

УДК 582.281

ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА

© 2011 г. Д. А. Андриянова*, Я. Э. Сергеева*, Г. А. Кочкина***, Л. А. Галанина*, А. И. Усов**, Е. П. Феофилова*

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117312

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991

***Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццоно, 142290

e-mail: feofilov@inmi.host.ru, biolog1@migmail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2010 г.

Разработаны методы получения клеточных стенок (КС) для представителей муконовых грибов и грибов аскомицетного аффинитета на стадии мицелия и покоящихся клеток – спор. Чистоту КС оценивали электронно-микроскопическим способом, специфическими методами окрашивания, контролем промывных вод, по наличию рибозы и дезоксирибозы, а также новым критерием – сравнение содержания хитина в целых клетках и КС грибов. Обсуждается значение предлагаемых методов получения чистых фракций КС и изучения их углеводного состава для хемосистематики мицелиальных грибов.

Клеточная стенка (КС) грибов впервые была описана в начале XVIII столетия, но длительное время практически не изучалась. В начале XX века началось ее интенсивное исследование, но в основном у растений и бактерий. Активное развитие грибоводства и биотехнологических производств, в которых в качестве продуцентов биологически активных веществ использовались мицелиальные грибы, сделали необходимым изучение КС грибов. Результаты исследований КС грибов до 80-х годов прошлого столетия были обобщены в работе [1]. В последующие годы были проведены основополагающие исследования, посвященные изучению химического состава КС, апикального роста и лизиса гиф, метаболизма хитина, антигрибных препаратов, гидрофобин, ковалентно связанных белков, ферментов, участвующих в образовании КС, ветвления гиф и лизиса КС [2–12].

Изучение биологической функции КС и ее химического состава в значительной степени зависит от метода выделения этой структуры и определения степени чистоты фракции КС. Так, например, традиционно считалось, что в КС мицелия муконовых грибов не содержится глюкан, а этот полисахарид характерен только для КС спор [13]. Однако в последние годы было показано, что у муконового гриба *Gongronella butleri* USDB 0201 в мицелии присутствует хитозан-глюкановый комплекс [14]. Между тем, современная хемосистематика грибов рассматривает отсутствие глюкана у Mucorales как один из важнейших систематических признаков. Кроме того, наличие такого аминополисахарида как хитозан, традиционно рассматриваемого в качестве харак-

терного признака при определении муконовых грибов, не установлено у грибов семейства Cunninghamhamellaceae, в частности у *Cunninghamella japonica* [15]. Возможно, что подобные различия в результатах исследований обусловлены методами выделения КС, которые должны обеспечить отсутствие трудно удаляемого цитоплазматического загрязнения во фракции КС.

Особенность предлагаемых в работе методов состоит в том, что они могут быть использованы на разных стадиях онтогенеза, в частности, на стадии активно растущего мицелия (трофофаза), стадии торможения ростовых процессов (идиофаза) и стадии перехода к образованию покоящихся клеток (спор). Используемые методы дают возможность получать чистые фракции КС грибов разных систематических групп как низших (муконовые), так и анаморфных грибов аскомицетного аффинитета, а также таких мало изученных клеточных структур, как половые клетки Mucorales – зигоспоры.

Цель работы – разработка методов выделения КС мицелиальных грибов, проверка чистоты полученных фракций, а также изучение углеводного состава КС грибов на стадии мицелия и образования покоящихся клеток – спор.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Работу проводили с мицелиальными грибами, представителями низших грибов и анаморфных грибов аскомицетного аффинитета.

Исследовали гетероталлические штаммы *Cunninghamella japonica* (синоним — *C. echinulata*) ВКМ F-470(–), ВКМ F-471(+), ВКМ F-776(–), ВКМ F-775(+), ВКМ F-626(–), ВКМ F-1204(–), *C. homotalica* ВКМ F-930 (семейство Cunninghamellaceae) и *Absidia coerulea* ВКМ F-858 (+) и ВКМ F-859 (–), (семейство Mucoraceae), оба семейства входят в порядок Mucorales [16]. Для более подробного изучения были отобраны штаммы *C. japonica* ВКМ F-1204(–) и *Absidia coerulea* ВКМ F-859 (–).

Из анаморфных грибов аскомицетного аффинитета исследовали *Penicillium roqueforti* ВКМ F-3057 (отдел Ascomycota, класс Eurotiomycetes, порядок Eurotiales, семейство Trichocomaceae).

