

November 1990/211 PW

Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld

Phenylalaninabbau - ein weiterer Weg Weg natürlicher Bildung von Benzoe- säure in geschmierten Käsen

J.O. Bosset, U. Bütikofer und R. Sieber

Schweiz. Milchw. Forschung 19, (3), 46-50 (1990)

Auf der Oberfläche wie auch im Innern von geschmierten Käsen konnten relativ hohe Benzoesäuregehalte beobachtet werden. Gleichzeitig wurde in der Rinde der Järbseite von Käsen, in denen auf der oberen und unteren Flachseite geringe Benzoesäurekonzentrationen vorhanden waren, hohe Gehalte an Benzoesäure gefunden. Die vorliegende Arbeit schlägt als möglichen natürlichen Stoffwechselweg den bereits bekannten Abbau des Phenylalanins über die β -Phenylpropionsäure und die Zimtsäure zu Benzoesäure vor. Acetophenon stellt ein sekundäres Produkt dieses Abbauweges dar. Dieser Abbau erfolgt ausschliesslich in der Schmiere und würde das Vorkommen der Benzoesäure in solchen Käsetypen erklären. Das Vorhandensein der Intermediärprodukte, der Konzentrationsgradient dieser Produkte, einschliesslich der Benzoesäure, deren Entwicklung im Verlaufe der Käserreifung wie auch die gleichzeitige Bildung von Ammoniak als Folge einer Desaminierung sind Beweise für die Existenz dieses Stoffwechselweges. Dieser besteht zusätzlich zur bereits beschriebenen Umwandlung der Hippursäure in Benzoesäure. Die Festlegung eines Toleranzwertes ist deshalb im Falle der geschmierten Käse nicht zulässig.

1. Einleitung

Benzoesäure stellt einen natürlichen Bestandteil von fermentierten Milchprodukten dar. In der Milch ist als deren Vorläufer die Hippursäure vorhanden, die unter der Wirkung der Milchsäurebakterien in Benzoesäure und Glyzin gespalten wird (1). Es ist davon auszugehen, dass auch die im reifen Käse gefundene Benzoesäure aus der Hippursäure gebildet wird. Bei Untersuchungen von in der Schweiz produzierten Käsen wurden jedoch bei verschiedenen Proben, aber nur in solchen von geschmierten Käsen, unerwarteterweise relativ hohe Konzentrationen an Benzoesäure gefunden, deren Vorhandensein nicht ohne weiteres erklärt werden konnte und die den von Obentraut et al. (2) angeregten Maximalwert von 40mg/kg für fermentierte Milchprodukte überschritten (3). In dieser Untersuchung wurden auch verschiedene, bei der Käsefabrikation verwendete Hilfsstoffe wie Käse-

abdeckmittel, Rindenfarbe u. a. auf ihren Gehalt an Benzoesäure untersucht (3). Da die Benzoesäure das Wachstum von Bakterien, Hefen und Pilzen hemmen kann (4), könnte sie in diesen Produkten aus prophylaktischen Gründen zur Anwendung gelangt sein. In diesen verschiedenen Hilfsstoffen wurde jedoch keine Benzoesäure festgestellt. Einzig das für die Käseherstellung zugelassene Lab (5) kann hohe Mengen an Benzoesäure enthalten (bis 5 g/kg). Aber die vom Lab in den Käse übergegangenen Mengen reichen jedoch für eine Erklärung der gefundenen Konzentrationen nicht aus. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine Erklärung für die in geschmierten Käsen nachgewiesenen hohen Benzoesäurekonzentrationen zu finden.

