

(xylanases and cellulases accordingly); pulp depitching (lipases); deinking (xylanases and cellulases); pulp delignification (laccases).

Now the research activity is focused on the development of new highly productive recombinant strains – producers of industrially significant enzymes.

## СИЛИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ КАК БИОАКТИВАТОРЫ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Филиппова О.И., Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф., Карпюк Л.А.,  
Перминова И.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия.

E-mail: fil@soil.msu.ru.

**Ключевые слова:** гуминовые вещества, биоактиваторы, кремний, стресс.

В настоящее время хорошо известно, что гуминовые вещества (ГВ) обладают свойствами биоактиваторов по отношению к растениям. Защитная активность ГВ при стрессах различного происхождения свидетельствует о том, что ГВ обладают неспецифическим действием. Основной неспецифической реакцией растений на любой стрессор является повреждение клеточной стенки. Так как кремний играет важную роль в укреплении последней, можно предположить, что обогащение ГВ кремнием должно привести к усилению их защитных свойств. Данная работа была направлена на определение биоактиваторных свойств гуминовых кислот угля и их силилированных производных в условиях солевого стресса, вызванного 0,15 М раствором NaCl.

Силилированные производные получали согласно [1] путём обработки гуминовых кислот леонардита, выделенных из гумата калия Rowhumus (Humintech, ФРГ), 3-аминопропилтриметоксисиланом (АПТС). Всего было получено 5 производных с содержанием кремния 2.6-11.3 %.

Биологическую активность исходных и модифицированных ГВ изучали методом биотестирования с использованием проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. Семена проращивали в растворах испытуемых ГВ с концентрацией 5, 10, 25 и 50 мг/л в течение 72 ч при температуре 24°C, после чего измеряли длину корней и побегов, а проростки помещали в вегетационные сосуды со средой Кноппа (контроль) или средой Кноппа в 0,15 М NaCl (солевой стресс) на 96 ч. По окончании эксперимента проводили учёт длин корней и побегов и рассчитывали их прирост. В качестве дополнительного тест-отклика использовали сырую биомассу проростков.

Результаты биотестирования показали, что растения пшеницы, пророщенные в растворах испытуемых ГВ, обладали большей

устойчивостью к солевому стрессу, чем контрольные. При этом было установлено, что защитное действие ГВ возрастает с увеличением содержания в них кремния до 8%, а затем – снижается (рис. 1).



Рисунок. Влияние ГВ и их силилированных производных с различным содержанием кремния на прирост корней и сырую биомассу побегов пшеницы.

Таким образом, проведённые эксперименты показали перспективность дальнейшего исследования силилированных препаратов ГВ в качестве биоактиваторов в условиях солевого стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (#06-04-49017-а) и МГУ им. М.В. Ломоносова (Междисциплинарный Научный Проект «Зеленая химия и молекулярные дескрипторы сложных систем» в 2008 г.).

#### Библиографический список

1. Leonid A. Karpiouk et al. In: Humic substances – linking structure to functions, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), 2006, 1033-1036.

#### PROTECTIVE ACTIVITY OF HUMIC SUBSTANCES AND THEIR Si-ENRICHED DERIVATIVES TOWARDS WHEAT SEEDLINGS UNDER SALT STRESS CONDITION

Philippova O.I., Kulikova N.A., Lebedeva G.F., Karpiouk L.A., Perminova I.V.

M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia.

E-mail: fil@soil.msu.ru.

**Key words:** humic substances, bioactivators, silicon, stress.

Humic substances (HS) are known to possess bioactivating properties in relation to plants. Mitigating activity of HS is observed under various stress

conditions including both biotic and abiotic ones, therefore non-specific action of HS towards plants can be hypothesized. The main non-specific damage induced by all the stresses is the plant cell injury. As silicon is responsible for cell wall stability, artificial enrichment of HS with silicon could result in increase in their mitigating activity. This study was aimed to estimate bioactivating properties of coal humic acids and their Si-enriched derivatives under salt stress conditions induced by 0.15 M NaCl.

