

УДК 574.24:577.115.083+577.114

ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИИ К ХОЛОДУ У ПСИХРОТОЛЕРАНТНОГО МИКРОМИЦЕТА *MUCOR FLAVUS*

© 2024 г. О. А. Данилова^{а, *}, Е. А. Януцевич^а, Г. А. Кочкина^б, Н. В. Гроза^с, В. М. Терешина^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского,
Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,
Москва, 119071, Россия

^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,
Пушино, 142290, Россия

^сМИРЭА Российский технологический университет, Москва, 119454, Россия
*e-mail: noitcelfer@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 05.01.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2024 г.

Для изучения механизмов защиты мембран и макромолекул клетки от холода исследовали состав осмолитов, мембранных липидов и их жирных кислот в погруженной культуре *Mucor flavus* в динамике роста при 20 и 4°C. Этот микромицет является психротолерантом, так как имеет широкий температурный диапазон роста (от 2 до 25°C) с оптимумом при 20°C. *Mucor flavus* отличается высокой скоростью роста (15 мм/сут при 20°C, 4 мм/сут при 0°C). При обеих температурах в составе мембранных липидов доминировали фосфатидные кислоты и фосфатидилэтаноламины, тогда как фосфатидилхолины являлись минорными компонентами. Основное различие в составе мембранных липидов — вдвое более низкое относительное содержание стерина при 4°C. В процессе роста в оптимальных условиях снижалась доля фосфатидных кислот на фоне небольшого повышения долей стерина, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов, тогда как при 4°C незначительно снижалась доля фосфатидных кислот, и повышалась доля фосфатидилхолинов. Состав жирных кислот фосфолипидов, где доминировали линолевая, олеиновая, линоленовая и пальмитиновая кислоты, в процессе роста при 20°C практически не изменялся. При 4°C снижалась доля пальмитиновой, и повышалась доля олеиновой кислоты, а также снижалась вдвое доля γ-линоленовой кислоты на фоне повышения доли α-линолевой. Однако эти изменения не приводили к существенному изменению степени ненасыщенности фосфолипидов, которая варьировала в диапазоне 1.5–1.6. В составе осмолитов цитозоля преобладали трегалоза и глюкоза, глицерин присутствовал в минорном количестве только при 4°C. В процессе роста, независимо от температуры, количество осмолитов достигало 3% от сухой массы, и доля трегалозы составляла 70%. При обеих температурах наблюдалось постоянство состава осмолитов, слабые изменения в составе мембранных липидов и их степени ненасыщенности, что, вероятно, способствует высокой скорости роста гриба в широком диапазоне температур.

Ключевые слова: психротолерантность, осмолиты, трегалоза, мембранные липиды, фосфатидные кислоты, стерин, степень ненасыщенности

DOI: 10.31857/S0026365624040011

Земля является холодной планетой, 85% территории которой постоянно или сезонно подвергается действию температур ниже 5°C. К низкотемпературным местообитаниям относят Арктический и Антарктический регионы, горные вершины, морские глубины, холодные почвы, озера, пещеры, холодные пустыни, криопэги (Кочкина и соавт., 2007; Hoshino, Matsumoto, 2012; Кочкина и соавт., 2014; Wang et al., 2015; Marchetta et al., 2023). Около 70% Земли занято океанами, вода которых на глубине имеет температуру от –1 до 4°C, снег

покрывает ~ 35% суши, замерзшая земля составляет ~ 24%, морской лед ~ 13% и ледники ~ 10%. Колебания температур в таких местообитаниях создают условия для развития микроорганизмов, включая грибы. Так, в Антарктиде преобладают представители отдела Ascomycota (99.2% микобиоты), в основном дрожжи, тогда как грибы отделов Basidiomycota и Mucoromycota составляют лишь 0.7 и 0.1%, соответственно (Pudasaini et al., 2017). Напротив, в Арктике присутствуют базидиальные микоризные грибы, которые необходимы для выживания

растений-хозяев (Smith, Read, 2008). Холодоустойчивые грибы играют важнейшую роль в круговороте веществ и биоценозе холодных местообитаний. Кроме того, они привлекают внимание астробиологов, так как способны развиваться в условиях, аналогичных марсианским, например, в присутствии перхлоратов (Cassaro et al., 2021). Возрастает также интерес к экстремофильным грибам, в том числе и холодоустойчивым, как к источникам биологически активных веществ и ферментов с необычными свойствами (Feller, Gerday, 2003; Ibrar et al., 2020).

До настоящего времени дискуссионным остается вопрос об определениях психрофильности/психротолерантности. Наиболее распространенное определение сформулировано для бактерий: психрофилы – микроорганизмы, способные расти при 0°C, имеющие оптимум роста при температуре $\leq 15^\circ\text{C}$ и не растущие при 20°C (Morita, 1975). Однако некоторые исследователи считают, что для эукариотных организмов такое определение не подходит, поскольку отдельные стадии цикла развития могут протекать при различных оптимальных температурах (Feller, Gerday, 2003; Cavicchioli, 2006; Hoshino, Matsumoto, 2012). Поэтому предложены также новые термины: стенопсихрофил (аналог “психрофила”) – для микроорганизмов с ограниченным диапазоном температур роста и эврипсихрофил (аналог “психротолеранта”) для микроорганизмов, которые предпочитают стабильно холодную среду, но могут также расти в широком диапазоне температур, вплоть до мезофильного. Существует также предложение считать организм психрофилом, если он способен расти при температуре $\leq 5^\circ\text{C}$, и криофилом, если рост возможен при $\leq 0^\circ\text{C}$, а весь цикл развития осуществляется в криозоне (Hoshino, Matsumoto, 2012; Coker, 2019).

Развитие психрофилов в холодных условиях стало возможным благодаря их способности противостоять низкой кинетической энергии среды и замерзанию воды, сформировавшейся в процессе молекулярной эволюции и адаптации (Casaneva et al., 2010). В процессе эволюции холодоустойчивых грибов происходила адаптация всех систем и процессов к холоду на молекулярном (особенности генома и экспрессии генов, строение белков, в том числе и ферментов) и физиологическом (образование антифризных белков, белков теплового и холодового шоков, поддержание жидко-кристаллического состояния мембран, накопление в цитозоле осмолитов, антиоксидантная защита) уровнях (Yusof et al., 2021). Известно, что при холодовом шоке наблюдается снижение активности мембранно-связанных ферментов и транспортеров, скорости трансляции и фолдинга, стабилизируются вторичные структуры РНК и ДНК, повышается упорядоченность мембранных липидов, приводящая к снижению текучести мембран (Sahara et al., 2002; Redón et al., 2012). Поэтому для

психрофилов важным звеном адаптации является поддержание функций мембран, что важно для работы связанных с мембранами белков и процессов. Текучесть мембраны зависит от свободного движения ацильных групп мембранных фосфолипидов, латеральной диффузии и колебательного движения фосфолипидов, а также взаимодействия между различными доменами в мембране (Hayashi, Maeda, 2006). На текучесть мембран оказывают влияние степень ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов (Inouye, Phadtare, 2014), соотношения стерины/фосфолипиды (Gostinčar, Gunde-Simerman, 2018) и фосфатидилэтаноламина/фосфатидилхолина (Dawaliby et al., 2016), а также малые белки теплового шока (Tiwari et al., 2015).

