



IDF Factsheets 15/2020 Listopad 2020

Uwaga: Niniejsze tłumaczenie na język polski zostało sfinansowane ze środków FUNDUSZU PROMOCJI MLEKA

Azotany naturalnie występujące w serach

Streszczenie

Azotany mogą występować w serze w sposób naturalny. Dodawanie azotanów w produkcji sera nie jest powszechne, ponieważ nieraz jakość mleka i technologia produkcji uwzględniają pierwotny cel takich dodatków, tj. hamowanie wzrostu niektórych bakterii powodujących psucie się produktu, co może stwarzać problemy z jakością sera. W zastosowaniu do niektórych gatunków sera, naturalny rozkład azotanów i azotynów podczas dojrzewania prowadzi do ich niskiej zawartości, ale zapewnia jednocześnie dobrą jakość sera. Niniejszy dokument zawiera przegląd omawianego zagadnienia i pokazuje w jaki sposób poszukuje się nowoczesnych praktyk w zakresie produkcji sera, aby uniknąć potrzeby dodawania azotanów/azotynów.

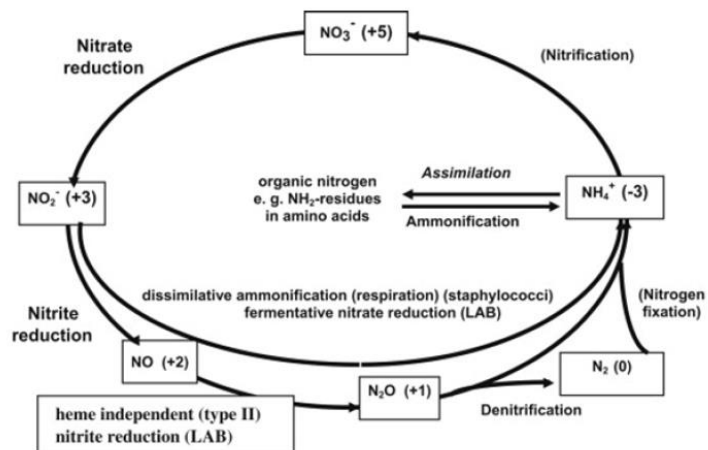
Podstawy

Surowe mleko krowie może zawierać 1 – 5 mg/l azotanów i mniej niż 0.1 mg/l azotynów (1). Wrodzony poziom tych związków zależy od jakości pasz skarmianych zwierzętami (2, 3). W przeszłości, informowano o przypadkach niecelowego zanieczyszczenia mleka azotanami w wyniku pozostałości środków używanych do mycia i dezynfekcji urządzeń stosowanych w przetwórstwie mleczarskim (1, 4). Aby tego uniknąć, należy obowiązkowo stosować zasady dobrej praktyki produkcyjnej (GMP). Składniki oparte na roślinach takich jak trufle, zioła, pieprz, nasiona zawierają naturalnie wysoki poziom azotanu sodu i mogą zwiększać ilość azotanów i azotynów, kiedy wspomniane składniki zostaną dodane do niektórych gatunków sera, szczególnie do serowych produktów do smarowania lub sera topionego (5).

Rola azotanów i azotynów w produkcji serów

Od lat trzydziestych XIX wieku, azotan sodu lub azotan potasu są stosowane w produkcji niektórych gatunków sera, czasem w połączeniu z azotynem potasu lub azotynem sodu (6). Azotan jest często dodawany do mieszaniny ziarna serowego i serwatki, a po oddzieleniu większości serwatki działa wtedy jako prekursor azotynu. Wspomniany dodatek azotanu to powoduje początkowo jego zawartość w serze; jednakże, podczas dojrzewania sera, stężenie to zmniejsza się do poziomu śladowych ilości. Ponadto, zawartość azotynów w dojrzałych serach zawsze pozostaje niskie (<1 mg/kg) (7, 8, 5). Omawiane związki zapobiegają kiełkowaniu przetrwalników beztlenowych bakterii *Clostridium tyrobutyricum*, w serach charakteryzujących się słodkim skrzepem. *Clostridium butyricum* i *Cl. tyrobutyricum* często znajdują się w kiszonce stosowanych jako pasza dla zwierząt. Zawartość przetrwalników w kiszonce może wynosić 105 w gramie, a przetrwalniki te mogą przedostać się do mleka. Sery, które mają wyższą początkową wartość pH (>5.8), wolniejsze tempo absorpcji soli (2-3 dni od solenia) oraz dojrzewają w wyższych (>7°C) temperaturach (9, 10, 11) są podatne na wzrost bakterii *Cl. butyricum* i *Cl. tyrobutyricum*.

