

# Afslutningsrapport

Kemisk karakterisering af sekundær  
metabolitdannelse fra skimmelsvampe på ost

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2000-35

*August 2000*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

## **Mejeriforeningen**

### **Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet**

## **Kemisk karakterisering af sekundær metabolitdannelse fra skimmelsvampe på ost.**

Medarbejdere der har været ansat på projektet:

Forskningslektor, Ph.D., Thomas Ostenfeld Larsen (Projektleder),  
Levnedsmiddelcenteret ved Institut for Bioteknologi, Bygning 221, Søtofts Plads,  
Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby. Tlf. 45 25 26 32.

E-mail: [TOL@IBT.DTU.DK](mailto:TOL@IBT.DTU.DK)

Laboratorietekniker, Hanne Jakobsen og

Laborant, Trine Camilla Rasted, begge Institut for Bioteknologi, Bygning 221,  
Søtofts Plads, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby.

Videnskabelige medarbejdere ansat i kortere perioder:

Dan Sørensen, Ph.D. stud. og

Lisa Rahbæk, Cand. Scient., Ph.D.

Øvrige medarbejdere/samarbejdspartnere:

Lektor Jens C. Frisvad

Forskningsadjunkt Jørn Smedsgaard

og Forskningsadjunkt Flemming Lund alle Mykologigruppen

Docent Carsten Christophersen,

Lektor Uffe Anthoni og

Lektor Per H. Nielsen alle Marin Kemi Gruppen

### **Forord:**

Projektets medarbejdere vil gerne takke Mejeriforeningen (Mejeribrugets  
ForskningFond), Levnedsmiddelcenteret ved DTU og Strukturdirektoratet for  
økonomisk og administrativ støtte til projektet. Vi vil også gerne takke  
Mejeriforeningen for den store interesse og opbakning, som den har udvist for  
projektet igennem de fire år, som projektet har været.

## Resumé (dansk)

Projektet har resulteret i ny viden omkring sekundær metabolitdannelse fra en række skimmelsvampe, der er kontaminanter på ost. Der er udviklet metoder til oprensning af rene stoffer fra svampe ekstrakter og ialt er omkring 25 stoffer isoleret. Strukturen for 20 af stofferne er opklaret og 9 af stofferne har vist sig at være ikke tidligere beskrevne naturstoffer. Det har derimod ikke været muligt at oprense og karakterisere farvestoffer dannet af *Penicillium caseifulvum* på Danablu. Farvestofdannelsen er mest udpræget når svampen vokser ved lavt pH og ved lave fosfat koncentrationer, mens væksten er korreleret til salt koncentrationen. Foruden nye stoffer er en række kendte mykotoksiner og andre metabolitter også vist at blive produceret på oste baserede substrater. De to arter *Penicillium caseifulvum* og *P. camemberti* har vist sig at være meget ensartede mht. fysiologi, cytotoxicitet og dannelse af flygtige stoffer. Projekt arbejdet har været grundlæggende for genintroduktionen af arten *Penicillium nordicum*, der ligesom *P. verrucosum* producerer ochratoxin. Førstnævnt art isoleres primært fra ost og kød produkter.

## Resumé (engelsk)

The project has provided new knowledge about secondary metabolism of a number of cheese associated fungal contaminants. Methods for isolation of pure compounds from fungal extracts have been developed and in total about 25 metabolites have been isolated. The structure of 20 compounds have been elucidated and 9 compounds turned out to be novel natural products. It has not been possible to isolate and characterize pigments produced by *Penicillium caseifulvum* on Danablu. Pigmentation is most pronounced when the fungus is growing at low pH and low phosphate concentrations, while growth is correlated to salt concentration. Apart from novel compounds a number of known mycotoxins and other metabolites have been shown to be produced on cheese based substrates. The two species *P. caseifulvum* and *P. camemberti* have been shown to be very similar with respect to physiology, cytotoxicity and production of volatile metabolites. Work made in this project has been the basis for the reintroduction of the species *Penicillium nordicum*, which produces ochratoxins like *P. verrucosum*. The former species is primarily isolated from cheese and meat products.

## 1. Formål

Det har været projektets formål at udvikle metoder til karakterisering af sekundære metabolitter fra skimmelsvampe. Disse metoder har omhandlet oprensning, påvisning og strukturoptklaring af kendte og ukendte sekundære metabolitter fra skimmelsvampe, der forekommer på ost.

Projektet har primært fokuseret på *Penicillium caseifulvum*, men andre vigtige arter som; *P. commune*, *P. camemberti*, *P. solitum*, *P. nalgiovense*, *P. roqueforti*, *P. discolor*, *P. nordicum*, *P. verrucosum* og *Aspergillus versicolor* er også blevet undersøgt.

## 2. Baggrund

Som de fleste andre fødevarer forurenes oste af og til med skimmelsvampe. Disse kan give anledning til misfarvninger, ændringer af smag, lugt og konsistens, samt til dannelse af toksiske komponenter (mykotoksiner). Samtidig er enkelte skimmelsvampearter dog meget værdifulde starterkulturer til fremstilling af skimmelmodnede oste, idet skimmelsvampenes evne til at ændre ostens sensoriske og konsistensmæssige egenskaber her udnyttes til produktion af specielle ostetyper.

I et tidligere samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Levnedsmiddelcenteret ved Institut for Bioteknologi på Danmarks Tekniske Universitet, ved forskningsadjunkt Flemming Lund (FL) og kollegaer, er det blevet kortlagt hvilke arter, der er dominerende på forskellige typer af danske oste. På faste og halv faste oste er langt den mest dominerende forurenende skimmelsvamp *Penicillium commune*, men arter som *P. nalgiovense*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *P. discolor*, *P. verrucosum*, *Aspergillus versicolor* m.fl. ses også af og til.

På oste af Danablu typen er det for få år siden desuden blevet opdaget, at en hidtil ukendt art *Penicillium caseifulvum*, kan være et stort problem. *P. caseifulvum* blev opdaget, da man på en række danske osterier i perioder fik problemer med gul/orange misfarvninger på overfladen af Danablu oste. Misfarvninger viser sig som regel, når ostene efter ca. 3 ugers lagring vaskes på overfladen, inden de pakkes til yderligere lagring. I andre tilfælde ses gulfarvningen først under den videre lagring. Ved at pøde direkte fra gule pletter isolerede FL renkulturer af *P. caseifulvum* (billede 1). Ved nærmere eftersyn kunne *P. caseifulvum* også tydeligt ses som en grå/blå overfladevækst på Danablu oste i modsætning til starterkulturen *P. roqueforti*, der som bekendt har mørke olivengrønne sporer.