Большое значение для криоустойчивости дрожжей имеют осмолиты трегалоза и глицерин, синтез которых регулируется HOG-путем (Inouye, Phadtare, 2014). Так, делеция гена HOG1 не влияет на рост дрожжей при 12°C, но снижает криоустойчивость при 4°C, поскольку не происходит индукции экспрессии генов ферментов синтеза трегалозы и глицерина. Трегалоза является многофункциональным соединением с протекторной, антиоксидантной, шаперонной, транспортной, запасной функциями (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Argüelles et al., 2017; Kahraman et al., 2019; Kosar et al., 2019). Уникальность этого нередуцирующего дисахарида заключается в том, что он способен защищать как макромолекулы, так и мембраны клетки, оказывая стабилизирующее действие благодаря замещению молекул воды в гидратных оболочках головок фосфолипидов и макромолекул путем образования многочисленных водородных связей. Способность трегалозы защищать мембраны предполагает, что мембранная и осмолитная система клетки взаимосвязаны, и необходимо совместное исследование мембранных липидов и осмолитов. Однако все исследования степени ненасыщенности жирных кислот психрофилов до настоящего времени проводили на общих липидах, включающих как мембранные, так и запасные, что не позволяет отнести этот показатель к мембранам. Кроме того, большинство исследований посвящено психрофильным дрожжам, а не мицелиальным грибам. Но даже для дрожжей исследования состава мембранных липидов единичны.

Целью данного исследования является изучение роли мембранных липидов и осмолитов в адаптации холодоустойчивого микромицета *Mucor flavus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использовали мукоровый гриб *Mucor flavus* Bainier 1903 ВКМ

F-4102D Mucoraceae, Mucorales, Insertae sedis, Mucoromycetes, Mucoromycota, Fungi. Микромицет изолирован из грунта пещеры “Ледяная” (Красноярский край, Березовский район), температура воздуха и грунта в которой составляла 4–6°C (Хижняк, 2009; Илиенц, 2011). При выделении получил наименование *Mucor* sp., в дальнейшем был идентифицирован в ВКМ как *M. flavus* на основании культурально-морфологических признаков и молекулярно-генетического анализа. Последовательность LSU rDNA этого штамма была депонирована в Генбанке под номером OR575477.

Гриб выращивали при оптимальной температуре (20°C) в течение 4–5 сут на скошенном сусле-агаре (7°Б), хранили при температуре 4–8°C.

Оптимальную температуру роста определяли, измеряя линейную скорость роста гриба в поверхностной культуре при различных температурах (–2...27°C). Споровую суспензию с концентрацией 10^7 спор/мл в количестве 5 мкл вносили в центр чашки Петри с сусле-агаром (7°Б). Диаметр колоний измеряли каждые 1–3 сут до момента, когда мицелий достигал краев чашки.

Выращивание гриба в глубинной культуре проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды Гудвина (Garton et al., 1951) на шейкерах New Brunswick Innova 44 и 44R (Eppendorf, США) со скоростью вращения 120 об./мин. В качестве инокулята использовали споровую суспензию, которую вносили до концентрации 10^5 – 10^6 спор/мл среды. Культивирование проводили при оптимальной температуре 20°C в течение 1–4 сут и при температуре 4°C в течение 4–15 сут.

Анализ липидов, углеводов и полиолов. Определение количества липидов, углеводов и полиолов проводили, как описано ранее (Януцевич и соавт., 2023). Вкратце, липиды экстрагировали по методу Николса с изопропанолом, дезактивирующим фосфолипазы, разделяли двумерной (полярные липиды) или одномерной (нейтральные липиды) тонкослойной хроматографией (ТСХ) и количественно определяли с использованием стандартных соединений методом денситометрии (программное обеспечение DENS). Для изучения состава жирных кислот полярные липиды выделяли методом одномерной ТСХ в системе для нейтральных липидов, элюировали смесью хлороформ–метанол (1:1), затем экстракт упаривали и проводили метанолиз 2.5% H_2SO_4 в метаноле в течение 2 ч при 70°C. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом ГЖХ.

Растворимые в цитозоле углеводы и полиолы экстрагировали кипящей водой, удаляли белки и заряженные соединения, из лиофильно высушенного образца получали триметилсилильные производные (Brobst, 1972) и анализировали методом ГЖХ с внутренним стандартом.

Статистический анализ. Для каждого варианта эксперименты проводили трижды ($n = 3$). На графиках каждая точка данных представляет собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В поверхностной культуре гриб рос в широком диапазоне температур от –2 до 25°C. Максимальная скорость роста 15 мм/сут наблюдалась при оптимальной температуре 20°C (рис. 1). При самой низкой использованной температуре (–2°C) скорость роста гриба снижалась до 2 мм/сут.

В глубинной культуре гриб рос в виде пеллетов белого цвета. При оптимальной для роста температуре гриб накапливал биомассу около 7–8 г/л к 3 сут, а при 4°C такую же к 10 сут.

Исследование состава растворимых углеводов и полиолов (УиП) цитозоля мицелия гриба показало, что при обеих использованных температурах общее количество углеводов у *Mucor flavus* было невелико и составляло около 3% от сухой биомассы (рис. 2).

Качественный состав углеводов не различался, основными являлись трегалоза и глюкоза, в следовом количестве присутствовали полиолы: глицерин и маннит. При 20°C в молодой культуре гриба (1 сут) доминирующими углеводами были глюкоза (57% от суммы) и трегалоза (38%) (рис. 2а). Затем в течение суток доля трегалозы повышалась до 70% на фоне снижения доли глюкозы до 27%. Данное соотношение углеводов поддерживалось далее в процессе роста. При 4°C в молодой культуре гриба (4 сут) доминирующими углеводами были глюкоза (53%), трегалоза (24%) и глицерин (21%) (рис. 2б). В динамике роста культуры резко изменялось соотношение УиП: относительное содержание глюкозы снижалось до 27%, глицерина до 3%, в то время как доля трегалозы возрастала до 70%.

Для исследования роли липидов в адаптации гриба к понижению температуры был изучен

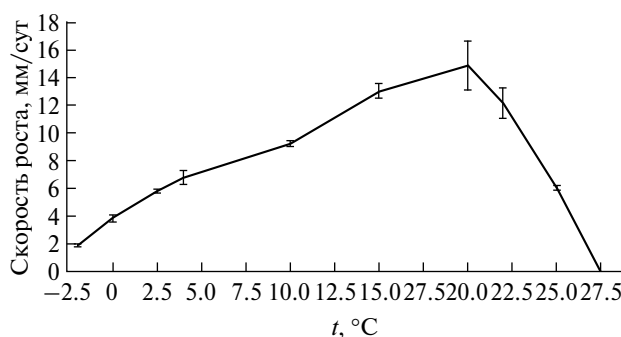


Рис. 1. Скорость роста *M. flavus* в зависимости от температуры.