Chociaż mechanizm hamowania przez azotany i azotyny wzrostu *Clostridium* i kiełkowania ich przetrwalników nie został w pełni ustalony, wydaje się, że opiera się on na pewnym zakresie reaktywnych pośrednich związków takich jak NO, N₂O₃ (peroksyazotyn (ONOO⁻), ditlenek azotu (NO₂) i RS-NO (Rys.1). Niniejsze związki oddziałują na wiele cząsteczek i struktur sera poprzez N-nitrosylację, S-nitrosylację, tworzenie disiarczków oraz peroksydację (tworzenie grup nadtlennych – przyp. tłum.) lipidów, tworząc w ten sposób kompromis w funkcjach komórek (12).



Fot.1. Cykl azotu (12)

Legenda do Fot.1:

Angielski

Polski

Nitrate reduction

Redukcja azotanów

Nitrification

Nitryfikacja

Nitrogen fixation

Wiązanie azotu

Denitrification

Denitryfikacja

Heme independent (type II) nitrite reduction (LAB)

Redukcja azotynu niezależna od hemu (typ II)

Organic nitrogen e.g. NH₂-residues in amino acids

Azot organiczny np. resztkowy NH₂ w aminokwasach

Assimilation

Asymilacja

Ammonification

Amonifikacja

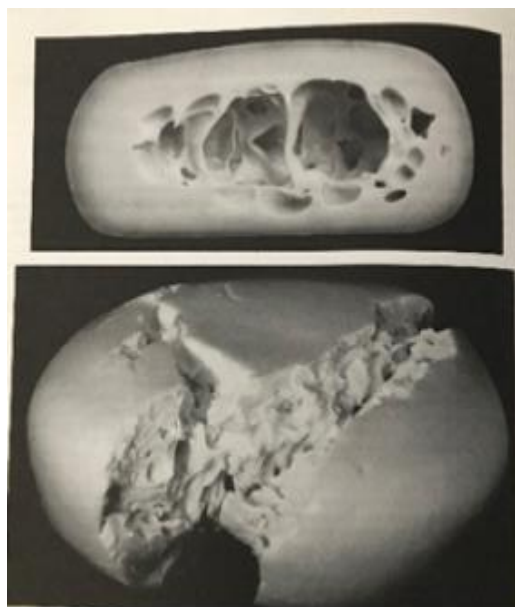
Dissimilative ammonification (respiration) (staphylococci)

Amonifikacja dysymilacyjna (oddychanie) (Gronkowce)

fermentative nitrate reduction (LAB)

redukcja azotanu (LAB) poprzez fermentację

Potencjalne wady sera przy braku azotanów i azotynów



Wada jakościowa sera, tzw. późne wzdęcie sera, spowodowana jest rozwojem przetrwalników *Cl. tyrobutyricum* w serze poprzez fermentację masłową t.j. fermentację mleczanu na maślan, CO₂ i H₂. Ciśnienie nagromadzonych gazów powoduje pęknięcia i szczeliny (Fot.2) w serze, którym towarzyszy nieprzyjemny zapach i posmak jełkości. Bakteria *Cl. butyricum* nie jest szkodliwa dla ludzi i zwierząt. Sery wyprodukowane z mleka z przetrwalnikami innych gatunków *Clostridium*, pochodzących z kiszonki n.p. *Cl. beijerinckii*, *Cl. sporogenes* i *Paenibacillus* nie powodują późnego wzdęcia w serach.

