

УДК 577.332.23: 539.199

МНОГОРАЗОВАЯ СИСТЕМА ОБНАРУЖЕНИЯ ФЕНОЛА В ВОДНОЙ СРЕДЕ НА ОСНОВЕ НАНОАЛМАЗОВ И ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ОКСИДАЗЫ ИЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *Neonothopanus nambi*

© 2021 г. Н. О. Ронжин^{1,*}, О. А. Могильная¹, Е. Д. Посохина¹, В. С. Бондарь¹

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи

Поступило 01.12.2020 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принято к публикации 01.04.2021 г.

Адсорбцией экстраклеточной оксидазы из гриба *Neonothopanus nambi* на модифицированные наноалмазы (МНА) детонационного синтеза создана многоразовая система определения фенола в водной среде. Установлено, что фермент прочно связывается с МНА и проявляет каталитическую активность в реакции соокисления фенола с 4-аминоантипирином без добавки пероксида водорода. Обнаружено, что в присутствии комплекса МНА–оксидаза регистрируется значительно (на порядок) больший выход продукта реакции по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента, обсуждается механизм выявленного эффекта. В модельных экспериментах продемонстрирована многократность применения комплекса МНА–оксидаза для тестирования фенола в водных образцах. Установлено, что иммобилизованный фермент проявляет функциональную активность при длительном (2 мес) хранении комплекса МНА–оксидаза при 4°C. Полученные данные создают предпосылки для использования созданной системы в экологическом мониторинге загрязнений водной среды фенолом.

Ключевые слова: наноалмаз, экстраклеточная оксидаза, базидиомицет *Neonothopanus nambi*, система индикации, фенол

DOI: 10.31857/S268673892104020X

Ферменты базидиальных грибов перспективны для применения в аналитических приложениях. В частности, большой интерес исследователей связан с изучением применимости экстраклеточных оксидаз грибов в создании диагностических тест-систем [1–4]. При этом следует сказать, что широкое применение секретлируемых оксидаз базидиомицетов в биомедицинской аналитике сдерживается их недостаточной стабильностью. Для повышения резистентности грибных оксидаз к воздействию негативных факторов реакционной среды и сохранения каталитической функции при многократном использовании осуществляется их иммобилизация на разных типах носителей, в том числе наночастицах [5–8]. Одним из перспективных носителей для иммобилизации ферментов (например, экстраклеточных оксидаз базидиомицетов) являются модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, которые

ранее были успешно использованы в создании индикаторных тест-систем для биомедицинской диагностики [9, 10].

Недавно в водных экстрактах из мицелия базидиомицета *Neonothopanus nambi*, содержащих экстраклеточные оксидазы гриба, мы обнаружили ФАД-содержащий фермент, который в отличие от известных пероксидаз катализировал реакцию соокисления фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП) без добавления экзогенного пероксида водорода [11]. Результаты проведенных исследований позволили высказать гипотезу, что данный фермент является оксидазой со смешанной функцией и прогнозировать его пригодность для аналитических целей.

Настоящая работа посвящена созданию на основе МНА и обнаруженной экстраклеточной оксидазы базидиомицета *N. nambi* индикаторной системы и оценке ее применимости для многократного определения фенола в водной среде.

Мицелий базидиомицета *N. nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов ССИБСО 836 (ИБФ СО РАН, ФИЦ “КНЦ СО РАН”, Красноярск) был использован для выделения экстраклеточных грибных ферментов. Биомассу мицелия в

¹ Институт биофизики Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

*e-mail: roniol@mail.ru

виде пеллет шарообразной формы получали разработанной нами ранее технологией выращивания данного гриба в погруженных условиях с использованием картофельно-сахарозной среды (“HiMedia Laboratory”, Индия). Экстраклеточную оксидазу, катализирующую соокисление фенола с 4-ААП без участия экзогенной перекиси водорода, выделяли из мицелия *N. nambi* способом, изложенным нами в предыдущей работе [11]. Процедура выделения включала: обработку суспензии пеллет мицелия β -глюкозидазой (“Serva”, Германия) в деионизованной (ДИ) воде (Milli-Q system, “Millipore”, США) для извлечения экстраклеточных ферментов гриба, концентрирование водного экстракта, содержащего экстрагированные ферменты и их разделение гель-фильтрационной хроматографией концентрата на колонке с Sephadex G-200 (“Pharmacia”, Швеция) с использованием в качестве элюента водного раствора 50 мМ хлорида натрия.

