

# Upotreba, kontrola i načini smanjenja količine korištenih nitrata i nitrita u mesnim proizvodima

---

**Kostelac, Danijela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:909760>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**UPOTREBA, KONTROLA I NAČINI  
SMANJENJA KOLIČINE KORIŠTENIH  
NITRATA I NITRITA U MESNIM  
PROIZVODIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

Danijela Kostelac

Zagreb, srpanj, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:  
Proizvodnja i prerada mesa

**UPOTREBA, KONTROLA I NAČINI  
SMANJENJA KOLIČINE KORIŠTENIH  
NITRATA I NITRITA U MESNIM  
PROIZVODIMA**

DIPLOMSKI RAD

Danijela Kostelac

Mentor: doc. dr. sc. Ivica Kos

Zagreb, srpanj, 2018.

UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF AGRICULTURE

Master study:  
Meat production and processing

**THE USE, CONTROL AND REDUCTION  
STRATEGIES FOR NITRATES AND NITRITES  
IN MEAT PRODUCTS**

MASTER THESIS

Danijela Kostelac

Mentor: Assis. Professor Ivica Kos, PhD

Zagreb, July 2018

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Danijela Kostelac**, JMBAG 0253038165, rođena dana 26.03.1994. u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UPOTREBA, KONTROLA I NAČINI SMANJENJA KOLIČINE KORIŠTENIH  
NITRATA I NITRITA U MESNIM PROIZVODIMA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Danijele Kostelac**, JMBAG 0253038165, naslova

**UPOTREBA, KONTROLA I NAČINI SMANJENJA KOLIČINE KORIŠTENIH  
NITRATA I NITRITA U MESNIM PROIZVODIMA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Ivica Kos, mentor

\_\_\_\_\_

2. prof. dr. sc. Krešimir Salajpal, član

\_\_\_\_\_

3. prof. dr. sc. Danijel Karolyi, član

\_\_\_\_\_

## **Zahvala**

*Prvenstveno se zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Ivici Kosu na ukazanom strpljenju, potpori, razumijevanju, velikoj pomoći i trudu pri izradi ovog diplomskog rada, svim profesorima Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a posebice članovima stručnog povjerenstva prof. dr. sc. Krešimiru Salajpalu i prof. dr. sc. Danijelu Karolyiju, zatim svojoj obitelji i prijateljima uz čiju sam podršku i riječi ohrabrenja uspjela u ostvarenju svog cilja i svoje fakultetsko obrazovanje privela kraju.*

# Sadržaj

Sažetak.....	1
Summary .....	2
<b>1. Uvod.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Pregled literature.....</b>	<b>5</b>
2.1. Konzerviranje mesa soljenjem/salamurenjem.....	5
2.1.1. Povijest korištenja nitrata i nitrita kod konzerviranja mesa .....	5
2.1.2. Kuhinjska sol i svojstva soli za salamurenje .....	8
2.1.3. Konzervirajuće djelovanje salamure .....	9
2.1.4. Metode i postupci salamurenja mesa .....	10
2.2. Nitrati i nitriti u okolišu.....	12
2.2.1. Redukcija nitrata u nitrite .....	15
2.3. Nitrati i nitriti u mesu i mesnim proizvodima .....	17
2.3.1. Tvorba nitrozamina .....	18
2.4. Utjecaj nitrata i nitrita na boju mesnih proizvoda .....	22
2.5. Antimikrobni učinak nitrata i nitrita.....	26
2.6. Antioksidacijski učinak nitrita.....	28
2.7. Promjene u sadržaju tijekom skladištenja .....	29
2.8. Utjecaj na zdravlje.....	30
2.9. Zakonodavstvo .....	31
2.10. Metode određivanja nitrata i nitrita u mesnim proizvodima .....	36
2.11. Načini smanjenja sadržaja nitrata i nitrita u mesnim proizvodima .....	37
<b>3. Zaključak .....</b>	<b>43</b>
<b>4. Literatura .....</b>	<b>44</b>
<b>5. Prilog.....</b>	<b>48</b>
5.1. Popis slika.....	48
5.2. Popis tablica .....	49
5.3. Popis shema.....	50
5.4. Popis kratica .....	51
Životopis.....	53



## **Sažetak**

Diplomskog rada studentice **Danijele Kostelac**, naslova

### **UPOTREBA, KONTROLA I NAČINI SMANJENJA KOLIČINE KORIŠTENIH NITRATA I NITRITA U MESNIM PROIZVODIMA**

Cilj ovog diplomskog rada bio je opisati upotrebu, kontrolu i načine smanjenja količine korištenih nitrata i nitrita u mesnim proizvodima. Nitrati i nitriti svrstani su u skupinu konzervansa, ali je njihova uloga u mesu i mesnim proizvodima višestruka i dodatno se ističe utjecaj na boju trajnih i toplinski obrađenih proizvoda, antioksidativno djelovanje, očuvanje arome i utjecaj na smanjenje aktiviteta vode. Nitrati i nitriti su najčešće dodani u kombinaciji s kuhinjskom soli (NaCl), pri čemu nitrati nemaju značajan utjecaj na meso i na rast bakterija, već moraju biti reducirani do nitrita pod posebnim uvjetima. Kao posljedica dodavanja nitrata i nitrita tijekom procesa prerade mesa, u reakciji nitrita s proteinima mesa mogu nastati kancerogeni i toksični spojevi N-nitrozamini. Zbog toga je upotreba i doziranje nitrata i nitrita ograničena pravilnicima pojedinih država ili asocijacija država. U novije vrijeme sve se više teži k smanjivanju količina korištenih nitrata i nitrita u mesnim proizvodima, a kao moguće alternative mogu se izdvojiti upotrebe hitozana, karmina, aromatskog i začinskog bilja, voća i povrća.

**Ključne riječi:** nitrati, nitriti, mesni proizvodi, N-nitrozamini

## Summary

Of the master's thesis – student **Danijela Kostelac**, entitled

### **THE USE, CONTROL AND REDUCTION STRATEGIES FOR NITRATES AND NITRITES IN MEAT PRODUCTS**

The aim of this master thesis was to describe the use, control and reduction strategies for nitrates and nitrites in meat products. Nitrates and nitrites are classified into a preservative group, but their role in meat and meat products is multifunctional and extended on the color of dry and heat-treated products, antioxidant activity, aroma preservation and the effect on reduction of water activity. Nitrates and nitrites are most commonly added in combination with salt (NaCl) where nitrates have no significant effect on meat and bacterial growth and must be reduced to nitrite under special conditions. Because of the addition of nitrates and nitrites during the meat processing process, nitrite reaction with meat proteins may result in carcinogenic and toxic N-nitrosamine compounds. Therefore, the use and dosage of nitrates and nitrites is limited by the regulations of individual states or associations of states. More recently, there is an increasing tendency to reduce the amount of nitrate and nitrite used in meat products, and many possible alternatives are proposed like the use of chitosan, carmine, aromatic and spice plants, fruits and vegetables.

**Keywords:** nitrates, nitrites, meat products, N-nitrosamines

# 1. Uvod

Meso je vrlo važan izvor energije za naš organizam, prava je riznica proteina i nutrijenata poput vitamina A i B skupine, i minerala kao što su magnezij, fosfor, kalij, željezo, selen i cink. Zbog bogate hranjive vrijednosti, meso se vrlo brzo kvari djelovanjem mikroorganizama na temperaturama većim od 5 °C. Radi očuvanja mesa u primjeni su brojni načini konzerviranja među kojima je upotreba kemijskih konzervansa jako raširena u mesnoj industriji (Lawrie i Ledward 2006.).

Prema Zakonu o prehranbenim aditivima, aromama i prehranbenim enzimima (NN 39/13) aditiv je definiran kao tvar koja se sama po sebi ne konzumira kao hrana, niti je prepoznatljiv sastojak određene hrane bez obzira na hranjivu vrijednost, a čije je dodavanje hrani namjerno zbog tehnoloških razloga u proizvodnji, preradi, pripremi, obradi, pakiranju, prijevozu ili skladištenju i ima za posljedicu, ili se može očekivati da će imati za posljedicu, da će aditiv ili njegov derivat postati izravno ili neizravno sastojak hrane. Aditivi se dodaju hrani u tehnološkom postupku proizvodnje, tijekom pripreme, obrade, prerade, pakiranja, transporta i čuvanja. Svrha dodavanja aditiva u hranu jest očuvanje njezine hranjive vrijednosti, očuvanje kakvoće i stabilnosti hrane ili poboljšanje njenih organoleptičkih svojstava te osiguravanje potrebnih sastojaka za skupine potrošača s posebnim prehranbenim potrebama. Prema tehnološkim i funkcionalnim svojstvima aditivi su podijeljeni u kategorije, a to su: boje, sladila, konzervansi, antioksidanti, emulgatori, stabilizatori, nosači, zgušnjivači, tvari za želiranje, tvari za reguliranje kiselosti, pojačivači okusa, tvari za pjenjenje, tvari protiv pjenjenja, tvari za poliranje, održavanje svježine, tvari za zadržavanje vlage, tvari za povećanje volumena, tvari za tretiranje brašna, potisnuti plinovi, plinovi za pakiranje. Zakonom su doneseni propisi kojima se odobravaju određeni aditivi, propisuju uvjeti njihova korištenja u hrani, način označavanja onih koji se stavljaju na tržište te kriteriji njihove čistoće. U propisima odobrenih aditiva, aditivi se navode uz specifičan naziv i E-broj aditiva, uz namirnice kojima se mogu dodati te uz najveću dopuštenu količinu (NDK) njihove uporabe. E-broj pojedinog aditiva označava da je provedena toksikološka evaluacija i klasifikacija istog (Havranek i sur. 2014.).

Od navedenih kategorija aditiva, nitrati i nitriti pripadaju skupini konzervansa, odnosno aditiva koji sprječavaju intoksikacije i kvarenje mesa i mesnih proizvoda te produljuju njihov rok trajanja (Kovačević i sur. 2016.). Konzervansi su tvari koje se dodaju hrani, a uz odgovarajuće uvjete sprječavaju ili usporavaju rast mikroorganizama te ne utječu negativno na senzorska svojstva hrane. Uglavnom se koriste u proizvodnji polupreradevina (u kasnijoj se obradi ili potpuno odstranjuju ili se njihova količina smanjuje na neznatnu koncentraciju), ali i kod nekih gotovih proizvoda što se u svakoj zemlji regulira posebnim propisima. Dodaju se u relativno malim količinama koje su dovoljne za uspješno djelovanje na mikroorganizme i time sprječavaju razvitak i širenje ili čak uništenje mikroorganizama, što je rjeđe. Kemijski konzervansi djeluju tako što oštećuju stanične stjenke mikroorganizama ili ometaju procese važne za izmjenu tvari. Konzervans je djelotvoran jedino ako je topljiv u vodi pa se stoga najčešće upotrebljavaju natrijeve soli kiselina koje služe kao konzervansi (Lovrić 2003.).

Među klasične konzervanse koji nisu aditivi ubrajaju se kuhinjska sol, etilni alkohol, octena kiselina, a najčešće korišteni konzervansi koji se smatraju aditivima jesu: sorbinska kiselina i njezine soli, benzojeva kiselina i njezine soli, natrijev nitrit i spojevi, te sumporni dioksid kao

kalijev metabisulfit. U mesnoj se industriji nitrati i nitriti prvenstveno koriste kao konzervansi (Sebranek i Bacus 2007.a, b), iako nitrati sami po sebi nemaju značajan utjecaj na meso, odnosno na rast bakterija, već moraju biti reducirani do nitrita. Oni zauzimaju posebno mjesto kod formiranja karakteristične crvene boje mesa, njezine toplinske stabilnosti, kod formiranja specifičnog okusa i teksture proizvoda od mesa te inhibiraju rast i razvoj bakterija općenito, ali i patogene bakterije *Clostridium botulinum*. Nitrati se rjeđe dodaju u mesne proizvode nego nitriti, osim kod proizvoda kod kojih je proizvodni proces dugotrajan i spor, a kao takav primjer se mogu navesti fermentirane kobasice (Sebranek i Bacus 2007.a). U zemljama Europske unije kao i u ostalim državama, nitriti i nitrati se koriste kao kalij-nitrit (E249) i natrij-nitrit (E250) te kao natrij-nitrat (E251) i kalij-nitrat (E252). Njihova uporaba propisana je Uredbom Komisije (EU) br. 1129/2011 te ostalim zakonima i pravilnicima drugih država. Sve se više teži smanjivanju njihovih količina potrebnih za očuvanje mikrobiološke sigurnosti hrane.

Neodgovorna upotreba nitrita može dovesti do velikog udjela rezidualnog nitrita koji se nije iskoristio za pozitivno djelovanje. Rezidualni nitriti mogu predstavljati problem jer pri reakciji nitrita s proteinima mesa mogu nastati štetni i kancerogeni spojevi N-nitrozamini (Beinrauch i Pawelitsch 2017.). N-nitrozamini mogu nastati iz nitrita i u želucu jer im pogoduje kisela sredina, odnosno niska pH vrijednost kakva je upravo u želucu čovjeka (Honikel 2008.).

Osim u mesu, nitrati su prisutni u prirodi kao dio dušičnog ciklusa (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.). Nalaze se i u voću i povrću, a najveće koncentracije oko 1500 do 2800 ppm sadrži lisnato povrće, npr. celer, zelena salata, repa (Sebranek i Bacus 2007.a), te uljarice i gomoljasto bilje. Nitrata u svoj organizam unosimo egzogenim putem konzumacijom povrća i drugih proizvoda koji ih sadrže, te putem pitke vode, dok nitriti uglavnom nastaju konverzijom iz nitrata (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.).

Kako bi se smanjila upotreba nitrata i nitrita, a time smanjio rizik od nastanka štetnih i kancerogenih nitrozo spojeva, u tijeku su brojna istraživanja o zamjenama za nitrite, odnosno predlaganje načina na koji bi se smanjio njihov sadržaj u mesnim proizvodima. García i sur. (2011.) upotrijebili su hitozan, linearni polimer koji se može koristiti, npr. kao bojilo, bez utjecaja na osjetilne atribute. Njegova upotreba znatno produljuje rok trajanja proizvoda te se smatra potencijalnim prirodnim prehrambenim konzervansom. Eskandari i sur. (2013.) koristili su kohineal (karmin, E120) kao bojilo, natrijev hipofosfit (SHP) kao antibotulinsko i antimikrobno sredstvo te butilirani hidroksianisol (BHA) kao antioksidant. Dodatak navedenih tvari kao zamjena za nitrite nije značajno djelovala na pH vrijednost, aromu i teksturu proizvoda, no uočene su značajne razlike u okusu između proizvoda sa i bez dodatka nitrita. Sebranek i Bacus (2007.a, b) također su pokušali ukazati na mogućnost proizvodnje mesnih proizvoda bez direktnog dodatka nitrata ili nitrita koristeći kao zamjenu prirodne dodatke kao što su vinski ocat, limunov sok, prah od višnje, prah od celera, ružmarin i dr. Rok trajanja takvih proizvoda bio je znatno kraći nego kod onih proizvoda kod kojih su dodani nitriti. Kao prirodni antioksidanti, a ujedno i zamjena za nitrata i nitrite, može se koristiti razno voće i povrće te aromatsko i začinsko bilje. Provedena istraživanja pružaju puno agrumenata za veću upotrebu zamjena za nitrata i nitrite, ali njihovu primjenu potrebno je potvrditi detaljnim senzornim, kemijskim, mikrobiološkim analizama (Gassara i sur. 2016.).

## 2. Pregled literature

### 2.1. Konzerviranje mesa soljenjem/salamurenjem

Kada je riječ o konzerviranju mesa, razlikujemo fizikalne, kemijske i mikrobiološke metode konzerviranja. U fizikalne metode ubrajamo upotrebu niskih/visokih temperatura, sušenje, upotrebu mikrovalova, upotrebu zračenja, visokog pritiska i pakiranje. Kemijske metode obuhvaćaju upotrebu soli, nitrita, šećera, začina, fosfata, zatim dimljenje, upotrebu antioksidanata te sulfita, sorbata, laktata, zakiseljivača i sl. Mikrobiološke metode uključuju kompeticiju, fermentaciju i antimikrobne tvari, odnosno baktericide. Iz navedene podjele može se izdvojiti da su soljenje i salamurenje kemijske metode konzerviranja mesa koje se vrlo često nadopunjuju drugim metodama, poput upotrebe visokih temperatura u proizvodnji toplinski obrađenih proizvoda. Uz konzervirajuće djelovanje, soljenje i salamurenje poboljšavaju organoleptička svojstva mesa miris, okus, boju, sočnost i teksturu (Kovačević 2001.). Prema Pravilniku o mesnim proizvodima (Narodne novine 2012.b), definicija soljenja glasi: „soljenje je tehnološki postupak obrade mesa, masnog tkiva i drugih jestivih dijelova trupa životinja za klanje i divljači kuhinjskom soli (NaCl) sa ili bez dodatnih sastojaka, osim Na i K soli“. Salamurenje je postupak konzerviranja smjesom kuhinjske soli, nitrata, nitrita i drugih dopuštenih sastojaka. Propisima su dopušteni sljedeći sastojci: polifosfati, askorbinska kiselina i askorbati, mliječna, vinska i limunska kiselina te njihove natrijeve soli, glukoza, dekstroza i saharoza te ocat. Salamura djeluje konzervirajuće difuzijom iona soli u meso prilikom razlike u osmotskim tlakovima (sol difundira u unutrašnjost mesa, a voda prema površini), te reakcijom difundiranih soli s mišićnim vlakanim. U početku je difuzija brza, a kasnije teče sporije. Treba imati na umu da se koncentracije soli u salamuri i u mesu nikada ne izjednačavaju, već difuzija prestaje kada koncentracija soli u mesu dostigne maksimalno 80 % vrijednosti koncentracije soli u salamuri. Kako bi salamura što bolje dospjela u meso, pogodna je „otvorena“ mikrostruktura mesa koja je najizraženija kada nastupi *postmortalno* nakupljanje mliječne kiseline, sniženje pH vrijednosti i sposobnosti vezivanja vode te proteoliza. Topla salamura, za razliku od hladne, brže prodire u meso (Kovačević 2001.).

Kao glavni sastojak salamure moraju se istaknuti nitrati, odnosno nitriti. Nitrati, koji se smatraju pravim konzervirajućim sredstvom, djelotvorni su jedino kada su reducirani do nitrita. Redukcija se odvija pod djelovanjem prirodno prisutnih bakterija na površini mesa ili namjerno dodanih bakterija koje posjeduju aktivnost enzima nitrat reduktaze. Nitrati se danas rjeđe koriste od nitrita, no igraju glavnu ulogu kod sušenih, odnosno fermentiranih mesnih proizvoda kod kojih je proizvodni proces dugotrajan i sporo teče (Sindelar i Milkowski 2011.).

#### 2.1.1. Povijest korištenja nitrata i nitrita kod konzerviranja mesa

Nakon što se milijunima godina razvijao, čovjek je kroz dugo prapovijesno razdoblje prešao put od sakupljača i lovca do poljodjelca i stočara. Cilj mu je bio što duže očuvati hranu koju je prikupio, a njegovo znanje i vještine vjerojatno sežu do daleko većih razmjera nego što tvrde znanstvena otkrića.

Podrijetlo korištenja nitrata u konzerviranju mesa izgubljeno je u povijesti, no sigurno je da se već stoljećima meso tretira sa soli što prethodi upotrebi nitrata (Binkerd i Kolari 1975.; Sebranek i Bacus 2007.a, b; Sindelar i Milkowski 2011.). Stari zapisi tvrde da su drevni Sumerani još 3000 godina pr. Kr. u Mezopotamiji uživali u suhom soljenom mesu i ribi kao dijelom svoje prehrane, a kuhano meso i ribu držali su u staklenkama u ulju od sezama. Također su i stanovnici drevnog Babilona sol smatrali vrlo bitnim sastojkom. Bilo je to doba kada je čovjek u svemu tražio korist, pa se tako 1600. godine pr. Kr. sol počinje naširoko upotrebljavati u Židovskom Kraljevstvu naročito zbog blizine Mrtvog mora koje im je služilo kao prirodan izvor soli. Tehnologija proizvodnje morske soli poznata je i od strane Kineza koji su oko 1600. godine pr. Kr. crpili sol iz bušenih bunara (Binkerd i Kolari 1975.).

Čuvanje mesa bilo je prakticirano u pustinjama Azije i u obalnim područjima. Pustinjska sol sastojala se od nitrata i boraksa u obliku prašine. Međutim, djelovanje nitrata na boju mesa nije spomenuto sve do vremena Rimljana. Prije nego je znao za nitrata, čovjek je, u pećinama, otkrio „salitru“ ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) u obliku izbočina na zidovima. Ovaj oblik nitrata, salitra, nastao je djelovanjem nitrificirajućih bakterija. S razlogom treba spomenuti da su pustinjske i zidne soli, zbog njihovih nitratnih kontaminanata, djelovale na meso i to ne samo na boju, već i na okus (Binkerd i Kolari 1975.).

Zapisi tvrde da su Feničani oko 1200. godine pr. Kr. sa istočnog dijela Mediterana, kao moreplovci, trgovali nasoljenom ribom koja je, od svježe ribe, mogla dulje izdržati bez procesa kvarenja. Drevni Grci su koristili sol u čuvanju ribe 500. godine pr. Kr. i „proizvodili“ sol u solnim vrtovima. Rimljani su naučili koristiti sol od Grka i na taj su način intenzivno konzervirali svinjsko meso i ribu. Naučili su kako marinirati razne vrste mesa, a marinada se sastojala ne samo od soli, već i od drugih sastojaka. U Rimskom Carstvu su osnovali trgovinu za takvu vrstu proizvoda (Binkerd i Kolari 1975.). Tretiranje mesa sa solju, salitrom i dimom s vremenom je poprimalo sve veći značaj (Sindelar i Milkowski 2011.). U doba Homera, soljenje i dimljenje su postale uobičajene metode konzerviranja mesa (Binkerd i Kolari 1975.).

