



Oktober 1990/207 W

Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld

Ueber das Vorkommen der Benzoesäure in Sauermilchprodukten und Käse

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 81, 484-493 (1990)

Einleitung

Verschiedene Autoren, darunter in den Jahren 1968 und 1969 als erste *Nishimoto et al.* (1, 2), haben darauf hingewiesen, dass die Benzoesäure einen natürlichen Bestandteil von fermentierten Milchprodukten darstellt (3). In der Milch ist als Vorläufer die Hippursäure vorhanden, die unter der Wirkung der Milchsäurebakterien in Benzoesäure und Glyzin gespalten wird. Da in der Schweiz nach den Vorschriften der Zusatzstoffverordnung (4) die Benzoesäure als Konservierungsmittel in keinem Milchprodukt erlaubt ist, stellt deren Vorhandensein in diesen Lebensmitteln die amtliche Lebensmittelkontrolle vor gewisse Probleme. Das Bundesamt für Gesundheitswesen hat deshalb provisorisch einen Toleranzwert von 50 mg/kg Benzoesäure festgelegt (5). Das Verschleppen der Benzoesäure aus unbehandelten Früchten bei der Herstellung von Fruchtjoghurts und aus dem Lab bei der Käseherstellung wird toleriert (4). Die Verwendung von Benzoesäure könnte jedoch wegen deren hemmenden oder inaktivierenden Wirkung gegenüber Bakterien, Hefen und Pilzen verlockend sein (6).

Ziel dieser Arbeit war es, eine Übersicht über die Konzentrationen an Benzoesäure in auf dem schweizerischen Markt erhältlichen Sauermilchprodukten und Käsen zu ermitteln. Beim Käse sollte geprüft werden, ob sortenspezifische und zonale Unterschiede (z. B. Einfluss der Rinden- oder Schmiereflora) im Benzoesäuregehalt existieren. Im weiteren wurde Schmelzkäse in die Untersuchung einbezogen.

Experimenteller Teil

Probenerhebung

Es wurden 8 Joghurt-nature-, 5 Bifidus-Sauermilch-, 105 Joghurt-, 11 Quark- und 3 Kefirproben untersucht, letztere 119 Proben enthielten verschiedene Früch-

te. Darunter befanden sich sowohl magere wie auch teilentrahmte und vollfette Produkte. Die Proben stammten von verschiedenen Fabrikanten und wurden vom Zentralverband Schweizerischer Milchproduzenten zur Verfügung gestellt. Sie wurden über den Zeitraum von einem Jahr gesammelt.

Bei den Käsen wurden vorerst je 3 zufällig ausgewählte, konsumreife Proben pro Sorte untersucht. Um zonale Unterschiede feststellen zu können, wurde sowohl in einer äusseren Schicht von 1 cm («Randzone» inkl. Rinde und eventuell Schmiere) wie auch in einer inneren Schicht von 2 cm («Zentrum») die Konzentration an Hippur- und Benzoesäure bestimmt. Bei Emmentaler, Greyerzer, Sbrinz, Appenzeller, Rohmilch-Tilsiter, Walliser Raclette, Vacherin fribourgeois, Mager- und Rahmquark handelt es sich um Proben aus dem Handel. Die übrigen Käse wurden von der Schweizerischen Genossenschaft der Weich- und Halbhartkäsefabrikanten (SGWH) anlässlich einer SGWH-Taxation zur Verfügung gestellt. Bei den Käsesorten, die mehr als 50 mg/kg Benzoesäure enthielten, wurden in einer zweiten Untersuchung noch mindestens 5 weitere Proben untersucht, die 2 Monate später von den entsprechenden Geschäftsstellen geliefert wurden. Nach dem Vorliegen dieser Resultate wurde sodann 3–4 Monate später nochmals Käse von den gleichen Herstellern überprüft.