После хроматографии фракции, содержащие наибольшую активность изучаемого фермента, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 10 кДа (“EMD Millipore Amicon, Darmstadt”, Германия). При концентрировании в образце проводили трехкратную замену ДИ воды для более полного удаления остатков элюента. Полученный концентрат (финальный препарат экстраклеточной оксидазы) использовали в экспериментах. Белковый состав финального препарата оценивали с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [12], используя в качестве маркеров набор белков фирмы “Invitrogen Corporation” (США) с молекулярными массами 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа соответственно.

Активность изучаемой оксидазы во фракциях после хроматографии и финальном препарате оценивали реакцией соокисления фенола с 4-ААП. Для тестирования использовали 4-ААП (1-фенил-2,3-диметил-4-аминопирозолон) квалификации ч.д.а. (“Реахим”, Россия) и фенол (“Fluka”, Германия), растворы реагентов готовили *in situ* в ДИ воде. При измерении активности фермента реакционная смесь (600 мкл) содержала 5.96 мМ фенола, 0.49 мМ 4-ААП и 100 мкл тестируемого образца. После добавления всех компонентов реакции пробы перемешивали 3 с на Vortex-Genie 2 g-560E (“Scientific Industries, Inc.,” США) и инкубировали 30 мин при 22°C. Уровень оксидазной активности в пробах оценивали по выходу цветного продукта реакции (хинонимин), который регистрировали спектрофотометрически (UV-1800, “Shimadzu”, Япония) по величине поглощения при длине волны 506 нм. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах определяли микробиуретовым методом по величине поглощения при 330 нм (UV-1800), исполь-

зуя БСА (“Sigma”, США) в качестве стандарта [13].

Для иммобилизации выделенной из гриба *N. nambi* экстраклеточной оксидазы использовали МНА со средним размером кластеров (d_{50}) в гидрозолях 50 нм (Zetasizer Nano ZS, “Malvern Instruments Ltd.”, Англия), которые получали из коммерческих детонационных наноалмазов (ООО “Реал-Дзержинск”, Россия) разработанным ранее способом [14]. Сухой порошок МНА получали высушиванием гидрозоля в ротаторном испарителе Rotavapor R-215 (“Buchi”, Швейцария). Для экспериментов готовили гидрозоль с концентрацией МНА 10.0 мг/мл добавлением ДИ воды к навеске порошка наночастиц.

В экспериментах использованы также: катализа из печени быка (активность фермента – 80 000 U/mg) (“Serva”, Германия), ФАД (“Sigma”, США), соли металлов FeSO₄ и CuSO₄ квалификации ч.д.а. (“Реахим”, Россия). Для исследований растворы перечисленных реагентов готовили *in situ* в ДИ воде.

Комплекс МНА–оксидаза получали адсорбцией фермента на наночастицы. Для этого финальный ферментный препарат смешивали с гидрозолем МНА при весовом соотношении компонентов 1 : 3 (белок : наночастицы). Полученную суспензию инкубировали при 25°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин (шейкер OS-10, “BIOSAN”, Латвия). МНА с адсорбированным ферментом собирали центрифугированием при 16 000 g (Centrifuge 5415R, “Eppendorf”, Германия) в течение 10 мин при 4°C. Супернатант отбирали для оценки количества фермента, не связанного с МНА. Полученный осадок трижды отмывали раствором 120 мМ NaCl для проверки десорбции оксидазы, иммобилизованной на МНА. Осадок наночастиц каждый раз ресуспендировали в новой порции промыточного раствора, собирали центрифугированием и отбирали супернатант для оценки оксидазной активности. Отмытый комплекс МНА–оксидаза ресуспендировали в ДИ воде и использовали для экспериментов.

