

Skimmelsvampe og mykotoksiner i industrien

Skimmelsvampe er de mest udbredte og artsrige af alle mikroorganismer. De spiller en meget vigtig rolle i naturen, som nedbrydere af al biologisk materiale. Det gør dem samtidig til en meget vigtig kilde til enzymer, som kan omdanne eller nedbryde stort set alt

Af Flemming Lund, f u@ipu.dk, DTU

Konkurrenceforholdene i skimmelsvampenes naturlige økosystem gør, at de kan have stor fordel af at kunne hæmme deres konkurrenter. I nogle tilfælde også have fordel af at tiltrække andre mikroorganismer og dyr, som kan hjælpe dem med nedbrydningen eller med at få dem selv spredt over større afstande.

Mange af disse stoffer har vi lært at udnytte som antibiotika eller andre medicinske produkter, eller som farve og aromastoffer. Men en del af stofferne som skimmelsvampene kan danne har meget uheldige egenskaber for mennesker og dyr. De virker sygdomsfremkaldende eller direkte toksiske.

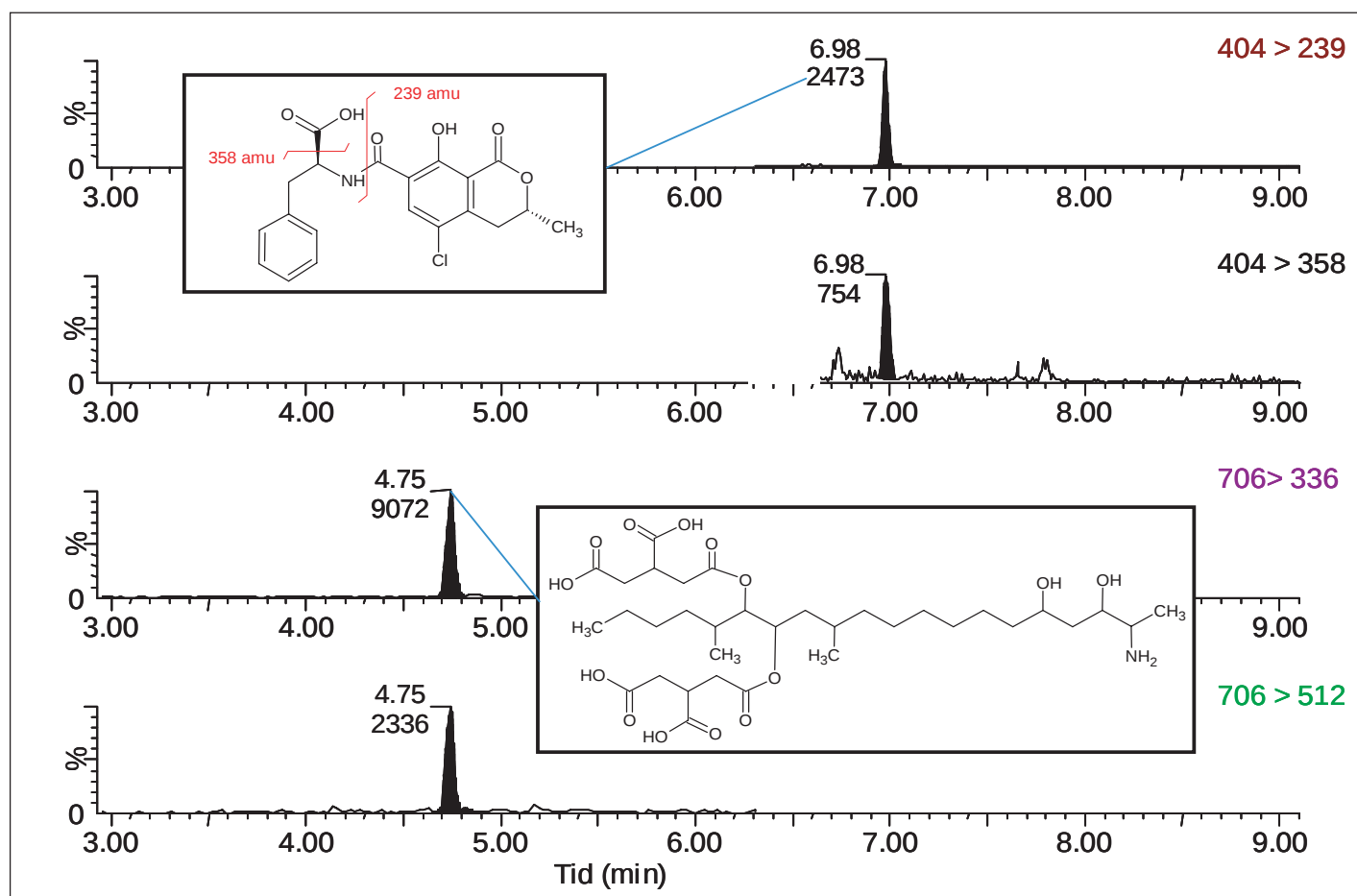
Det er klart, at hvis man bruger skimmelsvampe industrielt til fremstilling af enzymer, farver, aromaer eller medicinske produkter, så er det vigtigt at man sikrer sig, at de uønskede stoffer ikke findes i det færdige produkt.

