

Afslutningsrapport

Moderne levnedsmiddelmykologiske metoder i relation til hygiejne

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1996-12

Juli 1996



mejeriforeningen

danish dairy board

Slutrapport for FØTEK-samarbejdsprojekt

Moderne levnedsmiddelmykologiske metoder i relation til hygiejne

MEDARBEJDERE:

Lektor Ole Filtenborg, Institutet for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby (Projektleder). Tlf. 45 25 26 20. FAX 45 88 49 22

Civilingeniør Flemming Lund, Institutet for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby. Tlf. 45 25 26 22. FAX 45 88 49 22

FORORD:

Projektets medarbejdere vil gerne takke Mejeribrugets ForskningsFond og Statens Teknisk Videnskabelige Forskningsråd for økonomisk støtte til projektet. Vi vil endvidere takke Mejeriforeningen for en konstant og særdeles inspirerende interesse og opbakning af projektet i det samarbejde, der er foregået i styregruppen for projektet.

RESUMÉ (dansk):

Projektet har tilvejebragt ny viden vedrørende de skimmelsvampe, der har kvalitetsferringende virkning på osteprodukter af både dansk og udenlandsk oprindelse. Ud fra et meget omfattende prøvemateriale, er det blevet fastlagt at nogle få specifikke arter er hovedansvarlige for kvalitetsferringelsen. Disse arters taxonomiske tilhørsforhold er blevet detaljeret beskrevet ud fra deres morfologiske, fysiologiske, teknologiske og toksikologiske egenskaber og der er udviklet rutinemæssige påvisnings- og identifikationsmetoder. Der er tale om en helt ny metodetype, der foruden at være simplere og hurtigere, samtidigt er mere specifik end de hidtil

benyttede metoder. Metoderne har med held været afprøvet på enkelte virksomheder for at finde frem til og kontrollere kritiske punkter for skimmelsvampeinfektion af produkterne. Disse nye principper for forebyggelse og kontrol med skimmelsvampe, kan benyttes indenfor andre levnedsmidler, hvor vækst af skimmelsvampe giver anledning til kvalitetsproblemer.

ABSTRACT (English):

The project has provided new knowledge about spoiling fungi in cheese products. Investigations of a substantial amount of samples from Denmark and other countries, have revealed that a few specific species are dominating in the spoilage of cheese. These critical species have been taxonomically described from their morphological, physiological, technological and toxicological characteristics and methods for routine detection and identification have been developed. These methods are fundamentally different from the previously used methods in being specific as well as more simple and faster. The methods have been successfully implemented in a few factories to identify and control critical fungal infection points in the production-environment. These new principles for prevention and control of fungi can be used for foods in general.

FORMÅL:

At identificere og karakterisere de skimmelsvampearter, der bevirker kvalitetsforringelse af mejeriprodukter. At udvikle og afprøve specifikke påvisnings- og identifikations metoder for disse arter, med henblik på rutinemæssig anvendelse i kvalitetsstyring indenfor mejeriindustrien.

BAGGRUND:

Én af de vigtigste holdbarhedsbegrænsende faktorer for mejeriprodukter (især ost) er vækst af skimmelsvampe. Skimmelsvampene vides at kunne forårsage misfarvninger, ændringer i smag, lugt og konsistens, samt at danne stofskifteprodukter med antibiotisk og toksisk virkning (mykotoksiner).

I litteraturen er angivet at et stort antal arter især indenfor skimmelsvampeslægterne *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* og *Cladosporium* er isoleret fra ost. Vækst af disse skimmelsvampe har indtil videre ført til at følgende mykotoksiner er påvist i oste: Ochratoxin A, sterigmatocystin og penitrem A, toksiner som på forsøgsdyr er vist at forårsage alvorlige sygdomme på lever og nyre (bl.a. cancer), på nervesystemet, samt at svække organismens immunsystem. Det store antal

påviste skimmelsvampe på ost betyder imidlertid en risiko for at et langt større antal mykotoksiner kan forventes at forekomme.

Den bedste måde at sikre mejeriprodukternes holdbarhed, er at forebygge at skimmelsvampeinfektionerne, dvs. at bekæmpe skimmelsvampene i selve produktionsmiljøet. Det store antal kvalitetsforringende arter, der hidtil er påvist på ost, vanskeliggør imidlertid denne bekæmpelse i væsentlig grad. Der er dog grund til at tro at dette antal kan reduceres betydeligt, idet de seneste års forskning indenfor skimmelsvampe-taxonomi har fundet en snæver artstilknytning af vigtige egenskaber som dannelse af bestemte mykotoksiner og vækstkrav. I dette projekt tages denne problematik op for så vidt angår skimmelsvampe, der vokser på ost, med henblik på at udvikle optimale metoder til deres bekæmpelse og kontrol.

