid, od vitamina: vitamin A, B6, B12, C, D, E, K, folna kiselina, pantotenska kiselina, riboflavin,

biotin, tiamin te niocin, a dozvoljena količina propisana je Pravilnikom o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13) (7). Početna hrana za dojenčad smije sadržavati najviše 0,020 mg/kg olova, 0,007 mg/kg kadmija, 0,005 mg/kg žive te 0,015 mg/kg arsena (16). Od nukleotida smiju se dodati: citidin 5'- monofosfat, uridin 5'- monofosfat, adenzin 5'- monofosfat, gvanozin 5'- monofosfat te inozin 5'- monofosfat, u količini koja je definirana u Pravilniku o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13), a njihova ukupna koncentracija ne smije prekoračiti 1,2 mg/100 kJ (5 mg/100 kcal). Kod pripreme gotove početne hrane za dojenčad smije se dodati samo voda (7). Za zdravstvenu ispravnost i adekvatan sastav hrane za dojenčad od iznimne je važnosti pravilna priprema i rukovanje. Kako velika većina pripravaka na hrvatskom tržištu dolazi u praškastom obliku, svaki je obrok potrebno pripremiti poštujući upute proizvođača, koje se tiču higijenskih mjera, sterilizacije opreme, točne količine i kvalitete vode koja se primjenjuje (11).

2.4. Proteini

Proteini su makromolekule građene od velikog broja aminokiselina povezanih peptidnim vezama (17). Unose se u organizam hranom životinjskog i biljnog podrijetla i osnovni su građevni materijal za izgradnju tijela. U probavnom sustavu razgrađuju se pomoću enzima u sastavne dijelove, aminokiseline (18). Aminokiseline mogu biti esencijalne ili neesencijalne. Esencijalne aminokiseline, tj. one koje se ne mogu sintetizirati u organizmu, a unose se hranom jesu valin, leucin, izoleucin, lizin, treonin, tritofan, fenilalanin i metionin. Prema količini esencijalnih aminokiselina, proteini se dijele na kompletne i nekompletne. Kompletne proteini su oni koji sadrže sve esencijalne aminokiseline u dovoljnoj količini i odnosu koji zadovoljava potrebe ljudskog tijela, primjerice mliječni proizvodi. Nekompletne proteini manjkavi su u jednoj ili više esencijalnih aminokiselina, a aminokiselina koja najviše odstupa od količine koju treba ljudski organizam zove se limitirajuća aminokiselina. Organizam ima potrebu za proteinima kao izvorom energije, esencijalnih aminokiselina i izvorom građevnog materijala za izgradnju i povećanje tkivne mase. U pravilnoj prehrani proteini trebaju osigurati 10 – 15 % dnevnih energetske potrebe (19). Potreba proteina u hrani za dojenčad je 1.5 g/kg na dan. Ta se potreba smanjuje na 1 g/kg na dan čak i u doba ubrzanog razvoja u pubertetu (18). Majčino mlijeko najvažniji je izvor proteina koji, osim što izgrađuje sva tkiva ljudskog organizma, sudjeluje i u probavi i iskorištavanju ostalih hranjivih tvari prisutnih u majčinom mlijeku te obrani organizma od infekcija i regulaciji rada imunološkog sustava, čime se smanjuje mogućnost razvoja alergija (15). Normalan život bez proteina nije moguć. Organizam ne može stvarati rezerve proteina kao što stvara energetske zalihe ugljikohidrata u

obliku glikogena ili masti u masnom tkivu, stoga kvaliteta prehrane ovisi o pravilnom i svakodnevnom unošenju proteina (18). Proteini su nam potrebni za izgradnju i obnovu tjelesnih stanica, rast i razvoj, te podmiruju dio energetske potrebe, iako nisu primarni izvor energije. S obzirom da dojenčad i mala djeca rastu više nego odrasli, oni zahtijevaju i veći unos proteina kad je prehrana u skladu s potrebama organizma (14).

2.4.1. Proteini u mlijeku

Glavni proteini mlijeka su kazein i proteini sirutke koji se razlikuju prema kemijskom sastavu (strukтури), svojstvima (stabilnost, topljivost) te prema načinu koagulacije (djelovanjem kiseline, enzima ili topline).

Kazein se sastoji od frakcija koje oblikuju koloidne čestice, a to su: α_s - kazein, β - kazein, γ - kazein i κ - kazein. Frakcije kazeina imaju različit broj ostataka fosfoserina, kojima se vežu preko Ca^{2+} te sadrže hidrofilne i hidrofobne skupine. Micelu kazeina čine nakupine sastavljene od submicela (povezanih frakcija kazeina). Unutar micela nalaze se α_s - kazein i β - kazein, a na površini κ - kazein. U molekulama kazeinskih frakcija fosfor je vezan za serin (fosfoserin) (13). Sumpora ima relativno malo u kazeinu, što govori o maloj količini cisteina (potreban kao izvor sumpora) i metionina (esencijalna aminokiselina). Upravo zbog nedostatka ove dvije aminokiseline, biološka vrijednost kazeina nešto je manja nego kod proteina sirutke. Kazein sadrži velike količine glutaminske kiseline, prolina, leucina, valina, lizine te asparaginske kiseline (20).

Proteini sirutke izrazito su hidrofilni i termolabilni. U njih ubrajamo sve proteine u mlijeku osim kazeina, a to su: α - laktalbumin, β - laktoglobulin, albumin krvnog seruma, imunoglobulini (IgG, IgM, IgA), proteoze - peptoni te proteini membrane masne globule. α - laktalbumin je najotporniji na djelovanje topline. Sastavljen je od jednostrukog lanca s 123 aminokiseline. Sadrži znatno veću količinu sumpora od kazeina i ne sadrži fosfor. β - laktoglobulin je dimer sastavljen od dva peptidna lanca, a u svakome su 162 aminokiseline. Imunoglobulini su najtermolabilniji proteini. U mlijeku se nalaze u maloj količini dok u kolostrumu čine 85 do 90% i imaju važnu ulogu u zaštiti dojenčadi od vanjskih bakterija i virusa te izgradnji imuniteta (13).