Dette er den bioteknologiske og fødevarerindustrien naturligvis meget opmærksom på, men nogle gange sker der nye opdagelser som gør, at man får kendskab til tilstedeværelsen af stoffer man ikke før kendte til. Et eksempel på dette er opdagelsen af, at den bioteknologisk vigtige skimmelsvamp *Aspergillus niger* kan danne de stærkt toksiske mykotoksiner fumonisiner.

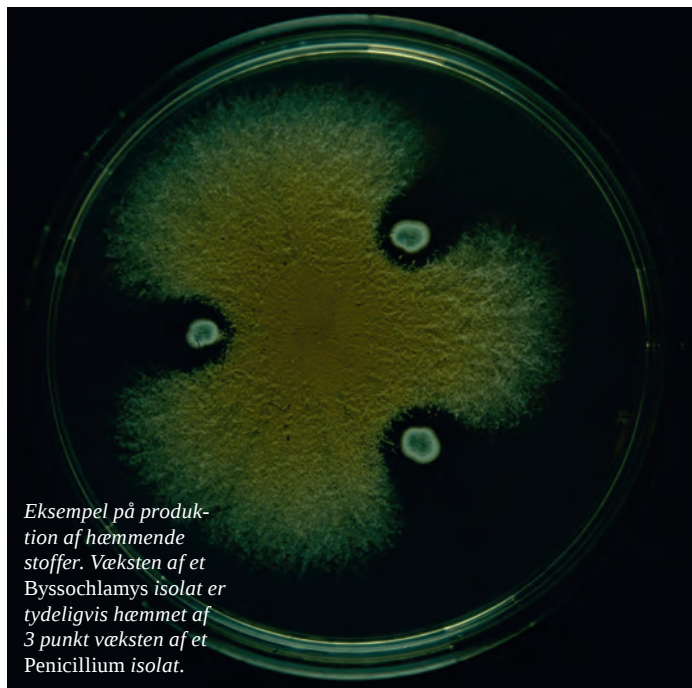
Identifikation er vigtig

På visse fødevarer som f.eks. skimmelost er vækst af *Penicillium roqueforti* ønsket, men her kan også uønsket skimmelsvampevækst give problemer. Andre beslægtede arter som *P. paneum*, *P. carneum* og *P. crustosum* er meget svær at skelne fra *P. roqueforti* på østen.

Dvs. at kontaminering af disse arter på en skimmelost ikke



Figur 1. HPLC-MS/MS detektion af ochratoxin A (øverste 2 traces, ca. 15 µg/kg) og fumonisin B2 (nederste 2 traces, ca. 9 µg/kg) i grøn kaffe, som er naturligt inficeret med *Aspergillus niger*. Til verifikation bruges mindst 2 masse overgange (transitioner) som for ochratoxin A er chloro-isocoumarin delen og hele molekylet efter tab af "myresyre". For fumonisin er det tab af henholdsvis en og to tri-carboxylsyre enheder og en eller to hydroxy grupper.



Eksempel på produktion af hæmmende stoffer. Væksten af et *Byssoschlamys* isolat er tydeligvis hæmmet af 3 punkt væksten af et *Penicillium* isolat.

nødvendigvis kan opdages. Og visse arter kan danne mykotoxiner, som er problematiske i ost. F.eks. *P. crustosum* danner nervetoksinet, penitrem A, i ost i store mængder, og der er rapporteret forgiftning med rystelser og senere dødsfald af hunde, som havde ædt en ost indeholdende dette mykotoksin.

Det kan derfor ikke anbefales at spise hverken ost eller andre fødevarer med vækst af ukendte skimmelsvampe.

