

Reductie van nitrietgebruik bij biologische vleeswarenbereiding

Een literatuuroverzicht

BO-04-0002

D. Stegeman (Agrotechnology & Food Innovations)

T.J. Verkleij (TNO Kwaliteit van Leven)

F.K. Stekelenburg (TNO Kwaliteit van Leven)

Rapport 560

Colofon



TNO Kwaliteit van Leven



Titel	Reductie van nitrietgebruik bij biologische vleeswarenbereiding
Auteur(s)	D. Stegeman, T.J. Verkleij, F.K. Stekelenburg
A&F nummer	560
ISBN-nummer	90-6754-979-7
Publicatiedatum	November 2005
Vertrouwelijk	-
Project code	1440026900 (BO-04-0002)

Agrotechnology & Food Innovations B.V.
P.O. Box 17
NL-6700 AA Wageningen
Tel: +31 (0)317 475 024
E-mail: info.agrotechnologyandfood@wur.nl
Internet: www.agrotechnologyandfood.wur.nl

© Agrotechnology & Food Innovations B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, hetzij mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten of onvolkomenheden.

All right reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system of any nature, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher. The publisher does not accept any liability for the inaccuracies in this report.

Dit rapport is goedgekeurd door: Drs. A.C. Koster



Het kwaliteitsmanagementsysteem van Agrotechnology & Food Innovations B.V. is gecertificeerd door SGS International Certification Services EESV op basis van ISO 9001:2000.

Abstract

Nitrite is a commonly used additive in the production of meat products like cold meats. It is used as a preservative and gives the product the well known pink colour and flavour. In organic meat products, nitrite is defined an undesirable additive. In the present literature survey, an overview of the functions of nitrite and possible, organic and conventional, alternatives to reduce or replace nitrite are given.

It is concluded that no single component is known that can replace nitrite in realizing all of its functions (antimicrobial, anti-oxidant, colour and flavour). Nitrite is a very effective preservative and anti-botulinal agent. For several products good, manufacturing practice and introducing extra hurdles like low water activity and low pH may be sufficient to end up with a safe product without nitrite that can be stored at low temperature for 2 or 3 month. Some other products (e.g., pasteurised cold meats with $a_w > 0.97$, or sausages with low a_w and pH, but stored at ambient temperatures for a longer period) probably still require nitrite, although in smaller amounts than presently used.

Nitrite probably is the only component that brings the typical pink colour and cured flavour. Alternatives - like fermented red rice - are known that may also induce a red colour of the meat product. However, these products only may be added if they introduce extra functionality in the (organic) product. They should be abandoned if they are only used for cosmetic reasons. Several anti-oxidants are known, that probably may be used to substitute nitrite in realizing nitrite's anti-oxidant function. According to some literature references, the desired flavour will also be present if other anti-oxidants are used, since the flavour of cured meat products, in fact, stems from the flavour of meat that is not oxidized. Other researchers state that although the mechanism behind the creation of the cured flavour is not known yet, it only will be present if nitrite is used.

From the survey it can be concluded that simply abandoning nitrite in the production of organic meat products is not possible without changes in appearance and controlling product safety. Several alternative ingredients may be used to take care of part of the functions of nitrite. Depending on product characteristics (especially shelf life and product-colour), attention must be paid to processing conditions and temperature conditions in the supply chain, before lowering the amount of nitrite to a certain extent. The exact extent should be determined case by case. In an industrial setting, respecting the present shelf life of the sliced products (2 to 4 weeks), a complete reduction theoretically might be possible for specific products and applying stringent conditions (processing, hygiene, and logistics).

Keywords: nitrite reduction, meat processing; meat products; curing; organic

Inhoudsopgave

Abstract	3
1 Inleiding	5
2 Functies van nitriet	7
2.1 Conserverende werking van nitriet	7
2.1.1 Praktische relevantie	8
2.1.1.1 Conserven	9
2.1.1.2 Geappertiseerde vleesproducten	10
2.1.1.3 Gepasteuriseerde vleesproducten	10
2.1.1.4 Nabehandelde gepasteuriseerde vleesproducten	11
2.1.2 Conclusies en aanbevelingen	12
2.2 Kleurvorming door toevoeging van nitriet	12
2.2.1 Reactie van nitriet met myoglobine	14
2.2.2 Reductie van nitrosometmyoglobine	14
2.2.3 Invloed van verhitting	15
2.2.4 Reductie van nitraat en nitriet	15
2.2.5 Experimenten met vermindering nitriet	16
2.3 Oxidatieremmend en aromavormende eigenschappen van nitriet	17
3 Alternatieven voor nitriet	19
3.1 Conservering	19
3.1.1 Biologisch toegestane ingrediënten	19
3.1.2 Andere onderzochte ingrediënten:	20
3.2 Kleur	21
3.2.1 Kruiden en specerijen	22
3.2.2 Toevoeging van vitamine E	22
3.2.3 Angkak	23
3.2.4 CCMP	24
3.2.5 Aromatische stoffen	25
3.2.6 Andere kleurstoffen	25
3.3 Oxidatieremmend en aromavormend	26
4 Conclusies en aanbevelingen voor onderzoek	29
Literatuur	31
Bijlage	41

1 Inleiding

Bij de productie van vleeswaren wordt nitriet vooral gebruikt voor het verkrijgen van een - door de consument gewenste - stabiele roze kleur, geur en smaak, en voor de microbiologische stabiliteit. Bij de bereiding van gangbare vleeswaren wordt nitriet daarom als standaard ingrediënt gebruikt. Ook bij de bereiding van biologische vleeswaren wordt nitriet op het moment veelal gebruikt. Dit laatste kan via een tijdelijke vrijstelling die nog loopt tot 1 januari 2006. Het toevoegen van nitriet bij de bereiding van vleesproducten stuit echter steeds vaker op weerstand en strookt in principe ook niet met het biologische concept. Enerzijds, omdat nitriet een chemische toevoeging is, anderzijds omdat in nitriethoudende vleesproducten (in zowel gangbare als biologische producten) afgeleide producten (nitrosaminen) kunnen ontstaan met vermeende kankerverwekkende eigenschappen.

De voornaamste reden dat nitriet nog is toegestaan in gangbare vleesproducten en tijdelijk ook in biologische vleeswaren is omdat veel waarde wordt gehecht aan de conserverende werking die het met zich meebrengt. Dat het gebruik van nitriet ook leidt tot de mooie – gewenste - roze kleur in vleeswaren is theoretisch een bijkomend (maar praktisch een belangrijk) effect. Op Europees niveau wordt al jaren gesproken over een reductie van de hoeveelheid nitriet in biologische vleesproducten. Toch bestaan hier nog steeds geen algemene richtlijnen voor, zodat ieder land haar eigen richtlijnen over het gebruik van nitriet bij de bereiding van biologische vleeswaren heeft geformuleerd die soms ook nog productspecifiek zijn. Door deze verschillende regels per land en soms zelfs per certificeringinstelling (voor eko-producten) kunnen eigenaardige situaties ontstaan. In Duitsland ligt het bijvoorbeeld aan de certificerende instelling of er wel of geen nitriet gebruikt mag worden, en in Nederland was het een paar jaar geleden mogelijk buitenlandse eko-vleeswaren te verkopen met nitriet terwijl dat hier toen door Nederlandse productiebedrijven niet gebruikt mocht worden tijdens de bereiding.

Om aan de vraag naar “nitrietvrije” of “laag-nitriet houdende” vleeswaren te kunnen voldoen zullen alternatieven voor het gebruik van nitriet gezocht moeten worden. De noodzaak voor het zoeken naar alternatieven en het bepalen van wat praktisch nog wel en wat niet meer haalbaar is wat betreft reductie van nitriet, is voor de biologische sector urgent vanwege het aflopen van de vrijstelling per eind 2005. Ook voor de gangbare sector is nitriet een probleem wat blijkt uit het feit dat het elke keer weer aangekaart wordt. Het thema is daarmee interessant voor de volledige vleesproducten sector.

Voor een volledige uitbanning van nitriet en vervanging door alternatieve ingrediënten is het noodzakelijk een eenduidig beeld te hebben van de mechanismen achter de kleurontwikkeling, -stabiliteit en microbiologische werking. Voor het volledig doorgronden van de achterliggende mechanismen is tijdrovend en diepgaand onderzoek nodig. Vanwege de urgentie van het probleem is het onderzoek daarom - in eerste instantie - gericht op een reductie van de

hoeveelheid nitriet en een mogelijke gedeeltelijke vervanging door alternatieven, waarbij de productkwaliteit (waaronder voedselveiligheid) gegarandeerd kan worden.

Als eerste stap in dit onderzoek is de literatuur bestudeerd en is kritisch het kaf van het koren gescheiden. In de open literatuur is namelijk veel gepubliceerd over mogelijke mechanismen die ten grondslag liggen aan de kleurvorming en de andere functies van nitriet, mogelijke alternatieve ingrediënten, en de risico's op en bij het ontstaan van kankerverwekkende afgeleide producten. De gepubliceerde resultaten zijn echter niet consequent of zijn zo opgeschreven dat grondige bestudering van de artikelen noodzakelijk is om zelf conclusies te trekken. Sommige conclusies blijken dan namelijk anders te zijn dan de titel van het artikel op zichzelf doet vermoeden. Voorbeelden van dit laatste zijn artikelen waarin gesteld wordt dat vleeswaren nitrietvrij geproduceerd kunnen worden, terwijl juist wel nitraathoudende ingrediënten gebruikt worden. Het daarbij toegepaste nitraat kan vervolgens in het product worden omgezet in nitriet en tot dezelfde afgeleide stoffen leiden

Het voorliggende rapport is het resultaat van de eerste stap in het onderzoek waarbij de huidige stand van zaken met betrekking tot het onderwerp is geïnventariseerd. Als vervolg op deze inventarisatie worden modelexperimenten uitgevoerd, waarbij gereduceerde hoeveelheden nitriet worden toegepast en de effecten (kleur, microbiologische stabiliteit) op de voorbeeldproducten bestudeerd worden.

2 Functies van nitriet

Nitriet vervult 3 functies in vleeswaren:

1. conservering,
2. kleuring,
3. oxidatieremming en aromavorming.

2.1 Conserverende werking van nitriet

De conserverende werking van nitriet toegevoegd aan vleesproducten is uitvoerig bestudeerd sinds het begin van de vorige eeuw maar nog altijd niet volledig opgehelderd (Pierson and Smoot, 1982; Roberts and Gibson, 1986; Woods *et al.*, 1989). Omdat vegetatieve micro-organismen worden geïnactiveerd door verhitting en veel vleesproducten een verhittingsproces ondergaan, is vooral de remming van hitteresistente bacteriesporen van belang. In het bijzonder *Clostridium botulinum*, veroorzaker van een ernstige vorm van voedselvergiftiging als gevolg van de productie van botuline toxine, was onderwerp van veel studies (Tompkin *et al.*, 1980).

Proteolytische *C. botulinum* sporen worden geïnactiveerd met 12 decimale reducties door een hittebehandeling overeenkomend met 2,4 minuten bij 121°C, in de praktijk bekend als “botulinum cook”. Non-proteolytische *C. botulinum* sporen zijn daarentegen veel minder hitteresistent en worden bij een hittebehandeling overeenkomend met 10 minuten bij 90°C al met 6 decimale reducties geïnactiveerd. In vleesproducten die een mildere hittebehandeling hebben ondergaan kunnen zowel proteolytische als non-proteolytische *C. botulinum* sporen overleven.

Om het effect van nitriet op de remming van *C. botulinum* te bestuderen zijn sinds die tijd veel experimenten verricht met cultuur media, vlees bevattende modelsystemen, vlees “slurries” of vleesproducten. Deze werden geïnoculeerd met verschillende clostridia soorten en in de meeste gevallen bewaard buiten de koeling. Onder dergelijke omstandigheden liet de aanwezigheid van nitriet een reductie van de kans op toxinevorming zien met een factor 10 tot 100 (1 tot 2 log-eenheden) (Hauschild *et al.*, 1982; Lücke and Roberts, 1993). De praktijk heeft echter bewezen dat het risico op de vorming van botuline toxine in vleesproducten erg klein is onafhankelijk van de aanwezigheid van nitriet (Jira, 2004).

De pH afhankelijke effectiviteit van nitriet wijst op de mogelijkheid dat de conserverende werking veroorzaakt wordt door de vorming van salpeterigzuur in het bijzonder bij pH waarden beneden 6. Tegenstrijdige informatie bestaat of de verhitting van bacteriesporen in aanwezigheid van zout en nitriet direct de ontwikkelingsmogelijkheden beïnvloedt of dat nitriet de ontkieming en ontwikkeling remt van sporen die door het verhittingsproces zijn beschadigd (Roberts and Ingram, 1966). Ook bestaat er geen overeenstemming over de vraag of de toegevoegde hoeveelheid nitriet (ingangsnitrietgehalte) of het restgehalte nitriet in het eindproduct de belangrijkste factor is bij de beheersing van *C. botulinum* in gepasteuriseerde vleesproducten (Christiansen *et al.*, 1978; Pivnick and Chang, 1974). In feite zijn de antibotulinum eigenschappen van nitriet multifactorieel waarbij het vooral gaat om de interactie tussen nitriet en andere

factoren, inclusief zout, pH, hitte-intensiteit, sporenniveau en de aanwezigheid van andere ingrediënten zoals fosfaten and ascorbaten (Archer, 2002). Later werd de mogelijkheid van nitriet om te reageren met ijzer als mogelijke verklaring gegeven voor het remmende effect van nitriet op *C. botulinum* (Benedict, 1980; Grever *et al.*, 1998; Tompkin, 1979). Deze binding met ijzer zou ook kunnen verklaren waarom nitriet minder nuttig effect heeft in producten met hoge ijzerconcentraties, zoals producten bereid met lever of bloed.

