

УДК 582.281.213

СПОРЫ ГРИБОВ: ПОКОЙ, ПРОРАСТАНИЕ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2012 г. Е. П. Феофилова*, А. А. Ивашечкин**, А. И. Алёхин***, Я. Э. Сергеева*

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

e-mail: biolog1@migmail.ru

** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

*** Центральная клиническая больница РАН, Москва, 117593

Поступила в редакцию 31.03.2011 г.

Обзор посвящен одной из стадий онтогенеза, отличающейся особой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов и способностью длительное время сохранять геномный материал — спорам грибов. Основная часть посвящена характеристике особого состояния, свойственного споре, и называемого покоем. Приводятся данные, характеризующие углеводный и липидный состав спор, основное внимание уделяется роли углеводных протекторов, в частности трегалозе и манниту, а также роли рафтов в процессе спорогенеза. Обсуждается роль специальных соединений, называемых аутоингибиторами и аутостимуляторами, в процессе выхода спор из состояния покоя. Заключительная часть посвящена роли спорового посевного материала в биотехнологических процессах. Рассматриваются данные о взаимосвязи химического состава спор с их способностью к сохранению покоя и процессом прорастания. Впервые приводятся специальные биотехнологические приемы, позволяющие путем воздействия на споровый материал, сохранять его всхожесть, интенсифицировать спорогенез, изменять соотношение конечных продуктов ферментации и увеличивать их выход.

Особая форма жизни — спора интенсивно исследуется в настоящее время не только биологами и медиками, но уже давно изучается в связи с представлениями о внеземном происхождении жизни, теорией “вихревых космических туманностей” [1], в которых жизнь, возможно, сохраняется в космосе. Действительно, среди известных организмов эту загадочную форму жизни, благодаря необычной устойчивости к действию неблагоприятных факторов, особому химическому составу и способности длительное время находиться в состоянии, которое определяют как “ни жизнь, но и не смерть”, можно считать лучшим кандидатом, возможно, давшим начало всему живому на планете Земля.

Споры бактерий начали изучаться значительно раньше грибных спор — почти 140 лет тому назад [2]. Интенсивному исследованию спор грибов способствовала работа [3], в которой впервые у грибов подробно рассматривалось состояние, названное покоем [4]. Изучение покоя грибов (гипобиоза), отличающегося по глубине торможения активного метаболизма от анабиоза, значительно расширило наши представления о формах латентной жизни.

Дальнейший интерес к изучению спор грибов и феномену покоя был тесно связан с началом развития биотехнологии (80 годы прошлого столетия), когда было накоплено много данных о том, что состояние спорового посевного матери-

ала является одним из ключевых факторов, влияющих на стабильность ферментаций и выход конечного продукта [5].

Необходимость написания настоящей обзорной работы диктовалась тем, что основные исследования по изучению покоя проводились на прокариотах и растениях, что было связано с исследованием микроорганизмов в глубоководных породах, существованием устойчивых к антибиотикам клеток-персисторов, а также с сохранением семян растительного фонда [6–10]. Покой грибов начал изучаться наиболее интенсивно в начале 21 века [11–13], что было связано с все возрастающей ролью грибов в медицине, пищевых производствах и сельском хозяйстве. Однако существующие работы практически не касаются изменений химического состава клеток грибов при переходе в состояние покоя, в частности в липидном бислое, протекторных углеводах, гормонах, ауторегуляторах. Накопленные данные помогут использовать их в биотехнологии в виде специальных приемов для сохранения полноценного спорового материала и контроля выхода конечного продукта.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПОКОЕ ГРИБНЫХ СПОР

Еще в прошлом веке известный врач Ганс Селье писал, что приспособление к условиям среды является наиболее отличительной чертой жизни.

В настоящее время возникло целое научное направление, которое изучает механизмы, позволяющие организмам адаптироваться к неблагоприятным воздействиям, получившее название “биохимической адаптации”. Впервые три основных типа биохимической адаптации к окружающим условиям были сформулированы еще в 1977 г. [14]: это — изменение макромолекул и их концентрации, а также адаптивная регуляция функции макромолекул. С помощью одного из указанных механизмов или их комбинации организм достигает векторного гомеостаза метаболических функций. Употребление термина “векторный гомеостаз” означает, что в результате изменения метаболизма, вызванного стрессовым воздействием, система способна обеспечить поддержание жизни. В случае очень резкого внешнего воздействия, например голода или изменения температуры, организм практически полностью использует все возможные системы биохимической адаптации, при этом в зависимости от фазы развития грибов изменение метаболизма может сопровождаться резким падением его уровня и интенсивности.

Состояние организма, получившее название покоя, является наиболее совершенным особым состоянием, обеспечивающим сохранение жизни в условиях действия неблагоприятных факторов. Покой отличается от других форм адаптации тем, что он сопровождается у ряда организмов не только метаболическими, но и одновременно резкими морфологическими изменениями. При этом у грибов происходит образование специализированных клеток — спор, которые называют “покоящимися” или “спящими” клетками. Программа генной экспрессии при спорообразовании находится под контролем четырех σ -факторов, являющихся субъединицами РНК-полимеразы [6]. Сам процесс спорообразования можно представить как стратегию, свойственную многим организмам, принадлежащим к растениям, животным и прокариотам, позволяющую сохранить геномный материал (genomic safe house) [15].

Состояние покоя тесно связано со стадиями развития организма и может наступить при действии стрессора только, если организм достиг определенной стадии компетентности. Это означает, что, если неблагоприятный фактор действует, например, на активно растущий мицелий грибов в стадии трофофазы, то последний не сможет перейти в стадию покоя. Но это возможно, когда организм уже достиг стадии идиофазы, во время которой происходит постепенное истощение питательных веществ и начинаются процессы вторичного метаболизма. Вероятно, последний процесс тесно взаимосвязан с наступлением состояния покоя, так как именно в это время происходит образование специфических для покоя соединений. У мукоровых грибов, например, начинается синтез каротиноидов, которые являются предше-

ственниками спорополленина — продукта окислительной полимеризации каротина, входящего в состав клеточной стенки споры и защищающего ее от действия химических соединений и литических ферментов.

Формы покоя отличаются разнообразием, например, для животных, таких, как насекомые и птицы, период покоя носит название диапаузы или гибернации, и не может продолжаться так долго, как, например, у грибов и бактерий, но имеет существенное значение, так как позволяет выжить в течение краткосрочного периода действия низких температур или голода [16]. Интересно, что у семян существуют два типа покоя — при появлении влажности покой у одного типа семян нарушается, другие семена сохраняют это состояние и в присутствии воды. Наличие нескольких типов покоя, которые мы ниже рассмотрим для грибов, представляется нам очень существенным механизмом адаптации, расширяющим возможности выживания вида. Наконец, значение покоя как формы адаптации состоит еще и в том, что в этот период происходит резкое увеличение устойчивости организмов к действию неблагоприятных факторов. Например, сухие личинки жуков могут переносить нагревание до 100 градусов без потери жизнеспособности. Спорангиоспоры мукорового гриба *Blakeslea trispora* выдерживают нагревание до 60–70°C и не теряют способности к прорастанию [17–18]. Часть конидий *Aspergillus niger* выдерживает автоклавирование при 1 атмосфере и сохраняет всхожесть, хотя образование ростковых трубок задерживается на 18–20 ч.