2. Experimenteller Teil

In den verschiedenen Zonen einer Vacherin fribourgeois-Probe wurde der Gehalt an Benzoe- und Hydrozimtsäure bestimmt. Dabei wurde die äussere Schicht von 1 cm («Randzone inkl. Rinde und eventuell Schmiere»), sodann eine innere Schicht von 2 cm («Zentrum») sowie die Rinde der Järbseite zur Bestimmung her-

beigezogen (Abbildung 1). Von den Vacherin fribourgeois-Käsen, die in einer ersten Überprüfung zum Teil hohe Benzoesäuregehalte aufwiesen, wurden nach zwei Monaten erneut Proben erhoben und auf Benzoesäure untersucht.

Die Benzoesäure wurde mit einer bereits beschriebenen HPLC-Methode bestimmt, die vor allem für den Nachweis der Sorbinsäure ausgearbeitet wurde (6). Die HPLC-Bestimmung der Zimt- und Hydrozimtsäure wurde isokratisch mit einem Methanolzusatz von 10% im Vergleich zum erwähnten Eluenten (6) durchgeführt. Die Detektion der Hydrozimtsäure erfolgte bei 206 nm, diejenige der Zimt- und Benzoesäure bei 227 nm. Das Analysengerät ist in der vorhergehenden Arbeit beschrieben (3).

3. Resultate und Diskussion

Die Zonen der untersuchten Vacherin fribourgeois-Probe enthielten unterschiedliche Benzoesäuregehalte (Abbildung 1). Dabei fiel vor allem der hohe Gehalt in der Rinde der Järbseite auf, welcher schon von Marchon und Deillon festgestellt wurde (7). Auffallend ist auch die hohe Konzentration an Hydrozimtsäure in der Rinde

Tabelle 1 Gehalt an Benzoesäure (Bs) und Hydrozimtsäure (Hs) in Vacherin fribourgeois (mg/kg)

Fabrikant	1. Untersuchung		2. Untersuchung			
	Zentrum Bs	Rinde Bs	Zentrum Bs	Rinde Bs	Järbseite Bs	Hs
A	61	161	—	—	—	—
B	89/41 ^a	204/45 ^a	131	359	229	168
C	22	0	137	366	454	313
D	16	26	5	7	3	nn
E	57	200	13	17	8	nn
F	45	94	12	11	22	nn
G	—	—	5	7	15	nn
H	72/115 ^a	272/205 ^a	35	118	123	114
I	29	143	16	140	140	484
K	61	304	7	21	43	nn

^a je zwei verschiedene Proben innerhalb von drei Wochen
nn = nicht nachweisbar

Tabelle 2 Theoretisch mögliche, bei vollständiger Umsetzung von Phenylalanin (Phe) erhaltene Benzoesäure (Bs) in Greyerzer, Appenzeller und Rohmilchtilsiter (mg/kg)

	Phe-frei ^a → Bs		Phe-Total ^a → Bs	
	Greyerzer	Appenzeller	Tilsiter	
Greyerzer	2 830	2 090	14 200	10 500
Appenzeller	2 437	1 800	13 100	9 680
Tilsiter	1 825	1 350	13 600	10 050

^a aus (20)

der Järbseite. In weiteren Proben von Vacherin fribourgeois, die in einer ersten Untersuchung zum Teil hohe Benzoesäurekonzentrationen aufwiesen (in einem Einzelfall über 600, in mehreren Fällen bis 300 mg/kg) (3), konnte ebenfalls in der Rinde der Järbseite in bezug auf Benzoe- und Hydrozimtsäure das gleiche beobachtet werden, obwohl in der Rinde der oberen und unteren Flachseite die Gehalte normal waren (Tabelle 1).

