

## Über die Benzoesäurebildung und -verteilung während der Herstellung und Reifung von geschmierten Käsen

Formation and Distribution of Benzoic Acid during Fabrication and Ripening of Smearred Cheese

R. Sieber, U. Bütikofer, E. Baumann und J. O. Bosset  
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern

### Einleitung

Benzoesäure ist ein natürlicher Bestandteil verschiedener Lebensmittel. Auch in Milchprodukten, vor allem in fermentierten, ist mit deren Vorkommen zu rechnen. Als erste haben *Nishimoto* et al. (1, 2) in den Jahren 1968 und 1969 darauf hingewiesen, dass die Benzoesäure einen natürlichen Bestandteil von fermentierten Milchprodukten darstellt (3). Gebildet wird diese Säure durch die Aktivität der Milchsäurebakterien aus der in der Milch vorhandenen Hippursäure. Aufgrund der in der Literatur vorhandenen Angaben können in Sauermilchprodukten Benzoesäurekonzentrationen von bis zu 50 mg/kg vorhanden sein (3). In geschmierten Käsen muss jedoch mit einem bis Faktor 10 erhöhten Gehalt an Benzoesäure in der Randzone gerechnet werden (4). Das Vorkommen dieser hohen Mengen kann nicht allein mit der Umwandlung der Hippur- in die Benzoesäure begründet werden. Es wurde deshalb als weiterer möglicher, natürlicher Stoffwechselweg der Abbau aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin vorgeschlagen (5).

Ziele dieser Arbeit waren es, mit Hilfe einer Stufenkontrolle eine vollständige und exakte Bilanz über das Verhalten der Hippur- und Benzoesäure während der Käsefabrikation und -reifung zu erstellen sowie ihre Verteilung zwischen Käseteig (Bruch) und Molke zu bestimmen. Mit bekannten Zugaben von Hippur- wie auch Benzoesäure in die Kessmilch sollte zudem die noch höchstmögliche Benzoesäurekonzentration im reifen Käse abgeschätzt werden. In letzterem wurde gleichzeitig der Gehalt an Hydrozimt- und Zimtsäure ermittelt. Diese Substanzen kommen als Stoffwechselzwischenprodukte bei der Bildung von Benzoesäure aus dem Phenylalanin in Frage (5).

## Experimenteller Teil

### Käseherstellung

Nach der üblichen Technologie wurde ein Halbhartkäse mit einem Gewicht von ca. 7 kg hergestellt.

Als Ausgangsprodukt wurde pasteurisierte Milch des Vortages verwendet, die in vier Varianten aufgeteilt wurde:

- A: Lagerung der Milch über Nacht zwischen 3 und 7 °C (langsame Erwärmung).
- B: wie A, aber nach einer Anreicherung mit Natriumbenzoat von 100 mg Benzoesäure/l Milch.
- C: Lagerung der Milch über Nacht bei Raumtemperatur nach einer Beimischung mit einer Rohmischkultur (RMK).
- D: wie C, aber nach einer Anreicherung mit Natriumhippurat von 100 mg Hippursäure/l Milch.

### Untersuchungsmethoden

Die Benzoesäure wurde mit einer bereits beschriebenen HPLC-Methode bestimmt, die für den Nachweis der Sorbinsäure entwickelt wurde (4, 6). Mit dieser Analysemethoden können gleichzeitig auch die Hippursäure wie auch die Hydrozimt- und Zimtsäure nachgewiesen werden. Ausserdem wurden die Massen von Milch, Bruch, Molke und Käse sowie deren Wasser- und Fettgehalt bestimmt, um die Bilanz herstellen zu können. Gleichzeitig wurde der pH-Wert gemessen.

Die Bestimmung der verschiedenen in Frage kommenden Messgrößen wurde bei den 7 folgenden Stufen des Herstellungs- und Reifungsverfahrens (Stufenkontrolle) ausgeführt:

- 1) in der Milch am Vortag,
- 2) in der Milch vor der Käsefabrikation,
- 3) in Kessmilch mit RMK und Lab,
- 4) in Bruch und Molke,
- 5) in Käse und Molke nach dem Pressen,
- 6) im Käse nach 1 Monat Reifung,
- 7) im Käse nach 3 Monaten Reifung.