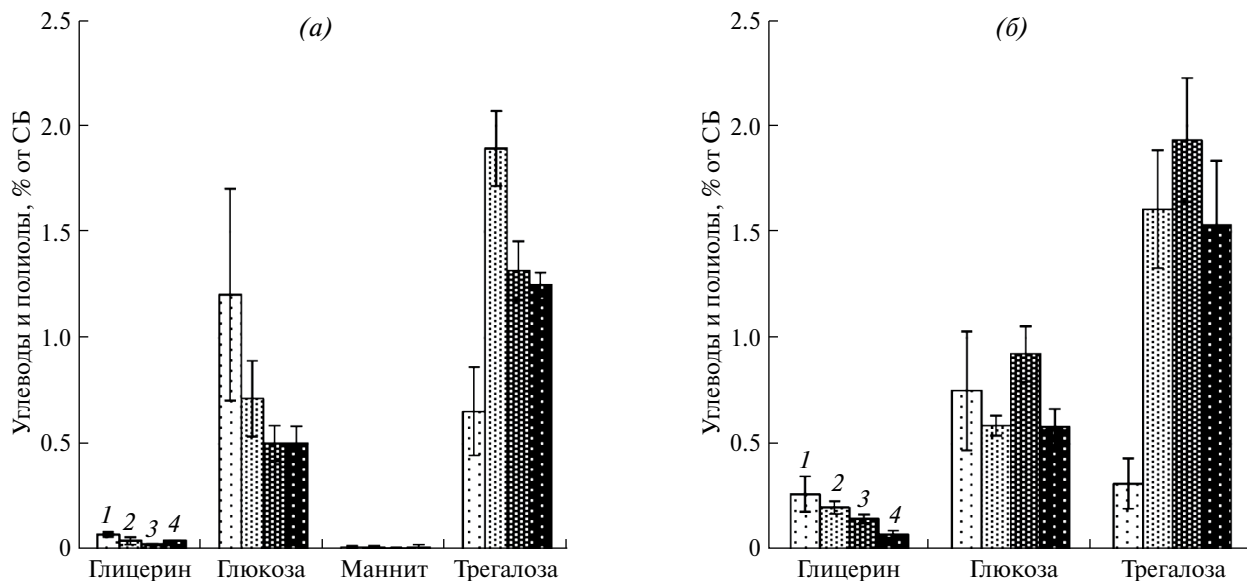


Рис. 2. Состав углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста *M. flavus* при 20°C (а) и 4°C (б). (а): 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут; (б): 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут; СБ – сухая биомасса.

состав мембранных и запасных липидов, а также состав жирных кислот фракции мембранных липидов в ходе роста глубинной культуры гриба при температурах 20 и 4°C. Количество мембранных липидов гриба варьировало в пределах 10–15% и слабо изменялось как в динамике роста, так и при различных температурах (рис. 3).

При оптимальной температуре в составе мембранных липидов доминировали фосфатидные кислоты (ФК) и фосфатидилэтаноламины (ФЭ) (рис. 4).

Фосфатидилхолины (ФХ) и стеринны (Ст) присутствовали в минорном количестве, остальные

липиды (кардиолипины, фосфатидилсеринны, фосфатидилинозиты и лизофосфатидилэтаноламины, лизофосфатидилхолины и сфинголипиды) в виде следов. В динамике роста доля ФК снижалась, а доли ФЭ, ФХ и Ст возрастали. При росте в условиях 4°C состав мембранных липидов такой же, можно отметить только, что доля стериннов была втрое ниже (рис. 5). При пониженной температуре состав мембранных липидов в динамике роста более стабилен, чем при оптимальной.

Исследование жирнокислотного состава фракции полярных липидов показало, что при обеих

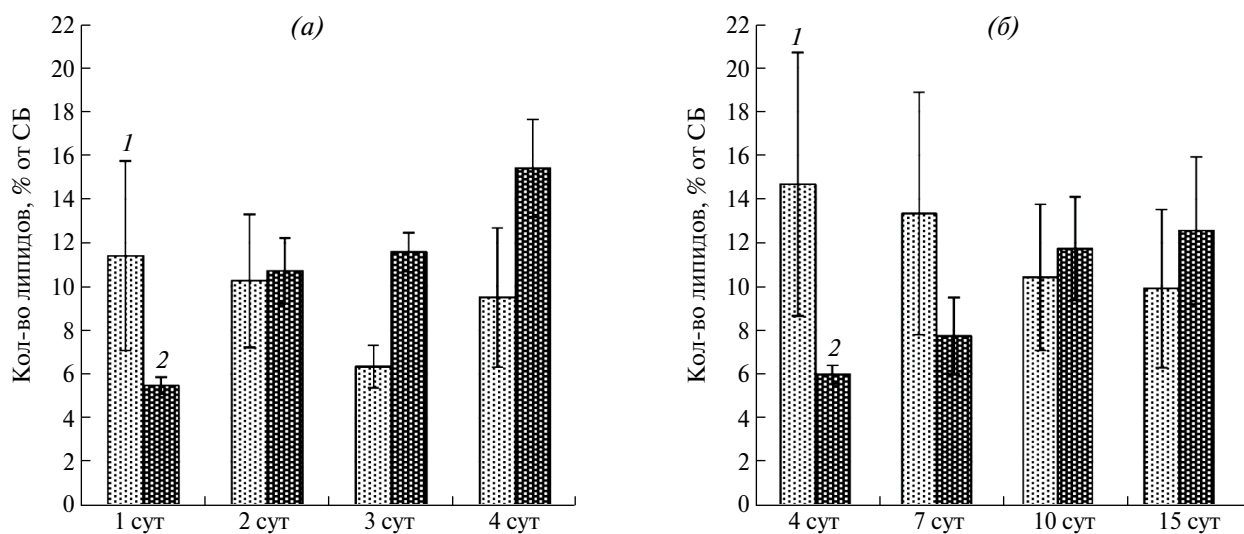


Рис. 3. Количество мембранных и запасных липидов гриба при 20°C (а) и 4°C (б): 1 – мембранные липиды, 2 – запасные липиды.

температурах доминирующими жирными кислотами являлись линолевая (C18:2n6c), пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1n9c), и α - и γ -линоленовая кислоты (C18:3n3 и C18:3n6 соответственно) (рис. 6а и 7а).

Тем не менее, была выявлена разница в соотношении жирных кислот. Так, при 20°C доля линолевой

кислоты достигала 35%, а олеиновой 20% (рис. 6а), тогда как при 4°C доля линолевой кислоты не превышает 25%, а относительное содержание олеиновой кислоты достигает 33% (рис. 7а). Кроме того, в оптимальных условиях линоленовая кислота представлена 20% от суммы γ -формы и следами α -формы, а при 4°C доля γ -линоленовой кислоты снижалась

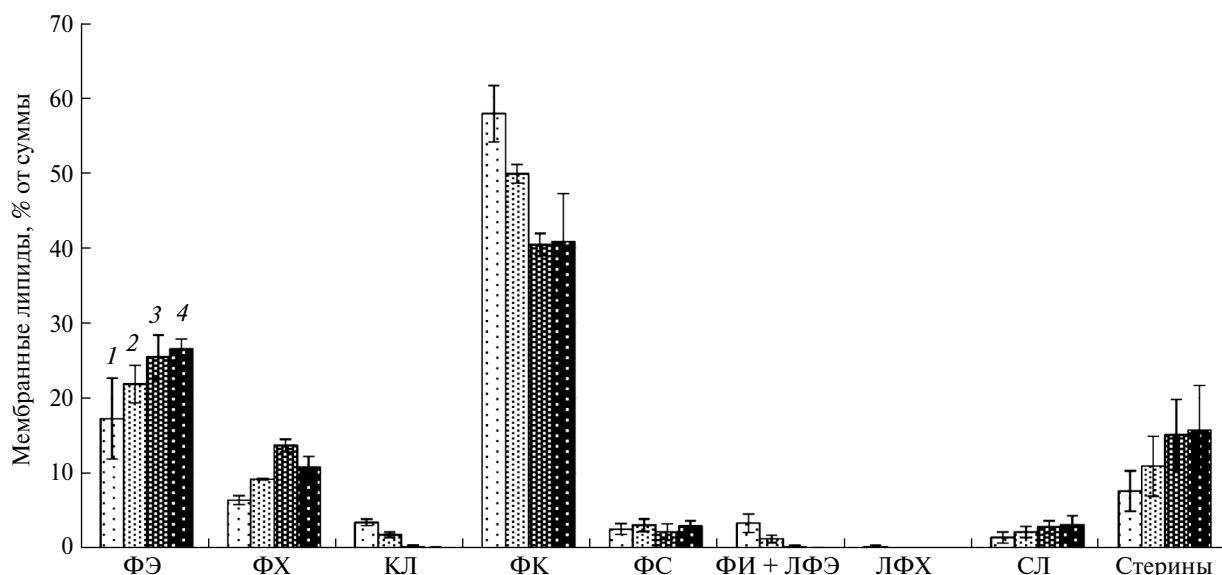


Рис. 4. Состав мембранных липидов в динамике роста *M. flavus* при 20°C. ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины, СЛ – сфинголипиды. 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут.

