

Section: Biology and Microbiology

DOI 10.70286/EOSS-20.10.2025.001

ВПЛИВ РІЗНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ НА РІСТ І РОЗВИТОК ЦВІЛЕВОГО ГРИБА *PENICILLIUM ROQUEFORTI*– ОСНОВНОГО МІКРООРГАНІЗМУ СИРІВ З БЛАКИТНИМИ ПРОЖИЛКАМИ

Данилюк Максим

здобувач вищої освіти магістерського рівня

Юлевич Олена

науковий керівник, к.т.н., доцент

Кафедра біотехнології та біоінженерії

Миколаївський національний аграрний університет, Україна

Анотація. У роботі досліджено вплив складу різних поживних середовищ на ріст і морфологічний розвиток цвілевого гриба *Penicillium roqueforti*. Порівняно чотири середовища з різним вмістом вуглецевих, азотних і мінеральних компонентів (PDA, CZA, PLA, CSSA). Встановлено, що швидкість росту, інтенсивність спороутворення та морфологічні особливості колоній залежать від поживного складу середовища. Найінтенсивніший ріст та накопичення біомаси спостерігалися на картопляно-декстрозному агарі (PDA), тоді як найвищу щільність спороутворення зафіксовано на пептонно-лактозному агарі (PLA). Середовище Чапека-Докса (CZA) забезпечувало мінімальний рівень росту, а сирне напівсинтетичне середовище (CSSA) характеризувалося ознаками протеолізу казеїну та формуванням щільних колоній. Виявлено, що поживний статус материнського міцелію визначає життєздатність і швидкість проростання спор. Отримані результати мають прикладне значення для оптимізації процесів культивування *P. roqueforti* у біотехнології, зокрема при розробці високоефективних стартових культур для виробництва сирів із благородною пліснявою.

Ключові слова: *Penicillium roqueforti*, поживне середовище, міцелій, конідії, спори, стартова культура.

Введення. Сир є складною мікробною екосистемою, що складається з широкого спектру різних мікроорганізмів. Наприклад, у виробництві сиру молочнокислі бактерії використовуються як закваска для продукування кислоти, тоді як дріжджі, цвіль, інші бактерії та гетероферментативні лактобактерії беруть участь у процесі дозрівання. Крім того, грибові штами сприяють формуванню специфічних органолептичних характеристик [3, 5].

Використання видимого грибкового міцелію було одним із найперших підходів у виробництві сиру 4000 років тому. Сири з пліснявою є популярними, але не виробляються масово (3% від загального обсягу виробництва сиру в світі та до 8% від усього сиру, виробленого в Європі). Вони мають характерний зовнішній вигляд, типовий аромат і смак завдяки своїм складним процесам дозрівання [11]. Плісняві сири поділяються на два підтипи. Перший – це сири з поверхневою пліснявою, такі як Камамбер і Брі, які зазвичай дозрівають під впливом *Penicillium camemberti*, утворюючи оксамитову білу кірку. Другий – сири, що дозрівають з внутрішньою пліснявою (з синіми прожилками) (Данаблю, Рокфор, Стілтон і Горгонзола, що дозрівають за допомогою *Penicillium roqueforti*) [5, 6].

P. roqueforti – один із тринадцяти видів нитчастих грибів, що застосовуються в молочній промисловості. Це добре досліджений вид із технологічної точки зору, основним джерелом існування якого є природне середовище, що не завжди відповідає вимогам харчового виробництва [8]. Останні дослідження зосереджені на морфологічних, метаболічних і генетичних особливостях *P. roqueforti*, який традиційно визначають за морфологією колоній на специфічних живильних середовищах [1]. Зазвичай на картопляно-декстрозному агарі (PDA) та солодовому екстрактному агарі він виявляє високу макроскопічну мінливість коліру і текстури колоній, а також ширини їх краю. Однак PDA є найбільш дискримінаційним для макро- та мікроскопічної оцінки гриба [5].

Розуміння того, як різні поживні середовища впливають на основні показники росту та розвитку *P. roqueforti*, є важливим як для фундаментальної науки, так і для біотехнології. Це дозволяє не тільки прогнозувати поведінку гриба в різних умовах, але й оптимізувати процеси культивування для максимального виходу біомаси, спор або цільових метаболітів.