S vremenom su se razvijale i razne druge metode, a među prvima je bila metoda koja je uključivala i konzerviranje šunke. Proces se sastojao od vizualnog pregleda buta, zatim nanošenja ulja na površinu buta trljanjem, dimljenja te ponovnog trljanja smjese ulja i octa. Nekoliko autora iznosi zanimljivu činjenicu da se koristila pržena sol za soljenje mesa u područjima s vrućom klimom, a razlog zbog kojeg se pržila je uništavanje mikroorganizama ili čak pretvorba nitrata u nitrite. Uporaba soli i salitre u srednjem vijeku postala je uobičajena, te je ubrzo uočen i učinak soli i salitre na boju mesa (Binkerd i Kolari 1975.; Sindelar i Milkowski 2011.). Osim soli i nitrata, za konzerviranje hrane naširoko su se koristili šećer i med. Mnogi znanstvenici su, još u ono doba, u svojim radovima opisivali metode konzerviranja mesa koje su podrazumijevale trljanje površine mesa sa soli ili uranjanje mesa u jaku otopinu soli i salitre. Neki od njih su isticali da je neophodno da meso, koje je nasoljeno, mora potjecati od skoro usmrćene životinje. Također su ukazivali da meso koje je tretirano na taj način gubi na boji (Binkerd i Kolari 1975.), ali kada se tretira sa salitrom, postaje crvenkasto i održivost takvog mesa je znatno produžena (Binkerd i Kolari 1975.; Sindelar i Milkowski 2011.).

U Europi i u svijetu se 1970-ih godina pobudio značajan interes za količinama nitrata u mesnim proizvodima zbog potencijalne opasnosti od nastanka kancerogenih i toksičnih spojeva N-nitrozamina (Sebranek i Bacus 2007.a, b; García i sur. 2011.) te su zbog toga razmatrane rezidualne količine nitrata u mesnim proizvodima od strane američkog instituta i zavoda za

meso. Kao glavni problem, skupina znanstvenika istaknula je uklanjanje jednog ili više prekursora N-nitrozamina (nitrita i sekundarnih amina), a kako su svi konzervirani proizvodi sadržavali oba prekursora, konzumacija takvih proizvoda proglašena je opasnom za zdravlje ljudi (Sindelar i Milkowski 2011.; Binkerd i Kolari 1975.), te je gotovo rezultiralo eliminacijom nitrita kao konzervirajućeg sredstva (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

Tablica 2.1.1.1. Usporedba dodanih količina nitrata i nitrita 1970. i 1974. godine

Mesni proizvodi	NITRATI (ppm)		NITRITI (ppm)	
	1970. g.	1974.g.	1970.g.	1974.g.
Konzervirano ohlađeno meso	0 – 1150	0 – 558	50 – 190	104 – 200
Konzervirano meso	0 – 1150	0	50 – 170	77 – 200
Frankfurter kobasice	NA	0	NA	100 – 156
Ostala lako pokvarljiva mesa	0 – 1140	0 – 100	78 – 156	100 – 200
Fermentirane kobasice	0 – 1328	0 – 625	56 – 156	90 – 156
Polusušene kobasice	0 – 1328	0 – 625	56 – 156	56 – 156
Slanina	0 – 200	0	78 – 200	120 – 200
Ostala sušena mesa	NA	0	NA	115 – 200
Konzervirano sterilizirano meso	0 – 125	0	88 – 190	120 – 200

NA= nije dostupno

Izvor: prilagođeno prema Binkerd i Kolari 1975.

Nova znanstvena otkrića uslijedila su 1978. pri eksperimentima koji su se provodili na štakorima, a dokazali su da je nitrit sam po sebi kancerogeni spoj. Međutim, 1982. godine Nacionalna akademija znanosti započela je temeljitu procjenu nitrita biološkim testovima čime su zaključili da nije dokazana kancerogenost potaknuta nitritima u niti jednom glavnom tkivu muških ili ženskih štakora i muških miševa, već je kancerogenost uočena samo u želucu ženskih miševa (Sindelar i Milkowski 2011.).

Nizom epidemioloških studija u 1990.-im godinama došlo se do spoznaja da je konzumacija konzerviranog mesa i mesnih proizvoda povezana s rakom mozga i dječjom leukemijom. U Washingtonu su 1994. godine mediji izvještavali da su djeca, koja pojedu više od 12 hot-dogova mjesečno, devet puta više izloženi opasnosti od nastanka leukemije. Kalifornija je 1998. godine predložila klasifikaciju nitrita kao razvojni i reproduktivni toksikant (Sebranek i Bacus 2007.a, b; Sindelar i Milkowski 2011.). Skupina znanstvenika je 2006. godine prikazala još jedan pregled radova na temu kancerogenosti potaknutom nitritima i nitratima, a njihov konačni zaključak bio je sljedeći: „Progutani nitrati ili nitriti, pod uvjetima koji rezultiraju endogenom nitrozacijom, su vjerojatno karcenogeni za ljude.“ (Sindelar i Milkowski 2011.). Dakle, još uvijek ne postoje uvjerljivi dokazi da su nitriti direktno kancerogeni za ljude (García i sur. 2011.), već se samo iznosi vjerojatnost za njihov mogući nastanak tijekom unosa većih količina u organizam. Epidemiološka studija iz 2008. godine izvijestila je da postoji veliki rizik za nastanak raka debelog crijeva kao posljedica konzumiranja prerađenog mesa (Sindelar i Milkowski 2011.; Santarelli i sur. 2008.).

## 2.1.2. Kuhinjska sol i svojstva soli za salamurenje

Postoje dvije vrste tvari kojima se može provesti konzerviranje: jednu čine tvari koje su same po sebi hrana ili se koriste u prehrani (kuhinjska sol, vinski ocat, alkohol) i nazivamo ih „prirodnim“ konzervansima (npr. šećer pri čemu je potrebna određena koncentracija), a drugu čine tzv. kemijski konzervansi. Kuhinjska sol (NaCl) može djelovati putem dehidracije (povećanje osmotskog tlaka) ili specifično (npr. putem iona klora Cl<sup>-</sup>). Koncentracije kuhinjske soli su različite za različite vrste mikroorganizama, pa je npr. za *Clostridium botulinum* kritična koncentracija 6,5 %, dok neke plijesni i kvasci podnose koncentracije i iznad 20 % (Lovrić 2003.).

Kuhinjska sol mora sadržavati minimalno 95 % NaCl te ne smije sadržavati vidljive primjese. Osim što mesu daje slan okus, na njega djeluje višestruko: inhibira rast i razmnožavanje mikroorganizama jer smanjuje aktivitet vode, utječe na pH vrijednost na način da zaustavlja smanjenje pH, odnosno utječe na porast pH ako je soljenje izvršeno u fazi kada je pH bio ispod 6, povećava topljivost miofibrilarnih proteina, ima pozitivan utjecaj na teksturu proizvoda te povećava sposobnost vezivanja vode mesa (npr. 1 % NaCl povećava SpVV za 20 %, dok prevelika koncentracija soli smanjuje SpVV). Najveći porast SpVV postiže se dodatkom 4 – 5 % NaCl, dok veće koncentracije uzrokuju denaturaciju proteina što ima za posljedicu smanjenje SpVV. Dodavanje NaCl mesu prije nastupa *rigor mortisa* rezultira zadržavanjem SpVV na istoj razini i do tjedan dana. Postoje i mogući negativni tehnološki učinci soli, a to su: promjene boje mesa i mesnih proizvoda pri previsokim koncentracijama NaCl uslijed oksidacijskih promjena hema i nastanka metmioglobina (tamna diskoloracija mesa) te oksidacijske promjene masti (razvoj užeglosti), što se može spriječiti dodavanjem prirodnih ili sintetskih antioksidanata (npr. tokoferoli, nitriti, fosfati, ekstrakt ružmarina) (Kovačević 2001.).

Kako je upotreba pojedinih soli za salamurenje štetna, u svijetu pa tako i kod nas upotreba pojedinih sastojaka salamure je ograničena. Ograničenja su propisana pravilnikom, a u upotrebi su tri vrste salamure:

- 1.) Sol za salamurenje (NaCl + 3 % NaNO<sub>3</sub> ili KNO<sub>3</sub>)
- 2.) Nitritna sol za salamurenje (NaCl + 0,5 – 0,6 % nitrita izraženih kao NaNO<sub>2</sub>)
- 3.) Nitritna sol za salamurenje s 1 % salitre (NaCl + 0,5 – 0,6 % nitrita izraženih kao NaNO<sub>2</sub> + 0,9 – 1,2 % salitre izražene kao NaNO<sub>3</sub>)

Koncentracija, odnosno jakost salamure mjeri se u stupnjevima Baumea (°Be) i u salometar – stupnjevima (voda= 0, a zasićena otopina = 100 salometarskih stupnjeva) (Tablica 2.1.2.1.). Salamure se dijele na:

- a) Blage salamure: 0 – 18 °Be (11 – 19 % NaCl), odnosno 2 – 3 % NaCl u mesu
- b) Jake salamure: 19 – 25 °Be (19 – 27 % NaCl), odnosno 3 – 5 % NaCl u mesu

Temperatura salamure za potapanje trebala bi iznositi 6 – 10 °C, za ubrizgavanje 4 – 6 °C, a salamure koja sadrži askorbate maksimalno 4 °C. Jakost salamure ne smije biti ispod 12,5 °Be jer bi tada bila ugrožena njena stabilnost. Prostorije za salamurenje najčešće su smještene u prizemlju ili podrumu, a u njima treba osigurati uvjete mirnog hlađenja (temperatura= 4 – 10 °C, relativna vlažnost= 85 – 90 %) (Kovačević 2001.).



Tablica 2.1.2.1. Odnos masenog udjela NaCl, gustoće i jakosti salamure

Salometar-stupnjevi	°Be	Gustoća (kg m <sup>-3</sup> )	w NaCl (%)
40	10,40	1,078	10,60
45	11,70	1,083	11,93
50	13,00	1,093	13,25
55	14,30	1,104	14,58
60	15,60	1,114	15,90
65	16,90	1,125	17,22
70	18,20	1,136	18,55
75	19,50	1,147	19,88
80	20,80	1,158	21,20
85	22,10	1,170	22,52
90	23,40	1,182	23,86
95	24,70	1,194	25,18
100	26,00	1,205	26,50

Izvor: prilagođeno prema Kovačević 2001.

### 2.1.3. Konzervirajuće djelovanje salamure

Kovačević (2001.) navodi da su nitrati natrijeve, odnosno kalijeve soli (NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>) nitratne kiseline (HNO<sub>3</sub>) i da tvore bjelkaste kristale. Jedno od svojstava jest da im se topljivost u vodi povećava zagrijavanjem. Nitriti su natrijeve, odnosno kalijeve soli (NaNO<sub>2</sub> i KNO<sub>2</sub>) nitritne kiseline (HNO<sub>2</sub>) te čine slabo žućkaste ili bezbojne kristale dobro topljivi u toploj vodi. Kemijski nisu postojani, osobito ako se nalaze uz organsku tvar, na povišenoj temperaturi ili u kiseloj sredini. Koriste se kao prehrambeni aditivi u prerađenoj hrani, a njihovo se djelovanje očituje kroz stabilizaciju boje u mesu, ribi i siru (Gassara i sur. 2016.). Iako je njihovo djelovanje bakteriostatsko, prvenstveno na rast *Clostridium botulinum*, te iako šećeri koji pod utjecajem laktobacila smanjuju pH i usporavaju rast gnjiležnih bakterija, konzervirajuće djelovanje salamure zasniva se na štetnom djelovanju NaCl na mikroorganizme kroz:

- oksidativno (toksično) djelovanje iona Cl<sup>-</sup>
- dehidraciju i smanjenje aktiviteta vode
- povećanje osmotskog tlaka koje uzrokuje dehidraciju stanice mikroorganizama
- smanjenu topljivost kisika
- inhibitorsko djelovanje na proteolitičke enzime mesa (Kovačević 2001.).

Iako je uporaba nitrita i nitrata u salamuri označena kao potencijalno opasna za zdravlje ljudi zbog moguće tvorbe karcinogenih N-nitroso spojeva (Karolyi 2003.), smjese za konzerviranje, odnosno salamure, obično se sastoje od soli (NaCl), natrijevih ili kalijevih soli nitrita i nitrata te začina (Gassara i sur. 2016.).

## 2.1.4. Metode i postupci salamurenja mesa

Postupke salamurenja mesa možemo podijeliti na:

- 1.) Suho soljenje i suho salamurenje- sol ili smjesa za salamurenje utrljava se u komade mesa koji se slažu na postolje ili u posudu, nakon čega se dodatno posipaju po površini odgovarajućom soli. Postupak je spor i zadržao se uglavnom u domaćinstvima, a ako se primjenjuje u industriji, za salamurenje se koristi nitritna sol ( $w$  nitritne soli iznosi 2 – 3,5 %), a postupak se provodi pri 0 – 8 °C.
- 2.) Vlažno salamurenje- može se izvesti:
  - a) Potapanjem mesa u salamuru- meso se potapa u salamuru koja se nalazi u bazenima ili kadama nakon čega se prekriva daskama. Postupak traje 3 – 4 tjedna.
  - b) Ubrizgavanjem salamure u mišiće ili krvne žile- automatsko ubrizgavanje salamure u krvne žile plećke i buta vrši se pod tlakom od 2 bara pomoću uređaja s jednom ili više igala za ubrizgavanje. Maseni udio salamure u takovom mesu iznosi 6 – 15 % na ukupnu masu mesa. Uređaji s više igala nazivaju se pikl-injektori i primjenjuju se za salamurenje manjih komada mesa.
- 3.) Kombinirano salamurenje (ubrizgavanjem i potapanjem) (Kovačević 2001.).

U novije doba kao inovacija koristi se postupak mehaničke obrade salamurenog mesa kojim se poboljšava prodor salamure u meso, a samim time i raspored iona soli te se postižu bolja organoleptička svojstva i kvaliteta gotovog proizvoda. Najznačajniji postupci mehaničke obrade su tambliranje koje se provodi u uređajima koji se zovu tambleri, i masiranje koje se obavlja pri atmosferskom tlaku npr. za šunke u ovitku, šunke za pizzu i sl. Tambliranje je postupak koji uključuje zagrijavanje i prevrtanje komada mesa zbog pokretanja peraja u rotirajućim bubnjevima, a poboljšana verzija uređaja uključuje da nakon što se meso prevrne, pada prema dolje (djelovanjem sile gravitacije) i nabada se na igle ugrađene u plašt rotirajuće posude što doprinosi još bržoj difuziji salamure u meso. S druge strane, masiranje je postupak koji se provodi u masirkama u kojima se miješanje vrši lopaticama koje rotiraju oko vertikalne osovine. Masiranjem se meso manje zagrijava nego tambliranjem. Problem mehaničke obrade mesa je u skupoj opremi i izostanku djelovanja na vezivno tkivo pri čemu meso i nakon masiranja ostaje žilavo (Kovačević 2001.).



Slika 2.1.4.1. Bazeni za potapanje mesa u salamuru



Slika 2.1.4.2. Uređaj za salamurenje mesa pikl-injektor

Izvor: <http://www.microtech.rs/prerada.html>



Slika 2.1.4.3. Uređaj s jednom iglom za salamurenje velikih komada mesa

Izvor: <https://www.original-ruehle.de/en/products/machines/details-en/action/show/product/pr-15/>



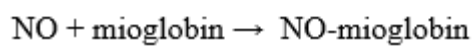
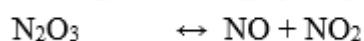
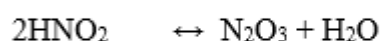
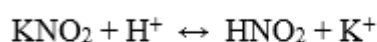
Slika 2.1.4.4. Uređaj za tambliranje mesa

Izvor: <http://www.microtech.rs/prerada.html>

## 2.2. Nitrati i nitriti u okolišu

Čovjek je još od davnina pokušavao zaštititi meso i ribu od kvarenja pa je tako s vremenom naučio što znači konzerviranje mesa i kako ga učiniti djelotvornim. U svakodnevnoj prehrani koristio je sol koja je snižavala aktivitet vode i inhibirala rast i razmnožavanje mikroorganizama. Međutim, u 19. stoljeću ljudi su shvatili da neke soli djeluju bolje od drugih. Tako je uočena salitra ( $\text{KNO}_3$ ), kao kontaminant soli, koja je doprinosila očuvanju proizvoda i dala mu crvenu boju, a raznim istraživanjima je utvrđeno da čista sol ne proizvodi tipičnu boju konzerviranog mesa (Sindelar i Milkowski 2011.). Provedeni su eksperimenti od strane njemačkih znanstvenika kojima je utvrđeno da dodatkom nitrata, odnosno salitre, meso mijenja boju te je jedan od znanstvenika 1901. godine izdvojio nitrozilmioglobin kao supstancu koja je odgovorna za svijetlocrvenu boju konzerviranog mesa. Reaktant je bila dušikasta kiselina ( $\text{HNO}_2$ ) koja je reagirala sa mioglobinom što se može vidjeti na Shemi 2.2.1. (Honikel 2008.). Prema tome, djelovanje dušikovih spojeva na boju mesa razjašnjeno je tijekom 20. stoljeća.

( $\text{KNO}_3$ ) salitra (nitrat)  $\rightarrow$  redukcija uz djelovanje mikroorganizama  $\rightarrow$  nitrit ( $\text{KNO}_2$ )



Shema 2.2.1. Djelovanje nitrata u konzerviranim mesnim proizvodima

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

Nitrati i nitriti su spojevi koji sadrže dušik i kisik, a njihova glavna razlika je u tome što nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) imaju jedan atom kisika više od nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ). Prirodno se pojavljuju u tlu, samim time i u biljkama, u vodi (Gassara i sur. 2016.), a dušik kao inertnu molekulu pri sobnoj temperaturi nalazimo u atmosferi u plinovitom stanju (Gassara i sur. 2016.; Honikel 2008.) te kao takav predstavlja jednu od osnovnih tvari za život na Zemlji. Dušik je ugrađen u aminokiseline i proteine, te je dio nukleinskih kiselina DNA i RNA (Gassara i sur. 2016.). Sam atom dušika jedan je od kemijskih elemenata koji mogu promijeniti svoje oksidacijsko stanje. Njegova vanjska ljuska od pet elektrona ( $s^2p^3$ ) može primiti tri dodatna elektrona pri čemu se njegovo oksidacijsko stanje mijenja. U amonijaku postoji u  $\text{N}^{3-}$  obliku, a kada otpusti pet elektrona, mijenja svoje stanje u  $\text{N}^{5+}$  i kao takav postoji u nitratima ( $\text{NO}_3^-$ ) (Gassara i sur. 2016.; Honikel 2008.). Tablica 2.2.1. prikazuje da se pored dušika jedino ugljik može pojaviti u osam faza oksidacije. To je razlog varijabilnosti ugljikovih spojeva, a samim time i složenosti dušikovih spojeva. Tablica 2.2.2. prikazuje najvažnije dušikove spojeve u različitim fazama oksidacije (Honikel 2008.).

Tablica 2.2.1. Elektronska konfiguracija i mogućnosti promjene elektrona u vanjskoj ljusci osnovnih bioloških elementa

Element	Elektronska konfiguracija	Mogućnost promjene elektrona
H 1 vanjski elektron	(s <sup>1</sup> )	otpušta 1, prima 1 elektron
O 6 vanjskih elektrona	(s <sup>2</sup> p <sup>4</sup> )	prima 2 elektrona
N 5 vanjskih elektrona	(s <sup>2</sup> p <sup>3</sup> )	prima 3, otpušta 5 elektrona
C 4 vanjskih elektrona	(s <sup>2</sup> p <sup>2</sup> )	prima 4, otpušta 4 elektrona

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

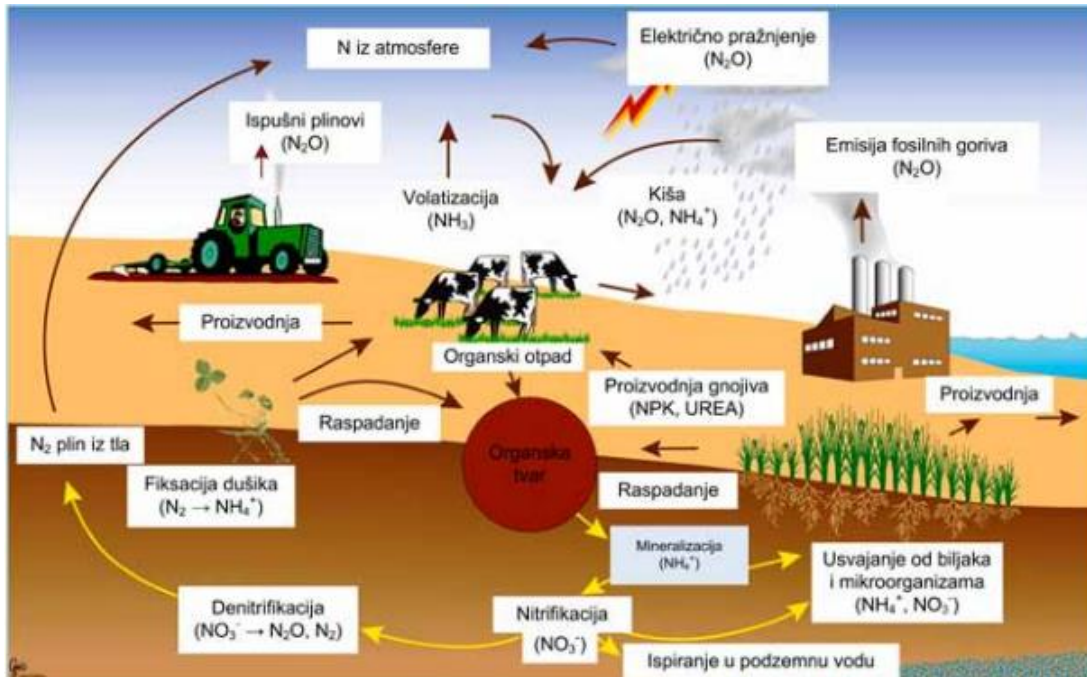
Tablica 2.2.2. Oksidacijska stanja osnovnih kemijskih spojeva s dušikom

Kemijski spoj	Formalno elektronsko opterećenje dušika	
NH <sub>3</sub>	-3	redukcija
N <sub>2</sub>	0	↑
N <sub>2</sub> O	+1	
NO	+2	
HNO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+3	
NO <sub>2</sub>	+4	↓
HNO <sub>3</sub>	+5	oksidacija

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

Nitrati su prirodno prisutni u tlu te ujedno služe kao izvor dušika za povoljan rast biljaka koje apsorbiraju više od 90 % dušika iz nitrata. Organske tvari tla sadrže oko 5 % dušika, a dušik se u tlu, kao gnojivo, nalazi u obliku amonijaka (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) te se, djelovanjem mikroorganizama, pretvara u nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) kako bi biljkama bio dostupan i iskoristiv. Gnojivo porijeklom od životinja odličan je izvor dušika te može uvelike pridonijeti poboljšanju kemijskog sastava tla, međutim, prekomjerna upotreba gnojiva može rezultirati toksičnim koncentracijama nitrata u krmnim smjesama za životinje. Sadržaj nitrata u proizvedenom usjevu može se smanjiti dodatkom fosfatnog gnojiva, no korištenje aditiva u hrani za životinje može rezultirati značajnim koncentracijama određenih elemenata kao što su bakar, cink, arsen i dr., a njihove količine u hrani za životinje mogu biti toksične (Gassara i sur. 2016.).

