

12. Franzetti L., Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 2007, vol. 57, no. 1, pp. 39–47.
13. Palleroni, N.J., *Pseudomonaceae* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Ed.Krigr, N.R., Holt, J.G., et al. 9th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, (1984) 114.
14. Васильев Д.А. [и др.]. Выделение и типирование бактерии *Pseudomonas putida*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 2009, 3 (10).
15. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с. Т. 2. 368 с.

РОЛЬ ФОСФОЛИПИДОВ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ПОКОЯЩИХСЯ  
И ПРОРАСТАЮЩИХ СПОРАНГИОСПОР  
*CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* И *UMBELOPSIS RAMANNIANA* –  
ПРОДУЦЕНТОВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Мысякина И.С.\*, Бокарева Д.А.\*\*\*, Сергеева Я.Э.\*\*

\*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Москва, РФ

\*\*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Москва, РФ

*Changes in the content and composition of lipids and fatty acids in exogenously dormant ("spores 0") and germinating sporangiospores ("spores P") of zygomycete fungi Cunninhamella echinulata VKM F-663 and Umbelopsis ramanniana VKM F-582 in distilled water were investigated. Changes in spores P lipids compared with spores 0 are expressed in an increase in the proportion of unsaturated fatty acids, in the decrease in the content of massive phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine) and in the increase in the levels of phosphatidylglycerol and phosphatidic acid, which can function as signaling compounds. The level of the basic phospholipid of mitochondrial membranes – cardiolipin in the process of spore exit from the state of dormancy increased in both representatives of zygomycetes. A certain increase in the content of free and esterified sterols was observed in the composition of neutral lipids of the spores of U. ramanniana. During the C. echinulata sporangiospores germination there did not occur any significant changes in the composition of neutral lipid classes, which can be explained by the fact that they are not the main reserve, mobilizing at the exit from the state of dormancy.*

**Введение.** Мицелиальные грибы широко используются в биологических и экологических технологиях в процессах получения биологически активных соединений, органических кислот, ферментов, хитина, липидов, а также в детоксикации ксенобиотиков, процессах очистки сточных вод, биосорбции и

др., поэтому состояние спорового материала и скорость прорастания спор имеют большое значение для эффективности микробных технологий.

Процесс выхода спор микроорганизмов из состояния покоя, несмотря на длительную историю изучения, до сих пор является предметом интереса исследователей [4; 5]. Ранее нами было проведено сравнительное исследование прорастания спор бесполого спороношения (спорангиоспор) и определение особенностей выхода их из состояния покоя у представителей зигомицетовых грибов – *Cunninghamella echinulata* и *Umbelopsis ramanniana* [1]. Было показано, что споры изученных штаммов находятся в состоянии экзогенного покоя, но имеют разные длительность лаг-фазы и скорость прорастания: у *C. echinulata* споры прорастали через 1–5 ч, а у *U. ramanniana* – через 20 ч. Кроме того, установлено, что в процессе выхода спор из состояния покоя в среде, не содержащей экзогенных питательных веществ (в дистиллированной воде), уровень трегалозы – сахара покоя – в покоящихся спорах *C. echinulata* и *U. ramanniana* значительно различался, а в проросших спорах снижался [2].

Споры грибов имеют существенные различия, как в химическом составе, так и в особенностях выхода из покоящегося состояния [3; 9]. Изменения в составе и содержании липидов, как резервных (триацилглицерины, эфиры стерина), так и мембранных (фосфо-, гликолипиды и стерина), а также в составе жирных кислот помогут прояснить роль липидов в процессе выхода из состояния экзогенного покоя спорангиоспор зигомицетовых грибов, различающихся по скорости прорастания.

Цель работы – исследовать изменения содержания и состава липидов и жирных кислот в экзогенно покоящихся и прорастающих в дистиллированной воде спорагиоспорах *Cunninghamella echinulata* ВКМ F-663 и *Umbelopsis ramanniana* ВКМ F-582 – продуцентов ненасыщенных жирных кислот, в том числе  $\gamma$ -линоленовой.