2.4.2. Usporedba sastava proteina u majčinom mlijeku i hrani za dojenčad

Mlijeko se primarno ocjenjuje prema sastavu proteina, koji se razlikuje kod pojedinih vrsta. Proteinski sadržaj u majčinom mlijeku iznosi 1,2 %, a u kravljem 3,5 %. Omjer kazein : proteini sirutke : neproteinski dušik, kod kravljeg mlijeka je 78 : 17 : 5 %, a kod majčinog

mlijeka 35 : 40 : 25 % (13). Majčino mlijeko sadrži znatno veću količinu proteina sirutke (osobito α - laktalbumina) nego kravlje pa je i biološka vrijednost (BV) majčinog mlijeka veća (21). Majčino mlijeko sadrži veću količinu cistina i triptofana, koji imaju nutritivni značaj i to upravo zbog većeg udjela α - laktalbumina, koji imaju veću količinu tih aminokiselina (22). Bitna je razlika veći omjer cistin / metionin u majčinom mlijeku nego u kravljem (23). Porastom omjera cistin / metionin raste iskoristivost proteina u organizmu. Taj omjer je kod sirutkinih proteina 10 puta veći nego kod kazeina pa je zbog njihovog većeg udjela u majčinom mlijeku veća iskoristivost proteina majčnog mlijeka (24). Od slobodnih aminokiselina koje pripadaju u neproteinski dušik, glavni nutritivni značaj pridaje se taurinu majčinog mlijeka, koji je u kravljem mlijeku prisutan u većoj količini jedino u kolostrumu, poznatom i kao prvo mlijeko (25, 26). Taurin je esencijalna aminokiselina te ima višestruki značaj u organizmu dojenčeta. Smatra se da je odgovoran za mentalno zdravlje dojenčeta, jer sudjeluje u razvitku mozga (27). Primijećeno je da dojenčad koja je hranjena mliječnim pripravcima neobogaćenih taurinom ima nezrele moždane evocirane potencijale. Danas je uobičajeno da se taurin stavlja u mliječnu hranu za dojenčad, posebno rane dojenačke dobi (28). Ima glavnu ulogu pri iskorištenju masti jer potiče aktivnost lipaze pankreasa (29) te potpomaže apsorpciju hranjivih tvari u organizmu (21). Prekoračena količina proteina može opteretiti bubrege, a visoka koncentracija aminokiselina u krvi može uzrokovati neurološke poremećaje dojenčadi (18). Naročita vrijednost majčinog mlijeka je u većoj količini imunih tvari koje su uglavnom proteinske prirode (30). Njihova funkcija može biti dvojaka: redukcija ili inhibicija alergijskih reakcija i zaštita od virusnih ili bakterijskih bolesti (21). Pored specifičnih imunih faktora - imunoglobulina (29), od kojih je najznačajniji anti *Escherichia coli* Ig A (zaštitni faktor metaboličkih poremećaja - dijareje), postoje i nespecifični faktori: lizozim (enzim koji razlaže peptidoglukane membrana bakterijskih stanica i potpomaže aktivnost Ig A) (31) te laktoferin i transferin, enzimi koji vežu Fe i onemogućuju bakterijama njegovo korištenje što naročito ometa rast koliformnih bakterija (23). Laktoperoksidaza je glavni enzim antibakterijskih svojstava kravljeg mlijeka jer se u njemu nalazi u većim količinama nego u majčinom mlijeku (29).

2.4.3. Probavljivost majčinog mlijeka i hrane za dojenčad

Količina proteina, njihov sastav te aminokiselinski sastav različiti su u majčinom i kravljem mlijeku, što utječe na nutritivnu vrijednost i probavljivost proteina. Majčino mlijeko ima manji udio kazeina od kravljeg mlijeka što je značajno jer iz tog razloga ostaje kraće u želucu i brže se probavlja (32). Veća probavljivost majčinog mlijeka povezana je i sa

svojstvima koagulacije proteina sirutke, a kazeinske micelle, koje su manje u majčinom mlijeku, prelaze također u nježnije disperzne oblike (meki gruš) te se lakše cijepaju probavnim enzimima (23, 27). Međutim, toplinskom obradom i svojstva koagulacije proteina kravljeg mlijeka postaju slična proteinima majčinog mlijeka (27). Veoma je važno povećati količinu cistina u mliječnoj hrani za dojenčad jer jetra dojenčadi ne sadrži enzim cistationazu, potreban za konverziju metionina u cistein. Veća količina cistina rasterećuje još nerazvijenu jetru dojenčeta, a značajna je pri razvoju mozga (21). Porastom omjera cistin / metionin raste i iskoristivost proteina u organizmu dojenčeta. Smanjenje količine proteina u kravljem mlijeku i podešavanje omjera kazein : protein sirutke, po uzoru na majčino mlijeko može se postići miješanjem mlijeka s različitim sirutkinim proizvodima. Time se postiže povoljan sastav aminokiselina u kravljem mlijeku, a osim toga može se postići i količina cistina približna količini u majčinom mlijeku, ali samo ako se količina proteina, pri sastavljanju hrane za dojenčad podesi na 1,5 % (33). Razlog tome je manja probavljivost proizvedene mliječne hrane za dojenčad nego prirodnog majčinog mlijeka (27). Međutim, pri podešavanju sastava proteina kravljeg mlijeka treba voditi računa da se ne prekorači dozvoljena količina mineralnih tvari. Zbog toga se pri proizvodnji mliječne hrane za dojenčad može koristiti također mlijeko s umanjenom količinom mineralnih tvari (21), a sirutkini proizvodi moraju biti demineralizirani. Od sirutkinih proizvoda uglavnom se koristila demineralizirana (90 %) sirutka u prahu, a danas se više koriste koncentratu proteina sirutke, i to najčešće dobiveni ultrafiltracijom jer su potpuno probavljivi (34). Smanjenjem količine proteina i mineralnih tvari te promjenom odnosa proteinskih frakcija u korist proteina sirutke, postiže se i bolja probavljivost proteina (23). Primjerice, dekalifikacijom mlijeka uklanjanjem 20 % kalcija, stvara se mekši gruš kojega dojenče lakše probavlja (35).

2.5. Usporedba sastava majčinog mlijeka i hrane za dojenčad

Sastav majčina mlijeka je jedinstven te osim nutrijenata važnih za normalan rast i razvoj dojenčeta, ono sadrži i niz biološki aktivnih tvari poput enzima, hormona, faktora rasta, antitijela, imunih stanica, ali i živih mikroorganizama koji se smatraju prvim probioticima. Upravo iz ovog razloga dojenje ima nepobitno pozitivan učinak na rast, razvoj i zdravlje dojenčadi (15). Polazeći od činjenice da je majčino mlijeko najbolji izbor za prehranu dojenčadi, svi mliječni nadomjesci orijentirani su prema stvaranju pripravaka koji bi se što više približili navedenom cilju. Za proizvodnju mliječne hrane za dojenčad sastav kravljeg mlijeka može se modificirati, prema uzoru na sastav majčinog mlijeka, kako bi se osigurao normalan rast, razvoj i zdravlje dojenčeta (36). Određenim tehnološkim procesom kravlje

mlijeko se mora modificirati u smislu smanjenja koncentracije proteina i mineralnih tvari (prvenstveno natrija), promjene odnosa proteinskih frakcija u korist proteina sirutke i povećanja odnosa kalcij : fosfor. Manje je komplicirano povećanje količine ugljikohidrata, zamjena masti i dodavanje potrebnih vitamina (23). Do osnovnih postavki u ovom procesu dolazi se isključivo na osnovu proučavanja i usporedbe sastava majčinog i kravljeg mlijeka, uloge pojedinih sastojaka te nutritivnih i imunoloških potreba dojenčadi. Pri tome se moraju uzeti u obzir preporuke i internacionalni standardi za dozvoljene količine pojedinih sastojaka u hrani za dojenčad, koja zamjenjuje majčino mlijeko (36).