Nitrati i nitriti se prirodno pojavljuju i u povrću zbog dušikovog ciklusa, pri čemu je dušik vezan za djelovanje bakterija. Visoke koncentracije nitrata (više od 1000 mg/kg) sadrže cikla, brokula, celer, kupus, zelena salata, rotkvica i špinat, dok nitrita u svježem povrću ima jako malo (manje od 1 mg/kg) (Gassara i sur. 2016.). Određene koncentracije nitrata nalaze se i u otpadnim vodama i vodama za piće, a Karolyi (2003.) navodi da posebice bunarska voda može biti bogata nitratima. U površinske i podzemne vode mogu dospjeti kao posljedica djelovanja poljoprivrednih aktivnosti (uključujući prekomjernu upotrebu anorganskih dušičnih gnojiva) kao što je prikazano na slici 2.2.1. Nitrati se, u anorganskim gnojivima, uglavnom koriste kao oksidacijsko sredstvo, zatim se koriste u proizvodnji eksploziva, a purificirani kalijev nitrat u proizvodnji stakla (Gassara i sur. 2016.).

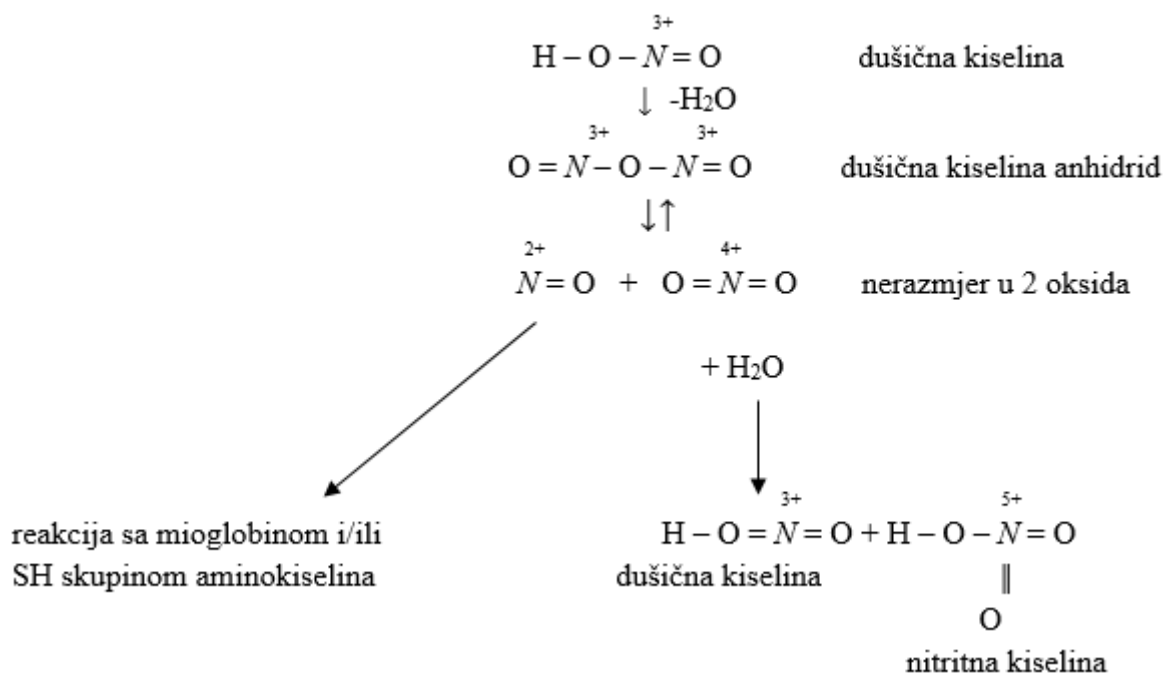


Slika 2.2.1. Kruženje dušika u prirodi

Izvor: [http://www.voda.hr/sites/default/files/pdf\\_clanka/hv\\_84\\_2013\\_119-128\\_filipovic-et-al.pdf](http://www.voda.hr/sites/default/files/pdf_clanka/hv_84_2013_119-128_filipovic-et-al.pdf)

Kod ljudi, slina je glavno mjesto stvaranja nitrita. Naime, u ljudskom organizmu postoje dva glavna izvora nitrata i nitrita; jedan je endogeni put 1-arginin-NO sintaze, a drugi je ishrana. Glavni put apsorpcije ovih spojeva je uzimanje hrane. Redukcija nitrata u nitrite započinje u usnoj šupljini djelovanjem komensalnih bakterija koje se nalaze na jeziku. Progutani nitriti, u kiselim uvjetima, u želucu postaju protonirani do dušikaste kiseline. Kada se nitriti jednom formiraju, postoji niz reakcija u tijelu za njihovu daljnju redukciju do NO, uključujući mioglobin i hemoglobin, askorbate, polifenole i protone (Gassara i sur. 2016. navedeno u Lundberg i sur. 2008.). Svega oko 5 % nitrata unesenih putem hrane reducira se u slini i gastrointestinalnom traktu, no ta vrijednost može doseći i 20 %, ovisno o količini nitrata u pojedinim namirnicama (Gassara i sur. 2016.).

Shema 2.2.2. prikazuje promjene dušične kiseline koje se odvijaju u mesu. Nakon što dušična kiselina nastane iz nitrita u kiselom okruženju, može tvoriti anhidride koji su u ravnoteži sa oksidima NO i NO<sub>2</sub>. NO reagira sa mioglobinom ili aminokiselinama, npr. cisteinom ili glutationom, dok NO<sub>2</sub> reagira sa vodom pri čemu ponovo tvori jednu molekulu nitratne kiseline i jednu molekulu nitritne kiseline. Slijedom reakcija, nitriti (oksidacijsko stanje N<sup>3+</sup>) oksidiraju do nitrata sa oksidacijskim stanjem N<sup>5+</sup>. NO, kao drugi reaktant, ima oksidacijsko stanje N<sup>2+</sup> i biva reduciran (Honikel 2008.).



Shema 2.2.2. Reakcije dušične kiseline u mesu  
Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

Ako se nitriti dodaju mesu, prisutna sol iz nitrita će se otopiti kod pH mesa 5,5. Zbog pK (konstanta disocijacije) dušične kiseline, koja je 3,37, oko 50 % kiseline je disocirano, pa se može očekivati da će oko 99 % nitrita pri pH 5,5 postojati kao anioni (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Mala količina nedisocirane dušične kiseline je u ravnoteži sa svojim anhidridom N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (dudušikov trioksid) što je u ravnoteži sa dva oksida: dušikovim oksidom i dušikovim dioksidom (Honikel 2008.).

NO<sub>2</sub> može reagirati sa vodom što znači da se od dvije HNO<sub>2</sub> molekule formiraju jedna molekula HNO i jedna molekula HNO<sub>3</sub>. Nadalje, NO molekula se, u prisustvu kisika, lako može sama oksidirati do NO<sub>2</sub> što znači da dolazi do izdvajanja kisika i ujedno antioksidativnog djelovanja nitrita u mesnim proizvodima. Zbog nedostatka kisika smanjena je mogućnost razvoja užeglosti, odnosno ranketljivog okusa mesnih proizvoda. Dokazano je da ioni željeza ubrzavaju proces oksidacije, a nitriti, koji su dodani u meso, će potpuno disociirati u Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Honikel 2008.).

### 2.2.1. Redukcija nitrata u nitrite

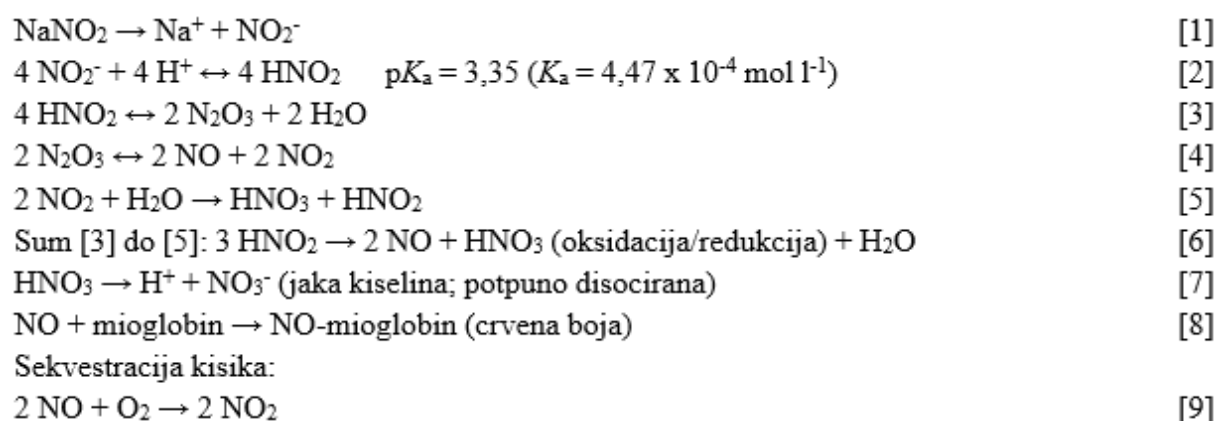
Nitriti se smatraju pravim konzervirajućim sredstvom i visoko reaktivnim spojevima koji imaju ulogu kao oksidacijsko, redukcijsko i nitrozacijsko sredstvo (Sebranek i Bacus 2007.a, b; Honikel 2004.), a u meso se dodaju kao natrijev nitrit i kalijev nitrit zajedno s kuhinjskom soli (NaCl). U mnogim državama propisano je da nitriti moraju biti pomiješani s običnom soli kako bi se spriječila prevelika doza nitrita koja je toksična u većim koncentracijama; obično se sa soli miješa 0,4 – 1,0 % nitrita (Honikel 2004.).

Nitritnu sol treba skladištiti na suhom mjestu kako u dodiru sa kisikom ne bi oksidirala u nitrat. U mesne se proizvode dodaje prvenstveno zbog inhibicije rasta sporulirajućih

mikroorganizama i to *Clostridium botulinum*, ali i *Salmonella* spp. i *Staphylococcus aureus* te za stabilizaciju boje i okusa. Proizvodi koji ih sadržavaju najčešće nazivamo salamurenim proizvodima (Honikel 2004.).

Redukcija nitrata u nitrite odvija se pod djelovanjem reduktivnih, odnosno denitrificirajućih bakterija, a kao takve mogu se izdvojiti bakterije iz roda *Micrococcus*, vrste *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Kocuria* (formirana od *Micrococcus*) *varians* i druge (Honikel 2004.; Sebranek i Bacus 2007.b), dok bakterije mliječne kiseline, *Lactobacillus plantarum* i *Pediococcus acidilactici* ne reduciraju nitrate u nitrite. Redukcija se može odvijati na temperaturama između 15 i 20 °C, no najučinkovitije su one više od 30 °C. Preporučene temperature za komercijalno dostupne nitrificirajuće bakterijske kulture su one između 38 i 42 °C kako bi vrijeme potrebno za pravilnu formaciju nitrita bilo što kraće. Istraživanja su pokazala da je upravo vrijeme kritični parametar u razvoju tipičnih svojstava konzerviranih mesnih proizvoda dobivenih od prirodnih izvora nitrata (Sebranek i Bacus 2007.b).

Na shemi 2.2.1.1. prikazan je slijed reakcija od nitritne kiseline do funkcionalnog spoja dušikovog oksida (NO) u mesnom proizvodu. Nitritna sol u vodi skoro u potpunosti disocira do nastanka Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) i NO<sub>2</sub><sup>-</sup> iona (reakcija [1]). Nitritni anion (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) sam po sebi nije aktivan kao konzervirajuće sredstvo. U mesu ili mesnom tijestu, pH vrijednost se kreće oko 5,5 – 6,0, te u ovakvo blago kiselom okruženju, mali dio NO<sub>2</sub><sup>-</sup> aniona reagira sa H<sup>+</sup> ionima do tvorbe dušikaste kiseline (HNO<sub>2</sub>) (reakcija [2]). HNO<sub>2</sub> je srednje jaka kiselina čija pK<sub>a</sub> (konstanta disocijacije kiseline) vrijednost iznosi 3,35. HNO<sub>2</sub> je u ravnoteži sa svojim anhidridom N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (reakcija [3]). N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se cijepa na NO + NO<sub>2</sub> (reakcija [4]). NO je djelotvorno konzervirajuće sredstvo koje se veže na mioglobin (reakcija [8]), a preostali NO<sub>2</sub> reagira sa vodom do nastanka nove HNO<sub>2</sub> i HNO<sub>3</sub> kiseline (reakcija [5]). HNO<sub>2</sub> ponovno ulazi u slijed događaja od jednadžbe [3], pa iz 3 HNO<sub>2</sub> nastanu 2 dušikova oksida (NO) i nitratna kiselina HNO<sub>3</sub> (reakcija [6]). HNO<sub>3</sub>, kao jaka kiselina, potpuno disocira u H<sup>+</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (reakcija [7]) (Honikel 2004.).



Shema 2.2.1.1. Slijed reakcija nitrita u vodenoj otopini kod pH oko 5,5 – 6,0

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2004.

NO se lako oksidira djelovanjem kisika do NO<sub>2</sub> (reakcija [9]). U usitnjenom mesnom tijestu prisutan je kisik i događaju se reakcije [9] i [5] što znači da drugi dio stvorenog NO oksidira do HNO<sub>3</sub>. Ova oksidacija može se smanjiti sjeckanjem pod vakuumom ili upotrebom antioksidanata kao što su askorbati, izoaskorbati ili tokoferoli. Međutim, kao rezultat niza



navedenih reakcija, znatan je dio nitrita (1/3 ili više) oksidirao u nitratae tijekom konzerviranja mesnih proizvoda. Ako se u proizvod tijekom proizvodnje dodaju samo nitriti, postoji mogućnost da bi se u gotovom proizvodu mogli pronaći i nitrati zbog oksidacije nitrita u nitratae (Honikel 2004.).

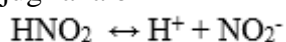
U mesnom tijestu sa višim pH (npr. jetrene kobasice ili krvavice sa pH 6,2 – 6,8), koncentracija HNO<sub>2</sub> je niža što znači da nitriti manje oksidiraju u nitratae. U kiselijem okolišu sirovih kobasica ili u mesnom tijestu kobasica tipa emulzije sa manjim pH (npr. zbog korištenja glukono-delta-laktona, GDL), koncentracija HNO<sub>2</sub> je viša: formira se više NO i intenzivnije crvena boja kao što bi bila u prisustvu antioksidanata (Honikel 2004.).

### 2.3. Nitrati i nitriti u mesu i mesnim proizvodima

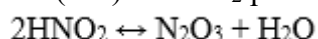
Prema postojećem Pravilniku o mesnim proizvodima (Pravilnik 2012.b), meso i mesni proizvodi svrstani su u devet kategorija unutar kojih postoje detaljnije podjele, odnosno skupine i podskupine, a proizvode se i stavljaju na tržište pod određenim nazivima. U kategorije se svrstavaju: Proizvodi od cijelih ili izrezanih komada ili mljevenog mesa, Kobasice, Suhomesnati mesni proizvodi, Gotova jela od mesa, Mesni proizvodi u komadima, Mesni proizvodi u vlastitom soku, Proizvodi od usitnjenog mesa, Slanina, Čvarci.

Pavlinić Prokurica i sur. (2010.) navode da je poznato da se nitrati mogu naći samo u onim mesnim proizvodima u koje su prethodno dodani nitriti. Reakcijom oksidacije, oko 20 % dodanih nitrita prelazi u nitratae dva sata nakon procesiranja i nastavlja se tijekom skladištenja. Glavnu ulogu u pretvorbi nitratae u nitrite kod suhomesnatih mesnih proizvoda ima dodatak askorbata ili njegovog izomera eritorbata dodatkom natrij-askorbata kao konzervansa, no nitrati nastaju i bez njegovog dodatka, ali u manjoj količini kod ostalih mesnih proizvoda.

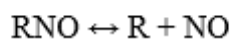
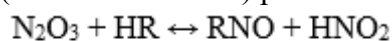
Kemijski gledano, nitriti su konjugirana baza dušikaste kiseline.



Kod fermentiranih mesnih proizvoda, kada je pH vrijednost veća od 6,5 tada je HNO<sub>2</sub> potpuno disocirana, dok kod pH 5,3 dušikasta je kiselina potpuno nedisocirana i to je optimalan pH za tvorbu aktivnog dušikovog (II) oksida (NO) iz HNO<sub>2</sub> preko didušikovog trioksida (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).



Redukciju nitratae u nitrite vrše reducirajući spojevi (reducirani NADH, citokromi, kinoni, askorbinska kiselina) kada N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (didušikov trioksid) prelazi u NO (dušikov (II) oksid).



70-ih godina prošlog stoljeća upotreba nitrita u mesnim proizvodima došla je u pitanje zbog znanstveno dokazane povezanosti s nastankom N-nitrozamina unatoč povoljnom djelovanju zbog čega se i upotrebljava. Kao što je već nekoliko puta spomenuto, nitriti reagiraju s aminima ili aminokiselinama mesa prilikom termičke obrade i u određenim uvjetima pri čemu nastaju spojevi N-nitrozodimetilamini (NDMA) i N-nitrozopirrolidin (NPYR) koji su dokazano kancerogeni, mutageni i teratogeni. Od više od 300 poznatih spojeva N-nitrozamina, oko 90 % spojeva je do sada testirano na životinjama i pokazalo se da uzrokuju različite vrste tumora, no ne postoji dovoljno čvrsti dokaz između pojave tumora kod ljudi i izloženosti N-nitrozo

spojevima. Zbog mnogih indirektnih dokaza o povezanosti s pojavom tumora kod ljudi, može se utvrditi da se radi o mogućem etiološkom uzročniku uzevši u obzir činjenicu da je 35 % svih tumora kod ljudi uzrokovano konzumacijom određene hrane. Sjedinjene Američke Države su 1998. godine nitrit proglasile razvojnim i reproduktivnim toksikantom (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.; Honikel 2008.).

Rezultati istraživanja znanstvenika pokazali su da na promjene količina nitrata i nitrita kao i na nastanak N-nitrozamina u različitim mesnim proizvodima uvelike utječu uvjeti skladištenja. Naime, razvoju bakterija odgovaraju više temperature pa dolazi do naglog smanjenja količina nitrita pri sobnoj i višim temperaturama, dok se vrijednosti nitrata pod utjecajem bakterija smanjuju, ali ne u toliko značajnoj mjeri. Količine nitrita smanjuju se i zbog reakcija nitrita sa sirovinama mesnih proizvoda iz kojih se proizvode, a to uključuje i način proizvodnje, duljinu skladištenja i dodatne sastojke koji se koriste u proizvodnji. Prilikom proizvodnje i prerade mesnih proizvoda, vrlo je bitan način dodavanja nitrita, odnosno dodaju li se odjednom ili postupno. Istraživanjem se također dokazalo da su za nastanak N-nitrozamina odgovorni nitrati, nitriti, primarni ili sekundarni amini ili amidi, proteini, peptidi ili aminokiseline koji se nalaze ili nastaju u mesnim proizvodima te koji pod utjecajem mikroorganizama postaju prekursori iz kojih, kao rezultat kemijskih reakcija, nastaju N-nitrozamini (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.).

Oksidacija nitrita u nitrata u mesu objašnjava zašto se u mesnim proizvodima, u koje su dodani samo nitriti, mogu pronaći i znatne količine nitrata. Njemački znanstvenici su prikazali rezultate istraživanja koji su se odnosili na koncentracije nitrita i nitrata u njemačkim mesnim proizvodima. Kobasice tipa emulzije, termički obrađene kobasice i termički obrađeni butovi proizvodili su se samo uz dodatak nitrita, ali sadržavali su srednju vrijednost od 20 – 30 mg nitrata/kg. U većini slučajeva, u konačnom proizvodu nitrita je bilo manje nego nitrata s koncentracijom ispod 20 mg nitrita/kg u srednjoj vrijednosti. Zabilježeno je samo nekoliko primjera i to kuhanih i sirovih kobasica te sirovih butova koji imaju višu koncentraciju nitrata. Bez dodatka nitrita u mesno tijesto, pojavljuje se rezidualna količina nitrata do 30 mg/kg što je, vjerojatno, zbog dodavanja vode i začina (Honikel 2008.).

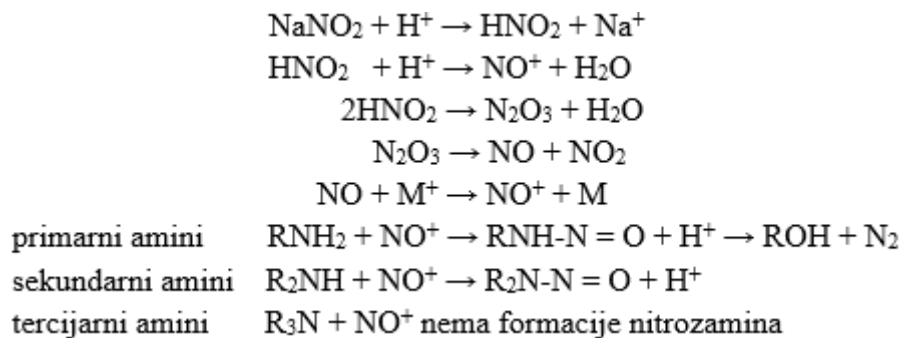
U istraživanju tijekom pripreme kobasica tipa emulzije i kuhanih kobasica dodano je 80 – 100 ppm nitrita, a kod pripreme kuhanih šunki 100 – 200 ppm nitrita. Unatoč dodatku nitrita, koncentracija u termički tretiranim proizvodima je bila ispod 20 ppm u više od 80 % proizvoda u vrijeme mjerenja 1 – 2 tjedna nakon proizvodnje. Situacija je bila slična i kod sirovih butova i sirovih kobasica. Ovim se proizvodima dodaju i nitrati (do 300 ppm) i nitriti (do 150 ppm). Neki proizvodi su imali koncentraciju nitrita iznad 20 ppm kod mjerenja 3 tjedna do 3 mjeseca nakon proizvodnje. Kuhane kobasice (kobasice sa jetrom i krvlju) sa pH > 6,2 ne mogu koristiti nitrite jer se HNO<sub>2</sub> formira samo u vrlo malim koncentracijama (Honikel 2004.).