Los van de remming van clostridia kan nitriet aanvullende bescherming bieden tegen de ontwikkeling van enkele andere pathogene bacteriën in rauwe vleesproducten of nabesmette verhitte vleesproducten. Helaas zijn de benodigde niveaus aan nitriet voor remming van pathogene bacteriën niet exact bekend en strikt afhankelijk van het type product en de gehanteerde opslagcondities. In het algemeen geldt: hoe hoger het nitrietgehalte, hoe beter de remmende werking. Vanwege toxicologische voedselveiligheidsredenen zijn op dit moment echter maximum ingangsnitrietgehalten wettelijk voorgeschreven.

In het verleden werden tamelijk hoge nitrietgehalten tot ver boven 200 mg/kg toegepast. Sinds 1980 is het toegelaten nitrietsniveau in veel landen verlaagd vanwege de onderkende mogelijkheid van N-nitrosamine vorming. Een andere overweging is geweest de vastgestelde (lage) ADI (acceptable daily intake) van nitriet. In Duitsland is in 1981 het nitrietgehalte in nitriethoudend zout verlaagd van 0,5-0,6% tot 0,4-0,5%. Als gevolg daarvan daalde de toevoeging van het ingangsnitrietgehalte in verhitte vleesproducten van 90 tot 120 mg/kg tot 70 tot 100 mg/kg. Een verbeterde procesbeheersing in de tijd maakte het ook mogelijk lagere nitrietgehalten te gaan gebruiken. Dit blijkt wel uit het feit dat de nitrietgehalten beduidend lager zijn geworden terwijl er in dezelfde tijd feitelijk een daling van het aantal explosies van botulisme is waargenomen (Lücke and Roberts, 1993). Ook in de Verenigde Staten is het residu nitrietsniveau in vleesproducten met 80% gereduceerd sinds 1960 zonder toename van het aantal botulisme gevallen (Cassens, 1997). In Polen kan eenzelfde tendens worden waargenomen en in Denemarken zijn lagere nitrietgehalten toegestaan dan in andere Europese landen zonder dat dit leidt tot voedselveiligheidsproblemen. Uit deze epidemiologische data kan worden geconcludeerd dat het beschermende effect van nitriet tegen botulisme veroorzaakt door vleesproducten wordt overschat (Lücke, 2003). Toch zal bij een verdere reductie van het ingangsnitrietgehalte de nodige voorzichtigheid in acht moeten worden genomen, waarbij mogelijk moet worden gecompenseerd met andere remmende factoren.

2.1.1 *Praktische relevantie*

Vers vlees, als ingrediënt van vleesproducten, is initieel besmet met een breed scala aan micro-organismen als gevolg van contaminatie gedurende het slachtproces. Ook toevoegingen gebruikt bij de bereiding van vleesproducten, zoals kruiden en specerijen, kunnen bijdragen aan een besmetting. Afhankelijk van het type vleesproduct kunnen verschillende soorten pathogene bacteriën aanwezig zijn, meestal in lage aantallen. In Tabel 1 is een overzicht gegeven van de meest voorkomende pathogene bacteriën, inclusief enkele relevante eigenschappen. Daaruit blijkt

dat slechts enkele van de pathogene bacteriën, namelijk *Listeria* spp., *Yersinia* spp, *B. cereus* en non-proteolitische *C. botulinum*, in staat zijn om zich onder gekoelde condities te ontwikkelen.

Daarnaast blijkt dat de ontwikkelingsmogelijkheden van sommige bacteriën, zoals *Campylobacter* spp., non-proteolytische *C. botulinum* en *Yersinia* spp. beperkt is ingeval van een relatief geringe verlaging van de wateractiviteit, zoals die in veel vleesproducten wordt bereikt.

Tabel 1 Eigenschappen van enkele pathogene bacteriën

Pathogene bacteriesoort	Aëroob/ Anaëroob	Toxinevormend / infectieus	Minimum groei- temperatuur (°C)	Minimum pH voor groei	Minimum a _w voor groei
<i>Bacillus cereus</i>	Facultatief	Beide	4	5,0	0,93
<i>Campylobacter</i> spp.	Micro- Aërofiel	Infectieus	30	4,9	0,99
<i>Clostridium botulinum</i>	Anaëroob	Toxinevormend	3,3 (type B, E) ¹ /10 ²	4,8 (type B, E) ¹ /4,6 ²	0,97 (type B, E) ¹ /0,93 ²
<i>Clostridium perfringens</i>	Anaëroob	Infectieus	12	5,5	0,93
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Facultatief	Infectieus	7	4,4	0,95
<i>Listeria monocytogenes</i>	Facultatief	Infectieus	0	4,4	0,92
<i>Salmonella</i> spp.	Facultatief	Infectieus	7	4,5	0,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aëroob (facultatief)	Toxinevormend	7 (10 voor toxine)	4,5 (5,2 voor toxine)	0,86 (0,90 voor toxine)
<i>Yersinia</i> spp.	Facultatief	Infectieus	0	4,5	0,96

Bij de conservering van vleesproducten worden ongewenste, zowel pathogene als bederfveroorzakende, bacteriën geïnactiveerd of in hun ontwikkeling beperkt. Dit wordt gewoonlijk bereikt door verhitting, zouten, aanzuren, drogen, koelen en gebruik van additieven zoals nitriet en lactaten etc. Afhankelijk van het type product wordt één of meer van deze zogenaamde horden toegepast. Op basis daarvan kunnen vleesproducten worden ingedeeld in de volgende vier specifieke productgroepen:

- Verhitte vleesproducten,
- Rauwe gezouten (gerookte) vleesproducten,
- Gefermenteerde vleesproducten,
- Gedroogde, gerijpte vleesproducten.

In het kader van dit project zal de relevantie van nitriet als conserveermiddel alleen voor de productgroep verhitte vleesproducten worden bediscussieerd.

2.1.1.1 Conserven

Buiten de koeling houdbare conserven, waaronder sommige vleesproducten, ondergaan over het algemeen een hittebehandeling vergelijkbaar aan 4 tot 5 minuten bij 121°C (F₀ waarde = 4 tot 5). Het eventueel in een vleesproduct aanwezige nitriet zal door een dergelijke hittebehandeling tot een minimum niveau dalen. Desondanks zullen als gevolg van de intensieve verhitting de in het

¹niet-proteolytische *Clostridium* soorten

²proteolytische *Clostridium* soorten

product aanwezige proteolytische en non-proteolytische *C. botulinum* sporen met meer dan 12 logeenheden worden geïnactiveerd. Andere aërobe en anaërobe bacteriesporen, die in staat zijn bederf te veroorzaken, zullen ook tot voldoende lage aantallen worden gereduceerd om een commercieel steriel product te verkrijgen. Dit betekent dat de aanwezigheid van nitriet in dergelijke producten vanuit microbiologisch oogpunt niet relevant is.

2.1.1.2 Geappertiseerde vleesproducten

De meeste buiten koeling houdbare vleesproducten, zoals luncheon meat (Smac) en worstjes in opgiet, worden vanuit sensorische overwegingen verhit bij lagere F_0 waarden van 0,1 tot 1,5 minuten (Hauschild and Simonsen, 1985). De veiligheid van deze zogenaamde geappertiseerde producten is gebaseerd op een combinatie van milde hittebehandeling en een voldoende hoog zout- en nitrietgehalte. De pekelpercentages van deze producten, die berekend kunnen worden als het percentage zout op de vochtfase ($\% \text{ zout} \times 100 / (\% \text{ zout} + \% \text{ vocht})$), liggen in de orde grootte van 4 tot 5% en de ingangshealten aan natriumnitriet op een niveau van 120 tot 150 mg/kg (Footitt and Lewis, 1995; Hauschild and Simonsen, 1985). Hoewel het restnitrietgehalte in deze geappertiseerde vleesproducten ook laag is, heeft nitriet bewezen een bescheiden rol te spelen bij de beheersing van de ontkieming en ontwikkeling van bacteriesporen.

2.1.1.3 Gepasteuriseerde vleesproducten

Het merendeel van de vleesproducten ondergaat echter een pasteurisatiebehandeling, waarbij veel lagere temperaturen tussen 66 en 100°C worden bereikt. Dergelijke producten bevatten over het algemeen tussen 1,5 en 3% zout. Bij gebruik van nitriethoudend zout (zout met 0,6% natriumnitriet (Colorozo)) resulteert een dergelijke dosering in ingangsnitrietgehalten tussen 90 en 180 mg/kg.

Als gevolg van de zouttoevoeging zal de wateractiviteit (a_w -waarde) van het product dalen. Deze daling is gerelateerd aan het pekelpercentage van het product en resulteert in a_w -waarden tussen 0,965 ($\pm 4\%$ pekkel) en 0,980 ($\pm 2,3\%$ pekkel). Tegenwoordig wordt bij de bereiding van vleesproducten vaak gebruik gemaakt van de toevoeging van lactaten om de wateractiviteit van het product verder te verlagen. De pH waarden van gepasteuriseerde vleesproducten liggen over het algemeen tussen 5,7 en 6,5.

Restnitrietgehalten in gepasteuriseerde vleesproducten zijn afhankelijk van verschillende factoren zoals zuurstofbeschikbaarheid gedurende de bereiding, pH, overige additieven en verhittingsintensiteit. Uit surveys uitgevoerd in verschillenden landen in Europa, Canada en de Verenigde Staten blijkt dat het gemiddelde restnitrietgehalten van verhitte vleesproducten liggen in de orde grootte van 10 tot 30 mg/kg (Anon, 2003; Cassens, 1997; Sen and Baddoo, 1997; White, 1975)

In vleesproducten gepasteuriseerd in hermetisch afgesloten eindverpakking zullen alleen bacteriesporen, inclusief die van pathogene soorten zoals *C. botulinum*, *C. perfringens* en *B. cereus* in staat zijn te overleven. In een enkel geval kunnen relatief hitteresistente *Streptococcus* spp.

overleven, maar deze zullen zich onder koeling nauwelijks vermeerderen. Ander vegetatieve (pathogene) bacteriën overleven een pasteurisatieproces van minimaal 2 minuten bij 70°C in het koudste punt van het product niet. Vanwege de mogelijke overleving van bacteriesporen worden de meeste gepasteuriseerde producten onder koeling bewaard. Onder deze condities zijn proteolytische *C. botulinum*, *C. perfringens* en *B. cereus* sporen niet in staat om te ontkiemen en/of zich te ontwikkelen. Alleen non-proteolytische *C. botulinum* sporen zouden kunnen ontkiemen en groeien onder deze condities, zie Tabel 1. Het risico op ontwikkeling en toxinevorming is echter erg laag vanwege de lage incidentie van *C. botulinum* sporen, de relatief lage wateractiviteit van de meeste vleesproducten ($< 0,97$) en de lage bewaartemperaturen ($< 7^{\circ}\text{C}$). Het extra microbiologische effect van nitriet zal onder deze condities waarschijnlijk beperkt zijn. Vanwege het gemis aan een volledige onderbouwing van deze stelling en omdat er toch nog over risico's (hoewel laag) gesproken wordt, is nitriet – tijdelijk – toegestaan bij de bereiding van biologische vleeswaren. Wanneer gepasteuriseerde vleesproducten daarentegen gedurende langere tijd buiten de koeling bewaard worden, zal nitriet een additioneel beschermende werking hebben tegen de mogelijke ontwikkeling van *C. botulinum*.

In producten die veel lever of bloed bevatten zal het toegevoegde nitriet worden geïnactiveerd door een overmaat aan heam-ijzer (Lücke, 1999). De veiligheid van deze producten is gebaseerd op een combinatie van lage wateractiviteit, een kookstap bij 100°C om de non-proteolytische *C. botulinum* te inactiveren en een gekoelde opslag.

Enkele specifieke gepasteuriseerde vleesproducten, zoals Gelderse rookworst en sommige braadworsten, worden gepasteuriseerd in vacuümverpakking en gedistribueerd buiten de koeling met een houdbaarheid van 2 tot 3 maanden. De stabiliteit van deze producten wordt gegarandeerd door een laag initieel sporegehalte (< 10 per g), een lage wateractiviteit ($< 0,97$), een lage pH ($< 5,4$) en het gebruik van voldoende nitriet (>120 mg/kg ingangshehalte) (Stekelenburg, 1999).

Vanwege de relatief lage pH van het product is het restnitrietgehalte na pasteurisatie over het algemeen minimaal (± 10 mg/kg). Desondanks heeft de toevoeging van nitriet in de loop der tijd laten zien voldoende extra bescherming te bieden tegen bederf van deze producten tijdens ongekoelde opslag.

2.1.1.4 Nabehandelde gepasteuriseerde vleesproducten

Veel gepasteuriseerde vleesproducten, zoals gekookte ham en boterhamworst, worden na de bereiding nabehandeld (roken, braden, finishen, etc) en vervolgens in al dan niet gesneden vorm verpakt onder vacuüm of aangepaste gasatmosfeer (MAP). Als gevolg van deze handelingen kan een herbesmetting van het product optreden met uiteenlopende soorten micro-organismen. De besmettingniveaus met pathogene bacteriën zijn over het algemeen laag (Stekelenburg, 1996). Vanwege de productsamenstelling, de verpakkingscondities en de opslagtemperatuur kunnen slechts enkele bacteriesoorten zich ontwikkelen op dit type producten gedurende de relatief korte houdbaarheidstermijn van enkele weken. In de praktijk wordt de bederfflora van voorverpakte gepasteuriseerde vleesproducten voornamelijk gevormd door melkzuurbacteriën en *Brochothrix*

thermosphacta. Deze bacteriën worden maar in zeer beperkte mate geremd door de aanwezigheid van nitriet in het product (Muermans and Stekelenburg, 1993). De enige pathogene bacteriesoort die in staat is zich onder deze condities te ontwikkelen is *Listeria monocytogenes*. Ook deze bacteriën worden slechts in beperkte mate geremd door nitriet. In de praktijk wordt de aanwezigheid en ontwikkeling van *L. monocytogenes* op verhitte vleesproducten voorkomen door afdoende hygiënemaatregelen en de toevoeging van lactaten (Buncic *et al.*, 1995; Duffy *et al.*, 1994; Nerbrink *et al.*, 1999; Stekelenburg, 2002; Stekelenburg and Kant Muermans, 2001). In vleesproducten met een relatief laag zoutgehalte, resulterend in een hoge a_w -waarde (> 0.97), of met een hoge pH waarde ($> 6,3$) kunnen Enterobacteriaceae, een andere groep van bederfbacteriën, zich ontwikkelen. De aanwezigheid van nitriet in het product kan de ontwikkeling van deze bacteriën vertragen (Stekelenburg and Labots, 1980).