2.5.1. Ugljikohidrati

Glavni ugljikohidrat kravljeg i majčinog mlijeka je laktoza, a u neznatnoj količini sadrže još i glukozu i galaktozu (21). U majčinom mlijeku pronađena je i veoma mala količina fruktoze, a identificirani su i različiti nelaktozni oligosaharidi. Smatra se da od prisutnih oligosaharida, glukozamini stimuliraju rast bifidobakterija koje djeluju pozitivno na peristaltiku (pokretanje) crijeva, rad mišića srca, mozga i bubrega te sudjeluju u metabolizmu masti i ugljikohidrata u jetri (29, 37). Laktoza majčinog mlijeka identična je laktozi kravljeg, ali je udio laktoze u kravljem mlijeku približno 5 %, a u majčinom mlijeku 7 %. U proizvodnji mliječne hrane za prehranu zdrave dojenčadi uvijek se koristi dodatak laktoze jer je njezina količina u kravljem mlijeku nedovoljna za dojenčad (21). Ona je izrazito bitna jer potiče peristaltiku crijeva, olakšava razgradnju proteina, sudjeluje u sintezi vitamina, osigurava optimalnu količinu Mg, poboljšava iskorištenje mliječne masti te uspostavlja blago kiselu reakciju u crijevima i na taj način sprječava rast i razmnožavanje štetnih bakterija (13). Prevelika količina laktoze može zdravom dojenčetu opteretiti jetru i bubrege te izazvati dijareju (27).

2.5.2. Masti

Od svih mliječnih sastojaka, mliječna mast se najviše razlikuje, kako po kemijskom sastavu tako i po udjelu, u kravljem i u majčinom mlijeku (21). Prosječne količine mliječne masti u kravljem mlijeku i u majčinom mlijeku približno su jednake, u kravljem mlijeku je udio mliječne masti 3,7 %, a u majčinom mlijeku 3,8 % , ali ono što se razlikuje je sastav kemijskog sastava masnih kiselina i konfiguracija triglicerida (13). Omjer zasićene : polunezasićene : nezasićene masne kiseline u majčinom mlijeku je 48 : 40 : 12 %, a u kravljem mlijeku 66 : 30 : 4 %. Zbog veće količine dugolančanih zasićenih masnih kiselina, apsorpcija mliječne masti kravljeg mlijeka znatno je smanjena. Kada mast nije potpuno

apsorbirana može doći do gubitka minerala iz organizma, kao i drugih nutritivnih sastojaka hrane (38). Značajan nedostatak masti kravljeg mlijeka je manjak esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina koje se ne mogu sintetizirati u organizmu (34). Od zasićenih masnih kiselina najveći je udio palmitinske masne kiseline, od nezasićenih najbrojnija je oleinska, dok je udio linolne i linolenske esencijalne masne kiseline jako malen (13). Zbog toga se sastav masti u hrani za dojenčad mora podesiti po uzoru na majčino mlijeko. To se može postići zamjenom mliječne masti s mješavinom biljnih ulja i životinjskih masti (24). Mliječna mast u kravljem mlijeku ipak sadrži i nešto esencijalne arahidonske kiseline koje nema u biljnim mastima (13). Tako se kombinacijom mliječne masti i biljnih masti te podešavanjem sastava masnih kiselina po uzoru na majčino mlijeko može postići dobra resorpcija masti u organizmu dojenčeta (39).

2.5.3. Mineralne tvari

Količina mineralnih tvari određuje se količinom pepela. Majčino mlijeko sadrži prosječno 0,2 % pepela, a kravlje mlijeko oko 0,7 % (13). Količina natrija, kalija i klora te njihov omjer u mliječnoj hrani veoma su značajni za zdravlje dojenčadi. Njihova neravnoteža ili višak mogu biti veoma štetni te su zbog toga utvrđene i gornje granice dozvoljenih količina u hrani za dojenčad. Maksimalna dozvoljena količina natrija u hrani za dojenčad je 60 mg/100 kcal, a kalija i klora 160 mg/100 kcal (7). Značajna razlika kravljeg mlijeka i majčinog mlijeka je u količini natrija i fosfora. U kravljem mlijeku koncentracija natrija i fosfora je visoka, zbog čega kravlje mlijeko nije pogodno za prehranu dojenčadi. Natrij se teško izlučuje iz organizma i ako ga ima u prevelikoj količini može uzrokovati dehidraciju mladog organizma (13). Prevelika količina fosfora može uzrokovati stvaranje netopljivog Ca - fosfata (iz kojeg organizam ne može iskoristiti kalcij) i prouzrokovati hipokalcemiju (23). Relativno visoka količina fosfora u kravljem mlijeku uvjetuje i manji omjer kalcij : fosfor (Ca : P). Kalcij je izuzetno važan za zdravlje koštanog tkiva i zubi te održavanje vitalnih funkcija u tijelu, a njegova iskoristivost u organizmu ovisi o količini fosfora u organizmu. Izrazito je važan omjer Ca : P. U kravljem mlijeku je taj omjer niži nego u majčinom mlijeku i iznosi oko 1,3, dok u majčinom mlijeku iznosi približno 2 (13). To je još jedan od razloga zašto kravlje mlijeko nije adekvatna hrana za dojenčad. U hrani za dojenčad bitno je povećati omjer Ca : P koji ne smije biti manji od onog u kravljem mlijeku niti veći od onog u majčinom mlijeku (24). Prema Pravilniku o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13) odnos između kalcija i fosfora ne smije biti manji od 1 niti veći od 2 (7). Željezo i cink u majčinom mlijeku prisutni su u relativno malim koncentracijama, što je slučaj i u kravljem mlijeku, ali je u majčinom mlijeku njihova bioraspoloživost i apsorpcija visoka i gotovo potpuno su

iskoristivi u organizmu dojenčadi (33). Potreba sve veće količine željeza javlja se tek krajem 3. mjeseca dojenja (21). Prilikom podešavanja sastava hrane za dojenčad mora se voditi računa o tome da se ne prekorače dozvoljene granice količina pojedinih mineralnih tvari. Općenito, veća količina mineralnih tvari u organizmu dojenčeta opterećuje bubrege zbog relativno male sposobnosti da se izluči višak soli (39).