### **2.3.1. Tvorba nitrozamina**

Kao sastojci hrane i tjelesni metaboliti u tjelesnim sekretima javljaju se amini i amidi, spojevi koji, prilikom reakcija s nitritima, mogu formirati karcinogene N-nitroso spojeve, a dijele se u dvije skupine:

1. nitrozoamini, koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju da bi postali nestabilni i reaktivni, te u takvom stanju mogu izazvati mutacije ili karcinom
2. nitrozoamidi, koji nastaju u kiseloj sredini, nestabilni su te se brzo raspadaju i oštećuju organe u kojima nastaju (Karolyi 2003.).

U konzerviranim mesnim proizvodima ili u želucu čovjeka nakon konzumacije te pod određenim uvjetima (npr. povišena temperatura tijekom pripreme) rezidualna količina nitrita može reagirati sa slobodnim aminokiselinama i aminima tvoreći N-nitrozamine. Eksperimentalna istraživanja na životinjama i epidemiološki dokazi tvrde da su N-nitrozamini potencijalno kancerogeni spojevi (Eskandari i sur. 2013.). Sjedinjene Američke Države započele su 1970-ih godina raspravu o formiranju nitrozamina u takvim proizvodima, posebice u prženoj slanini, a neki od znanstvenika su 1978. godine dokazali da slanina i njezini produkti nakon prženja sadrže znatne količine specifičnog nitrozamina N-nitrozopirolidina koji se formira kao posljedica dovoljne količine prisutnih sekundarnih amina, tretiranja visokim temperaturama ( $T > 130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i odgovarajuće pH vrijednosti (Honikel 2008.; Sindelar i Milkowski 2011., De Mey i sur. 2017.).



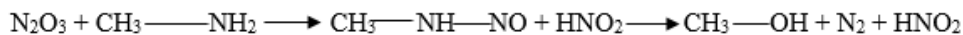
Shema 2.3.1.1. Kemijske reakcije formiranja N-nitrozamina ( $\text{M}/\text{M}^+$  su prijelazni metalni ioni poput  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ )

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

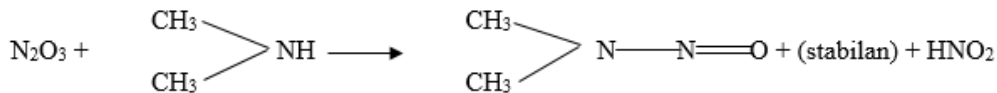
N-nitrozamini su prilično termostabilni spojevi (Institute of Food Technologists 1972.), nastaju nizom reakcija amina s nitritima (shema 2.3.1.1.) pri povišenoj temperaturi, no postoje neki preduvjeti koji moraju biti zadovoljeni:

- Prisutnost amina. Naime, u svježem mesu dostupne su vrlo male količine amina, a velike količine kreatina, kreatinina i slobodnih aminokiselina prolina i hidroksiprolina te nekih dekarboksilnih produkata njihovih aminokiselina (Honikel 2008.).
- Samo sekundarni amini tvore stabilne nitrozamine (slika 2.3.1.1.). Primarni amini se odmah razlože u alkohol i dušik, dok tercijarni amini ne mogu reagirati (Andrée i sur., 2010). Većina amina prisutnih u mesu su primarni amini koji potječu od  $\alpha$ -aminokiselina (Honikel 2008.).
- pH mora biti dovoljno nizak da se proizvede  $\text{NO}^+$  ili u njegovom formiranju moraju sudjelovati ioni željeza (Honikel 2008.). Pri niskoj pH vrijednosti potaknuta je tvorba nitrozacijskih sredstava, kao što su protonirana dušikasta kiselina ( $\text{H}_2\text{NO}_2^+$ ), didušikov trioksid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) ili nitrozil halogenidi ( $\text{NOX}$ ), dok se koncentracija neprotoniranih amina smanjuje (Andrée i sur. 2010.).

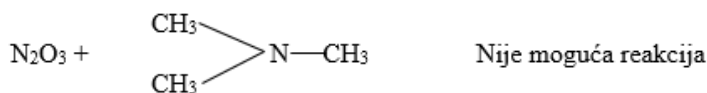
Primarni amini



Sekundarni amini



Tercijarni amini

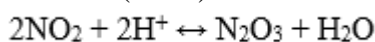


Slika 2.3.1.1. Tvorba N-nitrozamina

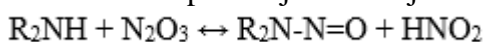
Izvor: prilagođeno prema Dikeman i Devine 2014.

Pavlinić Prokurica i sur. (2010.) navode podjelu N-nitrozamina na osnovu njihovih fizikalnih svojstava u dvije grupe: nehlapivi N-nitrozamini (hidroksilirani amini ili polifunkcionalne tvari) i hlapivi N-nitrozamini (nitrozirani dialkil amini i ciklički spojevi manje molekulske mase) od kojih je većina mutagena i čiji unos može voditi razvoju specifičnih karcinoma (De Mey i sur. 2017.).

N-nitrozamini nastaju kemijskom reakcijom nitrozacijskog agensa i sekundarnih amina. Kao nitrozacijski agensi služe oksidi dušika ( $\text{NO}_x$ ) u oksidacijskom stanju +3 ili +4, a nitrozacijski agens koji sudjeluje u stvaranju nitrozamina koji nastaju u hrani je nitratni anhidrid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ). Nitratni anhidrid brzo nastaje u kiseloj vodenoj otopini prema reakciji:



$\text{N}_2\text{O}_3$  se dalje spaja sa slobodnim parom elektrona neprotoniranih sekundarnih amina reakcijom nukleofilne supstitucije te nastaju N-nitrozamini:



Stupanj nitrozacije ovisan je o pH vrijednosti i uvjetovan je koncentracijama nitrita i amina. S obzirom da nitratni anhidrid reagira s neprotoniranim aminima, brzina, odnosno stupanj nitrozacije sekundarnih amina je obrnuto proporcionalan lužnatosti amina. Optimalna pH vrijednost za nitrozaciju većine sekundarnih amina je između 2,5 i 3,5. Radi se o dovoljno kiselom mediju kao što je i u ljudskom želucu, a koji pogoduje stvaranju nitrozamina iz prisutnih amina i nitratnog anhidrida (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.).

N-nitrozamini su često prisutni u suhomesnatim i prerađenim mesnim proizvodima jer im se, prilikom procesiranja, dodaju konzervansi u obliku nitrata ili nitrita (nitritna sol). Nitrati se, pomoću enzima nitrat-reduktaze (prisutnog kod mnogih bakterija), reduciraju u nitrite; nitriti stupaju u kemijske reakcije sa sekundarnim aminima tijekom procesa proizvodnje, skladištenja ili termičke obrade te nastaju nitrozamini (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.; De Mey i sur. 2017.). Od nitrozamina, u hrani se najčešće pojavljuju hlapljivi spojevi N-nitrozodimetilamin

(NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodibutilamin (NDBA), N-morfolin (NMOR), N-piperidin (NPIP), N-pirolidin (NPYR), N-tiazolidin (NTHZ), a od nehlapljivih se spojeva pojavljuju N-nitrozosarkozin (NSAR), N-hidroksiprolin (NHPRO), N-prolin (NPRO) i N-tiazolidin-4-karboksilna kiselina (NTCA) (Andrée i sur. 2010.; De Mey i sur. 2017.). Od navedenih spojeva, N-nitrozodimetilamin i N-nitrozodietilamin su najčešće otkriveni spojevi koji su vjerojatno kancerogeni, dok su ostali N-nitrozamini (NDBA, NPIP, NPYR, NMOR) svrstani kao mogući kancerogeni spojevi za ljudski organizam (De Mey i sur. 2017.). Za tvorbu NDMA neophodni su dimetilamini koji mogu nastati razlaganjem lecitina, glicina, kolina, sarkozina, betaina, kreatina i kreatinina, dok se NDEA može formirati iz aminokiseline alanina. Za tvorbu NPIP potrebni su piperidini, spojevi koji nastaju hidrolizom alkalina nastalih od piperina, važnog sastojka papra, te kadaverini koji se mogu dodati puferskoj otopini i također formirati NPIP. Kada se prilikom proizvodnje mesnih proizvoda dodaju nitriti i kadaverini, može se stvoriti više od 20 % NPIP koristeći sistem visoka temperatura-niska vlažnost. Matična aminokiselina lizin može također biti prekursor NPIP. S druge strane, lizin se može pretvoriti u kadaverin dekarboksilazom djelovanjem mikroorganizama. Prolin, putrescin i spermidin mogu se pretvoriti u NPYR, dok aminokiseline hidroksiprolin i ornitin te biogeni amin spermin ne rezultiraju formacijom NPYR. Nastanak NPYR usko se povezuje sa prženim i konzerviranim mesnim proizvodima (prženje slanine, roštiljanje kobasica, pečenje gotovih proizvoda kao što je pizza) iz razloga što pirolidinski prsten sadrži spojeve koji se pretvaraju u NPYR pri dodatku nitrita u proizvode ili toplinskom tretmanu na temperaturama od 170 °C (Honikel 2008.; Andrée i sur. 2010.; De Mey i sur. 2017.).

Pojava NDEA, NDBA i NMOR u mesnim proizvodima usko se povezuje sa prelaskom prekursora amina iz materijala za pakiranje, dok NPIP i NPYR mogu potjecati od upotrebe začina (npr. paprika i crni papar) koji sadrže pirolidine i piperidine. U mesnim proizvodima prisustvo biogenih amina i ostalih produkata degradacije proteina smatra se važnim izvorom prekursora amina. Između ostalih produkata proteinske degradacije, sekundarni amini (npr. dimetilamin) su direktno nitrozirani. Međutim, biogeni amini (kao npr. kadaverin, spermidin, spermin i putrescin) koji sadrže samo primarne grupe amina podliježu deaminacijskim i ciklizacijskim reakcijama do tvorbe odgovarajućih sekundarnih amina. Osim prisustva prekursora, mehanizam tvorbe N-nitrozamina je pod utjecajem okolišnih čimbenika kao što je vrijeme, temperatura, pH vrijednost i dr. (De Mey i sur. 2017.).

Pavlinić Prokurica i sur. (2010.) te Eskandari i sur. (2013.) tvrde da su inhibitori reakcija nitrozacije u hrani tvari s redoks potencijalom kao što su: askorbinska kiselina i askorbati, eritorbična kiselina, selen, vitamin E, tokoferoli i dr. Askorbinska kiselina inhibira stvaranje nitrozamina mehanizmom kompeticije nitrostabilnih prekursora (amini) s nitrozacijskim agensom. Kompletna inhibicija jedino je učinkovita u prisustvu veće količine askorbinske kiseline i/ili u anaerobnim uvjetima. Produkt koji nastaje reakcijom između nitrita i askorbinske kiseline odgovoran je ne samo za nitrozacijske reakcije, već i za gubitak nitrita tijekom sušenja (prženja) mesa. Za smanjenu produkciju reakcijskog produkta  $\text{NO}^+$  zaslužan je vitamin E, dok selen smanjuje produkciju reaktivnog  $\text{ONOO}^-$  produkta. Kako se u posljednje vrijeme sve više teži smanjivanju upotrebe nitrata i nitrita prilikom konzerviranja i procesiranja mesnih proizvoda, tj. upotrebi njihovih minimalnih količina, dokazano je da kombinacija 40 ppm  $\text{NaNO}_2$  i 2600 mg/kg sorbata reducira tvorbu N-nitrozamina u konzerviranim mesnim proizvodima od gotovo 100 mg/kg do manje od 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pa su stoga Sjedinjene Američke

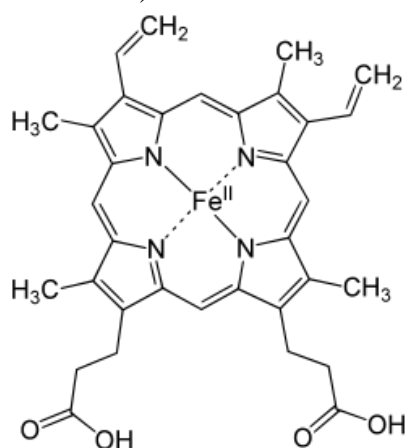
Države i druge zemlje, kao prevenciju stvaranja N-nitrozo spojeva, predložile dodatak 500 mg/kg natrij-askorbata. Tvorba nitrozamina može se ograničiti i blagim procesom zagrijavanja (ispod 160 °C), npr. pasterizacijom ili sterilizacijom te gama zračenjem (De Mey i sur. 2017.).

Osim amina, amidi i nezasićene masne kiseline ili njihovi derivati također mogu reagirati s nitritima ili njihovim derivatima. Masne kiseline ili njihovi derivati mogu tvoriti alkil nitrite o čijim se koncentracijama i prisutnosti u mesnim proizvodima ne zna puno. U tom kontekstu trebalo bi spomenuti da nitrozamini mogu biti prisutni i u elastičnoj gumenoj mrežici u koje se stavljaju mesni proizvodi, kao npr. kuhana šunka (Honikel 2008.).

## 2.4. Utjecaj nitrata i nitrita na boju mesnih proizvoda

Boja hrane potječe od prirodnih pigmenata ili pak dodanih bojila (aditiva). Općenito govoreći, pigmenti u hrani mogu se podijeliti u dvije skupine: pigmenti biljnog i pigmenti životinjskog porijekla. Po kemijskom sastavu pigmenti su najčešće porfirini, karotenidi i flavonoidi od kojih su porfirini jedna od najraširenijih grupa pigmenata. U zelenim biljkama nalaze se u obliku klorofila, a u crvenom mesu u obliku mioglobina (Jašić 2009.).

Osim što je crveni mišićni pigment, mioglobin je stanična organela koja ima funkciju reverzibilnog vezanja kisika. Aktivniji mišići sadrže više mioglobina, zbog čega su crveniji (npr. but i plećka). Prosječni maseni udio mioglobina u mišićnim vlaknima životinja za klanje kreće se od 0,02 % do 0,46 % ovisno o vrsti i dobi životinje. Obično vrijedi da starije životinje imaju veći maseni udio mioglobina, a samim time i crveniju boju mesa. Boja mesa također ovisi o spolu, starosti, anatomskoj lokaciji te o načinu uzgoja i korištenja životinja. Funkcionalna skupina mioglobina i hemoglobina je prostetska skupina hem (slika 2.4.1.). Mioglobin se nalazi u mišićnom vlaknu i od ukupnog kisika u org.anizmu životinja veže oko 10%, dok se hemoglobin nalazi u krvi i veže oko 90% kisika. Za života, mioglobin i hemoglobin su funkcionalno povezani. Nakon klanja i ispuštanja krvi, mioglobin veže oko 95 % kisika, te i nakon smrti zadržava svojstva oksidacije i redukcije što rezultira *postmortalnim* promjenama boje mesa (Kovačević 2001.).



Slika 2.4.1. Struktura hema

Izvor: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Hem>

Tri su osnovne boje mesa: „nativni“ (izvorni) mioglobin, oksimioglobin i metmioglobin (Kovačević 2001.; Honikel 2008.). Mioglobin (Mb) je reducirani pigment purpurno crvene boje kod kojeg je željezo u središtu hema u fero obliku ( $Fe^{2+}$ ) (Kovačević 2001.). Na njega se može vezati CO pošto je biatomska molekula slična kisiku i dušikovom (II) oksidu (NO) (Honikel 2008.). U mioglobinu kofaktor hem, porfirinski prsten sa ionom željeza u centru, veže različite ligande, a željezo može postojati u  $Fe^{2+}$  ili  $Fe^{3+}$  obliku (Gassara i sur. 2016.). Oksimioglobin ( $MbO_2$ ) je oksigenirani pigment svijetlocrvene boje kod kojega je željezo u središtu hema također u fero obliku ( $Fe^{2+}$ ) (Kovačević 2001.), termolabilan je i disocira (Honikel 2008.), dok je metmioglobin (MMb) oksidirani pigment tamnocrvene boje (moguće smeđa i crna) kod kojega je željezo u središtu hema u feri obliku ( $Fe^{3+}$ ). U mišićima žive životinje metmioglobina ima jako malo, no *post mortem* i nestankom kisika, njegova količina se povećava. Mioglobin i oksimioglobin su poželjne, dok je metmioglobin nepoželjna boja mesa iz čega proizlazi da je fero ( $Fe^{2+}$ ) poželjan oksidacijski oblik željeza u hemu, a feri ( $Fe^{3+}$ ) nepoželjan (tablica 2.4.1.).

Tablica 2.4.1. Različiti oblici mioglobina

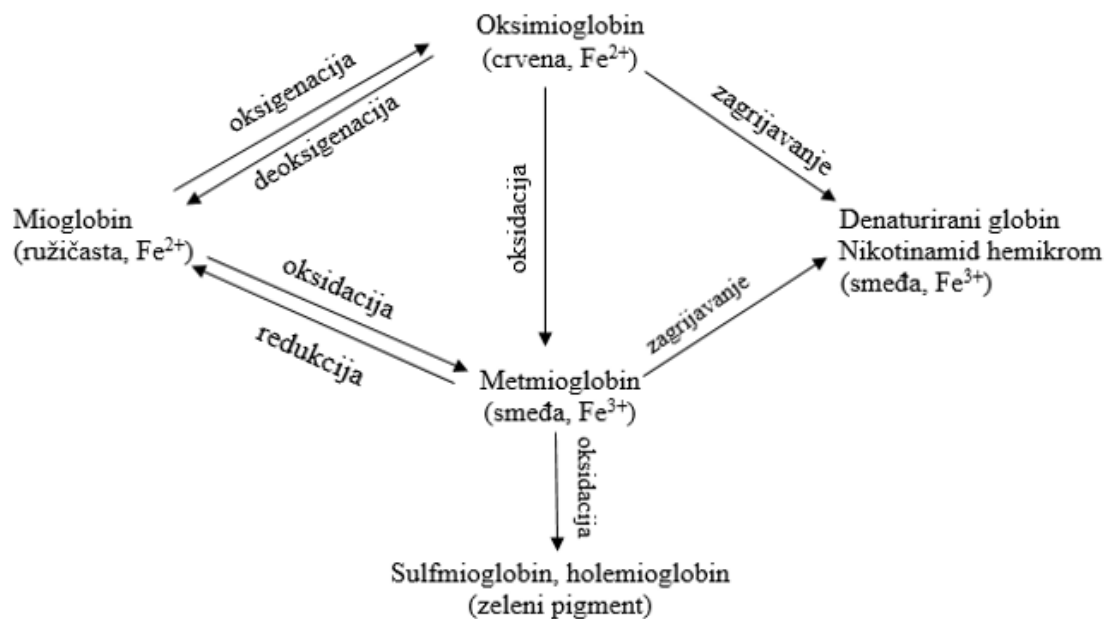
Oblik mioglobina	Oksidacijsko stanje	Ligand na hemu	Boja	Stanje
Mioglobin (reducirani)	$Fe^{2+}$	Voda	Ružičasto-crvena	Nativni
Oksimioglobin	$Fe^{2+}$	Kisik	Svijetlocrvena	Nativni
Metmioglobin	$Fe^{3+}$	Voda	Smeđa	Nativni
Denaturirani globin	$Fe^{3+}$	Voda	Siva	Denaturirani

Izvor: prilagođeno prema Feiner 2006.

Preostali oblici mioglobina koji se mogu pojaviti u mesu su (slika 2.4.2.):

- sulfmioglobin koji je zelenkaste boje kod kojega je željezo u središtu hema u feri obliku, a nastaje u prisutnosti sulfhidrilnog spoja i  $O_2$ , i može konvertirati u Mb i
- kolemioglobin koji je nepoželjne zelenkaste boje kod kojega je željezo u središtu hema u feri obliku, a nastaje djelovanjem reducirajućih tvari:  $H_2O_2$  ili askorbata te ne konvertira ponovo u Mb
- karboksimioglobin koji je poželjne svjetlo crvene boje kod kojega je željezo u središtu hema u fero obliku, nastaje vezanjem CO i vrlo je stabilan pigment na zraku, što se često koristi pri pakiranju svježeg mesa u modificirane atmosfere (Kovačević 2001.).

Najuočljiviji učinak nitrita na konzervirano meso i mesne proizvode je stabilna crvena boja koja se razvija nizom reakcija sve dok se ne stvori nitrozilmioglobin (Andrée i sur. 2010.). Nitriti u mesu ne djeluju direktno kao nitrozacijsko sredstvo, već najprije, u blago kiselim uvjetima kakvi postoje u mišićima životinja *post mortem*, tvore posrednike kao što su  $N_2O_3$  i NOCl (u prisustvu soli) čiju daljnu tvorbu do NO potpomažu askorbati ili eritorbati. Dobiveni NO reagirat će sa ionima željeza iz mioglobina i metmioglobina i na taj način formirati tipičnu boju konzerviranih mesnih proizvoda. Nadalje, NO reagira sa metmioglobinom te reakcijom redukcije prelazi iz oksidiranog hema u reducirani pigment mioglobin (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

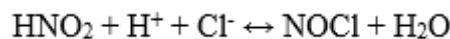


Slika 2.4.2. Promjena boje svježeg mesa

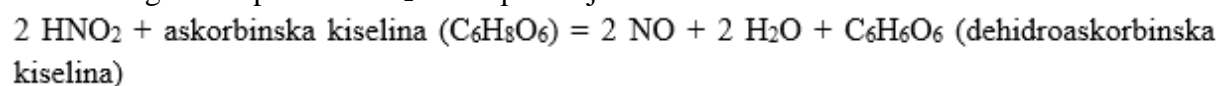
Izvor: prilagođeno prema <http://what-when-how.com/food-colors/natural-food-pigments-part-1/>

Kod proizvodnje fermentiranih kobasica, padom pH vrijednosti nadjeva ubrzava se razvoj salamurene boje jer se taj proces brže odvija kako se pH približava vrijednosti od 5,2 do 5,3 (slika 2.4.3.). Tada je prisutno više nedisocirane dušikaste kiseline (HNO<sub>2</sub>) te se stvara veća količina dušikovog (II) oksida (NO). Stabilizacija boje se odvija kod pH 5,2 i ispod jer dolazi do denaturacije nitrozilmioglobina zakiseljavanjem. Drugi proces koji se događa kada pH pada ispod 5,5 je smanjena aktivnost enzima nitrat reduktaza, pa dolazi do slabe ili gotovo nikakve redukcije nitrata u nitrite. To može predstavljati tehnološki problem kod stvaranja i stabilizacije boje samo pomoću nitrata i kad uz to treba proces zakiseljavanja brzo završiti. Tada se stvaraju male količine nitrita iz nitrata, jer nema dovoljno vremena za potrebnu redukciju. Posljedica toga je stvaranje slabe salamurene boje. Treba istaknuti kako prilikom proizvodnje fermentiranih kobasica prednost treba dati upotrebi vakuum kutera, vakuum miješalica i vakuum punilica jer ako ima kisika u nadjevu, dolazi do stvaranja oksimioglobina koji u svom „nativnom“ (izvornom) obliku ima privlačnu boju. Međutim, kako pada pH vrijednost, dolazi do denaturacije oksimioglobina koji tada prelazi u ružičastu boju. Ova pojava je posebno naglašena u proizvoda s malim promjerom ovitka, koji su često brzo fermentirajući, odnosno zakiseljavanje se odvija vrlo brzo, a samim time i denaturacija mioglobina (Feiner 2006.).