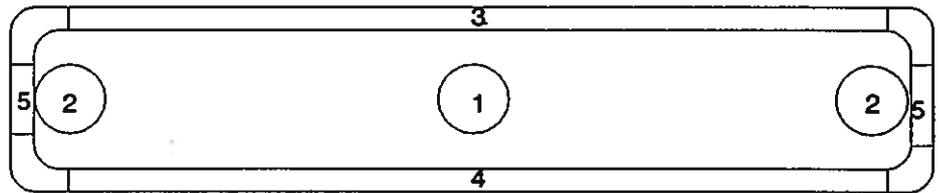
Die Rinde der Järbseite ist als einzige Zone des Käses dauernd aeroben Bedingungen ausgesetzt. Solche Bedingungen sind für die Bildung der Benzoesäure notwendig. Die geringeren Konzentrationen auf den oberen und unteren Flachseiten können folgendermassen erklärt werden. Diese Seiten ruhen abwechselungsweise auf den Brettern und sind dadurch nur in der Hälfte der Zeit aeroben Bedingungen ausgesetzt. Zudem werden diese Flächen periodisch gewaschen und sind damit einem mechanischen Abreiben unterworfen, das intensiver auf den ebenen Flächen als auf der gewölbten Järbseite erfolgt. Im weiteren ist in den Kellern dieser Käse ein starker Ammoniakgeruch feststellbar.

Eine theoretische Berechnung, die von der stöchiometrischen Umsetzung der gesamten in der Milch vorhandenen Hippursäure (Wolfschoon-Pombo und Klostermeyer (8) fanden in der Abendmilch maximal 62,4 mg/kg) in Benzoesäure ausgeht, erlaubt in keinem Falle, die in den äusseren Zonen dieser Käse festgestellten hohen Benzoesäuremengen zu erklären. Es muss deshalb die Existenz eines anderen natürlichen Stoffwechselweges postuliert werden.

Bereits Teuber (9) hat in seinem Handbuch «Grundriss der praktischen Mikrobiologie für das Molkereifach» darauf hingewiesen, dass in Harzerkäse durch Fermentation der aromatischen Aminosäuren bis zu 200 mg/kg Benzoesäure entstehen können. Kurisaki et al. (10) haben bei mit Hefen gereiften Käsen gezeigt, dass aus Phenylalanin, nicht aber aus Tyrosin, Benzoesäure entstehen kann. Gemäss der gemessenen Radioaktivität des Phenylalanins im Bruch und derjenigen der Benzoesäure im reifen Käse lag jedoch die Ausbeute der Umwandlung unter 1%.

