

Proteolyse in verschiedenen Hart- und Halbhartkäsen:

2. Amine

P. LAVANCHY, R. SIEBER
 Eidg.Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
 3097 Liebefeld-Bern
 Eingereicht am 21. September 1993

Bei Hart- (Sbrinz, Gruyère) und Halbhartkäsen (Walliser Raclette, Appenzeller, Tilsiter aus Rohmilch) wurde der Reifungsverlauf analytisch verfolgt. Dabei wurden an verschiedenen Tagen Proben erhoben und diese neben verschiedenen Parametern auch auf die biogenen Amine untersucht. Es zeigte sich im Verlaufe der Reifung vor allem bei den Halbhartkäsen nach dem zweiten Monat ein Anstieg im Gehalt an biogenen Aminen.

1. Einleitung

Käse durchläuft im Verlaufe der Reifung eine Proteolyse. Dabei wird durch die Wirkung der Proteasen und Peptidasen das Kasein in Peptide und freie Aminosäuren abgebaut. Aus den Aminosäuren können weitere Verbindungen gebildet werden, unter anderem aliphatische und aromatische Amine. Unter diesen finden in Käse die biogenen Amine Tyramin, Histamin, Cadaverin, Putrescin und Phenethylamin Beachtung (1). Putrescin spielt mit Spermin und Spermidin eine wichtige Rolle beim Wachstum von Geweben und Organen, und der menschliche Organismus ist auf deren Zufuhr über Lebensmittel angewiesen (2). Der Gehalt an biogenen Aminen in Käse wurden von verschiedenen Autoren ermittelt und deren Resultate in einer Über-

sicht zusammengefasst (16). Verschiedene Faktoren wie Verfügbarkeit von freien Aminosäuren, Mikroorganismen u.a. sind an der Bildung dieser Substanzen in Käse beteiligt (15). Auch über den Verlauf der Bildung von biogenen Aminen während der Reifung liegen Angaben für verschiedene Käse vor (6 - 10, 21, 22). In den Mitteilungen über den Reifungsverlauf von qualitativ guten Hart- (Sbrinz (17), Gruyère (18)) und Halbhartkäsen (Walliser Raclette (14), Appenzeller (19) und Tilsiter aus Rohmilch (20)) wurden nur die Summe der biogenen Amine angegeben. Es war deshalb das Ziel dieser vorliegenden Arbeit, in Fortsetzung der Arbeit über die freien Aminosäuren (12) noch eingehender das Auftreten der biogenen Amine während der Reifung dieser Hart- und Halbhartkäse zu dokumentieren.

2. Material und Methoden

Die Auswahl der Käse sowie die Probenahme sind in den entsprechenden Publikationen zum Reifungsverlauf von Sbrinz (17), Gruyère (18), Walliser Raclette (14), Appenzeller (19) und Tilsiter aus Rohmilch (20) beschrieben. Dabei wurden für den Sbrinz 20, den Gruyère 24, den Walliser Raclette 15, den Appenzeller und Tilsiter aus Rohmilch je 16 Käse ausgewählt und deren Käse im Verlaufe eines

oder zweier Jahre in bestimmten Abständen während der Reifung auf verschiedene Parameter untersucht. Bei Sbrinz und Gruyère wurden die Proben in die Zonen „unter dem Narben“ und die Zone „in der Mitte“ unterteilt. Die biogenen Amine wurden mit Hilfe einer HPLC-Methode (11) bestimmt.

3. Resultate

Im Käse sind die Gehaltswerte der einzelnen biogenen Amine nicht normal verteilt. Aus diesem Grunde werden im folgenden die Medianwerte mit dem Minimum und dem Maximum angegeben. Es handelt sich dabei um eine Auswertung der Resultate aller untersuchter Käse im Gegensatz zu den entsprechenden Publikationen, in denen nur Mittelwerte von Käsen mit guter Qualität publiziert wurden. Sbrinz und Gruyère bildeten im Verlaufe der Reifung nur geringe Mengen an biogenen Aminen und erreichten nur in einzelnen Fällen, beispielsweise Cadaverin in 245 Tage altem Gruyère, mehr als 1 mmol/kg (Tabellen 1 - 5). Bei den Halbhartkäsen fand während des ersten Reifungsmonats eine geringe Bildung an biogenen Aminen statt, einzige Ausnahme stellte in dieser Beziehung das Histamin im Appenzeller und Tilsiter dar. Im Verlaufe des zweiten Reifungsmonats er-

