ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2019, том 55, № 3, с. 244–255

УДК 579.222.3:579.66:579.61

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ ЛОВАСТАТИНА И ЭКСПРЕССИИ *LOV*-ГЕНОВ 1,3-ДИАМИНОПРОПАНОМ И СПЕРМИДИНОМ ЧЕРЕЗ РЕГУЛЯЦИЮ LaeA У *Aspergillus terreus*

© 2019 г. А. А. Жгун[1, *], Г. К. Нураева[1], М. В. Думина[1], Т. М. Воинова[2], В. В. Джавахия[1], М. А. Эльдаров[1]

[1]*Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071, Россия*

[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская обл., пос. Большие Вязёмы, 143050, Россия*

**e-mail: Zzhgun@mail.ru*

Поступила в редакцию 16.08.2018 г.
После доработки 01.11.2018 г.
Принята к публикации 18.12.2018 г.

Симвастатин получают на основе понижающего холестерин препарата ловастатина, основным промышленным продуцентом которого является мицелиальный гриб *Aspergillus terreus*. Показано, что при ферментации штамма *A. terreus* дикого типа ATCC 20542 и его высокоактивного мутанта № 43-16 экзогенное введение таких полиаминов, как 1,3-диаминопропан или спермидин, повышало продукцию ловастатина на 20–45%. При этом максимальный уровень (10 г/л) продукции ловастатина штаммом № 43-16 наблюдался на 3 сут раньше, чем в контроле. Было обнаружено, что в этот период ферментации повышались уровни экспрессии генов биосинтеза ловастатина и *laeA* (глобального регулятора вторичного метаболизма грибов) при сходном профиле экспрессии генов метаболизма полиаминов в обоих штаммах.

Ключевые слова: Aspergillus terreus, ловастатин, вторичный метаболизм грибов, полиамины, спермидин, LaeA

DOI: 10.1134/S055510991902017X

Ловастатин (**ЛОВ**) – первый препарат, используемый для нормализации уровня холестерина в крови, который был одобрен в 1987 г. Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США. Этот ценный вторичный метаболит продуцируется различными мицелиальными грибами, в том числе, представителями родов *Penicillium*, *Monascus* и др. В промышленном масштабе используют штаммы, полученные на основе *Aspergillus terreus*, у которых классическими методами случайного мутагенеза и селекции удалось достичь наивысшего выхода этого поликетида [1]. Так, у полученного ранее высокоактивного штамма *A. terreus* 43-16 (**HY**) продукция ЛОВ увеличивалась в 200–300 раз по сравнению с исходным штаммом дикого типа ATCC 20542 (**WT**) [2] и сопровождалась повышением уровня экспрессии генов кластера биосинтеза ЛОВ (*lov*-генов) в 5–50 раз [3].

Процессы регуляции биосинтеза вторичных метаболитов грибов исключительно сложны, тесно связаны с определенными сигналами окружающей среды и зависят от источников углерода, азота, pH среды и т.д. [4]. Эта многоуровневая иерархическая позитивная и негативная регуляция включает различные сигнальные пути, кластер-специфические и глобальные регуляторы, эпигенетические механизмы, действующие на уровни организации хроматина и т.п. [5, 6]. В работах [7–9] было показано, что эффективными индукторами биосинтеза бета-лактамов у *Penicillum chrysogenum* и *Acremonium chrysogenum* были биогенные полиамины – 1,3-диаминопропан (**ДАП**) и спермидин (**СП**). Алифатические полиамины (ДАП, путресцин, СП и спермин) широко распространены в живой природе. Наиболее изученные их функции связаны со стимуляцией роста микроорганизмов, увеличением стабильности мембран, взаимодействием с нуклеиновыми кислотами и регуляцией уровня гетерохроматина в клетке. В последнее время обнаружено, что полиамины способны регулировать процессы вторичного метаболизма у представителей царства грибов.

Так, при изучении *P. chrysogenum* и *A. chrysogenum* обнаружили индукторную роль ДАП и СП для биосинтеза бета-лактамных антибиотиков [7, 8]. В предыдущих работах [10, 11] было показано, что у высокоактивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ

Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

Штамм	Обозначение	Источник
A. terreus ATCC 20542	WT	Дикий тип, коллекция микроорганизмов ATCC, США
A. terreus ATCC 20542/ ACS5	A5	Получен в результате введения гена *ACS1* из *S. cerevisiae* в *A. terreus* ATCC 20542 [3]
A. terreus ATCC 20542/ $LovE_6$	E6	Получен в результате введения дополнительной копии гена *lovE* в *A. terreus* ATCC 20542 [3]
A. terreus № 43-16	HY	Высокоактивный штамм, получен на основе ATCC 20542 [2]
A. terreus № 43-16/ACS_3	A3	Получен в результате введения гена *ACS1* из *S.cerevisiae* в *A. terreus* № 43-16 [3]

F-4081 введенный экзогенно СП повышал в процессе ферментации выживаемость этого ослабленного продуцента (в частности, увеличивалось число прорастающих колоний и их размер) при культивировании на твердых питательных средах (**ТПС**), а также уровень биосинтеза цефалоспорина С. Недавно было обнаружено, что добавление СП при культивировании *A. flavus* стимулировало продукцию таких вторичных метабилитов, как афлатоксины [12].

Повышение продукции статинов при добавлении сравнительно дешевых низкомолекулярных полиаминов может привести к ощутимому практическому эффекту при крупномасштабном промышленном производстве.

Цель работы – изучение взаимосвязи между повышением уровня биосинтеза ЛОВ у *A. terreus* с изменениями в метаболизме полиаминов и/или работе глобального регулятора вторичного метаболизма грибов LaeA.

МЕТОДИКА

Штаммы, используемые в работе. Использовали штаммы *A. terreus*: ATCC 20542 (дикий тип), № 43-16 (высокоактивный продуцент ловастатина, получен на основе штамма ATCC 20542 методам УФ-мутагенеза [2]) и их рекомбинантные производные – ATCC 20542/$LovE_6$, ATCC 20542/ACS_5 и № 43-16/ACS_3, которые экспрессировали гены *lovE* из *A. terreus* или *ACS1* из *Saccharomyces cerevisiae* под контролем конститутивного gpdA промотора из *A. nidulans* [3]. Основные характеристики штаммов, использованных в работе, приведены в табл. 1.

Культивирование штаммов *A. terreus* с полиаминами на ТПС. Использовали подобранную для *A. terreus* агаризованные среду АТ или Чапека–Докса (**ЧД**) без добавок или с 5 мМ ДАП или СП ("MP Biomedicals", США). Среда АТ имела следующий состав (г/л): глюкоза – 100, соевая мука – 20, мальт-экстракт – 5.0, мясной пептон – 5.0, NaCl – 2.0, KH_2PO_4 – 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, агар-аагар – 20, pH 6.1; среда ЧД (г/л): сахароза – 30, $NaNO_3$ – 2.0, K_2HPO_4 – 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, KCl – 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01, агар-агар – 20.

Для определения влияния полиаминов на рост и морфологию колоний *A. terreus* использовали метод разведения капель с некоторыми изменениями, как описано ранее [13]. Клетки *A. terreus* собирали со скошенного АТ-агара, разводили 0.9%-ным раствором NaCl до оптической плотности $OD_{600} = 0.5$ (базовая концентрация) и делали последовательные 10-кратные разведения 0.9%-ным NaCl. Затем по 2 мкл вносили в чашки Петри со средой ЧД без добавок или с добавлением 5 мМ ДАП или СП, инкубировали в течение 3–5 сут (штаммы WT, E6, A5) или 6–8 сут (штаммы HY, A3) при 26°C. Влияние полиаминов оценивали по характеру роста микроорганизма при последовательном разведении на ТПС с 5 мМ ДАП или СП по сравнению с контролем (ТПС без добавок).