Den seneste udvikling i "*P. caseifulvum* historien" er, at vi her i starten af år 2000, fra et nyligt introduceret tysk skimmeloste produkt, har isoleret en renkultur af *P. caseifulvum*, hvilket klart tyder på, at arten bruges som starterkultur.

Ovennævnte farvestofproblematik har været den væsentligste baggrund for dette projekt. Det primære formål med projektet har således været at isolere/oprense og karakterisere de ovenfor beskrevne gul/orange farvestoffer fra *P. caseifulvum*, og i mindre grad stoffer fra andre nært beslægtede oste associerede svampe. Når rene stoffer er isoleret analyseres de efterfølgende ved spektroskopiske metoder således, at stoffernes nøjagtige kemiske strukturer kan fastlægges, ligesom stoffernes evt. toksiske egenskaber kan undersøges. På basis af en nøjagtig kemisk struktur kan de byggesten, som bruges til skimmelsvampens syntese af stoffet (biosyntesevejen) med stor sandsynlighed fastlægges. Efterfølgende kan det undersøges hvilke

procesfaktorer, der påvirker et givent stofs biosyntesevej. Dette kan i bedste fald lede til, at der findes betingelser, hvor dannelsen af det uønskede stof helt kan undgås.



Billede 1. Renkultur af *Penicillium caseifulvum* på de fire agar medier CYA, YES, MEA og CREA. Top (forside af kulturer), bund (bagside).

Når man taler om kemiske stofskifteprodukter (eller metabolitter) fra mikroorganismer og planter, taler man som regel om henholdsvis primære og sekundære stoffer. De *primære stoffer* findes i alle levende organismer og er livsnødvendige for deres overlevelse. Som eksempel kan nævnes de primære stoffer, der dannes ved nedbrydning af sukker under energidannelse. Primære stoffer indgår som regel i cykliske stofskifte processer, hvor de hele tiden regenereres. *Sekundære stoffer* betegnes derimod som stoffer, der tjener mere artsspecifikke og ikke nødvendigvis livsnødvendige funktioner for den producerende organisme. Det nok mest kendte eksempel på et sekundært stof fra skimmelsvampe er penicillin, der dannes af bl.a. *Penicillium nalgiovense*. Af andre kendte stoffer kan nævnes mykotoksinerne aflatoxin B<sub>1</sub> og ochratoxin A.

Projektet er blevet udført i samarbejde mellem Mykologigruppen på Institut for Bioteknologi, Danmarks Tekniske Universitet og Marin Kemi Gruppen på Kemisk Lab. II, H.C. Ørsted Instituttet, Københavns Universitet. Den kemifaglige baggrund for projektet har således i høj grad været; 1) Mykologigruppens mangeårige arbejde med udvikling af analytiske metoder til mikro-ekstraktion og detektion/påvisning af profiler eller fingeraftryk af kendte og ukendte metabolitter fra skimmelsvampe, og deraf store know-how omkring forskellige stoftypers spektroskopiske karakteristika, og 2) Marin Kemi gruppens store erfaring omkring oprensning og strukturopløsning af forskellige typer af naturstoffer (som alkaloider) fra især planter og marineorganismer herunder skimmelsvampe.

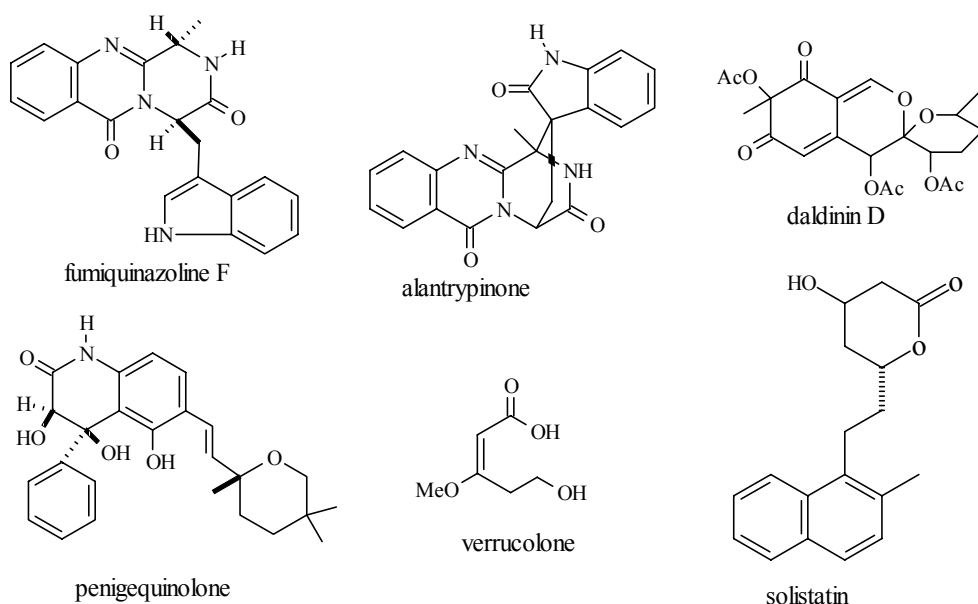
### 3. Resultater

#### 3.1 Udvikling af metoder til oprensning af skimmelsvampe metabolitter

Indledende i projektet blev der indkøbt et semipræparativt HPLC system (flow område 1-40 mL/min) af mærket Waters. I modsætning til typiske traditionelle præparative systemer hvor detektion baseres på måling ved en bølglængde, har detektoren været en photodiode array detektor. Det har derfor i projektet været muligt at optage fulde UV spektre af de stoffer, som er blevet adskilt, svarende til hvad der er muligt på analytiske HPLC systemer. Dette sammenholdt med at det har været muligt at indkøbe forskellige kolonnetyper til projektet har betydet, at det har været muligt at arbejde på et *state-of-the-art* system.