2.6. Posebni dodaci u hranu za dojenčad

Poznato je da djeca dojena majčinim mlijekom prirodno stječu zaštitu odnosno imunitet, dok dojenčad koja je isključivo na hrani za dojenčad češće obolijeva jer je njihova crijevna mikroflora često neuravnotežena. Upravo zato stručnjaci iz razvoja svakodnevno istražuju koje bi dodane vrijednosti trebale biti sastavni dio hrane za dojenčad da bi ona bila što sličnija majčinom mlijeku. Neki od tih inovativnih dodataka su posebne vrste masnoća poput omega - 3 masnih kiselina ili beta - palmitata, masti s posebnom strukturom koje su najbližije onima koje nalazimo u majčinu mlijeku. Također, neki od pripravaka danas imaju dodatak probiotika i prebiotika te nukleotida (11).

2.6.1. Višestruko nezasićene masne kiseline (LC PUFA)

Dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline (LC PUFA) potrebne su za normalan rast i razvoj brojnih organskih sustava, a osobito mozga i očiju. Dokosaheksaenska kiselina (DHA), koja pripada skupini omega - 3 masnih kiselina i arahidonska kiselina (ARA), koja spada u skupinu omega - 6 masnih kiselina, najrasprostranjenije su LC PUFA u mozgu, te čine oko 20 % do 25 % lipida u mozgu (40). One imaju funkcionalnu i strukturnu ulogu u razvoju dojenčeta. Istraživanja su pokazale da se kod dojenčadi koja je hranjena hranom za dojenčad obogaćenom DHA, bilježi viši udio DHA u mozgu (41). Tijekom prvih tjedana poslije rođenja kod novorođenčadi se ne sintetizira dovoljna količina LC PUFA koja bi zadovoljila njihove velike potrebe, stoga je važno da ih dojenčad dobije s hranom za dojenčad (42). Istraživanje objavljeno u časopisu *Pediatric Research* provedeno je kako bi se ispitalo djelovanje dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina na malu djecu. Testirano je 122 male djece, koja su tijekom prve godine života hranjena jednim od četiri pripravka: 3 su imala različite koncentracije dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina DHA i ARA (0.32, 0.64 i 0.96 %) dok ih jedan pripravak nije sadržavao. Učinci konzumacije različite hrane za dojenčad evaluirani su u 4. 6. i 9. mjesecu života, a procjenjivale su se srčana frekvencija i pozornost male djece tijekom gledanja u slike koje su predstavljale lica odraslih ljudi. Rezultati su pokazali da su mala djeca koja su dobivala obogaćenu hranu za

dojenčad bila kognitivno naprednija, s nižim srčanim frekvencijama, u odnosu na ostalu. Pokazalo se i da je hrana za dojenčad s najnižim udjelom višestruko nezasićenih masnih kiselina (0.32 %) bila sasvim dovoljna da se postignu navedeni učinci (43). LC PUFA su vrlo važne za otpornost domaćina na infekcije i druge poremećaje imunološkog sustava (44). U ispitivanju je dokazano da je zbog dodatka ARA i DHA u mliječnoj hrani za dojenčad, učestalost bronhiolitisa / bronhitisa u prvoj godini života bila manja nego kod dojenčadi hranjene običnom mliječnom hranom bez dodatka LC PUFA (45).

2.6.2. Beta - palmitat

Posljednjih godina na tržištu je sve zastupljenija hrana za dojenčad koja se pozicionira kao lakše probavljiva. Kod takve hrane osim što je izmijenjen sastav masnih kiselina, promijenjena je i struktura masti. Jedinstvene masnoće takve vrste nazivaju se beta - palmitati. Razvojem znanosti, sastav masnih kiselina u hrani za dojenčad postao je sve sličniji sastavu masnoća u majčinu mlijeku. Međutim, izmjena strukture masti u hrani za dojenčad počela je tek nedavno. Masti su u hrani za dojenčad prisutne kao trigliceridi, odnosno na jednu molekulu glicerola su vezane tri masne kiseline i svaka od njih ima svoju određenu poziciju. Palmitinska masna kiselina u beta - palmitatu vezana je na drugoj, odnosno srednjoj poziciji na glicerolu, a na vanjskim mjestima vezanja nalazi se jednostruko nezasićena oleinska masna kiselina po čemu je beta - palmitat specifičan. Takva struktura masti prevladava u majčinom mlijeku i zbog toga je u hrani za dojenčad, u kojoj su masne kiseline vezane na glicerol obrnutim poretkom, teško postići jednaku strukturu (11, 46). Prednosti beta - palmitata su lakša probavljivost, bolja apsorpcija masti, bolja iskoristivost energije i kalcija iz mlijeka te rjeđa pojava konstipacije (47)

2.6.3. Probiotici i prebiotici

Brojne spoznaje o neobičnoj važnosti pravilne ravnoteže mikroflore crijevnog sustava dojenčadi rezultirale su dodavanjem probiotičkih bakterija ili probiotika u hranu za dojenčad. Dojenčad ima posebnu potrebu za stimulacijom crijevnih bakterija jer se rađaju sa sterilnim crijevom koje se nakon rođenja kolonizira bakterijama, stoga snažna populacija dobrih crijevnih bakterija onemogućava patogenim bakterijama da nasele crijevo i izazovu infekciju (11).

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije probiotici su živi mikroorganizmi, tzv. "*dobre*" bakterije, koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina. Pomažu u uspostavljanju ravnoteže (između tzv. "*dobrih*" i "*loših*" bakterija)

u našim crijevima (48). Do sada je izolirano najmanje 500 različitih vrsta probiotika u crijevu, među kojima neke vrste imaju izrazito povoljan učinak, pa ih se naziva i promotorima zdravlja. To su primjerice *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus Caseii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* te *Saccharomyces boulardii* (49, 50). Posljednjih godina brojna su se znanstvena istraživanja bavila problematikom utjecaja probiotika na dojenčad i malu djecu. Rezultati do sada provedenih istraživanja pokazali su da postoje i neke dokazane indikacije za uzimanje probiotika, primjerice kod akutne diareje, prevencije diareje izazvane antibioticima, nekrotizirajućeg enterokolitisa, dojenačkih kolika te prevencije infekcija respiratornog sustava kao i nozokomijalnih infekcija. Također, pokazalo se da je učinak ovisan o dozi te o vrsti soja koja se koristi. Istraživanje talijanske skupine autora objavljeno u časopisu *Pediatrics* potvrdilo je učinkovitost primjene probiotičkog soja *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 kod dojenčadi s kolikama. Primjena probiotika u kapima smanjila je plač novorođenčadi i do 80 %. Soj *Lactobacillus reuteri* izoliran je iz majčinog mlijeka i stoga je njegova primjena u dojenaštvu dobro potkrijepljena (51). U hranu za dojenčad dodaju se i drugi dobro istraženi probiotički sojevi. Općenito, do danas je provedeno više od 70 kliničkih istraživanja u kojima je sudjelovalo više od 4.000 dojenčadi i male djece (uključujući i nedonošćad) koja su konzumirala hranu za dojenčad obogaćenu probioticima te nije zabilježena niti jedna neželjena reakcija koja bi se povezala s probioticima (11).