Ферментация штаммов *A. terreus* с полиаминами. Штаммы предварительно выращивали в пробирках со скошенной агаризованной АТ-средой в течение 7 сут при 25°C. Выросшими культурами инокулировали 30 мл посевной среды **ПАТ,** следующего состава (г/л): глюкоза – 100, соевая мука – 20, мальт-экстракт – 5.0, мясной пептон – 5.0, NaCl – 2.0, KH_2PO_4 – 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H2O$ – 0.5, pH 6.1. После культивирования штаммов на среде ПАТ в течение 48 ч при 26°C одной десятой объема инокулировали ферментационную среду АТ (**ФАТ**), следующего состава (г/л): глюкоза – 200, соевая мука – 40, мальт-экстракт – 5, мясной пептон – 10, NaCl – 2, KH_2PO_4 – 0.5 и $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, pH 6.1, с добавлением СП или ДАП до конечной концентрации, равной 5мМ. Контрольный опыт проводили в тех же условиях без добавления полиаминов. Ферментацию проводили в течение 8–11 сут при 26°C. Все этапы глубинного культивирования (на средах ПАТ и ФАТ) осуществляли в колбах Эрленмейера (250 мл) на качалке CERTOMAT®BS-1 ("Sartorius", Германия) при 230 об./мин в соответствии с разработанным ранее протоколом [2]. Сухую биомассу определяли после 2-кратной промывки 10 объемами H_2O и высушивания

Таблица 2. Структура синтетических олигонуклеотидов, использованных в работе

Олигонуклеотид	Последовательность (5' → 3')	Источник GenBank:
Act_RT_F Act_RT_R	CCACGTTACCACTTTCAACTCC GAGGAGCGATGATCTTGACCT	XM_001209659.1 [3]
E2_6_RT_F E2_6_RT_R	TGACCAGCGAAGAAATGACA TTATCTTTCATCCATTTCCA	XM_001211932.1 [3]
LovA_RT_F1 LovA_RT_R1	GCGATGTCAAGCCACTCCTCATTATG AGACCCAAGCTCCCAAGTACGTCAAG	AH007774.2
LovB_F1 LovB_R1	GCCCCATTCTATAAAAACCTGAGGATTC AGTCCTCATTATTCGAGACTCGCAGC	AF151722
LovC_RT_F LovC_RT_R LovD_RT_F LovD_RT_R LovE_RT_F LovE_RT_R LovF_RT LovF_RT	GCAGAGGAGGTCTTTGACTATCG GACTCGACGTTGGTGATACAGTCG GGATCTGGACGGAGAGAACTG CAGGGTTCCAGTTGGAAGAAC TCGATGCGTCTACAGTGAGC TAGCTGTCCGGTGGATCAAG TTGCATCTTGCCATTCAGAG TCGAGTCAAATGAGTAGGA	AH007774.2 [3]
LovG_RT_F LovG_RT_R	GCTCCGTTCCCTTCCTCTGCA GGGGTGTTGAGTCTGCCAGTCG	AH007774.2
AZ_RT_F AZ_RT_R	ATCTCAGTCTCCGAAGCGTCCTGG CGAGGATTTGTGACCGACATAAGTGG	CH476600.1
LaeA_RT_F LaeA_RT_R	GGATGCACGAGAACATAATCCTGGC AACTTGTGGAAAAGATCGAGGCGATC	NT_165972
ODC_RT_F ODC_RT_R	CCCCGGTGAGGAAGATGCGT TCGATCTCCGCCTTGGACGC	CH476600.1
SamDC_RT_F SamDC_RT_R	TACACGACCTCGCCGTCATCCT CCTTCCAGATCTCCTCCGACACG	CH476605.1
SpdS_RT_F1 SpdS_RT_R1	GAAGGTCCTGGTCATTGGCGGT TCTTGAGGAACTCGAAGCCGTCG	CH476594.1

аликвоты КЖ при 80°C в течение 96 ч до постоянного веса.

ВЭЖХ-анализ. После проведения ферментации *A. terreus* из культуральной жидкости экстрагировали соединения этилацетатом. Содержание ЛОВ определяли в экстрактах методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (“Agilent Technologies”, США), используя хроматографическую колонку Agilent-C18 (4.6 × 250 мм) с диаметром частиц 5 мкм. Подвижная фаза содержала метанол/0.1 М уксусная кислота в соотношениях 85 и 15%, и ее расход составлял 1.0 мл/мин. Детекцию проводили при 238 нм.

Получение препаратов тРНК, кДНК, ПЦР-анализ в реальном времени (ПЦР–РВ). Получение суммарной РНК и синтез кДНК осуществляли в соответствии с протоколами, описанными ранее [13, 14]. На основании последовательностей генов *lovA*, *lovB*, *lovG*, *ODC*, *SamDC, SpdS, AZ* и *laeA* в среде Vector NTI *v.8* software [15] сконструировали праймеры для оценки уровней их экспрессии (табл. 2). Использовали ранее подобранные пары праймеров для оценки уровней экспрессии других изучаемых *lov*-генов (*lovC*, *lovD*, *lovE* и *lovF*), определения копийности кластера генов биосинтеза ЛОВ в HY штамме и нормализацию данных (табл. 2) [3]. Реакции и обработку полученных результатов проводили в соответствии с протоколом [14], при этом для нормализации данных об уровнях экспрессии использовали гены “домашнего хозяйства”, актин и убиквитин-конъюгирующий фермент E2_6.

Определение числа копий кластера генов биосинтеза ЛОВ в последовательности геномной ДНК (гДНК) *A. terreus*. Дозу *lov*-генов в штаммах *A. terreus* ATCC 20542 и *A. terreus* № 43-16 определяли методом ПЦР-РВ с парами праймеров LovC_RT_F/LovC_RT_R, LovE_RT_F/LovE_RT_R, LovF_RT_F/LovF_RT_R и Act_RT_F/Act_RT_R относительно ампликонов, полученных на матрицах с известным начальным числом копий.

Для этого предварительно получали ПЦР-фрагменты *lovC*, *lovE*, *lovF* и *act*, с перечисленными парами праймеров соответственно. Для экстракции гДНК из реакционной смеси использовали набор CleanupMini (“Евроген”, Россия).

Выделение гДНК из *A. terreus* проводили, как описано ранее [16]. Количество очищенной ДНК в ПЦР-фрагментах и выделенной гДНК определяли на флуориметре Qubit® 4 ("Thermo Fisher Scientific", США) с использованием набора Qubit™ dsDNA HS для количественного определения ДНК ("Thermo Fisher Scientific", США). Для расчета молекулярной массы ($M_г$) гДНК использовали данные работы [17]. $M_г$ ПЦР-фрагментов рассчитывали с использованием программы DNA Calculator в пакете он-лайн сервиса Molbiotools (http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html), а число копий ПЦР-фрагментов и гДНК в 1 мкл раствора – по формуле (1).

$$\text{число копий} = \frac{\text{вес[нг]} \times 6.022 \times 10^{23}}{10^9 M_г}, \qquad (1)$$

где вес [нг] – вес ДНК в 1 мкл раствора, 6.022×10^{23} – число Авогадро, 10^9 – коэффициент пересчета, $M_г$ – молекулярная масса ДНК.

Для построения калибровочных кривых делали серии последовательных разведений от 5×10^6 до 5×10^2 копий в образце. Значение Ct ПЦР-продуктов, полученных на матрице с различными разведениями гДНК, переводили в число копий, используя стандартные кривые с амплифицированными ПЦР-продуктами. Полученное число копий для каждого гена сравнивали с известным числом копий в гДНК штамма дикого типа, используемого в качестве матрицы для ПЦР. Такой же алгоритм применяли для определения числа копий у высокоактивного штамма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение числа копий кластера генов биосинтеза ЛОВ *A. terreus* № 43-16. Известно, что процесс получения высокоактивных продуцентов внеклеточных метаболитов в грибах методом случайного мутагенеза и селекции может сопровождаться хромосомными перестройками, затрагивающими кластер генов целевого метаболита [18]. К важнейшим перестройками относятся дупликации. Дупликации кластеров генов внеклеточных метаболитов обнаружены у многих высокоактивных продуцентов. Так, в штаммах *P. chrysogenum* P2, AS-P-78 и BW1901 число кластеров генов биосинтеза бета-лактамов увеличено от 2 до 14 [19–21], а у промышленного продуцента DS17690 оказалось 8 копий кластеров этих генов [22, 23]. Однако для многих грибных штаммов, полученных таким способом, подобные изменения отсутствуют. Так, сверхпродукция ЦефС штаммом *A. chrysogenum* BKM F-4081D не была связана ни с повышением дозы гена [14], ни с другими хромосомными перестройками кластеров "ранних" и "поздних" генов биосинтеза бета-лактамов [24]. Дупликации кластеров генов (в том числе, биосинтеза поликетидов) и их последующее функциональное разобщение в грибах может проходить в естественных условиях, что позволяет организму более тонко управлять изменениями уровня продукции метаболита в ответ на различные сигналы окружающей среды [25]. Полногеномное секвенирование штамма *A. terreus* дикого типа показало наличие одного кластера генов биосинтеза ЛОВ [17]. В связи с этим на первом этапе требовалось определить, увеличилось ли число копий в процессе получения HY штамма *A. terreus*.