RESULTATER:

1. De kvalitetsødelæggende skimmelsvampe i mejeriprodukter.

Da skimmelsvampeproblemer på mejeriprodukter erfaringsmæssigt er størst på ost, er dette projekt koncentreret om forskellige ostetyper.

1.1. Identifikation af skimmelsvampe fra inficerede faste og halvfaste oste.

Fra 371 osteprøver med synlig vækst af skimmelsvampe er den ansvarlige skimmelsvampeart blevet isoleret og identificeret. Prøverne er dels uindpakkede oste indsamlet på danske mejerier, og dels indpakkede oste af dansk og udenlandsk oprindelse.

Table 1: Skimmelsvampearter på inficerede faste og halvfaste uindpakkede oste (A) fra danske mejerier og indpakkede oste (B) fra forskellige lande.

Art	A	B	Total	Land
<i>Penicillium commune</i>	78 ^a (6) ^b	76	154	Danmark, Grækenland, Frankrig, UK, Australien, Tyskland, USA, Belgien, Japan, New Zealand, Czekiet, Holland
<i>P. nalgiovense</i>	69(3)	12	81	Danmark, Grækenland, Czekiet
<i>P. sp.</i> ^c	26(1)	0	26	
<i>P. verrucosum</i>	2(1)	17	19	Danmark, Grækenland, Spanien, Schweiz
<i>P. solitum</i>	1(1)	17	18	Danmark, Grækenland, Spanien
<i>P. roqueforti</i>	1(1)	14	15	Danmark, Tyskland, Australien, Grækenland, Malta, Costa Rica
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	11(1)	1	12	Danmark
<i>Aspergillus versicolor</i>	10(3)	1	11	Grækenland
<i>Penicillium crustosum</i>	-	6	6	Danmark, Italien, Frankrig, UK
<i>P. atramentosum</i>	2(1)	3	5	Norge, Frankrig
<i>P. discolor</i>	-	4	4	Danmark
<i>P. chrysogenum</i>	1(1)	3	4	Danmark, USA
<i>Cladosporium spp.</i>	3(1)	0	3	
<i>Penicillium echinulatum</i>	-	3	3	Australien, Sydafrika
<i>P. brevicompactum</i>	1(1)	1	2	Danmark
<i>P. rugulosum</i>	1(1)	1	2	Danmark
<i>Fusarium oxysporum</i>	2(2)	0	2	
<i>Verticillium lecanii</i>	2(2)	-	2	
<i>Fusarium solani</i>	1(1)	0	1	
<i>Mucor racemosus</i>	1(1)	0	1	
Total	212	159	371	

^a Antal prøver ^b Antal mejerier ^c Uidentificerede arter

Det fremgår af tabel 1 at 3 skimmelsvampearter er ansvarlig for mere end 70% af de inficerede prøver, nemlig arterne: *Penicillium commune*, *P. nalgiovense* og en endnu ukendt *Penicillium* art. Af disse arter er *Penicillium commune* den klart vigtigste ostekontaminant, dels talmæssigt,

men også fordi den blev isoleret fra prøver på alle mejerier og alle lande. Andre arter forekommer under specielle betingelser eller sporadisk. Således er *Penicillium nalgiovense* især fundet på kitoste, hvor den gamle kit bliver genanvendt. Den ukendte "*Penicillium* sp." blev fundet på et enkelt mejeri ved en enkelt lejlighed, i øvrigt uden påviselig forklaring.

Mykologiske metoder til osteindustrien skal altså først og fremmest tage sigte på at påvise *Penicillium commune*, hvilket betyder en klar forenkling af metodeudviklingen.

Tabel 2: Vigtige kvalitetsødelæggende skimmelsvampearter på ost og nogle udvalgte sekundære metabolitter (mykotoksiner), som de kan danne.