Prebiotici se definiraju kao neprobavljeni ostaci hrane koji povoljno djeluju na organizam, poticanjem rasta bakterija u probavnom sustavu. Te molekule ujedno su prirodni sastojci majčinog mlijeka u kojem se nalaze u obliku kompleksnih molekula. Njihova koncentracija najveća je u kolostrumu, a smanjuje se u kasnijim fazama laktacije (11). Glavna im je uloga poticanje rasta i/ili aktivnosti poželjnih vrsta crijevnih bakterija, uglavnom rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koji su učinkovita zaštita od infekcija tj. patogenih bakterija. Najčešća skupina prebiotika koju nalazimo u dojenačkim mliječnim pripravcima su oligosaharidi (52). Najpoznatiji oligosaharidi su fruktooligosaharidi (FOS) i galaktooligosaharidi (GOS). U brojnim istraživanjima, u kojima je dojenčad bila hranjena hranom za dojenčad s dodatkom galaktooligosaharida, ustanovljeni su pozitivni učinci prebiotika na probavni sustav dojenčeta. Dokazano je da se dodatkom galaktooligosaharida u hranu za dojenčad znatno povećava kolonizacija crijevne mikrobiote (skup organizama koji koloniziraju probavni trakt), odnosno potiče rast poželjnih bakterija (53), smanjuje učestalost infekcija, posebice infekcija gornjih dišnih puteva te se smanjuje pojava alergija kod dojenčadi (54, 55).

2.6.4. Nukleotidi

Nukleotidi se sastoje od fosfata, šećera pentoze i heterocikličkog amina, odnosno dušične baze. Čine primarnu strukturu DNK i RNK, stoga su nužni za stvaranje i zamjenu stanica. Sudjeluju kao intermedijeri u mnogim biosintetičkim procesima te reguliraju metabolizam (56). Majčino mlijeko ima veću koncentraciju nukleotida nego kravlje mlijeko te se dodatak nukleotida u hranu za dojenčad smatra iznimno važnim jer utječe na metabolizam masti, rast te razvoj tkiva dojenčadi (11). Provedena su istraživanja u kojima je dokazano da nukleotidi u hrani za dojenčad imaju pozitivan učinak na crijevnu mikrofloru (57), smanjuju učestalost proljeva, odnosno poboljšavaju probavu dojenčadi (58) te pozitivno djeluju na imunološki sustav (59). Vrste i količine nukleotida koji se dodaju u hranu za dojenčad propisane su Pravilnikom o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci

Određen je udio vode i proteina u 10 uzoraka početne i 2 uzorka prijelazne hrane za dojenčad domaćih i stranih proizvođača, nabavljenih na hrvatskom tržištu. Svi uzorci su u praškastom obliku, 10 uzoraka hrane za dojenčad od kravljeg mlijeka namijenjeno je dojenčadi od 0-6 mjeseci, 1 uzorak hrane za dojenčad od kravljeg mlijeka namijenjen je dojenčadi starijoj od 10 mjeseci i 1 uzorak hrane za dojenčad od kravljeg mlijeka namijenjen je maloj djeci starijoj od 12 mjeseci.

Tablica 1. Analizirani uzorci hrane za dojenčad

UZORAK	PROIZVOD
1	Nan 1
2	Hipp 1
3	Baby love 1
4	Novalac 1
5	Prenan 1
6	Aptamil pronutra +
7	Pre hipp 1
8	Holle 1 bio kravlje
9	Milumil 1
10	Holle 3 bio kravlje
11	Holle 4 bio kravlje
12	Bebimil 1

3.2. Određivanje udjela vode u uzorcima hrane za dojenčad

3.2.1. Materijali:

Laboratorijsko posuđe i uređaji:

- aluminijska posudica
- eksikator
- analitička vaga tip JK 180, YMC CHYO, Mikrotehna, Zagreb
- zračna sušnica tip ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb

3.2.2. Metoda

Princip:

Određuje se udio vode indirektno, pri čemu se mjeri ostatak koji zaostaje nakon sušenja. Iz razlike u masi prije i nakon sušenja do konstantne mase, izračunava se udio vode u uzorku, a gubitak u masi izražava se kao masa vode u uzorku.

Postupak:

Aluminijska posudica koja je prethodno osušena i u eksikatoru ohlađena, izvaže se zajedno s poklopcem s točnošću $\pm 0,0001$. U posudicu se odvaže približno 5 g uzorka hrane za dojenčad s točnošću $\pm 0,0001$ i potrebno ju je protresti kako bi se uzorak ravnomjerno rasporedio. Nepokrivena posudica stavlja se u sušnicu zajedno s koso postavljenim poklopcem na $101\text{ }^{\circ}\text{C}$ približno 2 sata. Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica s uzorkom se poklopi dok je još u sušnici, prebaci u eksikator gdje se hladi, a kada postigne sobnu temperaturu se važe s točnošću $\pm 0,0001$. Nepokrivena posudica stavlja se ponovno u sušnicu zajedno poklopcem na približno jedan sat, nakon čega se ponovno ohladi i izvaže. Postupak se ponavlja sve dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,0005 g. Uzorci su sušeni ukupno 5 sati do konstantne mase. Ostatak uzorka predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi udio vode u uzorku.

Udio vode u uzorku hrane za dojenčad računa se pomoću jednadžbe:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

gdje je: m_1 - masa prazne posudice [g],
 m_2 - masa posudice s uzorkom prije sušenja [g],
 m_3 - masa posudice s uzorkom nakon sušenja [g] (60).

