

## NITRITES AND NITROSAMINES IN PROCESSED MEATS

F2.

## SUMMARY

Contribution to the study of the linkage of  $\text{NO}_2\text{Na}$  to the myofibrillar fraction of pig muscle

GOUTEFONGEA R. RENERRE M. VALIN C.  
Station de Recherches sur la Viande  
I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT  
FRANCE

The aim of this work is to try to bring some information about the nitrite fate in meat products during processing.

Twenty four hours after slaughter, myofibrils are extracted from *M. longissimus dorsi* of pig; they are incubated with  $\text{NO}_2\text{Na}$  (180  $\mu\text{g/g}$  muscle) or with  $\text{NO}_2\text{Na} + \text{ClNa}$  (180  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_2\text{Na} + 30\text{mg}$   $\text{ClNa/g}$  muscle) for twenty hours at  $4^\circ\text{C}$ .

After incubation, at fixed pH, several thermal processes are used and free  $\text{NO}_2\text{Na}$  is determined; by difference with the initial amount of  $\text{NO}_2\text{Na}$ , the amount of linked nitrite is obtained.

The results are:

- the amount of nitrite linked to the myofibrillar fraction is about 10 % of the initial amount of nitrite added, i.e. the same amount which is linked to the pigment.
- $\text{ClNa}$  does not seem having an influence on nitrite linkage (slight increase).
- pH, between 5,5 and 6,5, does not change the nitrite linkage
- the results obtained after thermal process at  $55^\circ\text{C}$  (onset of myofibrillar proteins denaturation) at  $68^\circ\text{C}$  (cooking temperature of cooked ham) and at  $116-117^\circ\text{C}$  (appertisation) are approximately the same as those obtained at  $0^\circ\text{C}$ .

This work will have to extend to the other muscular fractions.

## RESUME

Contribution à l'étude de la fixation du nitrite aux myofibrilles du muscle de porc.

R. GOUTEFONGEA M. RENERRE C. VALIN  
Station de Recherches sur la Viande  
I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT  
FRANCE

Le but de cette étude est d'essayer d'apporter quelques éclaircissements sur le devenir du nitrite dans les produits carnés au cours de leur fabrication.

Vingt quatre heures après l'abattage, les myofibrilles étaient extraites de *M. longissimus dorsi* de porc. Elles étaient incubées pendant 20 heures à  $+4^\circ\text{C}$  avec du  $\text{NO}_2\text{Na}$  (180  $\mu\text{g/g}$  muscle) ou  $\text{NO}_2\text{Na} + \text{ClNa}$  (180  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_2\text{Na} + 30\text{mg}$   $\text{ClNa/g}$  muscle)

Après incubation à pH contrôlé, différents traitements thermiques étaient employés et le nitrite libre était dosé. Par différence avec la quantité initiale de  $\text{NO}_2\text{Na}$ , on obtenait la quantité de nitrite lié.

Les résultats montrent que :

- la quantité de nitrite lié aux myofibrilles est d'environ 10 % de la quantité initiale de nitrite ajouté, soit l'équivalent de ce qui est lié au pigment.
- la présence de  $\text{ClNa}$  ne semble pas avoir une influence nette sur la fixation du nitrite (tendance légère à l'augmentation).
- le pH dans une gamme de pH 5,5 à pH 6,5, ne montre pas d'action sur la fixation du nitrite.
- les résultats obtenus après traitement thermique à  $55^\circ$  (début de dénaturation des protéines myofibrillaires) à  $68^\circ$  (température de cuisson du jambon cuit) et à  $116-117^\circ$  (traitement d'appertisation) sont semblables entre eux et analogues à ceux obtenus en maintenant la température  $0^\circ$ .

Ce travail devra être étendu aux autres fractions musculaires.

## ZUSAMMENFASSUNG

Ein Beitrag zur Bestimmung der Verbindung zwischen Nitrit und myofibrillär-Proteinen im Schweinmuskel

GOUTEFONGEA R. RENERRE M. VALIN C.  
Station de Recherches sur la Viande  
I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT  
FRANCE

In dieser Arbeit wird versucht das Nitritverhalten in Fleischwaren während der Verarbeitung weiter zu untersuchen.