Для определения количества копий кластера *lov*-генов в последовательности гДНК использовали метод ПЦР-РВ. Полученные результаты четко показали, что у высокоактивного продуцента *A. terreus* № 43-16 имелась одна копия кластера генов биосинтеза ЛОВ (табл. 3). При этом уровень продукции ЛОВ в этом штамме был увеличен более чем в 100 раз по сравнению с исходным штаммом дикого типа ATCC 20542 (табл. 4). Ранее также было показано значительное увеличение экспрессии *lov*-генов (в 5–50 раз) *A. terreus* 43-16 [3]. Это позволяло сделать вывод, что молекулярные основы повышения выхода ЛОВ у HY штамма связаны не с повышением дозы генов, а с изменением регуляции генов имеющегося биосинтетического кластера.

Влияние полиаминов на скорость роста штаммов *A. terreus* при культивировании на агаризованных средах. Полученные результаты по определению числа копий кластера *lov*-генов создали предпосылки для дальнейшего изучения молекулярного контроля биосинтеза ЛОВ *A. terreus*. Известно, что полиамины оказывают плейотропное воздействие на микроорганизмы. В частности, показано, что экзогенно введенные полиамины, способны влиять на продукцию вторичных метаболитов грибов. Добавление СП или ДАП может повышать на 10–15% выход таких NRPS-метаболитов, как пенициллин G (**penG**) [7] или ЦефС [26]. При этом происходит рост уровня экспрессии как соответствующих генов биосинтеза бета-лактамов, так и универсального регулятора вторичного метаболизма грибов *laeA* [7, 26]. Может ли биосинтез таких вторичных метаболитов поликетидной природы, как ЛОВ, также находиться под контролем полиаминов – вопрос, который приобретает особую актуальность в связи с тем, что у изучаемого HY штамма отсутствовали дупликации кластера *lov*-генов, а значительное повышение продукции ЛОВ достигалось вследствие изменения регуляции экспрессии входящих в него генов.

На первом этапе изучили влияние полиаминов на рост штаммов *A. terreus* WT, HY и их рекомбинантных аналогов (E6, A5 и A3) на ТПС. Для этого использовали метод разведения капель на полусинтетической среде ЧД и изучили действие ДАП и СП в диапазоне концентраций от 0.1 до 10 мМ. Добав-

Таблица 3. Количественная оценка числа копий *lov*-генов в штаммах *A. terreus*

Показатель	Количество используемой гДНК											
	5×10^5				5×10^4				5×10^3			
Ген	*act*	*lovC*	*lovE*	*lovF*	*act*	*lovC*	*lovE*	*lovF*	*act*	*lovC*	*lovE*	*lovF*
Штамм	*A. terreus* ATCC 20542											
Количество амплифицированного ПЦР продукта	3.7×10^5	5.1×10^5	7.2×10^5	5.5×10^5	6.3×10^4	4.4×10^4	4.9×10^4	4.7×10^4	5.7×10^3	5.1×10^3	5.4×10^3	7.3×10^3
Число копий	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Штамм	*A. terreus* 43-16											
Количество амплифицированного ПЦР продукта	5.4×10^5	5.5×10^5	6.2×10^5	5.9×10^5	4.9×10^4	5.4×10^4	5.9×10^4	5.1×10^4	3.9×10^3	7.1×10^3	5.5×10^3	4.3×10^3
Число копий	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Таблица 4. Молекулярные основы биосинтеза ЛОВ штаммами *A. terreus* ATCC 20542 и № 43-16

Показатель	Штамм *A. terreus*	
	ATCC 20542	№ 43-16
Число копий кластера *lov*-генов, шт.	1 (по данным [17])	1 (текущая работа)
Уровень относительной экспрессии *lov*-генов, раз	1 (по данным [3])	5–50 (по данным [3])
Продукция ЛОВ, мг/л	30–100 (по данным [39, 40])	7000–10000 (по данным [2])

ление 10 мМ полиаминов оказалось токсичным для клеток, а добавление в концентрациях от 0.1–1.0 мМ приводило к незначительным изменениям уровня роста. Наиболее выраженное стимулирующее действие наблюдали при концентрациях 5 мМ ДАП или СП (рис. 1). На ранних этапах роста добавление полиаминов приводило к появлению колоний в результате инокуляции меньшей начальной дозой клеток *A. terreus*. Так, после 72 ч инкубации на среде без полиаминов WT штамм давал начало колониям после инокуляции посевным материалом, разведенным до концентрации 10^{-3} (от базовой концентрации при $OD_{600} = 0.0005$). На среде ЧД после добавления ДАП появлялись колонии после инокуляции ТПС материалом, разведенным до 10^{-4} (рис. 1). Штамм E6 с введенной дополнительной копией *lovE* демонстрировал более активный рост по сравнению с исходным штаммом WT. На среде без добавок при тех же условиях культивирования наблюдали появление колоний, соответствующих посевной дозе, разведенной до 10^{-4}. На среде, содержащей 5 мМ СП или ДАП (рис. 1а, *2*) прорастали колонии при разведении 10^{-5}. Такие же результаты были получены при культивировании штамма A5 на средах с 5 мМ полиаминов. Оба высокоактивных штамма HY и его рекомбинантный аналог A3 по скорости роста заметно отставали от штаммов WT и его производных (рис. 1б). Между собой эти штаммы демонстрировали похожий рост. Так, на ТПС без добавок после 72 ч инкубации наблюдали рост колонии на разведениях до 10^{-2}, а добавление 5 мМ ДАП или СП (рис. 1б, *2*) стимулировало рост примерно на порядок. Стимулирующее воздействие полиаминов на скорость роста штаммов *A. terreus* было отмечено в начале культивирования (48–72 ч). Затем контрольные образцы по уровню роста догоняли соответствующие штаммы на ТПС с полиаминами.

Подобный эффект стимулирующего воздействия полиаминов на рост мицелиальных грибов был обнаружен ранее при культивировании в их присутствии штаммов *Penicillium chrysogenum* или *Aspergillus chrysogenum* [9, 26]. Поскольку стимулирующее воздействие ДАП или СП при культивировании на ТПС *A. chrysogenum* сопровождалось повышением продукции СРС в процессе ферментации, то на следующем этапе работы оценивали влияние полиаминов на синтез ЛОВ при глубинном культивировании штаммов *A. terreus*.

Влияние полиаминов на уровень биомассы, продукцию и удельный выход ЛОВ в процессе ферментации штамма HY *A. terreus*. Вначале изучили влияние полиаминов на продукцию ЛОВ в процессе ферментации высокоактивного штамма *A. terreus* № 43-16. Ранее для этого продуцента был оптимизирован процесс ферментации в глубинных условиях в колбах Эрленмейера на 250 мл [2, 3]. В подобранных условиях ферментация протекала 11 сут, продукцию ЛОВ наблюдали, начиная с 5 сут, а затем она стремительно нарастала к 7–9 сут. Далее скорость биосинтеза ЛОВ падала, при этом увеличивалось суммарное количество этого стабильного метаболита. Данные о среднем уровне продукции ЛОВ, удельной активности и сухой биомассы штамма HY *A. terreus* при ферментации в колбах Эрленмейера с 5 мМ ДАП (или СП) в течение 8 и 11 сут приведены на рис. 2. Полный про-