Rys.2. Przykład „wzdęcia” sera ze słodkim skrzepem (9)

Rys.2. Przykład „wzdęcia” sera ze słodkim skrzepem (9)

Obawy zdrowotne związane z azotanami i azotynami

Praktyka dodawania azotanów do mleka serowarskiego jest czasem kwestionowana, ponieważ resztkowy azotan w produkcie spożywczym jest redukowany do azotynu przez bakterie obecne w ślinie i w pewnych warunkach, n.p. w kwaśnym środowisku w przewodzie pokarmowym lub podczas obróbki cieplnej, azotan reaguje z drugorzędowymi aminami obecnymi w nitrozaminach (13). Nitrozaminy powstają z drugorzędowych biogennych amin w produkcie spożywczym, które mogą tworzyć się w produktach bogatych w białko lub wolne aminokwasy w wyniku dekarboksylacji przez bakterie.

Tworzenie się N-nitrozo związków jest przyspieszane przez obecność związków nitrozowalnych i hamowane przez witaminę C i inne przeciwutleniacze. Nitrozaminy są klasyfikowane jako związki prawdopodobnie rakotwórcze dla człowieka (13). Wobec tego, zostało ustalone Dopuszczalne Dienne Spożycie azotanu i azotynu, wynosi, odpowiednio, 3.7 mg azotanu i 0.06 azotynu na kg masy ciała dziennie (14).

Ogólny Standard Dodatków do Żywności CODEX-u (15) uważając zastosowanie azotanu sodu i/lub potasu w produkcji różnych gatunków sera za bezpieczne, ogranicza maksymalny dopuszczalny poziom resztkowego azotanu do 35 ppm w serze. Przepisy w różnych krajach w tym zakresie mogą się różnić (Tab.1).

Tab.1. Maksymalny dopuszczalny poziom azotanów i azotynów w mleku serowarskim w niektórych krajach

Kraj	Azotany/azotyny (maksymalnie)	Odniesienie w bibliografii
Brazylia	20 g azotanu na 100 l mleka	(16)
Kanada	Dopuszczalne w ograniczonych gatunkach sera; 200 mg/kg mleka i w produktach mlecznych stosowanych w wyrobie sera; resztkowy azotan w serze nie przekracza 50 mg/kg	(17)
USA	Nie zaakceptowany do stosowania jako dodatek w serze	(18)
UE	150 mg/kg mleka; tylko w twardych serach dojrzewających, pół-twardych i półmiękkkich dojrzewających serach; jako NaNO (azotan sodowy) na kg mleka serowarskiego (Uwaga: w mleku serowarskim lub równoważnie, jeśli dodany po oddzieleniu serwatki i dodaniu wody). Nie jest dozwolony do stosowania w produkcji serów ekologicznych)	(19)

Określenie zawartości azotanów i związków ich rozkładu są kluczowe dla zapewnienia zgodności z przepisami. Przez lata, osiągnięto postęp w zakresie metod analitycznych wykrywania azotanów w serze (5, 7, 20, 21, 22) w odniesieniu do poprawy ekstrakcji tych związków, granic określania wrażliwości i wykrywalności w serach. Związki rozpadu azotanów, są jednakże bardzo niestabilne i szybko redukują się do innych związków. Jest także niemożliwe odróżnienie czy wspomniane związki są obecne w sposób naturalny czy jest to wynik dodawania w czasie wyrobu sera (5). W badaniach Genualdi i wsp. (5) stwierdzono obecność naturalnych azotanów i azotynów w serze na poziomie odpowiednio, 10 mg/kg i 0.1mg/kg, bez dodawania jakiegokolwiek dodatku środka utrwalającego.

Podejście do zmniejszenia obecności azotanów/azotynów w serze

Podczas gdy stosowanie azotanu sodowego może być pomocne w produkcji pewnych gatunków sera, serowarzy w wielu krajach mogą zaprzestać stosowania związków

azotanowych lub obniżyć poziom ich stosowania w wyniku poprawienia stanu sanitarnego w gospodarstwach produkujących mleko, przez co zmniejszy się liczba przetrwalników w mleku surowym. Unikanie obecności bakterii *Cl.tyrobutyricum* ma najwyższe znaczenie i można to osiągnąć poprzez stosowanie mleka od krów które nie są żywione kiszonkami lub żywione kiszonkami dobrej jakości, utrzymując warunki sanitarne w oborach, oraz zapewniając dobre warunki higieniczne podczas doju. Standardowa pasteryzacja mleka nie eliminuje przetrwalników, ale baktofugacja wysokiej mocy (10 000 x g) lub mikrofiltracja może zredukować liczbę przetrwalników, co pozwala uniknąć potrzeby stosowania związków azotanowych. Baktofugacja usuwa 98.7 % przetrwalników bakterii beztlenowych obecnych w mleku surowym. Podwójna baktofugacja może zwiększyć poziom redukcji do 99% lub więcej (23).

