

Prisutnost L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim proizvodima s područja Republike Hrvatske

Jukić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:424349>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2024.

Iva Jukić

**PRISUTNOST L-GLUTAMINSKE KISELINE
KAO ADITIVA U MESNIM PROIZVODIMA S
PODRUČJA REPUBLIKE HRVATSKE**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Teute Murati (Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta), na Hrvatskom veterinarskom institutu pod komentorstvom dr. sc. Ane Vulić, više znanstvene suradnice.

ZAHVALA

Pogledom unatrag, put studiranja bio je iznimno izazovan, ali neprocjenjivo vrijedan proces osobnog sazrijevanja i prikupljanja znanja te ovom prilikom želim izraziti zahvalnost onima koji su me na tom putu podržavali.

Prije svega, želim izraziti svoju duboku zahvalnost mentorici, izv. prof. dr. sc. Teuti Murati, na njezinoj stručnosti, strpljenju i motivaciji, koji su bili presudni za uspješnu izradu ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem komentorici, dr. sc. Ani Vulić, na kontinuiranoj podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela. Hvala vam na ažurnosti, vrijednim idejama i konstruktivnim kritikama koje su dodatno unaprijedile kvalitetu mog istraživanja.

Neizmjereno sam zahvalna svojoj obitelji, dečku i prijateljima, koji su mi bili najveći oslonac kroz cijelo studiranje, a posebno tijekom izrade diplomskog rada. Hvala vam na bezuvjetnoj podršci, svakom savjetu, toplom zagrljaju i beskonačnom strpljenju, od prvog do posljednjeg ispita.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

PRISUTNOST L-GLUTAMINSKE KISELINE KAO ADITIVA U MESNIM PROIZVODIMA S PODRUČJA
REPUBLIKE HRVATSKE

Iva Jukić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215126

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti udio L-glutaminske kiseline prisutne u uzorcima mesnih proizvoda proizvedenih na području Republike Hrvatske koji su poslani na analizu Hrvatskom veterinarskom institutu tijekom 2023. godine. Udio L-glutaminske kiseline služio je za utvrđivanje poštivanja zakonski propisane maksimalne količine dodatka L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesne proizvode te u konačnici za određivanje potencijalno moguće akutne ili kronične toksičnosti na ljudsko zdravlje. Istraživanjem je određen udio L-glutaminske kiseline u 58 uzoraka gdje niti jedan uzorak nije prikazao nepoštivanje maksimalno dozvoljene količine L-glutaminske kiseline od 10 g/kg. Prosječno najviši udio L-glutaminske kiseline određen je u kategoriji trajnih kobasica (0,91 g/kg), nakon koje slijedi kategorija polutrajnih kobasica (0,76 g/kg), kategorija proizvoda od usitnjenog mesa (0,63 g/kg) te kategorija suhomesnatih proizvoda (0,55 g/kg). Određivanje toksičnih učinaka mesnih prerađevina predstavlja veliki izazov budući da mesne prerađevine nisu jedini izvor L-glutaminske kiseline u ljudskoj prehrani.

Ključne riječi: glutaminska kiselina, mononatrijev glutamat, aditiv, toksični učinci, mesni proizvodi

Rad sadrži: 44 stranice, 4 slike, 10 tablica, 64 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Teuta Murati

Komentor: dr. sc. Ana Vulić, v. znan. sur., Hrvatski veterinarski institut

Pomoć pri izradi: Matea Matijević, teh. sur.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (predsjednik)
2. izv.prof. dr. sc. Teuta Murati (mentor)
3. dr. sc. Ana Vulić, v. znan. sur., HVI (član)
4. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (zamjenski član)

Datum obrane: 25. listopada 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

THE PRESENCE OF L-GLUTAMIC ACID AS AN ADDITIVE IN MEAT PRODUCTS FROM THE
REPUBLIC OF CROATIA

Iva Jukić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215126

Abstract: The aim of this research was to determine the proportion of L-glutamic acid present in samples of processed meat products produced in the Republic of Croatia, which were submitted for analysis to the Croatian Veterinary Institute during 2023. The proportion of L-glutamic acid was used to assess compliance with legally permitted maximum limit amount of L-glutamic acid as an additive in meat products, and ultimately, to evaluate the potential for acute or chronic toxicity to human health. The study determined the L-glutamic acid content in 58 samples, none of which exceeded the legally permitted maximum limit of 10 g/kg. The highest average proportion of L-glutamic acid was found in the category of permanent sausages (0.91 g/kg), followed by the category of semi-permanent sausages (0.76 g/kg), the category of minced meat products (0.63 g/kg), and the category of cured meat products (0.55 g/kg). Determining the toxic effects of processed meat products presents a significant challenge, as processed meat is not the sole source of L-glutamic acid in the human diet.

Keywords: glutamic acid, monosodium glutamate, additive, toxic effects, meat products

Thesis contains: 44 pages, 4 figures, 10 tables, 64 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Teuta Murati, PhD, Associate professor

Co-mentor: Ana Vulić, PhD, Senior Research Associate, Croatian Veterinary Institute

Technical support and assistance: Matea Matijević, technical associate

Reviewers:

1. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (president)
2. Teuta Murati, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ana Vulić, PhD, Senior Research Associate, CVI (member)
4. Klara Kraljić, PhD, Associate professor/Assistant professor (substitute)

Thesis defended: October 25th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KEMIJSKI OPIS L-GLUTAMINSKE KISELINE	2
2.2. L-GLUTAMINSKA KISELINA KAO ADITIV	2
2.2.1. Procjena sigurnosti L-glutaminske kiseline kao aditiva	3
2.3. IZLOŽENOST L-GLUTAMINSKOJ KISELINI PUTEM HRANE	4
2.4. MEHANIZAM DJELOVANJA L-GLUTAMINSKE KISELINE	4
2.5. TOKSIČNI UČINCI L-GLUTAMINSKE KISELINE	6
2.5.1. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na središnji živčani sustav	7
2.5.2. Utjecaj L-glutaminske kiseline na kardiovaskularni sustav	8
2.5.3. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na jetru.....	8
2.5.4. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na reproduktivni sustav	9
2.5.5. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na sustav izlučivanja	9
2.5.6. Uloga L-glutaminske kiseline u progresiji tumora	10
2.5.7. Utjecaj L-glutaminske kiseline na razvoj drugih bolesti	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Uzorci	11
3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji	13
3.1.3. Otapala i reagensi	13
3.2. METODE.....	14
3.2.1. Princip i postupak određivanja vode u uzorcima mesnih proizvoda	14
3.2.1.1. <i>Postupak određivanja</i>	14
3.2.2. Princip i postupak određivanja L-glutaminske kiseline u uzorcima mesnih proizvoda	15
3.2.2.1. <i>Postupak određivanja L-glutaminske kiseline</i>	15
3.3. OBRADA PODATAKA	19
3.3.1. Unos podataka i izračun osnovnih parametara u Excel-u	19
3.3.2. Provođenje ANOVA analize.....	19
3.3.3. <i>Posthoc</i> analiza	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

U današnjem svijetu, upotreba L-glutaminske kiseline kao prehranbenog aditiva postala je uobičajena praksa radi poboljšanja okusa raznih prehranbenih proizvoda, uključujući koncentrate za juhe i umake, prerađene mesne proizvode, krekerne, konzerviranu hranu, gotova jela i brojne druge. L-glutaminska kiselina, iako početno korištena kao zamjena za sol radi smanjenja njezinog udjela u hrani, u konačnici dovela je do pojave različitih simptoma koji su nazvani sindrom kineskog restorana (Kazmi i sur., 2017). Osim toga, prekomjeran unos L-glutaminske kiseline može biti povezan s nizom zdravstvenih problema, poput neurodegenerativnih bolesti (npr. Alzheimerove i Parkinsonove bolesti), pretilosti, alergijskih reakcija te bolesti povezanih s kardiovaskularnim sustavom i imunološkim odgovorom (Bera i sur., 2017).

Obzirom na potencijalno štetne učinke, važno je redovito kontrolirati prehranbene aditive poput L-glutaminske kiseline i njezinih soli radi osiguranja sigurnosti i zdravstvene ispravnosti hrane (Brosnan i sur., 2014). Glutaminska kiselina, kao neurotransmiter, ima ključnu ulogu u tijelu, no njezin višak može imati štetne učinke poput ekscitotoksičnosti, koja može uzrokovati oštećenja ili čak smrt stanica (Samuels, 2020).

S druge strane, svinjsko meso je cijenjeno zbog bogatog okusa i visoke nutritivne vrijednosti, pri čemu aminokiseline poput glutaminske kiseline igraju ključnu ulogu u formiranju okusa. Napredak u tehnologiji proizvodnje aminokiselina omogućio je njihovu primjenu u unapređenju kvalitete mesa, što je od iznimne važnosti s obzirom na rastuću potražnju za visokokvalitetnim mesom (Ma i sur., 2020). Promjene u prehranbenim navikama, s naglaskom na konzumaciju brze hrane, postale su globalni zdravstveni problemi koji zahtijevaju povećanu svijest o važnosti zdrave prehrane (Banerjee i sur., 2021).

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti udio dodane L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim proizvodima te implementirati dobivene rezultate u analizu njenog potencijalnog toksičnog djelovanja. Također, istraživanjem se provjerila usklađenost proizvoda sa zakonskim propisima o dodatku L-glutaminske kiseline u mesne proizvode te se istražilo postoje li razlike u količini dodane L-glutaminske kiseline unutar različitih kategorija mesnih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

Glutaminska kiselina najčešće se u prehrambene proizvode dodaje u obliku mononatrijevog glutamata (engl. *monosodium glutamate*, MSG), prehrambenog aditiva koji poboljšava okus hrane dajući pikantan umami okus te prirodno prisutnog i u namirnicama poput zrelih rajčica, sira, mahuna i kukuruza (Yamaguchi i Ninomiya, 2000). MSG djeluje kao neurotransmiter u mozgu, ali prekomjeren unos može izazvati zdravstvene probleme poput pretilosti, neurotoksičnosti, kardiovaskularnih i jetrenih problema te problema s imunim sustavom (Hazzaa i sur., 2020). Iako je odobren kao siguran aditiv, velika količina glutamata može biti ekscitotoksična, uzrokujući oštećenje ili smrt neuronskih stanica (Samuels, 2020).

2.1. KEMIJSKI OPIS L-GLUTAMINSKE KISELINE

Prema Uredbi Komisije (EU) br. 231/2012 spoj glutaminske kiseline identificiran je kao:

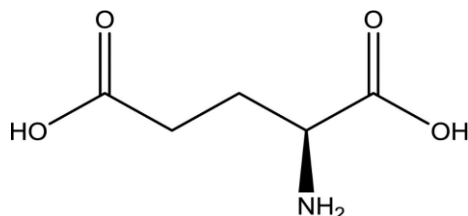
Kemijski naziv: L-glutaminska kiselina, L-2-amino-pentandioična kiselina (slika 1)

Kemijska formula: $C_5H_9NO_4$

Molekulska masa: 147,13 g/mol

Topivost: slabo je topljiv u vodi i praktički netopljiv u etanolu ili eteru

Fizički opis: bijeli kristali ili kristalni prah



Slika 1. Kemijska struktura L-glutaminske kiseline (prema EFSA Panel, 2017)

2.2. L-GLUTAMINSKA KISELINA KAO ADITIV

L-glutaminska kiselina se u značajnim količinama nalazi u hrani bogatoj bjelančevinama, poput sira, pilećeg, goveđeg i svinjskog mesa (Ninomiya, 1998). Ovaj aditiv ne pojačava okuse slatkog, slanog, gorkog i kiselog, već pojačava složene arome mesa, morskih plodova ili povrća s okusom umami (Anderson i sur., 2018), poznat kao peti okus te se često opisuje kao mesni okus (Yamaguchi i Ninomiya, 2000).

U 1960-ima, glutaminska kiselina je postala uobičajen aditiv, a hidrolizirani proteinski proizvodi poput biljnih bjelančevina, natrijevog kazeinata i autoliziranog kvasca postali su popularni. Početkom 1970-ih, proizvodne tvrtke zamijenile su glutaminsku kiselinu

hidroliziranim biljnim bjelančevinama i autoliziranim kvascem u dječjoj hrani, ali su sastojci s glutaminskom kiselinom ostali u formulama za dojenčad do kasnih 1970-ih. U posljednjih 30 godina, upotreba glutaminske kiseline značajno se povećala, te je sada prisutna u mnogim prehrambenim proizvodima, kao što su smrznuti obroci, krekeri, konzervirana tuna, juhe, prerađeno meso, dodaci prehrani, formule za dojenčad, preljevi za salate (Kazmi i sur., 2017).

Glutamat se prirodno nalazi u hrani u slobodnom obliku i vezan za bjelančevine. On čini oko 8 - 10 % sadržaja aminokiselina prosječnih prehrambenih bjelančevina (Raiten i sur., 1995). Odrasli Amerikanci konzumiraju oko 100 g bjelančevina dnevno, što dovodi do unosa glutamata od 8 - 10 g, odnosno 110 - 140 mg/kg za osobu tešku 70 kg (Austin i sur., 2011). S druge strane, unos MSG-a u prehrani Azijata varira od 1120 do 1600 mg dnevno u japanskoj populaciji, 1570 do 2300 mg dnevno u južnokorejskoj populaciji te 3000 mg dnevno u tajvanskoj populaciji (Raiten i sur., 1995). Za osobu na Tajvanu tešku 60 kg koja unosi 2400 kcal dnevno, unos bjelančevina iznosio bi oko 90 g dnevno što predstavlja unos glutamata iz prehrambenih bjelančevina iznosi oko 150 mg/kg dnevno, dok unos dodanog glutamata iznosi oko 50 mg/kg dnevno, što čini oko 25 % ukupnog dnevnog unosa glutamata (Brosnan i sur., 2014).