Tabelle 1. Biogene Amine in Sbrinz im Verlaufe der Reifung (Mi=Mitte, uN=unter dem Narben; N=20; Medianwert, Minimum, Maximum; mmol/kg)

	Zone	Reifungsalter in Tagen				
		1	35	112	364	546
Tyramin	Mi	0,02 0; 0,03	0,02 0; 0,05	0,02 0; 0,03	0,02 0; 0,18	0,02 0; 0,27
	uN	0,02 0; 0,03	0,02 0; 0,03	0,02 0; 0,03	0,02 0; 0,25	0,01 0; 0,18
Histamin	Mi	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,01	0 0; 0,12	0 0; 0,78
	uN	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0
Putrescin	Mi	0 0; 0,03	0,01 0; 0,09	0,02 0; 0,04	0,02 0; 0,06	0,03 0; 0,13
	uN	0 0; 0,03	0,02 0; 0,06	0,03 0; 0,07	0,02 0; 0,11	0,02 0; 0,12
Cadaverin	Mi	0 0; 0,01	0 0; 0,01	0 0; 0,03	0,01 0; 0,04	0,01 0; 0,11
	uN	0 0; 0,01	0,01 0; 0,04	0,01 0; 0,05	0,01 0; 0,07	0 0; 0,10
Phenethylamin	Mi	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,10	0 0; 0
	uN	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,18	0 0; 0

Tabelle 2. Biogene Amine in Gruyère im Verlaufe der Reifung (Mi=Mitte, uN=unter dem Narben; N=24; Medianwert, Minimum, Maximum; mmol/kg)

	Zone	Reifungsalter in Tagen				
		8	15	64	126	245
Tyramin	Mi	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,10	0 0; 0,10	0 0; 0,69
	uN	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,10	0 0; 0,60	0,20 0; 2,30
Histamin	Mi	0 0; 0	0 0; 0,01	0 0; 0,20	0,02 0; 0,35	0,01 0; 0,59
	uN	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0,07 0; 0,42	0,01 0; 0,83
Putrescin	Mi	0 0; 0,07	0,02 0; 0,13	0,01 0; 0,10	0,04 0; 0,31	0,08 0; 0,52
	uN	0,01 0; 0,05	0,02 0; 0,09	0,03 0; 0,12	0,05 0,01; 0,62	0,10 0; 0,79
Cadaverin	Mi	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,19	0,10 0; 1,00	0,19 0; 1,90
	uN	0 0; 0,10	0 0; 0,10	0,19 0; 0,80	0,19 0; 2,50	0,29 0; 2,80
Phenethylamin	Mi	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0
	uN	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0	0 0; 0,04

höhte sich der Gehalt an Tyramin, Histamin und Cadaverin leicht, um dann gegen Ende der Reifung deutlich anzusteigen (Tabellen 1 - 5).

In reifem Sbrinz lag der Medianwert der Summe der gesamten biogenen Amine unter 10, beim Gruyère unter 100 mg/kg, wobei sich die Verhältnisse zwischen dem Zentrum und unter dem Narben unterschieden. Bei den Halbhartkäsen stieg er bis zum Ende der Reifung auf 350 - 600 mg/kg an. Die Konzentration der gesamten biogenen Amine der Halbhartkäse sind um mehr als eine Zehnerpotenz höher als bei den Hartkäsen Sbrinz (17) und Gruyère (18). Solche hohen Werte bei den Halbhartkäsen wurden bereits in anderen Untersuchungen gemessen (3, 11, 14, 16).

4. Diskussion

Die Resultate der untersuchten Käse zeigten in bezug auf die biogenen Amine eine grosse Variationsbreite innerhalb der einzelnen Sorte. Dies erstaunt wenig, da die Hart- und Halbhartkäse aus roher Milch hergestellt und zudem bei den Halbhartkäsen eine tiefe Brenntemperatur (minimale Temperatur zwischen 38 und 42 °C) angewendet wird (13). Zur Entwicklung der biogenen Amine beitragen dürften die bakteriologische Qualität der verarbeiteten Rohmilch, die Milchbehandlung und die Behandlung während der Reifung (15). Bei einem Käse aus Rohmilch ist der Einfluss der Rohmilchflora auf das gesamte Gärgeschehen nicht zu unterschätzen (5). Die in der Milch vorhandenen Keime, unter denen auch Enterokokken zu finden sind (4), können die tiefen Brenntemperaturen der Halbhartkäse besser überleben und beeinflussen damit die Bildung der biogenen Amine wesentlich. Nach den Untersuchungen von Joosten und Northolt (9) sind es vor allem die Enterokokken, die jedoch erst bei einer Anzahl von grösser als 10⁷ koloniebildenden Einheiten (KBE)/g massgeblich an der Bildung von biogenen Aminen beteiligt sind. Diese Keime finden sich in den hier untersuchten Käsen in unterschiedlicher Masse. In Sbrinz (17) und Gruyère (18) war deren Anzahl mehrheitlich unter 10³ KBE/g. In Walliser Raclette (14) können die Enterokokken bis auf 10⁸ KBE/g, in Appenzeller (19) und Tilsiter (20) auf 10⁶ KBE/g ansteigen.