For hurtigt og nemt at få oprenset nogle ukendte svampe stoffer blev det indledende i projektet valgt at arbejde med en modelsvamp (*Penicillium verrucosum* isolat, IBT 5891), hvis 4 hovedkomponenter tilsyneladende var nye stoffer. Strategien lykkedes og efter indkøring af metoder blev store mængder af stofferne oprenset. Strukturen af de rene stoffer (figur 1) blev efterfølgende fastlagt ved tolkning af spektroskopiske data fra kernemagnetiske resonans målinger og massespektrometriske data og er beskrevet i artiklerne (1, 2 og 5).

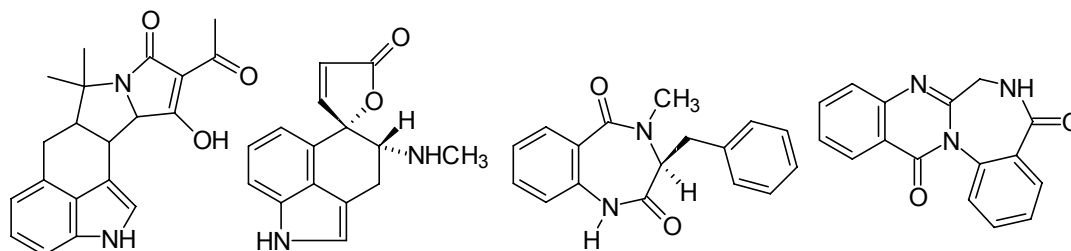
Igennem projektføreløbet har flere studerende kunne drage nytte af udstyret og de udviklede metoder. Især har speciale studerende Dan Sørensen (DS) fra Københavns Universitet været knyttet til projektet. DS har arbejdet med ukendt kemi fra *Penicillium solitum* og *P. nalgiovense*, hvilket udmøntede sig i to artikler (6, 7) og bl.a. fundet af den nye compactin analog solistatin (figur 1).



Figur 1. Metabolitter karakteriseret indlende i projektet fra *Penicillium verrucosum* og *P. solitum* (solistatin).

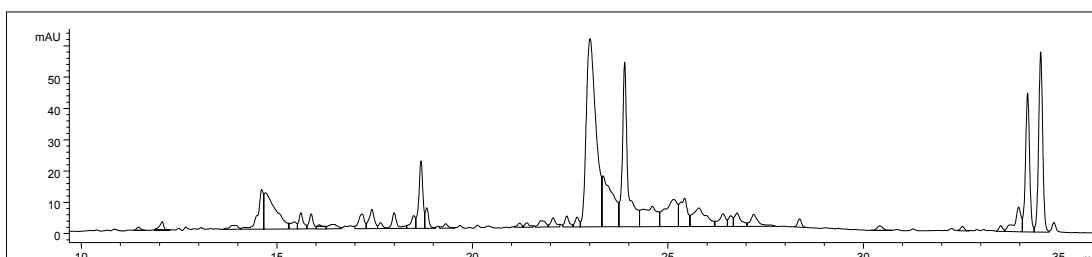
### 3.2 Kemisk karakterisering af *Penicillium caseifulvum*, *P. camemberti* og *P. commune*

Helt fra da de første kulturer af *P. caseifulvum* blev isoleret, har det været klart, at arten er nært beslægtet med både *P. camemberti* og dens vildtype *P. commune*. Sidstnævnte to arter kan producere mykotoksinet cyclopiazonsyre, som *P. caseifulvum* ikke producerer. *P. caseifulvum* danner derimod stofferne rugulovasine A og B samt cyclopeptine, alle stoffer som *P. commune* også er kendt for at kunne danne (figur 2).



Figur 2. Sekundære metabolitter fra *Penicillium caseifulvum*, *P. camemberti* og *P. commune* (cyclopiazonsyre, rugulovasine A, cyclopeptine og sclerotigenin).

Strategien i arbejdet med at karakterisere de uønskede farvestoffer fra *P. caseifulvum* har været at starte med at analysere for indholdet af svampestoffer i “rigtige” misfarvede osteskorpor fra de fire forskellige danske mejerier, hvor *P. caseifulvum* er påvist som kontaminant, samt at undersøge renkulturer fra mejerierne dyrket på syntetiske medier. Disse analyser viste, at osteekstrakterne indeholdt en lang række stoffer inklusivt farvestoffer, der ligeledes dannes af renkulturer af *P. caseifulvum*, når disse dyrkes på syntetiske medier (figur 3).

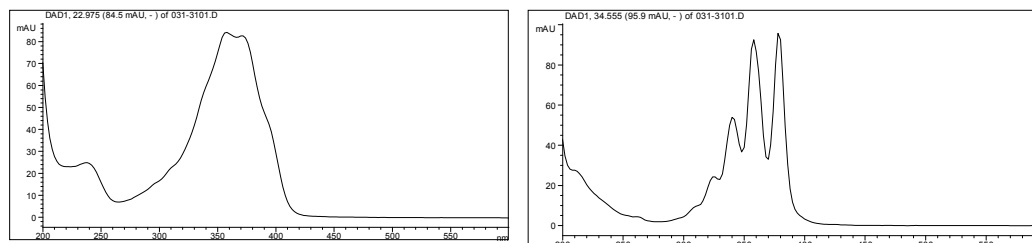


Figur 3. HPLC kromatogram der viser profilen af svampe metabolitter ekstraheret fra en Danablu med kraftig overflade kontamination af *Penicillium caseifulvum*. Kromatogramet viser absorptionen ved 340 nm. Figur 4 viser UV spektra af de to største toppe, der ses ved hhv. 23.0 og 34.6 min.

Stoffer med UV absorption i det synlige område (ca. 380-600 nm) blev valgt som “targets” for præparativ oprensning fra store syntetisk fremstillede farvede ekstrakter. Specielt har projektet fokuseret på de to hovedkomponenter navngivet “lys

gul” og “metabolit I” (figur 4). For begge stoffers vedkommende var der mange analoge stoffer i det farvede ekstrakt.

Analyserne viste samtidig, at isolater fra de forskellige fire danske mejerier havde en meget ensartet produktion (eller profil) af sekundære stoffer både ved ekstraktion af oste og syntetiske medier.