Мета і задачі дослідження. Визначити вплив складу різних поживних середовищ на ріст і розвиток *Penicillium roqueforti* з метою оптимізації умов його культивування для біотехнологічного використання у виробництві сирів з блакитними прожилками. Для досягнення поставленої мети було проведено порівняння ростових показників культури на чотирьох середовищах із різним вмістом вуглецевих, азотних і мінеральних компонентів, визначено швидкість росту та кінетику спороутворення, а також встановлено найбільш оптимальне середовище для активного росту гриба.

Результати дослідження і їх обговорення. Дослідження проводили в умовах мікробіологічної лабораторії ПрАТ «Лакталіс-Миколаїв». У всіх експериментах використовували один промисловий штам *Penicillium roqueforti*, що підтримувався в аксеничній культурі для усунення міжштамової варіабельності. Для підготовки інокуляту гриб вирощували на картопляно-декстрозному агарі (PDA) протягом 7-10 діб при температурі 25°C. Конідії збирали шляхом змивання поверхні культури стерильним водним розчином

0,01% Твін 80, який запобігає агрегації спор. Кінцеву концентрацію спорової суспензії стандартизували за допомогою камери Горяєва (гемоцитометра) до 1×10^6 конідій/мл. Для дослідження було підготовлено чотири експериментальні агаризовані середовища. Всі середовища стерилізували автоклавуванням при 121°C протягом 15 хвилин. Початкове значення рН було доведено до $5,6 \pm 0,1$. Склад середовищ наведений у таблиці 1. Даний етап експерименту виконували згідно з методикою [10].

Таблиця 1 – Склад досліджуваних поживних середовищ для культивування *Penicillium roqueforti*

№	Компонент (г/л)	Середовище			
		Картопляно-декстрозний агар (PDA)	Чапека-Докса (CZA)	Пептонно-лактозний агар (PLA)	Сирне напівсинтетичне (CSSA)
1	Картопляний екстракт	20	-	-	-
2	Декстроза (глюкоза)	20	-	-	-
3	Сахароза	-	30	-	-
4	Лактоза	-	-	20	15
5	Пептон	-	-	10	-
6	Міцелярний казеїн	-	-	-	25
7	Молочна кислота	-	-	-	5
8	NaCl	-	-	-	20
9	NaNO ₃	-	2,0	-	-
10	K ₂ HPO ₄	-	1,0	1,0	-
11	MgSO ₄ ×7H ₂ O	-	0,5	0,5	-
12	KCl	-	0,5	-	-
13	FeSO ₄ ×7H ₂ O	-	0,01	-	-
14	Агар	15	15	15	15

Умови культивування та оцінка морфологічних характеристик, біомаси і спороутворення проводились за наступною методикою [2, 9]. Чашки Петрі діаметром 90 мм, що містили 20 мл відповідного середовища, інокулювали в центрі краплею (5 мкл) стандартизованої спорової суспензії. Культивування проводили в темряві при температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 10 діб. Діаметр колоній вимірювали у двох взаємно перпендикулярних напрямках з інтервалом у 24 години, з фіксацією ключових показників на 3, 5, 7 та 10 добу для детального аналізу. Текстуру колоній, топографію поверхні, край, а також пігментацію фіксували візуально на 3, 5, 7 та 10 добу. Інтенсивність пігментації оцінювали за якісною шкалою (наприклад, бліда, помірна, інтенсивна синьо-зелена). На 10 добу три реплікативні колонії з кожного середовища збирали, обережно відокремлюючи міцеліальний килимок від агару. Зібраний міцелій висушували при 70°C до постійної ваги, після чого визначали середню суху вагу в міліграмах (мг) згідно з [4]. З центру зрілих 10-добових колоній вирізали агаровий блок площею 1 cm^2 . Спори суспендували в 10 мл 0,01% розчину Твін 80, і їх

концентрацію визначали за допомогою камери Горяєва. Результати виражали як кількість спор на 1 см² поверхні колонії.