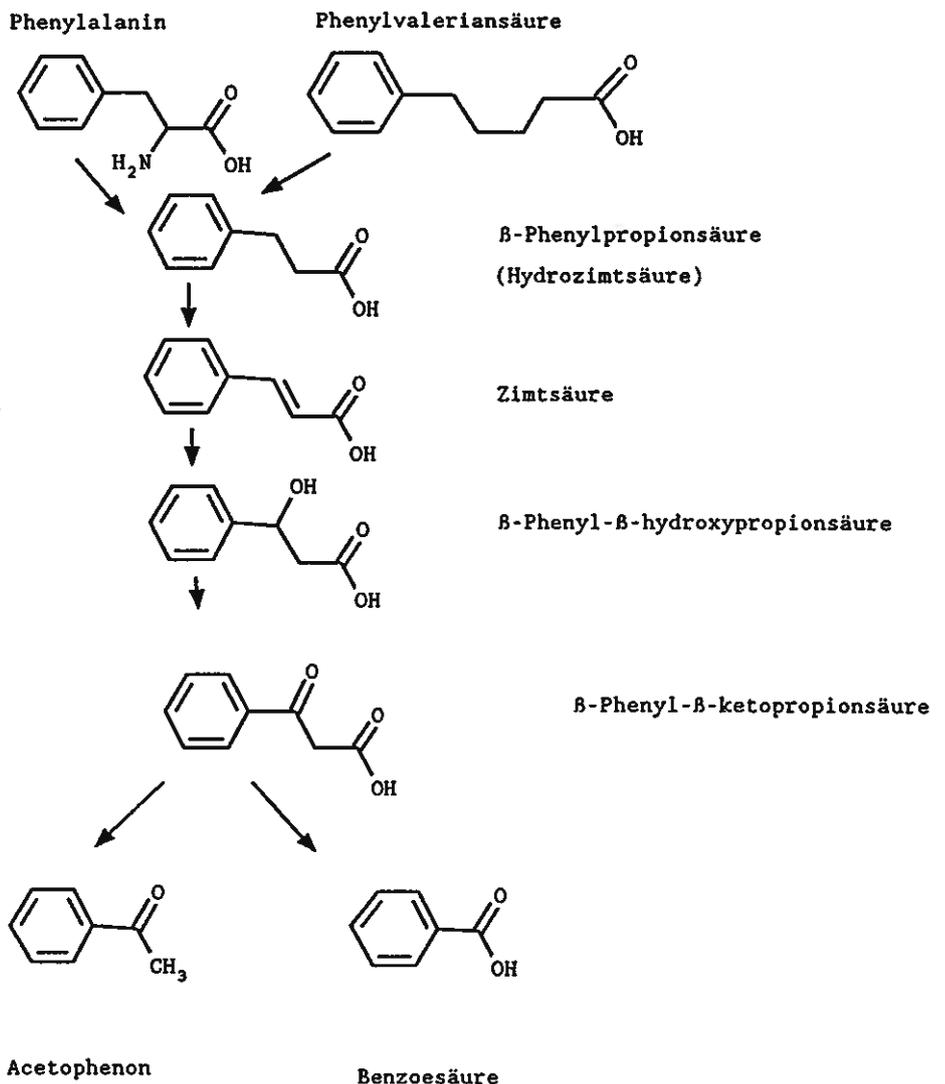
Leuthardt (11) schlägt einen Stoffwechselweg vor, der die Bildung der Benzoesäure aus Phenylalanin wie auch die gleichzeitige Bildung von Acetophenon (12,13) und Ammoniak (14), die in geschmierten Greyzerkäsen bereits nachgewiesen wurden, erklären könnte. Nach Dakin entstehen aus der Phenylvaleriansäure Acetophenon und Benzoesäure (11). Phenylalanin gelangt über die Desaminierung zu β -Phenylpropionsäure in

Abbildung 1 Untersuchung von 5 verschiedenen Zonen eines Vacherin fribourgeois auf Benzoe- und Hydrozimtsäure



Probe	Benzoesäure	Hydrozimtsäure
1 Zentrum	8 mg/kg	0 mg/kg
2 Zentrum Järbseite	9	25
3 obere Flachseite	10	24
4 untere Flachseite	24	33
5 Rinde Järbseite	81	230

Abbildung 2 Abbau des Phenylalanins zu Acetophenon und Benzoesäure (nach 11)



diesen Abbauweg, der in Abbildung 2 dargestellt ist.

Moore et al. (15) haben den Abbau von Phenylalanin durch *Sporobolomyces roseus* nachgewiesen. Nach Uchiyama et al. (16) wandelt *Rhodotorula rubra*

Phenylalanin und Zimtsäure in Benzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure um, während Phenylessigsäure durch *Penicillium chrysogenum* über einen anderen Weg zu Benzoesäure abgebaut werden kann (17). In Münster und Livarotkäsen

haben Kuzdzal Savoie et al. (18) mit Hilfe der GC/MS β -Phenylpropionsäure (=Hydrozimtsäure), Phenylelessigsäure und Benzoesäure identifiziert.

Bosset und Liardon (12,13,19) haben in eingehenden Untersuchungen zum Vorkommen von Aromastoffen in reifen Greyerzerkäsen mehrere der in Abbildung 2 erwähnten Stoffwechselprodukte nachgewiesen. Die folgenden Zwischenprodukte wurden identifiziert und teils quantitativ mit Hilfe der HPLC oder halbquantitativ mit Hilfe der GC/MS bestimmt:

- das Phenylalanin mit Ionenaustauschchromatographie (20),
- die β -Phenylpropionsäure mit HPLC (Tabelle 1) und GC/MS (19) wie auch deren Methylester GC/MS (12),
- die Zimtsäure in Spuren mit HPLC (Tabelle 1),
- das Acetophenon mit GC/MS (12,13) und
- die Benzoesäure mit HPLC (Tabelle 1) sowie GC/MS (19).