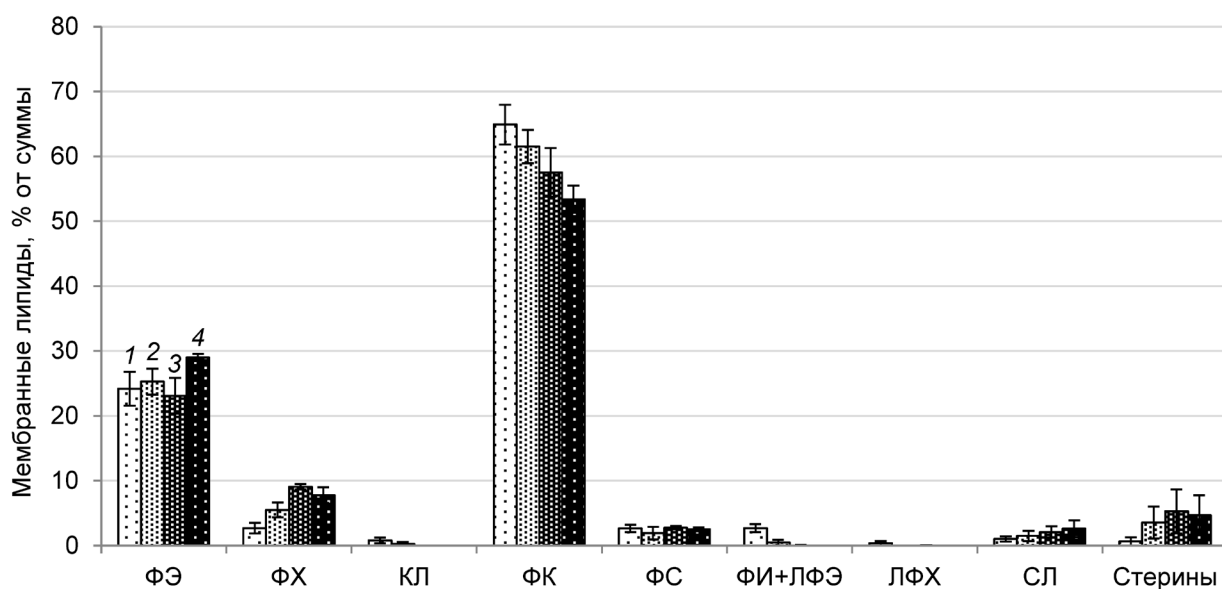


Рис. 5. Состав мембранных липидов в динамике роста *M. flavus* при 4°C. ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины, СЛ – сфинголипиды. 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут.

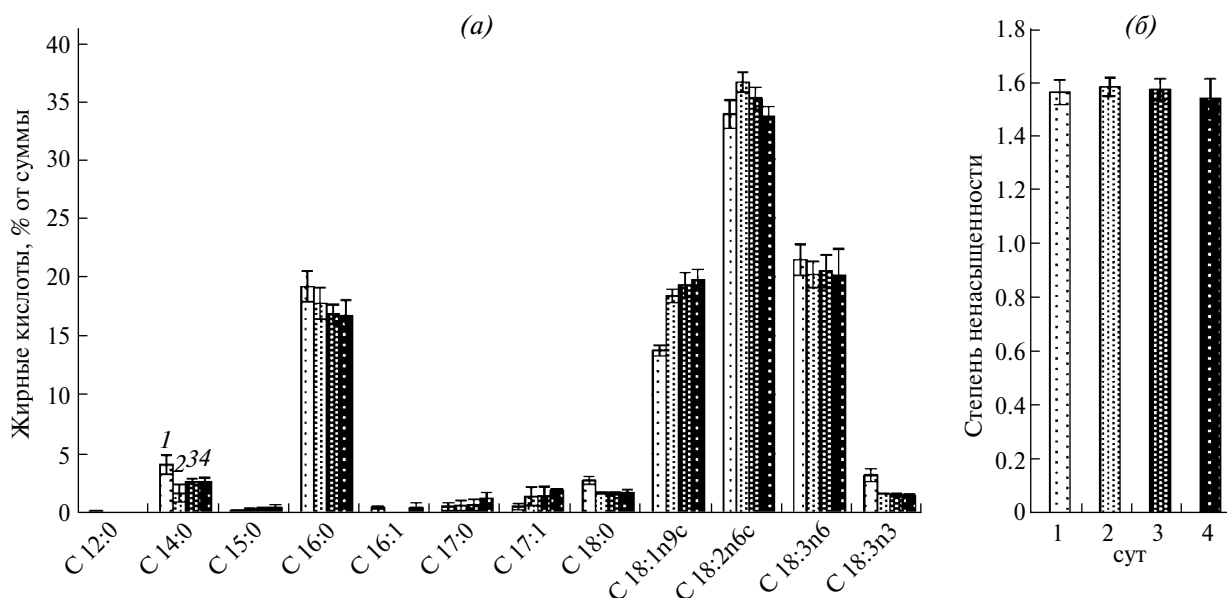


Рис. 6. Жирнокислотный состав мембранных липидов (а) и их степень ненасыщенности (б) в динамике роста *M. flavus* при 20°C. 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут.