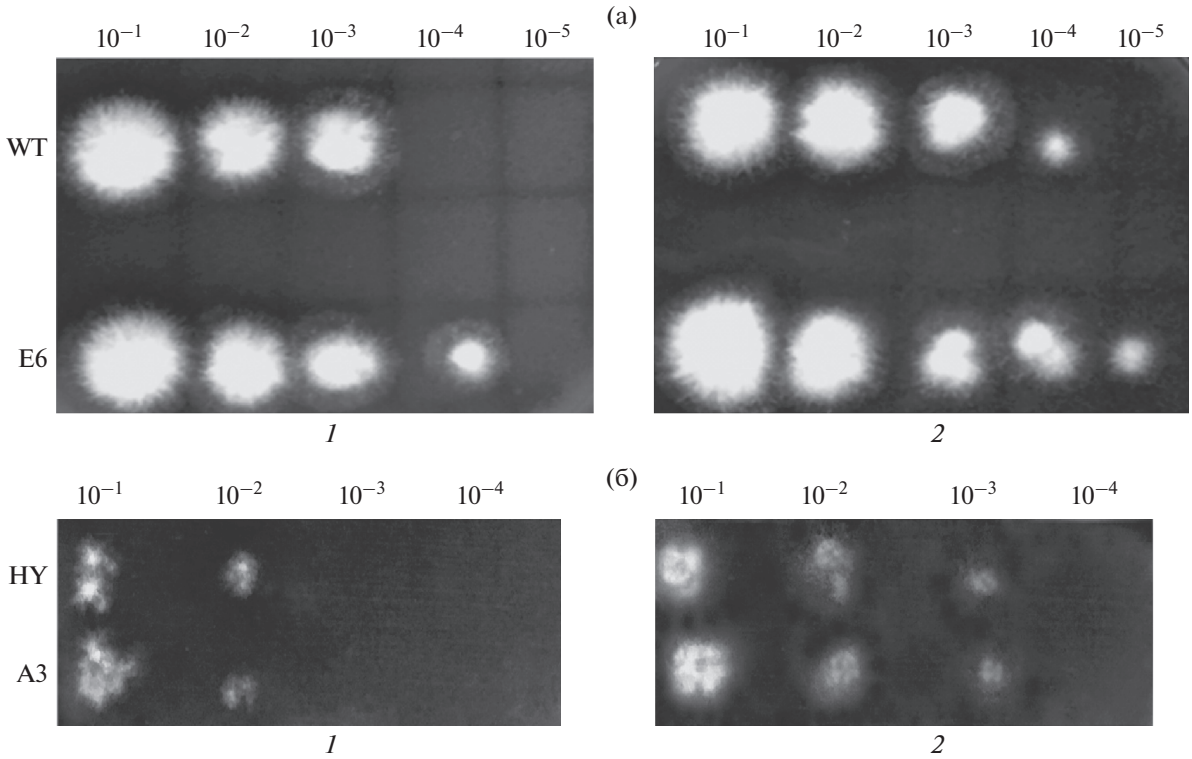

Рис. 1. Анализ воздействия полиаминов на рост штаммов *A. terreus* WT и E6 (а) и HY и A3 (б) методом разведения капель при культивировании в течение 72 ч при 26°C на агаризованной среде ЧД после добавления 5 мМ ДАП и СП (*2*), (*1* – контроль).

цесс культивирования, включая подготовку посевного материала и момент добавления полиаминов, представлен на рис. 3. Инокулят штамма *A. terreus* предварительно культивировали в течение 7 сут на скошенной агаризованной среде АТ, затем засевали жидкую среду ПАТ и культивировали 48 ч, после чего одной десятой объема культуральной смеси инокулировали ферментационную среду ФАТ. Полиамины добавляли на этапе передачи инокулята с ПАТ-среды на среду ФАТ, поскольку было показано, что этот период ферментации являлся оптимальным для экзогенного внесения полиаминов для повышения продукции вторичного метаболита при ферментации мицеллиальных грибов [7, 26]. В таких условиях наблюдали увеличение продукции ЛОВ при культивировании на среде ФАТ в течение 8 сут. Добавление 5 мМ ДАП приводило к повышению выхода ЛОВ на 30%, а СП – на 45% (рис. 2а). При этом абсолютный выход ЛОВ в контроле составлял в среднем 6500 мг/л, а в отдельных колбах достигал 7500. При добавлении ДАП средний выход ЛОВ был ~ 8700 мг/л, а в отдельных колбах наблюдали до 9700 мг/л. При добавлении СП средний выход ЛОВ оказался на уровне 9500 и достигал 10900 мг/л. Такой выход ЛОВ обычно наблюдали после окончания ферментации при культивировании без добавок [3]. Также было определено количество сухой биомассы (рис. 2б, *1*). Культивирование с ДАП приводило к его падению на 10%, а добавление СП – более чем на 15%. Эти данные могли свидетельствовать о токсичности полиаминов или их действии на формирование тех или иных морфологических форм *A. terreus*, например, пеллетов, подробно охарактеризованных ранее [27, 28]. Оказалось, что при добавлении ДАП в ферментационную среду штаммов удельная активность ЛОВ при пересчете на сухую биомассу возрастала примерно на 40% при внесении ДАП и на 70% – СП (рис. 2в, *1*).

После окончания ферментации (11 сут) в контроле наблюдали значительный прирост (на 60–65%) продукции ЛОВ по сравнению с 8 сут. При этом незначительно возросло содержание сухой биомассы (в пределах 10%), а удельный выход ЛОВ повысился на 50–55%. К окончанию ферментации продукция ЛОВ в штаммах с экзогенно-введенным ДАП повышалась значительно меньше, чем в контроле, ее прирост составлял ~20%. При этом наблюдали рост содержания сухой биомассы и удельной активности ЛОВ на 10%. При добавлении СП средний рост выхода ЛОВ был незначительным, составив менее 10%, а прирост сухой биомассы оказался выше 20%, в результате чего удельная активность снизилась на 10%.

Добавление полиаминов привело к значительному повышению продукции ЛОВ на 8 сут роста,

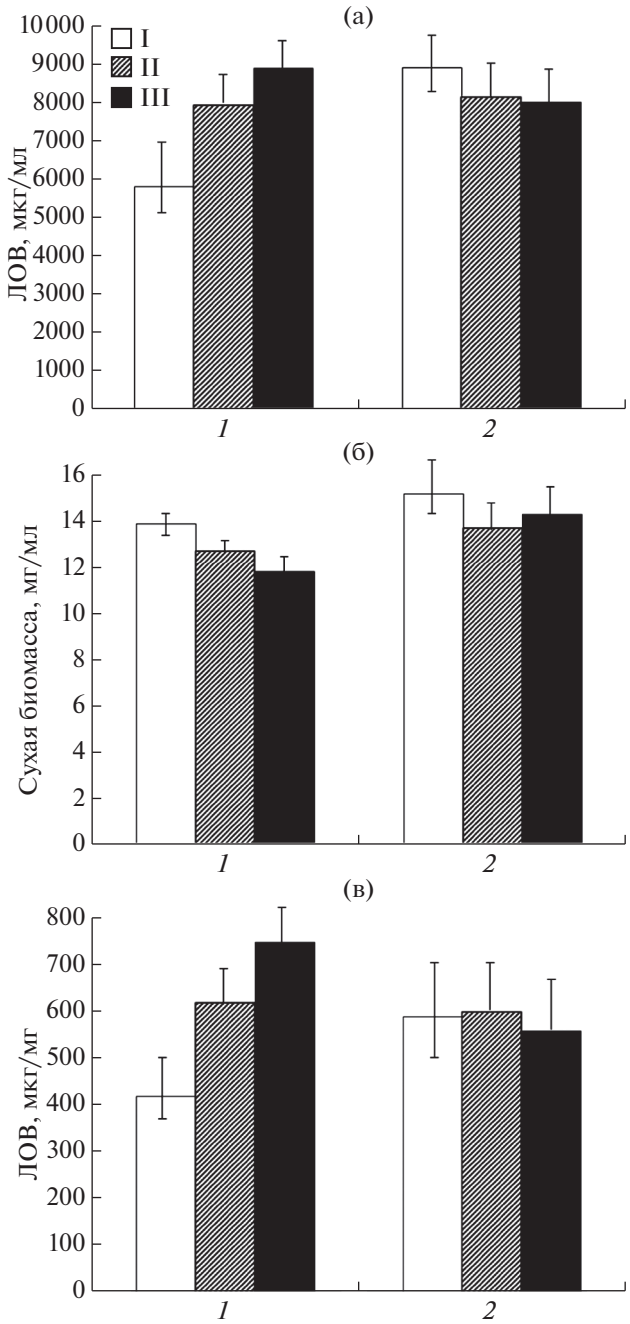

Рис. 2. Продукция ЛОВ (мкг/мл, а), накопление биомассы (мг/мл, б) и удельная продукция ЛОВ (мкг/мг сухого веса, в) при ферментации штамма *A. terreus* № 43-16 с ДАП (5 мМ, II) и СП (5 мМ, III) на среде ФАТ течение 8 (*1*) и 11 (*2*) сут при 26°С; контроль (I).