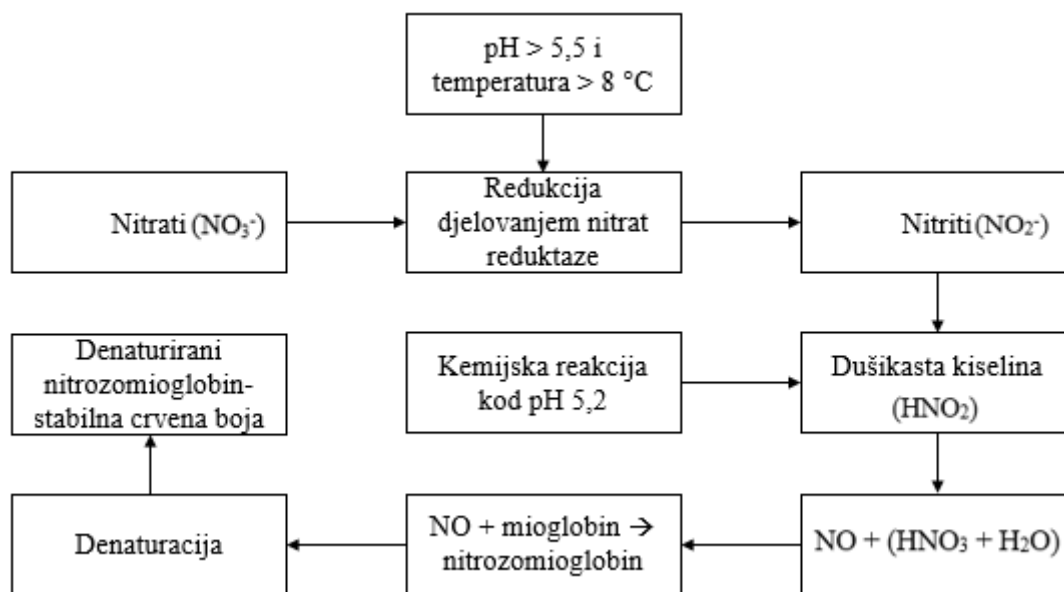
Sol ubrzava formiranje nitrozilmioglobina stvaranjem nitrozilklorida (NOCl) koji je jači prekursor NO nego N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:



Reakcije stvaranja NOCl i N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> brže su u kiselom mediju (optimalan pH 5,3) pa se pribjegava dodatnom zakiseljavanju mesa u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda sa glukono-delta-laktonom (GDL) ili kiselinama. Dodatkom askorbata dolazi do brze redukcije rezidualnog nitrita preko HNO<sub>2</sub> u NO prema jednadžbi:







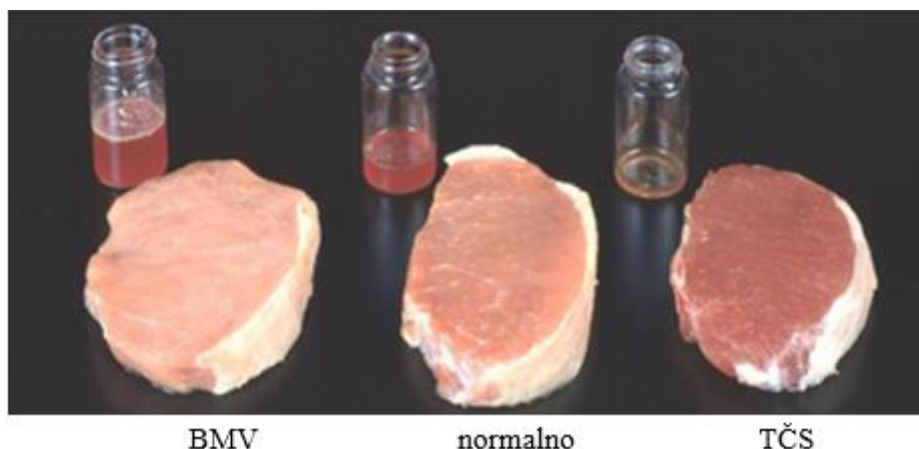
Slika 2.4.3. Mehanizam razvoja salamurene boje iz nitrata

Izvor: prilagođeno prema Feiner 2006.

Sebranek i Bacus (2007.b) te Sindelar i Milkowski (2011.) tvrde da tek 2 – 14 ppm nitrita (ovisno o vrsti) može izazvati ružičasto obojenje u termički obrađenim mesnim proizvodima. Prijašnja istraživanja iz 1970.-ih godina pokazala su da je 25 – 50 ppm nitrita bilo dovoljno za razvoj stabilne boje konzerviranih mesnih proizvoda, a danas općenito vrijedi da je za konzervirane mesne proizvode dovoljno 40 – 50 ppm nitrita za razvoj tipične boje. No, problem predstavlja nemogućnost određivanja apsolutne količine nitrita dobivenih iz nitrata zbog reaktivne prirode nitrita u mesu i može se jedino uspostaviti iz količine nitrata koja je potrošena (Sebranek i Bacus 2007.b). Za očuvanje boje konzerviranih mesnih proizvoda prihvaćena je mala količina rezidualnih nitrita, tek 10 – 15 ppm (Sindelar i Milkowski 2011.).

Postoje i posebne promjene boje mesa koje su posljedica patološkog stanja životinje (slika 2.4.4.). Blijedo, mekano, vodnjikavo (BMV, engl.: *PSE – pale-soft-exudative*) meso najčešće se javlja kod svinja i to onih s genetskim predispozicijama, rjeđe kod goveda, a posljedica je stresa, odnosno lošeg postupanja sa životinjama neposredno prije klanja. Tada dolazi do ubrzane *postmortalne* glikolize koja već nakon 45 minuta nakon klanja rezultira povećanjem temperature mesa (35 – 46 °C) i naglog pada pH vrijednosti ispod 5,6 te dolazi do denaturacije proteina i oštećenja sarkoplazme što rezultira otpuštanjem vode i migracijom stanične vode u izvanstanične prostore. Pojava BMV mesa predstavlja poseban tehnološki problem jer ono postaje, kao što i sam naziv govori, blijedo, mekano i vodnjikavo, a površina mu postaje vlažna. Takvo meso tijekom procesiranja gubi mesni sok, lako podliježe oksidativnim promjenama, izmijenjen mu je proces zrenja, teško se salamuri, a termičkom obradom postaje „suho“ i neukusno. S druge strane postoji i tamno, čvrsto, suho (TČS, engl.: *DFD – dark-firm-dry*) meso koje se javlja podjednako i kod svinja i kod goveda. Najčešći uzroci pojave TČS mesa su: kronični ili dugotrajni stres, transport na duge udaljenosti, dugotrajno gladovanje te prenapučenost životinja na jednom mjestu. Pojava TČS mesa nastaje kada pH ostaje visok (iznad 6) čak i 12 – 24 sata nakon klanja što se događa zbog nedostatka glikogena u mišićnom tkivu u trenutku klanja, pa visoki pH *post mortem* utječe na zatvorenost strukture mesa, teži

prodor kisika u meso i jači lom svjetlosti. Kronični stres prije klanja dovodi do potrošnje uskladištenog glikogena, čime je glikogen manje dostupan *post mortem* što utječe na normalan proces zakiseljavanja pa samim time pH ostaje visok (Kovačević 2001.).



Slika 2.4.4. BMV, normalno i TČS meso

Izvor: prilagođeno prema <https://bohatala.com/chemical-and-physical-properties-of-meat/>

Kovačević (2001.) navodi čimbenike koji utječu na promjene boje mesa, a to su: prisutnost kisika (poželjan je okolni medij bogat s O<sub>2</sub>), pH mesa (djeluje na strukturu mesa, topljivost kisika u mesu (Sebranek i Bacus 2007.b)), svjetlo (pojedina valna područja nisu poželjna za boju), NaCl (zbog oksidativnog djelovanja Cl, NaCl 5 – 6 puta ubrzava stvaranje nepoželjnih pigmentata), salamurenje (stabiliziranje boje mesa), askorbinska kiselina (u manjim količinama djeluje povoljno i reducira MMb u Mb), sušenje (povećava koncentraciju pigmenta), mikroorganizmi (aerobni mikroorganizmi troše O<sub>2</sub> i smanjuju njegov parcijalni tlak u okolnom mediju), temperatura (povećanje temperature može uzrokovati denaturaciju proteina i smanjiti topljivost kisika), vrijeme, te količina prisutnih reducensa (Sindelar i Milkowski 2011.). Svaki od navedenih čimbenika ima poseban mehanizam djelovanja.

## 2.5. Antimikrobni učinak nitrata i nitrita

Nitrati i nitriti se, osim za postizanje i očuvanje boje proizvoda, dodaju prilikom prerade mesa u kombinaciji s ostalim faktorima kako bi smanjili ili spriječili rast i razmnožavanje patogenih bakterija, od kojih je najpoznatija *Clostridium botulinum* (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.; Sebranek i Bacus 2007.a, b; Sindelar i Milkowski 2011.; Honikel 2004.; Kovačević i sur. 2016.), ali i ostalih kao npr. *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* (Sindelar i Milkowski 2011.). Nitriti su snažni inhibitori anaerobnih bakterija od kojih je najvažnija *Cl. botulinum* (Sebranek i Bacus 2007.a, b). Kako se spore *Cl. botulinum* nalaze svugdje u tlu, predstavljaju potencijalnu opasnost za životinje i cjelokupni prehrambeni lanac. Otporne su na mnoge oblike termičke obrade prilikom proizvodnje hrane te se zbog toga mogu naći u mnogim vrstama hrane. Konzumacijom hrane u kojoj se razmnožava bakterija *Clostridium botulinum* pri čemu proizvodi neurotoksine, toksini se apsorbiraju u probavnom traktu i vežu na periferni živac, te

inhibiraju otpuštanje neurotransmitora (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.). Učinkovitost nitrita kao antibotulinskog i općenito antimikrobnog sredstva ovisi o nekoliko okolišnih čimbenika: pH vrijednosti, koncentraciji natrijevog klorida, fosfata, prisustva reducensa (askorbati, eritorbati), količini željeza i toplinskoj obradi (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

Simptomi koji karakteriziraju botulinske infekcije su mučnina, povraćanje, umor, nesvjestica, poteškoće disanja, gutanja, govora, suha usta, slabost lica, mutan vid, opušteni kapci, a može doći i do „mlohavne paralize“ mišića- vrste paralize u kojoj su mišići u opuštenom stanju (Katušić 2017.). Simptomi se razvijaju unutar 12 – 72 sata nakon konzumacije kontaminirane hrane (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.), odnosno 18 – 36 sati nakon što se otrov nađe u tijelu, ovisno o količini koja je unesena u organizam (Katušić 2017.). Stopa smrtnosti kao posljedica djelovanja iznosi 10 %, no ukoliko smrt ne nastupi, oporavak traje nekoliko mjeseci (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.).

Zanimljiva je činjenica da postoji i pozitivna strana botulizma. Naime, znanstvenici su otkrili da paraliza do koje dolazi prilikom intoksikacije *Clostridium botulinum* pozitivno djeluje na smanjenje bora lica tako što sprječava kontrakcije mišića ispod kože, zatim pomaže kod pretjeranog znojenja te kod grčeva očnih kapaka (Katušić 2017.).

Glavni uzrok pojave botulizma u mnogim zemljama jest upravo konzumacija mesa i mesnih prerađevina jer je ono idealan medij za rast i razvoj te proizvodnju toksina *Clostridium botulinum*. Tijekom 70.-ih godina prošlog stoljeća došlo je do spoznaje da dodatak određene količine nitrita uspješno djeluje na suzbijanje rasta i razvoja *Clostridium botulinum* kod konzerviranih, polutrajnih i prerađenih mesnih proizvoda. Za svaki proizvod potrebno je odrediti količinu dovoljnu za uspješno djelovanje (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.). Kako bi antibotulinski utjecaj nitrita na mesne proizvode bio što izraženiji, treba obratiti pozornost na nekoliko drugih čimbenika: sol, pH vrijednost, toplinski tretman, razinu spora, početnu količinu nitrita dodanu tijekom proizvodnje te rezidualnu količinu nitrita u mesu (Sindelar i Milkowski 2011.). Također se pretpostavlja da je za rast *Clostridium botulinum* bitna i količina željeza prisutna u mesu. Naime, smatra se da dušikov-oksidi inaktiviraju željezo-sulfat koji je prisutan u mesu i to je vjerojatni mehanizam inhibicije rasta i razvoja *Clostridium botulinum* dodatkom nitrita suhomesnatim i prerađenim mesnim proizvodima (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.). U termički obrađenim mesnim proizvodima, antibotulinski učinak nitrita odvija se u dvije faze životnog ciklusa mikroorganizama. Prva faza uključuje inhibiciju vegetativnih stanica mikroorganizama koje su nastale od preživjelih spora, dok se u drugoj fazi sprječava njihovo dijeljenje (Sindelar i Milkowski 2011.). Do sada su izvedeni mnogi pokusi u cilju utvrđivanja minimalne količine nitrita koja djeluje inhibirajuće na rast spora i klijanje *C. botulinum* prilikom proizvodnje i prerade mesnih proizvoda zbog potencijalne opasnosti od nastanka kancerogenih nitrozamina. 1972. godine kao granica za učinkovito suzbijanje rasta i razvoja *Clostridium botulinum* smatralo se da je količina od 150 ppm nitrita dovoljna (Institute of Food Technologists 1972.), a znanstveni odbor za hranu (Scientific Committee on Food) je 1990. godine utvrdio da je 50 – 100 mg nitrita kao NaNO<sub>2</sub>/kg mesnih proizvoda dovoljno za većinu proizvoda, dok je za proizvode s duljim rokom trajanja i malom količinom soli potrebno dodati 50 – 150 mg nitrita/kg kako bi se inhibirao rast *Clostridium botulinum* (Pavlinić Prokurica i sur., 2010). Bez dodatka nitrita u mesne proizvode, opasnost od nastanka botulizma bila bi puno veća (Institute for Food Technologists 1972.).

Općenito se smatra da nitriti imaju veći baktericidni utjecaj na gram-pozitivne bakterije, u odnosu na gram-negativne (npr. *Salmonella*, *Escherichia coli*), pa je stoga nekoliko znanstvenika utvrdilo da je za inhibiranje rasta i razmnožavanja npr. *Staphylococcus aureus* dovoljno 200 ppm nitrita. Ovisno o vrsti bakterija i okolišnim čimbenicima, nitriti imaju različit mehanizam djelovanja pa tako, na primer, učinkovitije ograničavaju rast bakterija pri niskoj pH vrijednosti. U prisustvu nitrita, natrijev laktat i natrijev diacetat također djeluju inhibirajuće na rast i razmnožavanje patogena kao npr. *Listeria monocytogenes* (Sindelar i Milkowski 2011.).

## 2.6. Antioksidacijski učinak nitrita

Osim što djeluju na boju te inhibiraju rast i razmnožavanje mikroorganizama, nitriti djeluju i kao jaki antioksidanti u mesu i proizvodima od mesa (Sebranek i Bacus 2007.a, b; Sindelar i Milkowski 2011.; Honikel 2004.; Andrée i sur. 2010.). Mehanizam antioksidativnog djelovanja temelji se na izdvajaju kisika i vezanju na ione željeza u mioglobinovom kofaktoru hemu (Honikel 2004.). Antioksidativni efekt uključuje reakcije željeza (slobodni ioni željeza) iz hema i proteina, te formaciju nitrozo i nitrozil spojeva koji imaju antioksidativna svojstva. Pretpostavlja se da je ovaj mehanizam ovisan o mnogim istim početnim reakcijama nitrita koje tvore dušikastu kiselinu za boju konzerviranih mesnih proizvoda. Dušikovi oksidi u kombinaciji sa slobodnim željezom i željezom iz hema u mesu reduciraju katalitičku ulogu željeza kod oksidacije lipida. Dovoljno je 20 – 50 ppm nitrita za antioksidativni učinak (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

Nitriti imaju ulogu i kod formiranja karakterističnog okusa konzerviranih mesnih proizvoda (Andrée i sur. 2010.; Sebranek i Bacus 2007.a, b), zatim arome, mirisa i teksture. Naime, još uvijek nije dovoljno razjašnjen točan mehanizam djelovanja nitrita na okus (Sindelar i Milkowski 2011.). Neke od razlika u okusu mogu biti posljedica suzbijanja oksidacije lipida pomoću nitrita (Sebranek i Bacus 2007.a, b) na način da sprječavaju stvaranje slobodnih radikala, a posljedično tome i ranketljiv okus. Neka istraživanja pokazuju da nema značajnih razlika u okusu između konzerviranih i nekonzerviranih salama sve do perioda nakon 3 mjeseca skladištenja kada su zabilježene više koncentracije nitrita. Razlike u okusu uočene su i kod fermentiranih sušenih kobasica, a mogu se pripisati djelovanju natrijevog nitrita. Dovoljno je 20 – 40 ppm nitrita za postizanje arome, no istraživanjem je uočeno da nitriti inhibiraju razvoj užeglih okusa pri relativno niskim razinama (Gassara i sur. 2016.), stoga se smatra da je količina od 50 ppm dovoljna da bi izazvala razlike u okusu uočene od strane ispitanih potrošača. Kako još uvijek nije dovoljno razjašnjen način djelovanja nitrita na okus, postoji niz spojeva sa kojima bi se mogle povezati uočene razlike, npr. reakcije nitrita sa ugljikovodicima, alkoholima, ketonima, furanima, pirazinima, te sumporovim i dušikovim heterocikličnim spojevima (Sindelar i Milkowski 2011.).

## 2.7. Promjene u sadržaju tijekom skladištenja

U tablici 2.7.1. prikazane su promjene u sadržaju nitrita tijekom skladištenja i čuvanja toplinski obrađenih proizvoda. Najveće promjene zapažene su tijekom proizvodnje pa sve do završetka procesa termičke obrade. Gubitak nitrita odvija se tijekom 60 dana hladnog skladištenja (Honikel 2008.). Kada se nitriti dodaju mesu, ili reagiraju sa brojnim kemijskim komponentama, kao što su proteini, ili ih vežu. Velika količina nitrita dodanih tijekom procesa proizvodnje može biti potrošena ili izgubljena tijekom određenih koraka proizvodnje. Obično između 10 i 20 % dodanih nitrita ostaje nakon procesa proizvodnje (rezidualni nitriti) i ta razina nastavlja padati tijekom skladištenja. Za održavanje tipične boje konzerviranih mesnih proizvoda tijekom produženog roka trajanja, odnosno skladištenja, uzima se mala količina rezidualnih nitrita, tek 10 – 15 ppm, koja je dovoljna da služi za obnavljanje pigmenta izgubljenog oksidacijom (Sindelar i Milkowski 2011.). Koncentracija rezidualnih nitrita pod utjecajem je toplinskog procesa i hladnog skladištenja. Ovisno o formulaciji, 35 – 50 % dodanog NaNO<sub>2</sub> otkriveno je kao rezidualni nitrit 1. dan nakon termičke obrade. Koncentracija rezidualnih nitrita u mesnim proizvodima ovisi o mnogim čimbenicima kao što su proces toplinske obrade, pH proizvoda, dodatak reducirajućih agensa, temperatura skladištenja te sastav mesnih proizvoda (Eskandari i sur. 2013.).

Tablica 2.7.1. Rezidualni nitriti u fino usitnjenim toplinski obrađenim kobasicama

Skladištenje	Koncentracija dodanih nitrita (mg/kg)			
	75	100	150	200
Nakon termičke obrade	21,9	30,5	59,5	53,7
20 dana	7,5	9,3	10,2	15,4
40 dana	3,6	6,4	7,6	7,7
60 dana	0,5	0,9	4,0	5,8

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

Tablica 2.7.2. prikazuje da više pH vrijednosti usporavaju nestanak nitrita. Koncentracija nitrata je najviša 0. dan nakon termičke obrade i pada tijekom skladištenja. Smanjenje količine nitrita tijekom skladištenja je sporije sa povećanjem pH vrijednosti (Honikel 2008.). Različiti termički tretmani, kao što su pasterizacija i sterilizacija, imaju veliki utjecaj na mesni homogenat. Utvrđeno je da s porastom temperature zagrijavanja dolazi do većeg gubitka nitrita, tvorba nitrata je smanjena, a dodatkom askorbata i polifosfata gubitak nitrita u mesnom tijestu se ubrzava, dok se nitriti djelomično oksidiraju do nitrata (Honikel 2008.).

Uvjeti skladištenja mogu utjecati na tvorbu N-nitrozamina u lako pokvarljivim prerađenim mesnim proizvodima. Naime, povećanje količine N-nitrozildimetilamina tijekom roka trajanja proizvoda povezano je s mikrobnim rastom. Zbog aktivnosti mikroorganizama, nastavlja se stvaranje prekursora amina te posljedično tome može doći do redukcije nitrata u nitrite. Bez obzira na sterilizaciju konzerviranih mesnih proizvoda, ipak postoji mogućnost postupnog povećanja količine N-nitrozamina (De Mey i sur. 2017.).

Tablica 2.7.2. Sadržaj nitrita i nitrita nakon termičke obrade pri različitim pH vrijednostima

pH	Dani skladištenja	Nitriti		Nitriti	
		dodano 100 mg/kg	dodano 200 mg/kg	dodano 100 mg/kg	dodano 200 mg/kg
5,3	0	28	70	20	50
	6	20	41	16	27
	12	5	18	9	20
5,8	0	45	120	30	64
	6	24	110	22	40
	12	13	21	8	17
6,3	0	58	135	18	40
	6	41	112	17	30
	12	31	90	10	22

Izvor: prilagođeno prema Honikel 2008.