3.3. Određivanje udjela proteina u uzorcima hrane za dojenčad

3.3.1. Materijali

Laboratorijsko posuđe i uređaji:

- analitička vaga tip JK 180, YMC CHYO, Mikrotehna, Zagreb
- menzura
- uređaj za spaljivanje, digestion system 6, 1007 digester, Tecator
- Erlenmeyerova tikvica (250 mL)
- kiveta za Kjeltel sustav (500 mL)
- KjeltelTM8100, TecatorTM Line, Foss
- bireta za titraciju

Kemikalije:

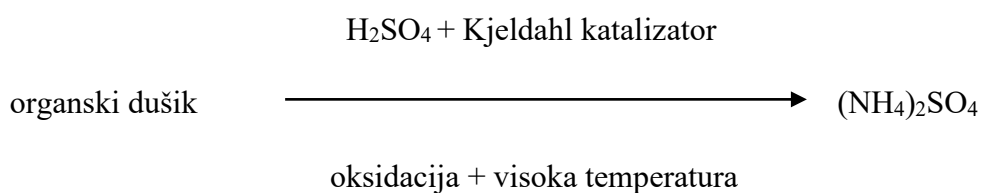
- 96 % sumporna kiselina (H_2SO_4)
- smjesa soli K_2SO_4 i $CuSO_4$ – katalizator kod spaljivanja
- 4 % borna kiselina (H_3BO_3) s indikatorima
- natrijev hidroksid ($NaOH$, $c = 0,1 \text{ mol/L}$)
- klorovodična kiselina (HCl , $c = 0,1 \text{ mol/L}$)

3.3.2. Metoda

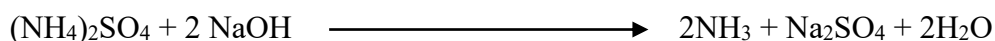
Princip:

1. Mineralizacija

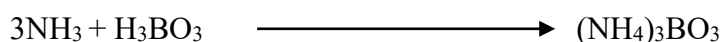
Organske tvari iz uzorka razore se zagrijavanjem sa sumpornom kiselinom uz katalizator koji joj povisuje vrelište i na taj način ubrzava reakciju. Dolazi do oslobađanja proteinskog i neproteinskog dušika (osim dušika vezanog uz nitrata i nitrite) koji zaostaje u obliku amonijevog sulfata.



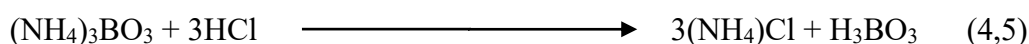
2. Alkalizacija s NaOH u suvišku



3. Destilacija u bornu kiselinu u suvišku



4. Titracija amonijevog borata klorovodičnom kiselinom



Postupak:

Odvagne se približno 1 g uzorka hrane za dojenčad s točnošću $\pm 0,0001$ i pomoću folije i pincete se prebaci u kivetu od 500 mL, tako da grlo kivete ostane čisto. U kivetu se dodaju 2 tablete za spaljivanje (približno 10 g smjese soli) i 15 mL 96 % sumporne kiseline te se kiveta stavlja u digestor gdje se zagrijava u bloku za spaljivanje. Spaljivanje uzorka je završeno kada zaostane bistra plavo-zelena tekućina bez neizgorelih crnih komadića uzorka. Sadržaj u kiveti se hladi do sobne temperature. Za to vrijeme u Erlenmeyerovu tikvicu dodaje se 25 mL 4 % borne kiseline, metilno crvenilo i brom krezol zeleno. Kada se sadržaj u kiveti ohladio, kiveta se stavi na odgovarajuće mjesto u Kjeltec uređaj, a na izlaz se postavi Erlenmeyerova tikvica s pripremljenom bornom kiselinom, na način da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu borne kiseline. Prije destilacije potrebno je provjeriti količinu destilirane vode i NaOH te podesiti sljedeće uvjete za destilaciju: 80 mL destilirane vode, 60 mL lužine NaOH, vrijeme trajanja destilacije 5 min i destilacija se pokrene. Nakon završetka reakcije vidljiva je promjena boje otopine iz ružičaste u zelenu, što ukazuje na prisutstvo amonijaka. Otopina se titrira klorovodičnom kiselinom do promjene boje u ružičastu (60, 5).

Udio dušika u uzorku hrane za dojenčad izračuna se pomoću jednadžbe:

$$\% N = \frac{(T - B) \times N \times 14,007 \times 100}{m}$$

gdje je: T - volumen titranta [mL],

B - volumen titranta slijepe probe [mL],

N - normalitet kiseline,

m - masa uzorka [mg].

Udio proteina u uzorku hrane za dojenčad izračuna se pomoću formule:

$$\%P = \%N \times F$$

gdje je: F - faktor za preračunavanje % dušika u proteine, a iznosi 6,25 za hranu za dojenčad

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu određivan je udio vode te udio proteina u uzorcima hrane za dojenčad. Rezultati su uspoređeni s Pravilnikom i s deklaracijama proizvoda.

Rezultati udjela vode u uzorcima hrane za dojenčad prikazani su u Tablici 2., a rezultati udjela proteina u Tablici 3. i Tablici 4.

4.1. Određivanje udjela vode u uzorcima hrane za dojenčad

Tablica 2. Udio vode u uzorcima hrane za dojenčad

UZORAK	Udio vode [%] (srednja vrijednost ± standardna devijacija)
1	3,24 ± 0,08
2	3,42 ± 0,03
3	3,60 ± 0,02
4	3,71 ± 0,07
5	4,11 ± 0,09
6	3,79 ± 0,05
7	3,44 ± 0,04
8	3,20 ± 0,03
9	3,06 ± 0,01
10	3,11 ± 0,03
11	3,17 ± 0,04
12	2,18 ± 0,05

Prema Pravilniku o ugušćenom (kondenziranom) mlijeku i mlijeku u prahu (NN 46/2007), mlijeko u prahu je proizvod dobiven isparavanjem vode iz mlijeka, djelomično ili potpuno obranog mlijeka, vrhnja ili smjese ovih proizvoda, u kojemu maseni udio vode iznosi najviše 5 % u gotovom proizvodu. Iz rezultata je vidljivo da se udio vode u uzorcima hrane za dojenčad kreće između 2,18 i 4,11 % što je u skladu s Pravilnikom (61).

4.2. Određivanje udjela proteina u uzorcima hrane za dojenčad

Tablica 3. Udio dušika (N) i proteina (P) u uzorcima hrane za dojenčad

UZORAK	Udio dušika (N) [%] (srednja vrijednost ± standardna devijacija)	Udio proteina (P) [%] (srednja vrijednost ± standardna devijacija)
1	1,59 ± 0,02	9,93 ± 0,14
2	1,68 ± 0,02	10,49 ± 0,12
3	1,78 ± 0,18	11,11 ± 1,14
4	1,74 ± 0,01	10,88 ± 0,06
5	2,30 ± 0,01	14,38 ± 0,11
6	2,35 ± 0,04	14,66 ± 0,22
7	1,70 ± 0,02	10,60 ± 0,10
8	1,70 ± 0,01	10,63 ± 0,06
9	1,63 ± 0,01	10,19 ± 0,06
10	2,03 ± 0,01	12,68 ± 0,09
11	1,97 ± 0,01	12,32 ± 0,06
12	1,63 ± 0,01	10,16 ± 0,06