Silicated derivatives were synthesized using 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTS) and humic acids obtained by desalting commercial potassium humate Powhumus (Humintech Ltd., Germany) according to (1). Five derivatives were obtained altogether with silicon contents from 2.5 to 11.3%.

To estimate mitigating activity of initial HS and produced derivatives, bioassay technique with seedlings of wheat *Triticum aestivum* L. was applied. Seeds were germinated for 72 hours at 24°C in the dark, and length of shoots and roots was measured. Then seedlings were transferred to pots containing Knopp's nutrition solution (blank) or Knopp's nutrition solution with 0.15 M NaCl (salt stress). After another 96 hours wheat seedlings were harvested, length of shoots and roots was measured and increase of length was calculated. Wet weight of the seedlings was used as an additional response.

The obtained data demonstrated that when seedlings were germinated in the presence of parent or modified HS, they were more resistant to the salt stress as compared to blank. At that, the most pronounced mitigating activity was registered for the HS derivative with silicon contents of 8% (Figure 1).

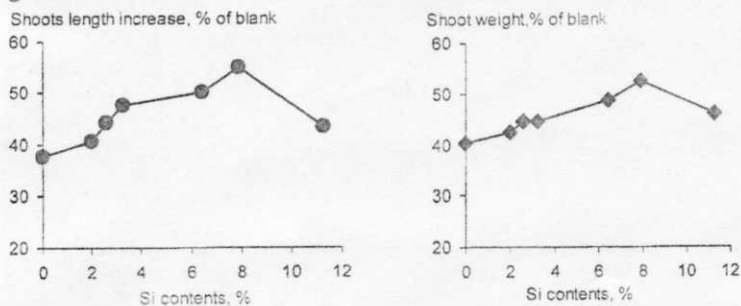


Figure 1. The influence of initial HS and their Si-enriched derivatives of different silicon contents on increase of length of wheat shoots and wet weight of seedlings.

Our findings indicated clearly that Si-enriched derivatives are the promising humic preparations for the further research of their bioactivating properties under salt stress conditions.

The research was supported by RFBR (#06-04-49017-a) and Lomonosov MSU (Interdisciplinary Scientific Project "Green chemistry and molecular descriptors of complex systems" in 2008).

### References

1. Karpouk L.A. et al. In: Humic substances – linking structure to functions, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), 2006, 1033-1036.

## ПОЛУЧЕНИЕ И БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

Хороненкова С.В.<sup>1,2</sup>, Тишков В.И.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,

<sup>2</sup>ООО "Инновации и высокие технологии МГУ", Москва.

<sup>3</sup>Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН, Москва, Россия.

E-mail: svkhor@gmail.com.

**Ключевые слова:** оксидаза D-аминокислот, экспрессия, белковая инженерия, структура

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз и катализирует реакцию окислительного дезаминирования D-аминокислот с образованием соответствующих  $\alpha$ -кетокислот. Фермент играет важную роль в метаболизме микроорганизмов, регуляции нервной деятельности и старении. На практике DAAO используется для получения предшественника полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков, для синтеза  $\alpha$ -кетокислот, неприродных L-аминокислот и в биосенсорах. Однако применение фермента на практике ограничено отсутствием дешевых источников DAAO, узким спектром субстратной специфичности и низкой стабильностью.

В нашей лаборатории был сконструирован рекомбинантный штамм *E.coli* – суперпродуцент DAAO. В результате оптимизации системы экспрессии и условий культивирования выход рекомбинантного фермента был повышен с 5000 до 35000 Ед активности с литра среды. В настоящий момент этот результат является лучшим, среди описанных в литературе.

Для повышения стабильности и каталитической активности были проведены эксперименты по направленному мутагенезу DAAO. Введение точечных мутаций привело к изменению кинетических свойств фермента. Для D-аминокислот с большим гидрофобным радикалом в боковой цепи наблюдали существенное улучшение каталитической эффективности. Один из полученных мутантов обладал повышенной температурной стабильностью (период полуйнактивации мутанта при 56 °С в 2,4 раза