Figur 4. UV spektre af ukendte formodede farvestoffer (“lys gul” og “metabolit I”) dannet af *Penicillium caseifulvum* både på Danablu oste og på syntetiske medier.

I mere end to år har projektet vha. diverse tilgængelige oprensingsmetoder forsøgt at oprense en række af de ovenfor nævnte farvestoffer. Indtil videre har det dog vist sig, at farvestofferne er meget ustabile eller har en sådan kemisk natur, at de adsorberes (bliver hængende) på de typer af kolonner, som har været brugt i projektet.

I de få tilfælde, hvor der tilsyneladende har været en tilstrækkelig mængde stof oprenset til spektroskopiske undersøgelser, har stofferne alligevel været nedbrudt før det har været muligt at gennemføre de nødvendige undersøgelser, der skulle danne grundlag for bestemmelse af farvestoffernes kemiske struktur.

Vores resultater stemmer overens med virkeligheden i den forstand, at misfarvninger på osteoverflader ofte tilsyneladende forsvinder, hvilket således indikerer, at farvestofferne også er ustabile i ostemiljøet. Det kan dog også være at farvestofferne virker som pH indikatorer, således at de ændrer farve i takt med at ostens pH ændres.

Det er dog lykkedes at opklare strukturen af den ufarvede benzodiazepin sclerotigenin (**10**) fra et isolat af *P. commune*. Sclerotigenin blev også detekteret i et ekstrakt fremstillet fra en kraftigt kontamineret Danablu ost, hvilket indikerer at stoffet dannes af *P. caseifulvum*, selv om renkulturer aldrig er påvist at kunne danne sclerotigenin på syntetiske substrater.

Der vil i resten af år 2000 fortsat blive arbejdet med at isolere og karakterisere ukendte stoffer fra *P. caseifulvum*, idet speciale studerende Bo Jørgensen (i samarbejde med KU) arbejder med *P. caseifulvum* i sit speciale projekt.

### 3.3 Aromastofdannelse

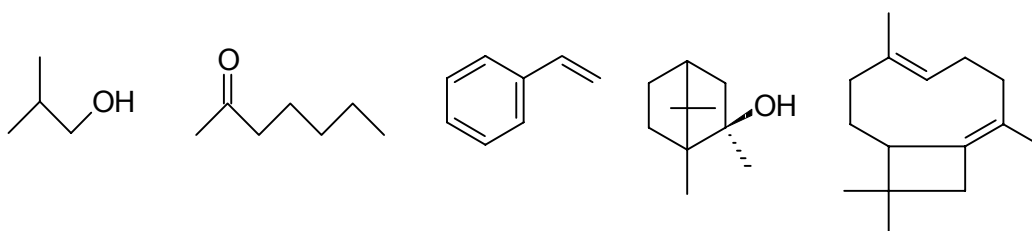
Flere af de Danablu osterier, hvor *Penicillium caseifulvum* er fundet som kontaminant, har vundet priser for deres ostes gode kvalitet. Fra Mykologigruppens side har det derfor været foreslået at *P. caseifulvum* måske ligefrem kan bidrage til en positiv aromaudvikling. Den nærtbeslægtede *P. camemberti* bruges til både hvid og til



blå hvid (sammen med *P. roqueforti*) oste fermentering. For at undersøge dette har vi dyrket isolater af *P. caseifulvum* og *P. camemberti* under realistiske vækst betingelser, dvs. ved ca. 12 °C, på et fløde medium.

Indenfor de første 10 dage, dvs. i det tidsrum hvor myceliet voksede frem og blev synligt, viste de to arter sig at have praktisk talt ens aromaprofiler (**3**). Begge arter dannede store mængder af især methyl-ketoner (2-pentanone, 2-heptanone og 2-nonanone), små alkoholer som isobutanol, organiske syrer samt en lang række andre kendte oste aromastoffer (figur 5).

Ældre og kraftigt sporulerende kulturer dannede kun små mængder af ovennævnte stoffer. Istedet sås en væsentlig øget produktion af terpenener som 3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene,  $\beta$ -caryophyllene samt en lang række ukendte stoffer. Aromaprofilerne for de ældre kulturer var mere forskellige end for de unge kulturer, men samlet sås et meget ensartet billede for de to arter. Ingen af kulturerne dannede under de givne betingelser den kendte off-flavor 2-methyl-isoborneol, dog dannede *P. caseifulvum* relativt store mængder af off-flavoren styren (figur 5).



Figur 5. Flygtige stoffer fra *P. caseifulvum* (isobutanol, 2-heptanone, styrene, 2-methyl-isoborneol og  $\beta$ -caryophyllene).

### 3.4 Fysiologiske undersøgelser af *Penicillium caseifulvum*

I projektet er det også blevet undersøgt hvilke fysisk-kemiske faktorer, der har betydning for vækst og farvestofdannelse for *P. caseifulvum* (**11**). I to faktor forsøg er følgende faktorer valgt på to niveauer blevet undersøgt: pH, salt koncentration (NaCl), P, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, S og N. Det viste sig, at lavt pH (< 5) og lavt fosfat indhold i mediet gav øget farvestofdannelse, mens høj salt koncentration var korreleret til vækst. Dette stemmer godt overens med, at det netop er om sommeren, hvor der er lavest fosfat indhold i mælk, at der ses de største problemer med misfarvning. Farvestof dannelse var ikke korreleret med vækst.