2.1.2 Conclusies en aanbevelingen

In het kader van de microbiologische veiligheid en houdbaarheid van verhitte vleesproducten is de benodigde hoeveelheid nitriet afhankelijk van de productsamenstelling, de processing en de opslagcondities. In vleesproducten die een hittebehandeling ondergaan bij F_0 waarden boven 2,4 minuten is vanuit voedselveiligheidsoogpunt de toevoeging van nitriet niet noodzakelijk. Wel speelt nitriet een rol bij vleesproducten die een lagere hitte-intensiteit ($F_0 = 0,1-1,5$ minuut) ondergaan en buiten de koeling worden bewaard. Een minimum ingangsnitrietgehalte van 100 mg/kg uitgedrukt als NaNO_2 wordt geadviseerd gebaseerd op literatuurgegevens.

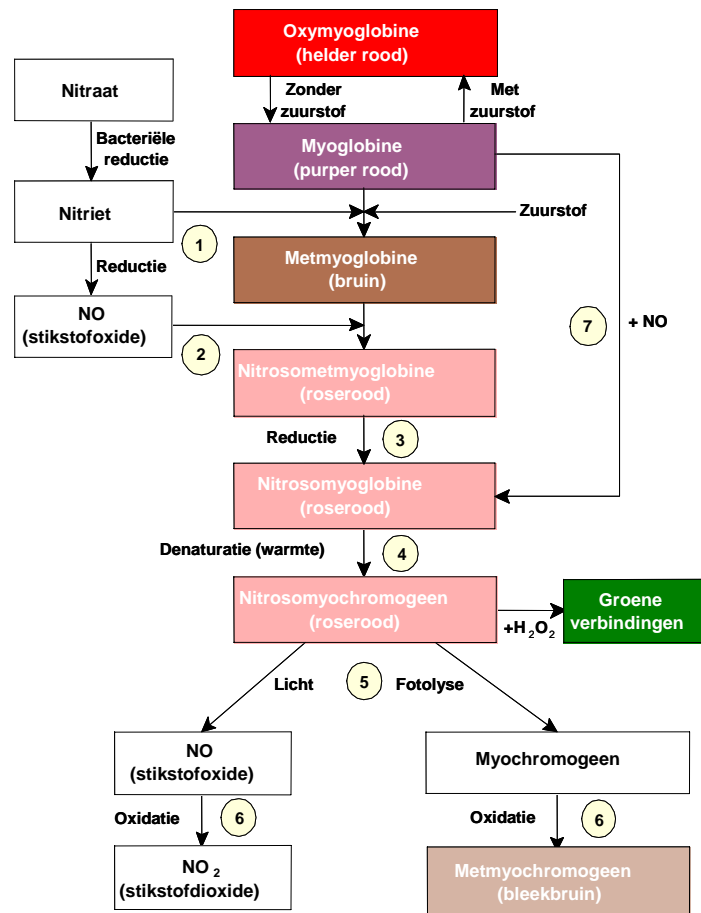
Voor gepasteuriseerde vleesproducten die onder koeling worden bewaard is de noodzaak van de toevoeging van nitriet vanuit microbiologisch oogpunt niet eenduidig bekend en afhankelijk van andere factoren, in het bijzonder de wateractiviteit en de pH waarde van het product. In gepasteuriseerde producten met relatief hoge a_w -waarden boven 0,970 kan de aanwezigheid van nitriet extra bescherming bieden, met name bij langere gekoelde opslagtermijnen (> 3 weken tot 2 à 3 maanden). Voor deze situatie kan als indicatie een ingangsnitriethoofniveau van 60 mg/kg uitgedrukt als NaNO_2 worden aangegeven als een minimum niveau waarbij enig conserverend effect zal kunnen worden waargenomen. De uiteindelijk benodigde nitriethoofdosering is mede afhankelijk van andere factoren, zoals de wateractiviteit en de pH-waarde van het vleesproduct.

2.2 Kleurvorming door toevoeging van nitriet

Vleeswaren danken hun kleur aan het eiwit nitrosomyoglobine (onverhit) of nitrosomyochromeen (verhit), dat ontstaat door inwerking van nitriet (stikstofoxide) op het eiwit myoglobine. Goede overzichten hiervan worden gegeven door (Fox, 1966; Giddings, 1977; Kolb *et al.*, 1990) en meer recent (Mancini and Hunt, 2005).

Reacties die plaats kunnen vinden zijn aangegeven in Figuur 1, pagina 13.

Overzicht van de reacties die plaatsvinden tijdens de kleurvorming en verkleuring van vleeswaren



Figuur 1 Zichtbare myoglobine kleuring-reacties aan de oppervlakte van vlees; TNO[®]

1. Oxidatie van myoglobine door nitriet tot metmyoglobine, hierdoor ontstaat een bruine kleur.
2. Additie van stikstofoxide aan metmyoglobine onder vorming van nitrosometmyoglobine.
3. Reductie van nitrosometmyoglobine tot het roze-rode nitrosomyoglobine.
4. Omzetting door verhitting van nitrosomyoglobine in nitrosomyochromeen.
5. Fotolyse van nitrosomyochromeen onder invloed van licht in NO en myochromeen.
6. Oxidatie van NO tot NO₂ en van myochromeen tot metmyochromeen. Dit is een onomkeerbare reactie, waarbij vleeswaar bleekbruin verkleurt.
7. Een alternatief is de directe vorming van nitrosomyoglobine uit myoglobine of oxymyoglobine en gasvormig stikstofoxide (NO). In dit geval treedt er geen oxidatie op tot metmyoglobine en is er dus ook geen reductiestap nodig.

Van niet alle stappen is het reactiemechanisme volledig bekend (Mancini and Hunt, 2005). Er wordt aangenomen dat er in sommige reacties tussenproducten worden gevormd, die snel overgaan in eindproducten (Bekhit *et al.*, 2003; Connolly *et al.*, 2002).

Uit de geraadpleegde literatuur bleek dat een aantal factoren invloed uitoefent op een of meer van de genoemde reacties. Deze literatuur wordt per reactiestap besproken:

2.2.1 *Reactie van nitriet met myoglobine*

Bij aanwezigheid van nitriet wordt eerst myoglobine geoxideerd tot metmyoglobine, waardoor de rode kleur verdwijnt. Daarna vindt reductie plaats van nitriet tot stikstofdioxide (NO) en wordt nitrosometmyoglobine gevormd (Fox, 1966). Bij deze reactie reageert NO met de zesde ligand van het heam-ijzer tot een extreem stabiele verbinding (bij afwezigheid van zuurstof). Het NO reageert zowel met ferro (tweewaardig ijzer, Fe⁺⁺) als met ferri (driewaardig ijzer, Fe⁺⁺⁺). De ferri-verbinding wordt via autoreductie omgezet in de ferro-verbinding. De dissociatiesnelheid van het NO-complex is zeer laag (Giddings, 1977).

Voor een goede omzetting van myoglobine in nitrosomyoglobine is een nitrietgehalte van 100 mg/kg of meer nodig (Lin and Sebranek, 1979). Bij 50 mg/kg was de kleurvorming nog wel voldoende, maar de kleurstabiliteit slechter. Alleen bij een lage zuurstofdoorlaatbaarheid van de verpakking en een laag restzuurstofgehalte werd dan een stabiele kleur verkregen. Demasi vond dat de vorming van nitrosoheampigmenten toenam bij verlaging van de pH (Demasi *et al.*, 1989). De minimale nitrietconcentratie om nog een zichtbare roze kleur te verkrijgen is 1 tot 2 mg/kg (MacDougall and Hetherington, 1992). In hun onderzoek wordt ook aangegeven dat de hierbij gevormde kleur zeer instabiel is. Bij een concentratie van 50 mg/kg was de kleur aan de oppervlakte stabiel, naar “binnen” toe werd de roze kleur wel minder.

Chasco *et al.* onderzochten de kleurvorming bij droge worstsoorten. Zij vonden dat tijdens het mengen en de fermentatie zowel oxidatie als nitrosering plaatsvindt (Chasco *et al.*, 1996). Hierbij wordt onder meer nitrosometmyoglobine gevormd. Tijdens het drogen wordt het nitrosometmyoglobine gereduceerd tot nitrosomyoglobine.

Behalve met myoglobine kan nitriet in een licht zuur milieu ook reageren met secundaire aminen, waarbij nitrosaminen worden gevormd (Hotchkiss and Cassens, 1987). Vooral tijdens het bakken van bacon kan dit het geval zijn. Door beperking van het nitrietgehalte en verhoging van het gehalte aan ascorbinezuur en dergelijke kan de vorming van nitrosaminen sterk worden verminderd.

2.2.2 *Reductie van nitrosometmyoglobine*

De omzetting van nitrosometmyoglobine in nitrosomyoglobine wordt bevorderd door reductiemiddelen, zoals ascorbinezuur. Deze reductie is niet pH-afhankelijk (Fox, 1966). Daar ascorbinezuur zowel de reductie van nitriet tot stikstofdioxide als de reductie van nitrosometmyoglobine bevordert ontstaat hierdoor meer nitrosomyoglobine en dus een betere kleur. In plaats van ascorbinezuur of ascorbaat kan voor de reductie ook erythorbaat (iso-

ascorbaat) worden gebruikt (Blunk, 1993). Volgens Lin et al. hebben erythorbaatconcentraties boven 500 mg/kg geen extra effect (Lin *et al.*, 1980).

Over de invloed van ascorbinezuur op de kleurstabiliteit komen er in de literatuur weinig gegevens voor. Zowel met als zonder ascorbaat treedt verkleuring op onder invloed van het licht. Door de betere uitgangspositie blijft de kleur met ascorbaat beter. Olsman en van Leeuwen (1982) vonden geen positief effect van ascorbinezuur op de kleurstabiliteit van gekookte hammen.

Wanneer nitriet door ascorbinezuur wordt gereduceerd tot stikstofoxide wordt het ascorbinezuur geoxideerd tot dehydroxyascorbinezuur. Volgens Mulder kan dit als pro-oxidant fungeren ten opzichte van vetten (1991). Ook verschillende heampigmenten kunnen invloed hebben op de verkleuring. Volgens Kanner *cs.* fungeren nitrosomyoglobine en nitrosoheam als anti-oxidanten en vertragen zij de oxidatie van vetten (Kanner *et al.*, 1980; Kanner *et al.*, 1984). Heam, metmyoglobine en oxymyoglobine daarentegen zijn pro-oxidanten. Geoxideerde vetten bevatten peroxiden en vrije radicalen welke indirect de verkleuring kunnen versnellen.

2.2.3 *Invloed van verbitting*

Door verhitten wordt myoglobine omgezet in het bruine metmyochromogeen, hierbij wordt het tweewaardige ijzer geoxideerd tot driewaardig ijzer. Het rode nitrosomyoglobine wordt omgezet in het roze-rode nitrosomyochromogeen, door de stabiliserende werking van de NO-groep blijft het ijzer tweewaardig. In de literatuur worden deze verhitte eiwitten ook wel aangeduid met metmyochrome en nitrosylhemochrome.

Het rode nitrosoheamcomplex van verhitte vleeswaren kan volledig worden geëxtraheerd met een 80 %-ig aceton/watermengsel. Dit betekent dat de binding met het eiwit is verbroken. Per heammolecule bevat nitrosohemochroom één molecule NO. In oudere publicaties gaat men uit van twee moleculen NO per heammolecule. Volgens Killday is dit tweede molecule NO gebonden aan het (gedenatureerde) eiwit (Killday *et al.*, 1988).

Tijdens het verhitten vindt nog verdere doorkleuring plaats. Hierbij spelen volgens Kolb vermoedelijk SH-groepen een reducerende rol (Kolb *et al.*, 1990).

2.2.4 *Reductie van nitraat en nitriet*

Onder sterk reducerende omstandigheden wordt nitriet (via HNO_2) gereduceerd tot NO. Deze reductie is pH-afhankelijk (sneller bij lage pH). In de weefselcel vindt deze reductie plaats in de mitochondria via het cytochroom-*c* oxidatie-reductiesysteem. Exogeen is een reductiemiddel nodig, bijvoorbeeld ascorbinezuur en/of cysteïne. Dit vormt met het nitriet een radicaal dat uiteenvalt in NO en het geoxideerde reductiemiddel (bijvoorbeeld dehydroascorbinezuur), zie (Fox, 1966).

Nitraat kan via een microbiële reductie omgezet worden in nitriet, zie onder andere (Fischer *et al.*, 2005b; Kolb *et al.*, 1990; Petäjä, 1977). Soms worden er starterculturen toegevoegd om deze omzetting te versnellen (Staphylococcus, Micrococci). Hoewel bij deze optie nog steeds nitriet gevormd wordt, kunnen goede kleuringen bereikt worden waarbij slechts geringe resthoeveelheden (rest)nitriet aanwezig zijn.