### Resultate und Diskussion

Die in einem Vorversuch erhaltenen Resultate für die Varianten A und C sind in Abbildung 1, diejenigen des Hauptversuches in Tabelle 1 zusammengestellt. Im letzteren wurden im ein und drei Monate gereiften Käse noch zusätzlich die Hydrozimt- und die Zimtsäure im Zentrum, in der Rinde der beiden Flachseiten und der Järbseite bestimmt.

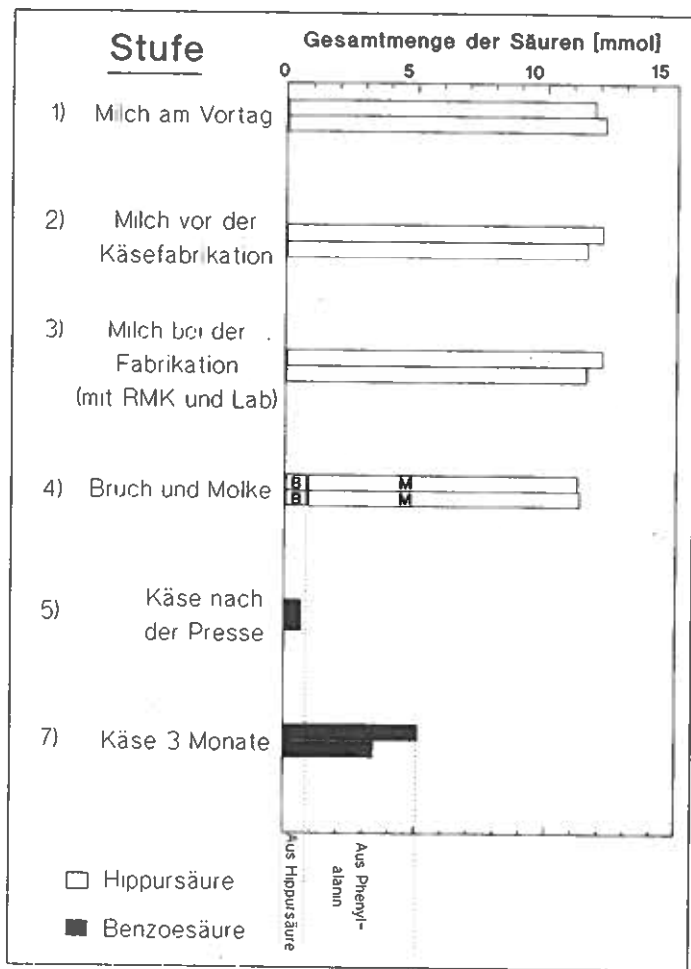


Abb. 1. Verhalten der Hippur- und Benzoessäure während der Käseherstellung und -reifung (Vorversuch)

Legende Der erste Balken entspricht der Variante A, der zweite der Variante C für die Beschreibung der Varianten siehe Legende der Tabelle 1

#### Verteilung der Hippur- und Benzoessäure zwischen dem Bruch und der Molke bei der Käseherstellung

Bis zum Käsepressen (Stufe 1 bis und mit 4) fand man praktisch keine Benzoessäure, wohl aber Hippursäure, deren Konzentration praktisch konstant blieb.