Tyramin

Joosten (7) hat in Untersuchungen vorwiegend an Gouda und zum Teil auch an Maasdamer den Gehalt an Tyramin bestimmt. Nach 1 Monat wurde in mit *L. brevis* fabriziertem Gouda 0,6, nach 3 Monaten 1,4, nach 6 Monaten 2,6 und

nach 12 Monaten 4,8 mmol Tyramin/kg gefunden. Die in dieser Arbeit ermittelten Tyraminkonzentrationen für Halbhartkäse liegen etwa in der gleichen Grössenordnung (Tabellen 3 - 5).

Histamin

Der Histamingehalt stieg in Schweizer Käse, der mit dem histaminbildenden Keim *L. buchneri* hergestellt wurde, linear von 2,2 nach ungefähr 1 Monat auf 7,2 mmol/kg nach 3 Monaten an (22). In 5 Hartkäsen aus Rohmilch, die ohne zusätzliche Bakterien oder mit *Enterobacter aerogenes* oder mit *L. buchneri* hergestellt wurden, stieg die Histaminkonzentration von 0,15 bis 0,39 nach 1 Monat, auf 0,45 bis 0,95 nach 2 Monaten, auf 1,38 bis 3,87 nach 3 Monaten, auf 1,62 bis 4,32 nach 4 Monaten und auf 1,98 bis 5,67 mmol/kg nach 5 Monaten an. In diesen Käsen wurde innen mehr Histamin nachgewiesen als in der Randzone (6). Im Gegensatz zu diesen Resultaten wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Mehrzahl der Hartkäse Sbrinz und Gruyère im Zentrum praktisch kein Histamin gebildet (Tabellen 1 - 2). In mit *L. buchneri* hergestelltem Gouda variierte der Histamingehalt in Abhängigkeit der Reifungstemperatur nach 3 Monaten zwischen 0,5 (9 °C) und 2,5 (21 °C) mmol/kg, in Abhängigkeit des Salzgehaltes zwischen 1,0 und 1,4 mmol/kg und in Abhängigkeit verschiedener Starterkulturen zwischen 0,8 und 1,3 mmol/kg (7). Diese Werte sind mit den in Tabellen 3 - 5 angegebenen Histamingehalten für die Halbhartkäse vergleichbar.

Putrescin und Cadaverin

Der Gehalt an Putrescin schwankte in mit *Hafnia alvei* inokuliertem Gouda zwischen < 0,2 und 1,2 mmol/kg nach

einem Monat und zwischen < 0,2 und 1,8 mmol/kg nach 3 Monaten, derjenige an Cadaverin zwischen 1,6 und 2,0 sowie zwischen 2,0 und 3,8 mmol/kg (7). In dieser Arbeit lagen nach 3 Monaten die Medianwerte für Putrescin in Halbhartkäsen unter 1 mmol/kg und für Cadaverin unter 1,5 mmol/kg (Tabellen 3 - 5).

Phenethylamin

Phenethylamin wurde nach 1 resp. 3 Monaten in mit *S. faecalis* bzw. *L. brevis* fabriziertem Gouda in Konzentrationen zwischen < 0,4 und 1,8 bzw. < 0,4 und 7,4 mmol/kg nachgewiesen (7). In den hier untersuchten Halbhartkäsen Appenzeller und Tilsiter lag der Medianwert am Ende der Reifung unter 0,4 mmol/kg (Tabellen 4 - 5).