Die für den Export bestimmten Schmelzkäseproben stammten von 6 verschiedenen schweizerischen Fabrikanten. Diese Proben enthielten teilweise verschiedene Zutaten wie Kümmel, Paprika, Curry, Wein, Schabziger. Zu deren Herstellung wurden Emmentaler, Greyerzer, Appenzeller, Tilsiter und Camembert verwendet.

Bestimmungsmethode

Die Benzoesäure wurde mit einer bereits beschriebenen HPLC-Methode bestimmt, die vor allem für den Nachweis der Sorbinsäure ausgearbeitet wurde (7). Dies wurde ermöglicht durch die Verwendung eines binären, linearen Gradienten mit Phosphatpuffer (7) und Methanol (B) (0–9 min: 0% B; 9–19 min: 0–100% B; 19–22 min: 100% B; 22–24 min: 100–0% B). Mit dieser Analysenmethode können gleichzeitig die p-Hydroxybenzoesäuremethylester, -ethylester, -propylester, die Benzoesäure, die Sorbinsäure, die Hippursäure wie auch das Pimaricin nachgewiesen werden.

Die Resultate werden als Mittelwert (\bar{x}) wie auch als Medianwert (\tilde{x}) angegeben.

Analysengerät

Beim Gerät handelt es sich um ein Kontron (Zürich) HPLC-System, bestehend aus 2 Pumpen Typ 420, Ofen Typ 480, Detektor Typ 430, Autosampler Typ 460 und Auswertesoftware 450 MT II. Die Säule (Dimension: 250 × 4 mm) war mit Nucleosil 120-5 C₁₈ (Macherey Nagel, Düren) gepackt.

Resultate und Diskussion

Analytische Gesichtspunkte

Die Benzoesäure liess sich ohne grosse Probleme in Joghurt, nicht aber in Käse, nachweisen. Bei Käsen, die in der Randzone hohe Benzoesäurekonzentrationen aufwiesen, wurden die Resultate mit einer «Scanning»-Aufnahme des Absorptionsspektrums («Pseudo-DAD») überprüft. Dabei zeigte sich, dass in einigen Fällen eine andere, vorläufig noch unbekannte Komponente mit praktisch identischer Retentionszeit wie Benzoesäure eluierte. Mit der Verwendung einer neu zugekauften Trennsäule und einer geringeren Einspritzmenge konnten jedoch beide Komponenten aufgetrennt werden (Abb. 1). In einzelnen Käsen machte dieser Artefakt bis zu 80% der integrierten Peakfläche aus.