Для аналізу проростання, за методикою [12], конідії збирали з 10-добових колоній, вирощених на кожному з чотирьох середовищ. Спори двічі відмивали в стерильному фосфатно-сольовому буфері (PBS) для видалення залишків поживних речовин і ресуспендували до концентрації 1×10^5 конідій/мл у мінімальному середовищі для проростання (10 мМ глюкози в PBS, pH 5,6). Суспензії інкубували при 25°C. Щогодини відбирали аліквоти для мікроскопічного аналізу. Конідію вважали пророслою, якщо довжина її ростової трубки дорівнювала або перевищувала діаметр спори. Для кожної часової точки підраховували щонайменше 300 конідій. Кінетику проростання кількісно оцінювали за такими параметрами: лаг-фаза (λ , час до 10% проростання), час до 50% проростання (τ) та максимальний відсоток проростання ($P_{\max}$) через 24 години.

Згідно з отриманими результатами дослідження, швидкість радіального росту колоній *P. roqueforti* продемонструвала виражену залежність від складу поживного середовища (рис. 1). Найінтенсивніший ріст спостерігався на картопляно-декстрозному агарі (PDA), який є багатим на легкозасвоювані вуглеводи, амінокислоти та вітаміни. На 10 добу середній діаметр колоній на цьому середовищі досяг $78,3 \pm 2,5$ мм. Дуже близькі показники росту були зафіксовані на пептонно-лактозному агарі (PLA), де кінцевий діаметр становив $75,8 \pm 2,8$ мм, що свідчить про ефективну утилізацію лактози та пептону як джерел вуглецю та азоту. Помітно повільніший ріст спостерігався на сирному напівсинтетичному середовищі (CSSA), де діаметр колонії на 10 добу склав $62,1 \pm 2,3$ мм. Це, ймовірно, пов'язано з вищими енергетичними затратами на синтез позаклітинних протеаз для розщеплення казеїну, а також з інгібуючим впливом високої концентрації NaCl (2%) та молочної кислоти. Найбільш суттєво ріст був пригнічений на середовищі Чапека (CZA), де кінцевий діаметр колоній ледь досягав $49,2 \pm 1,9$ мм. Це очікуваний результат, оскільки CZA є мінімальним середовищем, де гриб змушений синтезувати всі необхідні компоненти з простих неорганічних солей та сахарози, що вимагає значних метаболічних зусиль.

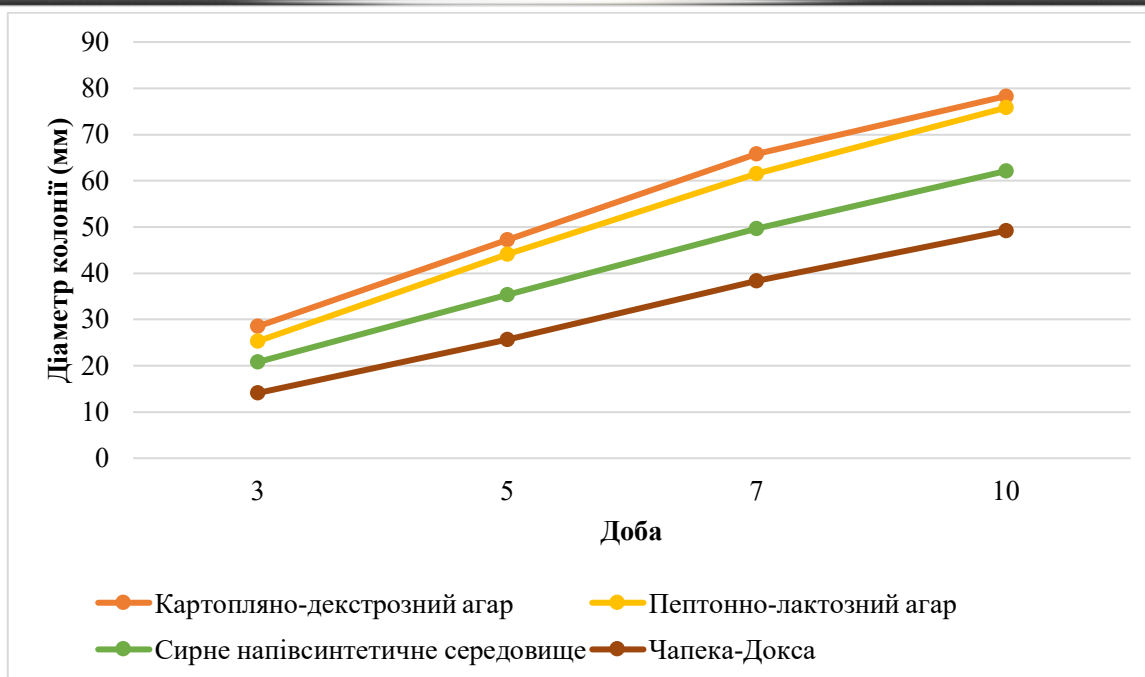


Рисунок 1. Динаміка радіального росту *P. roqueforti* на чотирьох різних поживних середовищах