Globalna potrošnja glutaminske kiseline se udvostručila iz nekoliko razloga. U azijskim zemljama, potražnja je povećana zbog promjena prehrambenih navika, urbanizacije, poboljšanog životnog standarda i razvoja prehrambeno-prerađivačke industrije. Međutim, prednosti upotrebe ovog aditiva su brojne: pruža umami okus, smanjuje potrebu za soli i mastima bez promjene okusa, može se koristiti kao zamjena za kuhinjsku sol jer sadrži trećinu natrija, te se koristi za poboljšanje okusa hrane kod pacijenata koji su izgubili apetit. Osim toga, njegova laka dostupnost, prihvaćenost među potrošačima i isplativost povećali su njegovu upotrebu u prehrambenoj industriji (Kazmi i sur., 2017).

2.2.1. Procjena sigurnosti L-glutaminske kiseline kao aditiva

L-glutaminska kiselina i glutamati (E 620 – 625) odobreni su kao prehrambeni aditivi u EU prema Prilogu II. Uredbe (EZ) br. 1333/2008, dok su posebni kriteriji čistoće definirani Uredbom (EU) br. 231/2012. L-glutaminsku kiselinu i njezine natrijeve, kalijeve, kalcijeve, amonijeve i magnezijeve soli, koje se koriste kao dodaci hrani, procijenio je Znanstveni odbor za prehranu (engl. *Scientific Committee on Food*, SCF) 1990. godine te zaključio da ne postoji zabrinutost za zdravlje s obzirom na visoki unos glutamata hranom (EFSA Panel, 2017). Zajednički FAO/WHO stručni odbor za prehrambene aditive (engl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) ponovno je procijenio L-glutaminsku kiselinu i njezine soli 1970. i 1973. godine, te je postavio prihvatljivi dnevni unos (engl. *acceptable daily intake*, ADI) na 0 - 120 mg/kg tjelesne mase dnevno (JECFA, 1974).

Ponovna procjena 2015. godine pokazala je da L-glutaminska kiselina i njezine soli uzrokuju nisku akutnu toksičnost. Studije akutne i subkronične izloženosti nisu otkrile štetne učinke pri uzimanju ovih aditiva u dozama do otprilike 5000 mg/kg tjelesne mase dnevno (kratkoročne studije) i 5250 mg/kg tjelesne mase dnevno u jednom testu granične doze. Panel je procijenio da su dostupni podaci o genotoksičnosti dovoljni za procjenu genotoksičnosti glutamata. Na temelju toga, Vijeće je zaključilo da glutaminska kiselina i njezine soli (E620 - E625) ne predstavljaju rizik od genotoksičnosti kada se koriste kao dodaci hrani (EFSA Panel, 2017).

2.3. IZLOŽENOST L-GLUTAMINSKOJ KISELINI PUTEM HRANE

ANS Panel procijenio je kroničnu izloženost glutaminskoj kiselini i glutamatima (E620 - E625) za različite skupine stanovništva, uključujući dojenčad, malu djecu, djecu, adolescente, odrasle i starije osobe. Izloženost prehrambenim aditivima glutaminske kiseline i glutamata (E620-E625) izračunata je množenjem njihovih koncentracija u svakoj kategoriji hrane s količinom potrošnje po kilogramu tjelesne mase za svaku osobu. Na temelju toksikološke baze podataka i razine bez opaženog štetnog učinka (engl. *no observed adverse effect level*, NOAEL) od 3200 mg/kg tjelesne mase dnevno, utvrđenog u studiji neurorazvojne toksičnosti, te primjenom faktora sigurnosti od 100, ANS Panel je utvrdio ADI od 30 mg/kg tjelesne mase dnevno, izražen kao glutaminska kiselina, za L-glutaminsku kiselinu i glutamate (E620 - E625). Doze koje su povezane s glavoboljom iznose 85,8 mg/kg tjelesne mase dnevno, s povišenim krvnim tlakom 150 mg/kg tjelesne mase te s povećanjem inzulina više od 143 mg/kg što je iznad ADI vrijednosti (EFSA Panel, 2017).

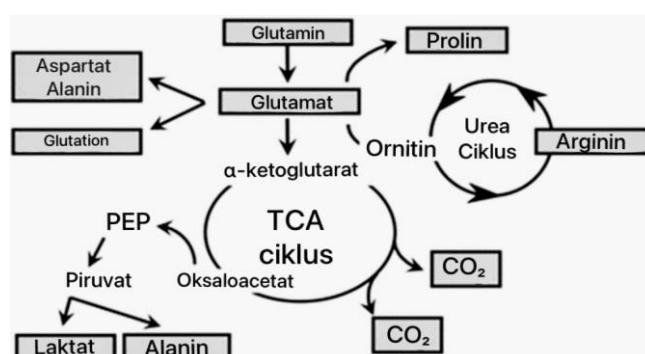
2.4. MEHANIZAM DJELOVANJA L-GLUTAMINSKE KISELINE

Glutaminska kiselina, neesencijalna je aminokiselina koja je najzastupljenija slobodna aminokiselina u mozgu te služi kao ključni ekscitacijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (engl. *central nervous system*, CNS). Osim toga, glutamat ima ulogu u održavanju redoks ravnoteže piridinskih nukleotida i služi kao izvor energije. Metabolizam glutamata je usko povezan s Krebsovim ciklusom, pri čemu glutamat dehidrogenaza katalizira reakciju glutamata s oksidiranim oblikom nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) kako bi se proizveli α -ketoglutarat i nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) (Krebs i Veech, 1969). Kada su razine glukoze u mozgu niske, glutamat služi kao alternativni izvor energije (Miller i sur., 1975).

Glutamat se oslobađa iz presinaptičkih neurona pri prijenosu živčanih impulsa i veže se na glutamatne receptore na postsinaptičkim neuronima. Ova neurotransmisija se prekida preuzimanjem glutamata od strane astrocita. Istraživanja su pokazala da vrlo visoke doze glutamata mogu uzrokovati oštećenje mozga u područjima nezaštićenima krvno-moždanom

barijerom (engl. *blood-brain barrier*, BBB), što podržava teoriju da prekomjerna stimulacija ekscitatornih receptora može dovesti do smrti neurona (Price i sur., 1981). Ova hipoteza je dodatno potkrijepljena kao objašnjenje oštećenja neurona u akutnim stanjima poput moždanog udara (Martin i sur., 1994). Subkutana primjena visokih doza glutaminske kiseline i njenih soli u štakora tijekom ranog postnatalnog razdoblja izaziva citotoksične efekte u CNS-u (Ureña-Guerrero i sur., 2003).

Receptori za umami okus, koji se nalaze na jeziku, grlu i cijelom gastrointestinalnom traktu, igraju važnu ulogu u tim procesima (Stańska i Krzeski, 2016). Na slici 2 prikazan je metabolizam glutamata koji započinje u crijevnim enterocitima gdje se pretvara u α -ketoglutarat, a zatim ulazi u Krebsov ciklus tj. ciklus trikarboksilnih kiselina (engl. *tricarboxylic acid cycle*, *TCA cycle*) za proizvodnju energije. Glutamat se dalje metabolizira u jetri, mišićima i mozgu, pretvarajući se u različite aminokiseline ili glukozu. Istraživanja su pokazala da se većina glutamata iz hrane oksidira u crijevima pri prvom prolasku, a njegov povećani unos koristi se za stvaranje adenosin trifosfata (engl. *Adenosine triphosphate*, ATP) ili drugih aminokiselina (Kazmi i sur., 2017).



Slika 2. Metabolizam glutamata (prema Kazmi i sur., 2017)

PEP – fosfoenlpiruvat; TCA ciklus - ciklus trikarboksilnih kiselina; CO_2 – ugljikov(IV) oksid

Apsorpcija glutamata u crijevima i njegov metabolizam značajno se razlikuju između novorođenčadi i odraslih. Kod beba majmuna razine glutamata u plazmi su veće nego kod odraslih, dok kod ljudi nije zabilježena takva razlika (Hays i sur., 2007). Ispitivanja na miševima, štakorima i svinjama pokazala su da povećanje glutamata u plazmi nakon oralne primjene glutamata ne rezultira povećanjem koncentracije glutamata u mozgu, osim u slučajevima visokih doza (Monno i sur., 1995).

Metabolizam glutamata u mozgu uglavnom se odvija putem transaminacije u aspartat, a ne putem oksidativne deaminacije, dok se u jetri i mišićima pretvara u različite aminokiseline i glukozu (Balazs, 1965). Glutamat se izlučuje putem bubrega u malim količinama, a njegova razina u urinu može se mjeriti (Ragginer i sur., 2012). Glutamat ima ključnu ulogu u različitim

fiziološkim procesima, od neurotransmisije do energetskog metabolizma i probave (EFSA Panel, 2017).

2.5. TOKSIČNI UČINCI L-GLUTAMINSKE KISELINE

Istraživanja su pokazala da konzumacija L-glutaminske kiseline i njenih soli može izazvati niz simptoma u ljudi. Povećanje razine glutamata u plazmi nakon oralnog unosa glutamata može dovesti do promjene krvnog tlaka i pojave simptoma kao što su utrnulost, slabost i palpitacije. Budući da su tkiva osjetljiva na glutamat prisutna u cijelom tijelu, učinci L-glutaminske kiseline i njenih soli mogu biti sustavni (Vulić i sur., 2019; Kazmi i sur., 2017; Fernstrom i sur., 1996; Reynolds i sur., 1979; Abraham i sur., 1975).

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća, Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) provodila je procjenu sigurnosti prehrambenih aditiva gdje je MSG došao pod nadzor nakon što su izvješća pokazala da su subkutane injekcije visokih doza MSG-a novorođenim miševima izazvale degenerativne promjene u mozgu. Najznačajniji učinci zabilježeni su u specifičnom dijelu mozga koji kontrolira izlučivanje nekoliko hormona hipofize. Kada su te životinje dosegle odraslu dob, bile su nižeg rasta, pretile te su imale probleme s reprodukcijom, što je sve bilo povezano s poremećenim funkcijama hipotalamusa i hipofize. Degenerativne promjene u hipotalamusu bile su vidljive samo tijekom prvih 12 - 24 sata nakon primjene MSG-a, ali su funkcionalne posljedice postale očite kada su životinje odrasle (Olney i Ho, 1970).

Klinička istraživanja pokazuju da su prve nuspojave zabilježene 1968. godine, nazvane "sindrom kineskog restorana" sa simptomima poput utrnulosti, slabosti i ubrzanih otkucaja srca nakon konzumacije obroka. Unos glutamata putem hrane često rezultira povećanim osjećajem gladi što je potvrđeno u različitim studijama (Kazmi i sur., 2017). Ranije su količine slobodnog glutamata u prehrani bile niske, ali razvoj tehnologije proizvodnje glutamata uvelike je povećao njegovu dostupnost, što je dovelo do povećane izloženosti ljudi ovom aditivu i potencijalnih zdravstvenih problema (Samuels, 2020).

Iako FDA i EFSA (engl. *European Food Safety Authority*) tvrde da je glutamat siguran za upotrebu, postoji rasprava o tome koliko je zapravo siguran (Zanfirescu i sur., 2019). Istraživanja na životinjskim modelima sugeriraju da glutamat može uzrokovati toksične učinke na reproduktivne funkcije, neurotoksičnost, oštećenje testisa, promjene u ponašanju i druge. Povećana konzumacija MSG-a povezana je s raznim zdravstvenim problemima poput pretilosti, inzulinske rezistencije, dijabetesa, neuroloških poremećaja i oštećenja srčanog tkiva (Nnadozie i sur., 2019).

Već više od 60 godina, provode se istraživanja o učincima MSG-a koji se često koristi kao jednokratna oralna doza do 150 mg/kg tjelesne mase, a ponekad i kronično do 6 tjedana s dnevnim dozama do 150 000 mg/dan (oko 2000 mg/kg tjelesne mase/dan za osobu od 70 kg) i tijekom 12 tjedana u dnevnim dozama do 45 000 mg/dan (oko 600 mg/kg tjelesne mase/dan, u tri podijeljene doze tj. oko 200 mg/kg pri svakom doziranju), bez ozbiljnih nuspojava osim povremene mučnine (Fernstrom, 2018). Eksperimenti na primatima također su istraživali sigurnost MSG-a u dozama od 1000 do 4000 mg/kg tjelesne mase. Istraživanja su pokazala da MSG ne uzrokuje neurodegenerativne promjene u hipotalamusu, čak i pri visokim dozama (Reynolds i sur., 1979; Abraham i sur., 1975). Kod novorođenih majmuna, značajna povećanja razine glutamata u plazmi nisu dovela do oštećenja funkcije hipofize, što sugerira da ni visoke doze MSG-a ne uzrokuju štetne učinke. Fernstrom i sur. (1996) pokazali su da je izloženost oralnoj dozi od 150 mg/kg MSG-a značajno povećala razinu glutamata u plazmi, ali nije uzrokovala značajne promjene u razinama hormona hipofize, uključujući prolaktin.

2.5.1. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na središnji živčani sustav

Kod sisavaca, ekscitacijski neurotransmiteri poput glutamata imaju ključnu ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima u središnjem živčanom sustavu (Mattson, 2008). Sve veći broj dokaza sugerira da povećana agresivnost kod životinja može biti rezultat prekomjerne aktivacije glutamatnih putova u kombinaciji s nižim razinama γ -aminomaslačne kiseline (GABA), koja je važna za funkcije središnjeg živčanog sustava. Također, slobodni radikali koji djeluju na dopaminergičke sustave mogu dovesti do neurodegeneracije i smanjenja lokomotorne aktivnosti. L-glutaminska kiselina povezana je s narušavanjem ravnoteže između endogenih antioksidansa i slobodnih radikala, što rezultira gubitkom integriteta membrane, smanjenom funkcijom neurona, povećanom nespecifičnom propusnošću različitih iona, te patološkim promjenama unutarstaničnih metaboličkih putova (Swamy i sur., 2013). Osim toga, postoji povezanost sa staničnom smrću, smanjenjem broja fotoreceptora i glija stanica u neuronima dojenčadi sisavaca koji su bili izloženi L-glutaminskoj kiselini (Husarova i Ostatnikova, 2013). Također, uzrokuje promjene u hipokampusu, uključujući smanjenu regulaciju cikličke 5' adenzin monofosfat-aktivirane protein kinaze (AMPK) te mijenja histomorfologiju neuronskog oštećenja u cerebralnom korteksu i malom mozgu kod glodavaca (Swamy i sur., 2013). Dokazi sugeriraju da prehrana bogata MSG-om mijenja neurokemijske tvari u velikom mozgu, hipokampusu i malom mozgu kod odraslih sisavaca (Banerjee i sur., 2021). Neurološka stanja koja su povezana s glutatom uključuju migrene, epileptične napade, autizam, hiperaktivnost, Alzheimerovu bolest, multiplu sklerozu i Parkinsonovu bolest (Bera i sur., 2017).