при этом выход был сопоставим с выходом в контроле на 11 сут роста. Дальнейшее культивирование от 8 до 11 сут приводило к существенному приросту содержания ЛОВ в контроле (до 55%), но не в культурах с полиаминами (только 10–20%). Так, на 11 сут ферментации содержание ЛОВ во всех колбах оказалось примерно одинаковым и в абсолютных величинах составляло от 10000 до 11500 мг/л, при этом в контроле оно было несколько выше. Количество ЛОВ в культурах с ДАП снижалось на 3%, а с СП – на 5% (рис. 3а, *2*). После 8 сут роста содержание сухой биомассы в культурах с полиаминами существенно снижалось, особенно в тех, в которые вносили СП, при этом наблюдалось максимальное повышение продукции ЛОВ. Затем происходил одинаковый прирост сухой биомассы в контроле и культурах с ДАП, а при внесении СП ее прирост оказался в 2 раза выше, но при этом уменьшался прирост ЛОВ. Так, к окончанию ферментации (11 сут) в колбах с добавленным СП содержание сухой биомассы снижалось незначительно (примерно на 5%) по сравнению с тем, которое было определено после 8 сут (среднее снижение составляло 17.5%). Можно предположить, что эти данные отражали множественные процессы, возникающие при добавлении полиаминов, в частности, характеризовали снижение их токсичности для клеток (рис. 3б). Удельный выход ЛОВ после 11 сут выровнялся, как в контроле, так и культуре с добавленным СП, а в культурах с ДАП оказался выше на 5% (рис. 3в, *2*).

Анализ уровней продукции ЛОВ и экспрессии генов его биосинтеза в штаммах *A. terreus* WT и HY при экзогенном введении полиаминов в процессе ферментации. Изучение влияния полиаминов на уровень биосинтеза ЛОВ в процессе ферментации позволило выбрать оптимальное время для повышения продукции этого поликетидного вторичного метаболита. Поскольку при добавлении полиаминов максимальный эффект обнаруживался при культивировании на ФАТ в течение 8 сут при 26°С, это время и было выбрано для дальнейшего изучения процесса продукции вторичного метаболита на молекулярном уровне. Результаты определения продукции ЛОВ штаммами *A. terreus* WT и HY после 8 сут ферментации приведены на рис. 4. В этот период ферментации продукция ЛОВ HY штаммом повышалась в 250–300 раз. Добавление полиаминов приводило к повышению биосинтеза ЛОВ, как у WT (на 15–20%), так и у HY штаммов (на 30–45%). Максимальный эффект наблюдали при добавлении СП (рис. 4). Эти результаты представляются важными, поскольку показывают, что полиамины могут воздействовать на уровень продукции вторичных метаболитов грибов не только штаммами-суперпродуцентами, у которых в процессе случайного мутагенеза и селекции важнейшие ресурсы клетки переориентированы и мобилизованы на продукцию целевого метаболита. Отбираются ли в процессе улучшения грибных штаммов изменения в метаболизме ПА? Например, такие, которые могли снижать уровень его биосинтеза для перераспределения метаболических потоков в пользу целевого метаболита. Экзогенное введение полиаминов в такие улучшенные штаммы могло бы комплементировать дефекты биосинте-

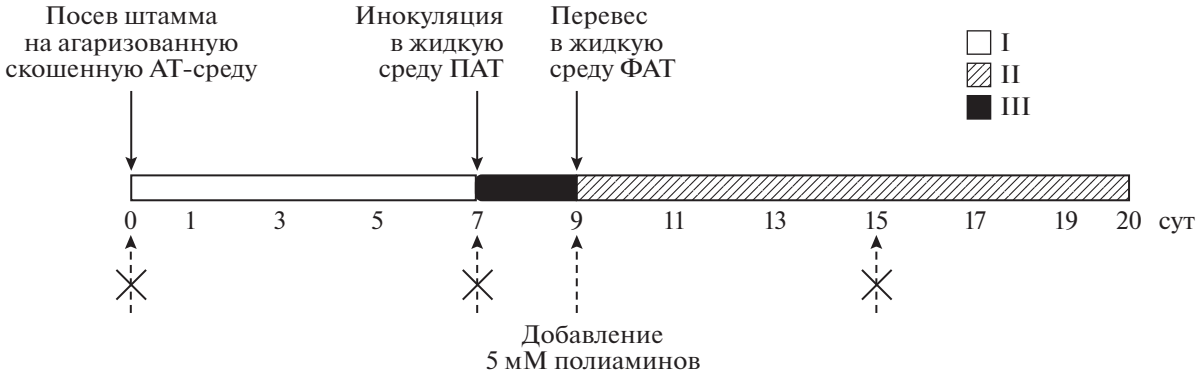

Рис. 3. Оптимизация этапов биосинтеза ЛОВ штаммами *A. terreus* с экзогенно введенными полиаминами на агаризованной скошенной АТ-среде (I) и жидких средах ПАТ (II) и ФАТ (III).
Этапы культивирования при подготовке и в процессе ферментации показаны стрелкой, а оптимальное время для экзогенного введения полиамина – пунктирной стрелкой; возможное, но не оптимальное время добавления полиамина – перечеркнутой стрелкой.

за его эндогенных форм. Однако тот факт, что у *A. terreus* полиамины стимулировали продукцию ЛОВ также и штаммом дикого типа (рис. 4), свидетельствовал о том, что экзогенные его формы влияли на некие универсальные механизмы регуляции вторичных метаболитов у грибов.

На рис. 5 приведены уровни относительной генной экспрессии *lov*-генов штаммами *A. terreus* WT и HY после 8 сут ферментации без добавок и в присутствии 5 мМ СП. Видно, что у штамма HY *lov*-гены сверхэкспрессированы. Ранее этот эффект продемонстрировали на примере 4 *lov*-генов (*lovC*, *lovD*, *lovE* и *lovF*), для которых наблюдали увеличение экспрессии в 5–50 раз [3]. В данной работе дополнительно изучили экспрессию гена цитохрома P450 (*lovA*), необходимого для окислительного гидроксилирования дигидромонаколина L до монаколина J, и нонакетида синтазы (*lovB*), основной мегасинтазы биосинтеза ЛОВ, создающей нонакетидный остов синтезируемого метаболита. Также была изучена экспрессия гена тиоэстеразы (*lovG*), открытой последней среди ферментов биосинтеза ЛОВ, но которая необходима для высвобождения дигидромонаколина L из комплекса с LovB [29] и полный набор биосинтетических *lov*-генов (*lovA*, *lovB*, *lovC*, *lovD*, *lovF* и *lovG*). Показано, что *lovA* в штамме HY сверхэкспрессировался в 30–35 раз, *lovB* – примерно в 20 раз, *lovG* – в 2–3 раза. Таким образом, у высокоактивного штамма HY все 6 биосинтетических *lov*-генов при сохранении их дозы (1 копия) и ген-регулятор биосинтеза ЛОВ (*lovE*) оказались сверхэкспрессированы. В связи с этим возникал вопрос, в результате каких (или какого) воздействий произошла такая синхронная апрегуляция, и носили ли эти воздействия глобальный характер, затрагивающий другие метаболизмы, или мишень находилась внутри последовательности *lov*-кластера.

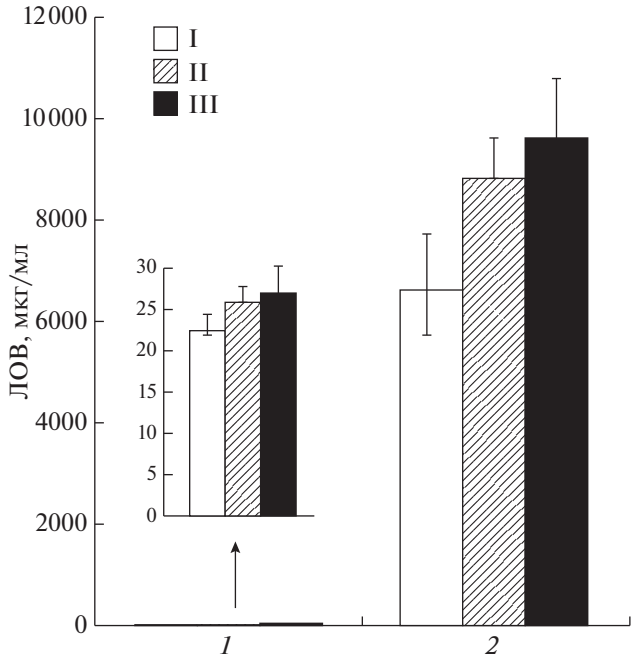

Рис. 4. Уровень продукции ЛОВ при ферментации штаммов *A. terreus* WT (*1*) и HY (*2*) с ДАП (5мМ, II) и СП (5мМ, III) в течение 8 сут при 26°C; контроль (I). Ферментация *A. terreus* WT (*1*) показана на врезке (цена деления оси ординат увеличена в 400 раз).