## 2.8. Utjecaj na zdravlje

Još su 1956. godine otkrivena oštećenja na jetri potaknuta dimetilnitrozaminima. Od tada je prisutnost nitrozamina utvrđena u hrani kao što je sir, riblji odrezak, brašno, gljive i alkoholna pića. Deset godina kasnije, 1966. godine, otkriveno je da visoki želučani pH, kakav postoji kod djece, omogućuje redukciju nitrata u nitrite djelovanjem bakterija, a kao posljedica redukcije javila se methemoglobinemija. Naime, bolest nastaje kod djece nakon uzimanja kaše od špinata koji je prirodan izvor nitrata (Institute of Food Technologists 1972.) ili putem pitke vode. Methemoglobinemija uzrokovana pitkom vodom nastaje kod beba mlađih od 3 mjeseca, a glavni razlog tome je bakterijska kontaminacija vode te gastrointestinalna infekcija i inflamacija sa sigurnom proizvodnjom dušikovih oksida. Drugi naziv bolesti jest „sindrom plavog djeteta“ jer uzrokuje pojavu plave boje kože zbog visoke koncentracije nitrata u krvi. Nitriti se vežu na hemoglobin te rezultiraju u kemijski promijenjenom hemoglobinu (methemoglobin) koji sprječava dopremu kisika do tkiva, a kao posljedica reakcije javlja se plava boja kože djeteta (Gassara i sur. 2016.).

Od 1970.-te godine pa nadalje, provedena su brojna istraživanja na temu zdravstvene brige vjerujući da je rizik od pojave karcinoma i leukemije direktno povezan s nitritima iz konzerviranih mesnih proizvoda (Sindelar i Milkowski 2011.), odnosno da tumor mogu uzrokovati nitrozamini koji nastaju u tijelu (točnije u želucu) od probavljenih nitrita i sekundarnih amina. Sekundarni amini mogu nastati tijekom kuhanja, odnosno toplinske obrade mesnih proizvoda (Institute of Food Technologists 1972.). Također postoji opasnost od nastanka problema s nazofaringealom, rijetkog tipa tumora glave i vrata (Gassara i sur. 2016.).

Znanstveni odbor za hranu je 2002. godine utvrdio prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable Daily Intake*, ADI) za nitrate koji iznosi 0 – 3,7 mg/kg tjelesne težine/dan, što je ekvivalentno unosu od 222 mg nitrata dnevno za odraslu osobu od 60 kg, dok ADI za nitrite iznosi 0 – 0,07 mg/kg tjelesne težine/dan. Iz navedenog se može zaključiti da su nitriti znatno manje štetni za unos u organizam od nitrita i mogu se dodavati u većim količinama nego nitriti.

Uz meso i mesne prerađevine, značajan segment u prehrani ljudi predstavlja i voće i povrće (istraživanja su pokazala da odrasla osoba prosječno dnevno konzumira 400 g različitog povrća, pa je tako prosječan unos nitrata 157 mg/kg) čijom se konzumacijom u organizam unosi 11 – 41 % dnevnog unosa nitrata. Ako uzmemo u obzir i konzumaciju voća koje sadrži manje nitrata, ukupan unos nitrata kreće se od 81 do 106 mg/dan za većinu EU populacije što je unutar ADI vrijednosti. Manji dio populacije koji konzumira samo lisnato povrće u velikim količinama predstavlja problem jer dolazi do prekoračenja ADI vrijednosti (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.).

Kod ljudi, unos nitrata u organizam odvija se egzogeno konzumacijom hrane koja sadrži nitrate te putem pitke vode, dok nitriti uglavnom nastaju konverzijom iz nitrata, no neki se nitriti konzumiraju kao dodaci hrani. Nakon unosa u organizam, nitrati se kod ljudi brzo apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta u krvnu plazmu pod djelovanjem crijevne mikroflore. Oko 25 % nitrata iz plazme prolazi kroz žlijezde slinovnice, koncentrira se i izlučuje kroz slinu. Pod djelovanjem bakterija, u ustima se oko 20 % nitrata reducira u nitrite. U kiselom mediju želuca iz nitrita nastaje dušikov oksid i drugi metaboliti te se većina apsorbiranih nitrata odmah izlučuje urinom (Pavlinić Prokurica i sur. 2010.).

U većim količinama nitriti su štetni za zdravlje jer uzrokuju razgradnju eritrocita i vitamina A, a također dio nitrita (oko 17 %) koji ne prelazi u nitrozilmioglobin zajedno s aminima stvara nitrozoamine koji su kancerogeni (Kovačević 2011.). Iz navedenih se razloga udio nitrita u mesnim proizvodima nastoji minimizirati.

Temeljna istraživanja dušikovih oksida ukazuju i na njihove pozitivne strane. Na primjer, u organizmu uzajamno djeluju sa proteinima skeletnog mišićja te reguliraju njihove kontrakcije, pozitivno utječu na imunološki sustav, disanje i homeostazu glukoze (Sebranek i Bacus, 2007.b), kontroliraju krvni tlak, utječu na zacjeljivanje rana te na neurološke funkcije. Nadalje, umjerena proizvodnja dušikovih oksida i nitrita u organizmu može spriječiti pojavu kardiovaskularnih bolesti kod ljudi uključujući hipertenziju, aterosklerozu i srčani udar (Sindelar i Milkowski 2011.).

Izbacivanje nitrita iz ljudskog organizma uglavnom se vrši urinarnim putem, a ono se odvija otprilike 4 – 6 sati nakon konzumacije obroka, dok se unutar 24 sata izluče gotovo svi uneseni nitrati. Približno 75 % ukupnih nitrata izlučuje se urinom (kroz bubrege) u obliku ureje, dok se ostala količina izlučuje kroz slinu i znoj (Gassara i sur. 2016.).

## **2.9. Zakonodavstvo**

Nakon što je otkriveno da su nitriti pravo konzervirajuće sredstvo, trebalo je samo nekoliko godina da se uvedu u proizvodnju mesnih proizvoda. No, za razliku od nitrata, nitriti su sami po sebi toksični. Kao pravilo je vrijedilo da su čak 10 puta toksičniji od nitrata. Utvrđeno je da su smrtonosno opasne doze za čovjeka 80 – 800 mg nitrata/kg tjelesne mase i 33 – 250 mg nitrita/kg tjelesne mase (Schuddeboom 1993.).

Nekad su se nitriti dodavali u mesne proizvode u prevelikim količinama što je primijećeno 30.-ih godina 20. stoljeća u Njemačkoj kada su zabilježeni prvi smrtni slučajevi kod ljudi zbog intoksikacije nitrita iz mesnih proizvoda. Problem su riješili 1934. godine tako što su uveli Zakon o nitritima kojim je bilo propisano da se nitriti u mesnim proizvodima mogu koristiti

samo u premiksima sa stolnom soli; njihov sadržaj bi trebao biti 0,5 % te nikako ne smije prijeći 0,6 %. Samo su nitrati mogli biti direktno dodani u mesno tijesto (Honikel 2008.).

1950-ih godina Njemačka je, Uredbom o mesu, ograničila rezidualnu količinu na 100 mg natrijevog nitrita/kg u gotovim mesnim proizvodima. U sirovim butovima bilo je dopušteno dodavati 150 mg NaNO<sub>2</sub>/kg. Također su postojala ograničenja za nitrata, pa je tako 1982. godine Uredbom o mesu ograničena količina nitrata i to u termički neobrađenim mesnim proizvodima na 300 mg/kg, odnosno rezidualna količina nitrata bila je od 100 do 600 mg/kg proizvoda (Honikel 2008.). Danas je u Njemačkoj pravilnikom propisana dopuštena količina nitrita za toplinski obrađene kobasice 80 – 100 ppm, dok za kuhane šunke vrijedi 100 – 150 ppm nitrita dodanih tijekom pripreme. U sirovim mesnim proizvodima granica seže do 150 ppm nitrata (Dikeman i Devine 2014.).

Nakon Uredbi iz 1982. godine slijedila je Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća 95/2/EC o prehranbenim aditivima osim bojila i sladila, gdje je indikativna količina od 150 mg nitrita/kg i 300 mg nitrata/kg dopuštena u više-manje svim mesnim proizvodima. Dopuštena rezidualna količina iznosila je 50 mg nitrita/kg u termički neobrađenim mesnim proizvodima i 100 – 175 mg nitrita/kg u svim ostalim mesnim proizvodima osim Wiltshire slanine i drugim sličnim proizvodima. Rezidualna količina nitrata u svim mesnim proizvodima iznosila je 250 mg/kg. Danska se suprotstavila Direktivi Europskog parlamenta i Vijeća 95/2/EC te je isključila upotrebu nitrata iz svih mesnih proizvoda osim Wiltshire slanine i sirovih butova u kojima je dozvoljeno 300 mg nitrata/kg. U Danskom propisu iz 1995. godine nitriti su se mogli koristiti do 150 mg/kg. (Honikel 2008.).

Uredbom (EU) 1129/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 11. studenog 2011. godine o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehranbenih aditiva propisane su najviše dopuštene količine mesnih proizvoda koje vrijede i u Republici Hrvatskoj kako je prikazano u tablici 2.9.1. i 2.9.2.. Najviša dopuštena količina nitrata za toplinski neobrađeno meso iznosi 150 mg/kg, a za tradicionalne mesne proizvode 250 mg/kg. U zemljama Europske unije trenutačno prihvatljivi dnevni unos (ADI) za nitrata je 3,7 miligrama po kilogramu tjelesne mase dnevno, dok je sigurna razina nitrita uspostavljena na 0,07 miligrama po kilogramu tjelesne mase dnevno (European Food Safety Authority 2017.).

Iako je EU zakonodavstvo mjerodavno na području Europske Unije, zabilježeni su slučajevi zahtjevanja nižih količina nitrata i nitrita od propisanih, kao što je vidljivo na primjeru Danske. Cilj je danskog zakonodavstva postići višu razinu zaštite zdravlja i života ljudi u pogledu izloženosti nitritima i mogućeg stvaranja nitrozamina u mesnim proizvodima određivanjem niže najveće dopuštene dodane količine nitrita za određene mesne proizvode u usporedbi s najvećim dopuštenim razinama propisanim Uredbom (EZ) br. 1333/2008 i nedopuštanjem stavljanja na tržište proizvoda za koje je moguće utvrditi samo najveće dopuštene razine ostataka. Novo zakonodavstvo iz 2015. i kasnije 2018. godine propisuje niže maksimalne količine navodeći za nitrite u termički neobrađenim proizvodima vrijedi pravilo da se može dodati ukupno 60 mg nitrita /kg, u fermentiranim kobasicama dozvoljeno je ukupno 100 mg/kg, a u konzerviranim ili polukonzerviranim proizvodima ukupno 150 mg nitrita/kg. U toplinski obrađenim mesnim proizvodima dozvoljeno je ukupno 60 mg nitrita/kg, ali ne i u tradicionalnim danskim mesnim okruglicama i tradicionalno pripremljenoj jetri. Tradicionalni suhomesnati proizvodi obuhvaćeni su posebnim propisima koji se odnose na nitrata i nitrite, a



dozvoljavaju ukupno 60 mg nitrita/kg, osim u slanini Wiltshire u kojoj je dozvoljeno 150 mg nitrita/kg (Commission Decision 2015/826, Comision Decision 2018/702). Danska smatra da se zabrinutost u pogledu uporabe količina nitrita dopuštenih u skladu s Uredbom (EZ) br. 1333/2008 posebno odnosi na povećan rizik od stvaranja nitrozamina. Suprotno najnovijem mišljenju EFSA-e, Danska smatra da stvaranje i hlapljivih i nehlapljivih nitrozamina ovisi o količini dodanih nitrita, dok EFSA smatra da ta veza postoji samo kod nehlapljivih nitrozamina. Znanstveno je dokazano da su mnogi hlapljivi nitrozamini kancerogeni i genotoksični, dok novije epidemiološke studije upućuju na vezu između potrošnje mesnih proizvoda i razvoja različitih oblika raka. To ide u prilog ograničenjima za uporabu nitritâ kao aditiva. Danska također naglašava da granična vrijednost PDU-a nije velika za malu djecu, koja su, prema sadašnjem izračunu za dansko stanovništvo, najizloženija nitritima.

Tablica 2.9.1. Najviše dopuštene količine nitrata u mesnim proizvodima

NAMIRNICE	NDK* (mg/kg)	NAPOMENE	OGRANIČENJA/IZNIMKE
Toplinski neobrađeno prerađeno meso	150	(1)	
Tradicionalni proizvodi obrađeni postupkom mokrog soljenja	250	(2) (3)	samo Wiltshire bacon i slični proizvodi: u meso se ubrizgava tekuća salamura, nakon čega slijedi mokro soljenje u trajanju od 3 do 10 dana. Salamura također sadrži mikrobiološke starter kulture.
	250	(2) (3)	samo Wiltshire ham i slični proizvodi: u meso se ubrizgava tekuća salamura, nakon čega slijedi mokro soljenje u trajanju od 3 do 10 dana. Salamura također sadrži mikrobiološke starter kulture.
Tradicionalni proizvodi obrađeni postupkom suhog soljenja	250	(2) (3)	samo dry cured bacon i slični proizvodi: suho soljenje nakon čega slijedi zrenje u trajanju od barem 4 dana
	250	(2) (3)	samo dry cured ham i slični proizvodi: suho soljenje nakon čega slijedi zrenje u trajanju od barem 4 dana

Izvor: prilagođeno prema Uredba (EU) 1129/2011

\* NDK: najviše dopuštene količine

(1) Najveća količina koja se može dodati tijekom proizvodnje.

(2) Najveća preostala količina, najveća dopuštena količina ostataka na kraju postupka proizvodnje.

(3) Nitrati mogu biti prisutni u određenim toplinski obrađenim mesnim proizvodima zbog prirodne pretvorbe nitrata u nitrite u slabo kiselom mediju.

Pri procjeni jesu li danski propisi doista odgovarajući i neophodni za postizanje tog cilja potrebno je u obzir uzeti niz čimbenika. Posebice je potrebno da dva zdravstvena rizika, s jedne strane prisutnost nitrozaminâ u mesnim proizvodima, a s druge strane mikrobiološka sigurnost

mesnih proizvoda, budu u ravnoteži. Posljednji aspekt nije samo pitanje obične tehnološke potrebe već i vrlo važno zdravstveno pitanje. Iako se priznaje da je razine nitritâ u mesnim proizvodima potrebno ograničiti, niže razine nitrita u mesu neće automatski dovesti do veće zaštite ljudskog zdravlja. Najprikladnija razina nitrita ovisi o nizu čimbenika priznatih u relevantnim mišljenjima SCF-a i EFSA-e, tj. o dodatku soli, vlazi, pH-u, roku valjanosti proizvoda, higijeni, kontroli temperature itd. (Comision Decision 2018/702).

Tablica 2.9.2. Najviše dopuštene količine nitrita u mesnim proizvodima

NAMIRNICE	NDK* (mg/kg)	NAPOMENE	OGRANIČENJA/ IZNIMKE
Toplinski neobrađeno prerađeno meso	150	(1)	
Toplinski obrađeno prerađeno meso	150	(1) (3) (4)	osim steriliziranih mesnih proizvoda ( $F_0 > 3,00$ )
Toplinski obrađeno prerađeno meso	100	(1) (3) (4)	samo sterilizirani mesni proizvodi ( $F_0 > 3,00$ )
Tradicionalni proizvodi obrađeni postupkom mokrog soljenja	175	(2)	samo <i>Wiltshire bacon</i> i slični proizvodi: u meso se ubrizgava tekuća salamura, nakon čega slijedi mokro soljenje u trajanju od 3 do 10 dana. Salamura također sadrži mikrobiološke <i>starter</i> kulture.
Tradicionalni proizvodi obrađeni postupkom suhog soljenja	100	(2)	samo <i>Wiltshire ham</i> i slični proizvodi: u meso se ubrizgava tekuća salamura, nakon čega slijedi mokro soljenje u trajanju od 3 do 10 dana. Salamura također sadrži mikrobiološke <i>starter</i> kulture.
Tradicionalni proizvodi obrađeni postupkom suhog soljenja	175	(2)	samo <i>dry cured bacon</i> i slični proizvodi: suho soljenje nakon čega slijedi zrenje u trajanju od barem 4 dana
Tradicionalni proizvodi obrađeni postupkom suhog soljenja	100	(2)	samo <i>dry cured ham</i> i slični proizvodi: suho soljenje nakon čega slijedi zrenje u trajanju od barem 4 dana

Izvor: prilagođeno prema Uredba (EU) 1129/2011

\* NDK: najviše dopuštene količine

(1) Najveća količina koja se može dodati tijekom proizvodnje.

(2) Najveća preostala količina, najveća dopuštena količina ostataka na kraju postupka proizvodnje.

(3) Vrijednost  $F_0$  3 odgovara zagrijavanju u trajanju od 3 minute na temperaturi od 121 °C (smanjenje bakterijskog opterećenja od milijardu spora u svakoj od 1000 konzervi na jednu sporu u tisuću konzervi).

(4) Nitrati mogu biti prisutni u određenim toplinski obrađenim mesnim proizvodima zbog prirodne pretvorbe nitrita u nitrate u slabo kiselom mediju.

Mnoge države imaju propisane slične pravilnike. U Sjedinjenim Američkim Državama 1925. godine donesen je prvi američki pravilnik kojim je bilo dozvoljeno najviše 200 ppm ulazne razine nitrata, nitrita ili njihove kombinacije u konačnom mesnom proizvodu (Institute of Food Technologists 1972.; Sindelar i Milkowski 2011.). U pravilniku Sjedinjenih Američkih Država piše: „Prehrambeni aditiv natrijev nitrit siguran je za upotrebu u ili na određenoj hrani u skladu sa sljedećim propisanim uvjetima: kao konzervans i fiksator boje, sa natrijevim nitratom kod pripreme mesa za konzerviranje u domaćinstvu, sa uputama za korištenje koje ograničavaju količinu natrijevog nitrita ne više od 200 ppm u konačnom mesnom proizvodu, odnosno natrijevog nitrata ne više od 500 ppm u konačnom proizvodu.“ (Honikel 2008.).

U Sjedinjenim Američkim Državama količina nitrita određena je po skupinama proizvoda, pa je tako za šunku i proizvode od mesa u komadima propisana količina od 200 ppm, za kobasice 156 ppm, dok za slaninu vrijedi 120 ppm nitrita (Michigan State University Extension 2014.). Za proizvode od usitnjenog mesa maksimalna ulazna koncentracija natrijevog ili kalijevog nitrita iznosi 156 ppm, a nitrata 1718 ppm. Za proizvode koji se tretiraju postupkom uranjanja, injektiranja ili masiranja dopuštena maksimalna ulazna koncentracija natrijevog ili kalijevog nitrita je 200 ppm, a nitrata 700 ppm. Sušeni konzervirani proizvodi ograničeni su na 625 ppm nitrita, odnosno 2187 ppm nitrata. Ako se koriste i nitrati i nitriti u istom proizvodu, njihov zbroj u konačnom proizvodu ne smije prelaziti 200 ppm analitički izmjerenih nitrita računatih kao natrijev nitrit. Kao iznimka javlja se slanina zbog potencijalne opasnosti od tvorbe nitrozamina. Za slaninu bez kože u koju je ubrizgana salamura, ili koja je tretirana postupkom masiranja, dozvoljeno je 120 ppm natrijevog nitrita ili 148 ppm kalijevog nitrita zajedno sa 550 ppm natrijevog askorbata ili natrijevog eritorbata uz dozvoljena odstupanja od  $\pm 20\%$  u vrijeme ubrizgavanja ili masiranja (Sebranek i Bacus 2007.a; USDA 1995), dok je za slaninu koja se konzervira suhim postupkom dozvoljeno 200 ppm nitrita (Sindelar i Milkowski 2011.). Nitrati nisu dozvoljeni u bilo kojoj metodi konzerviranja slanine. Za proizvode koji imaju produljeni rok trajanja, odnosno koji se čuvaju na sobnoj temperaturi i koje nije potrebno držati u hladnjaku, ne postoji maksimalna ulazna količina nitrita, no smatra se da je količina od 40 ppm nitrita dovoljna za očuvanje takvih proizvoda (Sebranek i Bacus 2007.a; USDA 1995.).

Svi zakoni, pravilnici i direktive uzimaju u obzir da su nitrati i nitriti toksične supstance i da ne ostaju nepromijenjeni u proizvodu tijekom obrade. Također se uzimaju u obzir otkrića tijekom ranih godina 20. stoljeća. Nitrati su djelotvorni jedino kada su reducirani do nitrita što se događa samo u onim proizvodima koji nisu termički tretirani odmah nakon proizvodnje, stoga bi unos nitrita i nitrata trebao biti ograničen na neophodno minimalne količine (Honikel 2008.).

## 2.10. Metode određivanja nitrata i nitrita u mesnim proizvodima

Pavlinić Prokurica i sur. (2010.) navode da mnoge do sada objavljene studije dokazuju da se i mali udio nitrita dodanih mesu kao konzervans kasnije javlja u obliku hlapivih N-nitrozamina pa se prilikom istraživanja uzorci podvrgavaju analizi na prisutnost natrij nitrita i natrij nitrata kako bi se dokazala veza s nastankom hlapivih N-nitrozamina. Nakon dodatka nitrita određenom supstratu, nitriti vrlo brzo stupaju u kemijske reakcije jer mogu djelovati kao oksidacijski, redukcijski ili nitrozacijski agens. Tako se pretvaraju u različite oblike kao što su nitrat, nitratna kiselina, dušikov oksid, dušikov (II) oksid, a kao posljedica reaktivnosti javljaju se promjene u okusu, boji i trajnosti mesnih proizvoda. Određen udio dodanog nitrita nestaje ovisno o pH, temperaturi, formulaciji proizvoda te duljini trajanja tijekom prerade i skladištenja. Tako se npr. nakon proizvodnje nekog suhomesnatog proizvoda manje od 50 % dodanog nitrita može dokazati kemijskom analizom. Znanstveno je dokazano da nitrit može stupiti u reakciju s proteinima, lipidima, pigmentima i drugim sastojcima mesa. Udio nitrita koji ostaje a da nije stupio u kemijsku reakciju, ostaje u slobodnom obliku (kao  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{HNO}_2$ ) i naziva se slobodni ili rezidualni nitrit, a može se detektirati analitičkim metodama. Količina rezidualnog nitrita ovisi o raznim čimbenicima kao što su pH vrijednost, temperatura procesiranja i skladištenja. Tijekom skladištenja dolazi do smanjenja koncentracije nitrita, pa tako mesni proizvodi na tržištu u prosjeku sadrže 5 – 30 mg/kg slobodnih nitrita. Nitriti koji stupaju u kemijsku reakciju sa sastojcima mesa nazivaju se vezani nitriti.

Postoji nekoliko metoda za određivanje koncentracije konzervirajućih sredstava. Nitritni i nitratni anioni mogu se otkriti kromatografskom tehnikom visokoučinkovite tekućinske kromatografije (engl. High Performance Liquid Chromatography- HPLC). HPLC metoda koristi se za odjeljivanja i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Važna primjena ove metode je u ispitivanjima hrane, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih tekućina na prisustvo i sadržaj štetnih supstanci, npr. pesticida, polikloriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika kao potencijalnih karcinogena i mutagena. Nadalje, primjenjuje se za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera, lipofilnih vitamina, i sl. (Luterotti n.d.).