Myofibrillen werden 24 Stunden nach dem Schlachten im Longissimus dorsi-Muskel entzogen, dann entweder mit  $\text{NO}_2\text{Na}$  (180  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_2\text{Na}$  pro Gramm Muskel) oder mit  $\text{NO}_2\text{Na} + \text{NaCl}$  (180  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_2\text{Na} + 30\text{mg}$   $\text{NaCl}$  pro Gramm Muskel) während 20 Stunden bei  $+4^\circ\text{C}$ , und unter genauem pH-Wert, inkubiert.

Danach werden die Proben unter verschiedenen Kochbedingungen verarbeitet und das freie Nitrit bestimmt; der Unterschied mit dem zugegebenen Nitrit stellt das verbundene Nitrit dar.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- das an Myofibrillfraktion gebundene Nitrit stellt etwa 10 % der Nitritzugabe vor, also die selbe Menge wie am Pigment verbunden ist.
- die Zugabe von  $\text{NaCl}$  scheint keine bedeutende Wirkung auf die Nitritbindung zu haben (leichtes Ansteigen dieser Bindung)
- eine pH-Wert Änderung zwischen 5,5 und 6,5 wirkt auch nicht auf diese Bindung
- Nach den verschiedenen Kochverfahren: sei es bei  $55^\circ\text{C}$  (Beginn der Proteindenaturation), bei  $68^\circ\text{C}$  (Schinken-Kochtemperatur) oder bei  $116-117^\circ\text{C}$  (Appertisationstemperatur), weisen die Ergebnisse keinen bedeutenden Unterschied im Vergleich mit den bei  $0^\circ\text{C}$  geliebten Proben auf.

## К ВОПРОСУ ИЗУЧЕНИЯ ФИКСАЦИИ НИТРИТА В МЫШЕЧНЫХ МИОФИБРИЛЛАХ СВИНЬИ.

ГУТФОНЖА Р., РЕНЕР М., ВАЛЕН Х. /Франция/

Бактерицидная роль нитрита а также и его действие на факторы определяющие окраску колбасных продуктов хорошо известны. Наоборот, плохо известны фиксации этого добавочного вещества к разным фракциям мышцы, и роль таких связей при выработке отдельных количественных характеристик готового продукта.

Настоящая работа проведена ввиду изучения связи нитрита с сократительным аппаратом мышцы, выбранным в качестве целостной модели которой процесс экстракции сохранял функциональную структуру.

По полученным нами результатам видно что:

- количество нитрита зафиксированное миофибриллярной фракцией, при наших условиях исследования, составляет приблизительно 10 % количества добавляемого нитрита.
- присутствие  $\text{NaCl}$  видимо положительно влияет на фиксацию нитрита.
- подогревание даже при температурах используемых для стерилизации /2 часа при  $116-117^\circ$ / не разрушает такое соединение.
- pH в использованном нами масштабе /5,5; 6,0; и 6,5/ не имеет существенного влияния на фиксированное количество нитрита.

## NITRITES AND NITROSAMINES IN PROCESSED MEATS

Contribution à l'étude de la fixation du nitrite aux myofibrilles  
du muscle de porc.

R. GOUTEFONGEA M. RENORRE C. VALIN

Station de Recherches sur la Viande  
I.N.R.A. THEIX - 63110 BEAUMONT

FRANCE

Historiquement, l'emploi du nitrate, conjointement au sel pour conserver la viande et préparer des produits de charcuterie, remonte fort loin dans le temps mais jusqu'à la fin du siècle dernier, on ignorait tout de son action.

A cette époque, a été découverts la réduction bactérienne du nitrate en nitrite, puis, au début de ce siècle, a été établi le rôle du nitrite dans la formation de la couleur rose caractéristique des produits de salaison.

Des travaux plus récents ont élargi nos connaissances sur les diverses actions du nitrite, dans le domaine de la couleur (HORNSEY 1956, TARLADGIS 1962, BARD et TOWNSEND 1971) du pouvoir bactéricide à l'égard de diverses souches et en particulier de *Clostridium Botulinum* (GREENBERG 1972, BAIRD-PARKER and BAILLIE 1973) de la saveur du produit (BROOKS et al 1940, MOTTRAM and RHODES 1973, WASSERMAN 1973). Toutefois, le devenir du nitrite dans les produits carnés est encore loin d'être connu parfaitement, et bien que les travaux de MIRNA et HOFFMAN (1966), OLSMAN and KROD (1972) et de SEBRANEK et al (1973) aient apporté un certain nombre de résultats à ce sujet, les conclusions du Symposium tenu à ZEIST en septembre (1973) sur le problème des nitrites dans les produits carnés insistent sur le manque de connaissances existant encore dans ce domaine.