**Методы исследования.** В работе использовали 2 штамма из коллекции мицелиальных грибов ВКМ ИБФМ РАН, характеризующиеся разной скоростью роста: высокой – *Cunninghamella echinulata* (Thaxter 1891) Thaxter ex Blakeslee 1905 ВКМ F-663, и низкой – *Umbelopsis ramanniana* (Moeller 1903) W.Gams 2003 ВКМ F-582.

Грибы выращивали в стеклянных матрасах со скошенным агаризованным сусликом в течение 7 сут для получения обильного спорообразования. Смытые с поверхности мицелия и осажденные центрифугированием споры дважды промывали дистиллированной.

Одну часть спорового материала (непроросшие, "споры 0") использовали как контрольный вариант. Другую часть спор переносили в 2-литровые колбы со стерильной дистиллированной водой и инкубировали на качалке (180 об./мин) при 28°C. Споры 0, а также проросшие споры с ростовыми трубками ("споры П") быстро прорастающего штамма (*C.*

*echinulata* ВКМ F-663) использовали для определения состава липидов через 5 ч инкубации, а медленно прорастающего (*U. ramanniana* ВКМ F-582) через 20 ч.

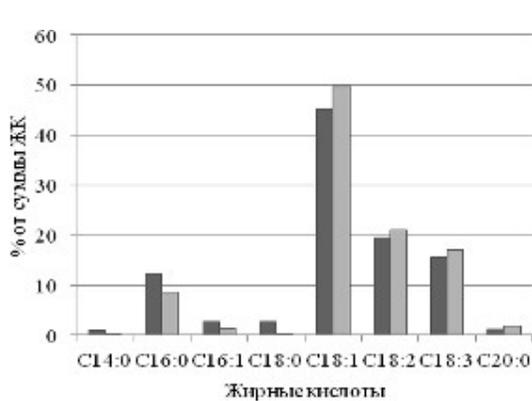
Липиды из биомассы спор экстрагировали методом Фолча. Для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) липиды подвергали кислотному метанолизу в смеси метанола и хлористого ацетила при 80°C в течение 1.5 ч. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом ГЖХ на газовом хроматографе Bruker 430 GC, снабженном пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой Select™ Biodiesel for FAME (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), в режиме линейного программирования температуры: 140°C (3 мин) – 4°C мин – 260°C (5 мин). Температура инжектора – 250°C, температура детектора – 250°C, линейная скорость потока газа-носителя (азота) – 20 см/с, деление потока 1:20. Объем вводимой пробы 1 мкл. Идентификацию индивидуальных жирных кислот проводили в сравнении времен удерживания со стандартом (FAME mix Supelco-37).

Состав классов липидов определяли методом ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (“Merck”, Германия) [6].

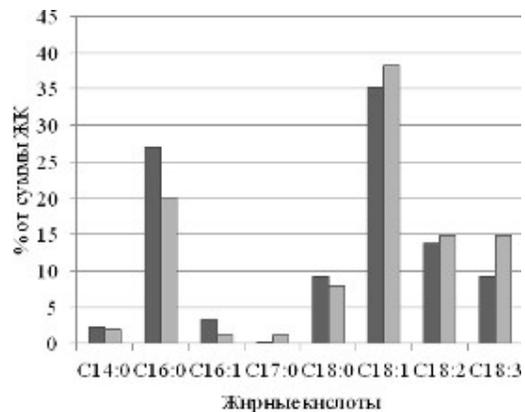
Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода медианы. Представлены значения результатов 3 независимых опытов.

**Результаты и обсуждение.** Процесс выхода спор из состояния покоя проводили в среде, не содержащей экзогенных питательных веществ (в дистиллированной воде). Такой подход позволяет получить адекватные данные об изменениях в составе метаболитов и оценить значение эндогенных соединений (в данном случае липидов) в процессе выхода спор из состояния покоя без стимулирующего влияния компонентов питательной среды.