Практически все грибы, за исключением нескольких стерильных видов, способны при действии стрессоров переходить в состояние покоя и образовывать споры. При этом покой грибов отличается от покоя бактерий и растений. Во-первых, это не анабиоз (аметаболизм, абиоз, ангидробиозис, скрытая жизнь), а гипометаболизм, и по номенклатуре метаболических состояний, предложенной в работах [19–20], ослабление метаболизма у грибов в период покоя не превышает 50%. Во-вторых, у грибов существует несколько типов покоя, причем основными являются два типа — конститутивный и экзогенный.

Первый тип покоя грибов (глубокий покой, конститутивный, эндогенный). Данный тип покоя имеет сложную систему регуляции процессов прорастания и ее называют “цитоплазматической регуляцией”, так как в этом случае сигнал к возобновлению ростовых процессов происходит и в отсутствие ядра [21]. Существуют два строго регулируемых процесса, которые можно наблюдать и в бактериальных, и в эукариотических клетках — это образование спор и их прорастание. Опыты с энуклеированными клетками или с актиномици-

ном D позволили установить удивительную вещь – вся информация, необходимая для спробразована передается задолго до момента ее реализации. Это было показано в опытах, в которых синтез специфических белков, необходимых для морфологической цитодифференцировки, начинался через несколько часов после подавления синтеза РНК с помощью высоких доз актиномицина D. Это свидетельствует о том, что для любой стадии образования спор или плодовых тел информация передается задолго до того, как эти события происходят в действительности. Предполагают, что эта информация сохраняется в долгоживущих матрицах, и вероятно, именно с этим связан феномен длительности сохранения спор и их жизнеспособности.

Необходимо подчеркнуть, что в случае эндогенного покоя появление воды недостаточно для начала прорастания споры, так как этот процесс находится под контролем системы цАМФ и специальных аутоингибиторных соединений, задерживающих выход споры из состояния покоя, а также имеется система клеточных барьеров и метаболических блоков. В основном в состоянии эндогенного покоя находятся половые споры (зиготы, базидиоспоры, аскоспоры), для прорастания которых необходима специальная обработка, например, нагреванием или химическими соединениями, нарушающими целостность клеточной стенки. Действие факторов, позволяющих управлять процессом выхода спор из состояния эндогенного покоя мало изучено. Такие споры прорастают в соотношении 1 : 100, и естественно их не используют как споры посевной материал в биотехнологических процессах.

Экзогенный (поверхностный) покой. Такой покой свойственен вегетативным спорам грибов и нарушается, когда неблагоприятный фактор перестает действовать. В этом случае основным сигналом к прорастанию является появление воды, причем у некоторых видов грибов первая стадия прорастания – набухание может происходить через 20–30 мин.

Два типа покоя могут иметь определенные различия, наблюдаемые в процессе прорастания. Так, например, конидии *Aspergillus niger* прорастают в дистиллированной воде и находятся в состоянии экзогенного покоя. Однако для образования ростковых трубочек им необходимо присутствие источников углерода и азота. Особенности их покоя состоят в том, что активными стимуляторами прорастания являются азотсодержащие соединения. Кроме того, при действии температуры на покоящиеся конидии изменения в липидном бислое и в составе нейтральных липидов практически те же, что и у растущего мицелия при температурном стрессе [22]. Эти данные позволяют предположить, что, если следовать совре-

менной классификации типов торможения жизненной активности [16], то экзогенный покой конидий *A. niger* по рассмотренным признакам приближается к типу метаболизма вегетативных клеток, находящихся в стадии идиофазы [22]. Этот тип экзогенного покоя конидий *A. niger* можно рассматривать, как своеобразную форму “переживания” между анабиозом и активной жизнедеятельностью по степени торможения метаболизма наиболее близкой к вегетативной жизни. Наличие в природе состояний, различающихся по степени торможения активного метаболизма, является проявлением диалектики жизни, которая для своего сохранения использует биохимические механизмы адаптации, способные обеспечить временное отсутствие жизни (минимум смерти), состояние покоя или сна.

Таким образом, два типа покоя у грибов различаются сложностью метаболической регуляции, наличием специальных ауторегуляторов, временем прорастания, количеством проросших спор, а также их химическим составом. Последнее является основной темой данной работы.

РАЗЛИЧИЯ В ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ КЛЕТОК ГРИБОВ В СОСТОЯНИИ БИОЗА И ПОКОЯ

У грибов переход к состоянию покоя связан с особым механизмом, который практически отсутствует у прокариот. Клетка разделяется на специальные отсеки, в которых хранятся соединения, необходимые при прорастании. Этот процесс называют компартментализацией. При этом запасные липиды – триацилглицерины отделены от ферментов липидного метаболизма; углеводы, например трегалоза, отделена специальным отсеком от фермента трегалазы.

Установлено, что вязкость и анизотропия цитоплазмы значительно отличаются не только у активно растущих и покоящихся клеток, но и зависят от типа покоя [23]. Сравнение покоящихся клеток гриба *Talaromyces macrosporus* – аскоспор и конидий – позволило установить значительные различия в физико-химических свойствах их цитоплазмы. При использовании метода электрон-спинового резонанса обнаружено, что цитоплазма аскоспор имеет в состоянии покоя очень высокую вязкость, в то время как конидии имеют существенно более низкую вязкость цитоплазмы и величину анизотропии. Интересно наблюдение, что высокие значения вязкости цитоплазмы аскоспор резко понижаются, когда начинается деградация трегалозы и происходит образование глюкозы, т.е. начинается первая стадия прорастания покоящихся клеток. Так как аскоспоры значительно более устойчивы к различным стрессовым воздействиям, предполагается, что эти свойства могут быть связаны с состоянием цитоплазмы.

Основным отличием покоящихся клеток от вегетативных является их обезвоженность. При этом споры, находящиеся в состоянии экзогенного покоя, содержат больше воды, чем находящиеся в конститутивном покое, а вегетативные клетки содержат больше воды, чем споры. В наибольшей степени оводнены вегетативные клетки. Экзогенно покоящиеся споры содержат до 60% воды, а активно растущие, вегетативные клетки — 80% и более. Содержание воды в спорах можно снизить до 3%, однако в этом случае дыхание уже не регистрируется [24]. Обнаружены различия в содержании воды в протопластах и споровых оболочках у бактерий и грибов. Методом лазерной диффрактометрии показано, что протопласты бактериальных спор сильно дегидрированы по сравнению с интегументом, противоположное распределение обнаружено у грибных спор. Предполагается, что именно значительная дегидратация протопластов обеспечивает способность бактериальных спор выдерживать более высокую температуру по сравнению со спорами грибов [25]. Развитие этой идеи нашло отражение в гипотезе последних лет, согласно которой устойчивость к внешним факторам и способность к прорастанию во многом зависят от регидратации и активности внутриклеточной воды в спорах [26].

Покоящиеся споры имеют еще один биохимический механизм, связанный с присутствием специальных соединений, называемых самоингибиторами, или аутоингибиторами прорастания. Наиболее подробно изучен и синтезирован ингибитор прорастания спор *Collectotrichum goe Sporoides*, названный глоеспороном [27]. Состояние покоя и прорастание конидий у *Penicillium paneum* регулируется летучим самоингибитором 1-октен-3-олом [28]. Этот ингибитор является продуктом ферментативного разрушения линолевой кислоты липоксигеназой и гидропероксидазой. Биосинтез 1-октен-3-ола определяет запах грибов, особенно свежесобранных и слегка поврежденных. У агариковых грибов запах сильно ощущается в мякоти шляпки, где образуются споры. Этот запах наиболее характерен для плодовых тел *Agaricus bisporus* с величиной шляпки 35 мм с закрытым покрывалом [29]. 1-Октен-3-ол выделяется в воздушную среду в очень высоких концентрациях, в то время, когда образуются пропагулы, как у пенициллов, так и у агариковых грибов, у которых это соединение выполняет функцию ингибитора прорастания. Кроме того, 1-октен-3-ол может выполнять роль “драйвера” в образовании спор и их распространении в воздухе.

