

DISS. ETH NO. 26532

**ROLE OF THE MICROBIAL COMMUNITY IN PRODUCTION OF
BIOGENIC AMINES IN FERMENTED FOODS AND
CHARACTERISATION OF A TYRAMINE-REDUCING
LACTOBACILLUS PLANTARUM STRAIN**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JANINE ANDEREGG

MSc ETH in Food Science

born September 9, 1980

citizen of Koppigen (BE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Leo Meile, examiner

Prof. Dr. Christophe Lacroix, co-examiner

Dr. Michael Beer, co-examiner

2020

Summary

Biogenic amines (BA) are organic bases, which can occur in high concentrations in fermented food products and can cause several adverse health reactions for the consumer. BAs are formed by decarboxylation of free amino acids by food-resident amino acid-decarboxylating bacteria, which can be part of the starter culture or may be introduced by contamination during food processing and storage. While cadaverine and putrescine tend to have an indirect toxic effect on human health by increasing the toxic effect of histamine and tyramine through competitive inhibition of detoxifying diamine oxidase enzymes, histamine and tyramine have a direct toxic effect. An intake of a higher concentration of histamine or tyramine can lead to serious health effects such as abdominal cramps, cardiac failure, diarrhoea, headache and migraine, hypertensive crises, intracranial haemorrhage, pounding heart and palpitations, pulmonary oedema and even death. While to date there is a legislation on the maximum histamine concentration in fish, despite the frequent occurrence in high concentrations and the range of toxic effects, there is no legal regulation of the maximum concentration of tyramine in fermented foods. Reasons are inter alia the lack of knowledge about tyramine production conditions as well as the main responsible tyramine-producing microorganisms in different fermented food products. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to improve the knowledge about tyramine-producing microorganisms and on their mechanism and factors involved in tyramine production as well as to investigate a *Lactobacillus plantarum* strain for the ability to reduce tyramine accumulation in fermented food.

In a first part of the thesis, 62 salami-type fermented sausages from the Swiss market were investigated on tyrosine-decarboxylating bacterial strains and the content of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine. BA concentrations were measured by ion-exclusion chromatography with pulsed amperometric detection (IC-PAD) and viable plate counts of enterococci, lactobacilli/lactococci and staphylococci were measured. Bacterial strains were geno- and phenotypically examined on their ability to produce tyramine. Positive strains were identified for the species by multiplex polymerase chain reaction (PCR) or 16S rRNA gene sequencing. In the analysed samples, all four BAs had higher concentrations in industrially-produced sausages compared to artisanally-produced ones. Tyramine was the major amine detected in 46 of 62 sausages, with a maximum of 785.22 mg kg⁻¹, and enterococci (74%), as well as coagulase-negative staphylococci (61%), mainly the meat starter culture *S. xylosum*,

could be identified as the main tyramine producers. Putrescine was found in 20 of 62 sausages, with a maximum observed concentration of 707.77 mg kg⁻¹. These two BAs showed a significant correlation ($P = 0.0407$) for their concentrations. Cadaverine and histamine were detected in nine and eight samples respectively, and both were found in significantly higher levels ($P = 0.019$) and ($P = 0.036$) in industrially-produced sausages. Interestingly, based on the quantitative tyramine content, five groups of fermented sausages were identified. Group 1 included products with a very high tyramine level (> 700 mg kg⁻¹), group 2 with a high level (400–700 mg kg⁻¹), group 3 with a moderate level (200–400 mg kg⁻¹), group 4 with a low level (< 200 mg kg⁻¹) and group 5 with a tyramine level below the detection limit (0.05 mg kg⁻¹). Samples with a tyramine level higher than 200 mg kg⁻¹ could be considered as products of less quality because consumption of such samples could be unhealthy for sensitive individual consumers.

Among fermented products, tyramine appears with the highest frequency in cheese. Therefore, 274 cheese samples were investigated on tyrosine-decarboxylating bacterial strains and their content of the four BAs cadaverine, histamine, putrescine and tyramine. Tyramine was with a concentration up to 984.38 mg kg⁻¹ by far the most abundant BA followed by cadaverine with a concentration up to 872.09 mg kg⁻¹. Moreover, the concentration of cadaverine significantly correlates with the concentration of tyramine. Furthermore, with a prevalence of 78% enterococci were by far the major tyramine producers in cheese samples and showed a significant correlation to tyramine. Besides, this study determined that the factors of milk treatment, milk origin as well as ripening time play an essential role in BA formation and accumulation in cheese. The highest concentration of all four BAs measured was found in semi-hard cheese made from cow's raw milk.