Czasem, aby zapobiec wzrostowi *Cl. tyrobutyricum* stosuje się bakteriocyny (w tym nizynę) i stąd, na przykład, zaakceptowano ich stosowanie w niektórych krajach takich jak np. Stany Zjednoczone, do produktów serowych do smarowania w celu zahamowania wzrostu przetrwalników *Cl. tyrobutyricum* lub *Cl. botulinum* (6). Ponadto, jeśli dany gatunek sera pozwala na dodatek większej zawartości soli (>5% soli w solance) i dojrzewania przez krótszy okres czasu w niższej temperaturze (<7°C), to można to stosować jak i inne podejścia do kontrolowania fermentacji masłowej (6).

Azotany i azotyny w serze a dieta człowieka

Warzywa, a szczególnie warzywa liściaste, są dominującym źródłem azotanu w diecie człowieka i ich udział wynosi 60-80% całkowitego pobrania azotanu. Inne źródła azotanu to woda pitna (15-20%) i inne produkty spożywcze, w tym produkty pochodzenia zwierzęcego (10-15%) do których dodawane są azotany i azotyny jako środki utrwalające oraz wzmacniacze smaku i koloru (26). Zawartość azotanów w warzywach liściastych jest naturalnie wysoka, dlatego też Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 (19) ustanowiło wyższe limity poziomu azotanów (Tab.2) w porównaniu do przetworów mlecznych. Interesującym jest to, że największym źródłem azotanu dla człowieka (około 93%) jest endogenne w organizmie człowieka tj. obecność azotanu w ślinie człowieka (27).

Tab.2. Maksymalny poziom zanieczyszczenia azotanami w produktach spożywczych pochodzenia roślinnego (19)

Produkt spożywczy	Zakres poziomu azotanu (mg/kg)
Świeży szpinak	3500
Świeża sałata	3000-5000 (w zależności od warunków uprawy)
Rukola	6000-7000 (w zależności od czasu zbioru)
Przetworzone produkty zbożowe	200

Wnioski

Azotany nie są powszechnie stosowane w produkcji sera, jednakże kiedy są stosowane, ich poziomy są niskie i ulegają one szybkiemu rozkładowi na inne związki (w tym tlenek azotu,

ditlenek azotu i /lub azot (gaz)). Jakość mleka pochodzącego z gospodarstwa stale się poprawia, co jest ważnym czynnikiem zapobiegania wadzie serów, jaką jest późne wzdęcie. Ilość resztkowych azotanów i azotynów w serach nie jest głównym sprawcą obecności azotanów i azotynów w diecie człowieka i nie prowadzi do zwiększenia Dozwolonej Diennej Dawki Spożycia (0 – 3.7 mg azotanu i 0 – 0.06 azotynu na kg masy ciała dziennie) (14). Jednakże, przemysł mleczarski musi zapewnić, że w gospodarce rolnej (np. jakość kiszonki i higiena doju) oraz w praktyce, w zakładach produkujących sery, spełniane są najwyższe standardy, które zapewniają konsumentom sery najwyższej jakości.

Podziękowania

Niniejszy dokument został opracowany przez Stały Komitet ds Dodatków do Żywności z pomocą Stałego Komitetu ds Nauki i Technologii Mleczarskiej pod kierunkiem Praveen Upreti (USA) i Allena Saylera (USA)