Совместно с 1-октен-3-олом у грибов может происходить синтез другого метаболита — 10-оксо-транс-8-деценной кислоты [30, 31]. Полагают, что этот ауторегулятор работает в тандеме с 1-октен-3-олом и участвует также в регуляции ростовых процессов, регулируя рост мицелия, и

инициирует образование плодовых тел. Эти данные позволяют предположить, что продукты ферментативного разрушения линолевой кислоты могут иметь большое значение при образовании у грибов сексуальных и вегетативных структур при нарушении состояния покоя.

У ржавчинных грибов имеются свои специфические аутоингибиторы прорастания — метиловый эфир *цис*-феруловой кислоты и метиловый эфир *цис*-3-4-диметоксикоричной кислоты. Основная функция этих соединений та же, что и у вышеуказанных аутоингибиторов — подавление процесса прорастания спор после их образования и при переносе их в воздушных потоках [32], поэтому у грибов синтезируется обычно два типа ауторегуляторов — летучие и нелетучие соединения.

Следует отметить еще один фактор, участвующий в регуляции состояния покоя, — это концентрация спор в среде. Высокая концентрация спор в среде приводит к торможению их прорастания из-за наличия самоингибиторов, накапливающихся в очень большой концентрации. В этом случае достаточно промыть споры в воде и можно наблюдать их интенсивное прорастание.

При сохранении состояния покоя, вероятно, большое значение имеет клеточная стенка грибов, в частности ее химический состав [33]. В клеточной стенке грибов удивительным образом собраны соединения, защищающие спору от литических ферментов, ядов, высокой температуры и других стрессовых воздействий: аминополисахариды, глюканы, белки, липиды, спорополленин, мукоран и др. Интересно, что соединения, входящие в состав клеточной стенки, могут влиять и на интенсивность спорогенеза. Так, для гриба — патогена беспозвоночных *Beauveria bassiana* добавление хитозана к среде выращивания приводит к интенсификации спорообразования [34]. Основным фактором, сохраняющим состояние покоя, является регуляция проницаемости клеточной стенки споры, в первую очередь для воды. О том, что изменение проницаемости клеточной стенки, вызванное, например, изменением осмотического давления (обработка глицерином) приводит при наблюдении в микроскоп к “просветлению” клеточной стенки, было известно еще в 80 годы прошлого столетия при изучении активации спор *Phycomyces blakesleeanus* [35]. Данные последних лет показали, что изменение проницаемости связано с фазовым состоянием липидного бислоя [36].

Обнаружены существенные различия в составе углеводов у покоящихся клеток — спор и активно растущего мицелия. Как правило, состояние покоя характеризуется высоким содержанием трегалозы. Трегалоза (α -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопиранозид) — широко распространенная в природе молекула, которая характерна для высших и низших форм жизни, но не для млекопита-

ющих. Большим достижением последних лет является установление такого факта, как наличие специального гена, участвующего в синтезе трегалозы, который присутствует у многих организмов, содержащих чрезвычайно низкий уровень трегалозы [37]. Это позволяет значительно расширить круг организмов, содержащих трегалозу, и предположить ее наличие у некоторых млекопитающих, тем более что у людей обнаружена трегалаза (TREN), которая гидролизует трегалозу в кишечнике и является маркером повреждения почечных канальцев [38]. В свете этих данных, представляет интерес обнаружение трегалозы у *Phytophthora infestans*, которую относили к группе Po (по классификации углеводов, специфичных для определенных систематических групп грибов), т.е. считалось, что этот организм не образует ни трегалозы, ни полиолов [39]. Однако позже в составе углеводов спорангиев *P. infestans* были обнаружены глюкоза как основной сахар (около 90%), трегалоза (6%) и полиол арабит [40]. Известно, что Оомусетес относили ранее к царству грибов, как особый ствол в этом царстве, причем одним из признаков считалось наличие спорангиев. Однако, сравнение состава сахаров спорангиев грибов и представителей царства Chromista показало большие различия: у грибов в покоящихся клетках обнаруживается высокое содержание трегалозы и полиолов, и низкий уровень глюкозы, в то время как у оомицетов было обратное соотношение углеводов (см. выше), следовательно, у оомицетов функция спорангий иная и не имеет отношения к состоянию покоя.

Всего около 40 лет назад о трегалозе знали только то, что этот сахар выполняет функцию запасного соединения. В настоящее время роль трегалозы значительно расширилась, так как показано, что эта молекула принимает участие в наиболее важных метаболических процессах.

В настоящее время не вызывает сомнений, что трегалоза синтезируется как стресс-зависимое соединение при действии холода, нагревания, обезвоживания, окисления и других неблагоприятных факторов. Именно в таких ситуациях организм синтезирует большое количество трегалозы, что позволяет ему сохранить целостность клеток. В условиях стресса присутствие трегалозы препятствует денатурации белков, что подтверждают современные данные об уменьшении содержания этого дисахарида во время агрегации белков, медирированных полиглутамином [41]. Механизм стабилизации белков был достаточно быстро выяснен, и трегалоза получила название химического шаперона [42].

Еще в 1991 г. в опытах с муковровым грибом *Cunninghamella japonica* было показано, что в условиях высокотемпературного стресса происходила остановка ростовых процессов и быстрое накоп-

ление трегалозы, которое сопровождалось изменением липидного состава и увеличением степени ненасыщенности липидов, т.е. была установлена взаимосвязь между синтезом трегалозы и составом липидного бислоя [43]. При этом параллельно с увеличением степени ненасыщенности липидного бислоя происходило увеличение уровня фосфатидилэтаноламина, что, вероятно, способствовало более активному росту мицелия после выхода из состояния стресса. Аналогичный эффект наблюдался при добавлении антиоксиданта в период действия стрессора. Позднее в опытах с дрожжами при действии на них пероксида водорода, который вызывал окислительное повреждение аминокислот в белках, было показано, что трегалоза способна устранять эти повреждения и защищать клетку от действия свободных радикалов [44]. Установлено, что экзогенные неприродные антиоксиданты, например 4,4'-дикумилдифенил-азотокись, а также природные – α -токоферол, убихинон Q₉, в том числе и собственные антиоксиданты грибов, обладают общим биологическим эффектом, стимулируя рост грибов, изменяя состав липидов, увеличивая степень их ненасыщенности и содержание фосфатидилсерина [45].

Механизм защитного действия трегалозы был установлен только в 2003 г. Используя метод ЯМР, были получены спектры ¹H и ¹³C, позволяющие судить о взаимодействии ОН...л и СН...О между трегалозой и ненасыщенными жирными кислотами. Полученные данные свидетельствовали о том, что трегалоза значительно снижала действие свободно радикального окисления на ненасыщенные ацилы липидов путем слабого связывания с двойными связями в молекулах жирных кислот [46].

Особенно велика роль сахаров, и в частности трегалозы, в процессе дегидратации клеток. В этом случае происходит потеря воды, которая связана с головками фосфолипидов, при этом на одну молекулу фосфолипидов приходится 10–12 молекул воды. Потеря воды приводит к уменьшению расстояния между молекулами фосфолипидов в плоскости мембраны, что может привести к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям между углеводородными цепями молекул фосфолипидов и образованию твердой фазы – геля [47]. При дегидратации могут образовываться и другие небеслойные структуры, например инвертированная гексагональная фаза [Т_m].