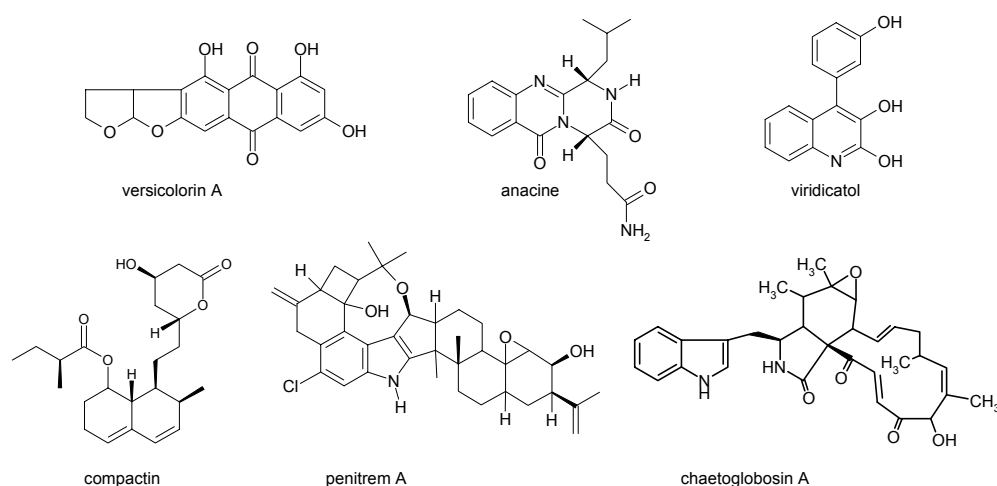
Når forskellige isolater af *P. caseifulvum* og *P. camemberti* dyrkes ved 12 °C på et Danablu agar medium (DBA) (fremstillet ved at blande smeltet blendet Danablu ost med agar), ser de to arter både morfologisk og fysiologisk meget ens ud. Begge arter bliver meget vatagtige og indtil *P. caseifulvum* begynder at sporulere er det praktisk talt umuligt at kende forskel på de to arter (**13**). Når *P. caseifulvum* podes som 3-stik bliver den grå/blå, mens den ved podning med en kraftig sporesuspension får grå sporer.

### 3.5 Kemisk karakterisering af øvrige skimmelsvampe associeret til ost

Som nævnt på side 3 har FL m.fl. karakteriseret den associerede funga på ost og beskrevet de relativt få arter, der er dominerende. I dette projekt er et antal isolater fra tolv af de vigtigste blevet dyrket på DBA medium. Efter vækst i 2 uger ved 12 °C er der blevet fremstillet ekstrakter fra overflade kulturer. Ekstrakterne blev analyseret ved HPLC og efterfølgende testet vha. MTT-testen (se afsnit 3.6 og tabel 3 herunder). En lang række kendte stoffer (som f.eks. cyclopiazonsyre, rugulovasiner, penitrem A og sterigmatocystin m.fl.) kunne påvises i de enkelte ekstrakter (tabel 1 og figur 6).

Skimmelsvamp	Sekundære metabolitter påvist fra ostebaseret medium
<i>Penicillium roqueforti</i>	Roquefortine A og analoger
<i>P. commune</i>	Rugulovasine A & B, viridicatin, cyclopiazonsyre m.fl., metabolit I
<i>P. camemberti</i>	Cyclopiazonsyre, metabolit I
<i>P. caseifulvum</i>	Rugulovasine A & B, metabolit I
<i>P. nalgiovense</i>	Diaportinol, diaportin syre, dichlorodiaportine og analoger
<i>P. atramentosum</i>	Rugulovasine A & B, meleagrin, oxaline
<i>P. solitum</i>	Cyclophenol, viridicatin, cyclopeptine, dehydrocyclopeptine, solistatin, viridicatin, compactin
<i>P. discolor</i>	Cyclophenol, viridicatin, cyclopeptine, dehydrocyclopeptine, chaetoglobosiner,
<i>P. crustosum</i>	Cyclophenol, cyclopeptin, penitrem A
<i>P. nordicum</i>	Sclerotigenin, anaciner, viridic syre og analoger, metabolit I
<i>P. verrucosum</i>	Verruciner
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocystin, versicoloriner

Tabel 1. Liste over hvilke skimmelsvampe arter, der er blevet dyrket på et oste baseret medium (DBA) og angivelse af hvilke stoffer, der er påvist i ekstrakter (se også figur 6).



Figur 6. Sekundære metabolitter dannet af oste associerede *Penicillium* arter på DBA.

Flere af de nævnte stoffer (som sclerotigenin, anaciner, verruciner, compactiner, solistatin, diaportiner, chaetoglobosiner) er os bekendt aldrig tidligere påvist fra oste eller oste baserede substrater. En litteratur søgning vil klarlægge dette og en endelig afrapportering vil fremgå af den planlagte artikel (13).

Det fremgår af tabel 1, at *P. nordicum* danner (store mængder) af stoffet sclerotigenin på ost. Dette er helt ny viden, idet vi i vores beskrivelse af hvilke arter (indenfor *Penicillium*), der laver stoffet slet ikke nævner arten *P. nordicum* (10). *P. nordicum* svarer i artiklen til de 4 af de 8 undersøgte *P. verrucosum* isolater der danner sclerotigenin.

At *P. nordicum* er en selvstændig art er endeligt blevet klarlagt i FØTEK3 projektet “The role secondary metabolites on fungal activities in foods”, hvor arbejdet med karakterisering af kemotyper indenfor *P. verrucosum* er fortsat. I dette projekt har vi fundet, at der udover stofferne citrinin og sclerotigenin også er to serier af analoge stoffer kaldet verruciner og anaciner, som aldrig dannes samtidigt. Sammenholdes alle data fra de ialt 45 isolater, der er undersøgt, finder vi nu fire kemotyper, hvor de to største grupper i arbejdet konkluderes at repræsentere arterne *P. verrucosum* og *P. nordicum*, idet eks-type kulturen af sidstnævnte art var indeholdt i den ene gruppe. Begge arter producerer ochratoxin A (OTA) og B, verrucoloner og metabolit I, mens de fleste *P. verrucosum* isolater desuden producerer verruciner og citrinin. Sidstnævnte to stof typer dannes aldrig af *P. nordicum* isolater, der derimod næsten alle producerer anaciner og desuden ofte sclerotigenin (tabel 2).

Skimmelsvamp	Forekomst	Karakteristiske sekundære metabolitter
<i>P. verrucosum</i>	Cerealier	Ochratoxiner, verrucoloner, citrinin, verruciner
<i>P. nordicum</i>	Ost & kød	Ochratoxiner, verrucoloner, sclerotigenin, anaciner

Tabel 2. Karakteristiske metabolitter dannet af *Penicillium verrucosum* og *P. nordicum*, som er ochratoxin producerende skimmelsvampe, der forekommer på hhv. cerealier og ost/kød.