Det er altså vigtigt, at kunne identificere skimmelsvampene. Men korrekt identifikation af skimmelsvampe er ikke altid nogen let opgave. I litteraturen er der således mange eksempler på fejlidentifikationer og på de deraf følgende fejltolkninger.

Mykologigruppen på DTU Biosys

Mykologigruppen på DTU Biosys er nu organiseret i Discoverydelen af Center for Mikrobiel Bioteknologi. Mykologigruppen på DTU har i mere end 30 år arbejdet med skimmelsvampe og deres sekundære metabolitter, mykotoxiner, taxonomi samt udvikling af metoder til identifikation af skimmelsvampe.

Medarbejderne i gruppen har derfor oparbejdet en høj ekspertise indenfor skimmelsvampes kemi, bl.a. via arbejdet med HPLC i de sidste 25 år samt de sidste 10 år også med HPLC-MS. Nogle medarbejdere har primært arbejdet med strukturoptælling af nye skimmelsvampe-metabolitter og til hjælp for dette arbejde er genereret en unik reference standard samling af 750 stoffer. Desuden er en database af yderligere ca. 1500 skimmelsvampe stoffer, som er identificeres tentativt via deres UV spektrum, akkurate masse, fragmenter (via tandem MS) og kromatografiske opførsel.

Til analyse for sekundære metabolitter startede Mykologigruppen med tyndt lags kromatografi, men da automatisering og *data-mining* er svært, begyndte medarbejdere i gruppen allerede i starten af 80'erne at bruge HPLC med diode array detektion således både retentions tid og UV/VIS spektrum kunne bruges til identifikation af en given komponent.

Senere er HPLC med electrospray og *Time of Flight (TOF)* masse-spektrometri (MS) kommet til. Ved denne type MS, fås en såkaldt *akkurat-masse* (<5 ppm præcision), dvs. massen bestemmes med 3-4 decimaler hvorved antallet af teoretiske



Det er blot nogle af de spørgsmål vi vil besvare på dette kursus

Kursusindhold: Vi tager udgangspunkt i konkrete problemer med skimmelsvampe. Du vil lære om deres egenskaber som voksesteder, vækstbetingelser, mykotoxinproduktion, kontamineringsveje, forebyggelse, konserveringsmidler, desinfektion og rengøring. Sammen vil vi identificere nogle skimmelsvampe af relevans for din situation. Send evt. dine egne skimmelsvampe til os, så identificerer vi dem sammen. Til identifikationen vil vi primært anvende simple diagnostiske metoder, som du kan anvende i eget laboratorium bagefter. Samtidig omtales og demonstreres mere avancerede metoder som molekyllær biologiske og kemiske analysemetoder.

Kurset henvender sig til: Alle som har interesse i at lære mere om skimmelsvampe. Kurserne har samme koncept, men den 28/8 er der fokus på fødevarer og den 9/10 er der fokus på biotek og farmaceutisk industri.

Undervisere: Flemming Lund (ph.d.) og Per Væggemose Nielsen (ph.d.).

Arrangør: IPU i samarbejde med Mykologigruppen på DTU Biosys.

Tilmelding: flu@ipu.dk. Senest 2 uger inden kursusstart skal egne prøver tilsendes IPU.

Sted: Lyngby – DTU

Tid: Torsdag, den 28. august 2008 eller torsdag den 9. oktober 2008, kl. 10-17.

Pris: 4.000 kr. inkl. kursusbog og identifikation af mindst 1 tilsendt skimmelsvampe.

kandidater til en given masse bliver meget mindre. F.eks. har molekyler med elementar kompositionen $C_{29}H_{46}O_5$, den mono-isotopiske masse 474.3345 amu, mens eks. $C_{20}H_{48}N_3O_9$ har massen 474.3391 amu, så med en passende præcision kan de to stoffer differentieres. I dette tilfælde er masse-forskellen 9.7 ppm og da præcisionen på en TOF MS er ca. 2-6 ppm (alt efter model) vil de to nævnte kandidater kunne differentieres.

Den akkurate masse er den bedste måde til at matche en ukendt top med beskrevne stoffer i databaser. Eksempelvis giver en søgning i Anitbase2008 (database med 35 000 mikrobielle metabolitter) med massen 474.3345 ± 0.3 amu 40 hits i databasen, mens 474.3345 ± 0.01 amu giver 6 hits. Efterfølgende kan antallet af kandidater indsnævres yderligere via UV/VIS data, polaritet, hvor det ioniserer bedst (positiv / negativ mode) etc. – denne proces kaldes *dereplikering*. I de *drug-discovery* projekter Mykologigruppen er involveret i pt. (antifungale, antibakterielle og anticancer) er ønsket at der ingen kandidater er – da stoffet i givet tilfælde er nyt og dermed potentielt kan omfattes af et stof patent.