Sodium chloride is often used in fermented food products to control the growth of pathogens by reducing water activity, although it might have an enhancing effect on BA production and accumulation. To investigate the influence of sodium chloride in BA production and accumulation, eight tyramine-producing bacterial strains, representing Gram-positive species, were investigated on their tyramine production in a cheese-like micro-cheese model containing 2.5 mM tyrosine and different sodium chloride concentrations (0%, 1.5%, 3%, and 4.5%). It could be demonstrated that an increase in sodium

chloride concentration resulted in an increase of tyramine concentration in all eight tested tyramine-producing bacterial strains. In the tested *Staphylococcus xylosus* strain, for example, an increase in tyramine concentration of 871% was observed with measured tyramine concentrations of 67.91 mg L⁻¹ and 569.17 mg L⁻¹ when the sodium chloride concentration was increased from 0% to 1.5%. However, different tyramine-producing bacterial strains reacted differently to an increase in sodium chloride concentration. While the tyramine-producing *Enterococcus faecalis* strain showed high and relatively stable tyramine concentrations between 598.52 mg L⁻¹ and 716.10 mg L⁻¹ in all four tested sodium chloride concentrations, the strains *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus equorum*, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus parabuchneri* showed higher tyramine concentrations with increasing sodium chloride concentrations.

The last study in this thesis examined the *Lactobacillus plantarum* JA-1199 strain - harbouring a multicopper oxidase and a histidinol-phosphate transaminase gene - for its capacity to reduce tyramine accumulation in a micro-cheese model. Therefore, eight tyramine-producing bacterial strains were incubated in combination with the *Lb. plantarum* JA-1199 strain in a micro-cheese model containing 2.5 mM tyrosine and different sodium chloride concentrations (0%, 1.5%, 3%, and 4.5%). At the end of their ripening period, all micro-cheese models were analysed for their tyramine concentration. The result of the study showed a significant reduction of tyramine accumulation of up to 99% when *Staphylococcus simulans* or *Staphylococcus xylosus* were incubated in combination with the *Lb. plantarum* JA-1199 strain. Although the capacity of *Lb. plantarum* JA-1199 to reduce tyramine accumulation decreased with an increase of sodium chloride concentration and showed a maximum of reduction of tyramine accumulation of 9.23% at a sodium chloride concentration of 4.5%, the tested *Lb. plantarum* JA-1199 strain was able to reduce tyramine accumulation at any sodium chloride concentration without affecting the growth of the tyramine producing or other microorganisms such as starter cultures.

In conclusion, this doctoral thesis has given insight into the complex interaction of fermented food and tyramine concentration with tyramine-producing microorganisms. It was shown that high concentrations of tyramine in fermented sausages or cheeses are caused by enterococci alone or in combination with

coagulase-negative staphylococci and that significant correlations are existing between tyramine and other biogenic amines. The approach with a high number of cheeses and fermented sausages samples from Switzerland supports previous studies, which reported punctually the ability of different bacterial strains to produce different biogenic amines. Furthermore, the knowledge of the influence of different factors affecting tyramine production and potential mechanisms could be extended. It was shown that different environmental and physicochemical factors increase the tyramine concentration in fermented foods. Moreover, this doctoral thesis demonstrated reduction of tyramine accumulation in a complex food-like matrix with potential for application as a feasible strategy for decreasing tyramine concentration and therefore increase the safety level of fermented food products. These findings have established prerequisites for the application of the *Lb. plantarum* JA-1199 strain to prevent/reduce tyramine accumulation in fermented food products. However, further studies are needed to demonstrate the efficacy of *Lb. plantarum* JA-1199 in different fermented food products without negatively affecting the respective food matrix.