Isolater af *P. verrucosum* er næsten altid isoleret fra cerealier og er som regel orangebrune på bagsiden af YES agar, mens *P. nordicum* isolater oftest er isoleret fra kød eller ost og er svagt creme farvede på bagsiden af YES agar. Disse klare forskelle underbygger ligeledes, at der er tale om to forskellige arter (12). Generelt danner *P. nordicum* væsentligt større mængder OTA end *P. verrucosum*, hvilket kan skyldes, at aminosyren phenylalanine, der er en væsentlig byggesten i biosyntesen af OTA, også indgår i biosyntesen af verruciner, som er hovedkomponenter for *P. verrucosum*. På DBA mediet dannede de to undersøgte isolater af *P. nordicum* dog ikke OTA.

Igennem de seneste år har Mykologigruppen også arbejdet en del med kemisk karakterisering af *P. roqueforti*. Hovedkonklusionen har været, at der er blevet beskrevet to nært beslægtede arter *P. carneum* og *P. paneum*, som både morfologisk og især kemisk afviger meget fra den traditionelle *P. roqueforti* art, der bruges som starterkultur. Som navnene indikerer findes de to sidstnævnte arter ofte på kød og brød. Alle tre arter kan danne roquefortine C, mens kun *P. carneum* og *P. paneum* kan danne mykotoksinet patulin, ligesom der er andre kemiske forskelle. I dette projekt er det blevet vist, at de tre arter danner meget forskellige flygtige stoffer, hvilket giver en alternativ måde at identificere arterne på (14).

### 3.6 Screening af svampeekstrakter for cytotoxicitet

Som nævnt ovenfor blev ekstrakterne fremstillet fra kulturer dyrket på DBA medium afsluttende i projektet screenet for deres evt. cytotoxicitet ved brug af den såkaldte MTT-test (13). Testen er tidligere brugt til undersøgelse af svampestoffer og

ekstrakter. Kort beskrevet går testen ud på, at en fortyndingsrække af ekstraktet (sammen med vækstmedium) tilsættes en velkarakteriseret cellelinie af opdyrkede svine nyre celler, der sidder som et monolag i mikrotiterbrønde. Cellerne vil herefter overleve, tage delvis skade eller dø afhængigt af ekstrakternes indhold af cytotoxiske stoffer. Princippet i testen baseres på at levende celler er i stand til at omdanne det gule farvestof 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) til lilla formozaner, mens cellesuspensioner der indeholder døde celler forbliver gule, hvilket kan måles spektrofotometrisk.

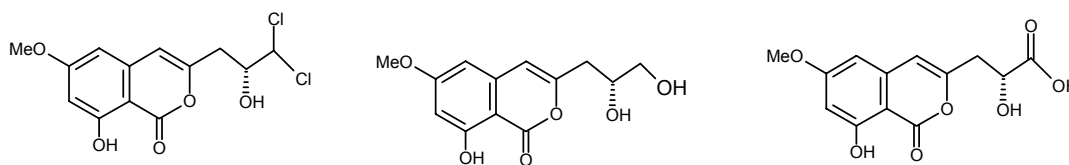
På trods af at testen kun skal betragtes som en hurtig diagnostisk screenings metode, giver den dog et udtryk for et givent antal ekstrakters relative cytotoxicitet. Metoden er således fundet relevant i dette projekt specielt til det formål at sammenligne de to nært beslægtede arter *P. caseifulvum* og *P. camemberti*. Ekstrakter af 5-7 isolater af disse to arter er blevet dyrket på henholdsvis et syntetisk agar medium (YES) og DBA medium med kontrol prøver og ekstrakter af to isolater af *P. roqueforti*.

Skimmelsvamp	Antal isolater/prøver	Toksisk indtil fortynding #
Kontrol	4	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	2	-
<i>P. commune</i>	2	3, 3
<i>P. camemberti</i>	5	1, 2, 2, 2, 1
<i>P. caseifulvum</i>	7	1, 1, 3, 3, 2, 2, 1
<i>P. nalgiovense</i>	2	5, 5
<i>P. atramentosum</i>	2	1, 2
<i>P. solitum</i>	3	1, 3, 3
<i>P. discolor</i>	3	2, 2, 5
<i>P. crustosum</i>	2	2, 2
<i>P. nordicum</i>	2	1, 3
<i>P. verrucosum</i>	1	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	2	2, 5

Tabel 3. Oversigt over de undersøgte ekstrakters (fra DBA medium) cytotoxicitet, angivet som antal fortyndinger et givent ekstrakt skal gennemgå før mere end 80% af det tilsatte gule farvestof MTT omdannes til lilla formozaner).

Resultater fra det syntetiske medium viste (ikke illustreret her), at hverken ekstrakter fra *P. caseifulvum* eller *P. camemberti* var toksiske. Samtidig sås de to undersøgte *P. roqueforti* ekstrakter at være 3-4 fortyndingstrin mere toksiske, hvilket stemmer godt overens med, at arten er kendt for at producere mykotoxiner som roquefortiner og PR-toxin på syntetiske medier. Disse stoffer produceres under normale omstændigheder ikke på Danablu eller blå hvide oste. Ekstrakter fra Danablu agar mediet gav helt andre resultater, idet ekstrakter af *P. roqueforti* nu var non-toksiske ligesom kontrol ekstrakter, mens *P. caseifulvum* og *P. camemberti* ekstrakter derimod var toksiske fra første til tredje fortyndingstrin (tabel 3). I gennemsnit var der således meget lille forskel på de to arters cytotoxicitet og resultaterne stemmer således med de kemiske data, der har vist, at de to arter er meget ens.

Når man ser på cytotoxiciteten af ekstrakter fra de øvrige 9 arter dyrket på DBA ses alle at være cytotoxicke (tabel 3). Ekstrakterne fra *P. nalgiovense* ses at være de mest cytotoxicke. Hovedkomponenterne i *P. nalgiovense* ekstrakterne var diaportiner, en gruppe af isocoumariner på flere end de fem, som er blevet beskrevet i dette projekt (figur 6) (7). Vi har dog ikke testet de rene stoffers cytotoxicitet.



Figur 6. Nye diaportiner fra *P. nalgiovense* (dichlorodiaporin, diaporinol og diaporinsyre) (7).