В ангидробиотических организмах сахара (но не моносахариды) предотвращают увеличение гексагональной фазы путем внедрения между головками фосфолипидов. Основными факторами снижения Т_m являются водородные связи между РО-группами полярных головок фосфолипидов и ОН-группами сахаров. Защитная роль сахаров при дегидра-

тации состоит также в предотвращении слияния мембран, что связано со способностью сахаров к стеклообразованию (витрификация), увеличению вязкости на несколько порядков и сильно замедляет молекулярную диффузию воды и кислорода, снижая вероятность химических реакций [48].

Трегалоза из-за своей особой роли в анабиозе всегда привлекала внимание биологов и химиков, а к началу 20 века было установлено, что это соединение выполняет у многих организмов различные функции. В настоящее время установлено, что трегалоза является источником энергии и резервным углеводом, стабилизирует и защищает при стрессе белки и мембранные липиды от деградации, препятствует разрушительному действию на биологические структуры свободных радикалов, является регулятором роста и развития растений и служит компонентом гликолипидов у коринебактерий [49].

Показана новая роль трегалозы, а также зависимость ее действия от концентрации в среде. В исследованиях с мицелиальными грибами, контаминирующими пищевые продукты, нами было установлено, что действие консерванта — сорбата калия (СК) — не является длительным [50, 51]. Наблюдается его разрушение ферментами грибов аскомицетного аффинитета и начинается рост вторичного мицелия, причем более интенсивный, чем в контроле. Однако если вместе с СК в среду внесено 0.1% трегалозы, то рост гриба задерживался до 7 сут. Если же вместе с консервантом внесено значительно больше трегалозы (в 10 раз) — 1.0%, то в этом случае СК действует, как консервант значительно меньшее время, и уже на 7 сут биомасса гриба составляла половину от контрольной. Таким образом, установлены два новых факта, касающиеся необычного действия трегалозы. Этот дисахарид выступает в роли соединения, в присутствии которого не проявляется эффект консерванта и стимулируется рост грибов. Однако эта необычная функция трегалозы определяется ее достаточно высоким содержанием в среде (более 1.0%). Если же концентрация этого полисахарида в 10 раз меньше, то трегалоза выступает уже в роли ингибитора ростовых процессов, т.е. в известной уже функции природного консерванта при действии стрессорного фактора. В связи с этим следует отметить, что ни глюкоза, ни лактоза не оказывают подобного действия [52].

В настоящее время считается, что нередуцирующие сахара — трегалоза и сахароза — участвуют в системе коммуникации клеток (гликокоде) и их метаболизм связан с системой клеточных сигналов [53]. В связи с уникальностью свойств нередуцирующих сахаров и определенным сходством в биологических функциях трегалозы и сахарозы, представляло интерес изучить влияние сахарозы на рост грибов-контаминантов сыров в присут-

ствии СК. Установлено, что сахароза в концентрации 1.0% активизирует рост грибов. Однако в отличие от трегалозы, низкие концентрации сахарозы (0.1%) в присутствии консерванта не оказывали ингибирующего действия на рост грибов. Возможно, необычный эффект трегалозы связан с уникальными физическими свойствами этой молекулы — высокой гидрофильностью, химической стабильностью и отсутствием внутренних водородных связей [54].

В настоящее время, кроме трегалозы и сахарозы известно несколько типов протекторных соединений:

— полиолы: глицерин, гликозилглицерин, арабит, маннит, сорбит;

— аминокислоты и их производные: глутамат, пролин, γ -аминомасляная кислота, глицин, бетаин, эктоин;

— комбинация мочевины с метиламинами, например триметиламин-N-оксид [55].

Однако механизм действия и протекторная функция этих соединений изучена значительно меньше, по сравнению с эффектом нередуцирующих дисахаридов.

Биохимическая адаптация к температурному стрессу, обусловленная протекторами углеводной природы, различается в зависимости от систематического положения организма. У *Zygomycetes* — *Cunninghamella japonica* и *Absidia coerulea* — найден только один биохимический механизм, основанный на превращении глюкозы в дисахарид трегалозу. Последняя выполняет функцию стабилизатора мембранных липидов и является своеобразным “депо” такого высокоактивного субстрата как глюкоза у этих грибов. Интересно, что только в условиях более глубокого (до 10°C) охлаждения появляются следы глицерина, а у (–) штамма *Blakeslea trispora* в стилоспорах, полученных в условиях гипертермии, обнаруживается полиол инозит.

У грибов, принадлежащих к классу *Ascomycetes*, в частности *Aspergillus japonicus* и *Myceliophthora termophila*, набор углеводов цитозоля более обширен. Кроме трегалозы, имеется ряд полиолов, которые также выполняют функцию протекторных соединений. При гипертермии отмечается тенденция увеличения образования трегалозы и инозита, а при гипотермии — маннита и глицерина. При этом наблюдалась интересная особенность, связанная с температурным оптимумом роста организма. У термофила *Myceliophthora termophila*, имеющего оптимум роста при 41–42°C, глицерин не образовывался при низкотемпературном шоке, но этот полиол появлялся у мезофила *A. japonicus*, имеющего температурный оптимум роста при 27–28°C.

Еще более широкий набор углеводных протекторов содержит цитозоль базидиомицетных гри-

бов. У этих грибов адаптация к температуре осуществляется с участием других биохимических механизмов. У *Lentinus edodes* в качестве криопротектора выступает арабит, а не маннит, как у аскомицетных грибов, но, как и у последних, при гипотермии обнаруживается глицерин.

Выше отмечалось, что переход клеток к состоянию покоя является адаптивным процессом, позволяющим клеткам пережить неблагоприятные воздействия. В этом процессе наряду с углеводным составом цитозоля, рассмотренным выше, определяющая роль принадлежит составу липидного бислоя.

Несомненный интерес представляют исследование липидного и углеводного состава клеток муконовых грибов, находящихся в состоянии эндогенного и экзогенного покоя. Для первых (зигоспор) характерно высокое содержание липидов (более 40%), в которых преобладающей фракцией являются нейтральные липиды, составляющие почти 90%. При этом для эндогенно покоящихся зигот характерно очень низкое содержание фосфолипидов и гликолипидов, а также преобладание в составе фосфолипидов фосфатидилхолина (66% от суммы фосфолипидов) и присутствие лизофосфатидилхолина. В то же время у эндогенно покоящихся спор (спорангио- и стилоспор) отмечено низкое содержание общих липидов (около 6–7%), в которых преобладает фракция фосфолипидов. В составе нейтральных липидов спор содержится значительно больше стерина и эфиров стерина, а также жирных кислот. Для *Blakeslea trispora* установлено еще одно различие в химическом составе клеток в зависимости от типа покоя – в составе каротиноидов. У зигоспор отмечен более высокий уровень ликопина, который не найден у стило- и спорангиоспор [56]. В этом случае ликопин является самым активным антиоксидантом, связывающим свободные радикалы (см. выше).