Tabelle 1. Verhalten der Stoffmengen (mmol) von Hippur- und Benzoessäure während der Käseherstellung und -reifung nach unterschiedlichen Bedingungen

Verarbeitungs-Reifungsstufe	Variante A <sup>1</sup>		Variante B <sup>1</sup>		Variante C <sup>1</sup>		Variante D <sup>1</sup>	
	Benzoës.	Bilanz <sup>2</sup>	Benzoës.	Bilanz <sup>2</sup>	Benzoës.	Bilanz <sup>2</sup>	Benzoës.	Bilanz <sup>2</sup>
Milch	0	6,7	63,9	70,7	0	7,1	0,3	50,1
Kessimilch (KM)	0	6,7	64,4	71,3	0	6,7	0,4	50,4
KM+Lab+RMK	0,6	7,4	62,4	69,0	0	6,7	0	50,4
Bruch/Molke	0/0,5	7,2	5,1/56,1	67,7	0/0	6,5	0/1,1	49,3
nach Presse:								
Käse/Molke	0,4/0	7,2	3,7/0,3	66,3	0,4/0	6,6	2,8/0,1	49,1
Käse 1 Mt. <sup>3</sup>	0,5	7,4	3,5	66,1	0,6	6,7	2,8	49,1
Käse 3 Mt. <sup>3</sup>	0,5	7,4	6,7	69,3	6,7	12,9	9,6	55,9

<sup>1</sup> Variante A: gelagert bei 3–7°C über Nacht  
Variante B: wie A, Anreicherung mit Natriumbenzoat von 0,82 mmol Benzoessäure/l Milch  
Variante C: gelagert bei Raumtemperatur über Nacht, nach Beimpfung mit einer Rohmischkultur  
Variante D: wie C, Anreicherung mit Natriumhippurat von 0,56 mmol Hippursäure/l Milch.

<sup>2</sup> Bilanz = Benzoessäure + Hippursäure.  
<sup>3</sup> In den Werten der Bilanz sind auch die Anteile der Molke nach der Bruchbereitung und nach dem Pressen enthalten.

Über die Verteilung der Benzoessäure bei der Käseherstellung haben einzig Chandan et al. (7) am Beispiel des Cottage cheese berichtet. Dabei stellten sie in der gesäuerten Magermilch wie auch im Bruch etwa die gleichen kleinen Konzentrationen an Benzoessäure fest. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten am Beispiel des vorliegenden Halbhartkäses die folgende Verteilung: 9% im Bruch und 91% in der Molke für die Benzoessäure sowie 7% im Bruch und 93% in der Molke für die noch verbleibende Hippursäure. Diese Zahlen geben an, dass der grösste Anteil der Hippursäure wegen ihrer relativen hohen Wasserlöslichkeit während der Käseherstellung mit der Molke eliminiert wird.

Gleich wie die Hippursäure verhielt sich auch die Benzoessäure beim Übergang aus der Milch in den Käse (Variante B). Wiederum gingen weniger als ein Zehntel der in die Milch zugegebenen Benzoessäuremenge in den Bruch über. Aber auch bei dieser Variante traten im Verlaufe der Käsereifung zunehmende Benzoessäuremengen auf, die ausserhalb der Bilanz liegen (Tabelle 1) (siehe auch Abschnitt Bildung von Benzoessäure aus der Umwandlung der Hippursäure bei der Käseherstellung).

#### Bildung von Benzoessäure aus der Umwandlung der Hippursäure bei der Käseherstellung

Nishimoto et al. (1, 2) haben aufgezeigt, dass die Milchsäurebakterien in der Lage sind, die in der Milch vorhandene Hippur- in Benzoessäure umzuwandeln.

Es wurde deshalb Milch bei niedrigen Temperaturen (Variante A = Kontrolle) wie auch nach der Beimpfung mit einer Rohmischkultur bei Raumtemperatur (Variante C) über Nacht gelagert und daraus Käse hergestellt.

Abbildung 1 wie Tabelle 1 bestätigen die *stöchiometrische* Umwandlung der Hippursäure. Zusätzlich konnte betreffend diesen Stoffwechsel kein Unterschied zwischen den beiden Varianten A und C festgestellt werden. Auch liess sich in beiden Fällen eine Benzoesäurebildung weder in der Ausgangsmilch noch in der Kessmilch noch im Bruch nachweisen. In Variante A enthielt jedoch bereits die mit Lab und Rohmischkultur versetzte Kessmilch geringe Mengen an Benzoesäure (Tabelle 1 für Variante A). In Variante C trat erst nach dem Pressen im Käse Benzoesäure auf. Bei dieser Stufe war in den Varianten A und C keine Hippursäure mehr vorhanden.