Diese Stoffwechselprodukte wurden fast nur in der Randzone inklusive Schmiere und Rinde gefunden (12,13,19). Ihre Konzentration nimmt mit der Reifungszeit stark zu (13,19), und gleichzeitig ist eine intensive Ammoniakabgabe in den Kellern festzustellen (14). Die relativ niedrigen, aber in absoluten Werten doch bedeutenden Mengen, die im Innern dieser Käselai-be gemessen wurden, können durch die Diffusion der Benzoesäure aus der Rinde erklärt werden. Ein solcher Konzentrationsgradient wurde auch bei zahlreichen anderen, durch die Schmiere gebildeten, polaren Verbindungen wie Pyrazine, Aldehyde und Methylketone beobachtet (12,13).

Ein weiterer Umstand, der die hier vorgestellte Vermutung bestätigen kann, ist die folgende Beobachtung. Greyerzerlaibe, die zur Bestimmung der CO₂-Abgabe in einem dichten Behälter bei einer aeroben Atmosphäre und einem hohen Feuchtigkeitsgrad – d.h. in sehr ungünstigen Bedingungen – aufbewahrt und nicht gepflegt wurden, wiesen im Gegensatz zu Emmentalerkäse, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen gehalten wurden (21), praktisch keine Tendenz zur Schimmelbildung auf der Rinde auf (14). Dies lässt sich damit erklären, dass aus dem Phenylalanin genügend Benzoesäure gebildet wurde, das auf Hefen hemmend wirkte. Es ist bekannt, dass diese Säure allgemein das Wachstum von Bakterien, Hefen und Pilzen hemmen kann (4).

Freies Phenylalanin wie auch andere Aminosäuren sind in den verschiedenen reifen Käse in unterschiedlichen Mengen vorhanden (20). Unter der Annahme, dass das im Käse vorhandene Phenylalanin vollständig in Benzoesäure umgesetzt

wird, ergeben sich die in Tabelle 2 errechneten Benzoesäuremengen. Möglicherweise ist infolge des intensiven Protein- und Peptidabbaues durch die Schmiere die Konzentration dieser Aminosäure am Rand und in der Rinde noch höher als im Innern des Käselaihs.

In Käse wurde von Kiermeier und Jarczynski (22) p-Hydroxybenzoesäure in kleinen Mengen nachgewiesen, die ähnlich wie bei der Benzoesäurebildung aus der entsprechenden Aminosäure Tyrosin entstanden sein kann.

4. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit lässt den Schluss zu, dass Benzoesäure in geschmierten Käsen über den Abbau von Phenylalanin gebildet werden kann. Die unterschiedlichen Mengen an Benzoesäure auf der Rinde der oberen und unteren Flachseiten sowie der Järbseite können durch zahlreiche, schwer kontrollierbare Faktoren wie Zusammensetzung der Schmiereflora, Häufigkeit und Art der Käsepflege, Klima des Lagerkellers (Temperatur, Feuchtigkeit) beeinflusst werden. In weiteren ausführlichen Untersuchungen müsste abgeklärt werden, welche Mikroorganismen für die Bildung der Benzoesäure aus dem Phenylalanin verantwortlich zu machen sind. Als Konsequenz dieser Arbeit geht jedoch eindeutig hervor, dass es nicht gerechtfertigt ist, einen Toleranzwert für geschmierte Käse festzulegen (2). Neben ihrer Wirkung als Aromabildner (12,13,19) spielt die Schmiere eine bedeutende Rolle in der Konservierung der Käselai-be, indem sie auf der Käseoberfläche in Form der Benzoesäure ein natürliches Konservierungsmittel bildet. Was die Konservierung dieses Nahrungsmittels betrifft, hat die traditionelle Fabrikation der geschmierten Käse dank der Beobachtung und der Empirie der Käser die Entwicklung der Wissenschaft und die neuesten Erkenntnisse vorweggenommen.