2.5.2. Utjecaj L-glutaminske kiseline na kardiovaskularni sustav

Primjena L-glutaminske kiseline dovodi do oksidacijskog stresa u srcu, uz povećanje razina laktat dehidrogenaze, aspartat transaminaze i alanin transaminaze. Kod štakora s infarktom miokarda, glutamat je izazvao promjene u srčanom ritmu, uključujući tahiaritmiju, ovisno o primijenjenoj dozi L-glutaminske kiseline (Yan i sur., 2013). Također, način primjene MSG-a igra važnu ulogu gdje metode poput intraperitonealne, intravenske i supkutane primjene koriste nešto veće doze od onih koje ljudi unose putem hrane. S druge strane, Konrad i sur. (2012) sugerirali su da je pretilost uzrokovana glutamatom povezana s hipertenzijom, bradikardijom i vagusnim simpatičkim učincima. Pretilost inducirana glutamatom, koja se razvija zbog nakupljanja masnoća u masnom tkivu uslijed povećane regulacije kolesterola, na kraju dovodi do kardiovaskularnih poremećaja (Airaodion i sur., 2019). Srčane anomalije izazvane glutamatom uključuju dislipidemiju, poremećaj ravnoteže između slobodnih radikala i razina antioksidansa, oksidacijski stres, nekrozu kardiomiocita i srčanu aritmiju (Banerjee i sur. 2021).

2.5.3. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na jetru

Kronična izloženost glutamatu povezana je s narušenom propusnošću membrane, što dovodi do jetrene fibroze kroz deformaciju hepatocita, dilataciju središnje vene, liziranje crvenih krvnih stanica, degenerativnih promjena s vakuolizacijom te staničnu infiltraciju na modelu glodavaca (Zanfirescu i sur., 2019). Međutim, Takai i sur. (2014) izvijestili su da glutamat izaziva hiperinzulinemiju, hiperkolesterolemiju, staničnu infiltraciju eozinofila, limfocita, neutrofila, plazmocita, mastocita i makrofaga te nakupljanje liposoma u hepatocitima, što na kraju rezultira nealkoholnim steatohepatitisom (engl. *non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) u mišjem modelu. Osim toga, steatoza izazvana pretilošću i upalni odgovor u jetri uzrokovan MSG-om dovode do hepatocelularnog karcinoma. Kod ljudi, povećana konzumacija glutamata povezana je s nealkoholnom masnom bolesti jetre kod pacijenata s prekomjernom težinom i dijabetesom. Waer i Edress (2006) su pokazali da povećani unos glutamata povećava sadržaj glikogena u jetri, slobodnih masnih kiselina, fosfolipida i triglicerida, stvarajući hiperlipidemijska stanja. Dokazi također sugeriraju da glutamat izaziva oksidacijski stres poremećajem redoks ravnoteže, eskalacijom peroksidacije lipida i smanjenjem razina endogenih antioksidansa, što stimulira stvaranje kolagenskih vlakana u jetri. MSG uzrokuje oštećenje jetre promjenom metabolizma, povećanjem proizvodnje aspartat transaminaze, alanin transaminaze i gama-glutamil transferaze, što rezultira upalom, steatozom, infiltracijom limfocita, monocita i makrofaga te fibrozom i neoplastičnim promjenama, uključujući nodularne lezije (Banerjee i sur., 2021).

2.5.4. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na reproduktivni sustav

Glutamat mijenja tipičnu histomorfološku strukturu testisa. Nedavna studija Mondal i sur. (2018) pokazala je da svakodnevna konzumacija glutamata povećava vjerojatnost narušene spermatogeneze, s većim pahinmom u primarnim spermatocitima i povećanim primarnim folikulima. Osim toga, studija Eweka i sur. (2011) pokazala je štetne učinke glutamata na ženski reproduktivni sustav, uključujući oštećenja jajnika kao što su poremećena vakuolizacija stanica strome i bazalne membrane, povećana veličina stanica folikula te odvajanje endosalpinksa od mezosalpinksa. Ksenobiotici poput glutamata uzrok su smanjene razine testosterona, promjena u strukturi testisa, krvarenja testisa, oligospermije te većeg rizika od neplodnosti (Pavlović i sur., 2007). Anabarkeh i sur. (2019) dokazali su da MSG inducira apoptozu zametnih stanica u primarnim spolnim organima mužjaka, što uzrokuje oštećenje DNA putem ugradnje obilježenog 2'-deoksiuridina, 5'-trifosfata (dUTP) na mjestima fragmentirane DNA u modelu štakora, pri čemu je apoptoza bila izraženija u primarnim spermatocitima nego u spermatogonijama.

2.5.5. Toksični učinci L-glutaminske kiseline na sustav izlučivanja

Bubrezi su ključni organ u sustavu izlučivanja, odgovorni za uklanjanje toksičnih tvari iz tijela i regulaciju ravnoteže tekućina i elektrolita. Promjene u crijevnoj mikrobioti koje igraju ključnu ulogu u zaštiti ljudskog zdravlja povezane su s kroničnim bolestima poput kronične bubrežne bolesti (Pongking i sur., 2020). Unos prehrane s glutamatom smanjuje prisutnost bakterija kao što su *Megamonas*, *Faecalibacterium* i *Blautia*, dok povećava prisutnost *Collinsella* (Peng i sur., 2018). Jedan od značajnih čimbenika rizika za kroničnu bubrežnu bolest je prehrana zastupljena s glutamatom, koja može dovesti do opstruktivne nefropatije, uključujući blokadu bubrega i smanjenje razine inhibitora kamenca, poput citrata i magnezija, što rezultira alkalizacijom urina. U stanicama bubrega, glutamat potiče katabolizam glutamata, stvarajući ugljični dioksid (CO_2) i bikarbonat (HCO_3^-). Apsorpcija HCO_3^- u cirkulaciju uzrokuje eliminaciju viška lužina putem bubrega, što dovodi do alkalizacije urina i potiče nefrolitijazu s hidronefrozom (Pongking i sur., 2020). Studija temeljena na proteomskoj analizi, (Sharma i sur., 2014) pokazala je da povećani unos glutamata dovodi do veće stope Krebsovog ciklusa zbog visoke razine α -ketoglutarat dehidrogenaze, što također izaziva oksidacijski stres u bubrežnim stanicama. Oksidacijski stres u urinarnom sustavu nastaje zbog nekontroliranog metabolizma glutamata, što izaziva stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i povećanu proizvodnju slobodnih radikala, uz nedovoljnu prisutnost endogenih antioksidansa, što dovodi do nefrotoksičnosti i oštećenja stanica u bubrežnom sustavu (Banerjee i sur., 2021).

2.5.6. Uloga L-glutaminske kiseline u progresiji tumora

Glutamatni receptori također su otkriveni u limfocitima, timocitima i nekim drugim ne-neuronskim stanicama. Dokazi sugeriraju da MSG izaziva povećanu regulaciju upalnih citokina i smanjenu regulaciju adiponektina u slučajevima kronične upale. Nakanishi i sur. (2008) zabilježili su da pretilost i dijabetes izazvani glutamatom pozitivno doprinose nealkoholnoj masnoj bolesti jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), što može dovesti do NASH-a s upalom i razvojem primarnog tumora do hepatocelularnog karcinoma. Razvoj raka povezan je s aktivacijom natrijevih kanala, ekscitatornim glutamatom i ne-neuronskim ekscitatornim receptorima, što rezultira hiperekscitabilnošću stanica. Povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u uvjetima oksidacijskog stresa i abnormalno nakupljanje masti u jetri povezani su s prekomjernom težinom i metaboličkim sindromom, što je također zabilježeno tijekom razvoja hepatocelularnog karcinoma (Zanfirescu i sur., 2019). Beyerle i sur. (2015) dokazali su povezanost između kolorektalnog karcinoma i aktivnosti glutation S-transferaze, citokroma P450 i UDP-glukuronozil transferaze kod ljudi. Kako bi istražili vezu između kolorektalnog karcinoma i pretilosti izazvane glutamatom, Hata i sur. (2012) također su utvrdili da pretilost izazvana MSG-om predstavlja visok rizik za razvoj raka debelog crijeva izazvanog azoksimetanom putem povećane regulacije IGF-1 receptora uz povećane razine inzulina, kolesterola i šećera u krvi. U malignim stanicama, ova modificirana stanična signalizacija ima važnu ulogu u sintezi ATP-a, kontroli korištenja energije i održavanju redoks ravnoteže putem aerobne glikolize u tumoru i glutaminaze koja proizvodi glutamat iz glutamina gdje ciklus limunske kiseline igra ključnu ulogu u proizvodnji α -ketoglutarata iz glutamata (Scalise i sur., 2017).

2.5.7. Utjecaj L-glutaminske kiseline na razvoj drugih bolesti

Glutamat uzrokuje razne štetne učinke na ljudsko zdravlje, uključujući dijabetes tipa 2 putem aktivacije N-metil-D-aspartat receptora što rezultira disfunkcijom β -stanica gušterače, hiperfagijom, hiperleptinemijom, dislipidemijom, poremećajem disanja tijekom spavanja, te je povezan s nociceptivnim odgovorima i sindromom kineskog restorana (Huang i sur., 2017). Osim toga, konzumacija glutamata dovodi do pojave metaboličkog sindroma poznatijeg kao sindrom X koji obuhvaća skup bolesti kao što su pretilost, hiperglikemija, dislipidemija, visoki krvni tlak, dijabetes, steatoza jetre i kardiovaskularni poremećaj. Hiperfagija, hiperleptinemija i dislipidemija povezane su s konzumacijom glutamata, što rezultira povećanom razinom leptina u serumu i promijenjenim omjerom lošeg i dobrog kolesterola (Bautista i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovome radu provedena je laboratorijska analiza određivanja L-glutaminske kiseline kao aditiva u uzorcima mesnih proizvoda (n=58) (tablica 1) poslanih na analizu Hrvatskom veterinarskom institutu tijekom 2023. godine.

3.1.1. Uzorci

Analizirani uzorci bili su proizvodi mesnih industrija s područja Republike Hrvatske proizvedeni tijekom 2023. godine. Kategorizacija uzoraka mesnih proizvoda izvršena je prema Pravilniku o mesnim proizvodima (Pravilnik, 2018). Uzorci su nakon homogenizacije pohranjeni u PVC posudice te skladišteni u hladnjaku na +4 °C ili ledenici na -20 °C do početka analize.

Tablica 1. Analizirani uzorci mesnih proizvoda

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj analiziranih uzoraka
Proizvodi od usitnjenog mesa	Čajna pašteta	2*	5
	Jetrena pašteta	2*	
	Kokošja pašteta	1	
Trajni i polutrajni suhomesnati proizvodi	Prsni vršci	1	7
	Suha rebra	2*	
	Dimljeni buncek	1	
	Rolana lopatica	1	
	Lopatica	1	
	Dimljena vratina	1	
Trajne kobasice	Zimska kobasica	2*	11
	Trajna kobasica	1	
	Turist kobasica	1	
	Panceta	2*	
	Sendvič salama	1	
	Panona	1	
	Wintera	1	
	Buđola	2*	

* ista vrsta proizvoda različitog proizvođača

Tablica 1. Analizirani uzorci mesnih proizvoda – *nastavak*

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj analiziranih uzoraka
Polutrajne kobasice	Debrecinka	1	35
	Kranjska kobasica	4*	
	Bbq kobasica sa sirom	1	
	Vikend kobasica	1	
	Slaninska kobasica	2*	
	Jeger	1	
	Obiteljska kobasica	1	
	Safalada	1	
	Pučka kobasica	3*	
	Čili kobasica	1	
	Safalada	1	
	Šunka – PIZZA	1	
	Domaća dubravska kobasica	1	
	Hrenovke	10*	
	Posebna salama	1	
	Hot dog hrenovke	1	
	Sendvič narezak sa sirom	1	
	Extra salama	1	
Mortadela	1		
Pileći parizer	1		

*ista vrsta proizvoda različitog proizvođača

3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji

Tijekom analize određivanja L-glutaminske kiseline u uzorcima mesnih proizvoda korišteno je sljedeće laboratorijsko posuđe i uređaji:

Određivanje vode u uzorcima

- Uređaj za homogeniziranje (Grindomix GM 200, Retsch)
- Analitička vaga, s preciznošću vaganja od 0,0001 g (CP 225 D, Sartorius)
- Porculanski lončić, promjera oko 60 mm i visine oko 25 mm
- Tanak stakleni štapić, duljine oko 80 mm
- Termostat, s mogućnošću održavanja temperature na $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Desikator, sa sredstvom za isušivanje (CuSO_4)
- Pijesak, opran kiselinom i ožaren (Merck KGaA, Njemačka)

Određivanje L-glutaminske kiseline

- Tehnička vaga s preciznošću vaganja od 0,01 g (GF-2000)
- Centrifuga, s mogućnošću postizanja 5000 o/min (Rotanta 460RF, Hettich, Njemačka)
- Vertikalna miješalica, „head-over-head“ (Multi RS-60, bioSan, Latvija)
- pH metar (SevenCompact 20, METTLER TOLEDO)
- UV/VIS spektrofotometar (HACH DR 6000, Njemačka)
- Jednokratna automatska pipeta, s mogućnošću pipetiranja volumena 10-100 μL , 100-1000 μL , 5000 μL te 10 mL
- Odmjerne tikvice volumena 250, 500 i 1000 mL
- Konusne PTFE epruvete sa čepom na navoj volumena 50 mL
- Plastični lijevak
- Filter papir, crna vrpca
- Staklene epruvete s ubrušenim čepom volumena 10 mL

3.1.3. Otapala i reagensi

- Perklorna kiselina, min. 60 % p.a. (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Kalij hidroksid, p.a. (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Kit L-glutamic acid (R-Biopharm, Njemačka)
- Ultra čista voda elektrolitičke provodljivosti $\leq 0,05\text{ }\mu\text{S/cm}$ (Direct-Q 3 UV, Merck, Njemačka)

3.2. METODE

Kako bi se odredio udio L-glutaminske kiseline u uzorcima mesnih proizvoda bilo je potrebno prvo odrediti udio vode u svakom pojedinačnom uzorku.