На рис. 5 приведены результаты, показывающие, что добавление 5 мМ СП (при ферментации в течение 8 сут) повышало экспрессию большинства биосинтетических генов у обоих сравниваемых штаммов *A. terreus*. При добавлении СП к штамму WT наблюдали повышение экспрессии *lovA* (в 2–3 раза), *lovB* (в 1.5–2 раза), *lovD* (в 1.2–1.5 раз) и *lovF* (в 1.5–1.8 раз), при этом экспрессия *lovC*, *lovE* и *lovG* была немного выше контроля (рис. 5). У высокоактивного штамма добавление СП приводило к росту экспрессии *lovA* (в 2–3 раза), *lovB* (в 3–5 раз), *lovC* (в 2–3 раза), *lovD* (в 4–6 раз) и *lovG*

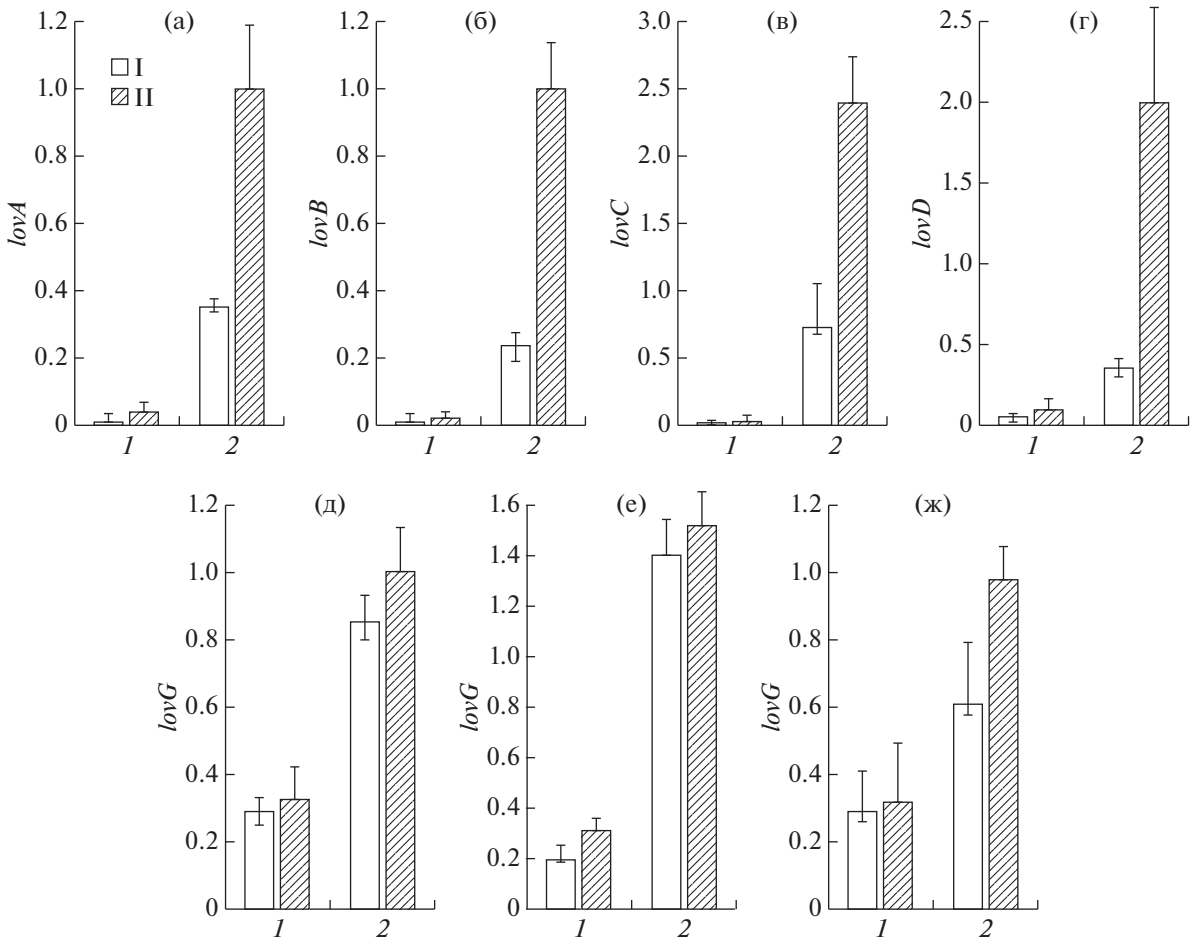

Рис. 5. Нормализованная экспрессия генов *lovA* (а), *lovB* (б), *lovC* (в), *lovD* (г), *lovE* (д), *lovF* (е) и *lovG* (ж) после культивирования в течение 8 сут штаммов *A. terreus* ATCC 20542 (*1*) и № 43-16 (*2*) без добавок (I) и с 5 мМ СП (II).

(в 1.5 раза), а повышение экспрессии *lovE* и *lovF* оказалось немного выше уровня контроля.

Таким образом, при ферментации в течение 8 сут с добавлением 5 мМ СП повышалась экспрессия *lov*-генов. У штамма WT уровень экспрессии увеличивался в 3 раза, штамма HY – в 5 раз и выше. Эти данные коррелировали с наблюдаемым уровнем повышения продукции ЛОВ при культивировании с СП (рис. 4). У штамма HY при добавлении 5 мМ СП значительнее увеличивался выход ЛОВ (до 45%) по сравнению с контролем (штамм HY без 5мМ SP), чем у штамма WT при добавлении СП (до 20%) по сравнению с его контролем (штамм WT без 5мМ SP).

Анализ уровней экспрессии генов метаболизма полиаминов и регуляции вторичных метаболитов грибов (*laeA*) штаммами *A. terreus* WT и HY после экзогенного введения полиаминов в процессе ферментации. Для определения возможного воздействия полиаминов на регуляцию метаболизма ЛОВ в штаммах *A. terreus* была изучена экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты их метаболизма. Известно, что существует гомеостаз концентраций полиаминов в клетке, и он поддерживается ферментами их биосинтеза и катаболизма [30]. К одному из ключевых ферментов биосинтеза полиаминов относится орнитиндекарбоксилаза (ornithine decarboxylase, **ODC**) [31]. Этот короткоживущий и динамично регулируемый фермент катализирует превращение L-орнитина в путресцин. На рис. 6 видно, что при ферментации на среде без полиаминов в течение 8 сут, уровни экспрессии гена *ODC* штаммами дикого типа и его высокоактивным аналогом практически совпадали. Добавление экзогенного СП заметно (в 3–4 раза) снижало содержание мРНК ODC в клетках обоих штаммов (рис. 6а). Другая важная регуляция содержания эндогенных полиаминов связана с S-аденозилметионин декарбоксилазой (S-adenosylmethionine decarboxylase, **SamDC**). Опосредованное SamDC декарбоксилирование S-аденозилметионина (**SAMe**) приводит к образованию декарбоксилированного S-аденозинметионинамина (**dcSAMe)** – важного субстрата для биосинтеза полиаминов. Видно, что уровень экспрессии гена *SamDC* высокоактивным продуцен-