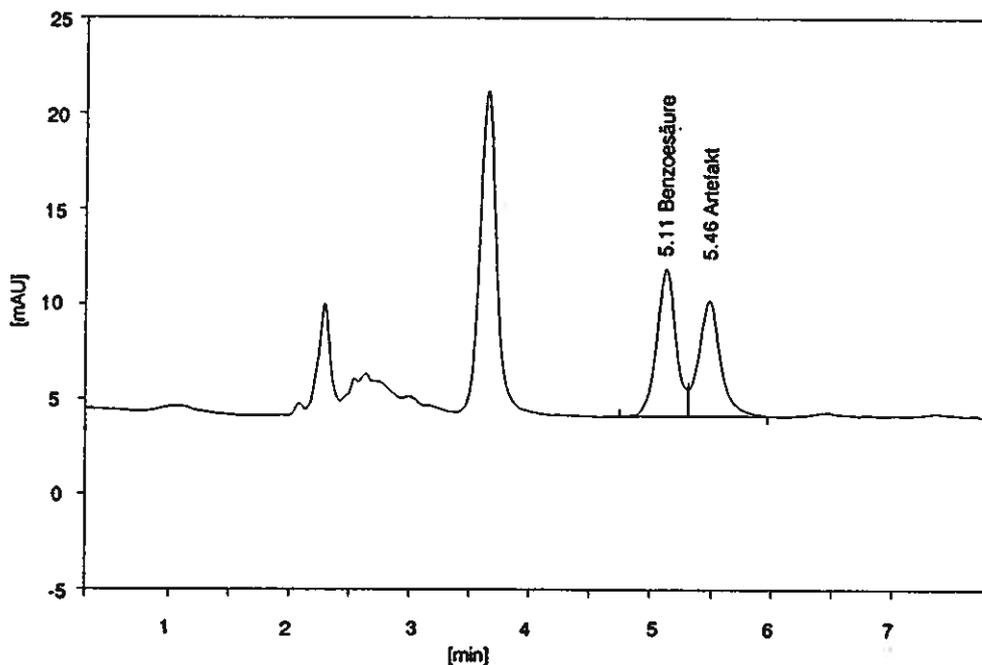


Abb. 1. Chromatographische Auftrennung der Benzoesäure in Käse

Sauermilchprodukte

Der Benzoesäuregehalt der verschiedenen Sauermilchprodukte schwankte zwischen 4 und 31 mg/kg (Abb. 2). Joghurt nature ($n = 8$) enthielt durchschnittlich 18,2 ($\bar{x} = 19,1$) mg/kg Benzoesäure. Dagegen wies Bifidus-Sauermilch ($n = 5$) mit 12,5 ($\bar{x} = 10,1$) mg/kg weniger Benzoesäure auf; in diesen Proben konnte auch Hippursäure nachgewiesen werden. Die drei Kefirproben lagen im gleichen Bereich (Tabelle 1).

Tabelle 1. Benzoesäuregehalt (mg/kg) von Sauermilchprodukten

Autoren	Produkt	n	Mittelwert	s	Bereich	Medianwert
Obentraut (8)	Fruchtjoghurt	92	17,8	4,0		
Renterghem (9)	Fruchtjoghurt	10	25		19–33	
Stijve (10)	Fruchtjoghurt	18			15–39	
Chandan (11)	Fruchtjoghurt				18–26	
diese Arbeit	Joghurt nature	8	18,2		9–25	19,1
	Bifidus-S.	5	12,5		5–23	10,1
	Kefir	3	14,5		8–19	16,5
	Fruchtjoghurt	105	16,4	4,7	5–32	17,0

In den 105 untersuchten Fruchtjoghurts (Abb. 2) betrug der arithmetische Mittelwert $\bar{x} = 16,4$ mg/kg Benzoesäure. Der Medianwert \tilde{x} des Vollmilchjoghurts unterschied sich mit 17 mg/kg nur wenig von demjenigen der mageren und teilentrahmten Joghurts ($n = 37$; $\bar{x} = 16$ mg/kg). Diese Werte stimmen recht gut mit den Angaben von *Obentraut et al.* (8) überein, während *van Renterghem* (9), *Stijve* und *Hischenhuber* (10) sowie *Chandan et al.* (11) deutlich höhere Konzentrationen in Fruchtjoghurts feststellten (Tabelle 1).