Окрім кількісних відмінностей у швидкості росту, культура *P. roqueforti* продемонструвала значну морфологічну пластичність, утворюючи колонії з унікальними характеристиками на кожному типі середовища (табл. 2). На PDA колонії характеризувалися швидким, експансивним ростом, формуючи щільний, оксамитовий міцеліальний килимок. Пігментація з'являлася рано (вже на 3 добу) і розвивалася до глибокого, рівномірного синьо-зеленого кольору. Реверс колоній був забарвлений у блідо-жовті або бежеві тони, що є типовим для цього гриба на стандартних середовищах. На CZA ріст був помітно обмеженим. Колонії були тоншими, з більш ниткоподібною (філаментозною) або павутиноподібною текстурою та радіальним патерном росту, особливо по краю. Спороутворення було менш щільним, а синьо-зелена пігментація – менш інтенсивною і з'являлася пізніше, ніж на PDA. Реверс залишався переважно незабарвленим. На PLA колонії були міцними та щільними, схожими на ті, що росли на PDA, але часто мали більш пухку (флокозну) або пучкову текстуру поверхні, що є відомим ефектом впливу пептону на морфологію *Penicillium*. Спороутворення було надзвичайно щільним, надаючи колонії порошкоподібного вигляду. Реверс демонстрував виразну пігментацію, часто червонуватого або коричневого відтінку. На CSSA колонії демонстрували помірний ріст, але були компактними та добре інтегрованими з середовищем. Ключовим спостереженням було утворення ледь помітної зони просвітлення навколо колонії, що свідчить про протеоліз казеїну. Текстура була щільною, але менш оксамитовою, ніж на PDA, а синьо-зелений колір був інтенсивним, що вказує на сильну адаптацію до цього субстрату.

Таблиця 2 – Динаміка росту та морфологічні особливості *Penicillium roqueforti* на різних поживних середовищах

№	Параметр	Доба	Середовище			
			PDA	CZA	PLA	CSSA
1	Діаметр колонії (мм)	3	28,5±1,2	14,1±0,8	25,3±1,5	20,8±1,1
		5	47,2±1,8	25,6±1,1	44,1±2,0	35,4±1,4
		7	65,8±2,1	38,4±1,5	61,5±2,2	49,7±1,9
		10	78,3±2,5	49,2±1,9	75,8±2,8	62,1±2,3
2	Пігментація	-	Інтенсивна, рівномірна синьо-зелена	Помірна, плямиста синьо-зелена	Інтенсивна, темно-синьо-зелена	Інтенсивна, сіро-зелена
3	Текстура колонії		Оksamитова, щільна	Тонка, ниткоподібна, павутиноподібна	Флокозна, порошкоподібна, пучковата	Щільна, злегка зморшкувата
4	Топографія поверхні		Пласка з ледь піднятим центром	Пласка, радіальна	Піднятий центр, концентричні кільця	Центрально піднята, радіальні борозни
5	Край		Рівний, чітко окреслений	Нерівний, арахноідальний	Рівний, з білим міцеліальним обідком	Злегка лопатевий, окреслений
6	Колір реверсу		Блідо-жовтий до бежевого	Незабарвлений	Червонувато-коричневий	Кремово-жовтий з коричневим центром

*дані сформовано автором

Спостережувані морфологічні відмінності не є випадковими; вони є макроскопічними проявами різних стратегій розвитку та метаболізму, які гриб застосовує при використанні кожного конкретного середовища. Оксамитовий, експансивний ріст на PDA відображає стратегію швидкого засвоєння поживних речовин та їх конверсії в біомасу в середовищі, де ресурси не є лімітуючими. Це класична стратегія «буму і спаду» (r-стратегія), спрямована на максимальне захоплення простору за сприятливих умов. Тонка, радіальна, «пошукова» морфологія на CZA є класичною відповіддю на дефіцит поживних речовин. Гриб витрачає менше енергії на формування щільних міцеліальних структур і більше – на подовження гіфів назовні для дослідження більшої площі в пошуках дефіцитних ресурсів. Флокозна текстура та надзвичайно інтенсивне спороутворення на PLA вказують на те, що специфічна комбінація лактози та пептону діє як потужний індуктор безстатевого розмноження. Пептон надає готові амінокислоти, що оминає необхідність їх синтезу *de novo* і дозволяє спрямувати ресурси безпосередньо на виробництво спор. Компактний, щільний ріст та ознаки протеолізу (зона просвітлення) на CSSA свідчать про стратегію «експлуатації». Гриб інвестує енергію у виробництво позаклітинних ферментів