В процессе цитодифференцировки грибов значительная роль принадлежит специализированным липидным доменам, называемыми рафтами, которые содержат сфинголипиды и стерин. Это латеральные зоны мембран, различающиеся по вязкости, а также по заряду (главная роль в этом принадлежит фосфатидилсерину) [57]. Домены различаются не только по химическому составу, но и по размерам, наиболее мелкие – это макродомены цитоплазматической мембраны. Следующий по размерам тип доменов – указанные выше липидные рафты, представляющие собой плоские или вогнутые участки высокоупорядоченной мембраны, обогащенные гликофинголипидами и стеринами, размер которых составляет от 10 до 1000 мкм [58]. Значение этих структур состоит в том, что включение липидов в рафты меняет путь передачи сигнала, что имеет

большое значение для выживания при переходе к состоянию покоя.

Очень крупные домены, обогащенные стеринами (SRDs), которые значительно превышают по размерам липидные рафты, идентифицированы в последние годы в цитоплазматической мембране грибов [59]. Первоначально эти домены были идентифицированы у животных [60]. Появление этих структур отмечено в процессе активного морфогенеза. Они локализованы в гифах, но не в почкующихся клетках *Candida albicans*. Вероятно, SRDs очень важны в период активного роста, и их рассматривают, как “организаторов” поляризованного морфогенеза у грибов.

В последнее время наряду с рафтами все большее внимание в области контроля морфогенных процессов уделяется лизофосфатидной кислоте (ЛФК), которую рассматривают как липидный медиатор со множеством биологических функций [61]. ЛФК стимулирует рост и дифференциацию клеток и влияет на их выживаемость. Кроме того, ЛФК используется для поддержания гомеостаза многих метаболических процессов, что необходимо организму при переходе от состояния покоя к активному метаболизму.

У многих грибов жирные кислоты, в том числе линолевая кислота ($C_{18:2}$), являются необходимыми компонентами в процессе спорогенеза. Так, для *Alternaria tomato*, у которой процесс конидиообразования протекает только в присутствии света, линолевая и линоленовая ($C_{18:3}$) кислоты являются спорогенными факторами [62]. У *Sclerotinia fructicola* образование артроспор протекает только в темноте. Активирующим спорогенез компонентом является склероспорин ($C_{12}H_{22}O_2$), представляющий собой сесквитерпен со скелетом гуанинового типа. Кроме этого стимулятора спорогенеза, у *S. fructicola* при культивировании в условиях темноты обнаружено еще одно соединение – R(–)-глицеринмонолинолеат, которое также стимулирует образование артроспор. Интересно, что гриб образует оба энантиомера, но только R-энантиомер является индуктором спорогенной активности [63].

Спорогенными факторами могут быть и гликолипиды, например, образование плодовых тел у *Schizophyllum commune* значительно стимулируется в присутствии цереброзидов и других сфинголипидов. Таким образом, гликолипиды, как и фосфолипиды и их ацилы, являются необходимыми структурными и функциональными компонентами в процессе спорогенеза у многих грибов [64]. В этом отношении следует напомнить об особой роли сфингозин-1-фосфата (S1P), о значении динамического баланса между уровнем метаболитов сфинголипидов, церамидом и S1P, а также последовательной регуляции различных семейств

митоген-активированных киназ в определении выживаемости или гибели клеток [65].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПОРОВОГО ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК ГРИБНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Теоретические исследования по изучению феномена покоя у грибов (биохимические изменения, которые происходят в течение этого процесса, в частности вторичный метаболизм) способствовали тому, что в 19 веке мицелиальные грибы стали рассматривать не только как источники белкового питания, но и как продуценты тех веществ, которые ранее получали из прокариот, растений и животных [66]. Одним из примеров могут служить такие гормоны растений, как гиббереллины, абсцизин и фузикоцин, которые получают теперь из грибов (*Fusarium moniliforme*, *F. amygdally* Del. и др.). Ликопин, который ранее получали из томатов, теперь получают из мукорных грибов, причем стоимость грибного ликопина ниже, чем из растений [67]. Большой интерес вызвали появившиеся в прошлом веке данные о способности полисахаридов и связанных с ними белков грибов оказывать иммуномодулирующее и противоопухолевое действие [68]. Основное, что привлекало производителей — это их “биотехнологичность”, т.е. способность накапливать за достаточно короткие сроки значительную биомассу, возможность совмещать в производстве получение нескольких целевых веществ и создание в результате этого экологически чистых технологий [69].

В настоящее время биотехнология грибных производств включает в качестве основного этапа подготовку активного спорового посевного материала и разработку способов его сохранения для проведения целевой ферментации. В современные опытно-промышленные регламенты обычно включается: определение типа покоя спор, скорость их прорастания, физико-химические факторы, и соединения, ускоряющие выход покоящихся клеток из онтогенетического анабиоза, стандартизация спорового посевного материала и способы его сохранения в активном состоянии.

В основе этих разработок лежат современные представления о спорогенезе грибов, как ответной реакции на стрессовые воздействия, роли в этом процессе протекторных соединений, новые данные об апикальном росте и роли клеточной стенки в процессе прорастания спор. Используя новые представления о состоянии покоя, в современной биотехнологии стали применять несколько приемов, способствующих увеличению выхода спорового посевного материала. В основе одного из них лежат данные фотобиологии, пока-

завшие, что свет и длина его волны могут существенно стимулировать процесс спорогенеза.

В бесполом цикле развития грибов различают три стадии цитодифференцировки: первая — прорастание споры и последующее образование мицелия, вторая — образование спорофоров и третья — образование спорангиев. При изучении действия света на процесс спорообразования различают две основные фазы: индуктивную (образование спорофора) и терминальную (образование конидий или спорангиоспор) [70].

Наибольший интерес представляют данные по влиянию света различного спектрального состава на ряд грибов-патогенов [71]. В этой работе впервые было установлено, что действие светового импульса, полученного в индуктивную фазу, передается в терминальную. В дальнейшем было показано, что воздействие света определенной длины волны на процесс спорообразования вызывает изменения в химическом составе спор (липидный и углеводный), что приводит к изменению метаболизма выросшего из таких спор мицелия и усилению спорогенеза. Например, мицелий *Aspergillus japonicus*, выращенный из спор, образование которых происходило в присутствии зеленого света ($\lambda = 530$ нм, $J = 2.05$ Вт/м²), имел более высокую активность целлюлозгидролазы и эндогликоказы по сравнению с контролем и кроме того в 3–4 раза стимулировал процесс спорообразования [72]. Эти данные открыли новые возможности для биотехнологии: определенные для биотехнологии: определенные воздействия на посевной материал (получившие впоследствии название “Zuschung” — “воспитание” спор), обеспечили не только увеличение выхода посевных спор но и дали возможность увеличить выход конечного продукта. Впоследствии этот метод (предварительное облучение посевных спор зеленым светом) позволил в 3–5 раз увеличить уровень β -каротина в мицелии *Blakeslea trispora* и воздействовать на процесс получения фузикоцина у *Fusicoccum amygdaly* [73]. При производстве лечебного препарата “Миколикопин” (активное начало — ликопин грибов) можно также получать активный посевной материал, используя воздействие зеленого света с длиной волны 530 нм ($1-1.7$ кВт/м²) на процесс спорогенеза. При таком освещении в терминальной стадии спорогенеза у гетероталлических штаммов гриба-продуцента *Blakeslea trispora* образуются споры, содержащие больше липидов, обогащенных фосфолипидом — фосфатидилхолином, который способствует более длительному сохранению активного спорового материала. В то же время использование зеленого света в процессе спорогенеза позволяет в 2 раза увеличить выход спор, используемых в качестве посевного материала при биотехнологическом процессе получения ликопина [74].