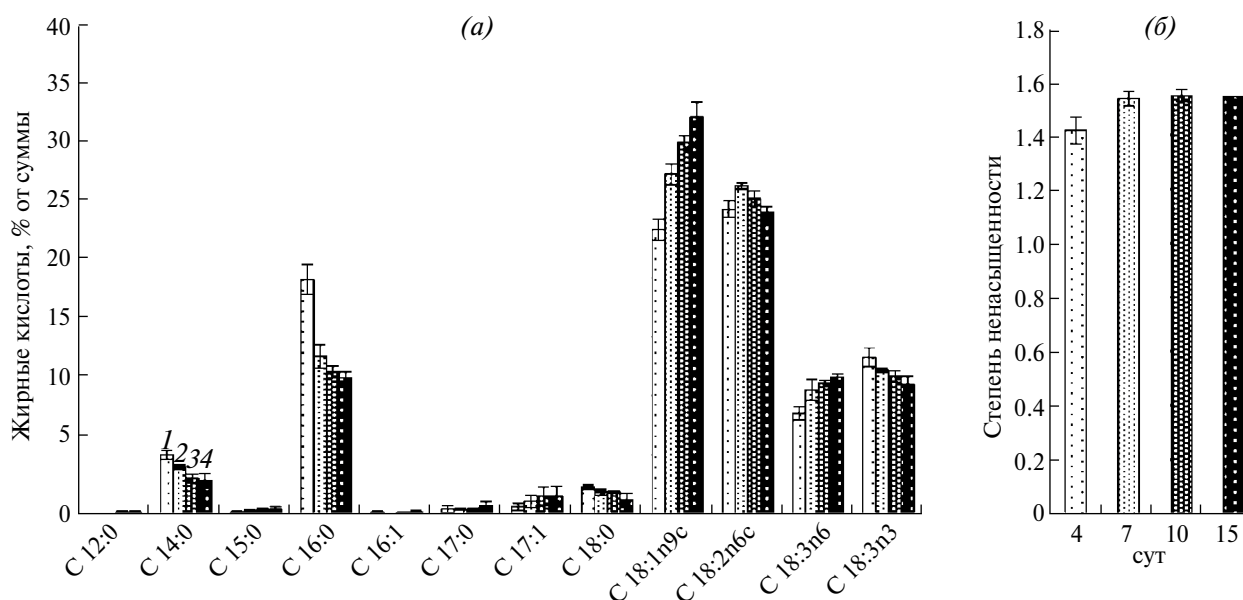


Рис. 7. Жирнокислотный состав мембранных липидов (а) и их степень ненасыщенности (б) в динамике роста *M. flavus* при 4°C. 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут.

вдвое, в то время как относительное содержание α -линоленовой кислоты достигало 10%. Однако, несмотря на эти различия в составе жирных кислот, степень ненасыщенности (СН) фракции фосфолипидов, независимо от стадии роста и температуры, слабо изменялась в пределах 1.5–1.6 (рис. 6б и 7б).

Количество запасных липидов с возрастом увеличивалось от 5 до 15%, независимо от температуры

выращивания (рис. 3). Основными запасными липидами были триацилглицериды (ТАГ) и диацилглицериды (ДАГ) (рис. 8).

При оптимальной температуре доля ТАГ достигала 75%, а ДАГ не превышала 20%, и в динамике роста изменения были незначительны (рис. 8а). При 4°C в молодой культуре в равных долях (около 30%) присутствовали ТАГ, ДАГ и свободные жирные

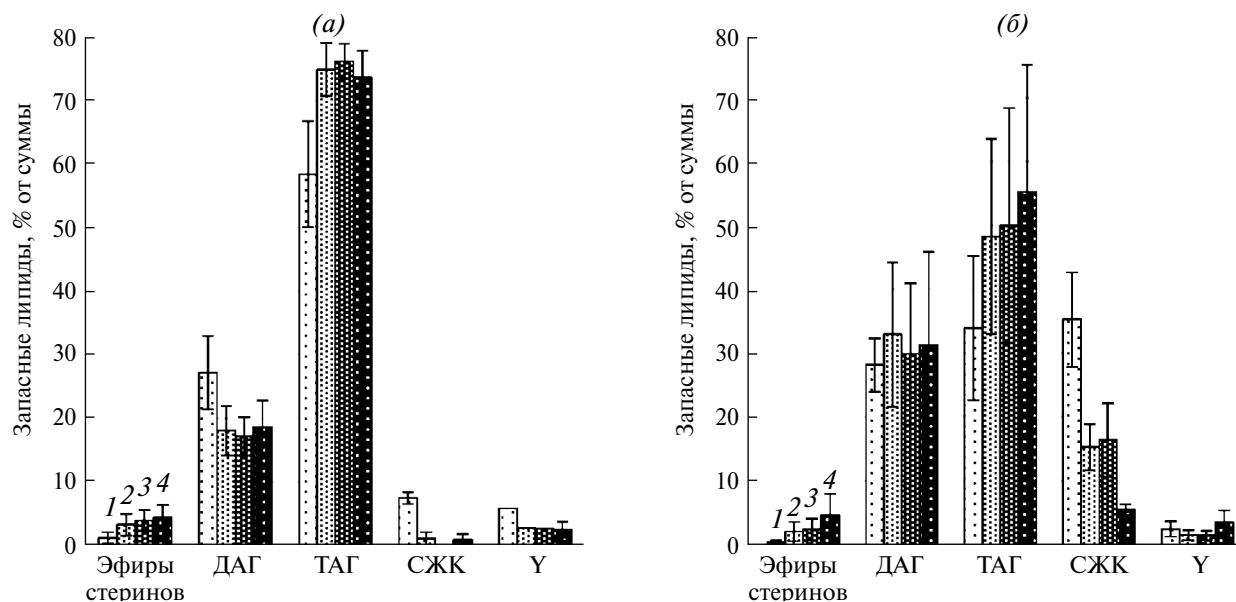


Рис. 8. Состав запасных липидов в динамике роста *M. flavus* при 20°C (а) и при 4°C (б). МАГ — моноацилглицериды, ДАГ — диацилглицериды, ТАГ — триацилглицериды, СЖК — свободные жирные кислоты, У — неидентифицированный липид. (а): 1 — 1 сут, 2 — 2 сут, 3 — 3 сут, 4 — 4 сут; (б): 1 — 4 сут, 2 — 7 сут, 3 — 10 сут, 4 — 15 сут.

кислоты (СЖК), в процессе роста доля СЖК снижалась до 5%, доля ДАГ не изменилась, а относительное содержание ТАГ возрастало до 55% (рис. 8б).

ОБСУЖДЕНИЕ

По основным определениям (Morita, 1975; Cavicchioli, 2006) исследуемый микромицет *M. flavus* относится к психротолерантным грибам, так как растет в широком диапазоне температур (–2...25°C), но имеет температурный оптимум роста при 20°C. Особенностью этого гриба является высокая линейная скорость роста, достигающая 15 мм/сут в оптимальных условиях, 4 мм/сут при 0°C, 6 мм/сут при 25°C. Эти показатели интересны с позиций адаптации к холоду, поэтому мы исследовали состав УиП цитозоля, мембранных и запасных липидов, а также состав жирных кислот фракции мембранных липидов в динамике глубинного роста гриба в оптимальных условиях (20°C) и при 4°C, когда скорость роста снижалась вдвое.

Изучение динамики роста биомассы в глубокой культуре показало, что кривые роста сходны и максимальная биомасса 7–8 г/л накапливается к 3 сут в оптимальных условиях и к 10 сут при 4°C. Количество УиП при обеих температурах невелико и варьирует в процессе роста в пределах 1–3% от сухой массы, основные компоненты представлены трегалозой, глюкозой и глицерином, что характерно для мукоровых грибов из-за слабо развитого пентозофосфатного цикла (Jennings, 1985).

В молодом мицелии при обеих температурах доминирует глюкоза (около 60% от суммы). В оптимальных условиях количество глицерина незначительно, а при 4°C выше и сравнимо по уровню с трегалозой (0.25 % от сухой массы). В процессе роста количество трегалозы существенно повышается, и она становится доминирующим компонентом (около 1.5% от сухой массы, 70% от суммы УиП). Неожиданным является тот факт, что количество трегалозы в процессе роста при 20 и 4°C было сходным, достоверных различий не обнаружено. По данным литературы, у дрожжей в холодных условиях накапливалось большое количество глицерина, а трегалоза появлялась только в криоzone (0–4°C) (Inoue, Phadtare, 2014). У облигатных психрофильных дрожжей *Mrakia psychrophila* при 4°C увеличивалась экспрессия генов десатуразы и глицерин-3-фосфат дегидрогеназы (Su et al., 2016). У исследуемого гриба при обеих температурах количество глицерина не превышало 0.25% от сухой массы, и он не становился доминирующим с возрастом. Низкое количество глицерина обнаружено также в глубоком мицелии трех холодоустойчивых антарктических микромицетов *Humicola marvinii*, *Geomyces pannorum* и *Mortierella elongata* (Weinstein et al., 2000). В совокупности, эти данные указывают на особое значение трегалозы у мицелиальных грибов, в отличие от дрожжей.