Все штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Кроме этих штаммов, использовали также гетероталлические штаммы *Blakeslea trispora* Т(+), Т(–) и *Aspergillus niger* из коллекции ИНМИ РАН.

Методы культивирования. Для получения максимального количества спор и интенсификации процесса спорообразования в условиях твердофазного культивирования использовали посев в матрацах на агаризованные среды (2%): картофельную, картофельно-морковную, с сусликом (7° по Баллингу), овсяную, 25%-ную глицерин-нитратную, кукурузно-соевую, с молочной сывороткой, Чапека, Чапека с добавлением дрожжевого экстракта и Чапека с добавлением 0.01% трегалозы. Для исследуемых грибов наиболее интенсивный процесс спорообразования наблюдался на суслико-агаре с добавлением трегалозы при температуре 27–28°C.

Зигоспоры муконовых грибов получали на суслико-агаре в чашках Петри, для чего на поверхность среды наносили кусочки агаровой среды с выращенным 3–4-суточным мицелием (+) и (–) штаммов. В процессе роста при смыкании растущего поверхностного мицелия образовывалась темная полоса шириной 1.5–2.0 см, содержащая преимущественно зигоспоры.

Для глубинного культивирования грибов (27–28°C, 250 об/мин) использовали как естественные (с сусликом, картофельно-морковная, кукурузно-соевая), так и синтетические (среда Гудвина с аспарагином и среда Галаниной с нитратом аммония [17]) питательные среды. В качестве посевного материала использовали водную суспензию 10–12-суточных спор, вносимых в колбу с питательной средой в количестве 3.0×10^6 – 3.9×10^6 спор/мл среды. Для анализа использовали мицелий в стадии трофофазы (40–48 ч) или идиофазы (70–75 ч).

Методы получения чистой фракции КС мицелия. Для получения КС отделенный от культуральной жидкости мицелий промывали водой и гомогенизировали 15 мин при 4°C (Homogenizer type MPW-324, Poland). Биомассу отфильтровывали на капроновом фильтре, отмывали водой и процедуру гомогениза-

ции повторяли. Отмытый вегетативный мицелий подвергали обработке ультразвуком (Ultrasonic disintegrator type UD-20 Techpan (Poland), 3 мин, 4°C, 22 кГц) с последующей длительной промывкой водой. Предварительно было установлено, что отмывка КС детергентом Na–ДДС или 8 М мочевиной, которые рекомендуются для удаления цитоплазматического загрязнения, может привести к разрушению КС и потере ряда соединений, в частности хитина. Для дальнейшего изучения углеводного состава КС мицелия, полученные КС обезжиривали, используя последовательную обработку смесью этанол–хлороформ (2 : 1 и 1 : 2) и затем либо обрабатывали диэтиловым эфиром, либо лиофилизировали и хранили при температуре 7–8°C в холодильнике.

Следует отметить, что разрушение КС и извлечение липидов у грибов, синтезирующих каротиноиды, имеет свои особенности. В данном случае, для извлечения каротиноидов используется жидкий азот и диметилсульфоксид, после чего проводится экстракция метанолом и хлороформом [19].

Метод получения фракции спор и их КС. Для получения фракции спор грибов рода *Cunninghamella* споры смывали с поверхности 12-суточной культуры гриба, растущего на суслико-агаре в матрацах, водой, охлажденной до 4°C. Большее количество спор можно получить, предварительно измельчив в гомогенизаторе волокнообразный поверхностный мицелий, снятый с поверхности чашки Петри [20]. Для того, чтобы избежать прорастания спор эта процедура должна происходить максимально быстро, так как споры этих грибов обладают способностью прорастать в воде через 30–40 мин при температуре 27–28°C. В то же время конидии *P. roqueforti* начинают прорастать в воде только через 23–26 ч, что облегчает условия работы со спорами этой культуры.

Отделение спор от остатков поверхностного мицелия проводили путем встряхивания на шейкере с последующим фильтрованием через капроновый фильтр. Контроль чистоты фракции спор осуществляли методом микроскопии. Осаждение чистой фракции спор грибов рода *Cunninghamella* проводили с помощью центрифугирования (Allegra, Beckman Coulter (USA), 7500 g, 4°C, 35 мин). Конидии *P. roqueforti* гидрофобны, не осаждаются при центрифугировании и для их сбора лучше использовать фильтрование через матерчатый фильтр.