Большое значение для сохранения всхожести посевного материала имели данные о роли трегалозы. К концу 20 века было установлено, что при прорастании споры происходит процесс разложения трегалозы под действием фермента трегалазы с образованием глюкозы. До сих пор остается неясным, почему эта образовавшаяся из трегалозы глюкоза практически не используется прорастающей спорой, а превращается в фосфорилированные триозы, причем окончательным этапом этого процесса является образование глицерина [75]. Однако трегалоза используется спорами, находящимися в состоянии покоя, так как в покое, по современным данным, все же сохраняется определенный уровень метаболизма.

В настоящее время установлено, что имеются существенные различия в липидном и углеводном составе спор, которые могут долго храниться или быстро теряют всхожесть. На примере муковых и аскомицетных грибов было показано, что уровень трегалозы в хранящихся спорах должен быть не менее 3–5%, а снижение всхожести четко коррелирует с увеличением в спорах уровня содержания углеводов и с появлением в составе углеводов конидий низкомолекулярных полиолов и глюкозы. Другими словами, у потерявших всхожесть спор увеличивается содержание арабита и уменьшается уровень маннита и трегалозы, а в составе липидов начинает преобладать фосфатидилэтаноламин и резко снижается содержание фосфатидилхолина [76]. В то же время у спор, которые могут долго храниться, преобладает трегалоза, а в составе фосфолипидов – фосфатидилхолин. Методом спиновых зондов электронного парамагнитного резонанса на примере конидий *Aspergillus japonicus* показано, что трегалоза предохраняет мембраны спор при дегидратации, что обеспечивает их жизнеспособность [77], поэтому в современных биотехнологических разработках для сохранения активного посевного материала используются споры, выращенные на среде с добавлением трегалозы, что позволяет лучше сохранять состояние покоя и всхожесть спор [74].

В биотехнологии грибных производств значительно внимание уделяется также активации прорастания посевных спор, что связано с сокращением сроков ферментации и удешевлением стоимости конечного продукта. В связи с этим в последние годы наблюдается определенный прогресс в наших знаниях о прорастании покоящихся клеток, и механизмах, контролирующих состояние покоя. На примере спор *Bacillus subtilis* было установлено, что этот процесс тесно связан с образованием КС и его регуляторами являются муропептиды [78]. У грибов образование конидий зависит от ассоциированных с КС специальных белков, которые передают сигнал внутрь клетки и контролируют состояние покоя и “пробуждения”

споры. Возможно, существует некоторая аналогия между β -глюканом КС грибов и пептидогликанмуропептидами бактерий и глюкан может служить сигналом запрещающим или разрешающим прорастание грибных спор. Было сделано интересное наблюдение – муропептиды, полученные из бактерий, способствуют росту гиф *Candida albicans*. Это позволяет предположить, что такие молекулы могут служить интер-сигналом, общим для всего царства “низших” организмов [79].

В настоящее время в биотехнологии используются несколько приемов, позволяющих ускорить выход спор из состояния покоя. Один из них – использование стимуляторов прорастания, например, добавки к ферментационной среде D-глюкозамина или N-ацетил-D-глюкозамина. Эти соединения, входящие в состав биополимера хитина, способствуют не только ускорению процесса прорастания, но и синхронному выходу спор из состояния покоя.

В биотехнологии часто пользуются еще одним приемом, который получил название “пробуждение спящих спор”. С этой целью устанавливают соединения, которые ускоряют прорастание спор. Это могут быть некоторые аминокислоты, моносахариды и, особенно, цАМФ. Собранные споры перед внесением в ферментационную среду культивируют в течение 30–60 мин в присутствии соединений-стимуляторов, под влиянием которых образуются “наклюнувшиеся” споры, используемые в качестве посевного материала для ферментации. Этот прием обеспечивает сокращение на 4–6 ч времени получения конечного продукта. Данные по изучению химического состава спор позволили также установить, что прорастание споры связано не только с изменениями в углеводном и фосфолипидном составе, но и с резким повышением уровня гиббереллинов (свободных и связанных), а также уровня нейтральных липидов, в частности эфиров стеринов, что в какой-то степени напоминает процессы, происходящие у растений. Поэтому предварительная краткосрочная обработка спор гиббереллинами перед посевом обеспечивает более быстрое и синхронное прорастание посевного материала в условиях ферментера.

В процессе эволюции у ряда организмов, в частности у грибов, появилась способность находиться достаточно долго в особом состоянии, которое позволяет сохранить их жизнеспособность. Терминология, используемая для обозначения этого состояния, неоднозначна [16], но с наших позиций ему более подходит название “криптобиоз” – скрытая жизнь. Криптобиоз встречается у растений, насекомых, прокариот, грибов, к нему также можно отнести такие состояния, как ги-

бернация, эстивация, диапауза, оцепенение, наблюдаемые у некоторых животных. Для этих состояний характерен переход от активной жизни (рост и пролиферация) к пониженному уровню метаболизма. Другими словами, это промежуточное состояние между биозом (активным метаболизмом) и анабиозом [80], при котором метаболические процессы заторможены.

У грибов в природных условиях нет анабиоза — уникального состояния, которое достигается при глубоком охлаждении организма чаще в комбинации с высушиванием (ангидробиоз). В этом случае капельно-жидкая вода в организме минует стадию кристаллизации и переходит в аморфное состояние (витрификация). Как отмечалось выше, в природе для грибов характерно состояние гипобиоза, получившее название “покоя”, при котором сохраняется практически до 50% метаболической активности. Для этого состояния характерны: повышенная устойчивость к неблагоприятным внешним воздействиям, морфологические и ультраструктурные отличия от вегетативных клеток. Перед наступлением покоя, который вызывается либо действием неблагоприятных факторов, чаще всего недостатком воды или истощением питательного субстрата, либо генетической программой, в организме происходит коренное изменение метаболизма — явление, длительное время непонятное исследователям, получившее название “вторичного метаболизма” [81]. До сих пор, в литературных источниках можно прочесть, что функциональная роль вторичного метаболизма остается открытой [81]. Изучение феномена покоя и процесса спорообразования позволяет, на наш взгляд, выдвинуть предположение о том, что это очень рациональный процесс подготовки к переходу в криптобиоз, касающийся не только биохимии, но и морфологии организма. Когда организм переходит в идиофазу, начинается образование специфических метаболитов, которые участвуют в процессах клеточной цитодифференцировки, коммуникации клеток и половой репродукции. Подтверждением этой функции вторичных метаболитов у грибов служат данные о наличии положительной связи между процессами спорообразования и синтезом вторичных метаболитов, например спорополленина — компонента клеточных стенок спор и зигот мукоровых грибов, образующегося путем окислительной полимеризации β -каротина — продукта вторичного синтеза. Другой пример, хиноновые и фенольные пигменты грибов порядка Basidiomycetes также являются компонентами споровых покровов, а каротиноиды входят в состав артроспор гриба *Trichophyton mentagrophytes* [82]. Эти данные представляют интерес, так как, во-первых, они показывают, что вторичные метаболиты грибов не являются статическими продуктами, а подвергаются дальнейшим превращениям и контролируют состоя-

ние покоя и процессы сохранения вида. Во-вторых, вторичные метаболиты участвуют в таких жизненно важных процессах, как цитодифференцировка, а также образование покоящихся клеток — спор, зигот, конидий и других клеточных структур, связанных с процессами бесполой и половой репродукции. Именно благодаря процессам вторичного синтеза, образуется споровая оболочка, в состав которой входят такие уникальные соединения, как хитин, хитозан, глюканы, спорополленин, гидрофобины, меланин, присутствие которых защищает спору от действия литических ферментов, смены температур, кислотной и щелочной среды, радиации, тяжелых металлов и других неблагоприятных факторов. В частности, не малое значение имеет и защита от поедания организмами-“хищниками”. Следовательно, одним из основных факторов перехода в состояние покоя является предварительное протекание процессов вторичного метаболизма.