Le fait que le nitrite peut, en régissant avec des amines secondaires, produire des nitrosamines (SEN et al 1969, WOLF and WASSERMAN 1972, TANNENBAUM 1972) dont certaines au moins ont un pouvoir cancérigène (MAGEE et BARNES 1967) est un motif supplémentaire pour développer les recherches sur le devenir du nitrite dans les produits carnés.

Dans le travail exposé ici, nous avons choisi, dans un premier temps, d'étudier la fixation du nitrite sur l'appareil contractile musculaire, celui-ci étant considéré comme modèle d'un ensemble organisé, en fonction de différentes conditions de température et de pH.

## MATERIEL ET METHODES

Vingt quatre heures après l'abattage, le muscle *Longissimus dorsi* gauche est prélevé sur une carcasse de porc d'un poids commercial (poids vif 100kg) et est soigneusement débarrassé de son aponévrose et dégraissé. Il est entièrement broyé et séparé en fractions de 200g sur lesquelles on pratique l'extraction des myofibrilles par une technique dérivée de celle utilisée par BENDALL (1961).

Toutes les opérations sont menées dans des récipients à centrifuger de contenance 1,250l.

Chaque échantillon est homogénéisé à l'Ultra Turax avec 5 volumes d'un

tampon à pH 7,2-7,4 contenant 20mM d'Imidazole, 80 mM de KCl et 5mM d'oxalate de Potassium, préalablement refroidi à 0°. L'homogénéat séjourne 2h à 0° puis est centrifugé 30mn à 2200g. Le surnageant est enlevé et le culot est lavé 3 fois avec 5 volumes de KCl 0,05M à 0°, le dernier lavage étant précédé d'une filtration sur tamis à trous de 0,75mm<sup>2</sup> pour enlever des fragments de tissu conjonctif et autres débris.

Le culot est alors mis en suspension dans 600ml d'eau distillée et on ajoute alors dans chaque récipient 36mg de  $\text{NO}_2\text{Na}$  ou 36mg de  $\text{NO}_3\text{Na}$  ainsi que 6g de ClNa. Ces quantités sont déterminées de manière à réaliser des conditions analogues à celles existant lorsque l'on saumure du jambon.

Le pH de cet homogénéat est déterminé (pH-mètre Radiometer pHM26) et éventuellement ajusté à la valeur désirée avec HCl 0,5N. Un prélèvement de 2ml est alors réalisé en double sur chaque échantillon pour la détermination de la teneur en protéines par Kjeldahl.

L'incubation dure une nuit à 0°-4° puis on applique le traitement thermique qui consiste en un chauffage à 55°C ou 68°C suivi d'un refroidissement dès que cette température est atteinte, ou en une stérilisation à 116-117° pendant 2 heures.

Le contenu de chaque récipient est à nouveau homogénéisé à l'Ultra Turax, le volume déterminé et 4 prises d'essai de 40ml sont effectuées et traitées par la méthode de détermination de la teneur en nitrite libre comme suit :

Les 40ml de prise d'essai sont traités par 100 à 150ml d'eau bouillante puis le milieu est tamponné par 5ml de solution saturée de borax. La déprotéinisation est assurée par un passage de 30mn au bain marie bouillant et complétée par ferrocyanure de potassium et acétate de zinc. Après ajustage à 200ml et filtration, le dosage des nitrites est effectué selon la méthode de GRIESS (1879) modifiée selon BARNES et FOLKARD (1951) (Remplacement de l'acide sulfanilique par le sulfanilamide et de l' $\alpha$ -naphthylamine par l' $\alpha$ -naphthylethylènediamine). La quantité de nitrite libre étant ainsi déterminée, on obtient par différence avec la quantité totale ajoutée, la fraction fixée aux myofibrilles.

## Résultats - Discussion

Trois expérimentations successives ont été réalisées. Les résultats en sont rassemblés dans le tableau 1, chaque valeur mentionnée est la moyenne des résultats obtenus sur deux répétitions.

La teneur en protéines de chaque échantillon, dans chaque expérience est pratiquement constante et comprise entre 17,8 et 18mg de protéines par ml d'homogénéat ; nous n'avons donc pas tenu compte de ces légères variations dans les calculs.