Zusammenfassung

Biogene Amine (BA) sind organische Basen, welche in hohen Konzentrationen in fermentierten Lebensmitteln vorkommen und beim Konsumenten mehrere negative Auswirkungen auf die Gesundheit verursachen können. BAs entstehen durch die Decarboxylierung freier Aminosäuren mittels lebensmittelbeständiger Bakterien, welche Decarboxylierungseigenschaften besitzen. Diese Bakterien können entweder Teil der Starterkultur sein, oder durch Kontamination bei der Lebensmittelverarbeitung und -lagerung in das Lebensmittel eingebracht werden. Während die BAs Kadaverin und Putrescin tendenziell eher eine indirekte toxische Wirkung auf die menschliche Gesundheit haben, indem sie die toxische Wirkung von Histamin und Tyramin durch konkurrierende Hemmung der entgiftenden Diaminoxidase-Enzyme erhöhen, haben Histamin und Tyramin eine direkte toxische Wirkung. Die Einnahme einer höheren Menge an Histamin oder Tyramin kann zu schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen wie Bauchkrämpfe, Herzversagen, Durchfall, Kopfschmerzen und Migräne, hypertensiven Krisen, intrakraniellen Blutungen, erhöhten Herzschlägen und Herzklopfen, Lungenödemen und sogar zum Tod führen. Während eine Gesetzgebung über die Maximalkonzentration von Histamin in Fischen existiert, gibt es trotz des in hohen Konzentrationen und häufigen Auftretens und dessen Bandbreite der toxischen Wirkungen keine gesetzliche Grundlage zur Regelung der Maximalkonzentration von Tyramin in fermentierten Lebensmitteln. Gründe dafür sind unter anderem ein mangelndes Wissen über die Produktionsbedingungen von Tyramin und deren produzierenden Mikroorganismen in verschiedenen fermentierten Lebensmitteln. Ziel dieser Doktorarbeit war es deshalb, das Wissen über die Tyramin-produzierenden Mikroorganismen und deren Mechanismen und beeinflussenden Faktoren, welche an der Tyramin-Produktion beteiligt sind, zu verbessern sowie einen *Lactobacillus plantarum*-Stamm und dessen Fähigkeit, Tyramin-Akkumulation in fermentierten Lebensmitteln zu reduzieren, zu untersuchen.

In einem ersten Teil der Arbeit wurden 62 vom Schweizer Markt stammende fermentierte Würste des Typs Salami auf Tyrosin-decarboxylierende Bakterienstämme sowie auf den Gehalt der vier BAs Kadaverin, Histamin, Putrescin und Tyramin untersucht. Die Konzentrationen der BAs wurden mittels Ionenaustauschchromatographie mit amperometrischer Puls-Detektion (IC-PAD) gemessen und die Konzentrationen von Enterokokken, Laktobazillen/Laktokokken und Staphylokokken wurde mittels

dem Ausstrichverfahren auf semiselektivem Agar-Medien bestimmt. Bakterienstämme wurden genotypisch und phänotypisch auf ihre Fähigkeit zur Tyramin-Produktion untersucht, und positive Stämme wurden durch eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder mittels 16S rRNS-Gensequenzierung auf ihre Spezies identifiziert. Aller vier untersuchten BAs kamen in industriell-hergestellten Würsten des Typs Salami in einer höheren Konzentration vor als in artisanal-hergestellten Würsten. Tyramin war das am häufigsten vorkommende BA und wurde mit einer Maximalkonzentration von 785,22 mg kg⁻¹ in 46 von 62 Wurstproben nachgewiesen. Als Hauptproduzenten von Tyramin konnten Enterokokken (74%) und Koagulase-negative Staphylokokken (61%), hauptsächlich die Fleischstarterkultur *Staphylococcus xylosus*, identifiziert werden. Putrescin wurde mit einer maximalen Konzentration von 707,77 mg kg⁻¹ in 20 von 62 Würsten gefunden und zwischen Putrescin und Tyramin wurde eine signifikante positive Korrelation ($P = 0.0407$) beobachtet. Kadaverin und Histamin wurden hingegen nur in neun beziehungsweise acht Proben nachgewiesen, allerdings in einer signifikant höheren Konzentration ($P = 0.019$) und ($P = 0.036$) in industriell-hergestellten Würsten im Vergleich zu artisanal-produzierten. Interessanterweise konnten auf der Grundlage des quantitativen Tyramin-Gehaltes fünf Gruppen von fermentierten Würsten identifiziert werden. Gruppe 1 umfasst Produkte mit einem sehr hohen Tyramin-Gehalt (> 700 mg kg⁻¹), Gruppe 2 Würste mit einem hohen Tyramin-Gehalt (400–700 mg kg⁻¹), Gruppe 3 Würste mit einem mässigen Gehalt an Tyramin (200–400 mg kg⁻¹), Gruppe 4 mit einem niedrigen Tyramin-Gehalt (< 200 mg kg⁻¹) und Gruppe 5 beinhaltet Würste mit einem Tyramin-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze (0.05 mg kg⁻¹). Proben welche der Gruppen 1, 2 und 3 angehören und somit einen Tyramin-Gehalt höher als 200 mg kg⁻¹ aufweisen, können als Produkte geringerer Qualität angesehen werden, da der Verzehr solcher Würste bei empfindlichen Konsumenten gesundheitliche Probleme verursachen können.