2.2.5 Experimenten met vermindering nitriet

Gedurende opslag van vleesproducten vindt er een afname plaats van de hoeveelheid nitrosomyochroomgeen (Fox and Ackerman, 1968). Er wordt aangegeven dat een kleine hoeveelheid toegevoegd ascorbinezuur hierin een cruciale rol speelt.

Dineen heeft met experimenten aangetoond dat een toegevoegde hoeveelheid van 25 mg/kg nitriet wel een rode kleur geeft aan de ham, maar de stabiliteit van deze kleur slecht is (Dineen *et al.*, 2000). De toegevoegde hoeveelheid van 100 mg/kg geeft wel een stabiele kleur.

Fischer heeft experimenten uitgevoerd met het toevoegen van 25 resp. 50 ppm nitraat aan het vleesmengsel en een nitraatreducerende starterculture (Fischer *et al.*, 2005a; Fischer *et al.*, 2005b). Door de starterculture onder optimale tijd (1 à 1.5 uur) en temperaturen (± 45 °C) de kans te geven het toegevoegde nitraat te reduceren tot nitriet, werd er bij verhitting van het vleesmengsel een voldoende stabiele vleeskleur gevormd. Worden deze producten vergeleken met controleproducten bereid met normale hoeveelheden nitriet, dan blijken de producten met verminderde nitriethoeveelheid, toegevoegd nitraat, en ingebouwde houddtijd bij 45 °C geen negatief effect te hebben op het totale kiemgetal, het kiemgetal van Enterobacteriaceae en op groei van geënte *listeria innocua* in het eindproduct na koken (kerntemperatuur van 72 °C) en gekoeld bewaren bij 7 °C gedurende 35 dagen (Fischer *et al.*, 2005b). Effecten op *clostridium* zijn niet bekend. Bepalingen van de kleur laten zien dat de monsters bereid met 50 ppm nitraat na 25 dagen bewaartijd (onder gemodificeerde atmosfeer) vergelijkbare roodwaarden tonen als de controleproducten. Producten bereid met 25 ppm blijken minder kleurstabiel te zijn en blijken na 25 dagen duidelijk lagere roodwaarden te tonen dan de controleproducten, visueel valt echter nog weinig verschil op te merken. Ook blijken de producten met 50 en 25 ppm gevoeliger te zijn voor licht dan de controleproducten.

Experimenten, uitgevoerd door Juncher *et al.* geven aan dat bij een gebruikte concentratie van 78 mg/kg nitriet en een verpakking die voldoende zuurstofdicht is ($< 0.5 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{atm}/24\text{h}$) de rode kleur stabiel is gedurende 28 dagen (Juncher *et al.*, 2003).

Daarbij is ook van belang, volgens Møller, dat de ratio tussen headspace en product in de verpakking niet te groot is (Møller *et al.*, 2003a). Een grote ratio heeft het risico in zich dat de daarin aanwezige absolute hoeveelheid zuurstof te hoog is.

Een van de redenen om de hoeveelheid nitriet gebruik te verlagen is, naast een vermindering van het gebruik van chemische toevoegingen, de hoeveelheid restnitriet in vleeswaren te

minimaliseren. Naast een verlaging van de hoeveelheid nitriet in het bereidingsproces kan deze hoeveelheid restnitriet in vleeswaren en andere vleesproducten ook verlaagd worden door gebruik te maken van gasvormig stikstofdioxide tijdens de vleeswarenbereiding in plaats van nitrietzouten. Hoewel op deze wijze nog wel een chemische toevoeging gebruikt wordt (en het dus waarschijnlijk niet toepasbaar is in de biologische verwerking), worden zo de gezondheidsrisico's verlaagd en ontstaan lagere restnitriet gehalten. (Fischer *et al.*, 2005a). Naar aanleiding van Duitse patenten uit 1939 is hiervoor onder andere aan de technische universiteit van Berlijn onderzoek verricht. Uit dit onderzoek wordt geconcludeerd dat de kwaliteit van bockworsten geproduceerd zonder nitriet, maar met toevoeging van NO tijdens het vacuüm-cutteren gelijk is aan bockworsten geproduceerd volgens normale omstandigheden (Thiemig *et al.*, 2001). Door andere onderzoekers zijn ook patenten ingediend op dit gebied, zie bijvoorbeeld (Cranston, 1997).

2.3 Oxidatieremmend en aromavormende eigenschappen van nitriet

Nitriet is een zeer goede antioxidant die vetoxidatie tegengaat. Door in de vorm van NO overgangsmetalen (meer specifiek het ijzer in myoglobine) te binden gaat nitriet de pro-oxidatieve werking van deze metalen tegen en wordt de auto-oxidatie van vetten in het vlees geremd, zie onder andere (Pegg and Shahidi, 2000). Tevens kan nitriet reacties aangaan met de dubbele koolstof bindingen in vetzuren, waardoor de vetzuren in vlees gestabiliseerd worden (Goutefongea *et al.*, 1977; Zubillaga *et al.*, 1984). Een laatste theorie zegt dat niet nitriet zelf maar de in vlees gevormde nitroso- en nitrosyl- componenten antioxidatieve eigenschappen bezitten (Kanner, 1979; Kanner *et al.*, 1980). Door het tegengaan van deze vetoxidatie kan het ontstaan van afwijkende aroma's (ranzigheid, warmed-over-flavour) voorkomen worden (O'Boyle *et al.*, 1990; Pegg and Shahidi, 2000; Shahidi and Pegg, 1992; Tang *et al.*, 2001).

De reden voor het ontstaan van pekelaroma is nog steeds niet duidelijk (Arneth, 2001). Vaak wordt gesteld dat de door nitriet verhinderde oxidatie van vetzuren in vlees ook de reden is voor het ontstaan van het pekelaroma (Arneth, 2001; Rüter and Grever, 2001). Het voor nitriethoudende vleesproducten typische aroma wordt daarom ook wel omschreven als een basis vleesaroma wat in het geval van uitsluiting van nitriet verhuld wordt door sterk geurende oxidatieproducten (Pegg and Shahidi, 2000). Echter, als geen nitriet wordt toegevoegd, maar andere antioxidatieve toevoegingen, zoals ascorbaat, dan ontstaat niet het gewenste aroma.

De hoeveelheid nitriet kan beduidend gereduceerd worden waarna nog steeds het gewenste aroma ontstaat. Volgens Arendt c.s. is een molaire verhouding tussen nitriet en myoglobine van 50:1 al voldoende om het gewenste effect te bereiken (Arendt *et al.*, 1997). Hierbij is als uitgangspunt genomen dat nitriet de metmyoglobine-geïnduceerde vetzuuroxidatie tegengaat en dat hierdoor het gewenste pekelaroma "ontstaat". Voor normale vleeswaren zou daarmee 10 mg NaNO₂/kg vlees al voldoende moeten zijn (Lücke, 2003). Hierbij moet nitriet wel volledig benut kunnen worden, wat alleen in een volledig zuurstofvrije omgeving mogelijk is (Lücke, 2003) en wordt verondersteld dat het pekelaroma ontstaat tengevolge van het tegengaan van vetoxidatie.

Meer realistisch is uit te gaan van toevoeging van ongeveer 40 mg/kg voor het bereiken van de gewenste sensorische kwaliteit (waaronder het pekelaroma) (Klettner and Troeger, 2000; Wirth, 1991).

3 Alternatieven voor nitriet

Zoals in het vorige hoofdstuk is vermeld staat heeft nitriet drie belangrijke functies: een conserverende, een kleurvormende en een antioxidatieve functie die min of meer gekoppeld is aan het verzorgen van het gewenste aroma. In de volgende paragrafen worden per functie mogelijke alternatieven gegeven.

3.1 Conservering

Voor het verkrijgen van de gewenste antimicrobiologische werking wordt als richtlijn een concentratie nitriet van 100-150 ppm gesteld indien geen alternatieven worden toegevoegd, zie bijvoorbeeld (Grever and Ruiter, 2001; Klettner and Troeger, 2000; Lücke, 1999; Pierson and Smoot, 1982; Skovgaard, 1992; Tyszkiewicz and Baldwin, 1986; Wirth, 1991). Zoals in het vorige hoofdstuk is vermeld, zijn deze concentraties niet hard en gelden ze niet in alle gevallen. Afhankelijk van de condities in de keten (zoals hygiëne, tijd-temperatuurstraject) en het type product (a_w , pH), kan ook een voldoende conservering verkregen worden bij lagere nitrietconcentraties.

Binnen de voedingsmiddelenwereld zijn veel verschillende toevoegingen bekend met antimicrobiologische werking. Ook meer specifiek voor vleesproducten zijn ingrediënten bestudeerd, vaak in combinatie met een verlaagde hoeveelheid nitriet.

3.1.1 *Biologisch toegestane ingrediënten*

Van alle bestudeerde ingrediënten mag slechts een zeer beperkt aantal toegepast worden in biologische vleesproducten, zie Bijlage 1, met daarin de SKAL-weergave van (EU 2092/91 Bijl. IV). Ingrediënten die op deze lijst staan en waar ook onderzoek naar verricht is zijn of melding van gemaakt wordt in de open literatuur:

- melkzuur,
- natrium-, kalium- en calciumlactaat,
- appelzuur,
- ascorbinezuur (geen ascorbaten),
- citroenzuur, en
- biologische kruiden(extracten)³.

Van de bovenstaande ingrediënten is lactaat meest gerapporteerde ingrediënt met een duidelijke antimicrobiologische werking (Huhtanen, 1984; Maas *et al.*, 1989; Maca *et al.*, 1997a; Maca *et al.*, 1997b; Sebranek, 1979; Wood *et al.*, 1986). Veelal wordt melding gemaakt een verlengde houdbaarheid van vlees en vleesproducten, en wordt dit aangetoond aan de hand van het effect op totale kiemgetal of meer specifiek *Listeria* en *Salmonella* soorten. In enkele gevallen wordt ook wordt melding gemaakt van positieve effecten op *Clostridium perfringens* en *C. botulinum*

³ In boeverre dit de kruiden zelf moeten zijn of dat ook extracten toegevoegd mogen worden valt niet duidelijke uit de regeling op te maken.

Lactaten remmen de groei van micro-organismen en vertragen hiermee ook de toxinevorming. Geadviseerde hoeveelheden liggen rond de 2% (de Vegt, 1997). Melkzuur en andere zuren worden voornamelijk ingezet ter verlaging van de pH en de hiermee samengaande vermindering van de groei van micro-organismen (Pegg and Shahidi, 2000). Ook kruiden en etherische oliën kunnen een ondersteunde antimicrobiologische en –oxidatieve rol hebben, maar kunnen zeker niet de functie van nitriet volledig vervangen (Sabah *et al.*, 2004).

Recent hebben Burt en Holley en Pater de huidige status over het gebruik van etherische oliën samengevat in twee overzichtsartikelen (Burt, 2004; Holley and Patel, 2005). Hieruit blijkt dat veel onderzoek is verricht naar de effecten van bepaalde stoffen zoals allyl-isothiocyanaat (komt voor in mosterdzaadjes en mierikswortel) capsicum (uit peper), kaneel, koriander, kruidnagel, oregano, tijm of specifieke organismen, waarbij vaak concentraties van rond de 1% antimicrobiologische effecten laten zien in vlees. Over effecten op clostridium zelf en de afgeleide toxines wordt niets gerapporteerd. Wel geeft Holley aan dat knoflook potentieel heeft om toegepast te worden tegen *C. botulinum* in rundvlees (Holley and Patel, 2005). In vitro testen van Ismael en Pierson tonen dat knoflook (en ui) een hoge activiteit vertonen in het tegengaan van het uitgroeien van sporen, terwijl verdere vermenigvuldiging van de Clostridium bacteriën juist beter geremd worden door kaneel, oregano en kruidnagel, dan door knoflook (Ismael and Pierson, 1990). Burt geeft aan dat oregano olie en nitriet in vitro een synergistisch effect heeft bij het vertragen van *C. botulinum* uitgroei (mengsel van type A, B en E) en het ontstaan van toxines. Burt merkt tevens op dat etherische oliën meer effect hebben in magere dan in vette vleesproducten (Burt, 2004).

3.1.2 *Andere onderzochte ingrediënten:*

Huhtanen heeft verschillende alkyn- en alkeenzuren en esters van deze zuren onderzocht op hun *C. botulinum*-remmende werking in verkleinde bacon (Huhtanen, 1983). De meest veelbelovende stoffen waren de esters (methyl en ethyl mono- en di-vormen) van fumaarzuur. Bij 0.125% toevoeging, waren al deze esters minimaal even goed als nitriet is staat uitgroei van botulinum sporen en ontwikkeling van toxines te voorkomen in ingeblikte bacon dat gedurende 8 weken aan 30 °C was blootgesteld. Sensorische eigenschappen zijn niet onderzocht, maar wel wordt gemeld dat de ethylesters een parfumeur met zich mee kunnen brengen in het eindproduct. Directe toepassing in industriële processen lijkt hiermee dus nog niet reëel.

Een grote groep onderzoekers heeft de effecten van parabenen (esters van hydroxybenzoëzuur) als antimicrobiële hulpstof onderzocht, waarbij verschillende resultaten gevonden zijn, sterk afhankelijk van de *Clostridium* stam. Hoewel de esters effectief zijn in de gebruikte media, blijkt het effect in vlees minimaal te zijn. Een belangrijke reden hiervoor is waarschijnlijk dat de parabenen vetoplosbaar zijn en slechts in zeer lage concentraties aanwezig zijn in de waterige fase (Pierson and Smoot, 1982). Het gebruik van parabenen ter vervanging van nitriet biedt op dit moment dan ook nog te weinig aanknopingspunten (Pegg and Shahidi, 2000; Pierson and Smoot, 1982).