Desuden ses ét *P. discolor* og ét *A. versicolor* isolat at være betydeligt mere toksiske end andre isolater af samme art. Når man ser på HPLC profilerne for de to isolater af sidstnævnte art sås meget store kemiske forskelle, hvilket forklarer MTT-test resultatet. Årsagen til at ekstraktet af de ene *P. discolor* isolat er så relativt mere toksisk end de to øvrige er derimod sværere at forklare idet kromatogrammerne for de tre ekstrakter ser meget ens ud. Dette tyder på at toksiciteten skyldes forskelle i mængder på nogle af de mindre komponenter.

De øvrige ekstrakter var alle middel toksiske, hvilket der ikke umiddelbart kan konkluderes noget ud fra. Mange mykotoksiner er ikke cytotoxicke og giver derfor intet eller kun ringe udslag i testen, eksempelvis sås de to ekstrakter af *P. crustosum* at indeholde store mængder af det tremorgene toksin penitrem A.

#### 4. Konklusioner

Projektet har bidraget med ny viden angående sekundær metabolitdannelse fra skimmelsvampe på ost. Således er der på basis af de metoder, som er udviklet i projektet blevet oprenset omkring 25 svampemetabolitter, hvoraf det er lykkedes at karakterisere de 20, hvoraf 10 har været nye.

Blandt de fem metabolitter, som det endnu ikke er lykkedes at oprense og karakterisere er nogle af de tilsyneladende mange farvestoffer, som dannes i små mængder af *Penicillium caseifulvum* både på Danablu oste og på en række forskellige syntetiske medier.

Mange af de nye stoffer er sammen med en række allerede kendte stoffer påvist for første gang i svampeekstrakter fra kontamineret Danablu oste eller fra overflade kulturer dyrket på et oste baseret medium.

Kemisk karakterisering af *P. caseifulvum* isolater fra fire danske mejerier og nogle få isolater af udenlandsk oprindelse har vist at alle eksisterende isolater har meget ensartede profiler af sekundære metabolitter.

Ved sammenligning af *P. caseifulvum* med *P. camemberti* mht. aromadannelse og toksisitet har det vist sig, at de to arter er meget ensartede. *P. caseifulvum* danner store mængder af aromastoffer, som er kendte fra *P. camemberti*. Når ekstrakter af de to arter testes vha. den såkaldte MTT-test findes det, at de to arter er stort set lige toksiske. Alt i alt indikerer resultaterne i projektet således, at *P. caseifulvum* foruden at være kontaminant på Danablu oste, ligeså godt kan betragtes som en potentiel ny starterkultur, hvilket den tilsyneladende allerede bruges som i Tyskland.

Fysiologiske undersøgelser har vist, at farvestofdannelse er mest udtalt ved lavt pH og ved lave fosfat koncentrationer, mens saltkoncentrationen er korreleret til vækst. Dette stemmer godt overens med, at de største problemer med misfarvning ses om sommeren, hvor der netop er lavt fosfat indhold i mælken. Resultaterne peger derfor på at mejeriindustrien, ved at styre pH, salt og fosfat indholdet i Danablu oste under deres fremstilling, herigennem har mulighed for at hæmme den uønskede farvestofdannelse.

Projektet har samarbejdet med en lang række eksterne partnere og andre forskningsprojekter omkring kemisk karakterisering af andre oste associerede arter end *P. caseifulvum*. Af vigtige resultater kan nævnes, at det alene ved analyse af flygtige stoffer er muligt at identificere de tre arter *P. roqueforti*, *P. carneum* og *P. paneum*, hvoraf de to sidstnævnte ofte fejlidentificeres som *P. roqueforti* (14). Tilsvarende har det vist sig, at oste (og kød) associerede *Penicillium* isolater, der producerer ochratoxin A, desuden producerer en række andre unikke stoffer, som ikke produceres af ceriale associerede OTA producerende arter. Resultaterne tyder klart på, at der er tale om to selvstændige arter, *P. nordicum* og *P. verrucosum* (13).

Endeligt har projektet medvirket til opbygning af en ny videnplatform omkring naturstofkemi i Levnedsmiddelcenteret på Institut for Bioteknologi, Danmarks Tekniske Universitet. Projektet har allerede været grundlagsskabende for to andre projekter bevilget i Forskningsråds regi (FØTEK3 projektet: "The role of secondary metabolites on fungal activities in foods" og STVF rammebevillingen: "Predictive biotechnology and functional biodiversity: intelligent screening and phenotypic informatics", begge projekter der udføres på Institut for Bioteknologi på Danmarks Tekniske Universitet).