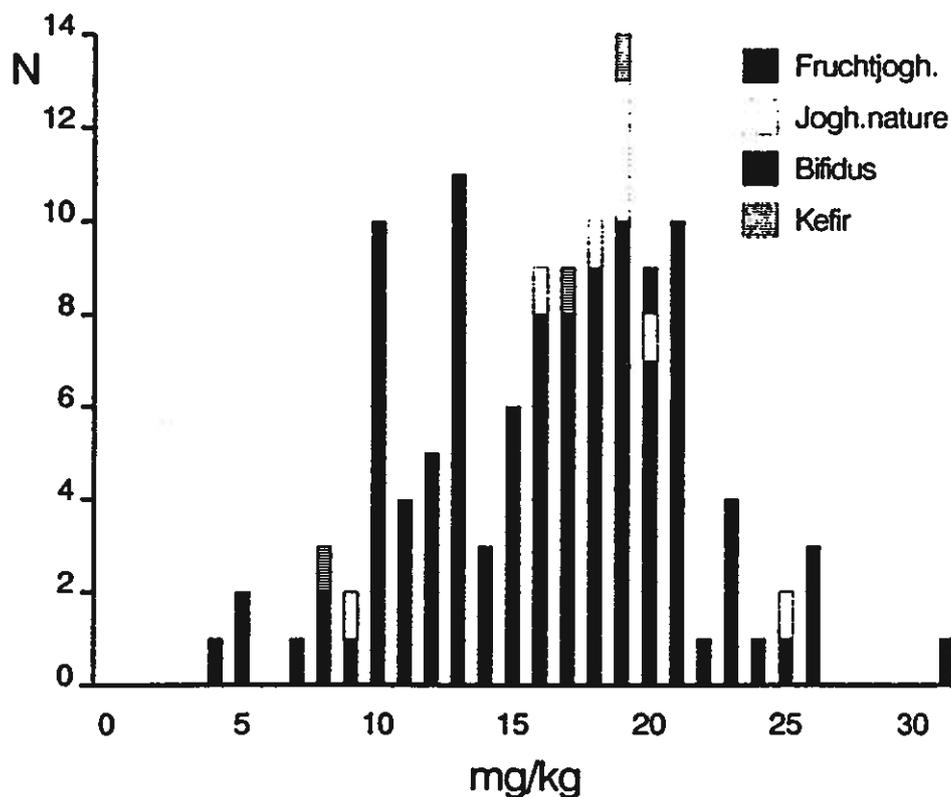


Abb. 2. Benzoesäuregehalt von Sauermilchprodukten
N = Anzahl Proben

Käse

Bei den Käsen wurden sowohl die Randzone als auch das Zentrum auf Benzoe- und Hippursäure, Ester der p-Hydroxybenzoesäure, Sorbinsäure sowie Pimaricin untersucht. Die Hippursäure konnte in gereiften Käsen praktisch nicht, die Sorbinsäure, die Ester der p-Hydroxybenzoesäure sowie das Pimaricin überhaupt nicht nachgewiesen werden.

Die Benzoesäuregehalte der beiden Zonen unterschieden sich bei einigen Käsen recht deutlich, bei anderen jedoch praktisch nicht und lagen im allgemeinen unter 50 mg/kg (Abb. 3). Eine Unterteilung in geschmierte und nicht geschmierte Käse zeigte bei den letzteren recht tiefe, mit den oben erwähnten Sauermilchprodukten vergleichbare Benzoesäurekonzentrationen auf (Tabelle 2). Bei den geschmierten Käsen gab es hingegen verschiedene Proben, die mit hohen Gehalten auffielen und die sich in Abbildung 3 deutlich von $\beta = 1$ (β ist definiert als das Verhältnis zwischen der Konzentration in der Randzone und im Zentrum) abheben. Vor allem bei Bündner Bergkäse, Pastmilch-Tilsiter, Tête de Moine, Va-

Table 2. Benzoesäuregehalt (mg/kg) von Käse

Autoren	Käse	n	Mittelwert	s	Bereich	Medianwert
Renterghem (12)	Frischkäse	82	26		?- 68	
Obentraut (8)	Quark, Mager-	18	39,1	2,5		
Obentraut (8)	Q. 20% FiT	9	23,9	2,2		
Obentraut (8)	Q. 40% FiT	12	14,0	2,9		
Kurisasi (13)	versch.	25			2- 41	
Chandan (11)	versch.	10 ^a			Sp- 41	
NN (14)	Quark ^b	7	39,4		31- 48	
NN (14)	Käse ^b	3	17,7		12- 22	
Müller (15)	Käse	71			<10-200	
diese Arbeit	Käse nicht geschmiert					
	Zentrum	16	5,8		0- 20	3,5
	Rinde	16	6,3		0- 19	3,5
	Käse geschmiert					
	Zentrum	84	27,7		0-174	15,0
	Rinde	84	61,8		0-622	18,5
	Frischkäse	5	8		1- 17	3,0
	Quark, Rahm-	3	9,9		6- 13	11,0
	Quark, Mager-	3	24,1		23- 25	24,0
	Früchtequark	11	16,0		10- 25	15,3