для розщеплення складних субстратів (казеїну), що є ключовою властивістю для його ролі в дозріванні сиру.

Продукція біомаси, виміряна як суха вага міцелію на 10 добу, корелювала з забезпеченістю середовищ поживними речовинами. Найвищий вихід міцеліальної маси було досягнуто на PDA, де середня вага однієї колонії становила 215 ± 12 мг. Це підтверджує, що склад картопляного екстракту та глюкози забезпечує оптимальні умови для вегетативного росту. Високі показники були також на PLA (198 ± 15 мг/колонію) та CSSA (185 ± 11 мг/колонію), що вказує на ефективне використання лактози, пептону та казеїну. На відміну від них, середовище Чапека (CZA) забезпечило значно нижчий вихід біомаси – лише 78 ± 7 мг/колонію. Ці результати узгоджуються з дослідженням Kour et al. [7], де показано, що збагачені середовища, які містять складні джерела азоту (наприклад, казеїнові гідролізати), дають високий вихід біомаси, тоді як мінімальні середовища з неорганічним азотом – значно нижчий. Цікаво, що щільність спороутворення не прямо залежала від накопиченої біомаси. Найвища щільність спор спостерігалася на пептонно-лактозному агарі (PLA), досягаючи $8,5 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$ спор/см². Це значно перевищує показники на інших середовищах. На PDA та CSSA були отримані високі, але дещо нижчі щільності спороутворення – $6,2 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$ та $5,8 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$ спор/см² відповідно. Найнижча щільність спор була зафіксована на середовищі Чапека (CZA) – $2,1 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ спор/см², хоча візуально спороутворення на цьому середовищі починалося відносно рано, що може бути стресовою реакцією.

Кінетика проростання конідій продемонструвала значну залежність від середовища, на якому вони були утворені та вказує на те, що якість спор, а не лише їх кількість є важливим параметром. Спори, зібрані з PLA та CSSA, показали найшвидше проростання. Вони мали коротку лаг-фазу ($\lambda \approx 3-4$ години) і швидко досягали 50% проростання ($\tau \approx 8-9$ годин). Спори з PDA також проростали швидко, але з дещо довшими показниками ($\lambda \approx 4$ години, $\tau \approx 10$ годин). Натомість спори, зібрані з бідного на поживні речовини середовища Чапека-Докса, показали значно уповільнене проростання. Лаг-фаза для них була суттєво довшою ($\lambda \approx 7$ годин), а час досягнення 50% проростання був майже вдвічі довшим, ніж для спор з повноцінних середовищ ($\tau \approx 16$ годин). Максимальний відсоток проростання ($P_{\max}$) був високим для всіх груп ($>95\%$), але для спор, отриманих з CZA, цей показник досягався значно пізніше.

Результати демонструють чіткий «материнський ефект» або «поживне попереднє кондиціонування» на життєздатність безстатевих спор. Поживний статус батьківської колонії визначає кількість та якість метаболічних резервів (наприклад, ліпідів, трегалози, поліолів), які «запаковуються» в конідії під час їх формування.

Спори є не просто сплячими клітинами, а автономними одиницями, що містять увесь необхідний апарат та енергію для ініціації росту.

Батьківський міцелій, що росте на збагаченому, складному середовищі,

такому як PLA або CSSA, може дозволити собі повноцінно забезпечити свої спори поживними речовинами. Такі спори є «добре нагодованими» і можуть швидко активувати свої метаболічні шляхи та синтезувати новий клітинний матеріал після отримання сигналу до проростання, що призводить до короткої лаг-фази та швидкої появи ростової трубки.