Andere veelbelovende stoffen die toegevoegd kunnen worden bij een (totale) reductie van nitriet zijn: nisine, sorbinezuur (en kaliumsorbaat), ascorbaat, zwaveldioxide, natriumhypofosfiet, ethyleendiaminotetraazijnzuur (EDTA), polyfosfaten, zuren als glucono- δ -lacton (Paquet and Rayman, 1987; Pegg *et al.*, 2000; Shahidi, 1991). Gebruik van sorbaat heeft hierbij de meeste aandacht gekregen en door meerdere onderzoekers zijn combinaties van verlaagd nitriet (voor kleur en aromavorming) met sorbaat voorgesteld als een zeer goed en soms zelfs beter alternatief dan normale hoeveelheden nitriet (Hall, 1983; Leistner, 1979; Ronning and Frank, 1988; Sofos and Busta, 1980; Wagner and Busta, 1983). Toevoeging van 2600 mg kaliumsorbaat per kilogram vlees heeft hierbij hetzelfde effect op *C. botulinum* als 156 mg nitriet per kg vlees. Door ook gebruik te maken van een geringe hoeveelheid nitriet wordt een gelijke waardering voor smaak en aroma verkregen als voor normale hoeveelheden nitriet (Shahidi, 1991; Shahidi and Pegg, 1992). Het gezamenlijke gebruik van sorbinezuur en nitriet kan echter leiden tot mutagene producten in het vlees en wordt daarom afgeraden (Binstok *et al.*, 1998; Paquet and Rayman, 1987).

Ook fosfaten worden vaak voorgesteld als antimicrobiële toevoeging. Verschillende vormen van zouten van fosforzuur, zowel enkelvoudige als poly- (gecondenseerde) fosfaten met twee of meer fosfaat anionen, zijn hiervoor beschikbaar. Al deze fosfaten vervullen drie functies in levensmiddelen: a) beheersing van de pH door bufferwerking, b) binden van metaalionen, c) verhoging van de ionsterkte van de oplossingen. Een overzicht van verschillende fosfaten en hun conserverende effecten wordt gegeven door Wagner (1986). Uit onderzoek blijkt dat per kilogram vlees 3000 mg natriumhypofosfiet (een goed oplosbare smaakloze stof) in combinatie met natrium tripolyfosfaat dezelfde microbiologische effecten bewerkstelligt als 120 - 150 mg/kg nitriet (Shahidi, 1991).

Paquet en Rayman (1987) hebben onderzocht in hoeverre N-acyl derivaten van D-aminozuren in combinatie met gereduceerde hoeveelheden nitriet gebruikt kunnen worden ter remming van de uitgroei van *C. botulinum* sporen. Uit dit onderzoek bleken verschillende N-acyl derivaten een duidelijk synergistisch effect te vertonen in combinatie met nitriet (60 ppm) bij gebruik in varkensvleesslurries.

Voor een verder overzicht van mogelijke vervangers met conserverende werking voor nitriet in vleeswaren wordt verder verwezen naar Pegg *et al.* (2000). Hoewel goede alternatieven voor nitriet bekend zijn, geven studies aan dat het toevoegen van alternatieven duidelijk in hogere concentraties moeten dan die van nitriet (Wood *et al.*, 1986).

3.2 Kleur

Voor het verkrijgen van de gewenste kleur in vleeswaren en -producten zijn verschillende groepen toevoegingen bestudeerd; aromatische stoffen, synthetisch pigment, gefermenteerde rijst, kruiden en specerijen en andere kleurstoffen. Tevens is door meerdere onderzoekers bestudeerd of toevoeging van antioxidanten in de vorm van vitamine E een positief effect heeft

op de kleurontwikkeling. Waarschijnlijk bieden hiervan alleen de natuurlijke kleurstoffen (zoals kruiden en groentes indien toegepast als voedingstof, niet puur cosmetisch) en vitamine E mogelijkheden binnen de biologische vleesverwerking. De andere ingrediënten zijn niet toegestaan in biologische vleeswaren

3.2.1 *Kruiden en specerijen*

Als alternatief voor nitriet worden ook wel nitraathoudende kruiden, groenten, specerijen (of zeezout) toegepast. Hiermee wordt voldaan aan het de biologische wens geen chemische toevoegingen te gebruiken, echter afgeleide nitrietverbindingen, zoals nitrosaminen, kunnen net zo gemakkelijk ontstaan als bij toevoeging van nitriet. Hoewel wat dit laatste betreft er dus geen duidelijk verschil bestaat tussen nitriet en nitraat, wordt dit in publicaties vaak niet duidelijk vermeld, en worden de resultaten beschreven alsof nitrietvrije vleesproducten gemaakt zijn, zie bijvoorbeeld (Fischer *et al.*, 2005a; Fischer *et al.*, 2005b). Ook bij commerciële producten wordt in sommige gevallen het (verkoop)argument nitrietvrij gebruikt zonder hier verder op in te gaan.

Een nadeel van toepassing van nitraatrijke ingrediënten is dat de hoeveelheid nitraat in deze ingrediënten zeer sterk varieert (o.a. afhankelijk van het seizoen, de hoeveelheid zon, etc.) zodat geen gestandaardiseerde hoeveelheid kruiden of specerijen toegevoegd kan worden. Volgens Blom-Zandstra (1989) kan de nitraathoeveelheid van prei in Nederland variëren van 1000 tot 2500 ppm, terwijl bijvoorbeeld Fista *et al.* (2004) melding maken van prei gekocht op de Griekse markt met nitraatconcentraties van slechts 65 tot 186 ppm.

Bij de bereiding van traditionele gefermenteerde Griekse worsten werden vroeger veelal prei en/of ui toegevoegd, terwijl tegenwoordig nitraten en nitrieten worden toegevoegd. Fista *cs.* hebben onderzoek verricht naar de effecten van prei, ui, en nitriet toevoeging aan deze worsten (Fista *et al.*, 2004). De overall beoordeling van een ongetraind Grieks panel was hierbij hoger voor de worsten bereid met prei (240 g/kg) dan die bereid met nitriet. Volgens een getraind Grieks panel was de geur en smaak (na grillen) van deze worsten beter, maar was de kleur van de producten slechter dan die van de controle monsters bereid met nitriet. Hierbij dient opgemerkt te worden dat door de lage concentraties nitraat in de prei, relatief veel prei toegevoegd moest worden aan de worsten.

In een ander onderzoek naar toepassing van kruiden en specerijen in gefermenteerde producten hebben Schnäkel en medewerkers laten zien dat toevoeging van combinaties van jeneverbes, zwarte peper, kummel en gedroogde rode wijn er voor kunnen zorgen dat het product kleurstabiel en minder snel grauw wordt. Ook oregano, mosterdzaadjes en knoflook kunnen hiertoe bijdragen (Schnäkel *et al.*, 2003).

3.2.2 *Toevoeging van vitamine E*

Naast additieven die toegevoegd worden tijdens de bereiding van vleeswaren is ook door meerdere onderzoekers bestudeerd in hoeverre de hoeveelheid nitriet verlaagd kan worden door

toevoeging van extra vitamine E (α -tocoferol) aan varkensvoer, zie bijvoorbeeld (Dineen *et al.*, 2000; Houben *et al.*, 1998; Houben and Gerris, 1998; Houben and Gerris, 2002; Hoving-Bolink *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1998a; Walsh *et al.*, 1998b). Uit al deze onderzoeken blijkt dat het toevoegen van extra vitamine aan het voer een verbeterde kleurstabiliteit (minder afname in roodwaarden onder invloed van licht) en een verminderde oxidatie van het verwerkte product (ham en kalkoenproduct) tot gevolg heeft en dat een reductie (met 50 - 75%) van de nitriettoevoeging mogelijk is afhankelijk van de hoeveelheid vitamine E toevoeging.

Houben heeft verder gekeken naar de verschillen tussen vitamine E toevoeging aan het voer en toevoeging tijdens de productbereiding van gepasteuriseerde gecutterde hamproducten (Houben and Gerris, 1998). Uit dit onderzoek blijkt dat onder vacuüm verpakt gesneden product een initiële daling van de rode kleur laat zien, gevolgd door een verhoging tot ongeveer de initiële waarden. Zowel toevoeging van vitamine E in het voer, waarbij uiteindelijk een concentratie van ongeveer 5 mg/kg vitamine E in het vlees terechtkomt, als toevoeging van 50 mg vit E per kg vlees zorgt er voor dat deze initiële daling geminimaliseerd wordt. In plaats van toevoeging van vitamine E kan ook onder laag zuurstof verpakt worden. Hierbij wordt de initiële daling in roodwaarde niet waargenomen. Hetzelfde onderzoek toont ook dat de concentratie nitriet gehalveerd kan worden naar 54 ppm zonder effect op de roodkleurstabiliteit, indien gebruik wordt gemaakt van de MAP verpakking. De initiële daling in roodkleuring wordt echter wel gezien bij halvering van de hoeveelheid nitriet als het gesneden product vacuüm verpakt wordt. In hoeverre vitamine E is toegestaan als hulpstof in de vleeswaren bereiding is niet helemaal duidelijk in de EU verordening (EU 2092/91 Bijl. IV) wordt vermeld dat E306 (natuurlijke tocoferolextracten) toepast mogen worden met als specifieke gebruiksvoorwaarde “als antioxidant in oliën en vetten”. Toevoeging van extra vitamine E, dan wel natuurlijke tocoferolrijke extracten aan de voeders lijkt wel mogelijk te zijn (EU 2092/91 Bijl. II).

3.2.3 *Angkak*

Een ander vaker voorgesteld kleurmiddel is angkak, de natuurlijke kleurstof die ontstaat na fermentatie van rijst en veel wordt gebruikt in de oosterse keuken (Entel, 1998; Fabre *et al.*, 1993; Leistner, 1994; Sesselmann *et al.*, 1995; Vösgen, 1997). Traditioneel wordt voor de productie van Angkak de Ascomycete *Monascus purpureus* gebruikt. Tegenwoordig worden ook *Monascus ruber* en *Monascus pilosus* gebruikt (Wageningen Universiteit). In een onderzoek van Sesselmann zijn naast Angkak meerdere kleurstoffen getest in meerdere typen vleesproducten. Over het algemeen bleek Angkak hierbij de meest getrouwe kleur op te leveren (Sesselmann *et al.*, 1995). Fabre en anderen concluderen dat Angkak (in de vorm van rode pigmenten van *Monascus ruber*) goed in staat is nitriet, nitraat en cochenille te vervangen in gekookte varkensvleesproducten. De algemene trend was dat het vlees gekleurd met Angkak een betere smaak en textuur bezat dan de controleproducten (Fabre *et al.*, 1993).

De samenstelling van commerciële Angkak producten is zeer variabel. Ook het mycotoxine citrinine is in sommige producten mogelijk aanwezig (Wild, 2000). Dit probleem wordt door

anderen echter weer sterk betwijfeld of zelfs tegengesproken (Vösgen, 1997). In een overzicht van de Wageningen Universiteit blijkt echter dat in enkele commercieel verkrijgbare angkak-producten citrinine analytisch aangetoond kan worden, terwijl in ander preparaten geen citrinine waargenomen kon worden (Wageningen Universiteit).

Er bestaan tegenstrijdige geluiden over het wel of niet toegestaan zijn van het gebruik van Angkak als additief bij de vleesverwerking in Nederland. In een rapport over biologische landbouw geeft de Stichting Voedingscentrum aan dat gefermenteerde rijst aan biologische vleeswaren toegevoegd mag worden (Voedingscentrum, 2001). In een eerdere discussie met TNO, Keuringsdienst van waren en de VWA is echter geconcludeerd dat Angkak niet toegepast mag worden, omdat het alleen tot doel heeft kleur aan te brengen (Verkleij, 2005). Volgens Vösgen heeft het product echter ook een conserverende werking zodat gefermenteerde rijst als een levensmiddel(ingrediënt) gezien moet worden (Vösgen, 1997). In Duitsland is het gebruik van Angkak ook vaker onderwerp van discussie geweest. De laatste jaren wordt er van uitgegaan dat het middel niet is toegestaan bij de bereiding van vleeswaren (Bertling, 2000; Entel, 1998; Lücke, 2003).

3.2.4 CCMP

Gesynthetiseerd dinitrosyl-ferroheamochroom, ook wel CCMP (preformed cooked cured-meat pigment) genoemd wordt door meerdere onderzoekers bestempeld als een van de beste vervangers van nitriet ter verkrijging van de gewenste kleur. CCMP wordt verkregen door chemische modificatie van hemoglobine op labschaal (Pegg *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 1990). De spectrofotometrische eigenschappen van het gesynthetiseerde CCMP zijn identiek aan die van de geëxtraheerde kleurstoffen uit vleesproducten bereid met nitriet (Pegg *et al.*, 2000). De kleurontwikkeling en stabiliteit van vleesproducten bereid met deze toevoeging zijn door meerdere onderzoekers bestudeerd en vertonen zeer goede resultaten (O'Boyle *et al.*, 1990; Pegg *et al.*, 2000; Schnäckel *et al.*, 2003; Shahidi, 1991).

Op zichzelf bezit CCMP enige antioxidatieve activiteit (Shahidi, 1991). De antimicrobiologische en oxidatieve stabiliteit die verkregen wordt bij gebruik van nitriet wordt echter niet verkregen bij gebruik van CCMP (Møller *et al.*, 2003b; O'Boyle *et al.*, 1990). Hiervoor moeten andere alternatieven ingezet worden. Uit onderzoek blijkt dat CCMP een synergistisch effect met ascorbaten vertoont; 12 mg CCMP en 550 mg natriumascorbaat per kg vlees levert een gelijke antioxidatieve activiteit op als 50 mg/kg NaNO₂; toevoeging van natrium tripolyfosfaat in combinatie met CCMP en natriumascorbaat verhoogt de oxidatieve stabiliteit nog verder (Shahidi *et al.*, 1988). In andere ander artikel van Pegg wordt vermeld dat toevoeging van 8 mg CCMP per kg vlees eenzelfde rode kleurwaarde aan het vleesproduct gaf als toevoeging van 156 ppm natriumnitriet. (Pegg *et al.*, 2000). Door de manier van bereiding van CCPM (chemische modificatie op labschaal) voldoet het niet aan de criteria van de IFOAM (International federation of organic agricultural movements) (Jira, 2004).