3.2.1. Princip i postupak određivanja vode u uzorcima mesnih proizvoda

Metoda se temeljila na miješanju prethodno homogeniziranog uzorka s pijeskom te sušenju na $103 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase. Gubitak mase uzorka predstavljao je udio vode koji je ovisan o karakteristikama samog uzorka.

3.2.1.1. Postupak određivanja

- Priprema uzorka
Uzorci su izrezani na kockice i homogenizirani na uređaju Grindomix GM 200, 16 sekundi pri 4000 o/min. Nakon homogenizacije uzorci su pohranjeni u plastičnim posudicama s poklopcem koje su bile napunjene skroz do vrha za usporavanje procesa kvarenja zbog manjeg kontakta sa zrakom. Pohranjeni uzorci u posudicama analizirani su u što kraćem vremenskom periodu.
- Priprema lončića i pijeska
U porculanski lončić kvantitativno je prenesen pijesak čija je masa bila 3-4 puta veća od mase uzorka. Porculanski lončić s pijeskom i staklenim štapićem bilo je potrebno osušiti na $103 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ u termostatu 30 minuta. Zatim je slijedilo hlađenje na sobnu temperaturu u deksikatoru te potom vaganje lončića s pijeskom i staklenim štapićem s točnošću odvage 0,0001 g (m_0).
- Sušenje uzorka
U prethodno osušeni, ohlađeni i izvagani porculanski lončić s pijeskom i staklenim štapićem odvagano je 5 g homogeniziranog uzorka s točnošću odvage 0,0001 g (m_1). Zatim je uzorak pomoću staklenog štapića izmiješan s pijeskom te stavljen na sušenje u termostatu 2 sata na $103 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon isteka vremena sušenja uslijedilo je hlađenje na sobnu temperaturu u deksikatoru te ponovno vaganje uzorka s točnošću odvage od 0,001 g. Proces sušenja (1 sat na $103 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), hlađenja i vaganja, ponavljali su se sve dok se rezultat dvaju uzastopnih vaganja nisu razlikovali više od 0,1 %.

Sadržaj vode w računa se prema sljedećoj jednadžbi:

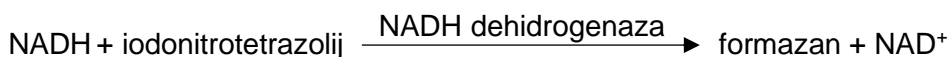
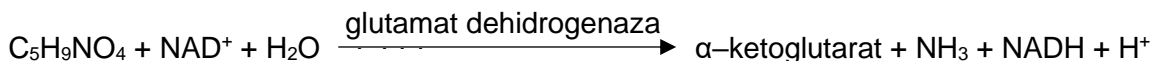
$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100 \% \quad [1]$$

gdje je **w** sadržaj vode (%), **m₀** masa lončića s pijeskom i staklenim štapićem (g), **m₁** masa lončića testnog uzorka, pijeska i staklenog štapića prije sušenja (g), **m₂** masa lončića testnog uzorka, pijeska i staklenog štapića poslije sušenja (g).

Rezultat je potrebno izraziti na jedno decimalno mjesto.

3.2.2. Princip i postupak određivanja L-glutaminske kiseline u uzorcima mesnih proizvoda

Princip određivanja L-glutaminske kiseline (C₅H₉NO₄) predstavlja oksidativnu deaminaciju u prisustvu oksidiranog oblika nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) do α-ketoglutarata i amonijaka (NH₃) djelovanjem enzima glutamat dehidrogenaze. U reakciji dolazi do redukcije NAD⁺ u nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) koji konvertira idonitrotetrazolij u formazan gdje se količina formazana mjeri spektrofotometrijski pri 492 nm. Ovaj princip prikazan je putem kemijskih jednadžbi:



3.2.2.1. Postupak određivanja L-glutaminske kiseline

- Vaganje

U konusnu PTFE epruvetu volumena 50 mL odvagano je 5 g prethodno homogeniziranog uzorka s preciznošću odvage 0,01 g.

- Priprema uzorka za određivanje L-glutaminske kiseline

U konusnu PTFE epruvetu s odvaganim uzorkom dodano je 40 mL 1M perklorne kiseline te je takav uzorak miješan na „*head-over-head*“ miješalici pri 50 o/min tijekom 10 minuta. Nakon isteka vremena sadržaj epruvete centrifugiran je pri 4600 o/min, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant bilo je potrebno filtrirati (crna vrpca) u novu

konusnu PTFE epruvetu gdje je odbačeno prvih par mL filtrata. Pipetirano je 10 mL filtrata u novu konusnu PTFE epruvetu te je podešen pH na 10 pomoću 2M KOH gdje je zabilježen volumen utrošenog kalijevo­g hidroksida. Takav sadržaj epruvete centrifugiran je 5 minuta pri 4000 o/min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja sadržaj je epruvete ponovno je filtriran (crna vrpca) te je takva otopina bila korištena za određivanje L-glutaminske kiseline.

- Priprema otopina za mjerenje L-glutaminske kiseline

Kako bi se odredio udio L-glutaminske kiseline korišten je kit koji se sastojao od 4 otopine (slika 3).

Otopina 1 s 24 mL otopine – koristila se nerazrijeđena

Otopina 2 – 35 mg liofilizata otopiti u 2,5 mL redistirane vode. Ovako priređena otopina bila je stabilna tjedan dana

Otopina 3 s 2,5 mL otopine koju je bilo potrebno razrijediti sa 6 mL redistirane vode. Ovako priređena otopina bila je stabilna mjesec dana

Otopina 4 s 1,2 mL otopine koristila se nerazrijeđena



Slika 3. Kit korišten za određivanje L-glutaminske kiseline (*vlastita fotografija*)

Za određivanje L-glutaminske kiseline bilo je potrebno pripremiti slijepu probu i uzorak za mjerenje na spektrofotometru na način prikazan tablicom 2.

Tablica 2. Priprema otopina za određivanje L-glutaminske kiseline

	SLIJEPA PROBA	UZORAK
Otopina 1	0,600 mL	0,600 mL
Otopina 2	0,200 mL	0,200 mL
Otopina 3	0,200 mL	0,200 mL
redestilirana voda	2,000 mL	1,800 mL
uzorak	-	0,200 mL

- Određivanje L-glutaminske kiseline pomoću UV/VIS spektrofotometra

Ovako pripremljene otopine promiješane su u epruветama i nakon 2 minute očitana je A_1 (apsorbancija) te je mjerenje ponavljano nakon 2 minute. Ako je razlika u apsorbciji bila veća od 0,010 uzorak se morao tretirati na način da se uklone reducirajuće tvari. Visoke koncentracije reducirajućih tvari poput L-askorbinske kiseline u mesnim aditivima ili sulfatna kiselina u voćnim sokovima ometaju postupak analize budući da reagiraju s iodonitrotetrazolijem. Navedeno interferiranje se uklanja tretiranjem uzorka s H_2O_2 (vodikov peroksid).

Nakon mjerenja u slijepu probu i u uzorak dodano je 0,030 mL otopine 4, promiješano te ostavljeno 15 minuta u tami (slika 4). Nakon isteka vremena očitana je apsorbcija otopina (A_2) te je ponavljano mjerenje svake 2 minute. Mjerenje je završeno kada je povećanje apsorbcije konstantno svake 2 minute ili kada je apsorbcija počela padati.



Slika 4. Razvijanje boje uzorka prilikom određivanja sadržaja L-glutaminske kiseline
(*vlastita fotografija*)

Udio sadržaja L-glutaminske kiseline izračunava se pomoću slijedećih jednažbi:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{uzorka} - (A_2 - A_1)_{slijepe\ probe} \quad [2]$$

gdje je ΔA razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe, A_1 izmjerena apsorbancija nakon 2 min, A_2 izmjerena apsorbancija otopine.

Izračun koncentracije L-glutaminske kiseline

$$c = 0,1120 * \Delta A \text{ g/L} \quad [3]$$

gdje je c koncentracija L-glutaminske kiseline (g/L), ΔA razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe.

Izračun mase uzorka

$$masa\ uzorka = \frac{a * 1000 * d}{(b + a * w) * (d + e)} \text{ g/L} \quad [4]$$

gdje je a masa uzorka (g), b volumen perklorne kiseline (mL), d volumen filtrata (mL), e volumen KOH (mL), w udio vode u uzorku (%), **1000** faktor korekcije (g→mg).

Izračun sadržaja L-glutaminske kiseline

$$\text{Udio L – glutaminske kiseline} = \frac{c \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{masa uzorka} \left(\frac{g}{L}\right)} * 100 \frac{g}{100g} \quad \text{tj. } (\%) * 10 \rightarrow g/kg \quad [5]$$

3.3. OBRADA PODATAKA

Analiza koncentracije L-glutaminske kiseline u različitim vrstama mesnih proizvoda provedena je korištenjem analize varijance (ANOVA) u programu Excel. Prikupljeni su podaci iz različitih kategorija mesnih proizvoda (proizvodi od usitnjenog mesa, trajni i polutrajni suhomesnati proizvodi, trajne kobasice i polutrajne kobasice) gdje je unutar svake kategorije analizirano više uzoraka od različitih proizvođača.

3.3.1. Unos podataka i izračun osnovnih parametara u Excel-u

Podaci su uneseni u Excel tablicu na način gdje svaka kolona predstavlja jednu kategoriju mesnih proizvoda, a redovi su predstavljali pojedinačne uzorke. Za svaku skupinu izračunati su broj uzoraka, zbroj vrijednosti, prosječna vrijednost i varijanca te su rezultati prikazani u tablici 7.

3.3.2. Provođenje ANOVA analize

Pomoću ugrađenih funkcija u programu Excel, izvedena je ANOVA analiza s jednim promjenjivim faktorom kako bi se ispitala razlika u koncentraciji L-glutaminske kiseline i udjelu vode među analiziranim kategorijama mesnih proizvoda te je postavljen nivo značajnosti $P = 0,05$. Rezultati ANOVA analize prikazani su u tablicama 8 i 10, koje uključuju sumu kvadrata (SS), stupnjeve slobode (df), srednju kvadratnu vrijednost (MS), F-vrijednost, P-vrijednost i kritičnu F-vrijednost.

3.3.3. *Posthoc* analiza

Za dodatnu potvrdu rezultata, izvedena je *posthoc* analiza kojom je izračunata prosječna razlika srednjih vrijednosti, standardna devijacija, standardna greška, t-vrijednost te interval pouzdanosti koji sugerira postoje li statistički značajne razlike između skupina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Glutaminska kiselina ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$), neesencijalna je, alifatska, polarna α -aminokiselina, a njezin je anion glutaminat. Glutaminat i glutamin izvori su amino-skupina za sve druge aminokiseline. Glutaminska kiselina ima središnju ulogu u metabolizmu dušikovih spojeva (Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, 2024). U citoplazmi stanica čini više od polovice ukupnih aminokiseline. Služi za sintezu purinskih nukleotida, pirimidinskih baza (preko asparaginske kiseline) što je potrebno za sintezu nukleinskih kiselina, za sintezu glutaciona, γ -aminomaslačne kiseline koja je neurotransmiter u inhibicijskim sinapsama (Medicinski leksikon, mrežno izdanje, 1992). U medicini se upotrebljava kao lijek protiv neuroza, psihičkih smetnji, depresije, umora i dr. (Proleksis enciklopedija, mrežno izdanje, 2012).

Upotreba glutaminske kiseline u prehrambenoj industriji značajno se povećala u posljednjih 30 godina. Najčešće se dodaje u prehrambene proizvode u obliku MSG, koji poboljšava okus raznih prehrambenih proizvoda (juha i umaka, prerađenih mesnih proizvoda, krepera, konzervirane hrane te različitih gotovih jela) dajući im pikantan umami okus (Yamaguchi i Ninomiya, 2000), smanjuje potrebu za soli i mastima bez promjene okusa te se može koristiti kao zamjena za kuhinjsku sol jer sadrži trećinu natrija (Kazmi i sur., 2017).

Razlog povećanja upotrebe ovog aditiva je promjena prehrambenih navika, urbanizacija, poboljšani životni standard i razvoj prehrambeno-prerađivačke industrije. L-glutaminska kiselina i glutamati (E 620 – 625) odobreni su kao prehrambeni aditivi u EU. Ipak, dodatak glutamata zabranjen je u nekim zemljama poput SAD-a, Meksika i Kanade zbog zabrinutosti oko pretilosti.

Prekomjerman unos glutaminske kiseline, osim s pretilosti, povezuje se s nizom zdravstvenih problema, poput neurodegenerativnih bolesti (npr. Alzheimerove i Parkinsonove bolesti), kardiovaskularnih problema, alergijskih reakcija te bolesti povezanih s imunološkim odgovorom (Hazzaa i sur., 2020; Bera i sur., 2017). Iako je odobren kao siguran aditiv, velika količina glutamata može uzrokovati oštećenje ili smrt neuronskih stanica (Samuels, 2020). Doze L-glutaminske kiseline koje se povezuju s glavoboljom iznose 85,8 mg/kg tjelesne mase dnevno, s povišenim krvnim tlakom 150 mg/kg tjelesne mase dnevno, a s povećanjem inzulina 143 mg/kg tjelesne mase dnevno (EFSA Panel, 2017).