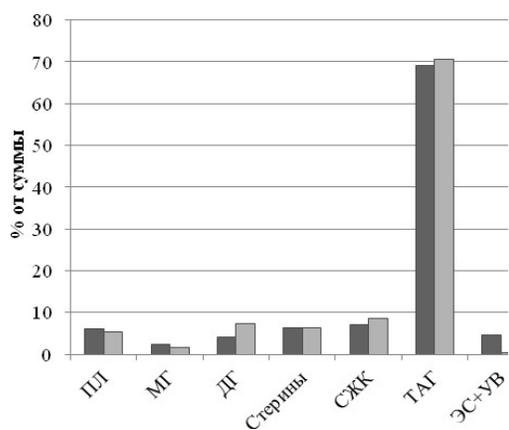
Состав жирных кислот (ЖК) общих липидов спор *C. echinulata* ВКМ F-663, находящихся в состоянии неглубокого покоя и быстро переходящих в первую (набухание; 1 ч) и вторую (формирование ростовой трубки; 2–5 ч) стадии прорастания представлен на рисунке (а). Основные изменения выразались в снижении относительного содержания насыщенных пальмитиновой и стеариновой кислот и возрастании доли ненасыщенных С<sub>18</sub>-кислот (олеиновой – С<sub>18:1</sub>, линолевой – С<sub>18:2</sub>, γ-линоленовой – С<sub>18:3</sub>), в результате чего степень ненасыщенности липидов в прорастающих спорангиоспорах увеличилась со 133.9 (споры 0) до 145.5 Δ/100 мол. ЖК (споры II). Споры 0 *U. ramanniana* ВКМ F-582, для которых был характерен длительный период прорастания (20 ч), имели по сравнению со спорами *C. echinulata* ВКМ F-663 более высокое содержание насыщенных ЖК (С<sub>16:0</sub> и С<sub>18:0</sub>) и более низкое – олеиновой и линолевой кислоты (рисунок, б). Уровень полиненасыщенной γ-линоленовой кислоты в спорах этого штамма также увеличивался в процессе выхода спорангиоспор из состояния покоя, что приводило к возрастанию степени ненасыщенности липидов (споры 0 – 93.9, споры II с – 113.8 Δ/100 мол. ЖК).