## Dokumentation

### Følgende artikler er publiceret i (eller er underarbejning til) internationale tidsskrifter

1. Larsen, T.O., Frisvad, J.C. & Christophersen, C. (1998). Arabenoic acid, a major chemical indicator of *Penicillium verrucosum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**, 463-465.
2. Larsen, T.O., Frydenvang, K., Frisvad, J.C. & Christophersen, C. (1998). UV-guided isolation of alantrypinone, a novel *Penicillium* alkaloid. *Journal of Natural Products* **61**, 1154-1157.
3. Larsen, T.O. (1998). Aroma production by *Penicillium caseifulvum*. *International Dairy Journal* **8**, 883-887.
4. Larsen, T.O. & Smedsgaard, J. (1998). Fungal metabolites in chemotaxonomy. In: *Natural Product Analysis. Chromatography, Spectroscopy, Biological Testing*. (Eds. P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf & W. Schwab). Braunschweig, Viewig, pp. 389-391. ISBN 3-528-06923-6.
5. Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C., Anthoni, U. and Christophersen, C. (1999). Consistent production of penigequinolone A and B by *Penicillium scabrosum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**, 329-332.
6. Sørensen, D., Larsen, T.O., Christophersen, C., Nielsen, P.H. and Anthoni, U. (1999). Solistatin, an aromatic compactin analogue from *Penicillium solitum*. *Phytochemistry* **51**, 1027-1029.
7. Sørensen, D., Larsen, T.O., Christophersen, C., Nielsen, P.H. and Anthoni, U. (1999). Dipodazine, a diketopiperazine from *Penicillium dipodomyis*. *Phytochemistry* **51**, 1181-1183.
8. Larsen, T.O. and Breinholt, J. (1999). Dichlorodiaportin, diaportinol and diaportinic acid, three novel isocoumarins from *Penicillium nalgiovense*. *Journal of Natural Products* **62**, 1182-1184.
9. Larsen, T.O. (2000). Karakterisering af sekundære stoffer fra skimmelsvampe på ost. *Mælkeritidende* **7**, 196-200.
10. Larsen, T.O., Frydenvang, K. and Frisvad, J.C. (2000). UV-guided screening of benzodiazepine producing species in *Penicillium*. *Biochemical Systematics and Ecology* (in press).
11. Suhr, K.I., Haasum, I. & Larsen, T.O. (200X). Factors effecting growth and pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *International Dairy Journal* (submitted).
12. Larsen, T.O. and Svendsen (200X). Chemical characterization of the two ochratoxin producing *Penicillium* species, *P. verrucosum* and *P. nordicum*. *Applied. & Environmental Microbiology* (submitted).
13. Larsen, T.O., Frisvad J.C., Christophersen, C. and Gareis, M. (200X). Chemical and biological characterization of cheese associated fungi. *Journal of Food and Agricultural Chemistry* (in prep).
14. Larsen, T.O. (200X). Chemistry of *Penicillium roqueforti*, *P. carneum* and *P. paneum* on cheese, meat and bread. *Journal of Food and Agricultural Chemistry* (in prep).
15. Larsen, T.O., Smedsgaard, J.S., Lund, F., Frisvad, J.C. (2000). Chemical characterisation of cheese associated fungi. Proceedings from the 22. Mycotoxin Workshop, Bonn, June 5-7, *Mycotoxin Research* (in press).

## Følgende foredrag og posters er præsenteret i projektperioden:

### 1996

17 April. Industrial contact programme, DTU. Oral presentation "Kemiske forbindelser fra skimmelsvampe på ost".

July 27 to 31. The 37th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, University of California, Santa Cruz. Oral presentation: "Secondary metabolites from fungi related to dairy products".

15 November. Visit at the group of professor John E. Smith at Strathclyde University, Glasgow. Oral presentation: "Pigments from cheese associated fungi".

### 1997

26-30 July. The 38th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. University of Iowa, Iowa City. Oral presentation: "New metabolites from penicillia related to cheese".

25 August. International symposium arranged by the Phytochemical Society of Europe. Bioassay Methods in Natural Product Research. Biomedical Centre, Uppsala University, Sweden, August 24th to 27th. Oral presentation: "Chemoconsistency of secondary metabolites produced by penicillia".

29 Sep. - 1 Oct. *Natural Product Analysis. Chromatography, Spectroscopy, Biological Testing.* University of Würzburg, Germany. Poster: Larsen, T.O. & Smedsgaard, J. "Fungal metabolites in chemotaxonomy".

7 Nov. Mejeriforskningsdag 1997. University of Århus. Poster: Larsen, T.O. & Jakobsen, H. "Kemisk karakterisering af sekundær metabolitdannelse fra skimmelsvampe på ost" and the poster: Nielsen, P.V., Larsen, T.O., Haasum, I., and Nielsen, M.S. "Fysiologi, økologi og resistensforhold hos skimmelsvampe på ost"

13 Nov. Oral presentation at Department of General and Organic Chemistry at the University of Copenhagen: Natural product chemistry of food related fungi".

26 Nov. Oral presentation at the Royal Danish School of Pharmacy: "Secondary metabolites from food related fungi. Methods for sampling & analysis, chemotaxonomy and pigments".

### 1998

29-30 Jan. LMC Congress, DTU. Poster: Larsen, T.O. & Jakobsen, H. "Kemisk karakterisering af sekundær metabolitdannelse fra skimmelsvampe på ost" and the poster: Suhr, K., Haasum, I., Larsen, T.O., and Nielsen, P.V. "Physiological Characterization of *Penicillium caseifulvum*: A fungus causing yellow discolouration of Blue cheese"

20 April. Oral presentation during a visit at University of California Santa Cruz, at Department of Chemistry and Biochemistry with Professor Phil Crews: "Identification of food-borne microfungi by fingerprinting of secondary metabolites".

22 April. Oral presentation during visit at University of California Santa Cruz, at Department of Chemistry and Biochemistry with Professor Phil Crews: "UV-guided isolation of new fungal metabolites".

6 May. Oral presentation at Department of Organic Chemistry, Technical University of Denmark: "Food related fungi and natural product chemistry, at Department of Biotechnology, DTU".

28-29 May. Frontiers in Food Biotechnology, DBC IV, Munkebjerg hotel, Vejle. Poster: Larsen, T.O. "Natural product chemistry from cheese related fungi" and the poster: Haasum, I., Suhr, K., Larsen, T.O., and Nielsen, P.V. "Physiological Characterization of *Penicillium caseifulvum*: A fungus causing yellow discolouration of Blue cheese".



1-2 September. Oral presentation: "Chemical characterization of fungal metabolites", during the first COST ACTION 835 meeting of the working group 4 (Chemical and biological characterization of toxic metabolites). National Veterinary and Food Research Institute, Helsinki, Finland.

8 December. Organizer of the half day meeting: "Kemi og skimmelsvampe" at the Technical University of Denmark.

### **1999**

24 February. Oral presentation: "Characterization of fungal metabolites at DTU, DK", at a mini-meeting of the working group 4 (COST ACTION 835: Chemical and biological characterization of toxic metabolites). Federal Centre for Meat Research (BAFF), Kulmbach, Germany.

22 April. Scientific meeting with professor Alejandro F. Barrero and his group at the University of Granada, Spain. Oral presentation: "Food related fungi and natural product chemistry, at the Technical University of Denmark".

5-8 September. BIODIVERSITY. A source of new leads for the pharmaceutical and agrochemical industries. University of St. Andrews, Scotland. Poster: T.O. Larsen, "Chemoconsistency of microfungus species in drug discovery".

28 October. Oral presentation at IBT, DTU. (Ny viden): "Skimmelsvampe og deres kemi". (Lecture given to 3.g. class from Herning Gymnasium).

10 December. Organizer of the one day danish seminar: "Natural Product Chemistry" at the Technical University of Denmark. Oral presentation: "Fungal Chemistry in Food Research".