^a untersuchte Sorten, Anzahl Proben unbekannt

^b Sauermilch

Sp = Spuren

cherin fribourgeois, bei dem der höchste Gehalt mit über 600 mg/kg gefunden wurde, und Vacherin Mont-d'Or wurden im Rand relativ hohe Benzoesäurekonzentrationen nachgewiesen. Beim Vacherin Mont-d'Or lagen alle drei Proben deutlich über 50 mg/kg. Erstaunlicherweise wurde zudem in zwei dieser drei Proben im Zentrum mehr Benzoesäure gefunden. Auch bei einer Probe Appenzellerkäse unterschied sich der Benzoesäuregehalt des Zentrums deutlich von demjenigen der Rinde (Abb. 3).

Die vorliegenden Werte liegen für Quark, Frischkäse und nicht geschmierte Käse im gleichen Rahmen wie in anderen Arbeiten (Tabelle 2). In einer Untersuchung des bernischen Kantonschemikers betrug der Benzoesäuregehalt in 7% der untersuchten Halbhart- und Weichkäseproben mehr als 50 mg/kg und in 83% weniger als 10 mg/kg ($n = 71$) (15).

In den Käsesorten wie Bündner Bergkäse, Past-Tilsiter, Vacherin fribourgeois und Vacherin Mont-d'Or, bei denen in mindestens einer Probe in der Randzone