Tablica 4. Usporedba dobivenih rezultata s vrijednostima na deklaraciji

UZORAK	g proteina/ 100 g praha (izmjereno)	g proteina/ 100 g praha (deklaracija)	g proteina/ 100 kcal (izmjereno)	g proteina/ 100 kcal (deklaracija)	Odstupanje od deklaracije (%)
1	9,9	9,6	1,9	1,9	3,4
2	10,5	10,2	2,1	2,0	2,8
3	11,1	11,4	2,2	2,2	-2,5
4	10,9	10,6	2,1	2,1	2,6
5	14,4	14,4	2,9	2,9	-0,1
6	14,7	9,6	3,0	2,0	52,7
7	10,6	10,8	1,9	1,9	-1,9
8	10,6	11,6	2,1	2,2	-8,4
9	10,2	10,0	2,3	2,2	1,9
10	12,7	13,5	2,6	2,8	-6,1
11	12,3	13,7	2,6	2,9	-10,1
12	10,2	10,7	2,0	2,1	-5,1

Prema Pravilniku o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13), početna hrana za dojenčad proizvedena od bjelanjčevina kravljega mlijeka smije sadržavati od 1,8 do 3,0 g proteina/100 kcal, a prihvatljivo odstupanje od deklaracije kod označavanja hranjivih vrijednosti proteina je $\pm 15\%$, što je propisano od strane Znanstvenog odbora pri Hrvatskoj agenciji za hranu (7, 4). Iz rezultata je vidljivo da se udio proteina u 11 uzoraka hrane za dojenčad kreće između 1,9 i 3,0 g/100 kcal što je u skladu s Pravilnikom i vrijednosti su unutar dozvoljenog odstupanja od deklaracije. Udio proteina u uzorku 6 (Aptamil pronutra+) je na gornjoj granici udjela dozvoljenog Pravilnikom, a odstupanje od deklaracije je veće od dozvoljenog.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Majčino mlijeko je „zlatni standard“ u prehrani dojenčadi. Sastav mu je vrlo složen, jedinstven i značajno se razlikuje od mlijeka drugih sisavaca, stoga je ono najbolja i nezamjenjiva hrana za dojenčad.
2. U slučaju kada dojenje nije moguće iz opravdanih razloga, jedina adekvatna zamjena je hrana za dojenčad.
3. Dozvoljene količine makronutrijenata i mikronutrijenata, dodanih specijalnih nutrijenata i tvari u hranu za dojenčad te njezina energetska vrijednost određene su pravilnicima.
4. Prema rezultatima provedenog istraživanja hrana za dojenčad sadrži mali udio vode koji se kreće između 2,18 i 4,11 %, što je u skladu s Pravilnikom o ugušćenom (kondenziranom) mlijeku i mlijeku u prahu (NN 46/2007).
5. U 11 uzoraka hrane za dojenčad udio proteina se kretao između 1,9 i 3,0 g/100 kcal, što je u skladu s Pravilnikom o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (NN 39/13) i vrijednosti su unutar dozvoljenog odstupanja od deklaracije. Udio proteina je u jednom uzorku bio na gornjoj granici udjela dozvoljenog Pravilnikom, a odstupanje od deklaracije je veće od propisanih 15 %.

6. LITERATURA

1. Schuman, A. (2003) A concise history of infant formula (twists and turns included). *Contemp. Pediatr.* **20** (2), 91.
2. Barness, L. A. (1987) History of infant feeding practices. *Am. Clin. Nutr.* **46**, 70-168.
3. Castilho, S.D., Barros Filho, A. A. (2010) The history of infant nutrition. *J. Pediatr.* **86** (3), 179-188.
4. Hrvatska agencija za hranu (2012) Prihvatljiva odstupanja kod navođenja hranjivih vrijednosti hrane. Znanstveno mišljenje. OB-34-01.
5. ISO 1871:1975, Agricultural food products - General directions for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.
6. Grgurić, J. (2003) Dojenačka mliječna hrana i etički i tehnološki izazovi. *Medix.* **9** (50), 99-102.
7. Pravilnik o početnoj i prijelaznoj hrani za dojenčad (2013) *Narodne novine* **39**, Zagreb (NN 39/2013).
8. Stevens E. E., Patrick T. E., Pickler, R. (2009) A history of infant feeding. *J. Perinat. Educ.* **18** (2), 32-39.
9. Greenberg, M. H., Smith, G. F., Vidyasagar, D. (1980) Historical Review and Recent Advances in Neonatal and Perinatal Medicine. Mead Johnson Nutritional Division, <<http://www.neonatology.org/>>. Pristupljeno 23. kolovoza 2016.
10. Friel, J. K., Isaak, C. A., Hanning, R., Miller, A. (2009) Complementary food consumption of Canadian infants. *Open Nutr. J.* **3**, 11-16.
11. Vranešić Bender, D. (2013) Dojenački mliječni pripravci. InPharma, <http://www.inpharma.hr/>. Pristupljeno 27. kolovoza 2016.
12. Anonymus, Choosing a formula for your baby's stage: 1, 2 or 3?, <<http://www.forbaby.co.nz/>>. Pristupljeno 25. kolovoza 2016.
13. Božanić, R. (2014) Sirovine prehrambene industrije - Mlijeko, Prehrambeno - biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
14. Anonymous (2012) Važnost proteina u prehrani beba i male djece, <<http://www.klinfo.hr/>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2016.
15. Anonymous (2012) Proteini nas programiraju, a sve počinje s majčinim mlijekom, <<http://www.klinfo.hr/>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2016.
16. Pravilnik o hrani za posebne prehrambene potrebe (2010), *Narodne novine* **46**, **48**, **117**, **130**, Zagreb (NN 46/07, NN 117/03, 130/03 i 48/04).

17. Stryer, L. (1991) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 11-16.
18. Fabečić-Sabadi, V., Hajnžić, T. F. (1999) Pedijatrija, Školska knjiga, Zagreb, 67-68.
19. Landeka Jurčević, I. (2014) Kemija i biokemija hrane - Proteini, Prehrambeno - biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
20. Šumić, Z. (2008) Tehnologija hrane - Kazein, <<http://www.tehnologijahrane.com/>>. Pristupljeno 27.8.2016.
21. Packard, V. S., Stewart, G. P., Schweigert, B. S., Hawthorn, J. (1982) Human Milk and Infant Formula, Academic Press, New York.
22. Webb, B. H., Johnson, A. H., Alford, J. A. (1974) Fundamental of Dairy Chemistry. The AVI Publishing Company, Inc., Westport.
23. Carić, M. (1985) Tehnologija mleka 1 - Koncentrovani i sušeni proizvodi, Naučna knjiga, Beograd.
24. Gurr, M. I. (1981) Human and artificial milks for infant feeding. *J. Dairy Res.* **48** (3), 519-554.
25. Clark, R. M., Ross, S. A., Hill, D. W., Ferris, A. M. (1987) Within - day variation of taurine and other nitrogen substances in human milk. *J. Dairy Sci.* **70** (4), 776-780.
26. Erbersdobler, H. F., Trautwein, E. (1984) Determination of taurine in human milk, cow milk and some milk products. *Milchwissenschaft.* **39** (12), 722-723.
27. Renner, E. (1983) Milk and Dairy Products in Human Nutrition - Milk Protein and Lactose, München, 90-161.
28. Walker, W. A. (1999) What is the role of nucleotides and polyamines in breast milk. *Acta Paediatr.* **88**, 1313-1315.
29. Friend, B. A., Shahani, K. M., Mathur, B. N. (1983) *J. Appl. Nutr.* **35** (2), 88-115.
30. Goldman, S. A. (1976) Symposium on human lactation. DHEW Publication No. (HSA), 79-5107, 49-58.
31. Hill, I., Porter, P. (1974) Studies of bactericidal activity to Escherichia coli of porcine serum and colostrum immunoglobulins and the role of lysozyme with secretory IgA. *Immunology.* **26**, 1239-1250.
32. Davis, T. A., Nguyen, H. V., Garcia - Bravo, R., Fiorotto, M. L., Jackson, E. M., Lewis, D. S., Lee, D. R., Reeds, P. J. (1994) Amino acid composition of human milk is not unique. *J. Nutr.* **124**, 1126-32.
33. Riordan J. (2004) The biological specificity of breast milk. In: *Breastfeeding and human lactation*. Boston, USA, Jones and Bartlett.