Tandem MS bruges også til dereplikering, men da der er begrænset viden om prædiktion af fragmentering af lige-elektronioner (som fås i electrospray) hjælper det ofte kun lidt hvis man ikke ved, hvordan alle kandidat-grupper fragmenterer – hvilket man ofte ikke gør. Kender man derimod stofgruppen er tandem MS ofte mere informativ end akkurat masse MS.



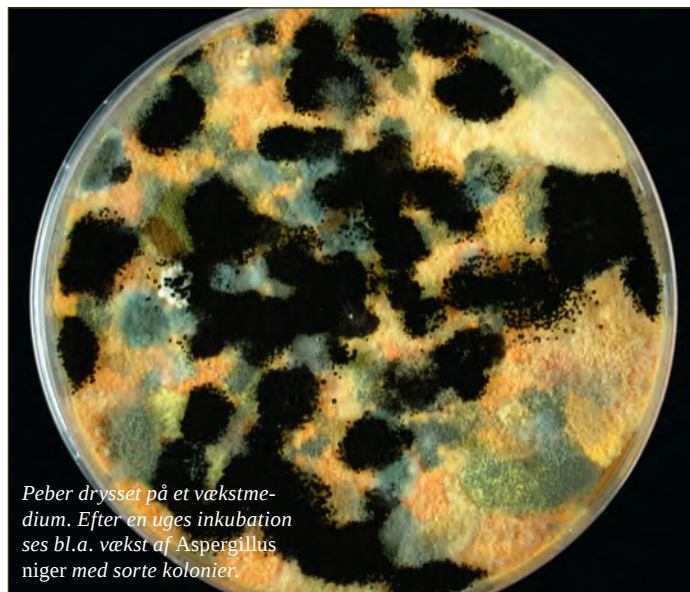
Produktion af et rødt farvestof ved vækst af *Penicillium brevicompactum*.

I forbindelse med konstruktion af genetisk-modificerede organismer er forskellige MS teknikker også nødvendige for at verificere ændringer, da det ikke altid er de forventede ændringer der er sket.

TOF-MS er desværre ikke så følsom, hvilket er et problem i naturligt inficerede fødevarer, hvor koncentrationerne ofte er meget lave ($\mu\text{g/kg}$ niveau). Derfor bruges MS/MS på triple quadrupol MS instrumenter til detektion af meget lave mængder - i f.eks. fødevarer. Ulempen er, at man kun ser hvad man scanner efter, og man ikke efterfølgende kan re-analysere datafilerne og se efter andre stoffer.

Mykotoksiner

Mykotoksiner er sekundære metabolitter, som er produceret af skimmelsvampe og som i små koncentrationer kan forårsage en akut eller kronisk sygdom hos hvirveldyr efter en naturlig indtagelse (via føde, indånding eller hudkontakt)



Peber drysset på et vækstmedium. Efter en uges inkubation ses bl.a. vækst af *Aspergillus niger* med sorte kolonier.

Hver art har sin egen metabolitprofil

Arbejdet med skimmelsvampene har vist, at hver art producerer en ganske bestemt profil af sekundære metabolitter. Dvs. når et isolat af en skimmelsvamp er identificeret til artsniveau kendes mykotoksin-risikoen.

Altså, hvis et produkt er kontamineret med en ukendt skimmelsvamp kan der være en risiko for dannelse af alle mulige mykotoksiner – mens en artsidentifikation giver information om risiko for måske kun et enkelt mykotoksin. Identifikation giver dermed en kraftig arbejdsreduktion, når risikoen af mykotoksiner skal vurderes.

Aspergillus niger

Et eksempel på et nyt spændende resultat fra Mykologigruppen er, at det kræftfremkaldende stof, fumonisin B_2 , produceres af nogle *Aspergillus niger* isolater. I biotekindustrien anvendes *A. niger* til produktion af citronsyre, extracellulære enzymer, single-celle protein og som transformationsvært af proteiner. Det er samtidig kendt, at enkelte isolater af *A. niger* producerer ochratoxin A. Dvs. at produkter fermenteret med *A. niger* nu bør analyseres for forekomst disse to mykotoksiner.