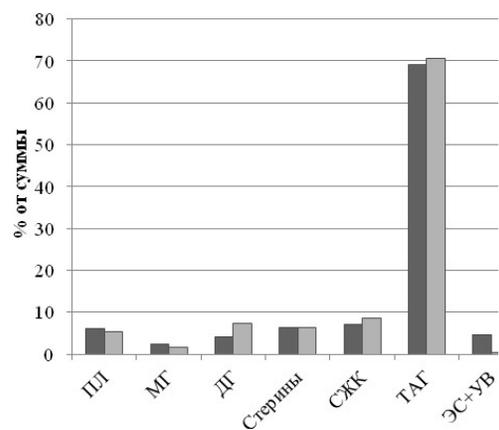
а



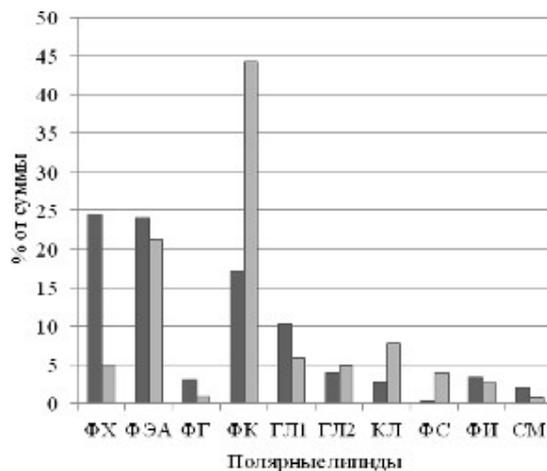
б



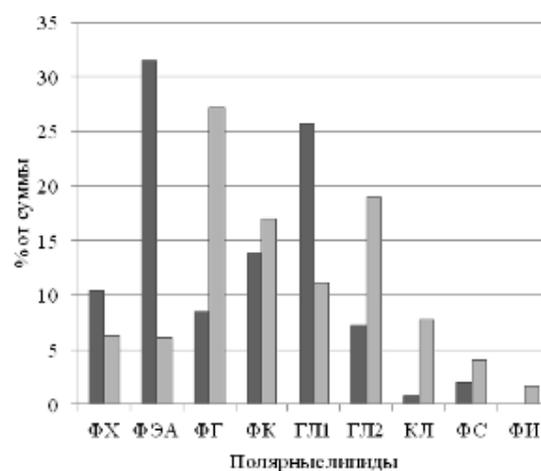
в



г



д



е

Рисунок. Состав липидов спорангиоспор *C. echinulata* ВКМ F-663 (а, в, д) и *U. ramanniana* ВКМ F-582 (б, г, е). ■ – споры 0 (покоящиеся); □ – споры II (прорастающие).

В общих липидах спорангиоспор штамма *C. echinulata* ВКМ F-663 основными липидами были триацилглицерины (ТАГ) (рис. в), а у спорангиоспор штамма *U. ramanniana* ВКМ F-582 – ТАГ, стерины (Ст), свободные жирные кислоты (СЖК) и диацилглицерины (ДАГ) (рис. г). Обращает на себя внимание тот факт, что в процессе прорастания спорангиоспор *C. echinulata* ВКМ F-663 не происходило сколько-нибудь значительных изменений в составе классов общих липидов, что можно объяснить тем, что нейтральные липиды не являются основным резервом, мобилизуемым на этапе выхода из состояния покоя. Ранее нами были получены данные по изменению содержания трегалозы в спорах зигомицетов [2]. В спорах 0 *C. echinulata* ВКМ F-663 ее содержание достигало 8.9% от сухой биомассы спор и снижалось при выходе из состояния покоя. Споры 0 *U. ramanniana* ВКМ F-582 имели значительно более низкое содержание трегалозы – 0.34%, и ее уровень в спорах II изменялся незначительно, однако в составе общих липидов наблюдалось некоторое увеличение содержания свободных и этерифицированных стеринов (рис. б).

Основными полярными липидами покоящихся спор *C. echinulata* ВКМ F-663 были фосфатидихолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидная кислота (ФК) и гликолипид 1 (ГЛ1) (рис. д). В процессе выхода из состояния покоя в спорах II происходило стремительное снижение доли ФХ и увеличение содержания ФК. В покоящихся спорах медленно прорастающего гриба *U. ramanniana* ВКМ F-582 соотношение мембранных липидов отличалось: основным были ФЭА, ГЛ1, ФХ и ФК (рис. е). Процесс прорастания его спорангиоспор также, как и спор *C. echinulata*, сопровождался снижением уровня ФХ и увеличением – ФК, однако для спор II *U. ramanniana* было характерно значительное снижение другого массивного фосфолипида – ФЭА и возрастание уровня фосфатидилглицерина (ФГ).

Примечательно, что уровень основного фосфолипида митохондриальных мембран – кардиолипина (КЛ) в процессе выхода спор из состояния покоя увеличивался у обоих представителей зигомицетов, что свидетельствует об активизации дыхательных процессов по сравнению с покоящимися спорами.

Высокое относительное содержание ФХ рассматривается как показатель гипометаболического состояния, в то время как его снижение и возрастание доли ФЭА и ФК свидетельствует о протекании активных метаболических процессов у грибов [3]. Кроме того, ФК является одним из соединений, принимающих участие в передаче клеточных сигналов при изменении условий внешней среды и в стрессовых условиях. Все вторичные липидные мессенджеры – сигнальные соединения – образуются из основных мембранных предшественников – ФХ и сфингомиелина (СМ) [8]. ФХ гидролизует в результате рецептор-опосредованной стимуляции специфической фосфолипазы С с образованием ДАГ или через стимуляцию

фосфолипазы D с образованием ФК [7]. Образованные в результате действия фосфолипаз ФК, лизо-ФК и ДАГ имеют отношение к контролированию многих клеточных функций [10] и оказывают влияние на пролиферативные свойства клеток.

