



**Notat**  
**Nitrit i varmebehandlede kødprodukter**  
**Optimeret holdbarhed af saltreduceret bacon**

4. november 2014.  
Projekt nr.  
2003017/2003018  
TJAN/JBOE/JMO/JUSS

**Nitrits omsætning i kogte kødprodukter**  
**Nitrat/nitrit balancen i bacon**

Tomas Jacobsen, Jannie Bøegh-Petersen og Jens Møller

**Sammendrag**

*Formål*

Formålet med rapporten er at beskrive nitrits kemiske reaktioner i kødprodukter, herunder nitrits antimikrobielle, antioxidative og farvestabiliserende egenskaber, samt nitrits uønskede reaktionsprodukter, som nitrosaminer. Rapporten dækker både varmebehandlede kødprodukter og bacon.

Nitrit og nitrat kan reagere med mange forskellige kemiske forbindelser og omdannes af flere forskellige reaktionsveje. Da kød samtidig er en meget kompleks matrice, som ændrer sig med tiden (pH, frie aminosyrer, nedbrydning af struktur) bliver de mulige reaktioner, der kan foregå, meget komplekse.

*Baggrund*

Projektet "*Optimering af recept og proces for optimal bevarelse af nitrits effekt i kogte kødprodukter*" ønsker en opdateret rapport om nitrits antimikrobielle effekter, med fokus på betydningen af mellem-lagring af blokvarer.

Til projektet "*Optimeret holdbarhed af saltreduceret bacon*" ønskes en litteraturreport om nitrit/nitrat omsætningens betydning for kvaliteten af bacon.

På det 1. følgegruppemødet var der særlig interesse for at få belyst omdannelse af nitrit til nitrat og omvendt.

## Konklusioner

Der er de seneste 10-20 år publiceret en lang række undersøgelser om nitrit/nitrat, men de har ikke medført væsentlige ændringer eller tilføjelser til den eksisterende viden om nitrit/nitrats omdannelse eller antimikrobielle effekt i forarbejdede kødprodukter. Som noget nyt er nitrit nu blevet undersøgt for dens gavnlige fysiologiske rolle af bl.a. kredsløbsregulering hos mennesker og dyr. Men det er stadig nedenævnte konklusioner der er gældende:

- For kogte kødprodukter er der generelt lavt indhold af restnitrit, som i større opgørelser påvises i området fra 0,1 ppm op til maksimalt 20-30 ppm
- Nitrit i kødprodukter fordeles i forskellige fraktioner (binding til pigment, protein og fedt), men fraktionen med størstedelen af den tilsatte nitrit kendes ikke
- Den antimikrobielle effekt af nitrit skyldes afledte forbindelser og virkningen er koncentrationsafhængig
- Den mest effektive hæmning ses for *Clostridium* og *L. monocytogenes* og i mindre grad for *Salmonella*
- I bacon og fermenterede pølser skyldes nitrats omdannelse til nitrit primært mikrobiel aktivitet
- I bacon skyldes nitrits oxidation til nitrat hovedsageligt kemisk omdannelse
- Nitrosaminer kan dannes fra rest-nitrit ved stegning af bacon, men mængden reduceres ved tilsætning af ascorbat/askorbinsyre
- Der er udviklet nye følsomme metoder til detektion af nitrosaminer

## *Fremgangsmåde*

### **Litteraturundersøgelse**

Der er gennemført en søgning på nitrit\* and nitrat\* and (bacon\* or cured meat\* or fermented\* meat or sausage\*) and (convers\* or format\* or influence\*). Søgningen gav 263 hits, hvorfra der fra titler og derefter abstracts blev udvalgt et antal artikler, som er anvendt til dette notat. Desuden er foretaget søgninger ud fra referencelister og citationer af nyere review artikler.

## *Lovgivning*

### **Resultater og diskussion**

Nitrit og nitrat anvendes i praksis som enten natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) eller kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ , også kaldet salpeter). I EU er anvendelsen reguleret iflg. Dir. 95/2/EG (senest ændret i Dir. 2006/52/EG af 5.7.2006) og kun tilladt som konserveringsmiddel. Det seneste direktiv fastsætter maksimumgrænser for tilsat mængde i modsætning til tidligere, hvor der var maksimumgrænser for indholdet af rest-nitrit i de færdige produkter.

I dag tillader EU lovgivningen 150 ppm tilsat  $\text{NaNO}_2$  i varmebehandlede kødprodukter, dog kun 100 ppm til helkonserves. Anvendelsen af nitrat som direkte tilsætning er begrænset til fremstilling af bacon og lufttørrede produkter såsom salami og skinke. I Danmark opretholder vi efter overenskomst med myndigheder, distributører og producenter 60 ppm nitrit som maksimal tilsætning til varmebehandlede charcuterivarer på køl.

I USA er FDA grænserne for tilsætning af nitrit og nitrat i kødprodukter meget forskellige fra EU's regulativer. Da flere af de relevante studier og et par større opgørelser over restindhold af nitrit/nitrat i kommercielt tilgængelige kødprodukter er foretaget på det amerikanske marked, vil det være relevant at kende disse grænser, som er opsummeret i Tabel 1. For nitritsaltet bacon er der i USA også andre regler, hvor grænsen for tilsat nitrit er 120 ppm, foruden et krav om tilsætning af minimum 550 ppm ascorbat eller tilsvarende reducerende additiv (Sindelar & Milkowski, 2012).

For økologiske produkter er der i EU fastsat en maksimal restmængde på 50 ppm og en retningsgivende tilsat mængde på 80 ppm  $\text{NaNO}_2$ . Brugen i økologiske produkter er i øvrigt kun tilladt, såfremt det kan dokumenteres, at der ikke findes alternative konserveringsmetoder, og at anvendelsen dermed er nødvendig af sikkerheds- og holdbarhedsmæssige grunde. Danske producenter af økologiske kødprodukter benytter sig dog almindeligvis ikke af denne mulighed (Jensen & Koch, 2009).

**Tabel 1.** Tilladte mængder af nitrit og nitrat i forskellige typer kødprodukter efter amerikansk lovgivning.

Tilsætningsstof (ppm)	Lagesaltet (kumme- eller sprøjtesaltet)	Hakket/fars	Tørsaltet
Natrium/kalium nitrit	200	156	625
Natrium/kalium nitrat	700	1718	2187

*Nitrits og nitrats reaktioner med kød*

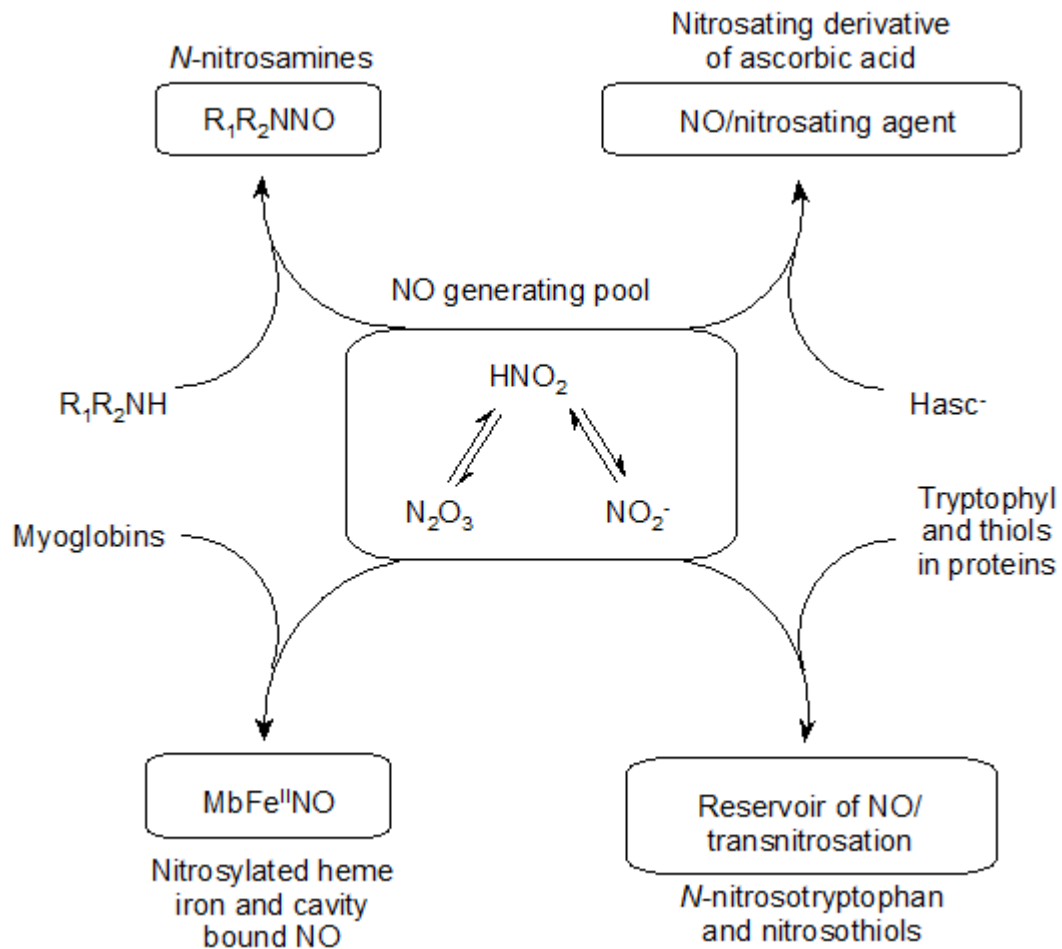
I kemiske reaktioner kan nitrit optræde oxiderende eller reducerende, hvilket medvirker til nitrits høje re-aktivitet. Afhængigt af forholdene kan nitrit, der er den korresponderende base til den svage syre salpetersyring, oxideres til nitrat eller reduceres til radikalet nitrogen(II)oxid (NO).