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada bio je odrediti udio L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim proizvodima s područja Republike Hrvatske. Na samom početku istraživanja postavljena je teza o potencijalnoj pojavi toksičnih učinaka na ljudski organizam uzrokovana L-glutaminskom kiselinom kao aditivom u mesnim proizvodima te je provedena analiza L-glutaminske kiseline u mesnim proizvodima proizvedenim na hrvatskom tržištu tijekom 2023.

godine. Dobiveni rezultati pokazali su učestalost upotrebe glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim proizvodima s područja Republike Hrvatske te su jasno doveli do zaključaka o poštivanju zakonski propisanih dozvoljenih granica dodatka ovog aditiva, kao i o potencijalnoj pojavi toksičnih učinaka učestalom konzumacijom analiziranih uzoraka mesnih proizvoda.

Radi bolje interpretacije rezultata u obzir je potrebno uzeti ADI i NOAEL vrijednosti, kao i zakonski propisane maksimalno dozvoljene količine dodatka ovog aditiva te sva prethodno analizirana istraživanja koja su određivala vrijednosti glutaminske kiseline u mesu i mesnim proizvodima.

JECFA je 1974. godine procijenila ADI vrijednost L-glutaminske kiseline od 0 do 120 mg/kg (JECFA, 1974). Skoro pola stoljeća nakon, Bera i sur. (2017) procijenili su ADI vrijednost za L-glutaminsku kiselinu do 16 mg/kg, dok prema procjeni EFSA iz 2017. godine ADI vrijednost iznosi 30 mg/kg. Iz prethodnih procijenjenih vrijednosti, 2017. godine procijenjena je niža ADI vrijednosti L-glutaminske kiseline kao aditiva u odnosu na 1974. godinu što može ukazivati na veću istraženost ovog aditiva te svjesnost o mogućim toksičnim učincima L-glutaminske kiseline. Osim procijene ADI vrijednosti koja je vrlo bitna za sigurnu konzumaciju ovog aditiva, prema Uredbi Komisije (EU) br. 1129/2011 dana je najveća dopuštena količina dodatka L-glutaminske kiseline u hranu do 10 g/kg izražena kao L-glutaminska kiselina bila ona pojedinačno ili kombinaciji s mononatrijevim glutamatom, monokalijevim glutamatom, kalcijevim diglutamatom, monoamonijevim glutamatom i magnezijevim diglutamatom (E620-625).

Ovim istraživanjem određena je količina dodane L-glutaminske kiseline u 58 uzoraka mesnih proizvoda proizvedenih na području Republike Hrvatske. Posljedično tome određeno je poštivanje Uredbe Komisije (EU) br. 1129/2011 o najvećoj dopuštenoj količini od strane proizvođača. Osim toga, dobiveni rezultati uspoređeni su s dostupnim istraživanjima temeljenih na istim vrstama mesnih proizvoda te su u konačnici izračunate vrijednosti potrebne količine mesnih proizvoda za izazivanje potencijalne toksičnosti L-glutaminske kiseline na ljudski organizam.

Kako bi se provela analiza bilo je potrebno odrediti udio vode u uzorcima te se nakon toga proveo postupak određivanja L-glutaminske kiseline. Određivanje udjela vode u svakom pojedinačnom uzorku mesnih proizvoda temeljio se na sušenju uzorka na određenoj temperaturi sve do konstantne mase gdje je gubitak mase uzorka predstavljao udio vode koji je bio vrlo bitan podatak prilikom izračuna udjela glutaminske kiseline u mesnim proizvodima. Nakon određivanja udjela vode u uzorcima provedena je analiza L-glutaminske kiseline koja se

temelji na oksidativnoj deaminaciji glutaminske kiseline u prisustvu određenih enzima što posljedično rezultira formiranjem formazana, čija se količina mjeri spektrofotometrijski pri 492 nm.

U diplomskom radu prikazani su rezultati analize L-glutaminske kiseline u uzorcima mesnih proizvoda izraženi u g/kg, kao i udio vode izražen u % koji je značajan za izračun udjela L-glutaminske kiseline.

Tablica 3 prikazuje dobivene rezultate za kategoriju proizvoda od usitnjenog mesa. Unutar ove kategorije analizirano je ukupno pet uzoraka od kojih su dva uzorka čajne paštete, dva uzorka jetrene paštete te jedan uzorak kokošje paštete (tablica 1). Iz dobivenih rezultata određen je interval unutar kojeg su se kretale vrijednosti udjela L-glutaminske kiseline u kategoriji proizvoda od usitnjenog mesa te on iznosi 0,25 - 1,11 g/kg. Jedan od uzoraka čajne paštete imao je najviši udio L-glutaminske kiseline koji iznosi 1,11 g/kg dok je uzorak kokošje paštete imao najniži udio L-glutaminske kiseline koji iznosi 0,25 g/kg. Uzorci čajne i jetrene paštete analizirani su od dva različita proizvođača gdje se sadržaj L-glutaminske kiseline kretao u intervalu od 1,00 - 1,11 g/kg za čajne paštete i 0,35 - 0,45 g/kg za jetrene paštete. S druge strane, uzorke čajne i jetrene paštete moguće je usporediti s rezultatima dobivenih istraživanjem Vulić i sur. (2019) gdje je određen udio L-glutaminske kiseline u čajnim pašetama u rasponu 1,21 - 11,46 g/kg te u jetrenim pašetama u rasponu 1,52 - 11,93 g/kg. Dakle, ovim istraživanjem dobiveni rezultati udjela L-glutaminske kiseline u čajnim i jetrenim pašetama u odnosu na rezultate istraživanja Vulić i sur. (2019) ukazuju na smanjenje dodavanja L-glutaminske kiseline kao aditiva u kategoriji proizvoda od usitnjenog mesa s područja Republike Hrvatske u posljednjih pet godina. Uzevši u obzir način izrade pojedinih vrsta unutar ove kategorije, bio je očekivan viši udio glutaminske kiseline u čajnoj pašeti koja se najčešće izrađuje od kombinacije više sirovina i začina, dok su jetrena i kokošja pašteta poznatije po kombinaciji osnovnog mesa i začina. Dakle, u ovom slučaju uočeno je potencijalno „maskiranje“ nekvalitetnih sirovina. Osim toga, u ovoj kategoriji mesnih proizvoda, maksimalna dozvoljena količina od 10 g/kg L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim proizvodima, nije prekoračena budući da je maksimalna izmjerena vrijednost iznosila 1,11 g/kg.

Za interpretaciju rezultata osim udjela glutaminske kiseline u mesnim proizvodima vrlo je bilo važno u obzir uzeti i udio vode koji je određen u svakom proizvodu. Uzevši u obzir sve analizirane uzorke u ovoj kategoriji, udio vode kretao se u intervalu 25,50 - 57,30 % gdje je najniži udio određen u uzorku čajne paštete, a najviši u uzorku kokošje paštete. Između uzoraka čajne paštete udio vode kretao se u rasponu 25,50 - 25,80 %, a između uzoraka jetrene paštete

39,70 - 40,10 %. Unutar ove kategorije utvrđen je trend unutar kojeg niži udio vode u proizvodu slijedi viši udio glutaminske kiseline i obrnuto.

Tablica 3. Udjeli L-glutaminske kiseline i vode u proizvodima od usitnjenog mesa

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Udio vode (%)	L-glutaminska kiselina (g/kg)
Proizvodi od usitnjenog mesa	Čajna pašteta	25,80	1,00
		25,50	1,11
	Jetrena pašteta	40,10	0,45
		39,70	0,35
	Kokošja pašteta	57,30	0,25

Udio vode i L-glutaminske kiseline za kategoriju trajnih i polutrajnih suhomesnatih proizvoda prikazan je u tablici 4. Unutar ove kategorije analizirano je ukupno sedam uzorka od kojih su dva uzorka suhih rebara te po jedan uzorak od prsnih vršaka, dimljenog bunceka, rolane lopatice, lopatice i dimljene vratine (tablica 1).

Tablica 4. Udjeli L-glutaminske kiseline i vode u kategoriji trajnih i polutrajnih suhomesnatih proizvoda

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Udio vode (%)	L-glutaminska kiselina (g/kg)
Trajni i polutrajni suhomesnati proizvodi	Prsni vršci	52,50	0,42
	Suha rebra	65,60	0,47
		51,60	0,52
	Dimljeni buncek	58,20	0,51
	Rolana lopatica	68,50	0,49
	Lopatica	73,00	1,18
	Dimljena vratina	73,20	0,25

Iz dobivenih rezultata određen je interval unutar kojeg su se kretale vrijednosti udjela L-glutaminske kiseline u kategoriji trajnih i polutrajnih suhomesnatih proizvoda koji je iznosio 0,25

- 1,18 g/kg. Najviši udio L-glutaminske kiseline određen je u uzorku lopatice od 1,18 g/kg dok uzorak dimljene vratine ima najniži udio L-glutaminske kiseline koji iznosi 0,25 g/kg. Uzorci suhих rebara analizirani su od dva različita proizvođača gdje se sadržaj L-glutaminske kiseline kreće se u intervalu od 0,47 - 0,52 g/kg. Unutar ove kategorije nije određen isti trend kao u prethodnoj kategoriji proizvoda od usitnjenog mesa. Naime, unutar kategorije trajnih i polutrajnih suhomesnatih proizvoda očekivani su rezultati nižeg udjela glutaminske kiseline budući da se način proizvodnje ovih proizvoda temelji na jednoj mesnoj sirovini. Međutim, rezultati su pokazali relativno visoke udjele u odnosu na prethodnu kategoriju u kojoj su bili očekivani viši udjeli. Razlog tomu može biti korištenje nekvalitetne mesne sirovine te njezino „maskiranje“ većim dodatkom L-glutaminske kiseline. U ovoj kategoriji dodatak L-glutaminske kiseline kao aditiva s maksimalnom vrijednosti od 1,18 g/kg bio je unutar maksimalne dozvoljene količine.

Također, udio vode kao i u prethodnoj kategoriji uzet je u obzir radi interpretacije rezultata. Udio vode u ovoj kategoriji bio je u intervalu 51,60 - 73,20 % gdje je najniži udio određen u uzorku prsnih vršaka, a najviši u uzorku dimljene vratine. Između uzoraka suhих rebara udio vode se kreće u rasponu od 51,60 - 65,60 %. U ovoj kategoriji nije zabilježen trend poveznice udjela vode s udjelom dodatka aditiva L-glutaminske kiseline kao što je bio slučaj prethodno u kategoriji proizvoda od usitnjenog mesa.

Unutar kategorije trajnih kobasica analizirano je ukupno 11 uzoraka što predstavlja po dva uzorka od zimске kobasice, pancete i buđole te po jedan uzorak od trajne kobasice, turist kobasice, sendvič salame, panone i wintere (tablica 1). Tablica 5 predstavlja prikaz rezultata dobivenih za trajne kobasice te određuje interval unutar kojeg se kretala vrijednost udjela L-glutaminske kiseline u kategoriji trajnih kobasica te on iznosi 0,36 - 1,84 g/kg. U uzorku panona kobasice određen je najviši udio L-glutaminske kiseline koji iznosi 1,84 g/kg, dok u uzorku turist kobasice najniži udio L-glutaminske kiseline od 0,36 g/kg. Uzorci zimске kobasice, pancete i buđole analizirani su od više različitih proizvođača gdje se sadržaj L-glutaminske kiseline zimске kobasice kretao u intervalu od 0,70 - 0,90 g/kg, u uzorcima pancete između 0,49 - 0,52 g/kg, a u uzorcima buđole u rasponu od 1,15 - 1,37 g/kg. Maksimalni izmjereni udio L-glutaminske kiseline u kategoriji trajnih kobasica iznosi 1,84 g/kg što pokazuje kako ni u ovoj kategoriji maksimalna dozvoljena količina L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim proizvodima nije prekoračena. Za ovu kategoriju prije same provedbe analize očekivan je udio glutaminske kiseline u nešto većim udjelima, što je u konačnici i određeno. U odnosu na prethodne dvije kategorije mesnih proizvoda velika većina uzoraka kategorije trajnih kobasica sadržavala je viši udio ovog aditiva. Kao i do sada, razlog potrebi za većom upotrebom L-

glutaminske kiseline unutar ove kategorije „maskiranje“ manje kvalitetnih sirovina korištenih za proizvodnju proizvoda te radi pojačavanja okusa budući da je ova kategorija mesnih proizvoda poznatija po svojem pikantnijem okusu.

Tablica 5. Udjeli L-glutaminske kiseline i vode u kategoriji trajnih kobasica

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Udio vode (%)	L-glutaminska kiselina (g/kg)
Trajne kobasice	Zimska kobasica	60,70	0,70
		32,60	0,90
	Trajna kobasica	30,70	0,85
	Turist kobasica	27,20	0,36
	Panceta	33,80	0,52
		30,70	0,49
	Sendvič salama	38,60	0,55
	Panona	34,90	1,84
	Wintera	34,20	1,23
	Buđola	37,10	1,15
		37,70	1,37

Analizom rezultata dobivenih određivanjem udjela vode dobiven je interval 27,20 - 60,70 % unutar kojeg se nalaze dobivene vrijednosti udjela vode za proizvode u kategoriji trajnih kobasica. Za trajne kobasice očekivan je niži udio vode od ostalih kategorija. Najniži udio određen u uzorku turist kobasice, a najviši u uzorku zimske kobasice. Uzorak zimske kobasice koji je iznosio 60,70 % možemo smatrati pogreškom prilikom određivanja udjela vode budući da je duplo viši od drugog uzorka zimske kobasice. Svi uzorci osim jednog uzoraka zimske kobasice kretali su se do maksimalno 38,60 % što uistinu prikazuje jednu od karakteristika ove kategorije, a to je dulja trajnost proizvoda zbog sniženog udjela vode. U ovoj kategoriji nije zabilježen trend poveznice udjela vode s udjelom dodatka aditiva L-glutaminske kiseline kao što je bio slučaj u kategoriji proizvoda od usitnjenog mesa.