Si on considère l'ensemble des résultats, on observe que la quantité de Nitrite fixée est relativement peu variable et voisine de 10 % de la quantité initiale ajoutée.

de pH de 5,5, 6,0 et 6,5. Il n'apparaît pas, ici non plus, de différences dans la quantité de nitrite fixée liées au pH. Ce résultat n'est pas surprenant car les travaux de SANDER et SCHWEINSBERG (1971) sur la formation de composés nitrosés montrent que l'influence des variations de pH est surtout sensible dans des zones de pH très inférieures (aux environs de pH 2,0 et pH 3,0).

L'étude de l'influence de la température a été menée aux températures de 55° et 68° et 116-117°.

Le choix de la température de 68° a déjà été justifié, celui de 116-117° l'est par le fait que tous les produits soumis à l'appertisation subissent un passage à cette température. Nous avons choisi en outre 55° car des travaux menés actuellement par l'un d'entre nous montrent qu'à partir de 55°, une certaine dénaturation commence à se manifester au niveau des myofibrilles et se traduit par l'apparition d'une fraction soluble dans KCl 0,05M.

Nous pouvons donc observer que quelle que soit la température utilisée, dénaturation commence des protéines myofibrillaires, cuisson du jambon cuit, stérilisation des produits appertisés, la quantité de nitrite fixé aux myofibrilles ne varie pas de façon sensible.

## Conclusion

Nous pouvons constater que, la présence ou non de ClNa, la valeur du pH, dans des limites correspondant à la pratique, la valeur de la température, n'ont pas d'influence importante sur la fixation du nitrite à l'appareil myofibrillaire. En outre, la quantité de nitrite qui se fixe à ces protéines représente environ 10 % de la quantité totale de nitrite ajouté et est donc relativement importante.

Nous pensons que cette étude, partielle, devra être complétée par un examen analogue des autres fractions musculaires, ce qui apportera un complément aux travaux de SEBRANEK et al (1973). De plus on sait que des nitrosamines peuvent se former à la suite de réactions de nitrosation entre le nitrite libre et des amines secondaires, réactions pouvant se produire soit au cours du processus de fabrication des produits carnés, soit dans le tube digestif des consommateurs, par contre on ne sait pas si le nitrite lié à des fractions musculaires peut participer à de telles réactions au cours des phénomènes de la digestion et bien que FROUIN (1973) ait montré que, dans le nitrososème la structure électronique et la réactivité de l'oxyde d'azote sont profondément modifiées, il nous semble important de vérifier ce point en étudiant l'apparition éventuelle de nitrosamines dans le tube digestif d'animaux de laboratoire alimentés avec des fractions azotées nitrosées.

Travail réalisé avec la collaboration technique de Madame VIZET Nicole et Monsieur OBLED A.

Tableau 1

Exp. N°	Température	pH	NO <sub>2</sub> Na fixé en % de la quantité initiale	
			NO <sub>2</sub> Na seul	NO <sub>2</sub> Na + ClNa
1	68°	5,5	8,4	9,5
		6,0	7,8	10,2
		6,5	9,1	11,4
2	68°	0°	9,4	10
		55°	9,8	9,9
		68°	7,8	9,7
3	116/117°	0°	7,1	10,6
		68°	10,0	8,2
		6,5	11,2	12,8

Cette quantité est relativement importante puisqu'elle représente sensiblement l'équivalent de ce qui se fixe à la myoglobine si l'on admet qu'une mole de NO se lie à une mole de myoglobine ; même si on considère, selon TARLADGIS (1962), qu'après cuisson, le pigment peut fixer deux moles de NO par mole, la quantité de nitrite fixée à l'appareil myofibrillaire est néanmoins d'une importance notable.

Nous pouvons également noter que nos résultats sont nettement supérieurs à ceux rapportés par SEBRANEK et al (1973) qui observent, par extraction des protéines myofibrillaires selon la technique de HELANDER (1957) (IK 1,1M), que la quantité de nitrite fixé à cette fraction est, après traitement, de 3 à 4 % du nitrite ajouté initialement. Or, les quantités de nitrite ajoutées sont sensiblement les mêmes, par rapport au poids de viande initiale, dans les deux cas et les températures de traitement sont également très voisines. On peut également admettre que, sur le plan de la composition en protéines l'extrait à l'IK 1,1M et l'extrait myofibrillaire que nous avons réalisés sont très voisins et qu'ils ne diffèrent que par le maintien d'une structure organisée dans notre expérimentation ; on peut trouver à l'explication de la différence observée entre nos résultats et ceux de SEBRANEK.