Mykotoksiner i produkter

Hvis der er konstateret et mykotoksin i et produkt vides altså samtidig, hvilke skimmelsvampe-arter, som potentielt kan danne det pågældende mykotoksin. Eksempelvis kan de meget potente kræftfremkaldende aflatoxiner kun dannes af 3 arter af *Aspergillus*.

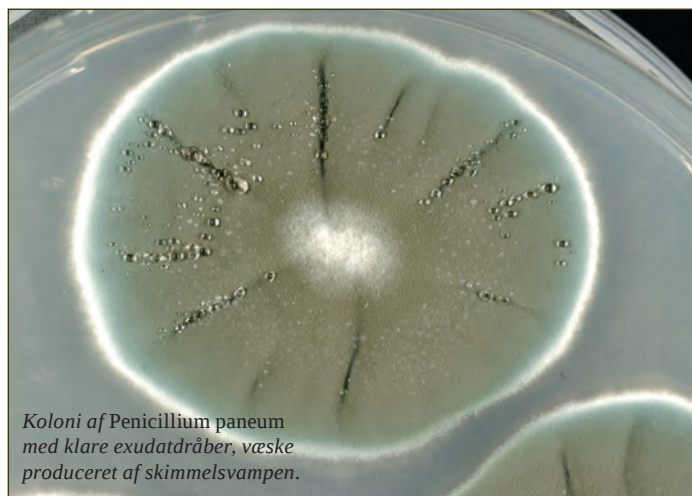
Et bestemt mykotoksin kan oftest produceres af flere arter indenfor samme slægt. Men fumonisin B_2 , som nu er fundet hos *Aspergillus niger* var indtil da kun fundet produceret af få *Fusarium* arter. *Fusarium* er normalt en "marksvamp" og *Aspergillus* er normalt en "lagersvamp". Dvs. ved en forebyggelse af forekomst og dannelse af mykotoksinet, fumonisin B_2 , er det vigtig at fastslå om produktionen af toksinet sker på marken eller på lageret. En grundig mykologisk undersøgelse med isolering og identifikation af skimmelsvampe fra både mark og lager vil vise hvor de potente fumonisiner producenter findes. Hvis *A. niger* er årsagen til problemet kan bedre styring af lagerbetingelser (temperatur, fugtighed etc.) formentlig forebygge dannelsen af fumonisiner. Det er nemlig ved ganske bestemte miljøbetingelser, at produktion af specifikke mykotoksiner er optimal. Og for mange mykotoksiner er disse produktionsmiljøer ikke de samme, som de optimale betingelser for skimmelsvampens vækst.

Special-analyser for industrien

Som tidligere nævnt råder Mykologigruppen over >750 mykotoksin- og metabolit-standader, hvor af de fleste ikke er kommercielt tilgængelige. Desuden ligger gruppen inde med en betydelig viden om, hvordan disse stoffer analyseres, og derfor laves en del specielanalyser for virksomheder, som ikke kan finde et kommercielt laboratorium til analyse for et givent toksin.

Eksempler på sådanne analyser er:

- Chaetoglobosiner i oste pga. kontaminering med *Penicillium discolor*.
- Mycophenolsyre, penitrem A og roquefortine C i oste og ensilage kontamineret med *P. roqueforti* og *P. carneum*, samt mycophenolsyre i frugt og grønt produkter kontamineret med *P. pervicompactum*.
- Cyclopiazonic acid i oste pga. kontaminering med *P. commune* og produkter fra fermenteringer med *Aspergillus oryzae*.
- Fumonisin og ochratoxin i fødevarer og bioteknologiske kontamineret med eller fermenteret med *A. niger*, og hvor der ikke er standardiserede analysemetoder for fumonisiner og ochratoxin.



Koloni af *Penicillium paneum* med klare exudatdråber, væske produceret af skimmelsvampen.

I en række andre projekter har gruppen udviklet hurtigmetoder til detektion af skimmelsvampe og mykotoksiner i fødevarer og råvarer med elektronisk næse. En metode, der kan give en bestemmelse inden for ganske få minutter.

Sekundære metabolitter og mykotoksiner

Nogle sekundære metabolitter er ikke mykotoksiner, men kan have andre uønskede egenskaber. For eksempel kan mycophenolsyre hæmme immunapparatet, så konsumenter måske kan blive mere modtagelige for infektioner.