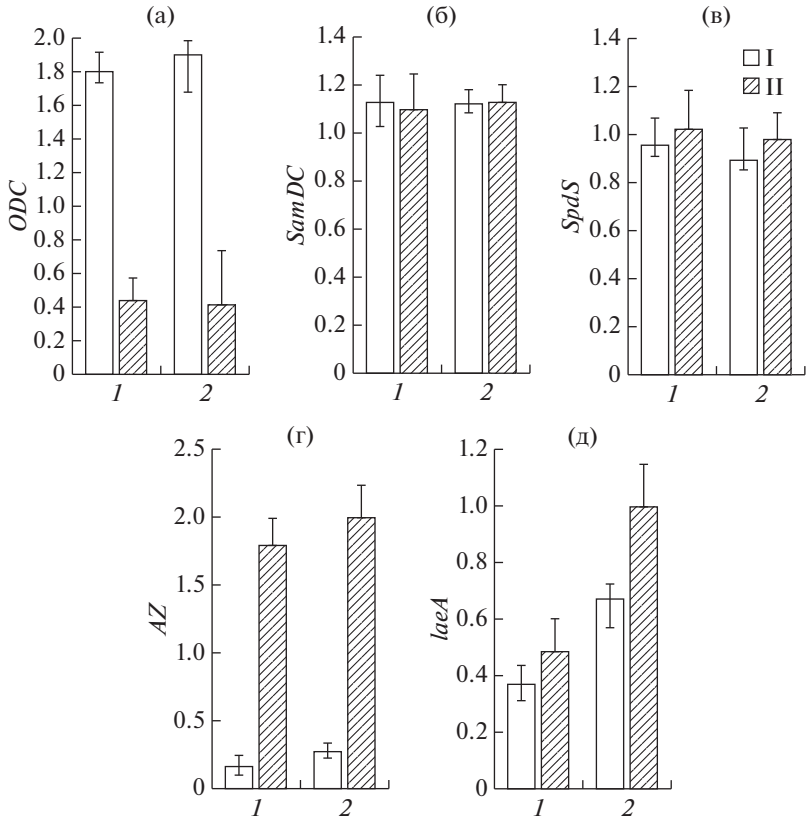

Рис. 6. Нормализованная экспрессия генов *ODC* (а), *SamDC* (б), *SpdS* (в), *AZ* (г) и *laeA* (д) после культивирования в течение 8 сут штаммов *A. terreus* ATCC 20542 (*1*) и № 43-16 (*2*) без добавок (I) и с 5 мМ СП (II).

том ЛОВ и исходным штаммом дикого типа был одинаковым и не изменялся при добавлении к ним 5 мМ СП (рис. 6б). Эти результаты коррелировали с полученными недавно данными при изучении влияния экзогенного введения 0.5 мМ СП на уровень экспрессии *ODC* и *SamDC A. flavus* [12]. Уровень экспрессии *ODC* падал (в 2–3 раза), а уровень экспрессии *SamDC* – немного повышался.

Один из ключевых ферментов биосинтеза полиаминов, спермидинсинтаза (spermidine synthase, **SpdS**), использует dcSAMe для синтеза СП в реакции аминопропилирования путресцина. У обоих сравниваемых штаммов при культивировании на среде ФАТ без добавок или в присутствии СП уровень экспрессии гена *SpdS* практически не изменялся (рис. 6в). Ранее было показано, что экспрессия этого гена была необходима для нормального развития, патогенеза и продукции афлатоксинов *A. flavus*. Добавление в ходе культивирования этого фитопатогена 0.5 мМ СП не изменяло уровень его экспрессии [12]. Для уменьшения концентрации полиаминов в клетке используются несколько механизмов. Так, N1-ацетилирование СП или спермина, катализируемое ферментом, спермидин-ацетилтрансферазой (spermidine acetyltransferase, **SAT**), приводит к их последующему катаболизму [32]. Другой механизм связан со снижением уровня эндогенного синтеза, который запускается реакцией превращения L-орнитина в путресцин, катализируемой ODC. Белок антизим (antizyme, **AZ**) служит антагонистом ODC. AZ эффективно связывается и инактивирует ODC, а образующийся гетеродимерный комплекс (ODC/AZ) служит эффективным субстратом для 26S протеосомной убиквитин-независимой деградации [31]. В данной работе показано, что содержание гена *AZ* в контролях обоих штаммов было примерно одинаковым, а добавление СП увеличивало его экспрессию в 5–7 раз – рис. 6г).

Таким образом, показано, что уровень экспрессии генов метаболизма полиаминов (*ODC*, *SamDC, Spds* и *AZ*) оказался примерно одинаковым в штаммах WT и HY. Можно предположить, что при создании штамма HY не произошло серьезных изменений в регуляции экспрессии рассматриваемых генов метаболизма ПА. Экзогенное введение СП приводило к похожим изменениям уровня экспрессии этих генов. Уровень экспрессии *ODC* падал, *AZ* – рос, а *SamDC* и *Spds* практически не изменялся. Такой же ответ генов метаболизма полиаминов продемонстрирован в недавней работе с другим фитопатогеном из рода *Aspergillus*, *A. flavus* [12]. Заметное снижение уров-

ня экспрессии *ODC* (до 4 раз) и одновременное увеличение уровня экспрессии *AZ* (до 7) может быть связано с одной точкой регуляции, а именно, биосинтезом путресцина из L-орнитина. Добавление экзогенного СП подавляло процессы эндогенного синтеза путресцина, являющего исходным субстратом для синтеза других полиаминов.

При сравнении уровня экспрессии генов биосинтеза ЛОВ и метаболизма полиаминов видно, экспрессия *lov*-генов высокоактивным штаммов значительно увеличена, а экспрессия *pa*-генов не изменена (рис. 5 и 6). Добавление экзогенного СП при выбранных условиях ферментации повышало выход ЛОВ у обоих штаммов, увеличивало экспрессию *lov*-генов и изменяло экспрессию *pa*-генов. Изменения экспрессии как *lov*-генов, так *pa*-генов носили сходный профиль для обоих штаммов. При этом экспрессия *lov*-генов была увеличена в 3–50 раз только у штамма HY. Можно предположить, что эндогенный метаболизм полиаминов не является основным фактором, служащим причиной сверхэкспресии биосинтетических *lov*-генов и выхода ЛОВ. Известно, что экзогенные полиамины способны увеличивать продукцию вторичных метаболитов в грибах [8, 12, 26].

Для изучения взаимосвязи между метаболизмом полиаминов и биосинтезом ЛОВ был определен уровень экспрессии гена *laeA* (рис. 6д). SAMe-зависимая метилаза гистонов (**LaeA**) является фактором ремоделирования хроматина, роль которого изучена у *A. terreus*. Показано, что этот фермент действует в качестве глобального регулятора вторичного метаболизма у мицеллиальных грибов, [33–36]. Уровень экспрессии *laeA* у штамма HY оказался повышенным в 2 раза, с этим могла быть связана наблюдаемая сверхэкспресия генов кластера биосинтеза ЛОВ. Добавление 5 мМ СП повышало экспрессию *laeA*, как штаммом WT (в 1.2 раза), так и в HY (в 1.5 раза). Недавно было показано, что добавление 0.5 мМ СП к *A. flavus* AF70 WT может, как увеличивать экспрессию *laeA* (в 2.6 раз), так и повышать продукцию афлатоксинов (AFB1 и AFB2) [12].

В работе показано, что уровень *laeA* увеличивался в ответ на добавление СП. Этот феномен впервые был обнаружен в работах, в которых было установлено, что добавление СП (или его метаболита, ДАП) к *P. chrysogenum* повышало продукцию penG и экспрессию кластера генов биосинтеза бета-лактамов и *laeA* [8, 9]. Можно предположить, что эти изменения связаны с присутствием субстрата SAMe, общего для биосинтеза полиаминов и функционирования LaeA. Подобный эффект наблюдался у штаммов *A. chrysogenum*. Так, добавление ДАП или СП повышало продукцию ЦефС, уровень экспрессии генов “ранних” и “поздних” кластеров биосинтеза бета-лактамов и экспрессии *laeA* [26]. Было высказано предположение, что экзогенное введение полиаминов может снижать потребление SAMe для их эндогенного синтеза, при этом увеличивается пул SAMe, что повышает эффективность работы LaeA, положительного регулятора биосинтеза ЦефС [26]. В результате проведенного исследования показано, что существует взаимосвязь между экзогенным введением СП и, с одной стороны, продукцией ЛОВ, а с другой – уровнем экспрессии *lov*-генов и *laeA*.