Da Käse als fermentiertes Lebensmittel optimale Bedingungen zur Bildung von BAs aufweist und im Käse vor allem das BA Tyramin in Höchstkonzentrationen vorkommt, wurden 274 Käseproben auf den Gehalt der vier BAs Kadaverin, Histamin, Putrescin und Tyramin sowie auf das Vorkommen von Tyrosin-decarboxylierenden Bakterien untersucht. Tyramin war mit einer gemessenen Konzentration von bis zu 984,38 mg kg⁻¹ mit Abstand das am häufigsten vorkommende BA, gefolgt von Kadaverin,

welches mit einer Konzentration von bis zu 872,09 mg kg⁻¹ vorkam. Darüber hinaus wurde zwischen diesen beiden gemessenen BAs eine signifikante Korrelation beobachtet. Die geno- und phänotypische Untersuchung der Tyrosin-decarboxylierenden Bakterienisolate zeigten ganz klar, dass Enterokokken, mit einer Prävalenz von 78% die hauptverantwortlichen Tyramin-Produzenten im Käse sind. Des Weiteren konnte mittels einer statistischen Untersuchung eine signifikante positive Korrelation zwischen Enterokokken und der Tyramin-Konzentration im Käse nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte in diesem Versuch bestätigt werden, dass Faktoren wie Milchbehandlung, der tierische Ursprung der Milch sowie die Reifungszeit des Käses wichtige Rollen bei der Bildung und Akkumulation von BAs spielen. Käse aus Rohmilch oder Halbhartkäse wiesen im Vergleich zu Käse aus thermisierter oder pasteurisierter Milch oder im Vergleich zu Weichkäse höhere Konzentrationen an BAs auf.

Natriumchlorid wird, obwohl es einen Einfluss auf die BA-Produktion und -Akkumulation haben kann, in fermentierten Lebensmitteln häufig dazu verwendet, das Wachstum von Krankheitserregern zu kontrollieren, indem es die Wasseraktivität im Lebensmittel reduziert. Um den genauen Einfluss von Natriumchlorid auf die BA-Produktion und -Akkumulation zu untersuchen, wurden acht Gram-positive Tyramin-produzierende Mikroorganismen, in einem Mikrokäse Modell, welches 2,5 mM Tyrosin und verschiedene Natriumchlorid-Konzentrationen (0%, 1,5%, 3% und 4,5%) enthält, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration bei allen acht getesteten Bakterien eine Erhöhung der Tyramin-Produktion zur Folge hat. Beim Tyramin-produzierenden *Staphylococcus xylosus*-Stamm zum Beispiel, konnte eine Erhöhung der Tyramin-Konzentration von 871% mit gemessenen Tyramin-Konzentrationen von 67,91 mgL⁻¹ und 569,17 mg L⁻¹ bei einer Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration von 0 auf 1.5% beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass verschiedene Tyramin-produzierende Bakterienstämme unterschiedlich stark auf eine Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration reagieren. Während der Tyramin-produzierende *Enterococcus faecalis*-Stamm in allen vier Natriumchlorid-Konzentrationen hohe und relativ stabile Tyramin-Konzentrationen zwischen 598,52 mg L⁻¹ und 716,10 mg L⁻¹ aufwies, wiesen die Stämme *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus equorum*, *Lactococcus lactis* sowie

Lactobacillus parabuchneri höhere Tyramin-Konzentrationen bei steigender Natriumchlorid-Konzentration auf.