Når kød saltes med nitrit vil mindst halvdelen af den tilsatte mængde ikke være målbar ved slutningen af saltningsprocessen (Cassens et al.1974). Dette betyder, at nitrit enten må være forsvundet til atmosfæren som gasformige N-forbindelser eller være reageret med andre stoffer så det ikke længere er målbart.

Woolford og Cassens (1977) har undersøgt nitrits reaktioner i bacon med <sup>15</sup>N-mærket natrium nitrit. Nitrit forsvandt under fremstilling og lagring, <sup>15</sup>N blev inkorporeret både i proteindelen (73-87 %) og fedtdelen (20-25 %). Tilsætning af ascorbat bevirkede, at en større del af <sup>15</sup>N blev genfundet i vandopløselige fraktioner og mindre i bindevæv og fedtdelen.

Generelt finder flere forskellige undersøgelser, at 5-15 % af tilsat nitrit bindes til myoglobin, 1-10 % omdannes til nitrat, 20-30 % findes i proteinfraktionen, 5 % i lipid-fraktionen, 5-15 % er bundet til SH-grupper og 1-5 % er på gasform (Cassens et al. 1979).

Nitrit kan reagere med SH-grupper på proteiner og danne nitrosothioler, men det kan ikke forklare den store mængde nitrit, der bindes til protein, da reaktionen bedst foregår ved meget lavere pH end der findes i kød (Cassens et al. 1979). Der er derfor en del nitrit, som er bundet på ukendt måde til proteiner. Figur 1 viser en oversigt over, hvordan nitrit og afledte forbindelser kan reagere i kødmatricer, hvilket både inkluderer farvedannelse, proteinbinding og uønskede nitrosaminer.



**Figur 1.** Puljer af nitrit og afledte forbindelser dannet i kødmatricer.

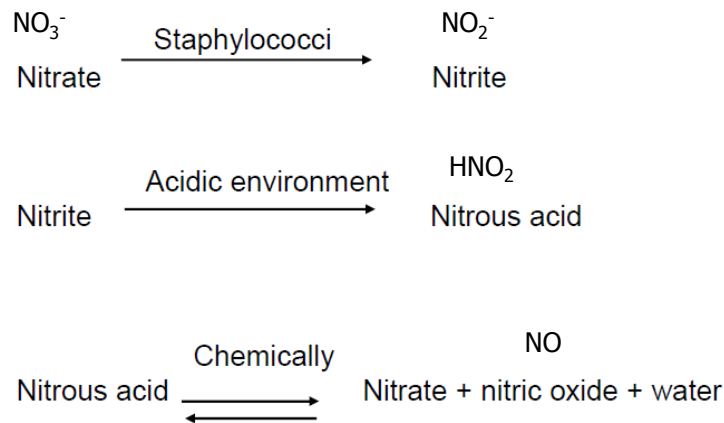
*Nitrats omdannelse til nitrit*

Nitrats omdannelse til nitrit antages normalt at ske udelukkende ved mikroorganismer, som har nitrat reduktase aktivitet. I starterkulturer til f.eks. spegepølser anvendes hovedsageligt forskellige typer staphylokokker, som under anaerobe forhold anvender nitrat som elektron acceptor ved nitrat respiration. Et eksempel på sådan et reaktionsforløb er vist i Figur 2.

Forskellige mælkesyrebakterier er også i stand til at reducere nitrat til nitrit (Hammes, 2012).

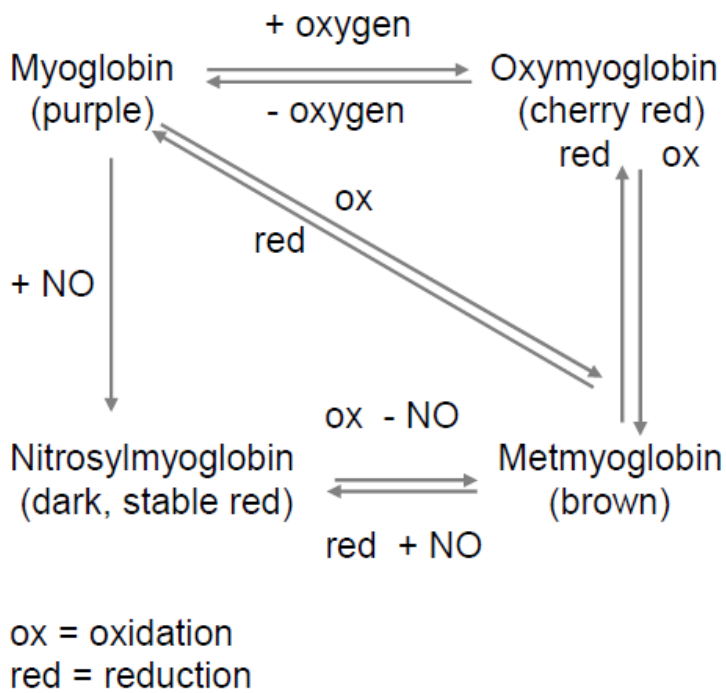
Nitrat kan muligvis reduceres til nitrit uden mikrobiel aktivitet, idet nitrat reduktase aktivitet angiveligt findes i alle hvirveldyr (Bahra et al., 2012), og der er observeret nitrat reduktion i saltede varmebehandlede produkter (Honikel, 2008).

Jolley (1979) har vist, at i bacon fremstillet af kød med højt pH (op til 6,7 inden saltning), omdannes nitrat hurtigt til nitrit ved tilsætning af bakterier fra Wiltshire cured bacon. I forsøget blev stor set alt tilsat nitrat omdannet til nitrit i den vakuumpakkede forsøgsbacon, således at der efter 5-15 dage var et meget højere nitritindhold end tilladt.



**Figur 2.** Reaktioner med forskellige nitrogen-oxider relevant for farvedannelse samt antioxidativ og antimikrobiel effekt i kødmatricer.

Farvedannelse



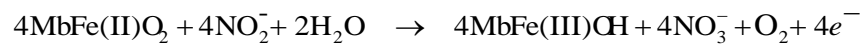
**Figur 3.** Farvecyklus for pigmentet myoglobin i kød og kødprodukter

I litteraturen er der flere forslag til, hvordan nitrit og dets reaktionsprodukter kan reagere med myoglobin og give den stabile røde farve nitrosylmyoglobin (MbFe(II)NO) i bacon.

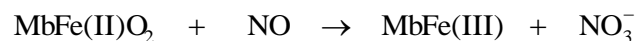
Under anaerobe forhold vil myoglobin MbFe(II) og NO reagere direkte og danne den stabile røde farve MbFe(II)NO. I saltet bacon vil nitrit kunne reagere med ascorbat og give NO. Natrium-chlorid kan reagere med NO og danne NOCl (nitrosohypochlorid) som har større nitrosyle-rende effekt end nitrit selv (Fox et al. 1996).

Under aerobe forhold (positivt redox potentiale) vil nitrit oxidere MbFe(II) til MbFe(III), hvorved der dannes metmyoglobin fra myoglobinen og nitrit omdannes til NO. Denne reaktion kendes typisk på overfladen af bacon eller spegepølser, kort efter saltning eller stopning hvor produkterne får en brun overflade af metmyoglobin.

På overfladen kan nitrit oxidere det røde oxymyoglobin (MbFe(II)O<sub>2</sub>) som findes i overfladen af fersk kød. Reaktionen sker efter ligningen:



Reaktionen mellem radikalet NO og det primære kødpigment i overfladelaget af fersk kød MbFe(II)O<sub>2</sub> er meget hurtig (med anden ordens hastighedskonstanter på 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) og vil ligeledes kunne forløbe på overfladen af nitritsaltet kød umiddelbart efter, at saltningen er foretaget, forudsat at nitrit er reduceret til NO af ascorbat eller andre reducerende forbindelser.



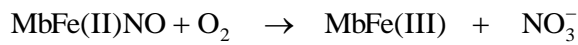
NO kan ikke reducere MbFe(III) til MbFe(II), da processen ikke er thermodynamisk mulig. Hvordan de kemiske reaktioner, der fører til den stabile røde farve ved nitrittilsætningen forløber, er ikke fuldt afklaret (Skibsted, 2011).