Для получения фракции КС полученные споры дважды замораживали жидким азотом, подвергали оттаиванию и обработке на аналоге пресса Хьюджа (метод твердого продавливания — экструзионная дезинтеграция, прибор Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН). Полученный после разрушения материал многократно промывали водой с последующим центрифугированием и обработкой жидким азотом. При необходимости после микроскопического контроля разрушенные споры отделяли от неразрушенных путем

дополнительного центрифугирования в 4.7 М растворе сахарозы (15 мин), затем фракцию КС подвергли обработке УЗ (5 мин) и центрифугировали. После промывки водой, КС обезжиривали для дальнейшего определения их углеводного состава.

Получение чистой фракции зигоспор и их КС. Для отделения зигоспор мукоровых грибов темную полосу в центре чашки Петри вырезали с помощью скальпеля, поверхностный мицелий, содержащий в основном зигоспоры, пинцетом отделяли от агара и гомогенизировали с последующей промывкой на капроновом фильтре. Полученный материал подвергли действию УЗ (5 мин, 4°C) в водной среде. После микроскопического контроля разрушенный материал фильтровали через капроновое сито (размер пор около 300 мкм). Полученный фильтрат, в котором кроме зигоспор, могут присутствовать спорангиоспоры, обрывки воздушного мицелия и спораносцы, центрифугировали 10 мин при 3000 g. При необходимости после микроскопического контроля повторяли этапы обработки УЗ и фильтрования [21]. Водную суспензию осадка осторожно насливали на 3.65 М сахарозу и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Находящиеся в верхнем слое зигоспоры отделяли и далее после отмывания водой пропускали через капроновый фильтр и собирали. Для получения КС зигоспор проводили их разрушение методом экструзионной дезинтеграции. Разрушенные зигоспоры многократно промывали водой центрифугировали, подвергали действию УЗ и пропускали через капроновые фильтры. Полученные КС обезжиривали для дальнейшего определения их углеводного состава.

Для контроля чистоты выделяемых КС применяли световую и просвечивающую микроскопию, последнюю проводили на электронном микроскопе JEM-100CXII (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Экстракцию липидов из целых клеток и КС, определение количества общих липидов, анализ фракционного состава фосфолипидов, получение метиловых эфиров жирных кислот проводили согласно [18].

Для определения содержания (% от суммы) нейтральных моносахаров, уроновых кислот и глюкозамина проводили обезжиривание КС с использованием системы растворителей этанол–хлороформ (2 : 1 и 1 : 2). Далее нейтральные моносахариды переводили в ацетаты путем гидролиза образцов КС под действием 2 М трифторуксусной кислоты (100°C, 8 ч) и анализировали методом ГЖХ на хроматографе Hewlett Packard 5890A (USA), снабженном пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-1MS в токе азота при градиенте температур от 160 до 260°C, со скоростью 7°C в мин. Идентификацию проводили при сравнении времени удерживания компонентов смеси со стандартами, количественное определение – с помощью

программы Мультихром 15 (Россия). Определение уроновых кислот в этом же гидролизате проводили реакцией с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой. Глюкозамин определяли по цветной реакции с ацетилацетоном и реактивом Эрлиха после гидролиза образцов 8 М соляной кислотой (100°C, 8 ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований подобраны условия глубинного культивирования грибов, обеспечивающие высокий выход биомассы. Установлено, что на среде Галаниной рост исследуемых грибов более стабильный и величина накопленной воздушно-сухой биомассы составляет для мукорового гриба *S. japonica* в трофофазе 9–10 г/л, в идиофазе – 14–16 г/л, для *P. roqueforti* – в трофофазе – 6–7 г/л, в идиофазе – 16–19 г/л.