Mycophenolsyre kan dannes i skimmelost af *Penicillium roqueforti* i koncentrationer op til 15 mg/kg. Samme niveau af koncentrationer af mycophenolsyre er også fundet i overfladen af en leverpostej (14 mg/kg) og overflade i en skinke (11 mg/kg). Begge produkter var podet med *Penicillium brevicompactum* og opbevaret til massiv vækst.

I midten af postej blev der fundet 0,15 mg/kg og i midten af skinken blev der fundet 0,23 mg/kg af mycophenolsyre. I leverpostej og skinke er det dermed vist, at mycophenolsyre diffunderer mindst 5 cm.

Altså, hvis man som forbruger vil undgå at indtage mycophenolsyre skal man ikke spise blåskimmelost og heller ikke bare bortskære synlig skimmelvækst af sin leverpostej og skinke. Til vurdering af risikoen ved indtagelse af mycophenolsyre kan nævnes, at anbefalet dosis af mycophenolsyre

anvendt som medicin ved organ transplantationer er 1,0 til 1,5 g to gange dagligt. Så niveauet i produkterne er altså meget lavt i forhold til den terapeutiske dosis.

Mange sekundære metabolitter og mykotoksiner kan diffundere langt udenfor området med synlig skimmelsvampevækst. Derfor indebærer det en risiko for forekomst af mykotoksiner eller andre uønskede sekundære metabolitter i produkter, hvor synlig vækst af skimmelsvampe er vasket, skåret eller på enden måde fjernet fra produktet.

Derfor - alle fødevarer med ukendte skimmelsvampe bør kasseres!

Oste med mykotoksiner i Frankrig og Grækenland

I Danmark spises normalt ikke oste som uønsket er angrebet af skimmel. Det anses for et kvalitetsproblem og osterierne arbejder kraftig forebyggende med rengøring og hygiejne for at undgå kontaminering af skimmelsvampe. I Frankrig og Grækenland (og sandsynligvis mange andre lande) findes en anden spisekultur med skimmel på oste. Under rejser i Frankrig og Grækenland har medarbejdere fra Mykologigruppen fundet mange "fine" oste med ukendt skimmelsvampevækst. Det er altså en specialitet fra disse lande og den ukendte vækst er ønsket og betragtes som en ekstra kvalitet. Imidlertid har gruppen påvist flere mykotoksinproducenter på disse oste.

Det er derfor meget sandsynligt, at konsumenter af disse oste indtager mykotoksiner - men tilsyneladende i så små mængder, at der ikke opstår akutte sygdomme. Derimod kan daglig indtagelse over længere tid måske være årsagen til sygdomme opstået efter flere års eksponering - f.eks. kræft i fordøjelsessystemet efter indtagelse af kræftfremkaldende mykotoksiner. Indtagelsen kan måske sammenlignes med rygning, hvor der også indtages kræftfremkaldende stoffer - men den direkte årsag til sygdommen kan være svær at bevise.

IPU

De ovenfor nævnte resultater med mycophenolsyre på leverpostej og skinke er fremkommet fra Louise Marie Sørensen ph.d. arbejde, som er et forskningssamarbejde mellem IPU og Mykologigruppen på DTU BioSys samt Slagteriernes Forskningsinstitut.

IPU er et firma, som i mere end 50 år har drevet konsulentvirksomhed i tæt kontakt med forskere fra DTU. For nylig har IPU startet et nyt samarbejde med DTU Biosys, som inkluderer skimmelsvampe.

IPU har ansat Per Væggemose Nielsen (ph.d.) og Flemming Lund (ph.d.), som begge har arbejdet i Mykologigruppen på DTU i mere end 14 år. Flemming Lund har arbejdet med skimmelsvampe fra fødevarer, specielt ost, brød og korn og udviklet flere simple metoder til identifikation. Endvidere har Flemming arbejdet med molekylær-biologiske metoder til kortlægning af kontamineringsveje. Per Væggemose Nielsen har arbejdet med fødevareemballering, hygiejne og konservering, specielt med naturlige antimikrobielle stoffer samt metoder til detektion af skimmelsvampevækst. Disse to IPU medarbejdere skal nu som konsulenter formidle den viden de selv og Mykologigruppen har oparbejdet gennem mange år til gavn for industrien.

Hvis du har et problem med skimmelsvampe eller mykotoksiner er du meget velkommen til at kontakte enten Per eller Flemming.

Flemming Lund, telefon 45 25 25 43, e-mail: flu@ipu.dk

Per Væggemose Nielsen, telefon 45 25 26 31, e-mail: pvn@ipu.dk