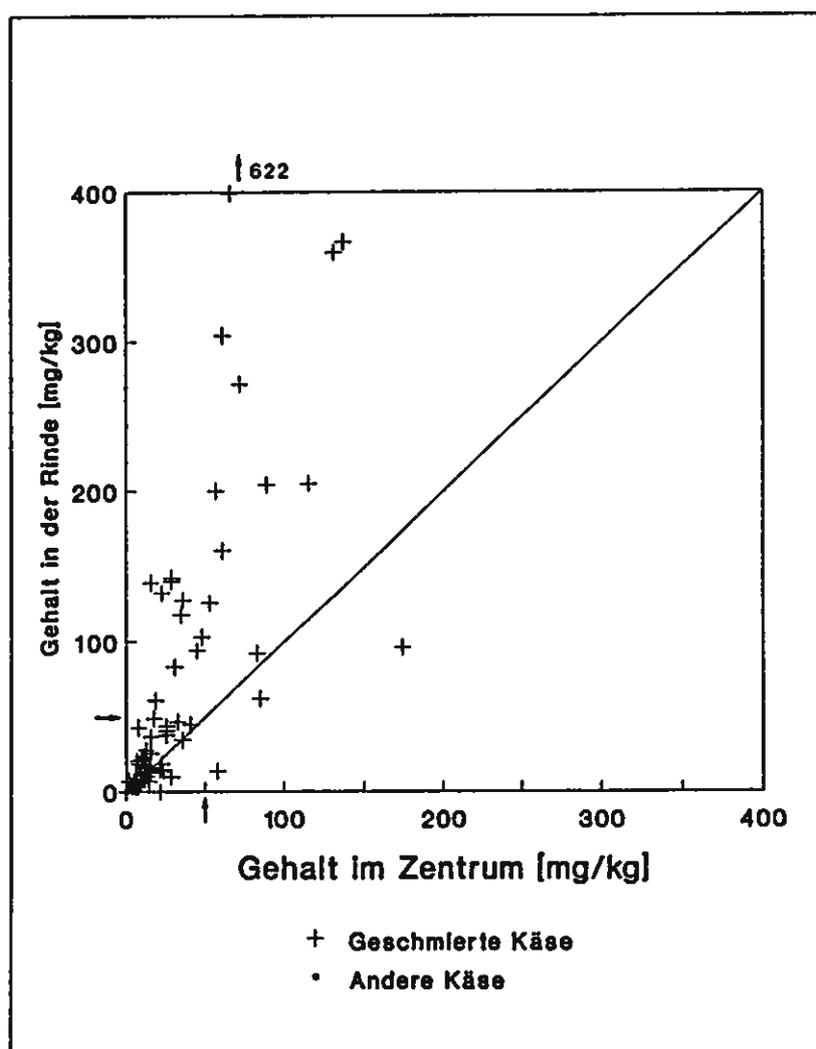


Abb. 3. Benzoesäuregehalt in der Randzone und im Zentrum verschiedener schweizerischer Käsesorten (→ provisorischer Toleranzwert)

höhere Benzoesäurekonzentrationen als 50 mg/kg gefunden werden konnten, wurden nachträglich noch mindestens 5 Proben untersucht. Die Resultate waren sehr unterschiedlich, was zu einer nochmaligen Überprüfung bei Past-Tilsiter und Vacherin fribourgeois führte. Diese Resultate sowie ein Hinweis auf einen hohen Benzoesäuregehalt in der Järbseite und der Nachweis der Hydrozimtsäure gaben den Anlass dazu, für die Entstehung der Benzoesäure in geschmierten Käsen neben dem Hippursäureabbau noch einen weiteren Abbauweg zu postulieren, nachdem bereits *Teuber* (16) für Harzerkäse auf die Bildung der Benzoesäure aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin hingewiesen hatte. Über diese Angelegenheit wird an anderer Stelle ausführlich berichtet (17). Im weiteren wurden noch verschiedene Käsereihilfsstoffe wie Käseabdeckmittel, Rindenfarbe u. a. untersucht, in denen jedoch keine Benzoesäure festgestellt werden konnte, was einen weiteren Hinweis für die Bildung der Benzoesäure aus dem Phenylalanin gibt.

Schmelzkäse

Der Benzoesäuregehalt der Schmelzkäse lag mit 0 bis 29 mg/kg etwa im gleichen Bereich wie derjenige der nicht geschmierten Käse. Es wurde für die 29 Proben ein arithmetischer Mittelwert \bar{x} von 11,6 mg/kg und ein Medianwert \bar{x} von 11 mg/kg bestimmt. Die Unterteilung der Proben in solche mit und ohne Lebensmittelzutaten ergab für diejenigen mit einer Zutat einen geringfügig höheren Mittelwert; diese beiden Mittelwerte unterscheiden sich jedoch statistisch nicht (Tabelle 3). Die vorliegenden Werte stimmen relativ gut mit denjenigen von *Luf* und *Brandl* (18) überein (Tabelle 3).

Tabelle 3. Benzoesäuregehalt (mg/kg) von Schmelzkäse

Autoren	ohne LM ^a -Zutaten			mit LM ^a -Zutaten		
	n	\bar{x}	Bereich	n	\bar{x}	Bereich
Luf und Brandl (18)						
österreichisch	22	9,4	4–17	11	10,1	7–22
importiert	24	9,2	5–19	8	13,1	8–24
diese Arbeit	19	11,5	0–29	10	11,8	0–20

^a LM = Lebensmittel

Schlussfolgerung

Diese Untersuchung soll einen Beitrag für die Festlegung eines Toleranzwertes für Benzoesäure in Sauermilchprodukten und Käse leisten. Aufgrund der erhaltenen Resultate könnte unter Berücksichtigung der derzeitigen Herstellungs-

bedingungen, der jahreszeitlichen Schwankung des Hippursäuregehaltes in der Milch (19) und deren maximalen Hippursäurekonzentration (20) realistischerweise ein Toleranzwert von 50 mg/kg Benzoesäure für Sauermilchprodukte ins Auge gefasst werden. Für Käse stellt sich jedoch die Problematik anders. Nach eigenen Untersuchungen ist ein solcher Toleranzwert nicht gerechtfertigt. Diese Feststellung gilt insbesondere für geschmierte Käse, da bei diesen eine Bildung der Benzoesäure aus dem freien Phenylalanin zu erwarten ist (17).