Проведенные нами электронно-микроскопические исследования показали, что в процессе роста мицелия и в зависимости от действия окружающих факторов, например, температуры, морфология КС значительно изменялась. Это особенно заметно у грибов аскомицетного аффинитета, например, у *A. niger* в условиях культивирования при 30–31°C на конечной стадии идиофазы в отсутствие лизиса КС (т.е. при закислении среды) толщина КС может увеличиваться почти в 2 раза по сравнению с контролем (28°C), появляются инвагинации, при этом в клетках практически отсутствует цитоплазматическое содержимое. У мукоровых грибов толщина КС также заметно изменялась при действии повышенной температуры. Например, у *S. japonica* толщина КС при 32°C достигала 27–28 мкм, в контроле при 27°C – 20–21 мкм. Кроме того, клетки мицелиальных грибов, особенно в стадии ранней трофофазы, характеризовались большим количеством цитоплазматического содержимого, например, водорастворимых белков, а в идиофазе – преобладали липидные включения, которые у грибов семейства Cunninghamellaceae могут составлять до 47–48% от веса сухого мицелия. При подготовке КС для анализа углеводного состава эти липиды извлекаются, что позволяет получать более чистую фракцию КС.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что КС можно получить в большем количестве из клеток грибов, находящихся в стадии идиофазы, а процедура очистки КС при этом может быть несколько облегчена из-за меньшего количества цитоплазматического содержимого на данной стадии развития.

Использованные методы (см. Методику) позволили получить фракции КС, чистоту которых оценивали следующими методами.

1. Окрашивание с флуоресцентным красителем (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в концентрации 1 мкг/мл в 50% этаноле. Отсутствие флуоресценции

Таблица 1. Состав сахаров мицелия (М) и клеточной стенки мицелия (КСМ) на стадии идиофазы *C. japonica* ВКМ F-626(–)

Образец	Моносахариды, % от суммы				Хитин КСМ/хитин М
	фукоза	манноза	глюкоза	галактоза	
Клеточная стенка	–	5.1	69.6	25.9	1.75
Мицелий	1.0	22.7	62.4	13.9	

Таблица 2. Состав целых спор (ЦС) и клеточной стенки спор (КСС) на терминальной стадии спорогенеза *C. japonica* ВКМ F-626(–)

Образец	Моносахариды, % от суммы			Хитин КСС/хитин ЦС
	манноза	глюкоза	галактоза	
Клеточная стенка	18.9	64.26	16.5	1.85
Целые споры	21.4	65.35	13.4	

(голубой свет) свидетельствует об отсутствии ядер в образцах выделенных КС. Если в выделенных препаратах отсутствует ДНК, то можно предположить, что молекулы внутриклеточного содержимого, имеющие меньшую молекулярную массу, отсутствуют в полученных образцах [22].

2. Метод, основанный на реакции взаимодействия йода с хитозаном. Изолированные чистые КС с раствором Люголя окрашиваются в розовый или фиолетовый цвет, в то время как интактные стенки имеют ярко красную окраску [1].

3. Измерение экстинкции промывных вод, которая при 260 и 280 нм не должна быть выше 0.1 (при отмывке 10–15 мг материала в 15–20 мл воды).

4. Микроскопический контроль чистоты КС.

5. ГЖХ углеводов на отсутствие рибозы и дезоксирибозы в гидролизатах КС [23].

Кроме этих критериев для установления чистоты КС, ценную информацию может дать сравнение содержания преобладающих соединений, таких, как, например, углеводы и липиды в целых клетках и КС мицелиальных грибов.

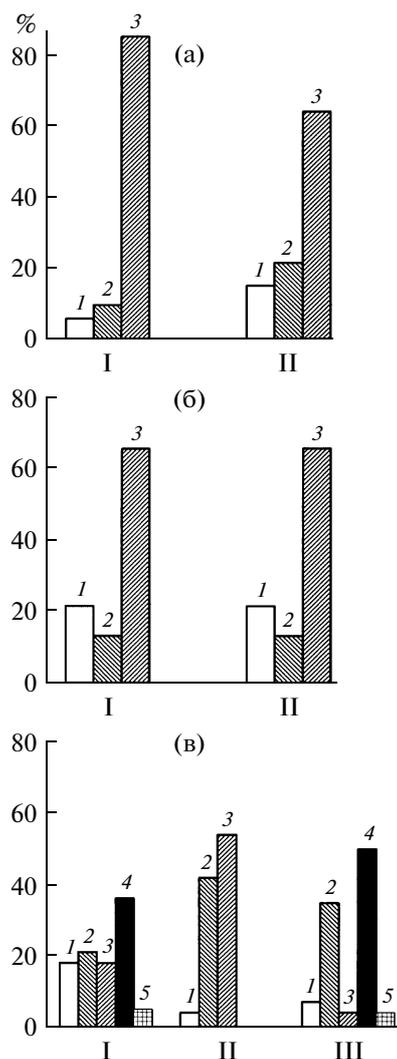
Из результатов, приведенных в табл. 1, следует, что КС *C. japonica* содержит значительно больше хитина, чем мицелий. Содержание этого основного полисахарида может рассматриваться в качестве критерия чистоты КС. Об этом свидетельствует тот факт, что повторная очистка КС не приводит к увеличению содержания хитина в КС гриба и все указанные выше тесты также свидетельствовали о чистоте КС.