Nitriti se mogu odrediti i titracijski sa permanganatom, no najviše korištena metoda za određivanje konzervirajućeg sredstva u mesnim proizvodima je mjerenje nitrita nakon kolorimetrijske reakcije, a nitrata nakon redukcije u nitrite. Kolorimetrijsko ispitivanje temelji se na reakciji nitrita, sulfanilamida i *N*-(1-naftil)-etilendiamina u kiselim uvjetima do tvorbe crvene azo boje koja ima apsorbanciju maksimalno 540 nm (Honikel 2004.).

Noviji standardi koriste enzim nitrit reduktazu koja reducira nitrate u nitrite dok je reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH) oksidiran u  $\text{NADP}^+$ . Reakcija se odvija u jednoj šarži nakon čega slijedi promjena u boji. Tijekom određivanja nitrata i nitrita, moraju se provesti dva kolorimetrijska mjerenja: jedno prije i jedno nakon procesa redukcije. Razlika između rezultata druge i prve analize prikazuje koncentraciju nitrata (Honikel 2004.).

Redukcijski/kolorimetrijski testovi su potencijalno skloni smetnjama od mnogobrojnih izvora, uključujući nedovršenu redukciju nitrata u nitrite kao i prekomjerno smanjenje nitrata preko nitrita, do nižih oksida. Visoka koncentracija inertnih soli može negativno djelovati na

preciznost metode, a puferški učinak organske kiseline može djelovati na pH, ovisno o apsorpciji azo boje (Honikel 2004.).

Za određivanje količine nitrita u hrani koristi se i standardna metoda HRN EN 12014-3:2007. Princip metode temelji se na tome da se nitriti u vodenom ekstraktu analiziranog uzorka tretiraju sa sulfanilamidom i *N*-(1-naftil)-etilendiaminom dihidrokloridom. Određivanje natrijevog nitrata provodi se pomoću validirane metode uz korištenje enzimatskog kita (Nitrate, Enzymatic BioAnalysis, UV-Test, R-Biopharm-Roche) (Kovačević i sur. 2016.).

U novije doba kao inovacija koristi se uređaj HI4113 ISE (engl. Ion Selective Electrode). Naime, radi se o selektivnoj elektrodi koja u sebi sadrži srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) smješten unutar PEI plastičnog tijela s amonijevim sulfatnim elektrolitom. Interni elementi izoliraju se iz uzorka pomoću organske membrane za prepoznavanje polimera. HI4113 je tekuća membrana, selektivna elektroda s kombinacijom iona za određivanje nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) u otopini. PVC membrana, koja se sastoji od organskog ionskog izmjenjivača, proizvodi potencijalnu promjenu zbog izmjene iona nitrata između organske polimerne membrane i uzoraka. Unutarnji senzorski elementi smješteni su unutar trajnog polieterimidnog (PEI) tijela. HI4113 uređaj je idealan za različite primjene u prehrambenoj industriji, poljoprivredi i analizi vode, te može detektirati od 0,62 do 6,2 mg/l  $\text{NO}_3^-$  (Hanna Instruments n.d.).

Identifikacija i kvantifikacija *N*-nitrozamina najčešće se provodi sustavom plinske kromatografije i spektrofotometrije masa (engl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS). GC – MS je analitička metoda koja kombinira karakteristike plinske kromatografije i masene spektrometrije kako bi se identificirale različite tvari unutar ispitivanog uzorka. Primjena GC - MS metode uključuje detekciju droga, istraživanje požara, analizu okoliša, istraživanje eksploziva, identifikaciju nepoznatih uzoraka i sl. Osim toga, može identificirati elemente u tragovima u materijalima za koje se prije mislilo da se ne mogu identificirati (Wikipedia 2018.b).

## 2.11. Načini smanjenja sadržaja nitrata i nitrita u mesnim proizvodima

Kako bi se smanjila upotreba nitrita i time smanjio rizik nastanka štetnih i kancerogenih nitrozo spojeva u mesnim proizvodima, nekoliko znanstvenika došlo je na ideju da potraže zamjenu za nitrite, odnosno način na koji bi se smanjio njihov sadržaj. Naime, postoje dvije alternative za rješavanje ovog problema:

- 1.) potpuna ili djelomična zamjena nitrita prirodnim ili nekim drugim sredstvima
- 2.) upotreba sredstava koji blokiraju tvorbu nitrozamina u proizvodima koji sadrže konvencionalne koncentracije nitrita (García i sur. 2011.)

García i sur. (2011.) su u svom radu opisali eksperiment kojim su, u svinjskim kobasicama, pokušali djelomično zamijeniti nitrite hitozanom. Hitozan je linearni polimer 2-amino-deoksi- $\beta$ -D-glukana, deacetilirani oblik hitina, koji se prirodno pojavljuje kao kationski biopolimer. Njegovo djelovanje prepoznato je u farmaceutskoj industriji, pa se tako koristi za čišćenje organizma od toksina, reguliranje krvnog tlaka i kolesterola te snižavanje pH krvi. Hitozan apsorbira i izbacuje radioaktivne tvari iz organizma, a dokazano je da pozitivno djeluje i kod zacjeljivanja rana (Tiens 2018.; García i sur. 2011.) i kod opekline, te sprječava širenje kancerogenih stanica krvožilnim sustavom. Koristi se i kao preventiva za dijabetes, te pomaže

kod poboljšanja funkcija jetre (Tiens 2018.). U mesnim proizvodima se može koristiti, npr. kao bojilo, bez utjecaja na osjetilne attribute, no utvrđene su i neke promjene u teksturi kobasica, pa se pretpostavlja da ima utjecaj i na stupanj deacetilacije. Utvrđeno je da upotreba hitozana znatno produljuje rok trajanja proizvoda te se smatra da je, u mesnim proizvodima, potencijalni prirodni prehrambeni konzervans. Nekoliko autora potvrdilo je da upotreba hitozana u mesu i mesnim proizvodima sprječava bakterijsko kvarenje (npr. skladištenjem na 30 °C tijekom 48 sati i na 4 °C tijekom 10 dana ograničen je rast *Staphylococcus* spp., koliforma, gram-negativnih bakterija, *Micrococcus* spp. i *Pseudomonas*), no postoje odstupanja u djelovanju protiv kiselomliječnih bakterija. Tretiranje hitozanom u koncentracijama od 0,3 – 0,6 %, odnosno 1 %, produljen je rok trajanja svježih svinjskih kobasica (koje su skladištene na niskim temperaturama) sa 7 na 15 dana, odnosno kobasice bez dodatka hitozana imale su rok trajanja između 15 i 25 dana, a one sa dodatkom hitozana između 33 i 37 dana iz čega se može zaključiti da hitozan zasigurno ima antimikrobna svojstva u mesu i mesnim proizvodima te posljedično tome djeluje na produljenje roka trajanja mesnih proizvoda (García i sur. 2011.).

Eskandari i sur. (2013.) su također proveli istraživanje u kojem su primijenili prirodno bojilo, antioksidante i antimikrobna sredstva u svrhu zamjene za nitrite. Kao bojilo koristili su kohineal (karmin, E 120), kao antibiotulinsko i antimikrobno sredstvo natrijev hipofosfit (SHP), a kao antioksidant butilirani hidroksianisol (BHA). Naime, kohineal, čiji je drugi naziv karmin (E 120), je prirodno crveno bojilo životinjskog porijekla te se rijetko upotrebljava jer je relativno skupo. Može izazvati alergijsku reakciju posebice kod osoba koje su osjetljive na aspirin ili benzojevu kiselinu (Lerotić i Vinković Vrček 2005.). Autori znanstvenog rada i sudionici ovog eksperimenta navode da je kohineal „crveno bojilo dobiveno od insekata (*Dactilopious coccus*) i sušenih ljuska slatke paprike. Prilično je stabilan prema svjetlosti, varijacijama pH vrijednosti i toplinskom tretmanu mesnih proizvoda“. U eksperimentu je korišteno 0,015 % kohineala što otprilike odgovara 120 ppm NaNO<sub>2</sub> za postizanje tipične boje konzerviranog mesa (Eskandari i sur. 2013.). Natrijev hipofosfit (SHP; NaPO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), korišten kao antibiotulinsko i antimikrobno sredstvo, je natrijeva sol hipofosforne kiseline i često se susreće kao monohidrat. Pri sobnoj temperaturi nalazi se u čvrstom agregacijskom stanju kao bezbojni bijeli kristali. Topiv je u vodi i lako upija vlagu iz zraka (Wikipedia 2018.a). Kao antimikrobno sredstvo, djelotvoran je pri razini od 1000 ppm u proizvodima sa niskom razinom nitrita, odnosno pri 3000 ppm kod proizvoda bez dodatka nitrita. Natrijev hipofosfit (SHP) također sprječava proizvodnju toksina *Clostridium botulinum* pri 25 °C za najmanje 3 dana (Eskandari i sur. 2013.). Butilirani hidroksianisol (BHA), korišten kao antioksidacijsko sredstvo, je fenolni spoj koji se često dodaje hrani kako masti ne bi promijenile svoj oblik (Vranešić Bender 2007.). To je sintetski antioksidant od kojeg postoji opasnost od nakupljanja u organizmu. Povišuje koncentraciju kolesterola i masnih kiselina u krvi, a može izazvati alergijske reakcije kao i obamrlost, dok je u hrani za djecu zabranjen jer izaziva sindrom hiperaktivnosti (Lerotić i Vinković Vrček 2005.). Znanstvenici su utvrdili da je butilirani hidroksianisol (BHA) jaki antioksidant pri razini od 30 ppm u toplinski obrađenim kobasicama tijekom 5 tjedana hladnog skladištenja. Dodatak navedenih tvari kao zamjena za nitrite nije značajno djelovala na pH vrijednost, aromu i teksturu proizvoda, no uočene su razlike u okusu između proizvoda sa 40 i 120 ppm nitrita u usporedbi sa proizvodima bez nitrita (Eskandari i sur. 2013.).

Najvažnije grupe prirodnih antioksidanata u voću i povrću su tokoferoli, flavonoidi, fenolne kiseline, terpenoidi i karotenoidi (Babović 2013.). Postoji više od 1300 biljaka i preko 30000

komponentata fenola izoliranih iz biljaka koje se koriste u prehrambenoj industriji. Istraživanja su pronašla linearnu povezanost između fenolnih spojeva, prvenstveno fenolnih kiselina i flavonoida te antioksidativnih svojstava bilja i začina. Proučena su svojstva aromatskog bilja, voća, esencijalnih ulja i začina kao što su klinčić, đumbir, papar i češnjak (Gassara i sur. 2016.). Sokovi od jagode, češnjaka, kelja i naranče ili crnog čaja ograničavaju tvorbu nitrozildimetilamina (NDMA) tijekom konzumacije obroka bogatog aminima (De Mey i sur. 2017.).

Vitamini, posebice vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), mogu biti učinkovita zamjena za nitrate i nitrite u mesnim proizvodima jer je dokazano da  $\alpha$ -tokoferol može ograničiti rast patogenih bakterija i smanjiti tvorbu N-nitrozamina u lipofilnom okruženju (npr. pržena slanina). Međutim, kao problem se javlja visoka cijena vitamina što bi mesnoj industriji prouzročilo još više troškova (Gassara i sur. 2016.; De Mey i sur. 2017.).

Povrće, kao što je celer, zelena salata i repa, prirodan su izvor nitrata sa visokim koncentracijama od 1500 do 2800 ppm pa se kao zamjena za upotrebu nitrata/nitrita može koristiti sok ili prah dobiven iz navedenih vrsta povrća. Analizom pojedinih komercijalno dostupnih sokova od povrća pokazalo se da sokovi od mrkve, celera, repe i špinata sadrže 171, 2114, 2273 i 3227 ppm nitrata. Navedeni se sastojci mogu koristiti kao prirodna sredstva za okus i aromu (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

Sebranek i Bacus (2007.a, b) pokušali su ukazati na mogućnost proizvodnje tzv. prirodnih odnosno organskih mesnih proizvoda bez direktnog dodatka nitrata ili nitrita koristeći kao zamjenu prirodne dodatke kao što su vinski ocat, limunov sok, prah od višnje, prah od celera, ružmarin i dr. Rok trajanja takvih proizvoda bio je znatno kraći nego kod onih proizvoda kod kojih su dodani nitriti.

Celer je namirnica koja pomaže u snižavanju krvnog tlaka jer sadrži aktivne ftalide, spojeve koji pripadaju skupini fitokemikalija, te služi kao dobar izvor flavonoidnih antioksidanta (zeaksantina, luteina i  $\beta$ -karotena). Također djeluje antikancerogeno jer u sebi sadrži spoj pod nazivom apigenin koji je prilično efektivan u aktiviranju apoptoze (samouništenje stanica) (Anonymous\_1 n.d.). Višnjini prah sadrži visoke koncentracije askorbinske kiseline koja smanjuje mogućnost tvorbe nitrozamina (Honikel 2008.) te se njegovim dodatkom ne mijenja pH proizvoda, kao niti druga svojstva (boja, oksidacija masti). Dokazano je da dodatkom praha celera sa ili bez 0,28 % višnjinog praha dolazi do 50 %-tnog smanjenja količine rezidualnih (slobodnih) nitrita (Sebranek i Bacus 2007.a, b). Askorbinska kiselina i askorbati blokiraju, odnosno ograničavaju nastanak nitrozamina i nitrozamida nastalih od nitrata i nitrita u mesnim proizvodima. Slijed reakcija askorbata kojima se ograničava nastanak nitrozo spojeva još nije u potpunosti razjašnjen, no razlog može biti redukcija rezidualnih nitrita u mesnim proizvodima askorbatima ili vezanje NO za askorbate i njegovo oslobađanje. Reakcijom askorbata sa kisikom nastaju dehidroaskorbati te smanjuju količinu nitrita koji mogu biti oksidirani do nitrata. Sigurno je da askorbati mogu reagirati i sa nitritima (dušikastom kiselinom ili NO) pri čemu vežu nastali NO (Gassara i sur. 2016.).

Grožđe se također može koristiti kao alternativa za nitrate i nitrite zbog antioksidativnih svojstava i prisutnosti visoke koncentracije fenolnih spojeva kao što su galinska, klorogenska i kofeinska kiselina, katehin i dr. Studije su ukazale da navedeni spojevi imaju slična svojstva kao i natrijev nitrit u mesnim proizvodima i kobasicama. Kombinacija antioksidanata, šećera i kiselina koje se nalaze u grožđu može biti djelotvorna kao i natrijev nitrit u očuvanju proizvoda.

Grožđe, za razliku od natrijevog nitrita, ne može tvoriti kancerogene nitrozamine te dodatak grožđa nije popraćeno dodatkom natrija što je važno za osobe koje su sklone problemima s hipertenzijom, odnosno povišenim krvnim tlakom. Također dodatak groždica može poboljšati ukupnu prehrambenu vrijednost mesnih proizvoda jer su bogate antioksidantima te pomažu u očuvanju okusa proizvoda (Gassara i sur. 2016.).

Najvažnije grupe prirodnih antioksidanata u začinskom bilju, kao što je ružmarin, su polifenoli i fenolne kiseline (Babović 2013.). Ružmarinska kiselina iz ružmarina ima ulogu u očuvanju okusa i ograničavanju, odnosno sprječavanju oksidacije lipida tijekom prerade mesa iako ne doprinosi direktno reakcijama nitrata/nitrita u mesnim proizvodima (Sebranek i Bacus 2007.a, b). Spojevi u ružmarinu sa najvećom antioksidacijskom vrijednosti su karnosol, karnosolna i spomenuta ružmarinska kiselina koji prekidaju oksidaciju tkiva na način da dodaju vodik slobodnim radikalima koji ih neutralizira (Babović 2013.).

Od ostalih sastojaka koji se ubrajaju u prirodne konzervanse treba spomenuti ocat i sok od limuna. Sredstvo za zakiseljavanje, kao što je ocat, ima sposobnost ubrzavanja reakcija nitrita zbog utjecaja na pH vrijednost. Sok ili prah od limuna je tipičan izvor limunske kiseline koja može imati slično djelovanje na pH kao i ocat (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

Meditranska morska sol, koja se također koristi kao prirodan izvor nitrata, odnosno nitrita, sadrži 1,1 ppm nitrata i 1,2 ppm nitrita. Morska sol se, općenito govoreći, dobiva evaporacijom morske vode, nerafinirane, bez dodataka aditiva te služi kao prirodan izvor minerala. Solarno evaporirana morska sol mora sadržavati barem 97,5 % natrijevog klorida te u određenim granicama i kalcij/magnezij, arsen i teške metale (Sebranek i Bacus 2007.a, b).

Gassara i sur. (2016.) ukazuju da ostali začini, kao što su muškat, origano i kadulja, imaju antioksidativna svojstva koja mogu usporiti početak užeglosti masti. Crni i bijeli papar, češnjak, gorušica, muškati oraščić, bobičasto voće, đumbir, cimet i crvena paprika potiču proizvodnju mliječne kiseline (djelovanjem bakterija *Lactobacillus*) koja produljuje rok trajanja mesnih proizvoda. Cimet, klinčić i kurkuma posjeduju bakterijska i fungicidalna svojstva koja mogu uništiti ili ograničiti rast mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane. Pretpostavlja se da su papar i cimet najbolji prehrambeni konzervansi.

Glavni sastojak cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), cinamaldehyd, je spoj koji ima antibakterijsko djelovanje i antioksidativna svojstva. Još je davnih 1880.-ih godina otkriveno antimikrobno svojstvo ulja cimeta protiv spora *Bacillus anthracis*. Esencijalno ulje cimeta je složena mješavina nekoliko hlapljivih komponenata arome, a kao takvi spojevi mogu se istaknuti fenoli (npr. karvakrol), ugljikovodici (spojevi terpena kao npr. limonene), alkoholi (npr. linalool), aldehidi (npr. cinamaldehyd) i ketoni (npr. menton). Cimet se najčešće koristi u proizvodnji fermentiranih kobasica zbog posjedovanja antibakterijskih svojstava protiv brojnih mikroorganizama, od kojih su neki patogeni, inhibirajući njihov rast i proizvodnju aflatoksina plijesni. Cimet posjeduje antialergijska, protuupalna, antiulcerogena, antipiretička i anestetička svojstva. U prehrani ljudi, poznat je kao aperitiv i stimulator probave (Gassara i sur. 2016.). Može pomoći kod gastritisa, dijabetesa, povišenog kolesterola, glivičnih i bakterijskih infekcija te mnogih drugih bolesti. Cimet također suzbija širenje leukemije i limfoma, regulira količinu šećera u krvi, pomaže u mršavljenju, ublažava reumatske bolove te poboljšava aktivnost mozga. Djelotvoran je i protiv bakterije *Escherichia coli* (Podnar n.d.).

Češnjak, čiji je glavni spoj alicin, a koji se najčešće koristi u prahu, poznat je po svojim antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima. Naime, njegova upotreba smanjuje količinu



nitrita potrebnu za osigurati pravilno konzerviranje koje neće promijeniti okus mesnih proizvoda. Međutim, ako se koristi u velikim količinama, može značajno promijeniti okus hrane pa se, iz navedenog razloga, količina tog začina mora minimizirati. Također je dokazano da češnjak, u kombinaciji sa klinčićem, inhibira rast svih patogenih bakterija (Gassara i sur. 2016.). Češnjak djeluje pozitivno na probavni sustav, potiče stvaranje i lučenje žuči, može spriječiti oštećenja i čireve na želucu, jača imunost, smanjuje osjećaj umora, razdražljivosti i uznemirenosti, no u prevelikim količinama može štetno djelovati na bubrege i uništavati krvna zrnca (Žigić 2009.).

Klinčić, čiji je glavni spoj eugenol, koristi se kao konzervans kako bi prikrivio kvarenje u mesu, sirupima, umacima i slatkišima. Eugenol inhibira tvorbu prostaglandina što objašnjava protuupalni i analgetski učinak, a kao inhibitor bakterijskog rasta djelotvoran je 75 – 100 %. Ulje klinčića pokazalo je inhibitorni učinak na bakteriju *Listeria monocytogenes* u namirnicama kao što je meso i sir, te je uspjelo ograničiti proliferaciju *L. monocytogenes* sa 0,5 % na 30 °C, odnosno 1 % na 7 °C. Mješavine ulja cimeta i klinčića koriste se kao alternative kemijskih sredstava, koriste se u aktivnim sustavima pakiranja kao i u suzbijanju plijesni i kvasaca u hrani (Gassara i sur. 2016.). Iako je danas najviše poznat kao začim, klinčić ima i brojna ljekovita svojstva, a prema nutritivnoj vrijednosti sličan je cimetu. Sadrži vlakna, fitosterole, kalcij, magnezij, željezo, fosfor, bakar te vitamine C, E, K i B6 te folnu kiselinu. Klinčić je stimulans, blagi anestetik i lokalni antiseptik koji pozitivno djeluje na želučanu sluznicu, protiv povraćanja i nadutosti, potiče pravilan rad probavnog sustava, može olakšati zubobolju te pomaže kod infekcija dišnih puteva (Anonymous\_2 2015.).

Kim, jedan od najznačajnijih začina u svijetu, postoji u dvije varijante: bijeli i crni. Mnoge studije ga prikazuju kao prehrambeni konzervans, no njegovo djelovanje se očituje i u antibakterijskim, antioksidativnim, hipoglikemičnim i hipolipidemičnim svojstvima. Na tržištu se pojavljuje kao gotovi proizvod, u okruglom obliku ili kao esencijalno ulje. Kao glavna komponenta kima javlja se kimov aldehyd sa koncentracijom od 53,6 % u ulju dobivenog od sjemenki i 40,5 % u ulju dobivenog od biljke. Kimovo ulje sadrži sulfide mente u tragovima, no glavni sastojci ulja su kimovi aldehidi,  $\beta$ -pinen,  $\gamma$ -terpinen,  $\rho$ -menta-1,3-dien-7-al,  $\rho$ -menta-1,4-dien-7-al i  $\rho$ -cimen. Sjemenke crnog kima posjeduju mnoga biološka svojstva, uključujući antikancerogena, antidijabetska, diuretska i antibakterijska svojstva (Gassara i sur. 2016.). Kim pomaže u liječenju bolesti jetre i žuči, kod problema s dišnim sustavom te kod prehlade, gripe, kroničnog bronhitisa, astme i upale pluća. Kao antioksidant djeluje ljekovito jer sprječava štetno djelovanje slobodnih radikala, štiti od infekcija i degenerativnih neuroloških poremećaja te se može koristiti kao preventiva u pojavi karcinoma (Lesinger 2015).