Dank

Für die zur Verfügung gestellten Joghurt- und Käseproben danken wir Herrn *M. Zeller* vom Zentralverband Schweiz. Milchproduzenten und Herrn *R. Bourquin* von der Schweiz. Genossenschaft der Weich- und Halbhartkäsefabrikanten. Für die zusätzliche Lieferung von Pastmilch-Tilsiter, Vacherin fribourgeois und Bündner Bergkäse danken wir den Herren *W. Diethelm* (Schweiz. Geschäftsstelle für Tilsiter, Weinfelden), *A. Overney* (Vacherin fribourgeois, Bulle) und *W. Reinhard* (Geschäftsstelle für Bündner Käse, Chur).

Zusammenfassung

Die Zusatzstoffverordnung lässt die Verwendung von Konservierungsmitteln in Milchprodukten nicht zu. Das Ziel dieser Arbeit war es, den natürlichen Benzoesäuregehalt in verschiedenen fermentierten Milchprodukten wie Sauermilchprodukte ($n = 121$), Käse ($n = 122$) und Schmelzkäse ($n = 29$) zu bestimmen. Die Resultate dieser Studie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: i) Alle fermentierten Milchprodukte, mit Ausnahme der Käse mit einer Schmiere, enthalten infolge der mehr oder weniger quantitativen Umsetzung der Hippursäure der Milch Benzoesäurekonzentrationen von weniger als 50 mg/kg (Mittelwert: $\bar{x} = 14,9$; Medianwert: $\tilde{x} = 16$ mg/kg; $n = 152$). ii) Käse mit einer Schmiere können hohe Benzoesäuregehalte aufweisen. Für diese Gruppe von Milchprodukten muss ein zweiter Stoffwechselweg in Betracht gezogen werden: der Abbau des aus der Proteolyse herstammenden, freien Phenylalanins, vor allem auf den ebenen Flächen und der Järbseite der Käselaike.

Résumé

L'Ordonnance fédérale sur les additifs alimentaires n'autorise pas l'adjonction d'agents conservateurs dans les produits laitiers. Le présent travail a donc pour but de déterminer les teneurs naturelles en acide benzoïque des produits laitiers fermentés les plus divers et les plus représentatifs possible tels que produits acidifiés ($n = 121$), fromages ($n = 122$) ainsi que fromages fondus ($n = 29$). Les résultats de cette étude mettent en évidence deux catégories principales: i) les produits laitiers fermentés dépourvus de croûte emmorgée; leurs teneurs, inférieures à 50 mg/kg, sont dues à une conversion plus ou moins quantitative de l'acide hippurique du lait en acide benzoïque (moyenne: 14,9; médiane: 16 mg/kg; $n = 152$); ii) les fromages à croûte emmorgée qui présentent des teneurs en acide benzoïque parfois très élevées. Pour ces produits intervient une seconde voie métabolique: la dégradation de la phénylalanine libre résultant de la protéolyse, surtout sur les faces et le talon des meules.

Summary

The Swiss Ordinance on Food Additives does not allow the use of preserving agents in dairy products. The object of this paper is to determine the levels of naturally contained benzoic acid in different fermented milk products such as sour milk products (N = 121), cheese (N = 122) and processed cheese (N = 29). The results obtained can be divided into two groups: i) All fermented dairy products except smeared cheese show benzoic acid contents of less than 50 mg/kg (mean value \bar{x} = 14.9; median \bar{x} = 16 mg/kg; N = 152). This is due to the quantitative transformation of hippuric acid into benzoic acid in milk. ii) Smeared cheese shows high benzoic acid contents. For this group, it is therefore necessary to consider a different metabolic pathway: The breakdown of phenylalanine originating from proteolysis, particularly on the flat surfaces and hoop side of the cheese loaves.