Tablica 6 prikazuje udjele L-glutaminske kiseline i vode za kategoriju polutrajnih kobasica. U ovoj kategoriji analizirano je najviše uzoraka od svih kategorija, odnosno trideset pet uzoraka. Od ukupnog broja uzoraka deset uzoraka predstavljaju uzorci hrenovki, četiri uzoraka kranjskih kobasica, dva uzorka slaninskih kobasica, tri uzorka pučkih kobasica te po jedan od uzoraka debrecinke, bbq kobasice sa sirom, vikend kobasice, jegera, obiteljske kobasice, safalade, čili kobasice, šunke- PIZZA, domaće dubravske kobasice, posebne salame, hot dog hrenovke, sendvič narezka sa sirom, extra salame, mortadele te pilećeg parizera (tablica 1). Iz dobivenih rezultata određen je interval unutar kojeg se nalaze vrijednosti udjela L-glutaminske kiseline u kategoriji polutrajnih kobasica koji iznosi 0,12 - 2,04 g/kg. Jedan od uzoraka hrenovki imao je najviši udio L-glutaminske kiseline od 2,04 g/kg, dok jedan od uzoraka kranjskih kobasica imao je najniži udio L-glutaminske kiseline od 0,12 g/kg. Uzorci kranjskih kobasica, slaninskih kobasica, safalade, pučke kobasice i hrenovki analizirani su od više različitih proizvođača. Udio L-glutaminske kiseline kranjskih kobasica nalazio se u intervalu od 0,12 - 0,79 g/kg, dok su se uzorci slaninskih kobasica nalazili između 0,35 - 0,48 g/kg. Uzorci safalade prikazali su raspon 1,02 - 1,49 g/kg, dok je kod pučkih kobasica bio prisutan raspon 0,33 - 0,82 g/kg te raspon uzoraka hrenovki 0,46 - 2,04 g/kg. Zbog svojih svojstva, za proizvode u ovoj kategoriji očekivao se veći udio glutaminske kiseline, što je analizom i dobiveno u nekim od uzoraka. Naime, dobiveni su rezultati koji variraju od niskih do viših udjela kojima je bilo potrebno pronaći uzrok odnosno objašnjenje.

Tablica 6. Udjeli L-glutaminske kiseline i vode u polutrajnim kobasicama

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Udio vode (%)	L-glutaminska kiselina (g/kg)
Polutrajne kobasice	Posebna salama	37,90	0,70
	Hot dog hrenovke	65,10	1,24
	Sendvič narezak sa sirom	66,90	0,59
	Extra salama	68,40	0,67
	Mortadela	60,10	0,24
	Pileći parizer	71,30	0,31

Tablica 6. Udjeli L-glutaminske kiseline i vode u polutrajnim kobasicama – *nastavak*

Kategorija mesnih proizvoda	Vrsta mesnih proizvoda	Udio vode (%)	L-glutaminska kiselina (g/kg)
Polutrajne kobasice	Debrecinka	49,10	1,64
	Kranjska kobasica	57,10	0,25
		61,20	0,79
		52,20	0,77
		49,10	0,12
	Bbq kobasica sa sirom	67,20	0,53
	Vikend kobasica	52,80	0,47
	Slaninska kobasica	57,30	0,35
		36,20	0,48
	Jeger	55,60	1,08
	Obiteljska kobasica	57,10	1,19
	Safalada	64,00	1,49
		60,90	1,02
	Pučka kobasica	55,20	0,82
		52,80	0,48
		55,70	0,33
	Čili kobasica	52,30	0,39
	Šunka – PIZZA	75,30	0,52
	Domaća dubravska kobasica	60,70	0,23
	Hrenovke	34,80	2,04
		61,90	1,01
		64,90	0,72
		66,00	1,20
59,60		1,04	
66,90		1,02	
62,70		0,92	
56,10		0,46	
62,10		0,75	
60,50		0,86	

Pregledom dobivenih rezultata uočeno je odstupanje dva uzorka kranjskih kobasica koji su iznosili 0,12 g/kg i 0,25 g/kg što predstavlja dosta nižu vrijednost u odnosu na ostala dva uzorka koja su relativno bliska po udjelu L-glutaminske kiseline s vrijednostima od 0,77 g/kg i 0,79 g/kg. Ono što je izgledno u ovome slučaju jest da je do razlike u vrijednostima došlo zbog nejednako korištene količine ovog aditiva među proizvođačima ili zbog pogreške prilikom mjerenja. Osim toga, velike oscilacije u rezultatima uočene su među uzorcima hrenovki gdje je razlika između najvišeg i najnižeg udjela jednaka 1,58 g/kg što ponovno ukazuje na potencijalne uzroke kao i kod uzoraka kranjskih kobasica. Potreba za detaljnom analizom ove kategorije proizašla je iz činjenice da je najmanja i najveća vrijednost udjela glutaminske kiseline u svih 58 uzoraka analiziranih ovim istraživanjem upravo određena unutar iste kategorije.

Obzirom da je granična vrijednost dodatka L-glutaminske kiseline 10 g/kg te da je maksimalni izmjereni udio L-glutaminske kiseline u kategoriji polutrajnih kobasica 2,04 g/kg, maksimalna dozvoljena količina L-glutaminske kiseline nije prekoračena. Rezultati kategorije polutrajnih kobasica usporedivi su s istraživanjem Croitoru i sur. (2010) gdje je određen udio L-glutaminske kiseline u tradicionalnoj šunki od 1,66 g/kg, pilećoj šunki od 0,93 g/kg, purećoj šunki od 0,73 g/kg. Budući da se radi o šunkama, usporedive su s uzorkom šunka – PIZZA koji iznosi 0,52 g/kg te ukazuje na smanjenje udjela L-glutaminske kiseline u proizvodima proteklog desetljeća, ali i na smanjenu upotrebu L-glutaminske kiseline u Republici Hrvatskoj u odnosu na Rumunjsku gdje je provedeno istraživanje Croitoru i sur. (2010). Također, Croitoru i sur. (2010) odredili su udio L-glutaminske kiseline u svinjskim hrenovkama od 0,37 g/kg te u pilećoj mortadeli u udjelu od 0,14 g/kg što je u ovom slučaju ispod dobivenih raspona za oba uzorka. Usporedbom rezultata moguće je zaključiti kako je i dalje postojan trend „maskiranja“ manje kvalitetne sirovine u proizvodima poput hrenovaka.

S druge strane, udio vode određen u ovoj kategoriji nalazio se u intervalu 34,80 - 75,30 % gdje je najniži udio vode određen u uzorku hrenovke, a najviši u uzorku šunke – PIZZA. Također, bitno je uočiti kako udio vode unutar iste vrste mesnih proizvoda nije značajno različit, osim u slučaju slaninskih kobasica gdje se udio vode razlikuje 21,10 % između uzoraka te uzoraka hrenovki koji se kreće u rasponu 34,80 - 66,00 %. Unutar ove kategorije, udio vode relativno je različit kod svakog proizvoda pojedinačno. Međutim, globalno gledajući kategorija polutrajnih kobasica uz trajne i polutrajne suhomesnate proizvode očekivano sadrži visoke udjele vode u svojim proizvodima.

Prethodnom analizom svake pojedinačne kategorije dan je uvid količine L-glutaminske kiseline kao aditiva unutar iste kategorije mesnih proizvoda, ali i unutar iste vrste koja je

analizirana od više različitih proizvođača gdje se mogla zaključiti ovisnost dodatak ovog aditiva o vrsti mesnog proizvoda i proizvođaču.

Kako bi se potkrijepile prethodno navedene pretpostavke za svaku od analiziranih kategorija mesnih proizvoda te kako bi se provela usporedba dobivenih vrijednosti između svih analiziranih kategorija mesnih proizvoda, provela se analize varijacije (ANOVA). Dakle, iz prethodno navedenog slijedi teza kako između analiziranih kategorija mesnih proizvoda postoje razlike. ANOVA pruža statističku obradu podataka gdje je postavljena P vrijednost jednaka 0,05 te ukoliko postoji statistički značajna razlika između kategorija mesnih proizvoda dobivena P vrijednost mora iznositi manje od zadane P vrijednosti.

Tablicom 7 i 8 prikazana je analiza varijance (ANOVA) koja uključuje prosječne vrijednosti, varijance te statističke parametre za svaku skupinu. Budući da je P-vrijednost koja iznosi 0,33 veća od zadane P vrijednosti koja iznosi 0,05, govori kako između skupina F-vrijednost nije statistički značajna, odnosno nema dovoljno dokaza da odbacimo nultu hipotezu koja pretpostavlja da između skupina postoji značajna statistička razlika između srednjih vrijednosti koncentracije L-glutaminske kiseline.

Tablica 7. Statistička analiza rezultata L-glutaminske kiseline

Skupine	Broj uzoraka	Zbroj vrijednosti	Prosječna vrijednost	Varijanca
Proizvodi od usitnjenog mesa	5	3,16	0,63	0,16
Trajni i polutrajni suhomesnati proizvodi	7	3,84	0,55	0,90
Trajne kobasice	11	9,96	0,91	0,20
Polutrajne kobasice	35	26,72	0,76	0,19

Tablica 8. Rezultati ANOVA analize za L-glutaminsku kiselinu

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-vrijednost	F kritična
Između skupina	0,63	3	0,21	1,18	0,33	2,78

SS -suma kvadrata, **df** - stupnjevi slobode, **MS** - srednja kvadratna vrijednost, **F** - F-vrijednost, **P-vrijednost** -vrijednost značajnosti, **F kritična** -kritična F-vrijednost

Stoga, kako bi se potvrdila istinitost rezultata dobivenih analizom varijance (ANOVA) izvedena je *posthoc* analiza kojom se odredio interval pouzdanosti za razlike između skupina. *Posthoc* analizom određen je interval pouzdanosti koji pruža dodatne informacije o preciznosti procjene razlike među skupinama. Pomoću prosjeka razlike srednjih vrijednosti između skupina koja je iznosila 0,200, standardne devijacije koja je iznosila 0,093, standardne greške koja je iznosila 0,102 te t-vrijednosti koja je iznosila 0,068, određen je interval pouzdanosti koji je iznosio $0,200 \pm 0,0069$. Interval pouzdanosti odnosi se na raspon vrijednosti u kojem se s određenom vjerojatnošću može očekivati stvarna vrijednost razlike između skupina. Sukladno tome, donja granica intervala iznosila je 0,1931 te gornja granica intervala 0,2069. Budući da su granice intervala iznad nule te nula nije uključena u interval, *posthoc* analiza sugerira na postojanje statistički značajnih razlika između barem nekih skupina parova. Uspoređujući prosječne vrijednosti udjela L-glutaminske kiseline pojedinih kategorija vidljivo je kako trajne i polutrajne kobasice sadrže veći udio ovog aditiva u odnosu na polutrajne i trajne suhomesnate proizvode te proizvode od usitnjenog mesa.

Kao što je navedeno na početku ovog rada, radi određivanja udjela glutaminske kiseline u uzorcima bilo je potrebno provesti određivanje udjela vode. Udio vode prvenstveno ima ulogu povezanu s trajnosti proizvoda te se zbog toga manji udio vode očekivao u proizvodima dulje trajnosti. Osim toga, na početku istraživanja postojala je teza o poveznici udjela vode i dodatka aditiva L-glutaminske kiseline. Iz pojedinačno dobivenih rezultata nije se moglo uočiti pravilo odnosno ima li udio vode utjecaja na količinu dodatka ovog aditiva. Posljedično tome, kako bi se adekvatno interpretirali dobiveni rezultati, u obzir je uzet odnos udjela vode i dodatka glutaminske kiseline te je provedena analiza varijance za udjele vode u analiziranim uzorcima te su rezultati prikazani u tablicama 9 i 10.

Tablica 9. Statistička analiza rezultata udjela vode

Skupine	Broj uzoraka	Zbroj vrijednosti (%)	Prosječna vrijednost (%)	Varijanca
Proizvodi od usitnjenog mesa	5	197,10	39,42	217,58
Trajni i polutrajni suhomesnati proizvodi	7	442,60	63,23	83,90
Trajne kobasice	11	398,20	36,20	77,45
Polutrajne kobasice	35	2038,20	58,23	83,36

Tablica 10. Rezultati ANOVA analize za udio vode

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-vrijednost	F kritična
Između skupina	517,93	3	1905,98	19,79	8,76E-09	2,78

SS - suma kvadrata, **df** - stupnjevi slobode, **MS** - srednja kvadratna vrijednost, **F** - F-vrijednost, **P-vrijednost** - vrijednost značajnosti, **F kritična** - kritična F-vrijednost

ANOVA analizom podataka o udjelu vode (tablice 9 i 10) utvrđena je statistički značajna razlika u udjelu vode između različitih skupina mesnih proizvoda gdje je $F = 2,78$ odnosno $P < 0,05$.

Iz usporedbe dobivenih rezultata proizlazi kako trajne kobasice sadrže prosječno najviši udio L-glutaminske kiseline (0,91 g/kg), dok sadrže prosječni najniži udio vode (36,20 %). Prosječno najniži udio L-glutaminske kiseline (0,55 g/kg) određen je u trajnim i polutrajnim suhomesnatim proizvodima koje su sadržavale prosječno najviši udio vlage (63,23 %). Ostale kategorije mesnih proizvoda nalazile su se po udjelu vode između kategorija trajnih kobasica i trajnih i polutrajnih suhomesnatih proizvoda. Iako analizom svih uzoraka pojedinih kategorija mesnih proizvoda nije dokazan utjecaj vlage na dodatak L-glutaminske kiseline, uspješno je dokazano kako proizvodi dulje trajnosti sadrže manji udio vlage. S druge strane, dodatak L-glutaminske kiseline kao aditiva ovisi o kvaliteti mesa koje se dodaje u ovakve proizvode, budući da je njezina uloga pojačivač okusa, odnosno „maskiranje“ lošije kvalitete sirovine. Rezultati u tablici 7 prikazuju kako trajne kobasice sadrže prosječno najveći udio L-glutaminske kiseline, nakon kojih slijede polutrajne kobasice, proizvodi od usitnjenog mesa te suhomesnati proizvodi. Iz ovog poretka vrlo je jasno kako se udio L-glutaminske kiseline povećava sa zastupljenosti različitih sirovina u sastavu proizvoda. Točnije, kombinacija različitih i nekvalitetnih mesnih sirovina pokušava se „zamaskirati“ većim dodatkom L-glutaminske kiseline kao aditiva, dok je primjerice kod suhomesnatih proizvoda ona najmanje zastupljena upravo iz razloga što je takav proizvod nastao iz jedne mesne sirovine, odnosno cjelovitog mesnog komada bez homogenizacije drugih sirovina kako bi se dobila kompaktna smjesa što je primjer kod trajnih i polutrajnih kobasica.