3.2.5 *Aromatische stoffen*

Verschillende stikstofhoudende heterocyclische en aromatische stoffen als vervanger voor nitriet zijn bestudeerd in het verleden. Voorbeelden hiervan zijn nicotinezuur, pyridine derivaten, terazolen, heterocyclische componenten als purines, pyrimidines, imidazolen, pyrazines en triazines en andere van deze ringstructuren afgeleide producten. Voordeel van deze stoffen is dat deze stoffen ook vaak als antioxidant werken en vaak ook antimicrobiologische activiteiten tegen bacteriën, schimmels en virussen bezitten. Een groot nadeel van deze stoffen is echter dat ze beduidend minder (oxidatie)stabiel zijn dan nitrietverbindingen en hierdoor sneller de gewenste kleur weer verliezen in de tijd (Pegg and Shahidi, 2000). Voor zover bekend mogen al deze stoffen echter niet toegepast worden bij de bereiding van biologische producten.

3.2.6 *Andere kleurstoffen⁴*

Bloukas en medewerkers (1999) hebben gekeken naar Curcumine (E100), Cochenille (E120), karamel (E150a), β -caroteen (E160a), paprika extract (E160g) en Betanine (E162) (alle stoffen toegevoegd in de vorm van commerciële additieven⁵) in combinatie met 0 en 150 mg/kg natriumnitriet bij de bereiding van Frankfurters. De Frankfurters bereid met Betanine werden wat betreft kleur het meest gewaardeerd door consumenten, gevolgd door producten bereid met paprika extract (in beide gevallen zowel met als zonder nitriet toevoeging) en producten bereid met nitriet alleen. Frankfurters bereid met curcumine werden het slechts beoordeeld. Ook bij de bepaling van de overall sensorische score (bepaald door een ongetraind panel) werden de Frankfurters met betanine verkozen boven de andere Frankfurter, waarbij de Frankfurter bereid met nitriet en betanine net iets slechter scoorde dan Frankfurters bereid met alleen betanine). Na variatie van de betanine concentratie wordt geconcludeerd dat voor het behalen van de gewenste kleur de concentratie nitriet verlaagd kan worden van 150 naar 100 ppm indien bij de bereiding 14.4 mg pure betanine per kg worst wordt toegevoegd. Bij hogere betanine concentraties wordt een te rode kleur verkregen.

Sesselmann en medewerkers hebben de effecten van karmijnzuur (cochenille) (E120), allurarood (E129), caroteen (E160a), paprika extract (E160c) en bietenextract (betanine) (E162) niveaus op de sensorisch geëvalueerde kleur(stabiliteit) van verschillende vleesproducten, waaronder Frankfurters (Sesselmann *et al.*, 1995). Hierbij bleek cochenille de beste resultaten op te leveren. De kleur die ontstaat bij gebruik van karmijnzuur komt redelijk overeen met de kleur die ontstaat bij normaal gebruik van nitriet, de kleur is echter net iets te roze. De andere toevoegingen waren niet kleurstabiel genoeg, of vertoonden een te oranje kleur (Sesselmann *et al.*, 1995).

Madsen *et al.* (1993) hebben onderzocht in hoeverre karmijn (een natuurlijke kleurstof, in de vorm van cochenille) in luncheon meat gebruikt kan worden ter vervanging van erythrosine (additionele kleurstof die - naast nitriet - veel gebruikt in bv. luncheon meat en salami) en

⁴ Al deze kleurstoffen zijn niet toegestaan in biologische vleesproducten

⁵ Als voedingsmiddel met kleurend effect zou wel bijvoorbeeld biet of paprika toegestaan zijn

concluderen dat een significant betere kleurstabiliteit ontstaat tijdens bewaring onder invloed van licht en zuurstof.

Stümpel heeft onderzoek verricht naar de effecten van toevoeging van karmijn, betanine en β -caroteen op de fysisch-chemische en sensorische eigenschappen van nitriethoudende kookworsten bereid van varkensvlees (Stümpel, 1997) om op deze manier een kleur te verkrijgen die overeenkomst vertoont met worsten waar naast varkensvlees ook rundvlees in is verwerkt. Geringe hoeveelheden karmijnzuur en betaninen hebben een positief effect op de kleur van de worsten, terwijl caroteen een geeloranje verkleuring tot gevolg heeft. De verschillende toevoegingen hebben geen effect op textuur, smaak en geur van de worsten en bleken zeer goed bestand tegen de opgelegde hittebehandeling.

3.3 Oxidatieremmend en aromavormend

Nitriet is een zeer goede antioxidant die vetoxidatie tegengaat. Nitriet is echter niet uniek, en veel verschillende toevoegingen of combinaties van toevoegingen zijn in staat vetoxidatie tegen te gaan en hiermee het ontstaan van afwijkende aroma's, zoals ranzigheid en warmed-over-flavour (O'Boyle *et al.*, 1990; Pegg and Shahidi, 2000; Shahidi and Pegg, 1992; Tang *et al.*, 2001).

Tang en anderen geven naast een opsomming van synthetische antioxidanten een opsomming van mogelijke natuurlijke antioxidanten: extracten van rozemarijn, salie, verschillende groentes, sojabonen, citrusschillen, sesam zaad, olijven, carob dop, druiven, paprika, en knoflook en thee (Tang *et al.*, 2001). Aan de hand van experimenten hebben ze de effecten van groene thee catechines op vetoxidatie onderzocht. Geconcludeerd wordt dat 1% NaCl pro-oxidatief werkt, maar dat deze pro-oxidatie verhinderd werd door toevoeging van de 300 mg catechines per kg vlees, en de vetoxidatie hiermee beheerst kon worden. Een reductie van de vetoxidatie met 80% werd gevonden voor verkleinde gekookte varkensproducten die gedurende 10 dagen bij 4 °C onder licht bewaard zijn.

In hun boek geven Pegg en Shahidi een grote opsomming van mogelijke anti-oxidanten, zoals tert-butyldrochinon, tetra-natriumpyrofosfaat, EDTA, natrium-ascorbaat en etherische oliën (Pegg and Shahidi, 2000). In veel gevallen blijkt een gelijke oxidatiestabiliteit verkrijgbaar te zijn indien nitriet wordt vervangen door alternatieven. Al-Shuibi en Al-Abdullah hebben onderzocht in welke mate nitriet vervangen kan worden door natriumsorbaat bij de productie van mortadella (Al-Shuibi and Al-Abdullah, 2002). Zij concluderen dat de hoeveelheid nitriet minimaal verlaagd kan worden van 120 naar 80 ppm, indien 1000 of 2600 ppm sorbaat wordt toegevoegd voor een gelijkblijvende antioxidatieve werking. Toevoeging van 2600 ppm lijkt (niet significant) hierbij de sensorische kwaliteit te verslechteren t.o.v. 1000 ppm. De gepresenteerde resultaten vertonen echter grote spreiding.

Zoals in paragraaf 2.2 beschreven is ontstaat niet het gewenste pekelaaroma als nitriet volledig vervangen wordt door andere anti-oxidanten. Een verklaring voor het ontstaan van dit aroma kan

nog steeds niet gegeven worden (Arneth, 2001). De antioxidatieve en pekelaaroma vormende effecten kunnen daarom tot op heden niet bereikt worden als totaal geen nitriet gebruikt wordt (Lücke, 2003).

4 Conclusies en aanbevelingen voor onderzoek

Uit dit literatuuroverzicht blijkt dat er geen ingrediënten bekend zijn die ter vervanging van nitriet in de vleeswarenbereiding toegepast kunnen worden en hierbij alle functies van nitriet kunnen overnemen. Wel wordt verondersteld dat de hoeveelheid nitriet die wordt gebruikt tijdens de bereiding verlaagd kan worden, zonder dat de kwaliteit van de vleeswaren hierbij aangetast wordt. Als eerste indicatie volgt uit de literatuurstudie dat toevoeging van 60 à 70 ppm nitriet al voldoende is voor het verkrijgen van de 1) gewenste kleuring, 2) kleurstabiliteit, 3) het ontstaan van het gewenste pekelaroma en de 4) antioxidatieve werking. Wel moet de vleeswaar aan bepaalde samenstellingen voldoen en onder koeling opgeslagen worden.

Voor het verkrijgen van de gewenste antioxidatieve werking, zou het wellicht nog mogelijk zijn andere biologische ingrediënten, zoals kruiden of thee (extracten) als alternatief voor nitriet te gebruiken. Mogelijk zou dit alleen of in combinatie met toevoeging van extra vitamine E aan het varkensvoer tot het gewenste resultaat leiden. Voor het vervullen van de andere drie eigenschappen (kleur, kleurstabiliteit en aroma) lijkt (nog) geen effectief alternatief biologisch ingrediënt te bestaan.

Voor het verkrijgen van de gewenste conserverende werking kan niet direct een richtlijn gegeven worden voor de minimaal noodzakelijke hoeveelheid nitriet. Deze is sterk afhankelijk van de hygiëne, verpakkings- en logistieke aspecten in de keten. Volgens de literatuurgegevens kan deze conserverende werking mogelijk ook door gebruikmaking van andere ingrediënten gerealiseerd worden (soms met uitsluiting van nitriet, soms samen met nitriet). Echter deze alternatieven zijn veelal niet toepasbaar voor het bereiden van biologische producten. Voor de wel biologisch toegestane ingrediënten zal per product(ieketen) bekeken moeten worden of de conserverende werking voldoende is.

Als vervolg op deze literatuurstudie worden experimentele testen uitgevoerd waarbij de kleurontwikkeling en stabiliteit in de tijd gevolgd worden, van vleeswaren bereid met een verlaagde hoeveelheid nitriet. Verwacht wordt dat een standaard verlaging van de nitriethoeveelheid naar 80 ppm nog geen groot effect zal hebben op de kwaliteit van de vleeswaren. Wordt 50 ppm nitriet gebruikt dan zou het kunnen zijn dat initieel de gewenste kleur wordt verkregen, maar dat deze kleur minder stabiel is dan die van de huidige vleeswaren. Voorgesteld wordt daarom vleeswaren (boterhamworst en ham) te produceren met 0, 50 en 80 ppm nitriet en de kleur(stabiliteit) van deze producten onderling en t.o.v. de commerciële varianten te volgen in de tijd. De producten zullen hierbij na slicen onder een beschermende atmosfeer verpakt en maximaal 4 weken bij 7 °C bewaard moeten worden. In een parallelle test zal de microbiologische stabiliteit van met *clostridium* sporen geënte vleeswaren met gereduceerde hoeveelheid nitriet gevolgd worden in de tijd.

Literatuur

- Al-Shuibi, A.M. and B.M. Al-Abdullah (2002) Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. *Meat Science* 62(4), 473-478.
- Anon (2003) Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal* 14, 1-34.
- Archer, D.L. (2002) Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *Journal of Food Protection* 65(5), 872-875.
- Arendt, B., L.H. Skibsted and H.J. Andersen (1997) Antioxidative activity of nitrite in metmyoglobin induced lipid peroxidation. *Food Research and Technology* 204(1), 7-12.
- Arneth, W. (2001) Chemistry of curing meat flavour. *Fleischwirtschaft* 81(3), 85-87.
- Bekhit, A.E.D., G.H. Geesink, M.A. Ilian, J.D. Morton and R. Bickerstaffe (2003) The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry* 81(2), 175-187.
- Benedict, R.C. (1980) Biochemical basis for nitrite-inhibition of *Clostridium botulinum* in cured meat. *Journal of Food Protection* 43(11), 877-891.
- Bertling, L. (2000) Angkak ist zulassungsbedürftig. *Fleischwirtschaft* 80(3), 34.
- Binstok, G., C. Campos, O. Varela and L.N. Gerschenson (1998) Sorbate-nitrite reactions in meat products. *Food Research International* 31(8), 581-585.
- Blom-Zandstra, M. (1989) Nitrite accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology* 115, 553-561.
- Bloukas, J.G., I.S. Arvanitoyannis and A.A. Siopi (1999) Effect of natural colorants and nitrites on colour attributes of frankfurters. *Meat Science* 52(3), 257-265.
- Blunk, H.C. (1993) Sodium ascorbate and sodium erythorbate. A comparison between the technological properties in the processing of cooked cured products. *Fleischwirtschaft* 73(10), 1163-1164.
- Buncic, S., C.M. Fitzgerald, R.G. Bell and J.A. Hudson (1995) Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. *Journal of Food Safety* 15(3), 247-264.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3), 223-253.
- Cassens, R.G. (1997) Residual nitrite in cured meat. *Food Technology* 51(2), 53-55.
- Chasco, J., G. Lizaso and M.J. Beriain (1996) Cured colour development during sausage processing. *Meat Science* 44(3), 203-211.