Art	Udvalgte sekundære metabolitter
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocystin
<i>Penicillium atramentosum</i>	Oxalin, rugulovasin A og B
<i>P. chrysogenum</i>	Meleagriner, roquefortin
<i>P. commune</i>	Cyclopiazonsyre, cyclopaldinsyre, cycloopenin, cycloopenol, palitantin, rugulovasin A og B, viridicatin
<i>P. crustosum</i>	Penitrem A, roquefortin C, terrestrinsyre, viridicatin
<i>P. echinulatum</i>	Penichiner
<i>P. discolor</i>	Chaetoglobosin
<i>P. roqueforti</i>	Isofumigaclavin A, PR-toxin, roquefortin C
<i>P. solitum</i>	Compactin, cycloopenin, cycloopenol, viridicatin
<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin A

1.2 Taxonomiske problemer vedrørende *P. commune*

Umiddelbart er ovennævnte resultater i modstrid med hvad der fremgår af litteraturen, som beskrevet tidligere, hvor et stort antal arter i flere slægter er påvist fundet på ost. I nærværende projekt er disse arter undersøgt nærmere og det har vist sig at der i langt de fleste tilfælde var tale om fejlidentifikationer, således at de fundne arter faktisk tilhører arten *Penicillium commune*. Årsagen til fejlidentifikationerne er at mange mykologer kun benytter de meget svært skelnelige morfologiske forskelle på arterne i *Penicillium* til identifikationen. I dette projekt er benyttet en kombination af disse forskelle og de meget mere specifikke forskelle i arternes dannelse af sekundære metabolitter (se tabel 2), hvilket giver en langt sikrere identifikation.

Under projektet dukkede endnu et taxonomisk problem op. Det viste sig nemlig at nogle af de *Penicillium commune* isolater, vi havde rekvireret fra andre forskere, som værende isoleret fra ost, tilhørte en ny art. Denne art har nu fået et tidligere anvendt navn, nemlig *Penicillium palitans* og er under projektet jævnligt blevet isoleret fra luften i mejerierne, men ikke fra vækst på selve osten. Det er i øvrigt sandsynligt at de rekvirerede isolater har en lignende oprindelse, idet man ofte i artikler glemmer at skelne mellem skimmelsvampe, der er i aktiv vækst på et levnedsmiddel og skimmelsvampe, der blot er hvilende på levnedsmidlet f.eks. i form af sporer.

1.3 Identifikation af skimmelsvampe fra inficerede *Penicillium roqueforti*-fermenterede oste

Fra 4 mejerier blev der fra prøver af *Penicillium roqueforti*-fermenterede oste, som havde en synlig gullig til orange misfarvning af overfladen isoleret en skimmelsvampeart af ukendt identitet. Både fysiologisk og morfologisk minder den meget om *Penicillium camemberti*, men der er dog så signifikante forskelle at der er tale om en ny art. Arten har nu fået navnet *Penicillium caseifulvum* (en *Penicillium*, der farver ost brun) og en artsbeskrivelse bliver publiceret i nærmeste fremtid.

Undersøgelser på mejerierne viste at *Penicillium caseifulvum* var lige så udbredt i produktionsmiljøet som *Penicillium roqueforti*. Endvidere kunne *Penicillium caseifulvum* isoleres fra overfladen af ostene på alle trin i produktionen fra den koagulerede mælk til den færdige ost. Infektionen blev først synlig under ostenes afsluttende lagring, hvor man kunne se svampens vækst overalt på osteoverfladen. Der sker med andre ord en konstant og automatisk infektion af ostene med denne skimmelsvamp i produktionsmiljøet og den vokser side om side med *Penicillium roqueforti* dog kun i ostens overflade.

I nærværende projekt er det ikke blevet undersøgt hvilken indflydelse *Penicillium caseifulvum*'s vækst eventuelt har på kvaliteten af den færdige ost. Det er imidlertid sandsynligt at den er årsag til de misfarvningsproblemer, der er konstateret. Arten har nemlig et stærkt orangefarvet substratmycelium på visse substrater og i et andet FØTEK-projekt er det konstateret at denne farve skifter fra gul til orange afhængigt af substratets pH og saltindhold. Så når skimmelsvampen er tilstede konstant i osten, mens misfarvningsproblemerne kun opstår i perioder, kan det skyldes produktionsforskelle af ovennævnte type. Det bør undersøges nærmere hvilken indflydelse *Penicillium caseifulvum* har på ostens kvalitet i øvrigt.

2. Påvisnings- og identifikationsmetoder for de kvalitetsødelæggende skimmelsvampe i ost.

Som tidligere nævnt er *Penicillium commune* den altdominerende kvalitetsødelæggende art på faste og halvfaste ostetyper. Det er derfor i dette projekt valgt at udvikle metoder til påvisning af denne art.

Metoden baseres på skimmelsvampens fremvækst på et selektivt substrat (CREAD = Creatine Sucrose Dichloran agar), samt dannelse af sekundære indolmetabolitter i dette substrat.