В последнее время исследование криптобиоза, анабиоза, открытие мумифицированных форм бактерий, цистоподобных клеток, нежизнеспособного некультивируемого состояния у ряда бактерий возвращает нас к вечному вопросу о том, что такое жизнь. Мы называем первую стадию развития микроорганизмов стадией биоза (жизнь), а далее вводим для грибов следующую стадию — покой, при котором происходит практически 50% торможение жизненной активности. При анабиозе, согласно последним данным, благодаря развитию новой техники, мы также обнаруживаем “следы” метаболической активности, но такой организм мы уже не называем живым, но не считаем его мертвым. Обычно мы называем организм мертвым, если не обнаруживаем протекания процессов метаболизма, чаще всего дыхания, но может быть у нас нет соответствующей аппаратуры? Следовательно, не конкретизировав определение, что мы считаем живым или мертвым, дать четкое определение соответствующему состоянию организмов, при которых происходит различной глубины торможение жизненной активности, мы пока не можем. Возможно, необходимо дальнейшее накопление научной информации, в частности исследование физиолого-биохимических особенностей, описанных выше состояний организмов, возникающих при стрессе, и создания критериев сравнения того, что мы называем “живым” или “мертвым”, что пока для нас остается во многом неизвестным. Можно считать, что определенный прогресс в решении поставленных вопросов дает 10 “признаков живого”, приведенных в работе Иваницкого Г.Р. “XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики” [83]. В природе мы наблюдаем ряд состояний организмов, которые называем “ни жизнь, ни смерть”, о которых мы уже знаем достаточно много, и их сравнительное изучение может по-

мочь в решении основного вопроса биологии — найти грань между жизнью и смертью. И в этом, вероятно, заключается основное значение изучения покоящихся форм.

Необходимо подчеркнуть еще один важный аспект изучения состояния покоя. В настоящее время особое внимание уделяется гетерогенности и фенотипическому разнообразию микробных популяций, находящихся в пролиферативном покое [84], когда происходит реализация того морфологического и физиологического типа клеток, который должен стать наиболее адаптивным к новым условиям роста. Причем гетерогенность рассматривается, как результат адаптивного мутагенеза, как компонента SOS-ответа, когда на миллион клеток возникает одна мутация при повреждении ДНК или прекращении размножения [85]. В данном случае предполагается усиление жизнеспособности популяции.

Необходимо подчеркнуть, что феномен покоя уже достаточно долго, почти 100 лет, исследуется и у растений на примере семян и почек [9, 86], причем в настоящее время такие природные и неприродные ингибиторы роста и прорастания, как кумарин, нарингенин (4',5,7-тригидроксифлаванон), сохраняющие состояние покоя, нашли практическое применение. Интересно, что ряд этих соединений оказывает одинаковый эффект у растений и грибов. Так, состояние покоя можно нарушить или значительно сократить введением гиббереллиновой кислоты, а малеиновый гидразид оказывает противоположное действие, увеличивая длительность покоя как у грибов, так и у растений. Возможно, ряд закономерностей, установленных для покоящихся клеток грибов, могут быть экстраполированы и для растений, ведь у *Planta* и *Fungi* много общего, недаром систематики длительное время объединяли их в одно царство.

Проблема покоя находится в настоящее время на стыке наиболее интенсивно изучаемых проблем биологии: происхождение жизни, определение критериев живой материи, адаптивный мутагенез, гетерогенность популяций, и приобретает все большее значение в современной биотехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagi B. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1963. V. 108. P. 615.
2. Coch F. // Beitr. Biol. Pflanz. 1876. B. 2. S. 249–276.
3. Susman A.S., Halvorson H.O. Spores, their Dormancy and Germination. N. Y.: Harper & Row, 1966. 354 p.
4. Doran W.L. // Bull. Torrey. 1907. V. 49. P. 303–304.
5. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 3. С. 302–309.
6. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
7. Zhang Y. // Frontiers Biosci. 2004. V. 9. P. 1136–1156.
8. Lewis K. // Nature Rev. Microbiol. 2007. V. 5. P. 48–51.
9. Lennon J.T., Jones S.E. // Nature Rev. Microbiol. 2011. V. 9. P. 119–130.
10. Jones S.E., Lennon J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5881–5886.
11. Lamarre C., Sokol S., Debeaupuis J.-P., Henry C., Lacroix C., Glaser P., Coppée J.-Y., François J.-M., Latgé J.-P. // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 417.
12. Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. P. 187–206.
13. Kasuga T., Townsend J. P., Chaoguang T., Gilbert L. B., Mannhaupt G., Taylor J. W., Glass N. L. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. 6469–6485.
14. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации / Ред. Е.М. Крепс. М.: Мир, 1977. 398 с.
15. Oshero N., May G. S. // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 199. P. 153–160.
16. Ушатинская Р.С. Скрытая жизнь и анабиоз. М.: Наука, 1990. 187 с.
17. Терёшина В.М., Меморская А.С., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 794–800.
18. Феофилова Е.П., Терёшина В.М. // Микробиология 1995. Т. 64. № 5. С. 681–685.
19. Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 5–24.
20. Лозина-Лозинский Л.К. // Криобиология и криомедицина. 1979. № 5. С. 30–39.
21. Харрис Г. Ядро и цитоплазма. М.: Мир, 1973. 185 с.
22. Морозова Е.В., М.В. Баранова, Козлов В.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 611–619.
23. Dijksterhuis J., Nijse J., Hoekstra F.A., Golovina E.A. // Eukaryotic Cell. 2007. V. 6. № 2. P. 157–170.
24. Furch B. // Z. Pflanzenphysiol. 1978. B. 5. S. 269–272.
25. Ulanowski Z., Ludlow I.K., Waites W. M. // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V. 40. P. 229–232.
26. Dantigny P., Nanguy S.P.-M. // Int. J. Food Microbiol. 2009. V. 134. P. 16–20.
27. Stevan V.L., Cleator E., Harter J., Hollowood C.J. // Org. Biomol. Chem. 2003. V. 1. P. 3263–3264.
28. Chitarra G.S., Abee T., Rombouts F.M., Posthumus M.A., Dijksterhuis J. // Appl. Env. Microbiol. 2004. V. 70. № 5. P. 2823–2829.
29. Cruz C., Noel-Suberville C., Montury M. // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. №1. P. 64–67.
30. Larsen T.O., Frisvat J.C. // Mycol. Research. 1995. V. 99. № 10. P. 1153–1166.
31. Kurichayachi T., Kaise H., Uno C., Hara T., Hayakawa T., Joh T. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 5. P. 1247–1253.
32. Macko V., Staples R.C., Renwick J.A.A. // Phytopathology. 1971. V. 61. № 8. P. 902.
33. Феофилова Е.П. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 6. С. 723–733.