Si nous analysons l'influence de la présence de ClNa sur la fixation du nitrite, nous constatons que si une légère tendance à l'augmentation de la quantité de nitrite fixé semble se manifester en présence de ClNa, elle n'est pas systématique et relativement peu marquée. En raison du faible nombre de données, nous n'avons pas pratiqué l'analyse statistique, mais nous ne pensons pas, au vu de ces résultats, que l'on puisse conclure à une influence de la présence du ClNa sur la fixation du nitrite aux myofibrilles.

L'étude de l'influence du pH a été conduite à 68° qui correspond à une température couramment utilisée lors de la cuisson de divers produits charcutiers et en particulier du jambon cuit. Pour rester dans une zone correspondant à la réalité pratique, nous nous sommes limités aux valeurs

## NITRITES AND NITROSAMINES IN PROCESSED MEATS

Références bibliographiques

- BAIRD, PARKER A.C., and BAILLIE M.A.H 1973 The inhibition of Clostridium botulinum by nitrite and sodium chloride - Proceedings of the Symposium on Nitrite in meat products. 10-14- September 1973 Zeist, The Netherlands.
- BARD J. and TOWNSEND W.E. 1971. Meat curing - in "The science of meat and meat products". Ed. Price J.F. and Schweigert B.S., W.H. FREEMAN and Co - San Francisco - Calif.
- BENDALL J.R. 1961. Study of the kinetics of the fibrillar adenosine triphosphatase of rabbit skeletal muscle. Biochem. J. 81-520.
- BROOKS J., HAINES R.B., MORAN T., PACE J., 1940 The function of nitrate, nitrite and bacteria in the curing of bacon and hams. Fd. Invest. Bd. Spac. Rept n° 49 - HMSO London.
- FROUIN A. et CORDIER J.P. 1973. Composition du pigment des viandes salées. XIX<sup>e</sup> Meeting of meat Research Workers - Paris 2-7 septembre 73.
- GREENBERG R.A. 1972 Nitrite in the control of clostridium botulinum - p.25 Proc. Meat Ind. Res. Conf. Chicago Ill.
- HELANDER E. 1957 On quantitative muscle protein determination. Acta Physiol. Scand. 41 supp. 141.
- HORWSEY H.C. 1956 The color of cooked cured porc. 1 - Estimation of the nitric oxide haem pigments. J. Sci. Food Agric. 7 : 534.
- MAGEE P.N. and BARNES J.M. 1967 Carcinogenic nitroso compounds. Adv. Cancer Res. 10-163.
- MIRVA A. and HOFFMAN K. 1969. Über den Vergleich von Nitrit in Fleischwaren. Die Fleischwirtschaft - 10-1361.
- MOTTRAM D.S. and RHODES D.N. 1973. Nitrite and the flavour of cured meat. Proceeding of the symposium on nitrite in Meat Products. 10-14 septembre 1973. Zeist, the Netherlands.
- OLSMAN W.J. and KROL B. 1972. Depletion of nitrite in heated meat products during storage. p. 409. Proc. 18th Meeting Meat Res. Workers - Guelph Ontario Canada.
- SAUNDER J. and SCHWEINSBERG F. 1971. In VIVO and IN VITRO Experiments on the formation of N.Nitroso compounds from amines or amides and Nitrate or Nitrite. Proceedings of a working conference held at the D.F.K.Z. Heidelberg 13-15 october 1971. I.A.R.C. Scientif. Publ. n°3 - 97-103.
- SEBRANEK J.G., CASSENS R.G., HOEKSTRA W.G., WINDER W.C. 1973. <sup>15</sup>N tracer studies of nitrite added to a comminuted meat product. J. Fd.Sci.38-1220.
- SEN N.P., SMITH D.C., and SCHWINGHAMMER L. 1969 Formation of N. Nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. Fd. Cosmet. Toxicol. 7 - 301.
- TANNENBAUM S.R. 1972 Nitrite and nitrosamine content of foods ; unsolved problems and current research. Proc. Recip. Meats conf. Iowa State University Ames Iowa.
- TARLADGIS B.G. 1962. Interpretation of the spectra of meat pigments. 2: Cured meats. The mechanism of colour fading. J. Sci. Food Agric. 13-485.
- WASSERMAN A.E. 1973. Nitrite and the flavour of cured meats. Proceedings of the symposium on nitrite in meat products. 10-14 Sept. 73 ZEIST The Netherlands.
- WOLFF I.A. and WASSERMAN A.E. 1972 Nitrites, nitrites and nitrosamines - Science 177-15.