Literatur

1. Nishimoto, T., Uyeta, M., Tauc, S. and Takebyashi, I.: (Bacterial formation of benzoic acid in milk). *J. Food Hyg. Soc. Japan* 9, 58–59 (1968).
2. Nishimoto, T., Uyeta, M. and Tauc, 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. Verordnung über die in den Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe (Zusatzstoffverordnung) vom 20. Januar 1982 (SR 817.521). Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1982.
5. Bundesamt für Gesundheitswesen: Benzoessäure in Milch und Milchprodukten. Kreis schreiben vom 3. Januar 1990.
6. Chipley J. R.: Sodium benzoate and benzoic acid. In: *Branen, A. L. and Davidson P. M., Antimicrobials in foods*, p. 11–35. M. Dekker, New York, Basel 1983.
7. Bütikofer, U., Baumann, E. und 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).
8. Obentraut, S., Binder, E. und Brandl, E.: Benzoessäure in fermentierten Milchprodukten. *Wiener tierärztl. Mschr.* 70, 276–282 (1982).
9. van Renterghem, R.: Het natuurlijke benzoësuurgehalte van yoghurt. *Belg. Arch. Soc. Geneesk. Hyg. Arbeidsgen. Ger. Geneesk.* 40, 530–538 (1982).
10. Stijve, T. and Hischenhuber, C.: High performance liquid chromatographic determination of low levels of benzoic acid and sorbic acid in yoghurts. *Deut. Lebensm. Rdsch.* 80, 81–84 (1984).
11. Chandan, R. C., Gordon, J. F. and Morrison, A.: Natural benzoate content of dairy products. *Milchwissenschaft* 32, 534–537 (1977).
12. van Renterghem, R. et Waes, G.: Recherche relative à la teneur en acide sorbique et en acide benzoïque et à la présence de moisissures et de levures dans le fromage frais. *Revue de l'agricult.* 40, 141–147 (1987).
13. Kurisaki, J., Sasago, K., Tsugo T. and Yamauchi, K.: (Formation of benzoic acid in cheese). *J. Food Hyg. Soc. Japan* 14, 25–30 (1973).

14. *NN.*: Jahresbericht 1988. Milchwirtschaftliche Untersuchungs- und Versuchsanstalt, Kempten 1989.
15. *Müller, U.*: Jahresbericht 1989. Kantonales Laboratorium, Bern 1990.
16. *Teuber, M.*: Grundriss der praktischen Mikrobiologie für das Molkereifach, 2. Auflage. Molkereitechnik Band 59/60, 124 (1987).
17. *Bosset, J. O., Bütikofer, U. und Sieber, R.*: Phenylalaninabbau – ein weiterer Weg zur natürlichen Bildung von Benzoesäure in geschmierten Käsen. Schweiz. milchw. Forsch. (im Druck).
18. *Luf, W. und Brandl, E.*: Der originäre Gehalt an Benzoesäure in Schmelzkäse. Öst. Milchwirt. 41, 43–46 (Wiss. Beilage 4) (1986).
19. *Svensen, A.*: Hippursyre og benzoesyre i melk og forskjellige meieriprodukter. Meieriposten 63, 704–707, 731–734, 761–767, 789–792 (1974).
20. *Wolfschoon-Pombo, A. und Klostermeyer, H.*: Vorkommen und Bestimmung von Hippursäure in der NPN-Fraktion der Milch. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 172, 269–271 (1981).

Dr. R. Sieber
U. Bütikofer
E. Baumann
Dr. J. O. Bosset
Eidg. Forschungsanstalt für
Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld-Bern