Указанный выше критерий чистоты КС – содержание хитина, выявляется еще более наглядно при анализе сахаров КС спор *C. japonica* (табл. 2). Как известно, спора имеет более толстые по сравнению с мицелием КС с повышенным содержанием хитина [1]. Нами показано, что в КС спор *C. japonica* содержится почти в два раза больше хитина, чем в целой покоящейся клетке.

Оценить чистоту КС можно также путем сравнения содержания липидов в целых клетках и КС спрангиоспор и зигоспор мукоровых грибов.

В целых клетках спорангиоспор *A. coerulea* содержится 5.0–6.5% липидов, в то время как в КС их содержание увеличивалось более, чем в 2 раза (13.5–14.3%). Целые зигоспоры характеризовались высоким содержанием липидов (около 40%), содержание которых в КС составляло около 16% (совместные исследования с И.В. Писаревской, Институт иммунологии Минздрав РФ). В то же время, если при получении КС зигоспор пропустить этап их обработки УЗ, то содержание липидов в КС зигоспор увеличивалось практически в 2 раза, за счет цитоплазматического загрязнения, что подтвердило необходимость соблюдения указанных выше обработок. Интересно отметить и тот факт, что зигоспоры *A. coerulea* отличались повышенным содержанием липидов, что характерно и для других представителей порядка Mucogales, например, *Blakeslea trispora* [24].

Различия в составе КС отдельных таксономических групп грибов были установлены еще в начале XVIII в., но этот признак в систематике грибов использовали впервые только в 1921 г. [25]. С тех пор



Изменение в составе моносахаридов (%) клеточных стенок мицелия (I), спор (II) и зигот (III) в процессе дифференцировки *P. roqueforti* (а), *C. japonica* ВКМ F-1204(-) (б), *A. coerulea* (в): 1 – манноза, 2 – галактоза, 3 – глюкоза, 4 – фукоза, 5 – рамноза.

состав КС, как таксономический критерий прочно вошел в систематику грибов [26]. Однако в последние годы состав КС стал широко использоваться и в установлении корреляций между морфогенетическими особенностями грибов и составом биополимеров их КС [27], например, в случае диморфных грибов, когда форма клетки, дрожжевая или мицелиальная, зависит от ее химического состава.

Проведенные в настоящей работе исследования по разработке способов получения КС и определения их химического состава в процессе онтогенеза грибов позволяют высказать ряд соображений о таксономии грибов порядка Mucorales. В настоящее время изучению грибов этого порядка уделяется большое внимание, что связано с их природной деятельностью, патогенностью и использованием в

биотехнологии [28]. В 70-е годы прошлого столетия при исследовании КС грибов рода *Mucor* были установлены закономерности, отличающие мукоровые грибы от других грибов царства Fungi [29]. В процессе онтогенеза этих грибов происходят изменения в составе КС: в споре преобладают глюкоза и меланин, а в мицелии – мукоран и хитозан. Мукоран – полимер КС мицелия практически не содержит глюкозы, а в его составе основным сахаридом является фукоза и уроновые кислоты. Это связано с тем, что при прорастании споры ее КС лизируется, а КС мицелия образуется de novo. Эти изменения получили название “онтогенетической рекапитуляции филогенетической истории КС” грибов порядка Mucorales, так как состав КС их спор предполагал происхождение от Chytridiomycetes и соответствовал остальным грибам царства Fungi.

Согласно данным 2008 года [16], к порядку Mucorales было отнесено 9 семейств. Однако последующие исследования по систематике рода *Absidia* привели к выделению еще двух монородовых семейств – Mucocladaceae и Lichthemiaceae [30]. Именно этот порядок (Mucogales) в последние годы подвергается наибольшей ревизии со стороны микологов-таксономистов. В связи с этим на следующем этапе исследований было проведено сравнение состава КС представителей грибов этого порядка, различающихся по типу спороношения – односпоровые спорангии у *C. japonica* (сем. Cunninghamellaceae), и многоспоровые у *A. coerulea* (сем. Mucogaseae). Для сравнения изучали состав КС у представителя анаморфных грибов аскомицетного аффинитета – *P. roqueforti*. В задачу исследования входило сравнение моносахаридного состава КС грибов на стадии мицелия и зрелых спор (спорангиоспор, конидий и зигоспор).