Tabelle 3. Biogene Amine in Walliser Raclette im Verlaufe der Reifung (N=15; Medianwert, Minimum, Maximum; mmol/kg)

	Reifungsalter in Tagen				
	1	10	23	58	130
Tyramin	0 0; 0	0 0; 0,10	0 0; 0,50	0,50 0; 1,11	1,90 0,10; 6,50
Histamin	0 0; 0	0 0	0 0; 0,10	0,10 0; 0,90	0,50 0; 5,70
Putrescin	0 0; 0	0 0	0 0; 0,30	0 0; 1,70	0,20 0; 3,70
Cadaverin	0 0; 0,10	0 0; 0,30	0,10 0; 0,40	0,10 0; 1,00	0,21 0; 4,80
Phenethylamin	0 0; 0	0 0	0 0	0 0; 0,20	0 0; 2,80

Tabelle 4. Biogene Amine in Appenzeller im Verlaufe der Reifung (N=16; Medianwert, Minimum, Maximum; mmol/kg)

	Reifungsalter in Tagen				
	1	10	25	60	130
Tyramin	0 0; 0,18	0,01 0; 0,03	0 0; 0,04	0,15 0; 1,20	1,74 0; 5,02
Histamin	0,09 0; 0,53	0,16 0; 0,51	0,22 0; 0,83	0,49 0,07; 4,14	1,39 0,12; 4,82
Putrescin	0 0; 0	0 0	0 0; 0,01	0 0; 0,80	0,34 0; 0,93
Cadaverin	0 0; 0,30	0 0; 0,15	0,04 0; 0,2	0,13 0; 2,20	1,28 0; 8,66
Phenethylamin	0 0; 0,08	0 0	0 0	0 0; 0,18	0,28 0; 1,64

Tabelle 5. Biogene Amine in Tilsiter aus Rohmilch im Verlaufe der Reifung (N=16; Medianwert, Minimum, Maximum; mmol/kg)

	Reifungsalter in Tagen				
	1	10	25	60	130
Tyramin	0 0; 0,5	0,01 0; 0,04	0 0; 0,05	0,36 0; 1,80	2,12 0,10; 7,47
Histamin	0,14 0; 0,93	0,10 0; 0,37	0,12 0,05; 0,45	0,53 0,16; 4,37	1,08 0; 5,19
Putrescin	0 0; 0	0 0	0 0; 0	0 0; 0,73	0,06 0; 0,18
Cadaverin	0 0; 1,09	0,04 0; 2,11	0,09 0; 2,08	0,17 0; 2,45	0,51 0,02; 1,56
Phenethylamin	0 0; 0	0 0	0 0	0 0; 0,08	0,33 0; 1,50

5. Schlussfolgerung

Biogene Amine sind Stoffwechselprodukte, die im Verlaufe der Käsereifung aus den freien Aminosäuren entstanden sind. Diese stellen nicht das limitierende Substrat für die Bildung von biogenen Aminen dar, da sie in genügenden Mengen im Verlaufe der Reifung gebildet werden (12). Doch zeigte sich, dass sich die Hartkäse in bezug auf ihren Gehalt an biogenen Aminen von den Halbhartkäsen deutlich unterscheiden. Dies muss auf die Bedingungen während der Käseherstellung zurückgeführt werden, da bei den Halbhartkäsen eine tiefe Brenntemperatur angewendet wird.