Dank

Die Autoren danken den Herren Dr. P. Marchon und F. Deillon, Crema SA, Fribourg, für den Hinweis eines hohen Benzoesäuregehaltes in der Järbseite von Vacherin fribourgeois. Ebenso sind sie Herrn A. Overney, Vacherin fribourgeois SA, Bulle, für die zur Verfügung gestellten Käse zu Dank verpflichtet.

5. Literaturverzeichnis

- 1 SIEBER, R., BÜTIKOFER, U., BOSSET, J.O., RÜEGG, M.: Benzoesäure als natürlicher

Bestandteil von Lebensmitteln – eine Übersicht. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 80, 345–362 (1989)

- 2 OBENTRAUT, S., BINDER, E., BRANDL, E.: Benzoesäure in fermentierten Milchprodukten. Wien. tierärztl. Mschr. 70, 276–282 (1983)
- 3 SIEBER, R., BÜTIKOFER, U., BAUMANN, E., BOSSET, J.O.: Über das Vorkommen der Benzoesäure in Joghurt und Käse. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 81, 484–493 (1990)
- 4 CHIPLEY, J.R.: Sodium benzoate and benzoic acid. in BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M.: Antimicrobials in foods. M. Dekker, New York, Basel, 11–35 (1983)
- 5 Verordnung über die in den Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe (Zusatzstoffverordnung) vom 20. Januar 1982 (SR 817.521)
- 6 BÜTIKOFER, U., BAUMANN, E., BOSSET, J.O.: Eine verbesserte HPLC-Methode zur Bestimmung der Sorbinsäure in Milchprodukten unter spezieller Berücksichtigung von Artefakten. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 79, 392–405 (1988)
- 7 MARCHON, P., DEILLON, F.: persönliche Mitteilung (1990)
- 8 WOLFSCHOON-POMBO, A., KLOSTERMEYER, H.: Vorkommen und Bestimmung von Hippursäure in der NPN-Fraktion der Milch. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 172, 269–271 (1981)
- 9 TEUBER, M.: Grundriss der praktischen Mikrobiologie für das Molkereifach. Molkereitechnik 59/60, 124 (1987)
- 10 KURISAKI, J., SASAGO, K., TSUGO, T., YAMAUCHI, K.: (Formation of benzoic acid in cheese). J. Food Hyg. Soc. Japan 14, 25–30 (1973)
- 11 LEUTHARDT, F.: Intermediärstoffwechsel. W. de Gruyter, Berlin, New York, 505 und 657 (1977)
- 12 BOSSET, J.O., LIARDON, R.: The aroma composition of Swiss Gruyère cheese: II. The neutral volatile components. Lebensm.-Wiss. u. -Technol. 17, 359–362 (1984)
- 13 BOSSET, J.O., LIARDON, R.: The aroma composition of Swiss Gruyère cheese: III. Relative changes in the content of alkaline and neutral components during ripening. Lebensm.-Wiss. u. -Technol. 18, 178–185 (1985)
- 14 BLANC, B., BOSSET, J.O., MARTIN, B., JIMENO, J.: Echanges gazeux à la surface du fromage de gruyère en cours de maturation. Schweiz. milchw. Forschung 12, 30–34 (1983)
- 15 MOORE, K., SUBBA RAO, P.V., TOWERS, G.H.N.: Degradation of