Из данных, представленных на рисунке, следует, что состав моносахаридов КС спор всех изученных грибов практически идентичен и основными моносахарами являются глюкоза и галактоза. Основные отличия у грибов, принадлежащих к семействам Mucogaseae и Cunninghamellaceae, выявляются только в период активного роста, т.е. на стадии мицелия. На данной стадии онтогенеза отмечены существенные различия в составе КС мицелия: преобладающим моносахаридом у *C. japonica* была глюкоза, а у *A. coerulea* – фукоза.

Таким образом, сравнение моносахаридного состава КС мицелия свидетельствует о существенной разнице между грибами – представителями семейств Cunninghamellaceae и Mucogaseae, различающиеся типами спороношения. При этом состав моносахаров *C. japonica* очень сходен с таковым гриба аскомицетного аффинитета *P. roqueforti*. Кроме того, состав ацильных цепей липидов, который в настоящее время является одним из ведущих хемосистематических признаков, также показывает, что *C. japonica* отличается по жирнокислотному составу липи-

Таблица 3. Состав основных жирных кислот (% от суммы) фосфолипидов целых клеток гетероталлических штаммов *B. trispora* и *C. japonica* ВКМ F-1204(–)

Жирная кислота	<i>B. trispora</i> T(–) штамм	<i>B. trispora</i> T(+) штамм	<i>C. japonica</i> (–) штамм	<i>C. japonica</i> (–) штамм (общие липиды)
C _{16:0}	15.1	15.1	16.9	18.2
C _{16:1}	6.6	3.3	1.5	1.0
C _{17:0}	6.0	3.1	–	сл.
C _{18:0}	3.8	1.0	5.5	16.2
C _{18:1}	13.7	16.5	42.1	46.7
C _{18:2}	51.5	26.4	18.0	11.0
C _{18:3}	–	20.0	5.0	6.1

дов от других представителей пор. *Mucorales*, например, *Blakesalea trispora* (табл. 3) по соотношению ацилов C_{18:1}/C_{18:2} в составе общих липидов и фосфолипидов. Совокупность полученных данных соответствуют последним представлениям о систематике зигомизетов, согласно которым эти грибы не являются монофилетической группой, а представляют собой полифилетическую или парафилетическую группу организмов [16].

С точки зрения филогении и эволюции мицелиальных грибов, представляют интерес данные о моносахаридном составе половых спор – зигоспор – по сравнению с вегетативными спорами на примере *A. coerulea*. Из данных рисунка следует, что состав моносахаридов КС зигоспор значительно отличается от состава моносахаридов КС спорангиоспор, и обнаруживает некоторое сходство с таковым мицелия, так как в мицелии и зигоспорах преобладающими сахарами являются фукоза и галактоза, что свидетельствует о наличии полисахарида мукорана. Если исходить из предположения о том, что наиболее древними являются такие компоненты КС грибов как хитин и глюкан, а предками грибов считают *Chytridiomycetes* [31], то можно предположить, что половой процесс у *Mucorales* возник значительно позднее, что согласуется с современными представлениями, о том, что половой процесс возник на более поздних ступенях эволюции и более примитивным следует рассматривать процесс бесполой репродукции с участием спорангиоспор [32].