### Farvestabilitet

Aktiviteten af kødets eget enzym metmyoglobin reductase (MMR) kan muligvis være medvirkende i omsætning af nitrit/nitrat afledte forbindelser. Et eksempel er, at laktat kan indgå i gendannelse af den reducerede form NADH, som er nødvendig for, at MMR enzymet kan være aktivt overfor metmyoglobin. Via koblede reaktioner med tilsat nitrit og afledt NO vil laktat være med til at nedbringe mængden af rest-nitrit i et kødprodukt samtidig med at reaktionen drives mod dannelse af det nitritsaltede pigment, MbFe(II)NO (McClure et al. 2011).

Det primære pigment i ikke-varmebehandlet nitritsaltet kød er nativt MbFe(II)NO, mens der ved pasteurisering sker en denaturering af myoglobinet's proteinkæde, hvilket ikke ødelægger farven, men derimod giver en lille farveændring til en mere pink nuance. Pigmentet i varmebehandlede kødprodukter kaldes nitrosylmyochrome, dMbFe(II)NO, og tidligere modelstudier har vist, at molekylets kemiske re-aktivitet er stort set identisk med det ikke-denaturerede pigment, MbFe(II)NO (Andersen & Skibsted 1992).

Produkterne for termisk induceret oxidation af pigmenter i nitritsaltet kød er det brune metmyoglobin og nitrat:

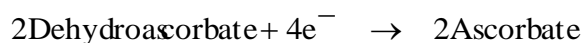
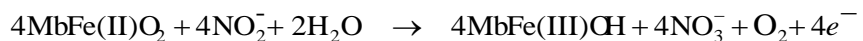
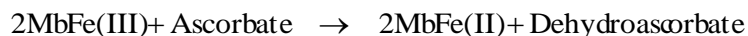


Under lagring i detailledet vil lysinduceret misfarvning være mest betydningsfuld og kritisk, da både nativ MbFe(II)NO og denatureret dMbFe(II)NO udviser meget høj grad af lysfølsomhed ved køletemperatur og lavt oxygen niveau (Møller and Skibsted, 2004).

Det er eftervist, at fotooxidationen af MbFe(II)NO ikke er afhængig af lysets bølgelængde og at fotooxidationen kræver tilstedeværelse af små mængder oxygen for at forløbe (Møller et al. 2002). Mekanismen for fotooxidation af MbFe(II)NO er ikke fuldt afklaret men et senere studie har vha. masse spektrometri påvist, at reaktionsprodukterne er de samme som for termisk oxidation, altså det brune MbFe(III) og nitrat ionen (Munk et al., 2010).

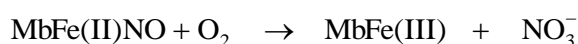
#### *Nitrit omdannelse til nitrat*

Lee et al. (1978) foreslår følgende omdannelse af nitrit til nitrat, idet de har vist, at tilstedeværelse af både metmyoglobin og ascorbat øger omdannelsen af nitrit til nitrat, mens hverken metmyoglobin eller ascorbat alene øger omdannelsen.



Ascorbat reducerer først MbFe(III) til deoxymyoglobin MbFe(II). MbFe(II) og nitrit bliver samtidig oxideret ved forbrug af ilt til nitrat. To elektroner frigives og overføres til dehydroascorbat som reduceres tilbage til ascorbat (Lee et al., 1978). De viser i forsøg med kødprodukter, at omdannelsen af nitrit til nitrat er størst, når produktet er tilsat ascorbat. Med 1000 ppm ascorbat finder de op til 38 ppm nitrat 2 dage efter saltning, dannet ud fra tilsætning af 150 ppm nitrit.

En anden kilde til omdannelse af nitrit til nitrat kan være den nævnte oxidation af MbFe(II)NO til MbFe(III) og nitrat.





Hastigheden af denne reaktion er afhængig af iltspænding og temperatur og reaktionen har maksimal hastighed, når iltspændingen er ca. 0,2 atm svarende til atmosfærisk iltspænding (Andersen & Skibsted, 1992).

Nyere forskning har vist, at flere forskellige bakterier er i stand til at oxidere nitrit til nitrat under anaerobe forhold. Disse bakterier har enzym systemer (nitrit oxido-reductaser) der uden frit tilgængeligt ilt kan oxidere nitrit til nitrat (Maia and Moura, 2014).

#### *Restnitrit i kødprodukter*

Restmængden af nitrit i kødprodukter har generelt været betragtet som et kritisk mål for sikkerheden af et produkt overfor vækst af patogene bakterier (Anonymous, 2003). Der er dog så mange faktorer, der påvirker den målbare mængde restnitrit, at man som tidligere nævnt er gået væk fra grænser baseret på restnitrit, og i stedet har fastsat grænser for maksimal tilladte mængde tilsat nitrit.

Selvom bidraget fra kødprodukter er lille, er mængden af restnitrit i kødprodukter alligevel en kritisk værdi til at vurdere befolkningens daglige indtag af dette tilsætningsstof. Det skal dog sættes i forhold til indtaget af nitrat fra kilder som grønbladede grønsager (~1000 ppm) og kartofler (~200 ppm) (Cammack et al., 1999), hvilket via nitrat reductase aktivitet i spyt og i mavesækken kan give ophav til lang større mængder nitrit. Endelig bør det nævnes, at nyere forskning inden for den humane fysiologi faktisk under visse forhold tilskriver nitrit en vigtig rolle som signalstof på linje med den afledte forbindelse NO (Castiglione et al., 2012). Der er sågar fremsat hypoteser om, at nitritniveauet i blodbanen kan være af betydning for helbredet på sigt og at en vis mængde kan modvirke hjertekarsygdomme og åreforkalkning (Sindler et al., 2014).

#### *Undersøgelser af restnitrit i kødprodukter*

Udviklingen inden for anvendelse af tilsætningsstofferne nitrit og nitrat i kødprodukter er generelt gået mod lavere niveauer af tilsætning (Cassens, 1997). I midt 90'erne blev udvalgte kødprodukter i USA målt til at have flg. mængder af restnitrit:

- Bacon: 7 ppm
- Skiveskåret kogt skinker: 6 ppm
- Middagspølser: 4 ppm

Cassens refererer endvidere til mere omfattende undersøgelser, hvor næsten 100 detailpakker af nitralsaltede kødprodukter er undersøgt. Her påvistes en gennemsnitlig mængde restnitrit på 10 ppm, dog uden at andelen af forskellige produkttyper er angivet (Cassens, 1997). Til sammenligning blev der refereret værdier for restnitrit i området mellem 26–64 ppm i forskellige kødprodukter ved 2 undersøgelser fra

30'erne og efterfølgende 4 undersøgelser i 70'erne (White, 1975). I samme artikel angives, at med et dagligt indtag af saltede kødprodukter på 75 g/dag vil en gennemsnitsborger i USA få et bidrag på 208 ppm nitrit fra kødprodukter.

#### *US opgørelse fra 2012*

I et studie fra 2012 undersøgtes 470 prøver af saltede kødprodukter indkøbt i 5 større amerikanske byer (Nuñez de González et al. 2012). Den omfattende undersøgelse dækkede både konventionelle kødprodukter tilsat nitrit/nitrat ( $n=306$ ) i henhold til gældende lovgivning i USA, samt økologisk eller "natur-saltede" kødprodukter ( $n=164$ ), der altså ikke ifølge deklarationen var tilsat nitrit eller nitrat, men dog alligevel oftest var fremstillet med brug af en alternativ naturlig nitratkilde. Endvidere blev produkterne inddelt i grupper efter varmemhandling og ikke-varmebehandling.

En overordnet sammenligning af kødprodukter og mængde af restnitrit viser, at kogte saltede pølser har højere restnitrit set i forhold til fermenterede, syrnede og varmebehandlede pølser, hvor restnitrit i de sidstnævnte prøver er  $<1$  ppm. For helmuskel-produkter ses niveauer af restnitrit på linje med kogte pølser, men det bør bemærkes, at lovgivningen tillader forskellige mængder af nitrit/nitrat i disse 2 typer af produkter. I Tabel B1 og B2 indsat i bilag 2 kan data fra undersøgelsen studeres i nærmere detaljer.