Bibliografia

- (1) Indyk, H., and Woolard, D. 2011. Contaminants of milk and dairy products: nitrates and nitrites as contaminants. 2nd ed. San Diego: Academic Press.
- (2) Topçu, A., A. A. Topçu, I. Saldamli, and Yurttagül, M.. Determination of nitrate and nitrite content of Turkish cheeses. *Afr. J. Biotechnol.* Vol.5 (15): 1441-1414 (2006).
- (3) Cristea, C. Study of the level of Nitrates/Nitrites in Milk Products from Braşov County. *J.M.B.* nr. 2, p. 28 (2008).
- (4) Tibulča, D., M. Jimborean, and Tibulča, A. Research on evolution of nitrite and nitrate content regarding milk processing in scalded cheese. *Rom. Biotechnol, Lett.* 24 (95): 770-775 (2011).
- (5) Genualdi, S., N. Jeong, and DeJager, L. Determination of endogenous concentrations of nitrites and nitrates in different types of cheese in the United States: method development and validation using ion chromatography. *Food Additives & Contaminants.* 35 (4): 615-623 (2018).
- (6) Walstra, P., J.T.M. Wouters, and T.J. Geurts. *Microbial Defects. Dairy Science and Technology.* 2nd edition. p.681-683 (1999).
- (7) Gray, J. I., Irvine, D.M. and Kakuda Y. Nitrates and N-Nitrosamines in Cheese. *J. Food Prot.* 423 (3): 263-272 (1979).
- (8) Munksgaard, L., and Werner, H. Fate of nitrate in cheese. *Milchwissenschaft.* 42: 216-219 (1987).
- (9) Kosikowski, F.V. Control of Spoilage Bacteria in Cheese Milk. *Cheese and Fermented Milk Foods.* 2nd edition. F.V. Kosikowski and Associates p. 292 (1982).
- (10) Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. Cheese: An overview. *Cheese Chemistry, Physics, and Microbiology.* Vol.1. General Aspects. Editors P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee. 3rd edition. Elsevier Academic Press. p.2929 (2004)

- (11) Sheehan, J.J. Cheese: Avoidance of gas blowing in Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition, p661-666 (2011)
- (12) Hammes, W.P. Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. Food Microbiology. 29: 151-156 (2012)
- (13) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No 94) (201).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326544/>
- (14) European Food Safety Authority. Nitrate in vegetables: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. EFSA J. 689: 2-79 (2008)
- (15) Codex Alimentarius – General Standard for Food Additives. FAO/WHO Joint Publications (accessed 2020 May 28). (2012).
- (16) Government of Brasil. Compêndio da legislação de alimentos. Consolidação das normas e padres de alimentos; Ministério da Saúde, Abia: Rio de Janeiro (1991)
- (17) Government of Canada. List of Permitted Food Additives. Available at: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/list-permitted/11-preservatives.html> (2020)
- (18) Code of Federal Regulations Title 21 PART 172 – Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption (§172.10) and for Sodium nitrite in (§172.175)
- (19) European Commission. Commission Regulation (EU) No 1258/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of nitrates in foodstuffs. Off. J. Eur. Comm. L320: 15-17 (2011)
- (20) Glória, M.B.A., Vale, S.R., Vargas, O.L., Barbour, J.F. and Scanian, J.F. Influence of Nitrate Levels Added to Cheesemilk on Nitrate, Nitrite and Volatile Nitrosamine Contents in Gruyere Cheese. J. Agric.Food Chem. 45:3577-3579 (1997)
- (21) Kyriakidis, N.B., K. Tarantili-Georgiou, and E. Tsani-Batzaka. Nuirtrate and Nitrite Content of Greek Cheeses. J. Food Comp. Analysis. 10: 343 – 349 91997)
- (22) International dairy Federation, International Organisation for Standardisation. ISO 14673-1,23/IDF 189-1,2,3:2004. Milk and milk products – Determination of nitrate and nitrite contents. Brussels (Belgium). Geneva (Switzerland); {accessed 14 July 2020}, https://store.fil-idf.org/?s=146737post_type=product (2004)
- (23) Brändle, J., K.J. Domig, and W. Kneifel. Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. Food Control. 67: 96-113 (2016)
- (24) Egan, K., D. Field, M. C. Rea, R.P. Ross, C. Hill, and P.D. Cotter. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? Frontiers in Microbiology. Vol. 7 Article 461 (2016)
- 26) Weitzberg, E. and J.O. Lundberg. Novel Aspects of Dietary Nitrate and Human Health. Annual Review of Nutrition, 33: 129-159 (2013)

27) Sindelar, J.J. and Milkowski, A.L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*. 26 (4): 259 – 266. (2012) <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1089860312000547?via%3Di-hub>

28) Lindström M., Myllykoski J., Sivelä S., & Korkeala, H. *Clostridium botulinum* in Cattle and Dairy Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50: 4, 281-304 (2010) <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390802544405>.