Фосфолипиды являются основным классом мембранных липидов у исследуемого гриба, тогда как доля стеридов не превышает 15%, а сфинголипиды присутствуют в следовом количестве. Нужно

отметить, что количество мембранных липидов было велико при обеих температурах, составляло около 10% от сухой массы и мало изменялось с возрастом. При обеих температурах доминирующим компонентом мембранных липидов были ФК (40–60% от суммы), доля ФЭ составляла около 20–30%, а ФХ не превышала 10%. В процессе роста в оптимальных условиях доля ФК снижалась на фоне повышения долей ФЭ и стерина, тогда как при пониженной температуре эти изменения выражены намного слабее. Основное различие между вариантами выращивания касается доли стерина, которая при 20°C втрое выше, чем при 4°C, т.е. соотношение стерина/фосфолипиды при пониженной температуре было значительно ниже. Это согласуется с данными о низкой доле стерина, полученными для дрожжей (Inouye, Phadtare, 2014), и отсутствии эргостерина у психротолерантного мукорового гриба *Mortierella elongata* (Weinstein et al., 2000). Самым необычным в составе мембранных липидов исследуемого гриба было преобладание небислойных липидов, ФК (40–60% от суммы) и ФЭ (20–30%), при низком относительном содержании характерного для грибов бислойного фосфолипида ФХ (менее 10%). Такие же особенности состава мембранных липидов выявлены нами ранее для других экстремофильных грибов термофилов (Ianutsevich et al., 2016), алкалофилов (Bondarenko et al., 2017; Ianutsevich et al., 2021), ксерофилов (Danilova et al., 2022; Ianutsevich et al., 2023a), ацидофилов (Януцевич et al., 2023; Ianutsevich et al., 2023b). Роль фосфатидных кислот в структуре и функционировании мембран остается неясной. Этот необычный фосфолипид может быть как бислойным (при нейтральном значении pH и в отсутствии дивалентных ионов), так и небислойным (в слабокислых условиях и в присутствии ионов) (Kooijman et al., 2003; McMahon, Gallop, 2005). Кроме того, авторы полагают, что способность ФК к агрегации может приводить к образованию микродоменов, участвующих в формировании изгибов мембран – первому этапу формирования везикул, регулируя, таким образом, везикулярный транспорт из аппарата Гольджи, эндо- и экзоцитоз. Установлено, что изменение соотношения бислойных и небислойных липидов меняет профиль латерального давления в мембране, влияя на структуру и стабильность мембранных белков, их конформацию и/или функции (Renne, Kroon de, 2018). Было выдвинуто предположение о роли небислойных липидов в связывании периферических мембранных белков и влиянии на стабильность трансмембранных белковых комплексов путем изменения профиля латерального давления (Brink-Van Der Laan Van Den et al., 2004). Считают, что увеличение доли небислойных липидов приводит к формированию участков мембран в гексагональной фазе (L₆), при этом некоторые

ацильные цепи фосфолипидов становятся направленными “внутрь” клетки, что облегчает связывание с ними G-белков, фосфолипаз и др. (Vigh et al., 2005). В совокупности эти данные позволяют говорить о важной структурной и регуляторной функции ФК, как при адаптации к стрессорным факторам, так и в адаптации экстремофилов. Для таких небислойных липидов, играющих важную роль в динамической организации мембран при стрессе, предложен термин “липидный морфоген” (Frolov et al., 2011).

На примере 8 психрофильных дрожжей было показано, что основным фосфолипидом являлся небислойный ФЭ, отношение которого к ФХ при понижении температуры выращивания возрастало (Řezanka et al., 2016). Кроме того, был показан значительный рост содержания полиненасыщенных жирных кислот при понижении температуры, что приводило к увеличению степени ненасыщенности фосфолипидов.

Степень “бислойности” липидной молекулы и ее форма зависят от состава ацильных цепей. Так, показано, что в отсутствие бислойного ФХ в клетках дрожжей происходило замещение в ФЭ диненасыщенных ЖК на мононенасыщенные, что придавало молекуле ФЭ более “бислойную” структуру (Bohmann et al., 2006). Исследование состава жирных кислот фракции фосфолипидов у *M. flavus* показало, что основными были ненасыщенные олеиновая, линолевая, линоленовая и насыщенная пальмитиновая кислоты. В оптимальных условиях преобладает линолевая кислота (35% от суммы), остальные по 20%, и их состав слабо изменялся в процессе роста. При 4°C доли олеиновой, линолевой и линоленовой кислот сравнимы (по 25%), в процессе роста наблюдается снижение доли пальмитиновой и повышение доли олеиновой кислоты. Интересным фактом является то, что при 20°C линоленовая кислота представлена, в основном γ-формой, а при 4°C равными долями γ- и α-форм, что указывает на важность α-линоленовой кислоты в адаптации к понижению температуры. Следует отметить, что обнаруженные различия в составе жирных кислот при различных температурах в процессе роста не привели к изменению степени ненасыщенности, которая варьирует в узких пределах 1.5–1.6. Ранее постоянство состава жирных кислот и, следовательно, их степени ненасыщенности (около 1.4), было обнаружено у психрофильных дрожжей *Glaciozyma antarctica* при всех изученных температурах (15, 0 и 12°C), несмотря на то, что во всех вариантах наблюдалась экспрессия генов Δ₉- и Δ₁₂-десатураз жирных кислот (Bharudin et al., 2018). У психротолерантного мукорового гриба *Mortierella elongata* СН достигала 1.8 и не изменялась при глубинном выращивании в условиях 5 и 15°C (Weinstein et al., 2000). В совокупности, эти данные позволяют предположить,

что у холодоустойчивых грибов существуют механизмы поддержания СН фосфолипидов на постоянном высоком уровне. У бактерий при снижении температуры наблюдается повышение степени ненасыщенности жирных кислот, снижение средней длины цепи, образование метиловых производных и увеличение отношения *антеизо-/изо-*производных жирных кислот (Casanueva et al., 2010). У изучаемого гриба мы не наблюдали образования каких-либо производных жирных кислот и снижения средней длины цепи жирных кислот мембранных липидов. Более того, в процессе роста и при двух использованных температурах мы не обнаружили существенного изменения степени ненасыщенности жирных кислот, что свидетельствует о высокой стабильности липидного бислоя.

Прямая корреляция между степенью ненасыщенности жирных кислот и текучестью мембраны подтверждена в опытах с *Rhodospiridium kratochvilovae* (Wang et al., 2017). Так, нокаут гена RKD12, кодирующего Δ_{12}/Δ_{15} -десатуразу, приводил к снижению долей линолевой и линоленовой кислот, снижению текучести и скорости роста при пониженной температуре. Делеция генов FAD12 и FAD15 отдельно у психрофильных дрожжей *Metschnikowia australis* W7-5 позволила выяснить, что снижение доли линолевой кислоты существенно замедляло рост в холодных условиях, чего не наблюдалось при отсутствии линоленовой кислоты (Wei et al., 2023). У исследуемого гриба, напротив, можно отметить значительное повышение доли α -линоленовой кислоты (с 2 до 10%) при 4°C, что указывает на ее значение в адаптации.