Die letzte Studie in dieser Arbeit untersuchte den *Lactobacillus plantarum* JA-1199-Stamm - der entsprechend seiner Genomsequenz ein Gen für eine Multikupfer-Oxidase sowie ein Gen für eine Histidinol-Phosphat-Transaminase kodiert - auf seine Fähigkeit, die Tyramin-Akkumulation in einem Mikrokäse-Modell zu reduzieren. Hierfür wurden acht Tyramin-produzierende Bakterien in Kombination mit dem *Lb. plantarum* JA-1199-Stamm in einem Mikrokäse-Modell, welches 2,5 mM Tyrosin und vier verschiedenen Natriumchlorid-Konzentrationen (0%, 1,5%, 3% und 4,5%) enthält, inkubiert. Am Ende der Reifungszeit wurden alle untersuchten Mikrokäse-Modelle auf deren Tyramin-Gehalt analysiert. Die Ergebnisse der Studie zeigten eine deutliche Reduktion der Tyramin-Konzentration von bis zu 99% bei einer Inkubation von *Staphylococcus simulans* oder *Staphylococcus xylosus* in Kombination mit dem *Lactobacillus plantarum* JA-1199-Stamm. Obwohl die Kapazität von *Lactobacillus plantarum* JA-1199 zur Reduktion der Tyramin-Akkumulation bei einer Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration abnahm, und bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 4,5% eine maximale Reduktion der Tyramin-Akkumulation von 9,23% zeigte, konnte der *Lactobacillus plantarum* JA-1199-Stamm die Tyramin-Akkumulation bei jeder Natriumchlorid-Konzentration verringern ohne das Wachstum der Tyramin-produzierenden Mikroorganismen oder der Starterkulturen zu beeinträchtigen.

Zusammenfassend erlaube diese Doktorarbeit einen Einblick in die komplexe Wechselwirkung zwischen fermentierten Lebensmitteln und deren Tyramin-Konzentrationen mit den dazugehörigen Tyramin-produzierenden Mikroorganismen. Es konnte gezeigt werden dass, abhängig vom jeweiligen Lebensmittel, hohe Tyramin-Konzentrationen entweder durch Enterokokken alleine oder in Kombination mit Koagulase-negativen Staphylokokken verursacht werden, und dass signifikante Korrelationen zwischen Tyramin und anderen BAs bestehen. Der Ansatz mit einer hohen Anzahl von Lebensmittelproben unterstützt frühere Studien, die über die Fähigkeit verschiedener Bakterienstämme, welche verschiedene BA produzieren, berichteten. Darüber hinaus konnte das Wissen über den Einfluss verschiedener Faktoren, die die Tyramin-Produktion beeinflussen, sowie das Verständnis der

involvierten Mechanismen bei der Tyramin-Produktion, erweitert werden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene umweltbedingte und physikalisch-chemische Faktoren die Tyramin-Konzentration in fermentierten Lebensmitteln beeinflussen. Des Weiteren zeigte diese Doktorarbeit eine praktikable Strategie zur Verringerung der Tyramin-Konzentration und damit zur Erhöhung des Sicherheitsniveaus fermentierter Lebensmittel auf, indem die Tyramin-Akkumulation in einer komplexen lebensmittelähnlichen Matrix reduziert wurde. All diese Erkenntnisse legen den Grundstein für die Anwendung des *Lactobacillus plantarum* JA-1199-Stammes zur Verhinderung bzw. Reduktion der Tyramin-Akkumulation in fermentierten Lebensmitteln. Dennoch sind zukünftige *in vivo* Studien erforderlich, um die Wirksamkeit des *Lactobacillus plantarum* JA-1199-Stammes in verschiedenen fermentierten Lebensmitteln zu bestätigen, ohne dass dabei die jeweilige Matrix des untersuchten Lebensmittels negativ beeinträchtigt wird.