2.1. Selektivt substrat til påvisning af *Penicillium commune*

Her er som udgangspunkt valgt substratet CREA (Creatine Sucrose agar), som tidligere undersøgelser har vist er selektivt for 16 *Penicillium* arter heriblandt *Penicillium commune*. Der er foretaget nogle få ændringer i dette substrat for at komme frem til substratet CREAD, som har følgende sammensætning:

Creatine (1 H ₂ O)	3 g
Sucrose	30 g
KCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ , 7 h ₂ O	0,5 g
Chloramphenicol	0,05 g
Dichloran	0,002 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,005 g
Agar	20 g
Destilleret vand	1000 ml

Efter autoklavering tilsættes 0,05 g chlortetracyclin og pH justeres til 4,8.

I forhold til substratet CREA er fjernet en indikator (bromcresole purpur) for at få et farveløst substrat og der er tilsat dichloran for at hæmme væksten af hurtigtvoksende skimmelsvampeslægter.

På CREAD hæmmes væksten af mange af de skimmelsvampetyper, som ikke har betydning for ostekvaliteten, men som forekommer generelt i levnedsmiddelproduktions-miljøer, som f.eks. *Penicillium chrysogenum* og *Penicillium brevicompactum*. Der findes dog et begrænset antal arter, som ikke har betydning for ostekvaliteten, men som kan vokse på dette substrat. Talrige undersøgelser i ostemejerier har imidlertid vist at kun ganske få af disse arter findes i dette produktionsmiljø og kun i meget lave tal. For at sikre at det kun er *Penicillium commune*, der

registreres på substratet CREAD, er det derfor nødvendigt med en supplerende test. Til dette formål er valgt påvisning af udvalgte sekundære metabolitters dannelse i CREAD.

2.2 Påvisning af sekundære indol-metabolitter i *Penicillium commune* på CREAD.

Penicillium commune vides blandt andet at danne de sekundære metabolitter cyclopiazonsyre og rugulovasin A og B. Disse stoffer hører til gruppen af indolmetabolitter, som dannes af adskillige *Penicillium* arter. Det er imidlertid forholdsvis få arter blandt dem, der kan vokse på CREAD, der kan danne disse metabolitter. Disse metabolitter er derfor inddraget i identifikationen af *Penicillium commune* i dette projekt.

Tidligere undersøgelser har vist at skimmelsvampes dannelse af sekundære metabolitter, kan påvises simpelt ved hjælp af tyndtlagskromatografi. I dette projekt er denne påvisning gjort endnu mere simpel og hurtig, nemlig ved anvendelse af papirkromatografi. Dette har kunnet lade sig gøre fordi der kun er behov for en uspecifik påvisning af én type sekundære metabolitter, nemlig indolmetabolitter.

Følgende metode til påvisning af indol metabolitter er udviklet (**Ehrlich-testen**):

- Dyrkning af kulturer på CREAD ved 25°C i 7 dage
- Whatman filter papir No. 1 (eller lignende) skæres i firkanter (f.eks. 6x12 mm)
- En agarprop skæres ud nær kulturens centrum med rustfrit stålrør (4 mm indre diameter)
- Agarproppen fjernes fra kulturen
- Et stykke udskåret filterpapir, fugtet med Ehrlich reagens^a påsættes agarproppens myceliedel.
- Efter max. 10 minutter aflæses papiret:

Violet ring: Indol metabolitter dannes

Farveløs eller gul ring: Indol metabolitter dannes ikke

^a Ehrlich reagens: 4-Dimethylaminobenzaldehyd (2 g) opløst i 96% ethanol (85 ml) og tilsat 37% saltsyre (15 ml).

Den nyudviklede metode er testet på alle de *Penicillium* arter, der kan vokse på CREAD, med følgende resultat:

Violet reaktion	Gul reaktion	Farveløs
<i>P. camemberti</i> (7) ^a <i>P. commune</i> (46) <i>P. discolor</i> (11) <i>P. expansum</i> (9) <i>P. roqueforti</i> (13)	<i>P. atramentosum</i> (8) <i>P. coprophilum</i> (8) <i>P. crustosum</i> (10) <i>P. concentricum</i> (8) <i>P. vulpinum</i> (8)	<i>P. coprobium</i> (10) <i>P. echinulatum</i> 8(9) <i>P. glandicola</i> (7) <i>P. hispanicum</i> (2) <i>P. solitum</i> (48) <i>P. spinulosum</i> (3) <i>P. carneum</i> (5)

^a Antal isolater, der er undersøgt

Kulturer med violet reaktion benævnes **Ehrlich positive**, de øvrige kulturer **Ehrlich negative**. Som det fremgår af ovennævnte tabel er der 4 arter, der som *Penicillium commune*, er Ehrlich positive på CREAD.