Um abzuklären, ob ein hohes Hippursäureangebot in der Milch die Milchsäurebakterien zu einer verstärkten Benzoesäurebildung veranlasste, wurde Milch neben einer Rohmischkultur noch mit Hippursäure versetzt und bei Raumtemperatur vorgereift (Variante D).

Dieses Vorgehen hatte nur eine geringe Benzoesäurebildung in der gelagerten Milch zur Folge. Erst im Käse nach dem Pressen erhöhte sich im Vergleich zu den ungesupplementierten Varianten A und C die Benzoesäuremenge. Der grösste Teil der Hippursäure ging in die Molke und weniger als ein Zehntel der vorhandenen (natürlichen oder zugesetzten) Hippursäure in den frischen Bruch über. Aber auch in dieser Variante wurden im reifen Käse erhöhte Benzoesäurekonzentrationen festgestellt, die nicht auf den Hippursäurezusatz zurückgeführt werden können (Tabelle 1) (siehe nächsten Abschnitt).

#### Bildung von Benzoesäure aus dem Abbau von Phenylalanin

Im Verlaufe der Käsereifung (1 und 3 Monate) musste eine zusätzliche Benzoesäurebildung festgestellt werden. Nachdem bereits im Käse nach der Presse praktisch keine Hippursäure mehr (*stöchiometrische Umwandlung*) vorhanden war, wurden in Variante C in drei Monate altem Käse signifikant erhöhte Benzoesäurekonzentrationen gefunden, was sich auch in einer unausgeglichenen Bilanz zeigte (Tabelle 1). In Variante A stieg der Benzoesäuregehalt im Zentrum der Käse zwar nicht an, wohl aber in der Rinde der Flachseiten und in geringerem Umfange auch in derjenigen der Järbseite (Tabelle 2). Damit wurde die im Vorversuch gemachte Beobachtung einer erhöhten Benzoesäurekonzentration in der Rinde bestätigt.

Hydrozimt- wie auch Zimtsäure sind als Stoffwechselzwischenprodukte beim Phenylalaninabbau anzusehen (5). Bei allen Varianten liess sich vor allem in der Rinde der beiden Flachseiten und Järbseite von ein wie auch drei Monate altem Käse eine Hydrozimtsäurekonzentration nachweisen, die etwa der Benzoesäurekonzentration vergleichbar war. Im Zentrum von drei Monate altem Käse war sie in Variante A höher, in den drei anderen Varianten tiefer. Die Zimtsäure konnte praktisch nur in der Rinde der Flachseiten in geringeren Mengen festgestellt wer-

den (Tabelle 2). Diese Angaben unterstützen den in einer anderen Arbeit gemachten Vorschlag des Phenylalaninabbaus als weitere Quelle der Benzoesäure bei geschmierten Käsen (5).

Tabelle 2. Vorkommen von Benzoe-, Hydrozimt- und Zimtsäure in 1 und 3 Monate gereiftem Käse nach unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der Kessmilch und nach Zugabe von Hippur- und Benzoesäure (mg/kg)

Variante	Käse 1 Monat			Käse 3 Monate		
	Zentrum	Rinde Flachseite	Rinde Järbseite	Zentrum	Rinde Flachseite	Rinde Järbseite
<i>A</i>						
Benzoesäure	9	39	10	9	126	39
Hydrozimtsäure	nn	54	45	41	202	53
Zimtsäure	nn	7	nn	nn	12	nn
<i>B</i>						
Benzoesäure	62	160	41	119	172	62
Hydrozimtsäure	nn	122	13	29	226	48
Zimtsäure	nn	7	nn	nn	13	nn
<i>C</i>						
Benzoesäure	10	144	18	114	212	55
Hydrozimtsäure	nn	97	10	41	323	46
Zimtsäure	nn	28	nn	nn	20	nn
<i>D</i>						
Benzoesäure	46	133	44	159	247	99
Hydrozimtsäure	nn	95	8	69	292	54
Zimtsäure	nn	8	nn	nn	19	nn

nn = nicht nachweisbar

Varianten A-D siehe Legende in Tabelle 1.