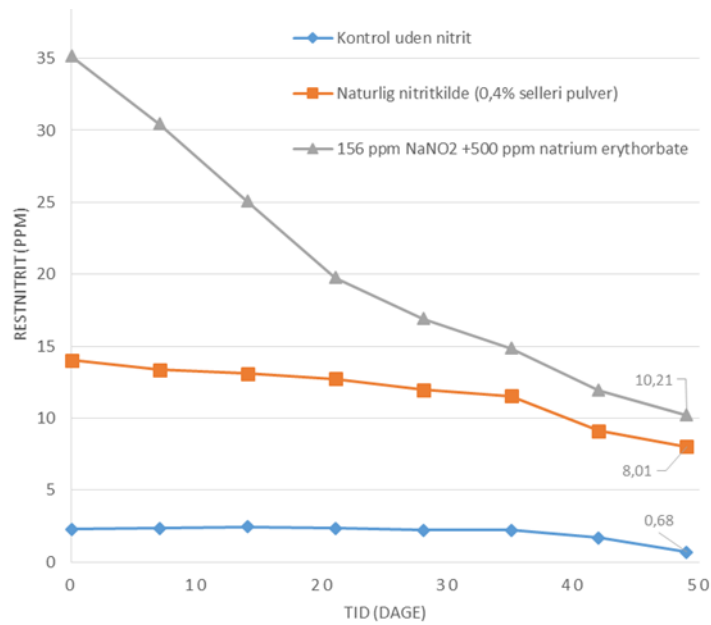
#### *Kødprodukter med alternative nitrit/nitrat kilder*

Et omfattende studie af produktkvaliteten af kommercielt tilgængelige kødprodukter, der enten er fremstillet ved tilsætning af naturlig nitrat kilde eller én kontrol med tilsat nitrit, er udført for både kogt skinke, middagspølser og bacon (Sindelar et al., 2007). Tabel B3 i bilag 2 viser resultater fundet for de varmebehandlede produkter, kogt skinke og middagspølser, hvor det er tydeligt, at prøve E, der som eneste er tilsat nitrit for kogt skinke, indeholder mellem 3–6 gange højere restnitrit i forhold til andre prøver, hvor startniveauet ikke er kendt. For nitrat i de 6 undersøgte kogte skinker findes der ikke systematiske forskelle.

Et lignende studie af udvalgte kødprodukter, der består af kommercielt tilgængelige frankfurterpølser og kogt skinke viser, at der ikke kan måles forskellige niveauer af restnitrit og nitrat i konventionelt fremstillede produkter overfor produkter med alternativ kilde til nitrit/nitrat (Sullivan et al., 2012). Men i frankfurterpølser ( $n=2$ ) der er helt fri for nitrit/nitrat tilsætning påvises signifikant lavere mængde af både nitrit og nitrat (Tabel B4 i bilag 2).

Et lignende studie har sammenlignet ikke-nitritsaltede (både helt fri for nitrit/nitrat og med naturlig nitritkilde, selleripulver) og konventionelt fremstillede middagspølser med 156 ppm nitrit og 500 ppm erythorbat

(Figur 4). Her ses det at målbart restnitrit efter 50 dages lagring ender på omtrent samme niveau mellem 8-10 ppm (Xi et al., 2012), hvor erythorbats (isomer af ascorbat) effekt kan tilskrives en >3x reduktion af restnitrit i konventionelt fremstillede pølser. Pølser med alternativ nitritkilde medfører derimod ikke ændret mængde restnitrit i samme udstrækning, dvs. fra ca. 15 ppm til 8 ppm nitrit.



**Figur 4.** Restnitrit i 3 forskellige kogte middagspølser, uden nitrit, med naturlig nitritkilde og med 156 ppm NaNO<sub>2</sub> og 500 ppm erythorbat, over 49 dages kølelagring ved 4° C (fra Xi et al. 2012).

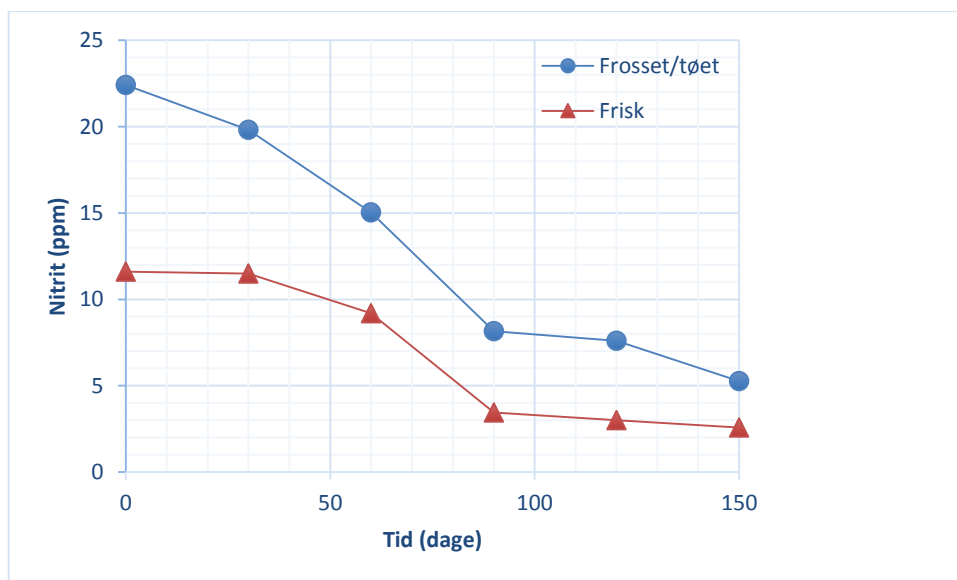
#### Øvrige ingredienser og restnitrit

I lever paté med varierende niveauer af hhv. nitrit (40, 80, og 120 ppm) og ascorbat (500, 750 og 1000 ppm) er observeret klar effekt af stigende nitrittilsætning på restnitrit målt efter fremstilling, hvorimod ascorbat i de undersøgte niveauer ikke havde effekt på restnitrit mængden (Vossen et al., 2012). Således kan der detekteres restnitrit på hhv. 11,8; 31,3 og 68,8 ppm for tilsætning i de 3 ovennævnte niveauer.

Som nævnt tidligere er der indikationer på, at øget laktatmængde i et kødprodukt inden varmebehandling vil kunne reducere restnitrit mængden (McClure et al., 2011), men i kogte kødprodukter vil denne mekanisme der beror på enzymaktivitet af endogene kødenzymer være uden betydning. Forsøg med at tilsætte tomatpulp-pulver sammen med nitrit i forskellige kombinationer til kødpølser viste, at tomatpulp uanset mængde er med til at reducere den målbare mængde restnitrit efter varmebehandling (Hayes et al., 2013). Dette antyder, at reducerende forbindelser i tomatpulp alt andet lige medfører en øget omdannelse af nitrit.

### Betydning af råvaren

Råvarernes status og forbehandling kan have indvirkning på restnitrit mængden efter produktion. For et tørsaltet, fermenteret oksekødsprodukt, "pastirma", er det fundet, at restnitrit mængden afhænger af, om kødråvaren er frosset/optøet eller fersk ved produktionen (Aksu et al., 2005). Figur 5 viser, at den målte restnitrit er halveret for fersk kød i forhold til frosset/optøet kød, hvor lagring ved enten 4° C eller 10° C ikke har målbar effekt.



**Figur 5.** Restnitrit målt under lagring ved 4° C og 10° C af tørsaltet, fermenteret oksekøds-pastirma, pakket i modificeret atmosfære (fra Aksu et al. 2005).

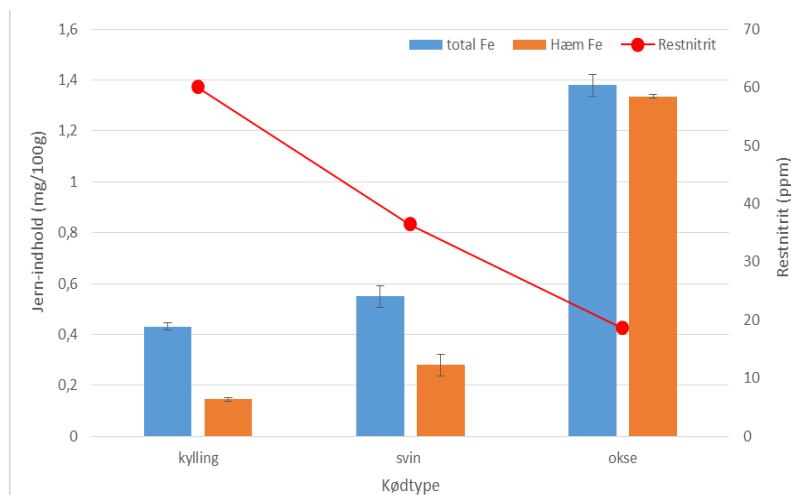
### Betydning af varmebehandling

En nyere studie har undersøgt, hvordan hastigheden for nitrits omdannelse til NO (og andre afledte forbindelser) afhænger af nitritniveau (40, 70, 100 og 150 ppm) og temperatur (55-72° C) (Barbieri et al., 2013). Her ses det, at hastigheden for nitrits omdannelse øges 2-4 gange ved temperaturer  $\geq 65^\circ$  C og at denne øgede omsætning af nitrit primært forløber i koncentrationsområdet 70-100 ppm, hvorimod hastigheden ikke påvirkes i samme grad ved lavere henholdsvis højere nitrit tilsætning.