6. Literatur

- 1 ASKAR, A., TREPTOW, H.: Biogene Amine in Lebensmitteln. E.Ulmer Verlag, Stuttgart (1986)
- 2 BARDOCZ, S., GRANT, G., BROWN, D.S., RALPH, A., PUSZTAL, A.: Polyamines in food - implications for growth and health. *J.Nutr.Biochem.* **4**, 66-71 (1993)
- 3 BÜTIKOFER, U., FUCHS, D., HURNI, D., BOSSET, J.O.: Beitrag zur Bestimmung biogener Amine in Käse. Vergleich einer verbesserten HPLC- mit einer IC-Methode und Anwendung bei verschiedenen Käsesorten. *Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg.* **81**, 120-133 (1990)
- 4 FORSTER, I., GRAND, M., GLÄTTLI, H.: Mikrobiologische Qualität der Rohmilch in verschiedenen Regionen der Schweiz. *Schweiz.Milchw.Forschung* **16**, 79-83 (1987)
- 5 GALLMANN, P.: Einfluss der Rohmilchflora auf die biochemischen Vorgänge der Käsereifung am Beispiel von Raclette-Käse aus pasteurisierter und roher Milch. Dissertation Nr. 6972, ETH Zürich (1982)
- 6 GRAF, W.: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bildung von Histamin in Hartkäse. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München (1992)
- 7 JOOSTEN, H.M.L.J.: Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed. *Neth.Milk Dairy J.* **41**, 329-357 (1987)
- 8 JOOSTEN, H.M.L.J., BOEKEL, M.A.J.S.van: Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 4. A study of the kinetics of histamine formation in an infected Gouda cheese. *Neth.Milk Dairy J.* **42**, 3-24 (1988)
- 9 JOOSTEN, H.M.L.J., NORTHOLT, M.D.: Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Neth.Milk Dairy J.* **41**, 259-280 (1987)
- 10 LALEYE, L.C., SIMARD, R.E., GOSSELIN, C., LEE, B.H., GIROUX, R.N.: Assessment of Cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *J.Food Sci.* **52**, 303-307 (1987)
- 11 LAVANCHY, P., BÜHLMANN, C., STEIGER, G.: Détermination des amines biogènes de quelques fromages fabriqués en Suisse. *Schweiz. Milchw. Forschung* **14**, 3-12 (3) (1985)
- 12 LAVANCHY, P., SIEBER, R.: Proteolyse in verschiedenen Hart- und Halbhartkäsen: 1. Freie Aminosäuren. *Schweiz. Milchw. Forschung* **22**, 59-64.
- 13 NN: Verordnung über die Bezeichnungen von Schweizer Käse vom 10. Dezember 1981 (SR 817.141). Eidg.Drucksachen- und Materialzentrale, Bern (1981)
- 14 SCHÄR, H., GLÄTTLI, H., NICK, B., SIEBER, R., STEIGER, G.: Untersuchungen über den Reifungsverlauf guter Walliser Raclettekäse. *Schweiz.Milchw.Forschung* **21**, 63-69 (1992)
- 15 SIEBER, R., BILIC, N.: Ueber die Bildung der biogenen Amine in Käse. *Schweiz.landwirt.Forschung* **32**, 33-58 (1992)
- 16 SIEBER, R., LAVANCHY, P.: Gehalt an biogenen Aminen in Milchprodukten und in Käse. *Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg.* **81**, 82-105 (1990)
- 17 SOLLBERGER, H., GLÄTTLI, H., NICK, B., RÜEGG, M., SIEBER, R., STEIGER, G.: Untersuchungen über den Reifungsverlauf guter Sbrinzkäse. *Schweiz.Milchw.Forschung* **20**, 63-69 (1991)
- 18 STEFFEN, C., RENTSCH, F., NICK, B., STEIGER, G., SIEBER, R., GLÄTTLI, H., EBERHARD, P.: Reifungsverlauf in qualitativ gutem Gruyère. *Landwirtschaft Schweiz* **5**, 209-215 (1992)
- 19 STEFFEN, C., SCHÄR, H., EBERHARD, P., GLÄTTLI, H., NICK, B., RENTSCH, F., STEIGER, G., SIEBER, R.: Untersuchungen über den Reifungsverlauf von qualitativ guten Käse: Appenzeller. *Schweiz.Milchw.Forschung* **22**, 39-45 (1993)
- 20 STEFFEN, C., SCHÄR, H., EBERHARD, P., GLÄTTLI, H., NICK, B., RENTSCH, F., STEIGER, G., SIEBER, R.: Untersuchungen über den Reifungsverlauf von qualitativ gutem Käse: Tilsiter aus Rohmilch. *Schweiz.Milchw.Forschung* **22**, 46-52 (1993)
- 21 STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W., TAYLOR, S.L.: Histamine production in low-salt Cheddar cheese. *J.Food Prot.* **54**, 852-855, 867 (1991)
- 22 SUMNER, S.S., ROCHE, F., TAYLOR, S.L.: Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J.Dairy Sci.* **73**, 3050-3058 (1990)

Résumé

Protéolyse dans différents fromages à pâte dure et semi-dure: 2. Amines

LAVANCHY, P., SIEBER, R. *Schweiz.Milchw.Forschung* **22**, 65-68 (1993)

Le cours de la maturation de fromages de Sbrinz, Gruyère, Raclette valaisanne, d'Appenzell et de Tilsit du lait cru a été suivi systématiquement. Des échantillons ont été prélevés les différents jours suivant la fabrication des fromages et ont été soumis à des analyses des amines biogènes. Pendant la maturation, les fromages à pâte mi-dure, plus particulièrement, présentent une augmentation du taux en amines biogènes après le second mois.

Summary

Proteolysis of different hard and semi-hard cheeses: 2. Amines

LAVANCHY, P., SIEBER, R.: *Schweiz.Milchw.Forschung* **22**, 65-68 (1993)

The changes during the ripening of Sbrinz, Gruyère, Walliser Raclette, Appenzell and raw milk Tilsit cheeses were followed systematically. Samples were taken at different days and submitted besides other parameters to analyses of biogenic amines. During the ripening the concentration of biogenic amines were changed especially in semi-hard cheeses, especially after the second month.