2.3 Procedure til påvisning og identifikation af *Penicillium commune* ved osteproduktion.

1. Der podes på substratet CREAD (fra luft, maskiner, ost, eller andet)
2. Inkubering af CREAD i 7 dage ved 25°C
3. Forskelligt udseende kolonier på CREAD undersøges med Ehrlich-testen
4. De **Ehrlich positive** kolonier registreres^a

^a Efter de erfaringer som talrige afprøvninger på mejerier har givet indtil nu vil de Ehrlich positive kolonier i de fleste tilfælde være *Penicillium commune*. Hvad angår de øvrige 4 arter, som er nævnt i tabellen i afsnit 2.2, kan de sorteres fra således: *Penicillium camemberti* og *Penicillium discolor* er specifikt knyttet til bestemte osteproduktioner, henholdsvis camembertost og natamycinbehandlet ost og forekommer kun der. *Penicillium roqueforti* kan let kendes på sin sorte kolonibagside og *Penicillium expansum* på sin kraftige sporedannelse. De to sidstnævnte kan på denne baggrund nemt skelnes fra *Penicillium commune*.

3. Afprøvning af den udviklede påvisnings- og identifikationsmetode for *Penicillium commune* på mejerier.

Den udviklede metode har været afprøvet på flere mejerier til at påvise kritiske infektionspunkter i produktionsmiljøet. Følgende kritiske punkter blev påvist: 1) Genanvendelse af kit, 2) ikke rengjort ventilator til tørring af ost og 3) luftindblæsning fra lokale med kasseret ost.

I alle tilfælde førte en ubedring af de opdagede fejl til en signifikant forbedring af ostens holdbarhed. Det er altså ofte få veldefinerede punkter i produktionsforløbet, der er særdeles vigtige årsager til skimmelsvampe infektioner.

Det er ikke lykkedes at opstille grænseværdier for *Penicillium commune* i produktionsmiljøet. Men det er vores erfaring, at selv små, men vedvarende påvisninger af denne art bør følges op af bekæmpelses foranstaltninger. Virksomhederne bør nu bruge denne metode til at indsamle det nødvendige datamateriale til at fastlægge mere præcise lokale grænseværdier.

Den rutinemæssige skimmelsvampeidentifikation på virksomhederne bør iøvrigt altid omfatte skimmelsvampevækst på systematisk udtagne osteprøver til holdbarhedskontrol. Dette for at registrere hvis en anden art end *Penicillium commune*, f.eks. som følge af væsentlige produktions ændringer, bliver den dominerende kvalitetsødelæggende art. Hvis dette skulle ske, kan Mykologigruppen på IBT på DTU kontaktes med henblik på en ændring af den benyttede metode.

DOKUMENTATION:

Der er bl.a. holdt følgende indlæg ved nationale og internationale kongresser og møder:

Lund, Flemming: Detection of indole metabolites from *Penicillium* species using a filter paper method. Third International Workshop on Standardisation of Methods for the Mycological Examination of Foods, København. 25 - 30 juni, 1994.

Lund, Flemming: Skimmelsvampe i mejeriprodukter. Mejeribrugsdag, Forening af mejeriingeniørstuderende, KVL, Frederiksberg, 27.2.1993

Lund, Flemming: Skimmelsvampe i ost - anvendelse, påvisning og bekæmpelse. Danmarks Mejeritekniske Selskab, Østergårds Hotel, Herning, 11.3.1993

Følgende artikler er publiceret i internationale tidsskrifter og bøger:

Lund, F. (1995) Mycological methods for detecting the associated fungae of cheese and rye bread in relation to hygiene. *Department of Biotechnology, Technical University of Denmark*. Ph. D. Thesis.

Lund, F., Filtenborg, O. and Frisvad, J.C. 1995. Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12:173-180.

Lund, F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20:228-231.

Lund, F. (1996) Direct identification of the common cheese contaminant *Penicillium commune* in factory air samples as an aid to factory hygiene. *Letters in Applied Microbiology* **22**.

Lund, F. (1995) Diagnostic characterization of *Penicillium palitans*, *P. commune* and *P. solitum*. *Letters in Applied Microbiology* **21**, 60-64.

Nielsen, P. V. & Lund, F. Mould growth on cheese; significance and methods for control. Book of abstracts, Food Micro '93, Novel approaches towards food safety assurance, The international committee on food microbiology and hygiene, 1993.

Damsgaard, E., Lund, F. & Filtenborg, O.. Kvalitetsforringende skimmelsvampe skal bekæmpes effektivt. Foreningen af mejeriledere og funktionærer. Dansk Mejeriingeniør Forening. Odense. *Mælkeritidende* 23 (11): 580-581, 1993.