### Betydning af kødtype og jernindhold

I et forsøg med nitritsaltede kogte kødprodukter fremstillet af kød fra 3 arter observeres en interessant sammenhæng mellem mængden af hhv. total jern og hæmjern, samt målt restnitrit umiddelbart efter fremstilling (Van Hecke et al., 2014). Figur 6 viser mængden af jern i de 2 puljer sammen med mængden af restnitrit målt lige efter varmebehandling baseret på tilsat mængde på 120 ppm  $\text{NaNO}_2$ . Der er en tydelig negativ korrelation, hvor øget jernindhold giver tilsvarende lavere målbart restnitrit mængde. Dataanalyse af henholdsvis total Fe og hæm-Fe korrelation mod restnitritmængder for de 3 typer kød viser, at den matematiske bedste sammenhæng er mellem hæm-Fe og

restnitrit, hvilket er i overensstemmelse med det faktum, at hæm-Fe binder NO, der er afledt af nitrit, hvilket er en kemisk interaktion, som i sidste ende påvirker den målbare mængde restnitrit.



**Figur 6.** Mængden af total Fe og hæm-Fe over for restnitrit i kødprodukter af 3 typer kød, kylling, svin og okse, fremstillet med 120 ppm NaNO<sub>2</sub> og varmebehandlet til 65° C (fra Van Hecke et al. 2014).

*Nitrit som antioxidant i varmebehandlede kødprodukter*

Flavour af nitritsaltede kødprodukter, der er varmebehandlede er blevet beskrevet som den naturlige kødsmag og aroma, mens varmebehandlede kød uden nitrit relativt hurtigt undergår oxidation, som betyder en ændret smag og aroma, ofte beskrevet som warmed-over-flavour (WOF) (Bekhit et al., 2013). En mekanisme bag den hurtige dannelse af WOF er bl.a. forbundet med frigivelse eller aktivering af pro-oxidativt hæm-Fe fra myoglobin og Fe-ioner fra jerndepoter, og her menes liganden NO, afledt fra nitrit, at være medvirkende årsag til, at denne kvalitetsforringelse ikke ses for nitritsaltede kødprodukter (Grever and Ruiters, 2001).

I et nyligt studie er flygtige forbindelser målt med GC sammenholdt i hhv. nitritsaltet skinke og nitritfri kontrol skinker. Her konkluderes det, at nitrit forhindrer dannelse af ubehageligt lugtende svovlforbindelser fremkommet via oxidative processer (Thomas et al., 2013).

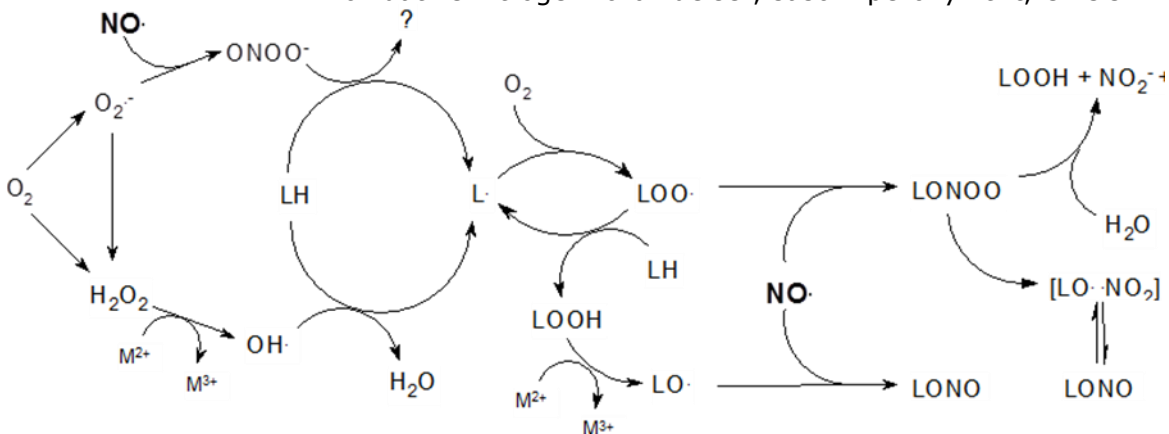
Det er påvist, at pigmentet i nitritsaltet kød, MbFe(II)NO, effektivt kan de-aktivere primære oxidationsprodukter, lipidhydroperoxider (LOOH), som ellers kan fremme oxidative processer og deraf følgende harskning (Baron et al., 2007).

Hæm-Fe's rolle for oxidation og nitrits påvirkning af dets re-aktivitet, har visse paralleller til pigmentet, zink porphyrin (Zn-PP), som er den primære farvegivne forbindelse i nogle tørsaltede kødprodukter fremstillet uden nitrit og nitrat (f.eks. Parma og Iberisk skinke). Her er det påvist, at hvis der tilsættes nitrit, bliver dette alternative Zn-PP pigment, hvor det centrale metal udskiftes, ikke dannet, hvilket formentlig er fordi NO er bundet til hæm-Fe og dermed kan Zn ikke komme til (Adamsen et al., 2006).

NO kan reagere meget hurtigt med en række skadelige frie radikaler, inklusiv hydroxyl (OH•), alkyl (L•), alkoxy (LO•) eller peroxy (LOO•) radikaler. Eksempelvis er 2. ordens reaktionshastighederne mellem NO og •OH eller NO og LOO•, målt til henholdsvis  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  og  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , og reaktionshastigheden er dermed nærmest diffusionskontrolleret.



Figur 7 viser, hvordan NO kan fungere som kædebrydende antioxidant i auto-oxidation af lipider, og hvordan NO i tilstedeværelse af særlig aktiverede former for oxygen kan medvirke til dannelse af pro-oxidative nitrogen forbindelser, såsom peroxyntirit, ONOO<sup>-</sup>.



**Figur 7.** Reaktionen af NO, der enten fremmer eller hæmmer oxidative processer, der leder til harskning af lipider.

*Antioxidativ effekt, smag og aroma komponenter i bacon*

Villaverde et al. (2014) har undersøgt bl.a. TBARS og "Strecker-aldehyder" i fermenteret pølse med forskellige tilsætninger af nitrit og ascorbat. Bacon ligner de fermenterede produkter ved, at det ikke er varmebehandlet og har næsten tilsvarende sammensætning og salt, nitrit og ascorbat tilsætning. Det kan derfor antages, at tilsvarende forhold vil findes i bacon som i pølse, måske i mindre omfang (pga. ændrede forhold, hvad angår temperatur og at produktet ikke er hakket). Harskning af fedt (TBARS) reduceres ved tilsætning af ascorbat eller nitrit. Ascorbat tilsætning alene er så effektiv, at der ikke observeres en antioxidant effekt af nitrit, når begge stoffer er tilsat. Der kan således ikke måles dannelse af harskningsprodukter, når der er nitrit eller ascorbat tilsat.

Methylforgrenede aldehyder er kendt for at have stor betydning for smag og aroma af saltede eller fermenterede produkter.

Undersøgelsen viser, at der dannes flere af disse aldehyder, når der er tilsat nitrit. Villaverde et al. foreslår en reaktionsvej, hvor nitrit oxiderer lysin, som deamineres og oxideres, hvorefter der ved en transaminering og decarboxylering i en reaktion med fx leucin dannes methylforgrenede aldehyder.

*Antimikrobiel virkning af nitrit og afledte forbindelser*

Historisk set er nitrit og nitrat tilsat pga. den koncentrationsafhængige inhiberende virkning på spiring *Clostridium* sporer. Der er på trods af en lang række undersøgelser endnu ikke et klart svar på, hvordan nitrit specifikt hæmmer *Clostridium* vækst, men det hævdes at mellem 50-150 ppm nitrit er nødvendigt for at forhindre vækst (Anonymous, 2003).

Det er kendt, at nitrit omdannes hurtigere ved reduceret pH og med tilsætning af reducerende additiver, samt at en varmebehandling også øger omdannelse i stor grad. Disse observationer indikerer, at det er forbindelser afledt fra nitrit (eller nitrat) som har en inhiberende virkning på vækst af bakterier og sporer.

Ved specifikt at vurdere effekten af restnitrit, restnitrat og andre parametre i 3 typer af kødprodukter på væksten af *Clostridium perfringens* og *Listeria monocytogenes* kunne det vises, at både restnitrit og restnitrat hæmmede væksten af *C. perfringens* i skinke (Sullivan et al., 2012). I middagspølser og bacon blev det fundet, at mængden af nitrosyl pigmentet havde samme inhiberende effekt på denne anaerobe bakterie, hvorimod disse faktorer ikke kunne påvises at have hæmmende effekt på *L. monocytogenes*.

For kogte kødprodukter; middagspølser, kødpølser og skinke, der er podet med *C. botulinum* og fremstillet med 0,75 og 120 ppm nitrit i recepten, kunne *C. botulinum* påvises, men uden vækst og toksinproduktion i en 5 ugers lagringsperiode ved 8° C (Keto-Timonen et al.,

2012). For de nitritfrie kødprodukter kunne der modsat detekteres de højeste kimtal for *C. botulinum* og toksindannelse påvises i alle tilfælde efter enten 3 eller 5 ugers lagring.

I varmebehandlede kødmodeller tilsat nitrit i niveauerne 0, 50, 100, 150 og 200 ppm og podet med *L. monocytogenes* til log 2 cfu/g kan det ses, at kontrolprøver uden nitrit opformerer sig til log 7-8 cfu/g i løbet af 10 dage ved 10° C (Xi et al., 2012). For 50 og 100 ppm nitrit tilsat ses en reduceret vækst, som kun når log 6 cfu/g på 10 dage, mens der ved nitritkoncentrationer på 150-200 ppm observeres en yderligere reduktion i væksten. Her udvises en nølefase de første 4 dage og dernæst opformerer *L. monocytogenes* kun til log 4 cfu/g. Sidestilles disse forskellige vækstforløb af *L. monocytogenes* med målinger af restnitrit i prøverne er der for de 2 laveste nitrittilsætninger målt restnitrit på 20-40 ppm, mens det i de 2 højeste ligger 70-90 ppm restnitrit, hvilket svarer til en 50% reduktion af tilsat nitrit efter varmebehandlingen. Det skal bemærkes, at der ikke er tilsat reducerende additiv og at pH i kødmodellerne ligger på 6,0-6,5, hvilket sandsynligvis medfører, at restnitrit mængden ligger relativt højt og konstant i løbet af de 10 dages lagring.

Et nyere studie sammenligner hæmmende effekt af konventionelt nitrit (100 eller 200 ppm) med "naturlig nitrit" i form af selleri juice (justeret til samme nitritkoncentration som ved konventionel tilsætning) overfor *L. monocytogenes* i kogt skinke (Horsch et al., 2014). Det ses, at de 2 former for nitrit har samme hæmning af *L. monocytogenes*, mens en pH nedjustering af selleri juice inden tilsætning øger dens inhiberende virkning overfor *L. monocytogenes*.

Reduktion af nitrit og nitrat tilsætning er undersøgt i forhold til den inhiberende virkning på *Salmonella* i tørrede, fermenterede pølser (Hospital et al., 2014). Både nitrit og nitrat er tilsat i niveauer på 150, 112, 75 og 0 ppm. *Salmonella* podet til log 3 cfu/g på dag 0 stiger 1 log-enhed under modningen i pølser med nitrit/nitrat tilsat. Efterfølgende reduceres *Salmonella* til log 0 cfu/g i pølser tilsat nitrit/nitrat efter endt modning/lagring på 55 dage. Antallet af *Salmonella* i pølser uden nitrit/nitrat stiger 2 log-enheder i løbet af modningsforløbet og reduceres derefter til en slutværdi på log 2 cfu/g efter endt modning.



Det vides, at *Salmonella typhimurium* via forskellige enzymesystemer (flavohemoglobin, flavorubredoxin og cytochrom nitrit reductase), kan overkomme stress fra NO, der er afledt fra nitrit (Mühlig et al., 2014). I fermenterede pølser tilsat 150 ppm NaNO<sub>2</sub> kan der påvises en øget transkription af gener til enkelte af disse enzymer, men yderligere analyse kan dog ikke udpege ét specifikt enzymesystem med størst betydning for den beskyttende effekt i forhold til de andre.

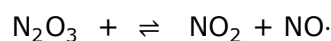
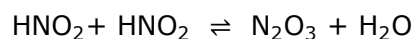
#### Nitrit-afledte bakterio- statiske forbindelser

En række undersøgelser udført i 1960'erne baseret på observationer i simple vækstmedier anfører, at tilstedeværelse af nitrit i kombination med varmebehandlingen kan hæmme spiring/vækst af *Clostridium* sporer, uden at der kan måles restnitrit i mediet. Disse ukendte afledte faktorer blev oprindeligt benævnt "Perigo-faktoren". Endvidere er det vist, at nitrit tilsat efter opvarmning af vækstmediet ikke har tilsvarende hæmmende virkning, hvorfor det er sandsynligt, at det lille radikale molekyle, NO, er den væsentligste inhiberende faktor mod især *Clostridium* vækst (Grever and Ruitter, 2001). Dermed vil forhold, som fremmer NO dannelse fra nitrit øge den antimikrobielle effekt af nitrit (eksempelvis reduceret pH samt tilsætning af reducerende forbindelser, såsom ascorbat og erythorbat).

Dog viser forsøg, hvor NO på gasform tilsættes direkte til hakket kød, at der ikke er samme inhibering som ved normal nitritsaltning. Dette tilskrives, at NO molekylet har meget kort levetid og vil nå at reagere med f.eks. ilt til inaktive forbindelser inden den ønskede interaktion med kød-matricen kan foregå.

#### Salpetersyrling, HNO<sub>2</sub>

Effekten af lavere pH kan indikere, at nitrits korresponderende syre salpetersyrling (HNO<sub>2</sub>), kan være medvirkende til at hæmme bakterier, hvilket dels kan hænge sammen med at syre-anhydridet, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, direkte kan give ophav til NO via en dismutation:



#### Jern-nitroso-thioler, Fe-S-NO og nitroso-thioler

I en kødmatrix kan der dannes komplekser af typen, Fe-S-NO, kaldet jern nitroso-thioler (Cammack et al. 1999), og denne type forbindelser kan inhibere både *L. monocytogenes* og *C. sporogenes* ved væsentligt lavere koncentrationer end både nitrit (x1000), NO (x8) og andre nitroso komplekser.

### *Peroxynitrit, ONOO<sup>-</sup>*

Hvis NO findes sammen med ilt vil det primære reaktionsprodukt være den rødbrune, giftige gas NO<sub>2</sub>. Men hvis NO findes sammen med reaktive oxygen forbindelser, såsom peroxider og superoxid anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, er det muligt, at den meget reaktive peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) dannes. Her er tale om en meget reaktiv forbindelse, der både vil virke oxiderende i kødet, men også kan ødelægge vegetative celler og sporer.

Peroxynitrit er en stærk oxidant som kan initiere lipid oxidation eller forårsage oxidative ændringer af proteiner, f.eks. nitration af tyrosin, eller den kan isomerisere til uskadelig nitrit (Beckman et al., 1994). Peroxynitrit kan protoniseres, ONOO<sup>-</sup>/ONOOH, med pK<sub>a</sub> = 6,8, og dermed er pH i miljøet meget afgørende for hvordan denne pro-oxidant reagerer. Ved pH < 6,8 vil den typisk isomerisere til nitrat.

### *Nitrits antimikrobielle virkning i maven*

Kontrollerede undersøgelser af spyt, der indeholder forskellige mængder af nitrit, og dernæst blandes med sur mavesaft viser, at den antimikrobielle effekt overfor *E. coli* øges ved tilstedeværelse af nitrit i kombination med askorbinsyre (Björne et al., 2006). Desuden ses proportional større log-reduktion i bakterieantallet for pH-området 2-4 med stigende mængde af nitrit, mens de nitrit-afledte forbindelser NO og nitroso-/nitrosyl-forbindelser ligeledes findes i hhv. 2 og 10 gange højere koncentration ved pH=3 end ved pH=5.

Over for *Salmonella*, der i nogle tilfælde kan overleve det sure miljø i maven via et syre tolerant respons, er det vist, at både nitrit og en syntetisk NO donor i en dosisafhængig virkning meget effektivt kan reducere antallet af *Salmonella* i løbet af 1½ times inkubation (Bourret et al., 2008).

### *Nitrosaminer*

De sundhedsmæssige aspekter ved nitrit og nitrat i bacon drejer sig hovedsagelig om dannelse af nitrosaminer og -amider ved stegningen af bacon. Der forekommer en lang række forskellige nitrosaminer, hvoraf i hvert fald de flygtige nitrosaminer er kendt som carcinogene stoffer.

Nitrosamin dannelse i bacon kræver, at der er nitrit tilgængeligt, at der er sekundære aminer, neutralt pH og over 130°C (Sindelar and Milkowski, 2012). I pH intervallet relevant for bacon, vil ascorbat reagere hurtigere end sekundære aminer med nitrosylerende forbindelser og derved mindske dannelsen af nitrosaminer (Skibsted, 2011). Nyere undersøgelser har dog vist, at nitrosaminerne også dannes uden opvarmning og ved lavere temperaturer end 130°C. Herrmann et al. (2014a) har undersøgt mængden af N-nitrosoaminer i dansk og udenlandsk bacon. Der skelnes mellem flygtige N-nitrosoaminer, som alle er carcinogene og ikke-flygtige N-nitrosoaminer, som måske er carcinogene. De finder ganske små

mængder af de forskellige flygtige N-nitrosaminer i både dansk og belgisk bacon inden det bliver stegt (0,07 – 1,4 µg/kg). Ved pandestegning af bacon, øges mængden af N-nitrosaminerne N-nitroso-pyrrolidine og N-nitroso-piperidine signifikant, mens indholdet af andre N-nitrosaminer falder. Dette skyldes måske tilberedningsmetoden, hvor der kan ske fordampning af nogle af nitrosaminerne ved stegningen.

I undersøgelsen er der også analyseret andre nitritsaltede kødprodukter fra Danmark og Belgien, men selvom nitrittilsætningen formodentlig er højere i de belgiske produkter afspejler dette sig ikke i mængden af nitrosaminer fundet i produkterne. Dannelsen af nitrosaminer i kødprodukter kan være påvirket af mange faktorer. Herrmann et al. (2014b) har i et kontrolleret multifaktor-forsøg vist, at øget nitrittilsætning øger dannelsen af visse nitrosaminer. Ligeledes har de vist, at stegning øger dannelsen af nogle nitrosaminer mens tilsætning af erythorbat (ascorbat analog) mindsker dannelsen af nitrosaminer. Større mængder erythorbat - op til 1000 mg/kg reducerer dannelsen af nitrosaminer yderligere.

## Konklusion

Der er de seneste 10-20 år publiceret en lang række undersøgelser om nitrit/nitrat, men de har ikke medført væsentlige ændringer eller tilføjelser til den eksisterende viden om nitrit/nitrats omdannelse eller antimikrobielle effekt i forarbejdede kødprodukter. Som noget nyt er nitrit nu blevet undersøgt for dens gavnlige fysiologiske rolle af bl.a. kredsløbsregulering hos mennesker og dyr. Men det er stadig nede-nævnte konklusioner der er gældende:

- For kogte kødprodukter er der generelt lavt indhold af restnitrit, som i større opgørelser påvises i området fra 0,1 ppm op til maksimalt 20-30 ppm.
- Nitrit i kødprodukter fordeles i forskellige fraktioner (binding til pigment, protein og fedt), men fraktionen med størstedelen af den tilsatte nitrit kendes ikke.
- Den antimikrobielle effekt af nitrit skyldes afledte forbindelser og virkningen er koncentrationsafhængig
- Den mest effektive hæmning ses for *Clostridium* og *L. monocytogenes* og i mindre grad for *Salmonella*.
- I bacon og fermenterede pølser skyldes nitrats omdannelse til nitrit primært mikrobiel aktivitet.
- I bacon skyldes nitrits oxidation til nitrat hovedsageligt kemisk omdannelse.
- Nitrosaminer kan dannes fra rest-nitrit ved stegning af bacon, men mængden reduceres ved tilsætning af ascorbat/ascorbinsyre.
- Der er udviklet nye følsomme metoder til detektion af nitrosaminer.

## Referencer

- Adamsen, C.E., Møller, J.K.S., Laursen, K., Olsen, K., and Skibsted, L.H. (2006). Zn-porphyrin formation in cured meat products: Effect of added salt and nitrite. *Meat Sci.* *72*, 672–679.
- Aksu, M.İ., Kaya, M., and Ockerman, H.W. (2005). Effect of modified atmosphere packaging, storage period, and storage temperature on the residual nitrate of sliced-pastırma, dry meat product, produced from fresh meat and frozen/thawed meat. *Food Chem.* *93*, 237–242.
- Andersen, H.J., and Skibsted, L.H. (1992). Kinetics and Mechanism of Thermal Oxidation and Photooxidation of Nitrosylmyoglobin in Aqueous Solution. 1741–1750.
- Anonymous (2003). The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *EFSA J.* *14*, 1–31.
- Bahra, M., Kapil, V., Pearl, V., Ghosh, S., and Ahluwalia, a (2012). Inorganic nitrate ingestion improves vascular compliance but does not alter flow-mediated dilatation in healthy volunteers. *Nitric Oxide* *26*, 197–202.
- Barbieri, G., Bergamaschi, M., and Franceschini, M. (2013). Kinetics of nitrite evaluated in a meat product. *Meat Sci.* *93*, 282–286.
- Baron, C.P., Møller, J.K.S., Skibsted, L.H., and Andersen, H.J. (2007). Nitrosylmyoglobin as antioxidant--kinetics and proposed mechanism for reduction of hydroperoxides. *Free Radic. Res.* *41*, 892–902.
- Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J.P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* *233*, 229–240.
- Bekhit, A.E.-D. a., Hopkins, D.L., Fahri, F.T., and Ponnampalam, E.N. (2013). Oxidative Processes in Muscle Systems and Fresh Meat: Sources, Markers, and Remedies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* *12*, 565–597.
- Björne, H., Weitzberg, E., and Lundberg, J.O. (2006). Intra-gastric generation of antimicrobial nitrogen oxides from saliva--physiological and therapeutic considerations. *Free Radic. Biol. Med.* *41*, 1404–1412.
- Bouret, T.J., Porwollik, S., McClelland, M., Zhao, R., Greco, T., Ischiropoulos, H., and Vázquez-Torres, A. (2008). Nitric oxide antagonizes the acid tolerance response that protects *Salmonella* against innate gastric defenses. *PLoS One* *3*, e1833.
- Cassens, R.G. (1997). Composition and safety of cured meats in the USA. *Meat Sci.* *59*, 561–566.
- Castiglione, N., Rinaldo, S., Giardina, G., Stelitano, V., and Cutruzzolà, F. (2012). Nitrite and nitrite reductases: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* *17*, 684–716.

- Grever, A., and Ruiter, A. (2001). Prevention of Clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite - a review. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 165–169.
- Hammes, W.P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiol.* 29, 151–156.
- Hayes, J.E., Canonico, I., and Allen, P. (2013). Effects of organic tomato pulp powder and nitrite level on the physicochemical, textural and sensory properties of pork luncheon roll. *Meat Sci.* 95, 755–762.
- Van Hecke, T., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Vossen, E., Van Camp, J., and De Smet, S. (2014). Nitrite curing of chicken, pork, and beef inhibits oxidation but does not affect N-nitroso compound (NOC)-specific DNA adduct formation during in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1980–1988.
- Herrmann, S.S., Duedahl-Olesen, L., and Granby, K. (2014a). Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control* 1–7.
- Herrmann; S.S., Granby, K. & Duedahl-Olesen, L. (2014b) Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved meat. Accepted for publication in *Food Chemistry*.
- Honikel, K.O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 78, 68–76.
- Horsch, A.M., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., Niebuhr, S.E., Larson, E.M., Lavieri, N. a, Ruther, B.L., and Wilson, L. a (2014). The effect of pH and nitrite concentration on the antimicrobial impact of celery juice concentrate compared with conventional sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. *Meat Sci.* 96, 400–407.
- Hospital, X.F., Hierro, E., and Fernández, M. (2014). Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. *Food Res. Int.* 62, 410–415.
- Jolley, P.D. (1979). The accumulation of unacceptable high levels of nitrite in vacuum packed back bacon. *J. Food Technol.* 14, 81–87.
- Keto-Timonen, R., Lindström, M., Puolanne, E., Niemistö, M., and Korkeala, H. (2012). Inhibition of toxigenesis of group II (nonproteolytic) *Clostridium botulinum* type B in meat products by using a reduced level of nitrite. *J. Food Prot.* 75, 1346–1349.
- Lee, S.H., Cassens, R.G., Winder, W.C., and Fennema, O.R. (1978). Factors affecting the formation of nitrate from added nitrite in model systems and cured meat products. *J. Food Sci.* 43, 673–676.
- Maia, L.B., and Moura, J.J.G. (2014). How Biology Handles Nitrite. *Chem. Rev.* 114, 5273–5257

- McClure, B.N., Sebranek, J.G., Kim, Y.H., and Sullivan, G. a. (2011). The effects of lactate on nitrosylmyoglobin formation from nitrite and metmyoglobin in a cured meat system. *Food Chem.* *129*, 1072–1079.
- Munk, M.B., Huvaere, K., Van Bocxlaer, J., and Skibsted, L.H. (2010). Mechanism of light-induced oxidation of nitrosylmyoglobin. *Food Chem.* *121*, 472–479.
- Mühlig, A., Kabisch, J., Pichner, R., Scherer, S., and Müller-Herbst, S. (2014). Contribution of the NO-detoxifying enzymes HmpA, NorV and NrfA to nitrosative stress protection of *Salmonella Typhimurium* in raw sausages. *Food Microbiol.* *42*, 26–33.
- Møller, J.K.S., and Skibsted, L.H. (2004). Mechanism of nitrosylmyoglobin autoxidation: temperature and oxygen pressure effects on the two consecutive reactions. *Chemistry* *10*, 2291–2300.
- Møller, J.K.S., Bertelsen, G., and Skibsted, L.H. (2002). Photooxidation of nitrosylmyoglobin at low oxygen pressure . Quantum yields and reaction stoichiometries. *60*, 421–425.
- Nun, M.T., Gonza, D., Osburn, W.N., Hardin, M.D., Longnecker, M., Garg, H.K., Bryan, N.S., and Keeton, J.T. (2012). Survey of Residual Nitrite and Nitrate in Conventional and Organic/ Natural/Uncured/Indirectly Cured Meats Available at Retail in the United States.
- Sindelar, J.J., and Milkowski, A.L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* *26*, 259–266.
- Sindelar, J.J., Cordray, J.C., Olson, D.G., Sebranek, J.G., and Love, J. (2007). Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, no-nitrate/nitrite-added commercial hams, bacons, and frankfurters. *J. Food Sci.* *72*, S551–9.
- Sindler, A.L., DeVan, A.E., Fleenor, B.S., and Seals, D.R. (2014). Inorganic nitrite supplementation for healthy arterial aging. *J. Appl. Physiol.* *116*, 463–477.
- Skibsted, L.H. (2011). Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* *24*, 176–183.
- Sullivan, G. a., Jackson-Davis, A.L., Schrader, K.D., Xi, Y., Kulchayawat, C., Sebranek, J.G., and Dickson, J.S. (2012). Survey of naturally and conventionally cured commercial frankfurters, ham, and bacon for physio-chemical characteristics that affect bacterial growth. *Meat Sci.* *92*, 808–815.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., and Berdagué, J.-L. (2013). Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food Chem.* *139*, 432–438.

Villaverde, A., Ventanas, J., and Estévez, M. (2014). Nitrite promotes protein carbonylation and Strecker aldehyde formation in experimental fermented sausages: Are both events connected? *Meat Sci.* *98*, 665–672.

Vossen, E., Doolaeghe, E.H. a, Moges, H.D., de Meulenaer, B., Szczepaniak, S., Raes, K., and de Smet, S. (2012). Effect of sodium ascorbate dose on the shelf life stability of reduced nitrite liver pates. *Meat Sci.* *91*, 29–35.

White, J.W. (1975). Relative Significance of Dietary Sources of Nitrate and Nitrite. 1971–1976.

Xi, Y., Sullivan, G. a., Jackson-Davis, A.L., Zhou, G.H., and Sebranek, J.G. (2012). Effects of natural antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* and on chemical, physical and sensory attributes of naturally-cured frankfurters. *Meat Sci.* *90*, 130–138.

Y, R.C., Joannou, C.L.Y., Y, X.C., Torres, C., Martinez, Y., Maraj, S.R., and Hughes, M.N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *1411*.



## BILAG 1

## Ord- og forkortelsesliste

<i>Ascorbat</i>	reduceret form af dihydroxycarboxylsyre der driver omdannelsen af nitrit til NO under saltning
<i>Dehydroascorbat</i> <i>dMbFe(II)NO</i>	oxideret form af dihydroxycarboxylsyre, der ikke er aktiv overfor nitrit nitrosylmyochrom, det pink kødpigment som dannes fra nitrosylmyoglobin ved en mild varmebehandling af kødproduktet
<i>Erythorbat</i> <i>Hæm-Fe</i>	struktur isomer af ascorbat Jern bundet i porphyrinring, som tilsammen kaldes hæm-Fe, er bl.a. ansvarlig for fysiologisk funktion af myoglobin og hæmoglobin
<i>LOOH</i>	lipidhydroperoxid, benævnt primære oxidationsprodukt som er smags og lugtfri med ustabil og vil forårsage harskning
<i>MbFe(II)</i>	deoxymyoglobin, det lilla kødpigment som findes i midten af fersk kød og på overfladen af vakuumpakket kød
<i>MbFe(II)NO</i>	nitrosylmyoglobin, det røde kødpigment der dannes i (nitrat) nitritsaltet kød
<i>MbFe(II)O<sub>2</sub></i>	oxymyoglobin, det røde pigment der findes på overfladen af fersk kød i atmosfærisk luft eller i høj O <sub>2</sub> MA pakninger
<i>MbFe(III)</i>	metmyoglobin, den oxiderede gråbrune form af kødpigmentet som dannes ved nedbrydning af de røde varianter af kødpigmentet
<i>myoglobin</i>	det primære farvegivende pigment i afblødte muskler, kan via hæm-Fe delen binde forskellige små ligand molekyler og derved ændre farve
<i>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i>	salpetersyrling anhydrid, kan give NO via henfaldsreaktion
<i>NO</i>	nitrogen(II)oxid,
<i>NO<sub>2</sub></i>	nitrogen(IV)oxid,
<i>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></i>	nitrit anion
<i>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	nitrat anion
<i>ONOO<sup>-</sup></i>	peroxynitrit, struktur isomer af nitrat dannet ud fra NO og aktiverede O <sub>2</sub> species, kan forårsage harskning eller henfalde til nitrat
<i>Restnitrit definition</i>	nitritmængden, der måles ved kemisk analyse efter fremstilling af kødprodukt.

**BILAG 2****Tabeller****Tabel B1.** Restnitrit målt i konventionelle kødprodukter tilsat nitrit og/eller nitrat i henhold til amerikansk lovgivning. Værdier er fremkommet som gennemsnit for prøver udtaget i 5 større byer i USA.

Produkt kategori	Kødprodukter inkluderet:	Antal prøver	Restnitrit (ppm)		
			Gennemsnit	Minimum	Maksimum
Saltede, tørrede pølser (rå)	Lufttørrede pølser og chorizo	n=40	0,66	0,0	10,0
Saltede pølser (kogt)	Bologna, frankfurter, middagspølser	n=59	7,60	0,1	29,3
Fermenterede pølser (kogt)	peperoni, snack pølser	n=52	0,84	0,0	26,7
Helmuskel lagesaltet bacon (rå)	bacon	n=20	7,26	0,2	36,5
Helmuskel lagesaltet skinke (kogt)	skinke, varmebehandlet bacon, pastrami, corned beef	n=97	7,46	0,0	27,6
Helmuskel tørsaltet skinke (rå)	tørsaltet landskinke, tørsaltet bacon og prosciutto	n=38	1,56	0,0	16,2

**Tabel B2.** Restmængde af nitrit målt i økologiske/natur-saltede kødprodukter tilsat nitrit og/eller nitrat i henhold til amerikansk lovgivning. Værdier er fremkommet som gennemsnit for prøver udtaget i 5 større byer i USA.

Produkt kategori	Kødprodukter inkluderet:	Antal prøver	Restnitrit (ppm)		
			Gennemsnit	Minimum	Maksimum
saltede, tørrede pølser (rå)	Lufttørrede pølser og chorizo	n=24	0,7	0,0	194,0
saltede pølser (kogte)	Bologna, frankfurter, middagspølser	n=30	5,7	0,1	35,4
fermenterede pølser (kogte)	peperoni, snack pølser	n=24	0,1	0,0	0,5
Helmuskel lagesaltet bacon (rå)	bacon	n=18	8,3	0,1	36,0
Helmuskel lagesaltet skinke (kogt)	skinke, varmebehandlet bacon, pastrami, corned beef	n=44	6,6	0,1	22,1
Helmuskel tørsaltet skinke (rå)	tørsaltet landskinke, tørsaltet bacon og prosciutto	n=24	2,1	0,0	28,9



**Tabel B3.** Måling af pH, restnitrit og restnitrat i kommercielt tilgængelige kødprodukter fremstillet efter forskellige principper for nitrit/nitrat tilsætning (Sullivan et al. 2012)

Produkttype	pH	Restnitrit (ppm)	Restnitrat (ppm)
<b>Frankfurter pølser</b>			
Alternativ nitritkilde, (n=8)	5,64-6,17	4,1-60,1	19,6-57,8
Helt nitrit fri, (n=2)	6,18-6,20	2,0	4,6-18,0
Konventionel, (n=2)	5,88-5,94	6,9-7,6	31,3-41,6
<b>Kogt skinke</b>			
Alternativ nitritkilde, (n=7)	5,78-6,12	4,2-10,7	7,3-19,9
Konventionel, (n=4)	5,91-6,12	5,0-12,0	15,6-24,8

**Tabel B4.** Måling af pH, restnitrit og restnitrat for 5 forskellige typer af kødprodukter fremstillet med alternativ nitratkilde (A-D) eller tilsat NaNO<sub>2</sub> (E) (Sindelar et al., 2007)

Produkt	Kogt skinke	pH	Restnitrit (ppm)	Restnitrat (ppm)
Brand A	Nitritfri	6,03	5,92	17,6
Brand B	Nitritfri	6,13	4,91	19,9
Brand C	Nitritfri	6,21	8,15	11,4
Brand D	Nitritfri	6,43	9,23	10,0
Brand E	Med nitrit	6,47	29,67	20,0

Produkt	Middagspølser	pH	Restnitrit (ppm)	Restnitrat (ppm)
Brand A	Nitritfri	5,70	6,27	13,1
Brand B*	Nitritfri*	5,85	1,43	6,8
Brand C	Nitritfri	6,08	7,71	41,3
Brand D	Nitritfri	6,04	8,07	44,4
Brand E	Med nitrit	5,94	2,19	31,7

\*Brand B i middagspølser var angiveligt ikke tilsat nogen form for nitrit- eller nitratkilde.