Iako ANOVA nije pružila dovoljno statističkih dokaza za opću razliku između skupina, *posthoc* analiza naglašava važnost razumijevanja specifičnih parova skupina koje pokazuju statistički značajne razlike. Ono što je ANOVA utvrdila jest spoznaja da su razlike među kategorijama mesnih proizvoda prisutne, ali statistički nisu toliko značajne. Ova spoznaja je vrlo jasna pregledom rezultata budući da se udjeli glutaminske kiseline nalaze u rasponu 0,12 - 2,04 g/kg što ne predstavlja veliku razliku obzirom da se radi o različitim kategorijama mesa koje se razlikuju po svojoj proizvodnji. Međutim, dobiveni rezultati ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja, na većem broju uzoraka, kako bi se dublje istražile specifičnosti koncentracije L-glutaminske kiseline između različitih skupina mesnih proizvoda.

Pregledom dostupne literature, utvrđen je vrlo mali broj istraživanja provedenih na različitim kategorijama mesnih proizvoda. Istraživanja se odnose na općenito pileće, svinjsko i goveđe meso što je teško usporedivo s konkretnim mesnim prerađevinama poput uzoraka analiziranih u ovome istraživanju. Osim istraživanja Vulić i sur. (2019) i Croitoru i sur. (2010) koja su analizirala prerađene mesne proizvode, dostupna su dva istraživanja koja su se bavila općenitim pojmom pilećeg, goveđeg i svinjskog mesa, odnosno određivanjem prirodno prisutne L-glutaminske kiseline koja je neophodna za interpretaciju dobivenih rezultata ovog istraživanja. Ninomiya (1998) odredio je udio slobodne L-glutaminske kiseline u pilećem mesu od 440 mg/kg, goveđem mesu od 330 mg/kg te svinjskom mesu 200 mg/kg. S druge strane, Jinap i Hajeb (2010) odredili su udio L-glutaminske kiseline u pilećem mesu od 220 mg/kg, goveđem mesu od 100 mg/kg te svinjskom mesu od 90 mg/kg. Navedena istraživanja dovode do zaključka kako udio L-glutaminske kiseline određene u mesnim proizvodima ovim istraživanjem ne predstavlja isključivo udio L-glutaminske kiseline dodane kao aditiv, već određeni dio upravo proizlazi iz slobodne L-glutaminske kiseline, prirodno prisutne u mesu. Također, uočljivo je kako je u periodu od 1998. do 2010. godine došlo do smanjenja udjela prirodno prisutne L-glutaminske kiseline unutar kategorija pilećeg, goveđeg i svinjskog mesa.

Istraživanjem Diaa Eldin i sur. (2023) određen je udio MSG-a dodanog u prerađevine pilećeg mesa. Dobiveni rezultati količine L-glutaminske kiseline iznose za konzervirano pileće meso $3,95 \pm 0,51$ g/kg, panirani odrezak $1,85 \pm 0,28$ g/kg, pileće mljeveno meso $2,75 \pm 1,05$ g/kg, pileća šavarma $1,73 \pm 0,22$ g/kg te pohano pileće meso $1,47 \pm 0,85$ g/kg. Istraživanjem Shaltout (1996) određeni su udjeli L-glutaminske kiseline u konzerviranom pilećem mesu (0,21 g/kg) i paniranom pilećem mesu (0,001 g/kg), što ukazuje na veći udio slobodne L-glutaminske kiseline u odnosu na istraživanje Diaa Eldin i sur. (2023). Pileće mljeveno meso i pohano pileće meso usporedivo je s istraživanjem Hassan i sur. (2018) kojim je dobivena niža vrijednost od 1,96 g/kg za mljeveno meso te viša vrijednost od 1,85 g/kg za pohano pileće meso. Prethodno navedena istraživanja u odnosu na istraživanja Vulić i sur. (2019) te Croitoru i sur. (2010) ukazuju na učestaliju upotrebu L-glutaminske kiseline kao aditiva tijekom godina. Osim toga, ovim istraživanjima dokazana je upotreba L-glutaminske kiseline kao aditiva u mesnim prerađevinama budući da su dobivene vrijednosti znatno iznad onih prirodno prisutnih u mesu.

Prethodno navedena istraživanja bila su od velikog značaja za interpretaciju dobivenih rezultata udjela glutaminske kiseline prisutne u uzorcima mesnih proizvoda analiziranih ovim istraživanjem. Osim toga, ovim istraživanjem uspješno je dokazano poštivanje Uredbe Komisije (EU) br. 1129/2011 od strane proizvođača, gdje ni u jednom analiziranom uzorku mesnih proizvoda nije određen udio L-glutaminske kiseline veći od maksimalne dozvoljene količine od

10 g/kg te je uočen manji dodatak L-glutaminske kiseline u mesne proizvode hrvatskih proizvođača u odnosu na studije provedene izvan i unutar Republike Hrvatske.

Nadalje, dobiveni rezultati u ovome diplomskom radu povezani su s dostupnim literaturnim navodima koji govore o sigurnim količinama L-glutaminske kiseline koje su dozvoljene za konzumaciju tijekom jednog dana. Međutim, uzevši u obzir da NOAEL vrijednost iznosi 3,2 g/kg dnevno (EFSA Panel, 2017) te da uzorak hrenovki koji je ujedno prikazao najviši udio L-glutaminske kiseline u ovome istraživanju iznosio je 2,04 g/kg, može se izračunati teorijski koliko je potrebno kilograma mesnog proizvoda (hrenovki) da bi izazvao toksičnost na ljudski organizam. Na primjer, za osobu prosječne mase od 80 kg potrebno je konzumirati 256 g L-glutaminske kiseline kako bi ona izazvala mogući toksični učinak, odnosno potrebno je konzumirati 125,5 kg hrenovki dnevno. Ovu količinu je u stvarnosti nemoguće postići budući da se radi o zaista velikoj količini mesnog proizvoda koju bi trebala jedna osoba prosječne tjelesne mase konzumirati. Osim NOAEL vrijednosti, predstavljena je i ADI vrijednost koja iznosi 30 mg/kg tjelesne mase, što predstavlja 2,4 g L-glutaminske kiseline dnevno po osobi tjelesne mase 80 kg. Dakle, za dostizanje ADI vrijednosti potrebna je konzumacija 1,18 kg hrenovki. Za razliku od dobivene vrijednosti potrebne količine proizvoda za dostizanje NOAEL vrijednosti, vrijednost dobivena za količinu proizvoda za dostizanje ADI vrijednosti je realna i moguća za dostizanje.

Prema Brosnan i sur. (2014) dnevni unos dodane L-glutaminske kiseline u prehrani varira između 350 - 500 mg po osobi, kao i udio glutamata iz prirodnih izvora koji varira između 130 - 180 mg/kg. Na primjeru uzoraka hrenovki, zanemarujući udio prirodno prisutne L-glutaminske kiseline u odnosu na ukupni udio, za unos dodane L-glutaminske kiseline potrebna je konzumacija 0,17 – 0,23 kg hrenovki dnevno. Bitno je napomenuti kako L-glutaminska kiselina nije zastupljena u prehrani ljudi samo preko mesa i mesnih proizvoda, već je dostupna i iz drugih izvora te nije moguće odrediti izravnu toksičnost L-glutaminske kiseline prisutne u mesnim proizvodima u prehrani ljudi.

Prema podacima EFSA Panel (2017) doze koje su povezane s glavoboljom iznose 85,8 mg/kg tjelesne mase dnevno, s povišenim krvnim tlakom 150 mg/kg tjelesne mase dnevno, kao i s povećanjem inzulina više od 143 mg/kg. Odnosno, kako bi se izazvali simptomi glavobolje za osobu prosječne mase 80 kg potrebna je konzumacija 6,86 g L-glutaminske kiseline, za pojavu simptoma povišenog krvnog tlaka 12 g i povišenje inzulina 11,44 g L-glutaminske kiseline, što ujedno predstavlja 3,36 kg (glavobolja), 5,88 kg (povišeni krvni tlak) te 5,61 kg (povišenje inzulina) konzumiranih hrenovki u jednom danu.

Obzirom da ponovna procjena EFSA Panel (2017) nije otkrila štetne akutne učinke pri uzimanju L-glutaminske kiseline u dozama do otprilike 5 g/kg tjelesne mase dnevno i 5,25 g/kg tjelesne mase dnevno u jednom testu granične doze što u ovom slučaju prelazi određenu NOAEL vrijednost od 3,2 g/kg tjelesne mase, dovodi do zaključka da je nemoguće uzrokovati akutni toksičan učinak L-glutaminske kiseline podrijetlom iz aditiva isključivo konzumacijom mesnih proizvoda.

Iako mnoga znanstvena istraživanja potkrjepljuju tezu o toksičnim učincima L-glutaminske kiseline kao aditiva, ni jedno istraživanje nije dokazalo toksičnost L-glutaminske kiseline koja potječe iz mesnih proizvoda već toksičnost uzrokovanu dodatkom doza izolirane L-glutaminske kiseline, odnosno konzumacijom bez hrane. Ovim istraživanjem određeni su udjeli ukupne L-glutaminske kiseline u različitim mesnim proizvodima koji su daleko ispod maksimalne dozvoljene granice te je izračunata količina mesnog proizvoda koja bi uzrokovala potencijalne toksične učinke. Također, ljudska prehrana nije sačinjena isključivo od mesa i mesnih proizvoda te zbog toga nije moguće odrediti koliko štetni utjecaj čini L-glutaminska kiselina zastupljena u takvoj hrani. Osim toga, L-glutaminska kiselina kao prirodno zastupljena aminokiselina u mesu također doprinosi udjelu L-glutaminske kiseline u proizvodu. Kao najbolji pokazatelj količine dodane L-glutaminske kiseline u mesnim proizvodima jest to da svi analizirani uzorci sadrže udio veći od onog određenog u istraživanjima koja su određivala udio slobodne L-glutaminske kiseline prirodno prisutne u pilećem, goveđem i svinjskom mesu.

Stoga, ovim radom predstavljeni su podatci prethodno provedenih istraživanja o potencijalnim toksičnim učincima L-glutaminske kiseline koji se javljaju oralnom konzumacijom visokih doza MSG-a iznad ADI vrijednosti koja iznosi 30 mg/kg tjelesne mase. S druge strane, eksperimentalnim dijelom određene su količine L-glutaminske kiseline u različitim kategorijama mesnih proizvoda, a rezultati dovode do zaključka da ukoliko se uzima u obzir samo dodana L-glutaminska kiselina odnosno ona u ulozi aditiva, ona ne može izazvati akutnu toksičnost. Posljedično tome, kako bi se istražila toksičnost L-glutaminske kiseline u mesnim proizvodima potrebno je provesti daljnja istraživanja koja će utvrditi pojavu simptoma uzrokovanih konzumacijom proizvoda koji u sebi sadrže ovaj aditiv pri tome i odrediti prirodno prisutnu L-glutaminsku kiselinu budući da i ona djeluje na ljudski organizam jednako kao i dodana L-glutaminska kiselina.

U konačnici, vrlo je važno poticati svijest o raznolikoj prehrani. L-glutaminska kiselina prirodno je zastupljena aminokiselina koja ima svoje pozitivne i negativne učinke, kao i svaki drugi spoj koji se nalazi u bilo kojoj drugoj namirnici. Zbog toga, njezin unos je teško potpuno izbaciti iz prehrane, ali se može ograničiti na način da se namirnice bogate dodanom L-

glutaminskom kiselinom ograniče kako se ne bi prešao preporučeni dnevni unosa i u konačnici dovelo do pojave akutnih i kroničnih toksičnih učinaka. Ovim radom nije bilo moguće dokazati izravnu toksičnost aditiva L-glutaminske kiseline na ljudski organizam, ali je svakako pregledom literature podignuta svijest o njezinim toksičnim učincima te je vrlo važno ne zaboraviti:

“Što postoji što nije otrov? Sve su stvari otrovne i ništa nije bez otrova. Samo doza određuje da nešto nije otrov.” - Theophrastus Bombastus Von Hohenheim (Paracelsus)

5. ZAKLJUČCI

1. Prehrambeni aditivi, poput L-glutaminske kiseline i njezinih soli, odlikuju se svojim pozitivnim učincima na prehrambene proizvode, ali negativnim učincima na ljudsko zdravlje, osobito kod prekomjerne konzumacije.
2. Unatoč tome što je L-glutaminska kiselina odobrena kao siguran aditiv, visoke doze mogu dovesti do ekscitotoksičnih učinaka, uzrokujući oštećenje neuronskih stanica, te se povezuje s raznim zdravstvenim problemima poput pretilosti, inzulinske rezistencije, dijabetesa, neuroloških poremećaja i kardiovaskularnih bolesti te sa štetnim učincima na reproduktivne funkcije i imunološki odgovor.
3. Prosječno najviši udio L-glutaminske kiseline određen je u uzorcima iz kategorije trajnih kobasica (0,91 g/kg), dok je prosječno najniži udio određen u kategoriji trajnih i polutrajnih suhomesnatih proizvoda (0,55 g/kg). U uzorku hrenovki određen je najviši udio L-glutaminske kiseline od 2,04 g/kg dok je u uzorku kranjske kobasice određen najniži od 0,12 g/kg.
4. Količine L-glutaminske kiseline u analiziranim mesnim proizvodima ne prelaze zakonom dopuštene vrijednosti od 10 g/kg što smanjuje rizik od akutnih toksičnih učinaka.
5. S obzirom na to da je L-glutaminska kiselina prirodno prisutna u mnogim prehrambenim proizvodima, uključujući meso i mesne prerađevine, moguća je kumulativna izloženost iz različitih izvora hrane. Zbog toga, vrlo je važno kontinuirano pratiti razinu glutamata u prehrani i educirati potrošače o potencijalnim zdravstvenim rizicima.
6. Važnost daljnjih istraživanja i regulative u ovom području ne mogu se zanemariti, jer iako trenutne razine L-glutaminske kiseline u hrani ne prelaze dopuštene granice, dugoročni učinci visokih razina L-glutaminske kiseline, osobito kod osjetljivih skupina, ostaju predmet zabrinutosti te je važno nastaviti sa sustavnim kontrolama kako bi se pratila upotreba L-glutaminske kiseline kao aditiva u proizvodima proizvedenima od manje kvalitetnih sirovina.