Osim djelovanja na okus, začini pomažu u zaštiti hrane od oksidativnog kvarenja i time produljuju rok trajanja hrane te štite organizam od kardiovaskularnih bolesti, određenih vrsta tumora i stanja kao što su artritis i astma. Naime, dio iskorištenog kisika može proizvoditi slobodne radikale koji postaju opasni za određeni broj organskih molekula kao što su proteini, lipidi i stanice DNA. Slobodni radikali su atomi koji posjeduju slobodne elektrone koji mogu izazvati kemijske reakcije u procesu stanične oksidacije koja može voditi razvoju bolesti kao što je tumor, kardiovaskularne bolesti i dijabetes. Antioksidanti iz prirodnih biljaka štite stanice od raspadanja tako što reagiraju sa slobodnim radikalima i time čine stanice otpornim. Njihova svojstva su uglavnom izvedena iz fenola ili tiola prisutnih u biljkama. Začini također mogu „zamaskirati“ loš okus ili miris hrane što se često događa na toplim mjestima gdje toplina

prouzrokuje raspadanje hrane, a posljedično tome i neugodne mirise, a kemijski konzervansi ne mogu eliminirati patogene u hrani (npr. *Listeriu monocytogenes*) niti u potpunosti ograničiti mikrobno kvarenje (Gassara i sur. 2016.).

### 3. Zaključak

Razvoj različitih načina povećanja održivosti hrane i mesa obilježili su čovjekov razvoj kroz povijest. Metode konzerviranja razvijale su se najprije na temelju iskustvenih, a kasnije znanstvenih činjenica, sve više su se upotrebljavale i kao takve usavršavale. Moderna proizvodnja hrane teško se može zamisliti bez dodavanja aditiva, među kojima se u mesnoj industriji najviše koriste nitriti i nitrati označeni kao konzervansi s kojima je lakše osigurati mikrobiološki ispravne mesne proizvode. Upotreba nitrata, odnosno nitrita je vrlo raširena jer oni:

1. ograničavaju i/ili sprječavaju rast i razmnožavanje mikroorganizama
2. inhibiraju rast i razvoj patogene bakterije *Clostridium botulinum* te njezinih toksina
3. produljuju rok trajanja proizvoda
4. djeluju kao antioksidanti
5. formiraju karakterističnu boju mesa i mesnih proizvoda
6. doprinose očuvanju arome proizvoda od mesa

Međutim, uz navedene prednosti bitno je naglasiti da se mora poštovati zakonska regulativa te nitrata i nitrite dodavati u dozvoljenim količinama kako bi smanjili mogućnost nastanka i utjecaja štetnih i kancerogenih spojeva N-nitrozamina. Prisutne su učestale inicijative o daljnjem snižavanju dozvoljenih količina praćeno naglašenijim potrebama za stalnom kontrolom i praćenjem unesenih i rezidualnih količina nitrata i nitrita u mesne proizvode. Usporedno s tim, predlažu se i razvijaju različiti načini smanjenja ili potpune zamjene nitrata i nitrita drugim sredstvima kao što su: prirodni izvori nitrata i nitrita poput praha celera, hitozan, kohineal, butilirani hidroksianisol, natrijev hipofosfit, višnjin prah, ružmarin, limunska kiselina, vinski ocat, te začinsko bilje kao što su cimet, klinčić, kim, češnjak, papar, đumbir, kurkuma, muškatni oraščić i dr. Iako je prijedloga puno, suvremena mesna industrija se i dalje oslanja na poznato djelovanje nitrata i nitrita kao i opće prihvaćeno mišljenje da uz umjerenu i raznoliku prehranu nema opasnosti od prevelike količine unosa nitrata i nitrita iz mesnih proizvoda u ljudski organizam.

## 4. Literatura

1. Andrée S., Jira W., Schwind K.-H., Wagner H., Schwägele F. (2010). Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science*. 86: 38-48.
2. Anonymous\_1 (n.d.). Antioksidans. <<http://antioksidans.com/pozitiva/celer-gorki-lek/>>. Pristupljeno 05. lipnja 2018.
3. Anonymous\_2 (2015). Klinčić – snažan začín koji liječi. <[https://zena.rtl.hr/clanak/vrt\\_i\\_biljke/klincic - snazan zacin koji lijeci/11421](https://zena.rtl.hr/clanak/vrt_i_biljke/klincic_-_snazan_zacin_koji_lijeci/11421)>. Pristupljeno 14. lipnja 2018.
4. Babović N. (2013). Antioksidansi u začinskom bilju – snažniji i zdraviji od sintetičkih varijanti. <<http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/antioksidansi-u-zacinskim-biljkama>>. Pristupljeno 05. lipnja 2018.
5. Beinrauch G., Pawelitsch K. (2017). Aditivi u hrani. *Gospodarski list*. 19, 36-44.
6. Binkerd E. F., Kolari O. E. (1975). The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. *Food and Cosmetics Toxicology*. 13: 655-661.
7. Commission Decision (EU) 2018/702 of 8 May 2018 concerning national provisions notified by Denmark on the addition of nitrite to certain meat products (notified under document C(2018) 2721).
8. Commission Decision (EU) 2015/826 of 22 May 2015 concerning national provisions notified by Denmark on the addition of nitrite to certain meat products (notified under document C(2015) 3526) .
9. De Mey E., De Maere H., Paelinck H., Fraeye I. (2017). Volatile *N*-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies. *Food Science and Nutrition*. 57 (13): 2909-2923.
10. Dikeman M., Devine C. (2014). *Encyclopedia of Meat Sciences*. The New Zealand Institute for Plant and Food Research. <[https://books.google.hr/books?id=vL9dAwAAQBAJ&pg=PA203&lpg=PA203&dq=nitrates+in+meat+products+in+Russia&source=bl&ots=G7o29egTVf&sig=lz\\_so0RSocK-SfL73vEhIbfBnVA&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwii2uzhrtPaAhXHDOwKHc5WBCUQ6AEINDAC#v=onepage&q=nitrates%20in%20meat%20products%20in%20Russia&f=false](https://books.google.hr/books?id=vL9dAwAAQBAJ&pg=PA203&lpg=PA203&dq=nitrates+in+meat+products+in+Russia&source=bl&ots=G7o29egTVf&sig=lz_so0RSocK-SfL73vEhIbfBnVA&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwii2uzhrtPaAhXHDOwKHc5WBCUQ6AEINDAC#v=onepage&q=nitrates%20in%20meat%20products%20in%20Russia&f=false)>. Pristupljeno 24. travnja 2018.
11. Eskandari M. H., Hosseinpour S., Mesbahi G., Shekarforoush S. (2013). New composite nitrite-free and low-nitrite meat-curing system using natural colorants. *Food Science & Nutrition*. 1(5): 392-401.
12. European Food Safety Authority (2017). EFSA confirms safe levels for nitrites and nitrates added to food. <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170615-0>>. Pristupljeno 24. travnja 2018.
13. Feiner G. (2006). *Meat products handbook – Practical science and technology*. Woodhead Publishing Limited, Engleska.
14. García M., Beldarraín T., Fornaris L., Díaz R. (2011). Partial substitution of nitrite by chitosan and the effect on the quality properties of pork sausages. *Food Science and Technology*. 31(2): 481-487.

15. Gassara F., Kouassi A. P., Brar S. K., Belkacemi K. (2016). Green Alternatives to Nitrates and Nitrites in Meat-based Products- A Review. *Food Science and Nutrition*. 56:13, 2133-2148.
16. Hanna instruments (n.d.). HI4113 ISE. <<https://hannainst.com/hi4113-nitrate-combination-ion-selective-electrode.html>>. Pristupljeno 16. svibnja 2018.
17. Havranek J., Tudor Kalit M. i sur. (2014). Sigurnost hrane: od polja do stola. M.E.P. d.o.o., Zagreb.
18. Honikel K. -O. (2004). Chemical analysis for specific components: Curing Agents. Federal Research Centre for Nutrition and Food. 195-201.
19. Honikel K. -O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*. 78: 68-76.
20. HRN EN 12014-3:2007, Spektrofotometrijsko određivanje količine nitrata i nitrita u mesnim proizvodima enzimskom redukcijom nitrata u nitrite (HRN EN 12014-3:2005) – 3. dio: Namirnice- Određivanje količine nitrata i/ili nitrita.
21. Institute of Food Technologists (1972). Nitrites, Nitrates, and Nitrosamines in Food – a Dilemma. *Food Science*. 37(6): 989-992.
22. Jašić M. (2009). Pigmenti. <<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/pigmenti>>. Pristupljeno 03. svibnja 2018.
23. Karolyi D. (2003). Salamureno meso i zdravlje ljudi. *Meso*. 5(5): 16-18.
24. Katušić K. (2017). Botulizam-uzroci, simptomi i liječenje. <<http://www.krenizdravo.net/zdravlje/bolesti-zdravlje/botulizam-uzroci-simptomi-i-lijecenje>>. Pristupljeno 29. svibnja 2018.
25. Kovačević D. (2001). Kemija i tehnologija mesa i ribe. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
26. Kovačević D., Mastanjević K., Čosić K., Pleadin J. (2016). Količina nitrita i nitrata u mesnim proizvodima s hrvatskog tržišta. *Meso*. 18(2): 40-46.
27. Lawrie R. A, Ledward D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science - 7th Edition*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
28. Lerotić D., Vinković Vrček I. (2005). Što se krije iza E-brojeva. Udruga za demokratsko društvo, Zagreb.
29. Lesinger I. (2015). Kim: ljekovit začim za koji su znali još i stari Egipćani, Grci i Rimljani. <<https://living.vecernji.hr/zelena-zona/kim-ljekovit-zacin-kojeg-su-znali-jos-i-stari-egipcani-grci-i-rimljani-999458>>. Pristupljeno 14. lipnja 2018.
30. Lovrić T. (2003). Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. Hinus, Zagreb.
31. Luterotti S. (n.d.). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). <[http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm)>. Pristupljeno 14. svibnja 2018.
32. Michigan State University Extension (2014). Additives have legal limit sin cured meat products. <[http://msue.anr.msu.edu/news/additives\\_have\\_legal\\_limits\\_in\\_cured\\_meat\\_products](http://msue.anr.msu.edu/news/additives_have_legal_limits_in_cured_meat_products)>. Pristupljeno 24. travnja 2018.

33. Pavlinić Prokurica I., Bevardi M., Marušić N., Vidaček S., Kolarić Kravar S., Medić H. (2010). Nitriti i nitrati kao prekursori N-nitrozamina u paštetama u konzervi. Meso. 12(6): 322-330.
34. Podnar O. (n.d.) Cimet. <<http://alternativa-zav.as.com/index.php/clanak/article/cimet>>. Pristupljeno 14. lipnja 2018.
35. Narodne novine (2012a): Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o prehranbenim aditivima (NN 79/12)
36. Narodne novine (2012b): Pravilnik o mesnim proizvodima (NN 131/12)
37. Narodne novine (2013): Zakon o prehranbenim aditivima, aromama i prehranbenim enzimima (NN 39/13)
38. Narodne novine (2015): Zakon o hrani (NN 30/15)
39. Santarelli R. L., Pierre F., Corpet D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. Nutrition and Cancer. 60:131-144.
40. Sebranek J. G., Bacus J. N. (2007a). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. Meat Science. (77), 136-147.
41. Sebranek J., Bacus J. (2007b). Natural and Organic Cured Meat Products: Regulatory, Manufacturing, Marketing, Quality and Safety Issues. American Meat Science Association. 1: 1-15.
42. Sindelar J. J., Milkowski A. L. (2011). Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. American Meat Science Association. 3: 1-14.
43. Službeni list Europske unije (2008): Uredba (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehranbenim aditivima
44. Službeni list Europske unije (2011): Uredba Komisije (EU) br. 1129/2011 od 11. studenoga 2011. o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehranbenih aditiva
45. Schuddeboom L. J. (1993). Nitrates and nitrites in foodstuffs. Council of Europe Press, Publishing and Documentation Service, ISBN 92-871-2424-6
46. Tiens (2018). Hitozan. <<http://www.zdravlje-iz-prirode.com/default.aspx?id=30>>. Pristupljeno 05. lipnja 2018.
47. USDA (1995). Processing Inspector's Calculations Handbook. <<http://food-safety.guru/wp-content/uploads/2015/05/USDA-edited-cure-calculations.pdf>>. Pristupljeno 08. lipnja 2018.
48. Vranešić Bender D. (2007). Znamo li što jedemo?. <<https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/znamo-li-sto-jedemo-2-3835/>>. Pristupljeno 05. lipnja 2018.
49. Wikipedia (2018a). Sodium hypophosphite. <[https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium\\_hypophosphite](https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_hypophosphite)>. Pristupljeno 05. lipnja 2018.
50. Wikipedia (2018b). Gas Chromatography - mass spectrometry. <[https://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography%E2%80%93mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry)>. Pristupljeno 17. svibnja 2018.

51. Žigić A. (2009). Je li češnjak doista toliko zdrav?. <<https://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/je-li-cesnjak-doista-toliko-zdrav/>>. Pristupljeno 14. lipnja 2018.

## 5. Prilog

### 5.1. Popis slika

Slika 2.1.4.1. Bazeni za potapanje mesa u salamuru. Izvor: autorica, 08.06.2017.

Slika 2.1.4.2. Uređaj za salamurenje mesa pikl-injektor. Izvor: Microtech (2012). Prerada. <<http://www.microtech.rs/prerada.html>> Pristupljeno 20. lipnja 2018.

Slika 2.1.4.3. Uređaj s jednom iglom za salamurenje velikih komada mesa. Izvor: Rühle (2015). Original PR 15. <<https://www.original-ruehle.de/en/products/machines/details-en/action/show/product/pr-15/>>. Pristupljeno 08. lipnja 2018.

Slika 2.1.4.4. Uređaj za tambliranje mesa. Izvor: Microtech (2012). Prerada. <<http://www.microtech.rs/prerada.html>> Pristupljeno 20. lipnja 2018.

Slika 2.2.1. Kruženje dušika u prirodi. Izvor: Filipović V. i sur. (2013). Prisutnost nitrata u podzemnim vodama; izvori i procesi – isprika i ispravak. <[http://www.voda.hr/sites/default/files/pdf\\_clanka/hv\\_84\\_2013\\_119-128\\_filipovic-et-al.pdf](http://www.voda.hr/sites/default/files/pdf_clanka/hv_84_2013_119-128_filipovic-et-al.pdf)>. Pristupljeno 11. lipnja 2018.

Slika 2.3.1.1. Tvorba N-nitrozamina. Izvor: Dikeman M., Devine C. (2014). Encyclopedia of Meat Sciences. Elsevier Academic Press. <[https://books.google.hr/books?id=vL9dAwAAQBAJ&pg=PA203&lpg=PA203&dq=nitrates+in+meat+products+in+Russia&source=bl&ots=G7o29egTVf&sig=lz\\_so0RSocK-SfL73vEhIbfBnVA&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwii2uzhrtPaAhXHDOWKHc5WBCUQ6AEINDAC#v=onepage&q=nitrates%20in%20meat%20products%20in%20Russia&f=false](https://books.google.hr/books?id=vL9dAwAAQBAJ&pg=PA203&lpg=PA203&dq=nitrates+in+meat+products+in+Russia&source=bl&ots=G7o29egTVf&sig=lz_so0RSocK-SfL73vEhIbfBnVA&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwii2uzhrtPaAhXHDOWKHc5WBCUQ6AEINDAC#v=onepage&q=nitrates%20in%20meat%20products%20in%20Russia&f=false)>. Pristupljeno 24. travnja 2018.

Slika 2.4.1. Struktura hema. Izvor: Wikipedia (2018). Hem. <<https://bs.wikipedia.org/wiki/Hem>>. Pristupljeno 03. svibnja 2018.

Slika 2.4.2. Promjena boje svježeg mesa. Izvor: prilagođeno prema Anonymous\_3 (n.d.) <<http://what-when-how.com/food-colors/natural-food-pigments-part-1/>>. Pristupljeno 18. lipnja 2018.

Slika 2.4.3. Mehanizam razvoja salamurene boje iz nitrata. Feiner G. (2006). Meat products handbook – Practical science and technology. Woodhead Publishing Limited, Engleska.

Slika 2.4.4. BMV, normalno i TČS meso. Izvor: Bohat ala (n.d.). Chemical and physical properties of meat. <<https://bohatala.com/chemical-and-physical-properties-of-meat/>>. Pristupljeno 03. svibnja 2018.



## 5.2. Popis tablica

Tablica 2.1.1.1. Usporedba dodanih količina nitrata i nitrita 1970. i 1974. godine. Izvor: prilagođeno prema Binkerd E. F., Kolari O. E. (1975). The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. Food and Cosmetics Toxicology. 13: 655-661.

Tablica 2.1.2.1. Odnos masenog udjela NaCl, gustoće i jakosti salamure. Izvor: Kovačević D. (2001). Kemija i tehnologija mesa i ribe. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.

Tablica 2.2.1. Elektronska konfiguracija i mogućnosti promjene elektrona u vanjskoj ljusci osnovnih bioloških elementa. Izvor: prilagođeno prema Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

Tablica 2.2.2. Oksidacijska stanja osnovnih kemijskih spojeva s dušikom. Izvor: prilagođeno prema Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

Tablica 2.4.1. Različiti oblici mioglobina. Izvor: Feiner G. (2006). Meat products handbook – Practical science and technology. Woodhead Publishing Limited, Engleska.

Tablica 2.7.1. Rezidualni nitriti u fino usitnjenim toplinski obrađenim kobasicama. Izvor: prilagođeno prema Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

Tablica 2.7.2. Sadržaj nitrata i nitrita nakon termičke obrade pri različitim pH vrijednostima. Izvor: prilagođeno prema Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

Tablica 2.9.1. Najviše dopuštene količine nitrata u mesnim proizvodima. Izvor: Službeni list Europske unije (2011): Uredba Komisije (EU) br. 1129/2011 od 11. studenoga 2011. o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehrambenih aditiva

Tablica 2.9.2. Najviše dopuštene količine nitrita u mesnim proizvodima. Izvor: Službeni list Europske unije (2011): Uredba Komisije (EU) br. 1129/2011 od 11. studenoga 2011. o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehrambenih aditiva

### 5.3. Popis shema

Shema 2.2.1. Djelovanje nitrata u konzerviranim mesnim proizvodima. Izvor: Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

Shema 2.2.2. Reakcije dušične kiseline u mesu. Izvor: Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

Shema 2.2.1.1. Slijed reakcija nitrita u vodenoj otopini kod pH oko 5,5 – 6,0. Izvor: Honikel K.-O. (2004). Chemical analysis for specific components: Curing Agents. Federal Research Centre for Nutrition and Food. 195-201.

Shema 2.3.1.1. Kemijske reakcije formiranja N-nitrozamina ( $M/M^+$  su prijelazni metalni ioni poput  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ). Izvor: prilagođeno prema Honikel K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78: 68-76.

## 5.4. Popis kratica

<b>KRATICA</b>	<b>PUNI NAZIV</b>
ADI	engl. Acceptable Daily Intake; prihvatljivi dnevni unos
BHA	butilirani hidroksianisol
BMV	blijedo, mekano, vodnjikavo
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	salitra
Cl	klor
CO	ugljičkov monoksid
DFD	engl. Dark-Firm-Dry; tamno-čvrsto-suho
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Fe	željezo
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GDL	glukono-delta-lakton
H	vodik
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
HNO <sub>2</sub>	nitritna (dušikasta) kiselina
HNO <sub>3</sub>	nitratna kiselina
HPLC	engl. High Performance Liquid Chromatography
ISE	engl. Ion Selective Electrode
K	kalij
KNO <sub>3</sub>	kalijev nitrat
KNO <sub>3</sub>	kalijev nitrat, salitra
Mb	mioglobin
MbO <sub>2</sub>	oksimioglobin
MMb	metmioglobin
N	dušik
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	didušikov trioksid
Na	natrij
NaCl	natrijev klorid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaNO <sub>2</sub>	natrijev nitrit
NaNO <sub>3</sub>	natrijev nitrat
NDK	najviša dopuštena količina
NDMA	N-nitrozodimetilamin
NHPRO	N-nitrozohidroksiprolin
NO	dušikov monoksid; dušikov (II) oksid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitriti
NO <sub>2</sub>	dušikov dioksid; dušikov (IV) oksid
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitрати
NOCl	nitrozilklorid
NOMb	nitrozilmioglobin

---

NPIP	N-nitrozopiperidin
npr.	na primjer
NPRO	N-nitrozoprolin
NPYR	N-nitrozopirrolidin
NSAR	N-nitrosarkozin
NTCA	N-nitrozotiadolizin-4-karboksilna kiselina
NTHZ	N-nitrozotiazolidin
O <sub>2</sub>	kisik
pK	konstanta disocijacije
ppm	engl. parts per milion
PSE	engl. Pale-Soft-Exudative; blijedo-mekano-vodnjikavo
RNA	ribonukleinska kiselina
S	sumpor
SHP, NaPO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	natrijev hipofosfit
SpVV	sposobnost vezanja vode
T	temperatura
TČS	tamno, čvrsto, suho
w	maseni udio

---

## Životopis

Danijela Kostelac rođena je 26. ožujka 1994. godine u Sisku. Osnovnu školu pohađala je u Martinskoj Vesi, u opću gimnaziju Sisak kreće 2009., a završava je 2013. godine. Nakon gimnazije upisuje Veleučilište u Požegi, smjer Prehrambena tehnologija, te 2016. godine stječe titulu stručne prvostupnice (baccalaurea) inženjerke prehrambene tehnologije i upisuje smjer Proizvodnja i prerada mesa na Agronomskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu. 2015. i 2016. godine dodijeljene su joj stipendije redovitim studentima Veleučilišta u Požegi na temelju izvrsnosti. Stručnu praksu u sklopu preddiplomskog i diplomskog studija obavlja u Gavrilović d.o.o. pri čemu stječe dodatna znanja i iskustva korisna za cjelokupno obrazovanje. Kroz brojna studijska putovanja stječe dobre komunikacijske vještine, sklona je timskom radu kao i daljnjem učenju i usavršavanju. Služi se računalnim operativnim sustavom „Microsoft Windows“ i programskim paketom „Microsoft Office“. Dobro raspolaže engleskim jezikom u govoru i pismu. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije, a u slobodno vrijeme bavi se rolanjem.

Kontakt:

e-mail: [kdanijela.mvd@gmail.com](mailto:kdanijela.mvd@gmail.com)

mobitel: 099/ 6836906