- Christiansen, L.N., R.B. Tompkin and A.B. Shaparis (1978) Fate of *Clostridium botulinum* in perishable canned cured meat at abuse temperature. *Journal of Food Protection* 41(5), 354-355.
- Connolly, B.J., R.G. Brannan and E.A. Decker (2002) Potential of peroxy nitrite to alter the color of myoglobin in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18), 5220-5223.
- Cranston, P.M. (1997) Curing meat with nitric oxide, EP 0 804 880 A1. BOC Gases Australia Ltd., Patent No EP 0 804 880 A1.
- de Vegt, B. (1997) Secret Ingredients. *Meat Processing* December 1997.
- Demasi, T.W., L.W. Grimes, R.L. Dick and J.C. Acton (1989) Nitrosoheme pigment formation and light effects on color properties of semidry, nonfermented and fermented sausages. *Journal of Food Protection* 52(3), 189-193.
- Dineen, N.M., J.P. Kerry, P.B. Lynch, D.J. Buckley, P.A. Morrissey and E.K. Arendt (2000) Reduced nitrite levels and dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation: effects on the colour and oxidative stability of cooked hams. *Meat Science* 55(4), 475-482.
- Duffy, L.L., P.B. Vanderlinde and F.H. Grau (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *International Journal of Food Microbiology* 23(3/4), 377-390.
- Entel, S.A. (1998) Angkak - Zulassungspflichtiger Zusatzstoff oder charakteristische Lebensmittelzutat? *Fleischwirtschaft* 78(12), 1269-1270.
- EU 2092/91 Bijl. II Verordening Nr 2092/91 Inzake de biologische productiemethode en aanduidingen dienaangaande op landbouwproducten en levensmiddelen, Bijlage II D.
- EU 2092/91 Bijl. IV Verordening Nr 2092/91 Inzake de biologische productiemethode en aanduidingen dienaangaande op landbouwproducten en levensmiddelen, Bijlage IV
- Fabre, C.E., A.L. Santerre, M.O. Loret, R. Baberian, A. Pareilleux, G. Goma and P.J. Blanc (1993) Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science* 58(5), 1099-1102, 1110.
- Fischer, A., A. Bristle, U. Gehring, K. Herrmann and M. Gibis (2005a) Reddening of emulsion type sausage without nitrite curing salt - Part 1: colour, colour stabilisation, nitrite and nitrate concentrations, sensory properties. *Fleischwirtschaft* 85(4), 110-115.
- Fischer, A., K. Ulmer, G. Wolf and A. Bristle (2005b) Reddening of emulsion type sausage without nitrite curing salt - Part 2. Influence on microbial growth, shelf life and sensory properties. *Fleischwirtschaft* 85(5), 106-109.
- Fista, G.A., J.G. Bloukas and A.S. Siomos (2004) Effect of leek and onion on processing and quality characteristics of Greek traditional sausages. *Meat Science* 68(2), 163-172.

- Footitt, R.J. and A.S. Lewis (1995) *The canning of fish and meat*. Blackie Academic & Professional, London, UK, ISBN 0751400114.
- Fox, J.B. (1966) The chemistry of meat pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 14(3), 207-210.
- Fox, J.B., Jr. and S.A. Ackerman (1968) Formation of nitric oxide myoglobin: mechanisms of the reaction with various reductants. *Journal of Food Science* 33(4), 364-370.
- Giddings, G.G. (1977) The basis of color in muscle foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 9(1), 81-114.
- Goutefongea, R., R.G. Cassens and G. Woolford (1977) Distribution of sodium nitrite in adipose tissue during curing. *Journal of Food Science* 42(6), 1637-1641.
- Grever, A.B.G. and A. Ruiter (2001) Prevention of Clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite - a review. *European Food Research and Technology* 213(3), 165-169.
- Grever, A.B.G., L.J. Schuddeboom and L.L. de Vos (1998) Nitriet (mede)veroorzaker van ijzertekort. *Voedingsmiddelentechnologie* 31(26), 33-34.
- Hall, M.A. (1983) Nitrite substitutes in further processed poultry products. Thesis University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin USA.
- Hauschild, A.H.W., R. Hilsheimer, G. Jarvis and D.P. Raymond (1982) Contribution of nitrite to the control of Clostridium botulinum in liver sausage. *Journal of Food Protection* 45(6), 500-506.
- Hauschild, A.H.W. and B. Simonsen (1985) Safety of shelf-stable canned cured meats. *Journal of Food Protection* 48(11), 997-1009.
- Holley, R.A. and D. Patel (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22(4), 273-292.
- Hotchkiss, J.H. and R.G. Cassens (1987) Nitrate, nitrite, and nitroso compounds in foods. *Food Technology* 41 (4), 127-136.
- Houben, J.H., G. Eikelenboom and A.H. Hoving-Bolink (1998) Effect of the dietary supplementation with vitamin E on colour stability and lipid oxidation in packaged, minced pork. *Meat Science* 48(3-4), 265-273.
- Houben, J.H. and C.V.M. Gerris (1998) Effect of the dietary supplementation with vitamin E on colour stability of packaged, sliced pasteurized ham. *Meat Science* 50(4), 421-428.
- Houben, J.H. and C.V.M. Gerris (2002) In vivo or in vitro application of vitamin E and the colour stability of low-oxygen packaged, sliced, pasteurised, differently cured pork shoulder model products. *European Food Research and Technology* 215(5), 384-389.

- Hoving-Bolink, A.H., G. Eikelenboom, J.T.M. Van Diepen, A.W. Jongbloed and J.H. Houben (1998) Effect of dietary vitamin E supplementation on pork quality. *Meat Science* 49(2), 205-212.
- Huhtanen, C.N. (1983) Antibotulinal activity of methyl and ethyl fumarates in comminuted nitrite-free bacon. *Journal of Food Science* 48(5), 1574-1575.
- Huhtanen, C.N. (1984) Nitrite substitutes for controlling *Clostridium botulinum*. *Developments in Industrial Microbiology* 25, 349-362.
- Ismail, A. and M.D. Pierson (1990) Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. *Journal of Food Science* 55(6), 1676-1678.
- Jira, W. (2004) Chemical reactions of curing and smoking. Part 1. Curing. *Fleischwirtschaft* 84(5), 235-239.
- Juncher, D., B. Rønn, T. Beck Hansen, P. Henckel, A. Karlsson, L.H. Skibsted and G. Bertelsen (2003) Effect of pre-slaughter physiological conditions on the oxidative stability of colour and lipid during chill storage of sliced, retail packed roast ham. *Meat Science* 63(2), 151-159.
- Kanner, J. (1979) S-nitrosocysteine (RSNO), an effective antioxidant in cured meat. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56(2), 74-76.
- Kanner, J., I. Ben Gera and S. Berman (1980) Nitric-oxide myoglobin as an inhibitor of lipid oxidation. *Lipids* 15(11), 944-948.
- Kanner, J., S. Harel, J. Shagalovich and S. Berman (1984) Antioxidative effect of nitrite in cured meat products: nitric oxide-iron complexes of low molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32(3), 512-515.
- Killday, K.B., M.S. Tempesta, M.E. Bailey and C.J. Metral (1988) Structural characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implications in the meat-curing reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36(5), 909-914.
- Klettner, P.-G. and K. Troeger (2000) Technology of processing fermented sausage and cooked sausage with reduced nitrite addition. *Fleischwirtschaft* 80(5), 82-85.
- Kolb, H., G. Heinz and H.W. Wiegand (1990) Möglichkeiten der Farbbeeinflussung durch Pökeln. Übersicht. *Fleischwirtschaft* 70(9), 956-960, 965-966, 1050.
- Leistner, L. (1979) The current situation with respect to nitrate/nitrite problems. *Fleischerei* 30(8), 603-608.
- Leistner, L. (1994) Die ernährungsphysiologische Bedeutung von Angkak. *Fleischwirtschaft* 74(7), 772, 775-778.

- Lin, H.S. and J.G. Sebranek (1979) Effect of sodium nitrite concentration and packaging conditions on color stability and rancidity development in sliced bologna. *Journal of Food Science* 44(5), 1451-1454.
- Lin, H.S., J.G. Sebranek, D.E. Galloway and K.D. Lind (1980) Effect of sodium erythorbate and packaging conditions on color stability of sliced bologna. *Journal of Food Science* 45(1), 115-118, 121.
- Lücke, F.K. (1999) Assessment of the technological necessity of the use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. *Fleischwirtschaft* 79(10), 96-98.
- Lücke, F.K. (2003) Einsatz von Nitrit und Nitrat in der ökologischen Fleischverarbeitung: Vor- und Nachteile. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung* 160(Juni), 95-104.
- Lücke, F.K. and T.A. Roberts (1993) Control in meat and meat products. In *Clostridium botulinum, Ecology and control in foods*. Eds. H W Hauschild and K L Dodds. pp 177-207. Marcel Dekker, New York.
- Maas, M.R., K.A. Glass and M.P. Doyle (1989) Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9), 2226-2229.
- Maca, J.V., R.K. Miller and G.R. Acuff (1997a) Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged ground beef patties treated with salts of organic acids. *Journal of Food Science* 62(3), 591-596.
- Maca, J.V., R.K. Miller, J.D. Maca and G.R. Acuff (1997b) Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged cooked beef top rounds treated with sodium lactate and sodium propionate. *Journal of Food Science* 62(3), 586-590, 596.
- MacDougall, D.B. and M.J. Hetherington (1992) The minimum quantity of nitrite required to stain sliced and homogenised cooked pork. *Meat Science* 31, 202-210.
- Madsen, H.L., H. Stapelfeldt, G. Bertelsen and L.H. Skibsted (1993) Cochineal as a colorant in processed pork meat. Colour matching and oxidative stability. *Food Chemistry* 46(3), 265-271.
- Mancini, R.A. and M.C. Hunt (2005) Current research in meat color. *Meat Science* 71(1), 100-121.
- Møller, J.K.S., M. Jakobsen, C.J. Weber, T. Martinussen, L.H. Skibsted and G. Bertelsen (2003a) Optimisation of colour stability of cured ham during packaging and retail display by a multifactorial design. *Meat Science* 63(2), 169-175.
- Møller, J.K.S., J.S. Jensen, L.H. Skibsted and S. Knochel (2003b) Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture. *European Food Research and Technology* 216(6), 463-469.

- Muermans, M.L.T. and F.K. Stekelenburg (1993) Modelling van de groeisnelheid van melkzuurbacteriën in vacuümverpakte boterhamworst; invloed van nitrietgehalte. Rapport nr. B 93.175. TNO Voeding, Zeist
- Mulder, S.J. and G. Wijngaards (1991) Effecten van ascorbaat op de kleur en vetoxydatie van bacon. Rapport nr. T 91.175. TNO Voeding, Zeist
- Nerbrink, E., E. Borch, H. Blom and T. Nesbakken (1999) A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. *International Journal of Food Microbiology* 47(1/2), 99-109.
- O'Boyle, A.R., L.J. Rubin, L.L. Diosady, N. Aladin Kassam, F. Comer and W. Brightwell (1990) A nitrite-free curing system and its application to the production of wieners. *Food Technology* 44(5), 88, 90-91, 93, 95-96, 98, 100, 102-104.
- Olsman, W.J. and C.M. van Leeuwen (1982) Het nut van ascorbinezuur bij de bereiding van hammen en schouders. Rapport nr. T 83.014. CIVO-Instituten TNO, Zeist
- Paquet, A. and K. Rayman (1987) Some N-acyl-D-amino acid derivatives having antibotulinal properties. *Canadian Journal of Microbiology* 33(7), 577-582.
- Pegg, R.B., K.M. Fisch and F. Shahidi (2000) Ersatz herkömmlicher Pökellung durch nitritfreie Pökelsysteme. *Fleischwirtschaft* 80(5), 86-89.
- Pegg, R.B. and F. Shahidi (2000) Possible substitutes for nitrite. In *Nitrite curing of meat -The N-Nitrosamine problem and nitrite alternatives*. pp 209-253. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, Connecticut USA.
- Petäjä, E. (1977) Untersuchungen über die Verwendungsmöglichkeiten von Starterkulturen bei Brühwurst. [Investigations on use of starter cultures in Frankfurter-type sausages.]. *Fleischwirtschaft* 57(1), 109-112.
- Pierson, M.D. and L.A. Smoot (1982) Nitrite, Nitrite alternatives, and the control of *Clostridium Botulinum* in cured meats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 17(2), 141-187.
- Pivnick, H. and P.C. Chang (1974) Perigo effect in pork. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products* Zeist, The Netherlands, 111-116.
- Roberts, T.A. and A.M. Gibson (1986) Chemical methods for controlling *Clostridium botulinum* in processed meats. *Food Technology* 40(4), 163-171, 176.
- Roberts, T.A. and M. Ingram (1966) The effect of sodium chloride, potassium nitrate and sodium nitrite on the recovery of heated bacterial spores. *Journal of Food Technololy* 8, 467.
- Ronning, I.E. and H.A. Frank (1988) Growth response of putrefactive anaerobe 3679 to combinations of potassium sorbate and some common curing ingredients (sucrose, salt, and nitrite), and to noninhibitory levels of sorbic acid. *Journal of Food Protection* 51(8), 651-654, 657.

- Rubin, L.J., L.L. Diosady and A.R. O'Boyle (1990) A nitrite-free meat-curing system. *Food Technology* 44(6), 130.
- Ruiter, A. and A.B.G. Grever (2001) Nitriet: Een bijzonder conserveermiddel. *Voedingsmiddelentechnologie* 34(21), 48-50.
- Sabah, J.R., V.K. Juneja and D.Y.C. Fung (2004) Effect of spices and organic acids on the growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground beef. *Journal of Food Protection* 67(9), 1840-1847.
- Schnäckel, W., D. Wiegand and D. Schnäckel (2003) Stabilization of colour of raw dried fermented sausages without nitrite with spices. *Fleischwirtschaft* 83(4), 95-99.
- Sebranek, J.G. (1979) Advances in the technology of nitrite use and consideration of alternatives. *Food Technology* 33(7), 58-62, 93.
- Sen, N.P. and P.A. Baddoo (1997) Trends in the levels of residual nitrite in Canadian cured meat products over the past 25 years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(12), 4714-4718.
- Sesselmann, U., E. Brunner and M. Zellner (1995) Farbstoffe in Fleischerzeugnissen. Neue Möglichkeiten aufgrund der 'EG-Richtlinie ueber Farbstoffe, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen'. *Fleischwirtschaft* 75(11), 1288-1291, 1324.
- Shahidi, F. (1991) Developing alternative meat-curing systems. *Trends in Food Science & Technology* 2(9), 219-222.
- Shahidi, F. and R.B. Pegg (1992) Nitrite-free meat curing systems: update and review. *Food Chemistry* 43(3), 185-191.
- Shahidi, F., L.J. Rubin and D.F. Wood (1988) Stabilization of meat lipids with nitrite-free curing mixtures. *Meat Science* 22(1), 73-80.
- Skovgaard, N. (1992) Microbiological aspects and technological need: technological needs for nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants* 9(5), 391-397.
- Sofos, J.N. and F.F. Busta (1980) Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. *Food Technology* 34(5), 244-251.
- Stekelenburg, F.K. (1996) Onderzoek naar de aanwezigheid van pathogene micro-organismen en het type bederfflora in gesneden vleeswaren. Rapport Nr. V96.266. TNO Voeding, Zeist
- Stekelenburg, F.K. (1999) Aanbevelingen voor de productie van buiten de koeling houdbare in eindverpakking gepasateuriseerde rookworst of soortgelijke producten. In *Handboek voor de vleeswarenindustrie*, 7.8. Bedrijfschap voor de vleeswarenindustrie, 's Gravenhage, The Netherlands.