СН жирных кислот мембранных липидов у холодоустойчивых грибов может достигать высоких значений. Так, у психрофильных дрожжей *Leucosporidium frigidum* и *L. nivalis*, растущих при температуре 1°C, 80% жирных кислот представлены линоленовой (35–50%) и линолевой (25–30%) кислотами, что приводило к очень высокой СН (>2) (Watson et al., 1976). Однако нужно учесть, что состав жирных кислот определяли в общих липидах, включающих как запасные ацилглицериды, так и фосфолипиды, что создает трудности для сравнения. У исследуемого гриба СН оставалась относительно постоянной (1.5–1.6) как в процессе роста, так и при изменении температуры. Этот неожиданный факт позволяет предположить, что выявленная очень высокая скорость роста гриба в широком диапазоне температур может быть связана с доминированием трегалозы и относительно стабильными составом фосфолипидов и степени их ненасыщенности. Основное изменение в составе мембранных липидов при пониженной температуре по сравнению с оптимальной – снижение доли стериннов на фоне повышения доли фосфолипидов. Не исключено, что именно эта стабильность

осмолитной и мембранной систем обеспечивает возможность высокой скорости роста в очень широком диапазоне температур.

БЛАГОДАРНОСТИ

Для низкотемпературного глубинного выращивания было использовано оборудование ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Илиенц И.Р. Сообщества микромицетов пещер как источник штаммов для сельскохозяйственной и экологической биотехнологии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Красноярский гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2009. 19 с.
- Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Акимов В.Н., Гиличинский Д.А., Озерская С.М. Галопсихротолерантные грибы рода *Geomyces* из криопэггов и морских отложений Арктики // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 39–47.
- Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Akimov V.N., Gilichinskii D.A., Ozerskaya S.M. Halo- and psychrotolerant *Geomyces* fungi from arctic cryopegs and marine deposits // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 31–38. <https://doi.org/10.1134/S0026261707010055>
- Кочкина Г.А., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Чигинева Н.И., Василенко О.В., Спирина Е.В., Гиличинский Д.А. Разнообразие грибов деятельного слоя Антарктиды // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 236–244. <https://doi.org/10.7868/S002636561402013X>
- Kochkina G.A., Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Chigineva N.I., Vasilenko O.V., Spirina E.V., Gilichinskii D.A. Fungal diversity in the Antarctic active layer // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 94–101. <https://doi.org/10.1134/S002626171402012X>
- Хижняк С.В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири: автореф. дисс. ...докт. биол. наук: 03.00.16. Красноярский гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2009. 32 с.
- Януцевич Е.А., Данилова О.А., Грум-Гржимайло О.А., Гроза Н.В., Терешина В.М. Адаптация ацидофильного

- гриба *Sistotrema brinkmannii* к pH фактору // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 279–288.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622600870>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimailo O.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Adaptation of the acidophilic fungus *Sistotrema brinkmannii* to the pH factor // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 370–378.
<https://doi.org/10.1134/S0026261723600210>
- Argüelles J.-C., Guirao-Abad J.P., Sánchez-Fresneda R. Trehalose: a crucial molecule in the physiology of fungi // Reference Module in Life Sciences. Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition). Elsevier, 2017. P. 486–494.
- Bharudin I., Abu Bakar M.F., Hashim N.H.F., Mat Isa M.N., Alias H., Firdaus-Raih M., Md Illias R., Najimudin N., Mahadi N.M., Abu Bakar F.D., Abdul Murad A.M. Unravelling the adaptation strategies employed by *Glaciozyma antarctica* PI12 on Antarctic sea ice // Mar. Environ. Res. 2018. V. 137. P. 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.007>
- Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M. Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 743–754.
<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0940-4>
- Boumann H.A., Gubbens J., Koorengevel M.C., Oh C.-S., Martin C.E., Heck A.J.R., Patton-Vogt J., Henry S.A., de Kruijff B., de Kroon A.I.P.M. Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a Eukaryote // Mol. Biol. Cell. 2006. V. 17. P. 1006–1017.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0344>
- Brink-Van Der Laan E. Van Den, Antoinette Killian J., de Kruijff B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2004. V. 1666. P. 275–288.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.010>
- Brobst K.M. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives: analysis of corn syrup // General carbohydrate method / Eds. Whistler R.L., BeMiller J.N. New York–London: Academic Press, 1972. P. 3–8.
- Casanueva A., Tuffin M., Cary C., Cowan D.A. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of “omic” technologies // Trends Microbiol. 2010. V. 18. P. 374–381.
- Cassaro A., Pacelli C., Aureli L., Catanzaro I., Leo P., Onofri S. Antarctica as a reservoir of planetary analogue environments // Extremophiles. 2021. V. 25. P. 437–458.
<https://doi.org/10.1007/s00792-021-01245-w>
- Cavicchioli R. Cold-adapted archaea // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 331–343.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1390>
- Coker J.A. Recent advances in understanding extremophiles // F1000Research. 2019. V. 8. P. 1917.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1>
- Danilova O.A., Ianutsevich E.A., Bondarenko S.A., Antropova A.B., Tereshina V.M. Membrane lipids and osmolytes composition of xerohalophilic fungus *Aspergillus penicillioides* during growth on high NaCl and glycerol media // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 503–513.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722601373>
- Dawaliby R., Trubbia C., Delporte C., Noyon C., Ruyschaert J.M., van Antwerpen P., Govaerts C. Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 3658–3667.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.706523>
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 17R–27R.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Feller G., Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation // Nat. Rev. Microbiol. 2003. V. 1. P. 200–208.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro773>
- Frolov V.A., Shnyrova A.V., Zimmerberg J. Lipid polymorphisms and membrane shape // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. Art. a004747.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004747>
- Garton G.A., Goodwin T.W., Lijinsky W. Studies in carotenogenesis. 1. General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff // Biochem. J. 1951. V. 48. P. 154–163.
<https://doi.org/10.1042/bj0480154>
- Gostinčar C., Gunde-Cimerman N. Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi // Genes (Basel). 2018. V. 9. Art. 143.
<https://doi.org/10.3390/genes9030143>
- Hayashi M., Maeda T. Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biochem. 2006. V. 139. P. 797–803.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvj089>
- Hoshino T., Matsumoto N. Cryophilic fungi to denote fungi in the cryosphere // Fungal Biol. Rev. 2012. V. 26. P. 102–105.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.003>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 989–999.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Bondarenko S.A., Tereshina V.M. Membrane lipid and osmolyte readjustment in the alkaliphilic micromycete *Sodiomyces tronii* under cold, heat and osmotic shocks // Microbiology (SGM). 2021. V. 167. № 11. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.001112>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Antropova A.B., Tereshina V.M. Acquired thermotolerance, membrane lipids and osmolytes profiles of xerohalophilic fungus *Aspergillus penicillioides* under heat shock. // Fungal Biol. 2023a. V. 127. P. 909–917.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.01.002>

- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo O.A., Tereshina V.M. The role of osmolytes and membrane lipids in the adaptation of acidophilic fungi // *Microorganisms*. 2023b. V. 11. Art. 1733. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071733>
- Ibrar M., Ullah M.W., Manan S., Farooq U., Rafiq M., Hasan F. Fungi from the extremes of life: an untapped treasure for bioactive compounds // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 2777–2801. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10399-0>
- Inouye M., Phadtare S. Cold-shock response and adaptation to near-freezing temperature in cold-adapted yeasts // *Cold-adapted yeasts: biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance* / Eds. P. Buzzini, R. Margesin. Springer, 2014. <https://doi.org/10.1126/stke.2372004pe26>
- Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. P. 3793–3810. <https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Jennings D.H. Polyol metabolism in Fungi // *Advances in microbial physiology* / Eds. Rose A.H., D.W. Tempest: Academic Press, 1985. P. 149–193.
- Kahraman M., Sevim G., Bor M. The role of proline, glycinebetaine, and trehalose in stress-responsive gene expression // *Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants* / Eds. Hossain M. et al. Cham: Springer International Publishing, 2019. P. 241–256.
- Kooijman E.E., Chupin V., de Kruijff B., Burger K.N.J. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid // *Traffic*. 2003. V. 4. P. 162–174. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>
- Kosar F., Akram N.A., Sadiq M., Al-Qurainy F., Ashraf M. Trehalose: a key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance // *J. Plant Growth Regul.* 2019. V. 38. P. 606–618. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9876-x>
- Marchetta A., Papale M., Rappazzo A.C., Rizzo C., Camacho A., Rochera C., Azzaro M., Urzi C., Lo Giudice A., De Leo F. A deep insight into the diversity of micro-fungal communities in Arctic and Antarctic lakes // *J. Fungi*. 2023. V. 9. Art. 1095. <https://doi.org/10.3390/jof9111095>
- McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling // *Nature*. 2005. V. 438. P. 590–596. <https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Morita R.Y. Psychrophilic bacteria // *Bacteriol. Rev.* 1975. V. 39. P. 144–167. <https://doi.org/10.1128/mmbr.39.2.144-167.1975>
- Pudasaini S., Wilson J., Ji M., van Dorst J., Snape I., Palmer A.S., Burns B.P., Ferrari B.C. Microbial diversity of Browning Peninsula, Eastern Antarctica revealed using molecular and cultivation methods // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00591>
- Redón M., Borrull A., López M., Salvadó Z., Cordero R., Mas A., Guillamón J.M., Rozès N. Effect of low temperature upon vitality of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid mutants // *Yeast*. 2012. V. 29. P. 443–452. <https://doi.org/10.1002/yea.2924>
- Renne M.F., de Kroon A.I.P.M. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // *FEBS Lett.* 2018. V. 592. P. 1330–1345. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12944>
- Řezanka T., Kolouchová I., Sigler K. Lipidomic analysis of psychrophilic yeasts cultivated at different temperatures // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2016. V. 1861. P. 1634–1642. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.07.005>
- Sahara T., Goda T., Ohgiya S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 50015–50021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209258200>
- Smith S.E., Read D. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, 2008. 3rd edn. 787 p.
- Su Y., Jiang X., Wu W., Wang M., Imran Hamid M., Xiang M., Liu X. Genomic, transcriptomic, and proteomic analysis provide insights into the cold adaptation mechanism of the obligate psychrophilic fungus *Mrakia psychrophila* // *G3 Genes| Genomes| Genetics*. 2016. V. 6. P. 3603–3613. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033308>
- Tapia H., Koshland D.E. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 2758–2766. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>
- Tiwari S., Thakur R., Shankar J. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi // *Biotechnol. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/132635>
- Vigh L., Escribá P.V., Sonnleitner A., Sonnleitner M., Piotto S., Maresca B., Horváth I., Harwood J.L. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function // *Prog. Lipid Res.* 2005. V. 44. P. 303–344. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.08.001>
- Wang M., Jiang X., Wu W., Hao Y., Su Y., Cai L., Xiang M., Liu X. Psychrophilic fungi from the world's roof // *Persoonia*. 2015. V. 34. P. 100–112. <https://doi.org/10.3767/003158515X685878>
- Wang M., Tian J., Xiang M., Liu X. Living strategy of cold-adapted fungi with the reference to several representative species // *Mycology*. 2017. V. 8. P. 178–188. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1370429>
- Watson K., Arthur H., Shipton W.A. *Leucosporidium* yeasts: obligate psychrophiles which alter membrane-lipid and cytochrome composition with temperature. // *J. Gen. Microbiol.* 1976. V. 97. P. 11–18. <https://doi.org/10.1099/00221287-97-1-11>
- Wei X., Zhang M., Chi Z., Liu G.-L., Chi Z.-M. Genome-wide editing provides insights into role

- of unsaturated fatty acids in low temperature growth of the psychrotrophic yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *australis* W7-5 // Mar. Biotechnol. 2023. V. 25. P. 70–82.
<https://doi.org/10.1007/s10126-022-10182-4>
- Weinstein R.N., Montiel P.O., Johnstone K. Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic // Mycologia. 2000. V. 92. P. 222–229.
<https://doi.org/10.2307/3761554>
- Yusof N.A., Hashim N.H.F., Bharudin I. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the antarctic yeast, *Glaciozyma antarctica* pi12 // J. Fungi. 2021. V. 7. Art. 528.
<https://doi.org/10.3390/jof7070528>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Cold Adaptation in a Psychrotolerant Micromycete *Mucor flavus*

O. A. Danilova¹*, E. A. Ianutsevich¹, G.A. Kochkina², N. V. Groza³, and V. M. Tereshina¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia

³MIREA Russian Technological University, Moscow, 119454 Russia

*e-mail: noitcelfer@mail.ru

Received December 7, 2023; revised January 5, 2024; accepted January 15, 2024

Abstract. To study the mechanisms of protection of the cell membranes and macromolecules from cold, the composition of osmolytes, membrane lipids, and their fatty acids in a submerged culture of *Mucor flavus* was analyzed in growth dynamics at 20 and 4°C. This micromycete is psychrotolerant, having a wide growth temperature range (from –2 to 25°C) with an optimum at 20°C. *Mucor flavus* has a high growth rate (15 mm/day at 20°C, 4 mm/day at 0°C). At both temperatures, phosphatidic acids and phosphatidylethanolamines were predominant in the composition of membrane lipids, while phosphatidylcholines were the minor components. The main difference in the composition of membrane lipids was the threefold lower share of sterols at 4°C. During growth under optimal conditions, the proportion of phosphatidic acids decreased against the background of a slight increase in the levels of sterols, phosphatidylethanolamines, and phosphatidylcholines, while at 4°C the proportion of phosphatidic acids decreased slightly and the proportion of phosphatidylcholines increased. The fatty acids composition of phospholipids during growth at 20°C did not change significantly; linoleic, oleic, linolenic, and palmitic acids were predominant. At 4°C, the proportion of palmitic acid decreased and that of oleic acid increased, while the proportion of γ -linolenic acid decreased by half while that of α -linolenic acid increased. However, these changes did not lead to a significant change in the unsaturation degree of phospholipids, which varied between 1.5 and 1.6. Trehalose and glucose were the predominant osmolytes of the cytosol; glycerol was present in minor amounts only at 4°C. At both temperatures, the amount of osmolytes reached 3% of the dry weight in the course of growth, and the proportion of trehalose reached 70%. At both temperatures, a constant composition of osmolytes and slight changes in the composition of membrane lipids and their degree of unsaturation were observed, which probably contributes to the high growth rate of the fungus over a wide temperature range.

Keywords: psychrotolerance, osmolytes, trehalose, membrane lipids, phosphatidic acids, sterols, degree of unsaturation