34. Mendez, A., Olano, A. (1979) Lactulose. A review of some chemical properties and applications in infant nutrition and medicine. *Dairy Sci. Abstr.* **41** (9), 521-535.
35. Meduzov, B. C, Biriokova, Z. A. i Ivanova, L. N. (1982) Proizvodstvo detskih moločnih Produktov, Legkaja i piščevaja promišlenost, Moskva.
36. Tratnik, Lj. (1992) Modifikacija kravljeg mlijeka pri proizvodnji mliječne hrane za dojenčad. *Mljekarstvo.* **42**, 221.
37. Niseteo, T. (2013) Bakterije koje život znače - Vaše zdravlje, <http://www.vasezdravlje.com/>. Pristupljeno 31. kolovoza 2016.
38. Sarett, H. P. (1981) The Modern Infant Formula. Infant and Child Feeding, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 99-117.
39. Ergotić, E., Anušić, J. (1978) Bebiron 75, tiskani materijali »Plive«, tvornice farmaceutskih i kemijskih proizvoda, Zagreb.
40. Innis, S. M. (2000) Dietary n-3 fatty acids and brain development. *J. Nutr.* **137**, 855-859.
41. Agostoni, C. (2008) Role of Long - chain Polyunsaturated Fatty Acids in the First Year of Life. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* **47**, 41-44.
42. Kurlak, L. O., Stephenson, T. J. (1999) Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. *Arch. Dis. Child.* **80**, 148-154.
43. Colombo, J., Carlson, E. S., Cheatham, L. C., Fitzgerald - Gustafson, M. K., Kepler, A., Doty, T. (2011) Long - Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Infancy Reduces Heart Rate and Positively Affects Distribution of Attention. *Pediatr. Res.* **70**, 406-410.
44. Ganapathy, S. (2009) Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Immunity in Infants. *Indian Pediatr.*, 46-785.
45. Pastor, N., Soler, B., Mitmesser, S. H., Ferguson, P., Lifschitz, C. (2006) Infants fed docosahexaenoic acid - and arachidonic acid - supplemented formula have decreased incidence of bronchiolitis/ bronchitis the first year of life. *Clin. Pediatr.* **45** (9), 850-855.
46. Hoddinott, P., Tappin, D., Wright, C. (2008) Breast feeding. *BMJ* **336**, 881-887.
47. Havlicekova, Z., Jesenak, M., Banovcin, P., Kuchta, M. (2016) Beta - palmitate - a natural component of human milk in supplemental milk formulas. *Nutr. J.* doi:10.1186/s12937-016-0145-1

48. Rosenzweig Jukić, I. (2007) Pliva zdravlje - Što su probiotici, <<http://www.plivazdravlje.hr/>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2016.
49. Mattar, A. F., Drongowski, R. A., Coran, A. G., Harmon, C. M. (2001) Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. *Pediatr. Surg. Int.* **17**, 265-268.
50. Hatakka, K., Savilahti, E., Ponka, A. (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day centres: double blind, randomised trial. *BMJ* **322**, 1-5.
51. Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Palumeri, E., Calabrese, R., Oggero, R., Roos, S., Matteuzzi, D. (2010) *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double - Blind, Placebo - Controlled Trial. *Pediatr.* **126** (3), 526-533.
52. Marteau, P. (2001) Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health. *Clin. Nutr.* **20**, 41-5.
53. Decsi, T., Arató, A., Balogh, M., Dolinay, T., Kanjo, A. H., Szabó, E., Várkonyi, A. (2005) Randomised placebo controlled double blind study on the effect of prebiotic oligosaccharides on intestinal flora in healthy infants. *Orv. Hetil.* **146** (48), 2445-2450.
54. Arslanoglu, S., Moro, G. E., Boehm, G. (2007) Early Supplementation of Prebiotic Oligosaccharides Protects Formula - Fed Infants against Infections during the First 6 Months of Life. Center for Infant Nutrition, Division of Neonatology, Macedonio Melloni Hospital, *Milan J. Nutr.* **137**, 2420-2424.
55. Arslanoglu, S., Moro, G. E., Schmitt, J., Tandoi, L., Rizzardi, S., Boehm, G. (2008) Early Dietary Intervention with a Mixture of Prebiotic Oligosaccharides Reduces the Incidence of Allergic Manifestations and Infections during the First Two Years of Life. *J. Nutr.* **138**, 1091-1095.
56. Aaron Lerner, M. D., M. H. A., Raanan Shamir, M. D. (2000) Nucleotides in Infant Nutrition - A Must or an Option. *IMAJ.* **2**, 772-774.
57. Brunser, O., Espinoza, J., Araya, M., Cruchet, S., Gil, A. (1994) Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. *Acta Paediatr.* **83**, 188-191.
58. Gutiérrez - Castrellón, P., Mora - Magaña, I., Díaz - García, L., Jiménez - Gutiérrez, C., Ramirez - Mayans, J., Solomon - Santibáñez, G. A. (2007) Immune response to nucleotide - supplemented infant formulae - systematic review and meta - analysis. *Br. J. Nutr.* **98**, 64-67.

59. Singhal, A., Macfarlane, G., Macfarlane, S., Lanigan, J., Kennedy, K., Elias - Jones, A., Stephenson, T., Dudek, P., Lucas, A. (2008) Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula - fed infants - a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1785-1792.
60. Vahčić N., Hruškar M., Marković K. (2008) Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane, Praktikum, Prehrambeno - biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
61. Pravilnik o ugušćenom (kondenziranom) mlijeku i mlijeku u prahu (2007), *Narodne novine* **46**, Zagreb (NN 46/2007).