#### Schlussfolgerung

Benzoesäure wurde weder während der Lagerung der Milch bei tiefen Temperaturen (Variante A) noch bei einer solchen unter Zusatz einer Rohmischkultur bei Raumtemperatur (Variante C) gebildet. Erst nach dem Pressen konnte im Käse wie auch in der Molke diese Säure festgestellt werden. An dieser Tatsache änderte auch ein Hippursäurezusatz zur Milch vor der Lagerung bei Raumtemperatur nichts (Variante D). Angesichts der Tatsache, dass in den ersten paar Stunden der Käsefabrikation vor allem die Streptokokken im Kessi sich vermehren und erst in einer späteren Phase, während dem Pressen, die Laktobazillen (8), muss scheinbar die Umwandlung der Hippursäure eher den Laktobazillen als den Streptokokken zugeschrieben werden.

Die durch die stöchiometrische Umwandlung der Hippursäure entstandene Benzoessäure vermag noch nicht Bakterien zu hemmen, da die minimale hemmende Konzentration für Mikrokokken und *E. coli* über 50 mg/kg und bei den übrigen Bakterien über 200 mg/kg liegt. Bei Schimmel und Hefen liegt dieser Schwellenwert bei 20 mg/kg (9). Die im Verlaufe der Käsureifung natürlich gebildete Benzoessäure liegt jedoch in höheren Konzentrationen vor und könnte deshalb auf der Rinde als natürliches Schutzmittel gegen Hefen und Schimmel wirksam werden (5).

In geschmierten Käsen wurden hohe Benzoessäurekonzentrationen gefunden, höher in der Randzone als im Zentrum, wie bereits in einer vorangegangenen Arbeit berichtet wurde (4, 5). Diese Beobachtung wurde an aus dem Handel bezogenen, geschmierten Käsen gemacht und hat sich durch die hier vorgestellten Resultate bestätigt. Solche hohen Benzoessäurekonzentrationen lassen sich nicht mehr aus der Umwandlung der Hippur- in die Benzoessäure erklären. Die festgestellten Mengen an Hydrozimt- und Zimtsäure unterstützen die bereits für geschmierte Käse vorgeschlagene Entstehung aus dem Phenylalanin (5). Welche Mikroorganismen für diesen Stoffwechsel verantwortlich sind, sollte in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

#### Dank

Für die Herstellung der Käse bzw. die Durchführung der Analysen danken wir den Mitarbeitern der Sektionen Käsetechnologie und Chemie.

#### Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Übergang der Hippursäure von der Milch in den Käse sowie mit der Bildung der Benzoessäure während der Käsefabrikation und -reifung bei geschmierten Käsen. Eine Lagerung der Milch vom Vortag bei niedrigen Temperaturen (Lagerung während der Nacht bei 3–7 °C) wie auch bei Raumtemperatur, auch unter Beimpfung mit einer Rohmischkultur, bewirkte noch keine Bildung der Benzoessäure. Bei der Käseherstellung entsteht aus der in der Milch natürlich vorhandenen wie auch aus künstlich zugegebener Hippursäure erst während dem Pressen die Benzoessäure. Der Übergang der Hippursäure sowie der in die Milch zugegebenen Benzoessäure in den Bruch beträgt weniger als 10%, der Rest wird mit der Molke eliminiert. Im Verlaufe der Käsureifung steigt die Konzentration an Benzoessäure im Käse an, die aus dem Phenylalanin als weiterer Quelle herkommt. Diese sekundäre Bildung ist vor allem in der Rinde ausgeprägt. Durch Diffusion kann die entstandene Benzoessäure auch ins Zentrum der Käse gelangen.