Полученные данные могут быть использованы как для понимания особенностей регуляции биосинтеза ЛОВ *A. terreus*, так и общих принципов регуляции вторичных метаболитов грибов. Использование относительно дешевых полиаминов потенциально может сократить время промышленного биосинтеза ЛОВ. Однако для понимания общей картины регуляции его биосинтеза и влияния на этот процесс полиаминов требуется дальнейшее изучение работы как белков-партнеров LaeA (VeA, VelB, VosA и VelC [37]), так и других ферментов, вовлеченных в их метаболизм (ADC, AGM, CAT и PAO) [38].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barrios-González J., Miranda R.U.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 4. P. 869–883.
2. Патент РФ. 2005. № 2261901.
3. *Жгун А.А., Думина М.В., Воинова Т.М., Джавахия В.В. Эльдаров М.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 175–185.
4. *Demain A.L.* Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Fungal Biology / Eds. Martín J.F., Garcia-Estrada C., Zeilinger S. N.Y.: Springer, 2014. 339 p.
5. *Macheleidt J., Mattern D.J., Fischer J., Netzker T., Weber J., Schroeckh V., Valiante V., Brakhage A.A.* // Annu. Rev. Genet. 2016. V. 23. № 50. P. 371–392.
6. *Martín J.F.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 44. № 4–5. P. 525–535.
7. *Martín J., García-Estrada C., Kosalková K., Ullán R.V., Albillos S.M., Martín J.F.* // Fungal Genet. Biol. 2012. V. 49. № 12. P. 1004–1013.
8. *García-Estrada C., Barreiro C., Jami M.S., Martín-González J., Martín J.F.* // J. Proteomics. 2013. V. 85. P. 129–159.
9. *Martín J., García-Estrada C., Rumbero A., Recio E., Albillos S.M., Ullán R.V., Martín J.F.* // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 16. P. 5688–5696.
10. *Жгун А.А., Иванова М.А., Домрачева А.Г., Новак М.И., Эльдаров М.А., Скрябин К.Г., Барташевич Ю.Э.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 46. № 6. С. 663–670.
11. *Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И., Епремян А.С., Яроцкий С.В.* // Биомед. химия. 2015. Т. 61. № 5. С. 5–12.
12. *Majumdar R., Lebar M., Mack B., Minocha R., Minocha S., Carter-Wientjes C., Sickler C., Rajasekaran K., Cary J.W.* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 317.

13. *Думина М.В., Жгун А.А., Керпичников И.В., Домрачева А.Г., Новак М.И., Валиахметов А.Я., Кнорре Д.А., Северин Ф.Ф., Эльдаров М.А., Бартошевич Ю.Э.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 4. С. 372–381.
14. *Dumina M.V., Zhgun A.A., Novak M.I., Domratcheva A.G., Petukhov D.V., Dzhavakhiya V.V., Eldarov M.A., Bartoshevitch Iu.E.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 30. № 11. P. 2933–2941.
15. *Lu G., Moriyama E.N.* // Brief. Bioinform. 2004. V. 5. № 4. P. 378–388.
16. *Zhgun A.A., Avdanina D.A., Potapov M.P., Stepanov M.G., Shitov M.V.* // Znan.Misel J. 2018. V. 20. № 1. P. 6–13.
17. *Savitha J., Bhargavi S.D., Praveen V.K.* // Genome Announc. 2016. V. 4. № 3. P. e00491-16.
18. *Nijland J.G., Ebbendorf B., Woszczynska M., Boer R., Bovenberg R.A., Driessen A.J.* // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 21. P. 7109–7115.
19. *Barredo J.L., Díez B., Alvarez E., Martín J.F.* // Curr. Genet. 1989. V. 16. № 5–6. P. 453–459.
20. *Fierro F., Barredo J.L., Díez B., Gutierrez S., Fernández F.J., Martín J.F.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995. V. 92. № 13. P. 6200–6204.
21. *Newbert R.W., Barton B., Greaves P., Harper J., Turner G.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 19. № 1. P. 18–27.
22. *Harris D.M., van der Krogt Z.A., Klaassen P., Raamsdonk L.M., Hage S., van den Berg M.A., Bovenberg R.A., Pronk J.T., Daran J.M.* // BMC Genomics. 2009. V. 10. № 75. P. 1–20.
23. *Salo O.V., Ries M., Medema M.H., Lankhorst P.P., Vreeken R.J., Bovenberg R.A., Driessen A.J.* // BMC Genomics. BioMed Central. 2015. V. 16. № 937. P. 1–15.
24. *Думина М.В., Жгун А.А., Домрачева А.Г., Новак М.И., Эльдаров М.А.* // Генетика. 2012. Т. 48. № 8. С. 918–925.
25. *Zeng G., Zhang P., Zhang Q., Zhao H., Li Z., Zhang X., Wang C., Yin W.B.,* Fang W. // PLoS Genet. Public Library of Science, 2018. V. 14. № 6. P. e1007472.
26. *Жгун А.А., Калинин С.Г., Новак М.И., Домрачева А.Г., Петухов Д.В., Джавахия В.В., Эльдаров М.А. Бартошевич Ю.Э.*// Известия вузов. Прикл. химия и биотехн. 2015. Т. 14. № 3. С. 47–54.
27. *Rodríguez Porcela E.M., Casas Lópeza J.L., Sánchez Péreza J.A., Fernández Sevillaa J.M., Chistib Y.* // Biochem. Eng. J. 2005. V. 26. № 2–3. P. 139–144.
28. *Bizukojc M., Ledakowicz S.* // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2015. V. 149. P. 133–170.
29. *Xu W., Chooi Y.H., Choi J.W., Li S., Vederas J.C., Da Silva N.A., Tang Y.* // Angew Chem. Int. Ed. Engl. 2013. V. 52. № 25. P. 6472–6475.
30. *Perez-Leal O., Merali S.* // Amino Acids. 2012. V. 42. № 2–3. P. 611–617.
31. *Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M.* // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. № 21. P. 3389–3406.
32. *Mandal S., Mandal A., Johansson H.E., Orjalo A.V., Park M.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. V. 110. № 6. P. 2169–2174.
33. *Bok J.W., Keller N.P.* // Eukaryot. Cell. 2004. V. 3. № 2. P. 527–535.
34. *Teresa P., Armando M., Javier B.-G.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015. V. 4. № 10. P. 537–555.
35. *Niu J., Arentshorst M., Nair P.D., Dai Z., Baker S.E., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Punt P.J., Ram A.F.* // G3 (Bethesda). 2016. V. 6. № 1. P. 193–204.
36. *Palonen E.K., Raina S., Brandt A., Meriluoto J., Keshavarz T., Soini J.T.* // Microorganisms. 2017. V. 5. № 1. P. E12(1–23).
37. *Sarikaya-Bayram Ö., Palmer J.M., Keller N., Braus G.H., Bayram Ö.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. № 1. P. 1–7.
38. *Valdés-Santiago L., Ruiz-Herrera J.* Polyamines in Fungi: their Distribution, Metabolism, and Role in Cell Differentiation and Morphogenesis/Boca Raton, U.S.A.: CRC Press, 2015. 186 p.
39. *Casas Lópeza J.L, Sánchez Péreza J.A., Fernández Sevillaa J.M., Acién Fernándeza F.G., Molina Grimaa E., Chistib Y.* // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 33. № 2–3. P. 270–277.
40. *Vilches Ferrón M.A., Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J.M., Chisti Y.*// World J. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 21. № 2. P. 123–125.

1,3-Diaminopropane and Spermidine Can Stimulate Lovastatin Production and Upregulate Expression of Lovastatin Biosynthetic Genes Mediated by the LaeA Regulator in *Aspergillus terreus*

A. A. Zhgun[a, *], G. K. Nuraeva[a], M. V. Dumina[a], T. M. Voinova[b], V. V. Dzhavakhiya[a], and M. A. Eldarov[a]

[a] *Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 117312 Russia*

[b] *Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow region, 143050 Russia*

**e-mail: Zzhgun@mail.ru*

Received August 16, 2018; revised November 1, 2018; accepted December 18, 2018

The filamentous fungus *Aspergillus terreus* is the main industrial producer of cholesterol-lowering drug lovastatin, also used as semi-product for simvastatin production. We observed that exogenous polyamines, 5 mM 1,3-diaminopropane or 5 mM spermidine, are capable to increase lovastatin production by 20–45% during fermentation of *A. terreus*, the wild-type strain ATCC 20542 and overproducing strain 43-16. After spermidine addition maximum level of lovastatin production in 43-16 strain (up to 10 g/L) was observed 3 days earlier than in control. At this fermentation period the spermidine addition also increased expression level of lovastatin biosynthetic cluster genes and *laeA* (the global regulator of secondary fungal metabolism). The expression pattern of the genes for polyamine metabolism was also influenced by spermidine addition and was similar in both strains.

Keywords: Aspergillus terreus, lovastatin, fungi secondary metabolism, polyamines, spermidine, LaeA