Батьківський міцелій на стресовому, мінімальному середовищі, як CZA, обмежений у ресурсах. Він виробляє спори як засіб виживання, але ці спори забезпечені лише мінімально необхідними резервами. Потрапивши в нове середовище, їм потрібно більше часу для відновлення клітинних компонентів, активації ферментів та початкового поглинання поживних речовин, перш ніж вони зможуть розпочати проростання. Це пояснює подовжену лаг-фазу.

Це має надзвичайне біотехнологічне значення для промислового виробництва стартових культур. Метою є не просто отримання великої кількості спор, а виробництво високоякісних спор, які забезпечать швидку та рівномірну колонізацію сирного згустку.

Висновки. Проведене дослідження всебічно продемонструвало високу фенотипічну пластичність *P. roqueforti* у відповідь на зміни в поживному середовищі. Було встановлено, що не існує єдиного «найкращого» середовища; оптимальний вибір повністю залежить від бажаного результату. Кожне середовище індукує унікальний набір фізіологічних та морфологічних відповідей, що відображає різні стратегії виживання та розмноження гриба.

Середовище, яке використовується для виробництва інокуляту, є критичним параметром процесу, що безпосередньо впливає на ефективність кінцевого продукту. Культивування *P. roqueforti* на середовищі типу PLA або на середовищі на основі сирних компонентів є кращим для виробництва високоефективної стартової культури порівняно з використанням загального середовища, як PDA.

На основі отриманих даних можна запропонувати рекомендації для оптимізації промислових процесів. Для виробництва стартових культур *P. roqueforti* може бути доцільною двостадійна стратегія культивування: перша стадія в рідкому середовищі, оптимізованому для нарощування біомаси (аналогічно профілю PDA), з подальшим перенесенням на твердий субстрат, подібний до PLA, для максимізації спороутворення та якості спор. Результати, отримані на середовищі CSSA, переконливо свідчать, що включення компонентів сиру, таких як казеїн, до складу виробничого середовища може бути новою стратегією для попередньої активації гриба. Це потенційно може підвищити його ферментативну активність та ефективність під час подальшого дозрівання сиру, скорочуючи час дозрівання та покращуючи органолептичні властивості кінцевого продукту.

Список використаних джерел

1. Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. d. G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., & Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin

- production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *LWT*, 89, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.053>
2. Chen, Y., Li, B., Zhang, Z., & Tian, S. (2017). Induction and Quantification of Patulin Production in *Penicillium* Species. *BIO-PROTOCOL*, 7(11). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2324>
3. Copetti, M. V. (2019). Fungi as industrial producers of food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 25, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.006>
4. Daou, M., Farfan Soto, C., Majira, A., Cézard, L., Cottyn, B., Pion, F., Navarro, D., Oliveira Correia, L., Drula, E., Record, E., Raouche, S., Baumberger, S., & Faulds, C. B. (2021). Fungal Treatment for the Valorization of Technical Soda Lignin. *Journal of Fungi*, 7(1), 39. <https://doi.org/10.3390/jof7010039>
5. Doğan, M., & Tekiner, İ. H. (2021). Evaluating starter culture potential of wild *Penicillium roqueforti* strains from moldy cheeses of artisanal origin. *Food Bioscience*, 43, 101253. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101253>
6. Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R. C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., & Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Molecular Ecology*, 29(14), 2639–2660. <https://doi.org/10.1111/mec.15359>
7. Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Singh, J., Rastegari, A. A., & Saxena, A. K. (2019). Agriculturally and Industrially Important Fungi: Current Developments and Potential Biotechnological Applications. Y Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi (c. 1–64). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_1
8. Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
9. Maheva, E., Djelveh, G., Larroche, C., & Gros, J. B. (1984). Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 6(2), 97–102. <https://doi.org/10.1007/bf00127297>
10. Nakhchian, H., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Mohebi, M. (2025). Application predictive modelling of *Penicillium roqueforti* germination in environmental conditions in cake. *Czech Journal of Food Sciences*, 43, 8–16. <https://doi.org/10.17221/84/2024-cjfs>
11. Paul, S., & Joshi, S. R. (2022). Industrial Perspectives of Fungi. Y Industrial Microbiology and Biotechnology (c. 81–105). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_3
12. Punt, M., Teertstra, W. R., & Wösten, H. A. B. (2021). *Penicillium roqueforti* conidia induced by L-amino acids can germinate without detectable swelling. *Antonie van Leeuwenhoek*, 115(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01686-5>