6. LITERATURA

Abraham R, Swart J, Golberg L, Coulston F (1975) Electron microscopic observations of hypothalami in neonatal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) after administration of monosodium-L-glutamate. *Exp Mol Pathol* **23**, 203-213. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(75\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0014-4800(75)90018-0)

Airaodion AI, Ogbuagu EO, Osemwowa EU, Ogbuagu U, Esonu CE, Agunbiade AP i sur. (2019) Toxicological effect of monosodium glutamate in seasonings on human health. *Glob J Nutri Food Sci* **1**, 1-9. <https://doi.org/10.33552/GJNFS.2019.01.000522>

Anderson GH, Fabek H, Akilen R, Chatterjee D, Kubant R (2018) Acute effects of monosodium glutamate addition to whey protein on appetite, food intake, blood glucose, insulin and gut hormones in healthy young men. *Appetite* **120**, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.08.020>

Austin GL, Ogden LG, Hill JO (2011) Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971–2006. *Am J Clin Nutr* **93**, 836-843. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000141>

Balazs R (1965) Control of glutamate oxidation in brain and liver mitochondrial systems. *Biochem J* **95**, 497. <https://doi.org/10.1042/bj0950497>

Banerjee A, Mukherjee S, Maji BK (2021) Worldwide flavor enhancer monosodium glutamate combined with high lipid diet provokes metabolic alterations and systemic anomalies: An overview. *Toxicol Rep* **8**, 938-961. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.009>

Bautista RJH, Mahmoud AM, Königsberg M, Guerrero NELD (2019) Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants. *Biomed Pharmacother* **111**, 503-516. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.108>

Bera TK, Kar SK, Yadav PK, Mukherjee P, Yadav S, Joshi B (2017) Effects of monosodium glutamate on human health: A systematic review. *World J Pharm Res* **5**, 139-144. <https://wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/effects-monosodium-glutamate-human-health-review/440> Pristupljeno 7.lipnja 2024.

Beyerle J, Frei E, Stiborova M, Habermann N, Ulrich CM (2015) Biotransformation of xenobiotics in the human colon and rectum and its association with colorectal cancer. *Drug Metab Rev* **47**, 199-221. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.996649>

Brosnan JT, Drewnowski A, Friedman MI (2014) Is there a relationship between dietary MSG obesity in animals or humans? *Amino acids* **46**, 2075-2087. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1771-6>

Croitoru M, Fülöp I, Ajtay M, Dudutz G, Crăciun O, Dogaru M (2010) Glutamate determination in foodstuffs with a very simple HPLC-UV method. *Acta alimentaria* **39**, 239-247. <https://doi.org/10.1556/aalim.39.2010.2.15>

Diaa Eldin IM, Abou Sayed Ahmed ET, Hassan HM, Shaltout F, El-shorbagy GA (2023) Prevalence of food additive in hen meat products. *J Dairy Vet Anim Res* **12**, 104-106. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2023.12.00332>

EFSA Panel (2017) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, Di Domenico A, Dusemund B, Lambré C. i sur. Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624) and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA J* **15**, e04910. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4910>

Eweka AO, Igbigbi PS, Ucheya RE (2011) Histochemical studies of the effects of monosodium glutamate on the liver of adult wistar rats. *Ann Med Health Sci Res* **1**, 21-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507088/> Pristupljeno 24. lipnja 2024.

Fernstrom JD (2018) Monosodium glutamate in the diet does not raise brain glutamate concentrations or disrupt brain functions. *Anna Nutr Metab* **73**, 43-52. <https://doi.org/10.1159/000494782>

Fernstrom JD, Cameron JL, Fernstrom MH, McConaha C, Weltzin TE, Kaye WH (1996) Short-term neuroendocrine effects of a large oral dose of monosodium glutamate in fasting male subjects. *J Clin Endocr Metab* **81**, 184-191. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.1.8550750>

Hassan M, Amin R, El-Taher OM, Meslam EM (2018) Chemical preservatives in some meat products. *Benha Vet Med J* **35**, 58–65. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2018.38118>

Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T i sur. (2012) Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* **33**, 702-707. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr323>

Hays SP, Ordonez JM, Burrin DG, Sunehag AL (2007) Dietary glutamate is almost entirely removed in its first pass through the splanchnic bed in premature infants. *Pediatric* **62**, 353-356. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318123f719>

Hazzaa SM, Abdelaziz SAM, Abd Eldaim MA, Abdel-Daim MM, Elgarawany GE (2020) Neuroprotective potential of allium sativum against monosodium glutamate-induced excitotoxicity: impact on short-term memory, gliosis, and oxidative stress. *Nutrients*, **12**, 1028. <https://doi.org/10.3390/nu12041028>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2024) Glutaminska kiselina. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/glutaminska-kiselina> Pristupljeno 1. listopada 2024.

Huang M, Narita S, Inoue T, Koizumi A, Saito M, Tsuruta H i sur. (2017) Fatty acid binding protein 4 enhances prostate cancer progression by upregulating matrix metalloproteinases and stromal cell cytokine production. *Oncotarget* **8**, 111780. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22908>

Husarova V, Ostatnikova D (2013) Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: a review. *JMED Res* **2013**, 1-12. <https://doi.org/10.5171/2013.608765>

JECFA (1974) Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 539, and corrigendum. JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. <https://iris.who.int/handle/10665/41072> Pristupljeno 15. lipnja 2024.

Jinap S, Hajeb P (2010) Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite* **55**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.05.002>

Kazmi Z, Fatima I, Perveen S, Malik SS (2017) Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *Int J Food Prop* **20**, 1807–1815. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295260>

Konrad SP, Farah V, Rodrigues B, Wichi RB, Machado UF, Lopes HF i sur. (2012) Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. *Clinics* **67**, 1209-1214. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(10\)14](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(10)14)

Krebs HA, Veech RL (1969) Equilibrium relations between pyridine nucleotides and adenine nucleotides and their roles in the regulation of metabolic processes. *Adv Enzyme Regul* **7**, 397-413. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(69\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0065-2571(69)90030-2)

Ma X, Yu M, Liu Z, Deng D, Cui Y, Tian Z, i sur. (2020) Effect of amino acids and their derivatives on meat quality of finishing pigs. *J Food Sci Technol* **57**, 404-412. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04077-x>

Martin RL, Lloyd HGE, Cowan AI (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* **17**, 251-257. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90008-6)

Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann NY Acad Sci* **1144**, 97-112. <https://doi.org/10.1196/annals.1418.005>

Medicinski leksikon, mrežno izdanje (1992) Glutaminska kiselina. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2024. <https://medicinski.lzmk.hr/clanak/glutaminska-kiselina> Pristupljeno 1. listopada 2024.

Miller AL, Hawkins RA, Veech RL (1975) Decreased rate of glucose utilization by rat brain in vivo after exposure to atmospheres containing high concentrations of CO₂. *J Neurochem* **25**, 553-558. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb04367.x>

Mondal M, Sarkar K, Nath PP, Paul G (2018) Monosodium glutamate suppresses the female reproductive function by impairing the functions of ovary and uterus in rat. *Environ Toxicol* **33**, 198-208. <https://doi.org/10.1002/tox.22508>

Monno A, Vezzani A, Bastone A, Salmons M, Garattini S (1995) Extracellular glutamate levels in the hypothalamus and hippocampus of rats after acute or chronic oral intake of monosodium glutamate. *Neurosci Lett* **193**, 45-48. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11664-I](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11664-I)

Nakanishi Y, Tsuneyama K, Fujimoto M, Salunga TL, Nomoto K, An JL i sur. (2008) Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *J Autoimmun* **30**, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.11.016>

Ninomiya K (1998) Natural occurrence. *Food Rev Int* **14**, 177-211. <https://doi.org/10.1080/87559129809541157>

Nnadozie JO, Chijioke UO, Okafor OC, Olusina DB, Oli AN, Nwonu PC i sur. (2019). Chronic toxicity of low dose monosodium glutamate in albino Wistar rats. *BMC Res Notes* **12**, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4611-7>

Olney JW, Ho OL (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* **227**, 609-611. <https://doi.org/10.1038/227609b0>

Pavlović V, Cekić S, Kocić G, Sokolović D, Živković V (2007) Effect of monosodium glutamate on apoptosis and Bcl-2/Bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiol Res* **56**, 619-626.

Peng Q, Huo D, Ma C, Jiang S, Wang L, Zhang J (2018) Monosodium glutamate induces limited modulation in gut microbiota. *J Funct Foods* **49**, 493-500. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.015>

Pongking T, Haonon O, Dangtakot R, Onsurathum S, Jusakul A, Intuyod K i sur. (2020) A combination of monosodium glutamate and high-fat and high-fructose diets increases the risk of kidney injury, gut dysbiosis and host-microbial co-metabolism. *Plos One* **15**, e0231237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231237>

Pravilnik (2018) Pravilnik o mesnim proizvodima. Narodne novine 62, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_07_62_1292.html Pristupljeno 24. lipnja 2024.

Price MT, Olney JW, Lowry OH, Buchsbaum S (1981) Uptake of exogenous glutamate and aspartate by circumventricular organs but not other regions of brain. *J Neurochem* **36**, 1774-1780. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb00430.x>

Proleksis enciklopedija, mrežno izdanje (2012) Glutaminska kiselina. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/glutaminska-kiselina> Pristupljeno 4. listopada 2024.

Ragginer C, Lechner A, Bernecker C, Horejsi R, Möller R, Wallner-Blazek M, i sur. (2012) Reduced urinary glutamate levels are associated with the frequency of migraine attacks in females. *Eur J Neurol* **19**, 1146-1150. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03693.x>

Raiten DJ, Talbot JM, Fisher KD (1995) Executive summary from the report: analysis of adverse reactions to monosodium glutamate (MSG). *J Nutr* **125**, S2891-S2906. <https://doi.org/10.1093/jn/125.11.2891S>

Reynolds WA, Lemkey-Johnston N, Stegink LD (1979) Morphology of the fetal monkey hypothalamus after in utero exposure to monosodium glutamate. U: Filer LJ (ured.) *Glutamic acid: Advances in biochemistry and physiology* [online], Raven Press, NY, str. 217-229. <https://www.ajinomoto.com.my/sites/default/files/paragraph/side-by-side/files/morphology-fetal-monkeu.pdf> Pristupljeno 24. lipnja 2024.

Samuels A (2020) Dose dependent toxicity of glutamic acid: a review. *Int J Food Prop* **23**, 412-419. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1733016>

Scalise M, Pochini L, Galluccio M, Console L, Indiveri C (2017) Glutamine transport and mitochondrial metabolism in cancer cell growth. *Front Oncol* **7**, 306. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00306>

Shaltout FA (1996) Mycological and mycotoxicological profile of some meat products (doktorska disertacija), Veterinarski fakultet, Sveučilište Zagazig, Moshtohor.

Sharma A, Wongkham C, Prasongwattana V, Boonnate P, Thanan R, Reungjui S i sur. (2014) Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to monosodium glutamate. *Plos One* **9**, e116233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116233>

Stańska K, Krzeski A (2016) The umami taste: from discovery to clinical use. *Otolaryngol Pol* **70**, 10-15. <https://doi.org/10.5604/00306657.1199991>

Swamy AV, Patel NL, Gadad PC, Koti BC, Patel UM, Thippeswamy AHM i sur. (2013) Neuroprotective activity of pongamia pinnata in monosodium glutamate-induced neurotoxicity in rats. *Indian J Pharm Sci* **75**, 657. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928729/>
Pristupljeno 24. lipnja 2024.

Takai A, Kikuchi K, Kajiyama Y, Sugiura A, Negishi M, Tsunashima H i sur. (2014) Serological and histological examination of a nonalcoholic steatohepatitis mouse model created via the administration of monosodium glutamate. *Int Sch Res Notices* **2014**, 725351. <https://doi.org/10.1155/2014/725351>

Uredba (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehrambenim aditivima. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj?locale=hr> Pristupljeno 04. lipnja 2024.

Uredba Komisije (EU) br. 1129/2011 od 11. studenoga 2011. o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehrambenih aditiva. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/hr/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1129> Pristupljeno 05. lipnja 2024.

Uredba Komisije (EU) br. 231/2012 od 9. ožujka 2012. o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbe (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX%3A32012R0231> Pristupljeno 05. lipnja 2024.

Ureña-Guerrero ME, López-Pérez SJ, Beas-Zárate C (2003) Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. *Neurochem Int* **42**, 269-276. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00131-6](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00131-6)

Vulić A, Kudumija N, Lešić T, Dergestin Bačun L, Pleadin J (2019) Sadržaj mononatrijevog glutamata (MSG) u mesnim i ribljim paštetama s hrvatskog tržišta. *Veterinarska stanica* **50**, 361-368. <https://hrcak.srce.hr/file/326450> Pristupljeno 04. lipnja 2024

Waer HF, Edress S (2006) The effect of monosodium glutamate (MSG) on rat liver and the ameliorating effect of "guanidino ethane sulfonic acid (GES)"(Histological, histochemical and electron microscopy studies). *Egypt J Hosp Med* **24**, 524-538. <https://doi.org/10.21608/EJHM.2006.17916>

Yamaguchi S, Ninomiya K (2000) Umami and food palatability. *J Nutr* **130**, 921S-926S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.921S>

Yan L, Lan ZHOU, Xu HF, Li YAN, Fan DING, Wei HAO i sur. (2013) A preliminary experimental study on the cardiac toxicity of glutamate and the role of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor in rats. *Chin Med J* **126**, 1323-1332. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20120497>

Zanfirescu A, Ungurianu A, Tsatsakis AM, Nițulescu GM, Kouretas D, Veskoukis A i sur. (2019) A review of the alleged health hazards of monosodium glutamate. *Compr Rev Food Sci F* **18**, 1111-1134. <https://doi.org/.1111/1541-4337.12448>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Iva Jukić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis