

1. INTRODUKTION

Denne rapport er udarbejdet på anmodning af virksomheden Hanegal A/S. Den omhandler anvendelsen af nitrit i fødevarer, herunder de teknologiske fordele og de sundhedsmæssige aspekter ved nitrøse forbindelser i fødevarer og vurderer på baggrund af faktuelle oplysninger fra videnskabelige studier om nitritsaltning, fra en sikkerhedsmæssig vinkel og med særlig fokus på *Clostridium botulinum*, er en nødvendighed.

Rapporten er udarbejdet af Teknologisk Institut, der er et uvildigt konsulentfirma.

2. NATRIUM NITRIT (NaNO₂)

Natrium nitrat (NaNO₃) og natrium nitrit (NaNO₂) anvendes i forbindelse med saltning af en række levnedsmiddelprodukter fordi egenskaberne for disse tilsætningsstoffer er mangfoldige. Således stabiliserer de den røde farve i kødprodukter, de inhiberer væksten af visse mikroorganismer og de bidrager til smagsudviklingen. Når anvendelsen af nitrat og nitrit i fødevarer i næsten 40 år har været kontroversiel skyldes det påvisningen af, at nitritkonservering medfører dannelse af nitrosaminer, der er kraftigt cancerogene¹.

Når virkningen af nitrit i levnedsmidler skal belyses er nedenstående punkter af interesse:

- Nitrits kulørdannende egenskaber
- Nitrits konserverende egenskaber
- Dannelse af cancerogene forbindelser

Kulørdannende egenskaber

Det er almindelig kendt, at natrium nitrat ved bakteriel nedbrydning reduceres til nitrit, hvorefter nitrit, enten kemisk eller bakterielt, kan reduceres til kvælstofilter eller frit nitrit (N₂). Kvælstofilterne binder sig til det røde muskel- og blodfarvestof myoglobin og hæmaglobin under dannelse af nitroso-myoglobin, der er rødt. Ved kogning eller saltning denatureres denne forbindelse til en forbindelse der stadig er rød, hvorimod kød saltet i rent salt (NaCl) eller kogt kød bliver gråt. Nitroso-myoglobinet er altså varmestabil men meget oxidationsfølsomt, hvorfor nitritkonserverede kødvarer beskyttes mod atmosfærens ilt ved fx vakuumpakning.

Den nødvendige mængde af nitrit i kødvarer for en kortvarig kulørdannelse er påvist til ca. 5 ppm NaNO₂ (5 mg/kg kød)² mens en koncentration på ca. 20 ppm anses for nødvendig for at opnå en farvestabilitet, der er acceptabel i kommerciel fødevarerproduktion. Nitritkoncentrationer på ca. 50 ppm er nødvendige for at opnå en tilfredsstillende smagsudvikling^{2,3}.

Konserverende egenskaber

Nitrit additivet virker hæmmende på mange sygdomsfremkaldende og holdbarhedsbegrænsende bakterier. Men når nitritsaltning gennem årene har været anvendt har det været med særlig fokus på stoffets evne til at hæmme *Cl. botulinum*. Frygten for forekomst og vækst af *Cl. botulinum* i fødevarer hænger sammen med bakteriens produktion af et exotoxin, der selv i ganske små mængder er dødelig for mennesker. Tilsætning af nitritsalt er således en billig og effektiv metode til eliminering af *Cl. botulinum* og bidrager som nævnt samtidig til farvestabiliteten.

Virkningen af nitrit er koblet til forekomsten af NaCl, vandaktiviteten, pH og varmebehandlingen. Effekten af ikke varmebehandlet nitrit er pH afhængig og relativt høje koncentrationer er nødvendige for at hindre vækst ved neutrale pH værdier. Derimod er det påvist, at når nitrit tilsættes inden varmebehandlingen er langt mindre koncentrationer af nitrit tilstrækkeligt til at hindre udspiring og effekten er samtidig pH uafhængig^{7,8}. Princippet omtales som *Perigo-effekten*. Grænserne for vækst af sporer af *Cl. botulinum* ved varierende pH-værdier, saltkoncentrationer og nitritkoncentrationer og de indbyrdes forhold af disse parametre er kendte⁴ og gives i tabel 1. Det ses af resultaterne, at ved lavere vandaktivitet og lavere pH reduceres behovet fra tilsætning af nitrit. Det skal endvidere bemærkes, at forsøgene af udført under temperaturforhold der er optimale for vækst (35 °C). Ved lavere temperaturer hæmmes væksten yderligere hvorfor den nødvendige koncentration under disse forhold vil kunne reduceres yderligere. Derudover skal tallene i tabel 1 ses i lyset af det i praksis naturligt forekommende indhold af *Cl. botulinum*, idet det er påvist, at den nødvendige mængde af nitrit for at hindre toksindannelse afhænger af sporekontaminationsgraden. I et forsøg med hakket, varmebehandlet svinekød med et salt i vand forhold på 5,16, var et indhold på 300 ppm nitrit nødvendigt for at hindre toksindannelse ved en podning på 10⁶ sporer/g, mens det ved podning med 10² sporer/g ikke var nødvendigt at tilsætte nitrit overhovedet⁵. Dette skal ses i lyset af, at det gennemsnitlige indhold i kødprodukter er estimeret til under 0,01/gram, jf. nedenstående.

Mekanismen af nitrits effekt er kortlagt⁶ og omfatter blokering af to vitale punkter i spiringsprocessen af anaerobe sporer.

Tabel 1: Effekt af varierende indhold af NaCl, NaNO₃ og pH overfor *Cl. botulinum* type A, B, E og F ved 35 °C⁴. Tallene angiver den højeste nitritkoncentration i ppm, ved hvilken *Cl. botulinum* formerede sig ved forskelligt pH. (-: ingen vækst ved 50 ppm NaNO₃)

NaCl % i vand	vandaktivitet, Aw	pH 6,2	pH 6,0	pH 5,8	pH 5,6
0	1,0	300	300	250	150
1	0,994	300	250	250	150
2	0,989	300	250	200	50
3	0,983	250	250	150	-
4	0,977	200	150	100	-
5	0,971	50	50	50	-
6	0,965	50	-	-	-

Dannelse af cancerogene forbindelser

Når nitrit reagerer med sekundære og tertiære aminer dannes nitrosaminer. Mere end 100 af de 130 testede nitrosaminer vides at været cancerogene i samtlige dyrearter, de er afprøvet i⁹. Der dannes meget små mængder (måles i ppb), men nitrosaminer virker cancerogent i så små mængder, at det ikke er lykkedes at fastsætte en "no level effect"¹⁰ og der er derfor ikke fastsat en nedre grænseværdi for carcinogenitet.

Dannelsen af nitrosaminer ud fra nitrit og/eller kvælstofilter sker ved lavere pH mens mange bakterierarter, herunder *E. coli*, *Proteus* og *Serratia* der er almindeligt forekommende i kødvarer, spontant kan danne nitrosaminer ud fra sekundære aminer ved neutrale pH værdier. Undersøgelser af nitrosamin i kødvarer konserveret med nitrit afslører indhold af nitrosaminer fra meget lave niveauer (tæt på nul) og op til ca. 80 ppb^{10,11,12}.

3. FOREKOMST OG VÆKST AF CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Økologi

Botulisme skyldes visse stammer af *Cl. botulinum*, en gram-positiv, anaerob sporedannende stavbakterie. Syv typer er kendte: A, B, C, D, E, F and G. Type A, B og E forårsager botulisme hos mennesker mens de øvrige primært relateres til botulisme hos dyr. For alle tre typer gælder, at de primært findes i vand og dermed først og fremmest udgør en risiko i fisk og skaldyr. Langt de fleste tilfælde af human botulisme er således knyttet til indtag af fiskeprodukter. Dog kan alle tre typer findes i jordprøver og risikoen for kontamination i vegetabiliske og animalske fødevarer er derfor til stede. Med hensyn til den overordnede forekomst af *Cl. botulinum* i jord er det estimeret, at antallet pr. gram sandsynligvis er under 1.

Type A findes oftere i jordprøver i det vestlige USA og type B i jordprøver i øststaterne og i Europa. Type E sporer findes primært i sedimentet i havmiljø, især ved kysterne, og anses i Danmark som en typisk marin bakterie¹³. Den adskiller sig desuden fra type A og B ved sine non-proteolytiske egenskaber som betyder, at en eventuel vækst ikke vil kunne erkendes sensorisk ved en afvigende lugt. Dermed udgør type E en særlig risiko og er også den type, der har forårsaget flest humane tilfælde i Danmark.

Temperaturkrav

Nogle non-proteolytiske type E stammer kan danne toksin helt ned til 3,3 °C selv om produktionen sker meget langsomt. Nedre vækstgrænse for de proteolytiske stammer A og B angives til hhv. 10 og 12,5 °C. Optimum for toksinproduktion ligger for type E på ca. 20-25 °C og for A og B typerne omkring 30 – 37 °C. I kødprodukter, hvor type E ikke anses for en stor risikofaktor, vil man ved en overholdelse af gældende lovgivning på 5 °C i kølekæden med stor sikkerhedsmargin kunne undgå vækst af *Cl. botulinum* uanset kødproduktets øvrige konserverende egenskaber.

Med hensyn til varmeresistens er det veldokumenteret, at type A og B sporer er betydeligt mere varmeresistente end type E sporer. Varmeresistensen er som for de

Øvrige inhiberende faktorer afhængige af de faktuelle forhold i produktet, men også den vegetatives celled "historie" har betydning for sporenes varmeresistens. De omtrentlige D-værdier for type A, B og E fremgår af tabel 2, hvoraf det ses, at de nødvendige varmebehandlinger for eliminering af sporer af type A og B vil betyde en autoklavering af produktet, hvilket oftest er uønsket.

Salt og pH.

Cl. botulinum type A og B kan danne toksin ved vandaktiviteter ned til 0,93-0,94 svarende til ca. 10% salt i vandfasen eller 50% saccharose. Ved over 10% salt kan *Cl. botulinum* ikke formere sig. Type E er mere følsom for salt, hvor vækstgrænsen sker ved ca. 4% salt. pH hæmmer generelt væksten af bakterier og ved pH under 4,5 standser væksten af *Cl. botulinum* helt – også under fravær af alle andre inhiberende principper, hvilket betyder, at ved stigende saltindhold vil højere pH også være hæmmende.

Ilt

Ilt er stærkt toksisk for *Cl. botulinum*, men vækst kan finde sted selvom ilt diffunderer fra omgivelserne og ind i fødevarer, blot iltspændingen holdes under vækstgrænsen som følge af miljøets egen reducerende evne, eventuelt suppleret med en sænkning af redoxpotentialet forårsaget af vækst af andre mikroorganismer. Den praktiske erfaring fra fødevarerindustrien er derfor, at vakuumpakning af levnedsmidler ikke øger risikoen for vækst af Clostridier betydeligt.

Konkurrenceflora

Forekomst og vækst af fx laktobaciller der reducerer pH som følge af syreproduktion virker inhiberende på *Clostridium botulinum*. Også vækst af nisinproducerende lactis streptokokker og vækst af *E. coli* og fækæle streptokokker hæmmer væksten af *Clostridium botulinum*,

Tabel 2: Sammenligning af *Cl. botulinum* stammer

	Serologisk type		
	A	B	E
Proteolytisk	+	+	-
Primære habitat	jord	jord	vand
Min. vækst temperatur	10 °C	10 °C	3,3 °C
Max. vækst temperatur	50 °C	50 °C	45 °C
Min. pH for vækst	4,7	4,7	4,8
Min. Aw for vækst	0,94	0,94	0,97
D-værdi for endosporer	D ₁₁₀ =2.72-2.89	D ₁₁₀ =1.34-1.37	D ₈₀ =0.80
Max. NaCl for vækst	10%	10%	4-5%
Primære forekomst i fødevarer	vegetabilier/kød	vegetabilier/kød	fisk

4. RISIKOVURDERING AF *CL. BOTULINUM*

Vurderingen af behovet for nitrittilsætning til fødevarer som en indbygget sikkerhedsfaktor mod toksindannelse af *Cl. botulinum* bør indeholde to hovedpunkter:

1. Hvor stor er risikoen for dannelse af cancerogene nitrosaminer ved nitritsالتning?
2. Hvor stor er risikoen for toksindannelse fra *Cl. botulinum* i produktet?

Som omtalt ovenfor kan det ifølge en række videnskabelige undersøgelser med stor sikkerhed konkluderes, at tilsætning af nitrit vil medføre dannelse af nitrøse aminer, hvoraf størstedelen er cancerogene i ekstremt små mængder. Selvom indholdet af nitrosaminer i fødevarer er små må tilsætning af nitrit isoleret set vurderes som uønsket og nitrittilsætning bør derfor undgås.

Risikoen for dannelse af nitrosaminer skal i denne sammenhæng vurderes i relation til risikoen for dannelse af exotoksiner fra *Cl. botulinum*. Ved en risiko for toksindannelse kan nitrittilsætning således retfærdiggøres mens nitrittilsætning er unødvendig i tilfælde hvor risikoen for vækst af *Cl. botulinum* ikke er til stede. Med andre ord bør nitrit udelades i fødevareproduktionen i de tilfælde, hvor forekomsten af *Cl. botulinum* er lig nul og/eller hvor vækstkravene ikke er opfyldt.

Prævalensen af Cl. botulinum i kød

Det er karakteristisk i statistikker over botulisme, at årsagen i de fleste tilfælde skyldes hjemmelavet mad, der direkte eller indirekte er jordforurenede. I USA var i perioden 1899-1967 langt den hyppigste årsag grøntsager, frugt og krydderier mens kød, fjerkræ og mælk kun sjældent gav anledning til udbrud. Det samme forhold afspejles i Danmark hvor hjemmelavede fiskeretter har været den primære årsag til botulisme. Fælles for de beskrevne udbrud er, at adskillelsen mellem urene og rene arbejdsprocesser under private forhold har været mangelfuld og medført kontaminering af "urene" råvarer til "rene" færdigvarer. Desuden har en grov tilsidesættelse af almindelige konserveringsprincipper som varmebehandling og temperaturoppbevaring fundet sted. Prævalensen af *Cl. botulinum* i kød og fjerkræ er ekstremt lav. Et summary af publicerede data i en 14 års periode over botulinum sporer afslører et gennemsnitligt indhold af sporer på under 0,01/g¹⁵.

Forebyggelse mod vækst af Cl. botulinum

På trods af den meget ringe forekomst af sporer i kød har *Cl. botulinum* alligevel været genstand for betydelige overvejelser i forbindelse med sous-vide¹ produktion af kød, fordi denne metode giver gunstige forhold for sporespiring under opvarmningen og derfor kan udgøre en reel risiko for botulisme med mindre der udøves effektive konserveringsprincipper i produktionen og i distributionen. I sous vide produktion af kød destrueres stort set alle vegetative celler mens sporerne overlever. Produktet har en meget lav iltspænding og er uden konkurrenceflora i et neutralt pH område. Forholdene er således ideelle for vækst af sporer med mindre temperatur og tidsforhold monitoreres omhyggeligt. Netop styringen af produktion og distribution er baggrunden for metodens succes og stigende udbredelse.

¹ Sous-vide er betegnelsen for vakuumerede fødevarer, der opvarmes i emballagen, nedkøles og opbevares på køl inden genopvarmning.

Den kommercielle sous-vide produktion af såvel grøntsager som kødprodukter i Europa og USA i dag dokumenterer, at det er muligt at producere tilberedte fødevarer uden tilsætning af nitrit. Det er et uomgængeligt krav, at produktionen *skal* indrettes efter de såkaldte ”hurdle principper” eller ”combined methods for Food Preservation”. Denne teknologi er betegnelsen for en bevidst anvendelse af kombinationer af kendte konserveringsprincipper som vandaktivitet, pH, temperatur osv. hvis synergistiske effekt medfører at vækst ikke kan finde sted.

I et 3-årigt forskningsprogram^{16,17} vedr. fødevarekonservering støttet af EU-kommissionen viste hurdle teknologien at en bevidst kombination af kendte konserveringsprincipper i sig selv er tilstrækkeligt til at producere sikre fødevarer. I tabel 3 illustreres hurdle effekten af vandaktivitet, pH og temperatur for *Cl. botulinum* type A, B og E. Den laveste vandaktivitet ved hvilken der forekommer vækst er væsentligt højere ved lav end ved høj temperatur, og er næsten pH-uafhængig i området 6-8, mens pH 5 eller 9 udelukker vækst. Der kan altså ikke fastsættes specifikke grænser for de enkelte konserveringsprincipper, da der er tale om multifaktorielle fænomener og sikkerheden må vurderes i denne sammenhæng.

Dette illustreres yderligere af japanske undersøgelser af nudel suppe, hvori det afslørede for type A og B sporer, at der ikke fandt toksin produktion sted ved (1) pH 6.5, 4% NaCl og 20 °C, (2) pH<5.0, 1% NaCl og 30 °C, (3) pH < 5.5, 3% NaCl og 30 °C og (4) pH<6.0, 4% NaCl og 30 °C¹⁴. Disse oplysninger skal sammenholdes med data i tabel 2, hvoraf det ses, at de enkelte parametre i de japanske studier ligger inden for vækstkravene, men at kombinationen udelukker vækst.

Når disse forhold tages i betragtning skal det isoleret set bemærkes, at opbevarings-temperaturen af færdigvaren alene kan medvirke til at sikre produktet. Type A og B sporer, der som nævnt oftest er relateret til kødvarer, vokser ikke ved temperaturer under 10 °C, hvorfor en overholdelse af kølekæden alene vil eliminere risikoen for vækst af type A og B. Med hensyn til type E må det anses som tvivlsomt, om den overhovedet er relevant betragte som en risiko i kød, og skulle det være tilfældet vil det være i et ekstremt lille omfang. Af tabel 3 ses en vækst ved 10 °C og det er rapporteret, at denne type kan vokse helt ned til 3,3 °C, men det kræver optimale vækstforhold – herunder et Aw over 0,99 ved neutralt pH og selv under disse forhold vil nølefasen være meget lang. Ved industriel forarbejdning af kødvarer begrænses vækstforholdene, hvorfor risikoen for toksindannelse fra type E må vurderes som urealistisk, såfremt almindelige hygiejne- og konserveringsprocedurer overholdes.

Tabel 3. Hurdle effekt for *Cl. botulinum*¹⁸. Tabellen viser antal dage før vækst. Et tomt felt indikerer ingen vækst efter 4 måneder.

Temp.	pH	Type A							Type B							Type E						
		Aw							Aw							Aw						
		0.997	0.	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94	0.997	0.	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94	0.997	0.	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94
10	5																					
	6														9	14						
	7														7	9						
	8														8							
	9																					
20	5																					
	6	5	5	5	16			4	9	9					2	2	7					
	7	5	5	5	5			2	2	4	9				1	2	2	7				
	8	5	5	5	9			2	2	4	14				1	2	2					
	9																					
30	5																					
	6	2	5	5	7	12		2	2	3	9				1	1	2					
	7	2	1	1	7	9	12	1	1	2	3	9	14		1	1	1	2				
	8	1	1	5	7	9		1	1	2	4	14			1	1	1	2				
	9																					
40	5																					
	6	1	1	3	9	9		1	2	2	3	14			3	1						
	7	1	1	1	5	5	5	1	1	1	2	3	9	17	1	1	1					
	8	1	1	1	5	5	5	1	1	1	2	9	14		1	17	1	7				
	9																					

5. IMPLEMENTERING AF HACCP

Som et vigtigt og relativt nyt led i hurdleteknologien er indførelse af et HACCP system i fødevarer-virksomheder. HACCP står for Hazard Analysis of Critical Control Points og er et forebyggende, dokumenterbart og verificerbart kvalitetsstyringssystem, der til enhver tid sikrer, at virksomheden forebygger enhver tænkelig hazard (fx *Cl. botulinum*) ved at indbygge kritiske grænser (fx Aw eller temperaturopbevaring) i produktionen og dokumenterer, at disse grænser overholdes. Implementering af HACCP er obligatorisk for alle fødevarer-virksomheder i EU, jf. Direktiv 91/118/EEC og i 1993 blev HACCP ligeledes et krav for international handel i GATT (nu WTO) udstedt af FAO/WHO Codex Alimentarius Commission¹⁹.

Det betyder, at der i al produktion af fødevarer skal forebygges mod kemiske og biologiske risici samt mod fremmedlegemer. Blandt disse *hazards* er Clostridier og nitrosaminer. I risikovurderingen skal risikoen for en eventuel forekomst af de pågældende hazards tages i betragtning. Det er klart, at såfremt nitrit tilsættes i fødevarerproduktion tilføjes en hazard (nitrosaminer), der hygiejnemæssigt kun kan forsvares såfremt risikoen for vækst af Clostridier eller andre patogene bakterier er større. Inhibering af mikroorganismer er som ovenfor beskrevet betinget af de specifikke vækstforhold i produkterne. For så vidt angår *Cl. botulinum* er muligheden for vækst af type A og B ikke til stede ved temperaturer under 10 °C, mens type E kan vokse ned til 3,3 °C, men næppe udgør en reel risiko pga. dens marine tilhørsforhold og begrænsede mulighed for vækst ved reduceret Aw.

Såfremt HACCP programmet inddrager muligheden for forekomst af *Cl. botulinum* og produktionen tilrettelægges så vækstforholdene reduceres/elimineres må det derfor anses som højst usandsynligt, at produktet vil udgøre en risiko for botulisme.

6. KONKLUSION

Nitritkonservering har i mange år været et teknologisk hjælpemiddel, der har sikret fødevarerproducerer mod *Cl. botulinum*, der uden tvivl er den mest frygtede bakterie af alle i fødevarer. Samtidig har nitrit som sidegevinst nogle egenskaber, der stabiliserer produktet og fremmer en ønsket farve- og smagskvalitet. Da nitrits konserverende egenskaber blev opdaget var det en teknologisk revolution fordi sikkerheden med ét kunne løftes til et hidtil uset niveau.

Når nødvendigheden af at anvende nitrit som konserveringsmiddel skal vurderes som en sikkerhedsfaktor bør den reelle risiko for toksinproduktion fra *Cl. botulinum* evalueres i forhold til de sundhedsskadelige virkninger ved dannelsen af kræftfremkaldende nitrosaminer.

I takt med ny viden om indretning af fødevarer-virksomheder, hygiejneprocedurer i primærproduktion og fødevarerindustri, konserveringsteknologi samt kortlægning af vækstbetingelser for mikroorganismer og prævalensen af bakterier i fødevarer er behovet for nitrit og andre konserveringsmidler faldet. Dette medfører, at fødevarerindustrien og deres leverandører i dag er langt mere bevidste om fødevarer-sikkerhed og har forstået at udnytte forskningsresultaterne på især konserveringsområdet.

De seneste forskningsresultater dokumenterer, at en korrekt anvendelse af hurdle principperne i sig selv er tilstrækkelige til at producere sikre fødevarer. Dette indebærer bl.a. at produktionen tager hensyn til mulige risici og at der tilkøbes et HACCP program, hvilket desuden er et krav for samhandel. I praksis betyder det, at nitrit kan udelades uden risiko for toksindannelse fra *Cl. botulinum*, forudsat at levnedsmidlerne produceres/sammensættes og/eller opbevares under forhold, der ikke giver mulighed for vækst og at disse forhold kan dokumenteres i HACCP programmet. Udbredelsen af sous vide produkter er det mest nærliggende eksempel på at toksindannelse kan undgås i kødprodukter, der i øvrigt opfylder vækstkravene for *Cl. botulinum*.