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о несомненной значимости изучения состава КС грибов для их таксономии и филогении, а такой критерий как состав моносахаридов полностью зависит от методов выделения КС и установления их чистоты, т.е. отсутствия цитоплазматического загрязнения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09–04–00430.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Феофилова Е.П.* Клеточная стенка грибов. М.: Наука, 1983. 248 с.
2. *Gooday G.W.* // Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi. / Eds. P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.G. Copping. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris: Springer-Verlag, 1990. P. 60–79.
3. *Kuhn P.J., Trinci A.P.J.* // Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi / Eds. P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.G. Copping. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris: Springer-Verlag, 1990. P. 1–30.
4. *Канарская З.А., Гамаюрова В.С., Шабрукова Н.В., Гогелашвили Г.Ш., Грунин Ю.Б., Канарский А.В., Избранова С.И.* // Биотехнология. 2000. № 3. С. 63–66.
5. *Chitnis M., Ghormade V., Deshpande M.V.* // Chitin Metabolism / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Italy: Atec, 2001. P. 541–551.
6. *Wösten H.A.B.* // Annu. Rev. Microbiol. 2001. V. 55. P. 625–646.
7. *Cheng J., Park T.S., Fisci A., Ye X.S.* // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 1. № 18. P. 6198–6209.
8. *El Gueddan N.E., Rauchhaus U., Moerschbacher B.M., Deising H.B.* // New Phytologist. 2002. V. 156. P. 103–112.
9. *Harris S.D., Momany M.* // Fungal Genet. Biol. 2003. V. 41. № 4. P. 391–400.
10. *De Groot P.W.J., Ram A.F., Klis F.M.* // Fungal Genet. Biol. 2005. V. 42. № 8. P. 657–675.
11. *Bowman S.M., Free S.J.* // BioEssays. 2006. V. 28. № 8. P. 799–808.
12. *Klis F.M., Ram A.F.J., De Groot P.W.J.* // Biology of the Fungal Cell, 2nd Edition. The Mycota VIII / Eds. R.H. Howard, N.A.R. Gow. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 111–151.
13. *Bartnicki-Garcia S., Nickerson W.I.* // Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 58. P. 102–119.
14. *Nwe N., Stevens W.F., Tokura S., Tamura H.* // Enzyme Microb. Technol. 2008. V. 42. P. 242–251.

15. *Феофилова Е.П., Терешина В.М.* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 444–448.
16. *Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A.* Dictionary of the Fungi. 10th Edition. Wallingford, Oxon: CABI Publishing, 2008. 771 p.
17. *Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Андриянова Д.А., Феофилова Е.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 576–581.
18. *Кейтс М.* Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 332 с.
19. *Valduga E., Valerio A., Tatsch P., Treichel H., Furigo A., Di Luccio M.* // Food Bioprocess Technol. 2009. V. 2. № 2. P. 234–238.
20. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Полотебнова М.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 4. С. 500–506.
21. *Писаревская И.В., Феофилова Е.П., Марченко И.В.* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 1. С. 124–129.
22. *Мейчик Н.Р., Матвеева Н.П., Николаева Ю.И., Чайкова А.В., Ермаков И.П.* // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1103–1111.
23. *Слонекер Дж.* Методы исследования углеводов. / Ред. А.Я. Хорлин. М.: Мир, 1975. С. 22–25.
24. *Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 449–453.
25. *Schmidt M.* // Arch. Microbiol. 1936. V. 7. P. 241–260.
26. *Феофилова Е.П.* // Микология и фитопатология. 1982. Т. 16. № 2. С. 166–174.
27. *Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н.* Основы микологии. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 220 с.
28. *Кочкина Г.А.* // Новое в систематике и номенклатуре грибов. М.: Национальная Академия микологии – медицина для всех, 2003. С. 106–135.
29. *Bartnicki-García S.* // Annu. Rev. Microbiol. 1968. V. 22. P. 87–108.
30. *Voigt K., Hoffmann K., Einax E., Eckart M., Papp T., Vágvölgyi C., Olsson L.* // Current Advances in Molecular Mycology / Eds. Y. Gherbawy, R.L. Mach, M.K. Rai. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. P. 313–332.
31. *Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасов К.Л.* Водоросли и грибы. М.: Издательский Центр “Академия”, 2006. 320 с.
32. *Левкина Л.М., Тарасов К.Л.* // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14. № 2. С. 170–172.

Filamentous Fungi’s Cell-Wall Extraction at Different Stages of Ontogenesis and Exploration of Their Carbohydrate Composition

D. A. Andriyanova^a, Ya. E. Sergeeva^a, G. A. Kochkina^c, L. A. Galanina^a,
A. I. Usov^b, and E. P. Feofilova^a

^a *Vinogradskii Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

^b *Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^c *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

e-mail: feofilov@inmi.host.ru, biolog1@migmail.ru

Received November 23, 2010

Abstract—Methods of obtaining cell walls (CW) for specimens of mucoraceous molds and ascomycetic affined fungi are developed at the stage of mycelium and resting cells, or spores. CW purity was assessed by electron microscopy, specific staining methods, scourage control, presence of ribose and desoxyribose, and the comparison of chitin content in whole cells and CW of fungi (a new criteria). The authors discuss the significance of the proposed methods of obtaining pure fractions of CW and of the study of their carbohydrate content for the chemotaxonomy of filamentous fungi.