#### Résumé

Le présent travail étudie le transfert de l'acide hippurique dans le fromage, de même que la formation de l'acide benzoïque entre le caillé et le petit-lait lors de la fabrication et pendant l'affinage du fromage à croûte emmorgée. Quelles que soient les conditions tes-

tées pour le stockage du lait de la veille (entreposage pendant une nuit à 3–7 °C ou à température ambiante, même après inoculation avec une culture mixte brute), aucune conversion de l'acide hippurique en acide benzoïque n'a été observée. Cette dernière, pratiquement stoechiométrique, n'a lieu que dans le fromage frais pendant l'étape de pressage. Une étude de la répartition des acides hippurique et benzoïque (ajoutés au lait) entre le caillé et le petit-lait révèle que moins de 10% de ces acides passe dans le caillé. Le reste est éliminé avec le petit-lait. La teneur en acide benzoïque des fromages à croûte emmorgée s'accroît ensuite pendant l'affinage par suite de la dégradation de la phénylalanine, surtout dans la zone extérieure. On peut observer néanmoins une augmentation de la teneur en acide benzoïque jusqu'au coeur de la meule par suite de la diffusion de ce composé vers l'intérieur.

#### Summary

This paper deals with the carry-over of hippuric acid to cheese and the formation and distribution of benzoic acid during manufacture and ripening of smeared cheese. Storage of milk delivered the previous day did not lead to the production of benzoic acid, in spite of different storage conditions applied (low temperatures of 3 to 7 °C, ambient temperature, inoculation of a raw mixed culture). Hippuric acid is transformed into benzoic acid during pressing of the young cheese. Less than 10% of the hippuric acid and benzoic acid naturally present in milk or added pass over to the curd. The rest is eliminated with whey. During ripening of smeared cheese, an additional quantity of benzoic acid originates from phenylalanine degradation. This other metabolic pathway only exists in the rind, but part of the resulting benzoic acid can diffuse to the center of the cheese loaf.

#### Literatur

1. Nishimoto, T., Uyeta, M., Tawe, S. and Takebayashi, I.: [Bacterial formation of benzoic acid in milk]. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 9, 58–59 (1968).
2. Nishimoto, T., Uyeta, M. and Tawe, S.: [Precursor of benzoic acid in fermented milk]. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 10, 410–413 (1969).
3. Sieber, R., Bütikofer, U., Bosset, J. O. und Rüegg, M.: Benzoessäure als natürlicher Bestandteil von Lebensmitteln – eine Übersicht. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 80, 345–362 (1989).
4. Sieber, R., Bütikofer, U., Baumann, E. und Bosset, J. O.: Über das Vorkommen der Benzoessäure in Sauermilchprodukten und Käse. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 484–493 (1990).
5. Bosset, J. O., Bütikofer, U. und Sieber, R.: Phenylalaninabbau – ein weiterer Weg zur natürlichen Bildung der Benzoessäure in geschmierten Käsen. *Schweiz. Milchwirt. Forsch.* 19, 46–50 (1990).
6. Bütikofer, U., Baumann, E. und Bosset, J. O.: Eine verbesserte HPLC-Methode zur Bestimmung von Sorbinsäure in Milchprodukten unter spezieller Berücksichtigung von Artefakten. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 79, 392–405 (1988).
7. Chandan, R. R., Gordon, J. F. and Morrison, A.: Natural benzoate content of dairy products. *Milchwissenschaft* 32, 534–537 (1977).
8. Steffen, C.: Konzentration und Konfiguration der Milchsäure im reifenden Emmentalerkäse. Dissertation Nr. 4630, Eidg. Techn. Hochschule Zürich (1971).

9. *Chiple, J. R.*: Sodium benzoate und benzoic acid. In: Branen, A. L., Davidson, P. M., Antimicrobials in foods, p. 11-35. M. Dekker, New York-Basel 1983.

Dr. R. Sieber

U. Bütikofer

E. Baumann

Dr. J. O. Bosset

Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft

CH-3097 Liebefeld-Bern