- phenylalanine and tyrosine by *Sporobolomyces roseus*. *Biochem. J.* **106**, 507-514 (1968)
- 16 UCHIYAMA, K., KAWAGUCHI, K., TOCHIKURA, T., OGATA, K.: Metabolism of aromatic acids in microorganisms. Part III. Metabolism of cinnamic acid in *Rhodotorula*. *Agr. Biol. Chem.* **33**, 755-763 (1969)
- 17 HOCKENHULL, D.J.D., WALKER, A.D., WILKIN, A.D., WINDER, F.G.: Oxidation of phenylacetic acid by *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* **50**, 605-609 (1952)
- 18 KUZDZAL SAVOIE, S., KUZDZAL, W., LOSI, G., GOTO, K.: Riconoscimento degli acidi benzoico, fenilacetico (α -toluico) e fenil-propionico (idrocinnamico) presenti negli acidi grassi liberi del Munster e del Livarot. *Sci. Tecnol. Alim.* **3**, 229-233 (1973)
- 19 BOSSET, J.O., LIARDON, R.: The aroma composition of Swiss Gruyère cheese: IV. The acidic volatile components and their changes in content during ripening. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* (in preparation)
- 20 LAVANCHY, P., BÜHLMANN, C.: Valeurs normales de certains paramètres importants du métabolisme pour des fromages fabriqués en Suisse. *Schweiz. milchw. Forschung* **12**, 3-12 (1983)
- 21 FLÜCKIGER, E.: persönliche Mitteilung (1983)
- 22 KIERMEIER, F., JARCZYNSKI, R.: Über die quantitative Bestimmung von p-Hydroxybenzoesäure in Käse. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **113**, 370-374 (1960)

Résumé

J.O. BOSSET, U. BÜTIKOFER et R. SIEBER:

La dégradation de la phénylalanine: une autre voie métabolique de formation de l'acide benzoïque dans les fromages à morge

Schweiz. Milchw. Forschung **19** (3), 46-50 (1990)

On a fréquemment mesuré des teneurs relativement élevées en acide benzoïque tant à la surface qu'à l'intérieur de meules de fromage à morge. On a même trouvé des teneurs élevées en acide benzoïque dans le talon de meules relativement pauvres en ce composé dans leurs faces planes. Le présent travail propose une voie métabolique permettant d'expliquer la présence, entièrement naturelle, d'acide benzoïque sur et dans ce type de fromage: la dégradation de la phénylalanine, en passant par l'acide β -phénylpropionique et l'acide cinnamique, l'acétophénone étant un produit secondaire de ladite dégradation. Cette dernière est due exclusivement et spécifiquement à la morge. La mise en évidence des produits intermédiaires de la réaction, de leurs gradients de concentration - y compris pour l'acide benzoïque -, leur évolution au cours de l'affinage des meules ainsi que la production simultanée d'ammoniac par suite d'une désamination sont autant de preuves de l'existence de cette voie métabolique. Celle-ci est complémentaire à la transformation, déjà décrite, de l'acide hippurique du lait en acide benzoïque. Dans un tel contexte, l'établissement d'un seuil de tolérance n'est pas acceptable en ce qui concerne les fromages à morge.

Summary

J.O. BOSSET, U. BÜTIKOFER and R. SIEBER:

Phenylalanine breakdown - another pathway of natural production of benzoic acid in smeared cheese

Schweiz. Milchw. Forschung **19** (3), 46-50 (1990)

Rather high benzoic acid contents have been measured on the surface of and inside of smeared cheese. At the same time, high benzoic acid contents were found in the rind of the hoop side of cheese loaves which showed low concentrations on the bottom and upper side. The present paper suggests a natural metabolic pathway which explains the occurrence of benzoic acid inside and outside these cheese types, i.e. phenylalanine breakdown with β -phenylpropionic acid and cinnamic acid as intermediate products. Acetophenone is a secondary product of this breakdown, which only takes place in the smear. The presence of intermediate products, their concentration gradients and that of benzoic acid, the changes in benzoic acid content during cheese ripening as well as simultaneous ammonia production resulting from deamination, prove that this metabolic pathway actually exists. It occurs additionally to transformation of hippuric acid into benzoic acid. A limit is therefore not acceptable for smeared cheese.