В условиях отсутствия источников углерода и азота в среде (т.е. в условиях стресса “голодной среды”) споры, тем не менее, способны к прорастанию, однако изменения в их липидном составе свидетельствуют о том, что отдельные их классы играют скорее структурную и сигнальную роль, нежели запасную.

**Выводы.** Основные изменения, которые происходят в спорангиоспорах зигомицетовых грибов при выходе из покоящегося состояния в условиях отсутствия питательных веществ в среде заключаются в изменении содержания эндогенных запасов углеводов (трегалозы) и мембранных липидов. Изменения в липидах выражаются в увеличении доли ненасыщенных жирных кислот, в снижении содержания массивных фосфолипидов (ФХ и ФЭА) и увеличении уровня ФГ и ФК, которые могут выполнять функцию сигнальных соединений. Что касается считающихся резервными ТАГ, то их содержание в спорангиоспорах исследуемых зигомицетов при выходе из покоящегося состояния практически не изменялось, поэтому можно сделать вывод о выполнении ими в процессе прорастания функций, отличной от запасной.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-04-03484).

### Список литературы

1. Мысякина И.С., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Прорастание спор мицелиальных грибов в связи с экзогенным покоем // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 269–274.
2. Мысякина И.С., Усов А.И., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Содержание трегалозы в покоящихся и прорастающих спорах мицелиальных грибов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3 (1). С. 143–145.
3. Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Алехин А.И., Сергеева Я.Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 5–17.
4. D’Enfert C. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa* // Fungal Genet. Biol. 1997. V. 21. P. 163-172.
5. Dantigny P., Nanguy S.P.-M., Judet-Correia D., Bensoussan M. A new model for germination of fungi // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 146. P. 176-181.

6. Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. 2<sup>nd</sup> edn. Amsterdam–NY–Oxford: Elsevier, 1986. 464 p.
7. Moritz A., De Graan P.N.E., Gipsen W.H., Wirtz K.W.A. Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 7207–7210.
8. Sciorra V.A., Rudge S.A., Jiyao Wang, McLaughlin S. Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes // J. Cell Biol. 2002. V. 159. № 6. P. 1039.
9. Wyatt T.T., Wösten H.A.B., Dijksterhuis J. Fungal spores for dispersion in space and time // Adv. Appl. Microbiol. 2013. V. 85. P. 43–91.
10. Xie Z., Fang M, Rivas M.P., Faulkner A.J., Sternweis P.C., Engebrecht J.A., Bancaitis V.A. Phospholipase D activity is required for suppression of yeast phosphatidylinositol transfer protein defects // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 12346–12351.

## ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ У ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА МИНСКА

Головач Т.Н.<sup>1</sup>, Иванов А.А.<sup>2</sup>, Яцков Н.Н.<sup>1</sup>, Курченко В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск

<sup>2</sup> Таможенный комитет Республики Беларусь, г. Минск

*kurchenko@tut.by*

*В статье приведены данные по встречаемости IgE к различным аллергенам в сыворотках крови 3522 пациентов города Минска и Минского района. Показано, что у 5,87% больных содержатся IgE к пищевым аллергенам. В том, числе к растительным антигенам – 2,56% и животным антигенам – 3,3%. Наиболее часто аллергия обнаруживается у больных к животным белкам: коровьему молоку – 0,77%, казеину – 0,58%, α-лактальбумину – 0,89%, β-лактоглобулину – 0,22%. Предложена технология получения ферментативного гидролизата белков сыворотки молока с низким аллергенным потенциалом. Частичный гидролизат белков сыворотки молока, полученный по этой технологии, может быть использован в качестве продуктов лечебно-профилактического и профилактического назначения в питании здоровых детей, входящих в группы риска, а так же в питании больных с нетяжелыми формами аллергических проявлений.*

**Введение.** В настоящее время около 30% населения земного шара страдает различными аллергическими заболеваниями, при этом каждый третий житель России подвержен аллергии. Значительное место среди этих заболеваний занимает аллергия, вызванная пищевыми продуктами. Показано, что она встречается в среднем, у 10% детей и 2% взрослых. При этом наследственная отягощенность по аллергическим заболеваниям обнаружена