- Stekelenburg, F.K. (2002) Enhanced inhibition of *L. monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. *International Journal of Food Microbiology*, (concept).
- Stekelenburg, F.K. and M.L.T. Kant Muermans (2001) Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 66(3), 197-203.
- Stekelenburg, F.K. and H. Labots (1980) Bacteriologie van gesneden vleeswaren. *Vleesdistributie en Vlees Technologie* 7, 18-21.
- Stümpel, G. (1997) Eigenschaften von mit Karmin, Betanin und beta-Carotin gefärbter Brühwurst. Application of carmine, betanin and beta-carotene in cooked sausage. *Fleischwirtschaft* 77(5), 435-438, 454.
- Tang, S., J.P. Kerry, D. Sheehan, D.J. Buckley and P.A. Morrissey (2001) Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International* 34(8), 651-657.
- Thiemig, F., U. Tsedendamba and P. Oelker (2001) The red-colour development in emulsions of scalding sausages with a gas mixture of nitric oxide and nitrogen. *Fleischwirtschaft* 81(9), 101-106.
- Tompkin, R.B. (1979) The role and mechanism of the inhibition of *C. botulinum* by nitrite - is a replacement available? In 31th Annual Reciprocal Meat Conference 135-147.
- Tompkin, R.B., L.N. Christiansen and A.B. Shaparis (1980) Antibotulinal efficacy of sulfur dioxide in meat. *Applied and Environmental Microbiology* 39(6), 1096-1099.
- Tyszkiewicz, I. and Z. Baldwin (1986) Sensoric and chemical limits in lowering the dose of sodium nitrite in the process of meat curing. *Nahrung* 30(2), 141-145.
- Verkleij, T. (2005) Toepasbaarheid Angkak in biologische vleesproducten *persoonlijke mededeling*.
- Voedingscentrum (2001) Eten van biologische landbouw deel II: Biologische producten. Stichting Voedingscentrum Nederland
- Vösgen, W. (1997) Verwendung von fermentiertem Reis in Fleischprodukten. *Fleischwirtschaft* 77(1), 32, 34, 58.
- Wageningen Universiteit Ang-Kak, Literatuurrecherche T30. <http://www.food-info.net/nl/national/verslag-angkak.htm>
- Wagner, M.K. (1986) Phosphates as antibotulinal agents in cured meats: a review. *Journal of Food Protection* 49(6), 482-487.
- Wagner, M.K. and F.F. Busta (1983) Effect of sodium acid pyrophosphate in combination with sodium nitrite or sodium nitrite/potassium sorbate on *Clostridium botulinum* growth and

- toxin production in beef/pork frankfurter emulsions. *Journal of Food Science* 48(3), 990-991, 993.
- Walsh, M.M., J.F. Kerry, D.J. Buckley, E.K. Arendt and P.A. Morrissey (1998a) Effect of dietary supplementation with alpha-tocopheryl acetate on the stability of reformed and restructured low nitrite cured turkey products. *Meat Science* 50(2), 191-201.
- Walsh, M.M., J.F. Kerry, D.J. Buckley, P.A. Morrissey, P.B. Lynch and E. Arendt (1998b) The effect of dietary supplementation with alpha-tocopheryl acetate on the stability of low nitrite cured pork products. *Food Research International* 31(1), 59-63.
- White, J.W., Jr. (1975) Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23(5), 886-891.
- Wild, D. (2000) Red mould rice (Angkak). Analysis and detection in meat products. *Fleischwirtschaft* 80(10), 91-93.
- Wirth, F. (1991) Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtschaft* 71(9), 1051-1054.
- Wood, D.S., D.L. Collins Thompson, W.R. Osborne and B. Picard (1986) An evaluation of antibotulinal activity in nitrite-free curing systems containing dinitrosyl ferrohemochrome. *Journal of Food Protection* 49(9), 691-695.
- Woods, L.J.F., J.M. Wood and P.A. Gibbs (1989) Nitrite. In *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Ed. G W Gould, London - New York.
- Zubillaga, M.P., G. Maerker and T.A. Foglia (1984) Antioxidant activity of sodium nitrite in meat. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61(4), 772-776.

Bijlage

Bijlage 1 Bijlage-VI van de biologische verordening

DEEL A - INGREDIËNTEN VAN NIET-AGRARISCHE OORSPRONG

A.1. Levensmiddelenadditieven, inclusief dragers:

Naam	Specifieke gebruiksvoorwaarden
E 170 Calciumcarbonaat	Alle toegestane vormen van gebruik behalve als kleurstof
E 270 Melkzuur	-
E 290 Kooldioxide	-
E 296 Appelzuur	-
E 300 Ascorbinezuur	-
E 306 Tocopherolextract	Antioxidant in oliën en vetten
E 322 Lecithinen	-
E 330 Citroenzuur	-
E 333 Calciumcitraten	-
E 334 Wijnsteenzuur (L(+)-)	-
E 335 Natriumtartraten	-
E 336 Kaliumtartraten	-
E 341(i) Monocalciumfosfaat	Rijsmiddel voor zelfrijzend bakmeel
E 400 Alginezuur	-
E 401 Natriumalginaat	-
E 402 Kaliumalginaat	-
E 406 Agar-agar	-
E 407 Carrageen	-
E 410 Johannesbroodpitmeel	-
E 412 Guarpitmeel	-
E 413 Tragacanth	-
E 414 Arabische gom	-
E 415 Xanthaangom	-
E 416 Karayagom	-
E 422 Glycerol	Plantenextracten
E 440(i) Pectine	-
E 500 Natriumcarbonaten	-
E 501 Kaliumcarbonaten	-
E 503 Ammoniumcarbonaten	-
E 504 Magnesiumcarbonaten	-
E 516 Calciumsulfaat	Drager
E 524 Natriumhydroxide	Behandeling van het oppervlak van Laugengebäck
E 551 Siliciumdioxide	Antiklontermiddel voor kruiden en specerijen
E 938 Argon	-
E 941 Stikstof	-
E 948 Zuurstof	-

A.2. Aroma's als gedefinieerd in Richtlijn 88/388/EEG:

Stoffen en producten als gedefinieerd in artikel 1, lid 2, onder b), i), en artikel 1, lid 2, onder c), van Richtlijn 88/388/EEG, die overeenkomstig artikel 9, lid 1, onder d), en lid 2 van voornoemde richtlijn op het etiket zijn aangeduid als natuurlijke aromastoffen of natuurlijke aromatiserende preparaten.

A.3. Water en zout:

Drinkwater

Zout (met natriumchloride of kaliumchloride als basiscomponenten) dat in het algemeen wordt gebruikt bij de vervaardiging van levensmiddelen.

A.4. Preparaten op basis van micro-organismen:

Preparaten op basis van micro-organismen die gewoonlijk worden gebruikt bij de productie van levensmiddelen, met uitzondering van genetisch gemodificeerde organismen als gedefinieerd in artikel 2, lid 2, van Richtlijn 90/220/EEG.

A.5. Mineralen (incl. spoorelementen), vitaminen, aminozuren en andere stikstofverbindingen:

Mineralen (inclusief spoorelementen), vitaminen, aminozuren en andere stikstofverbindingen zijn alleen toegelaten voor zover ze volgens de wet aan levensmiddelen moeten worden gevoegd.

DEEL B - TECHNISCHE HULPSTOFFEN EN ANDERE PRODUCTEN

Naam	specifieke gebruiksvoorwaarden
Water	-
Calciumchloride	Coagulatiemiddel
Calciumcarbonaat	-
Calciumhydroxide	-
Calciumsulfaat	Coagulatiemiddel
Magnesiumchloride (of nigari)	Coagulatiemiddel
Kaliumcarbonaat	Drogen van druiven
Natriumcarbonaat	Suikerproductie
Citroenzuur	Olieproductie en zetmeelhydrolyse
Natriumhydroxide	Suikerproductie
Zwavelzuur	Productie van raapzaadolie (Brassica spp)
Isopropanol (2-propanol)	Suikerproductie Voor het kristallisatieproces bij de suikerbereiding Met inachtneming van het bepaalde in Richtlijn 88/344/EEG, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 97/60/EEG. Voor een (...) periode eindigend op 31 december 2006
Kooldioxide	-
Stikstof	-
Ethanol	Oplosmiddel
Looizuur	Hulpstof bij filtreren
Eiwitalbumine	-
Caseïne	-
Gelatine	-
Isinglass	-
Plantaardige oliën	Plaatsmeermiddel, losmiddel of anti-schuimmiddel
Siliciumdioxidegel of colloïdale oplossing	-
Actieve kool	-
Talk	-
Bentoniet	-
Kaolien	-
Diatomeeënaarde	-

Naam	specifieke gebruiksvoorwaarden
Perliet	-
Hazelnootdoppen	-
Rijstmeel	-
Bijenwas	Losmiddel
Carnaubawas	Losmiddel

Preparaten op basis van micro-organismen en enzymen die gewoonlijk worden gebruikt als technische hulpstof bij de productie van levensmiddelen, met uitzondering van genetisch gemodificeerde micro-organismen als gedefinieerd in artikel 2, lid 2, van Richtlijn 90/220/EEG, en met uitzondering van enzymen die zijn geproduceerd met genetisch gemodificeerde micro-organismen als gedefinieerd in artikel 2, lid 2, van Richtlijn 90/220/EEG.

DEEL C - INGREDIËNTEN VAN AGRARISCHE OORSPRONG DIE NIET BIOLOGISCH ZIJN GEPRODUCEERD

C.1. Onverwerkte plantaardige producten en producten daarvan verkregen via de procédés als bedoeld in punt 2, onder a), van de inleiding van deze bijlage:

C.1.1. Eetbare vruchten, noten en zaden:

Nederlandse naam	Wetenschappelijke naam
Eikels	Quercus spp
Colanoten	Cola acuminata
Kruisbessen	Ribes uva-crispa
Maracujas (Passievruchten)	Passiflora edulis
Frambozen (gedroogd)	Rubus idaeus
Rode aalbessen (gedroogd)	Ribes rubrum

C.1.2. Eetbare specerijen en kruiden:

Nederlandse naam	Wetenschappelijke naam
Peruaanse peper	Schinus molle L.
Mierikswortelzaad	Armoracia rusticana
Kleine galangal	Alpinia officinarum
Saffloerbloemen	Carthamus tinctorius
Waterkerskruid	Nasturtium officinale

C.1.3. Varia:

Algen, inclusief zeewier, die in de bereiding van conventionele voeding mogen worden gebruikt.

C.2. Plantaardige producten, verkregen via de procédés als bedoeld in punt 2 onder b), van de inleiding van deze bijlage:

C.2.1. Oliën en vetten, wel of niet geraffineerd, doch niet chemisch gemodificeerd, met uitzondering van:

Nederlandse naam	Wetenschappelijke naam
Cacao	Theobroma cacao
Kokos	Cocos nucifera
Olijven	Olea europaea
Zonnebloem	Helianthus annuus
Palm	Elaeis guineensis
Kool- en raapzaad	Brassica napus, rapa
Saffloer	Carthamus tinctorius
Sesam	Sesamum indicum
Soja	Glycine max

C.2.2. Volgende suikers, zetmeel en andere producten op basis van granen en knollen:

Fructose
Rijstpapier
Ouwel
Zetmeel van rijst en uit kleeftmaïs, niet chemisch gemodificeerd.

C.2.3. Varia:

Eiwit uit erwten *Pisum* spp.
Rum: uitsluitend bereid uit suikerrietsap
Kirsch bereid op basis van vruchten en smaakstoffen als bedoeld in deel A.2 van deze bijlage.

C.3. Dierlijke producten:

Aquatische organismen, niet afkomstig van aquacultuur, die in de bereiding van conventionele voeding mogen worden gebruikt
Gelatine
Weipoeder "herasuola".

Toegestane stoffen volgens de Skal-normen

In aanvulling op bijlage VI deel A van Verordening 2092/91 mag gebruikt worden:

Naam	Specifieke gebruiksvoorwaarden
Calciumchloride (CaCl ₂)	alleen in kaas
Krijt	alleen in honden- en kattenvoer
Vitaminen	alleen in honden- en kattenvoer
Mineralen en spore-elementen	alleen in honden- en kattenvoer
Zuivere aminozuren	alleen in honden- en kattenvoer
Organische zuren	alleen in honden- en kattenvoer
Rozemarijnextract	alleen in honden- en kattenvoer
E 220 Zwaveldioxide	alleen in wijn
E 224 Kaliummetabisulfit	alleen in wijn
E 250 Nitriet	alleen in vleeswaren, tot 1 januari 2006
E 325 Na-lactaat	alleen in vleeswaren
E 326 K-lactaat	alleen in vleeswaren
E 327 Ca-lactaat	alleen in vleeswaren