34. *Palma-Guerrero J., Larriba E., Guerri-Agullo B., Jansson H.-B., Salinas J., Lopez-Llorca L.V.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. № 6. P. 2237–2245.
35. *Verbeke M.N., van Laere A.J.* // Exp. Mycol. 1982. V. 6. № 4. P. 313–320.
36. Антонов В.Ф. Проблемы регуляции в биологических системах. Биологические аспекты / Ред. А.Б. Рубин. М: НИЦ “РХД”, 2007. 480 с.
37. *Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B.* // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. № 9. P. 793–810.
38. *Ouyang Y., Xu Q., Mitsui K., Motizuki M., Xu Z.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 379. № 2. P. 621–625.
39. *Pfyffer G.E., Boraschi-Gaia C., Weber B., Hoesch L., Orpin C.G., Rast D.M.* // Mycol. Res. 1990. V. 94. № 2. P. 219–222.
40. Терёшина В.М., Меморская А.С., Морозова Е.В., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 4. С. 511–517.
41. *Jain N.K., Roy I.* // Protein Sci. 2009. V.18. № 1. P. 24–36.
42. *Crowe J.H.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2007. V. 594. P.143–148.
43. Терёшина В.М., Михайлова М.В., Феофилова Е.П. // Микробиология. 1991. Т. 63. № 4. С. 781–786.
44. *Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 24261–24267.
45. Феофилова Е.П., Кузнецова Л.С. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 467–473.
46. *Oki K., Watanabe H., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y., Komori M., Inoue Y., Sakurai M.* // J. Amer. Chem. Soc. 2003. V. 125. № 42. V. 12739–12748.
47. *Chapman D., Williams R.M., Ladbrooke B.D.* // Chem. Phys. Lipids. 1967. V. 1. № 5. P. 445–475.
48. Хукстра Ф.А., Головина Е.А. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 3. С. 347–362.
49. *Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I, Carroll D.* // Glycobiology. 2003. V. 13. № 4. P. 17–23.
50. Феофилова Е.П., Кузнецова Л.С., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 128–133.
51. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 5. С. 695–701.
52. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 463–470.
53. *Paul M.J., Primavesi L.F., Jhurrea D., Zhang Y.* // Ann. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 417–441.
54. Лианг Л.К., Вонг К.К., Жу К.Л., Шу З.М. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 12. С. 1589–1596.
55. *Gowrishankar J.* // Biol. Int. 2001. № 40. P. 8–11.
56. Терёшина В.М., Меморская А.С., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 794–800.
57. *Beck J.G., Mathieu D., Loudet C., Vuchoux S., Dufourc E.J.* // FASEB J. 2007. V. 21. № 8. P. 1714–1723.
58. Безуглов В.В., Коновалов С.С. Липиды и рак. Очерки липидологии онкологического процесса. СПб.: Прайм-Еврознак, 2009. 352 с.
59. *Alvarez F.J., Douglas L.M., Konopka J.B.* // Eukaryot. Cell. 2007. V. 6. № 5. P. 755–763.
60. *Steinberg G.* // Eukaryot. Cell. 2007. V.6. № 3. P. 351–360.
61. Бердичевец И.Н., Тяжелова Т.Н., Шимишлавилли Х.Р., Рогаев Е.И. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1213–1223.
62. *Hugeon S.B.* // Chem. Regulation Plant (Japan). 1976. № 11. P. 69.
63. *Katayama M., Marumo S.* // Agric. Biol. Chem. 1978. V. 42. № 7. P. 1431–1433.
64. *Sakai H., Kajiwara S.* // Lipids. 2004. V. 39. № 1. P. 67–73.
65. Шпигель С., Кувилье О., Эдзаль Л., Кохама Т., Мензелев Р., Оливера А., Томас Д., Ту З., ван Бруклин Д., Ванг Ф. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 1. С. 83–87.
66. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1997. Т. 66. №3. С. 302–309.
67. Феофилова Е.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Алёхин А.И., Гончаров Н.Г., Дулькин Л.М. // Микология сегодня / Ред. Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. М.: Национальная академия микологии, 2007. С. 314–323.
68. Феофилова Е.П. // Иммунология, аллергология, инфектология. 2004. № 1. С. 27–32.
69. Biowissenschaften und Biotechnologie. Eine Strategie für Europa. Mitteilung der Kommission an Europäische Parlament, der Rat, den Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen. Luxemburg: SpringerVerlag, 2002. S. 51.
70. *Widdel S., Larsson Ch.* Blue Light Effects in Biological System. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1984. P. 179–301.
71. *Plourde D.F., Green, Jr.K.J.* // Phytopathology. 1982. V. 72. P. 58–61.
72. Феофилова Е.П., Волохова М.В., Величко Б.А., Карпов А.М., Полотебнова, М.В., Шлыкова Г.Ф. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 6. С. 719–722.
73. Феофилова Е.П. // Итоги науки и техники. Микробиология. М: ВИНТИ. 1991 Т. 24. С. 71–115.
74. Феофилова Е.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Алёхин А.И., Гончаров Н.Г. Патент РФ № 200913024. 2009.
75. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1992. Т.61. № 5. С.741–755.
76. Морозова Е.В., Козлов В.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 2. С. 149–154.
77. Горнова И.Б., Феофилова Е.П., Головина Е.А., Кроткова Н.Б., Холодова В.П. // Микробиология 1992. Т. 61. № 4. С. 549–554.
78. *Dworkin J., Shach I.M.* // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 890–896.

79. Xu X.L., Lee R.T., Fang H.M., Wang Y.M., Li R., Zou H., Zhu Y., Wang Y. // *Cell Host Microbe*. 2008. V. 4. № 1. P. 28–39.
80. Keilin D. // *Proc. R. Soc. London. Ser. B*. 1959. V. 150. P. 149–191.
81. Безбородов А.М., Квеситадзе Г.И. Микробиологический синтез. СПб.: “Проспект Науки”, 2011. 144 с.
82. Hashimoto T., Pollack J. H., Blumental H. J. // *J. Bacteriol.* 1978. V. 136. № 3. P. 1120–1126.
83. Иваницкий Г.П. // *Успехи физических наук*. 2010. Т. 180. № 4. С. 337–369.
84. Avery S.V. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 577–587.
85. Galhardo R.S., Do R., Yamada M., Friedberg E.S., Hastings P.J., Nohmi T., Rosenberg S.M. // *Genetics*. 2009. V. 182. P. 55–68.
86. Crocker W. *Growth of Plants*. N.Y.: Reinhold Publ. Corp., 1948. 459 p.

Fungal Spores: Dormancy, Germination, Chemical Composition, and Role in Biotechnology (Review)

E. P. Feofilova^a, A. A. Ivashechkin^b, A. I. Alekhin^c, and Ya. E. Sergeeva^a

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

^b *Moscow State University, Department of Biology, Moscow, 119991 Russia*

^c *Central Clinical Hospital, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117593 Russia*

e-mail: biolog1@migmail.ru

Received March 31, 2011

Abstract—This review is focused on one of the stages of ontogenesis distinctive by its particular tolerance to the action of unfavorable factors and ability to retain the genomic material for a long period of time, i.e., fungal spores. The major part is devoted to the characterization of the specific stage typical for spores, which is called dormancy. Data are presented characterizing the carbohydrate and lipid composition of spores, with special attention being paid to the role of carbohydrate protectors, in particular, trehalose and mannite, as well as to the role of rafts in the process of sporogenesis. The role of special compounds called autoinhibitors and autostimulators in the process of exit from dormancy is discussed. The final section deals with the role of spore seeding material in biotechnological processes. Data on the correlation between the chemical composition of spores, their ability to remain dormant, and the germination process are considered. Special biotechnological approaches are presented for the first; they allow for the preservation of the germinating ability of spores, intensification of sporogenesis, changes in the ratio of final fermentation products, and an increase in their yield.