Тестирование активности фермента, иммобилизованного на МНА, проводили так же, как изложено выше. После проведения реакции комплекс МНА–оксидаза удаляли из реакционной смеси центрифугированием (Centrifuge 5415R) и определяли в супернатанте количество образовавшегося продукта. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка, адсорбированного на наночастицы. При изучении применимости полученной индикаторной системы (комплекс МНА–оксидаза) для многократного определения фенола использовали водные пробы с одинаковой концентрацией аналита. В этом случае после проведения реакции

комплекс собирали центрифугированием и отбирали супернатант для спектральной оценки (UV-1800) образовавшегося продукта. Осадок трижды промывали ДИ водой для удаления остатков компонентов и продукта реакции, каждый раз ресуспендируя наночастицы в новой порции промывочного раствора и собирая центрифугированием. Отмытый комплекс МНА–оксидаза ресуспендировали в ДИ воде и добавкой фенола и 4-ААП вновь запускали реакцию.

Все эксперименты по оценке активности фермента и комплекса МНА–оксидаза проводили в трех повторностях. Планки погрешностей определяли как стандартное отклонение среднего значения из 3 повторов.

В данной работе мы установили, что экстраклеточная оксидаза, выделенная из базидиомицета *N. nambi* с помощью описанной выше технологии, хотя и не является гомогенной, однако имеет высокую степень чистоты (рис. 1). Из представленных данных SDS-электрофореза видно, что финальный препарат выделенного фермента содержит практически один доминантный белок с молекулярной массой около 60 кДа. При этом следует заметить, что величина молекулярной массы данного фермента в денатурирующих (рис. 1) условиях совпадает с величиной его молекулярной массы в нативных условиях, установленной нами ранее при гель-фильтрационной хроматографии [11]. Это позволяет говорить, что изучаемая экстраклеточная оксидаза базидиомицета *N. nambi* является мономерным ферментом.

В экспериментах мы показали, что инкубация финального препарата фермента с МНА сопровождается эффективной адсорбцией выделенной оксидазы на наночастицы. При выбранных экспериментальных условиях (весовое соотношение компонентов – белок : наночастицы, время инкубации, температура и скорость перемешивания смеси) на МНА адсорбировалось более 85% белка. При этом мы установили, что изучаемая оксидаза прочно связывается с наночастицами. По крайней мере, адсорбированный фермент не элюировался при последовательных трехкратных промывках комплекса МНА–оксидаза раствором 120 мМ хлорида натрия. Регистрируемый в суммарном объеме промывок выход продукта реакции соокисления составлял не более 1.5–2%, по сравнению с выходом в исходном препарате фермента.

В исследованиях мы установили, что иммобилизованная на МНА оксидаза проявляет свою каталитическую функцию и обеспечивает образование продукта в реакции соокисления фенола с 4-ААП без добавления пероксида водорода (рис. 2а). При этом следует сказать, что в сравнительных экспериментах мы обнаружили интересный эффект. Как видно из представленных данных

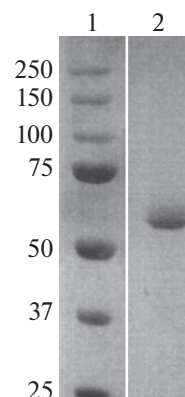


Рис. 1. Электрофореграмма финального препарата экстраклеточной оксидазы, выделенной из мицелия базидиомицета *N. nambi*. На треках SDS-электрофореза: 1 – маркерные белки с молекулярной массой 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа соответственно, 2 – препарат выделенного фермента.

(рис. 2а), в присутствии комплекса МНА–оксидаза наблюдается значительно больший (на порядок и более) выход продукта, по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента. Мы предполагаем следующий механизм этого эффекта.

В предыдущей работе мы высказали гипотезу, что изучаемая экстраклеточная оксидаза базидиомицета *N. nambi* является ферментом со смешанной функцией [11]. Согласно этой версии, данная оксидаза при наличии фенола в водной среде сначала генерирует пероксид водорода, который затем используется в реакции соокисления фенола с 4-ААП. Об образовании пероксида водорода под действием изучаемого фермента свидетельствуют результаты экспериментов, в которых было показано, что добавки в реакционную смесь экзогенной каталазы (концентрации в пробе 2–4 мкг/мл) снижают выход продукта реакции на 23–35%, по сравнению с контролем.

При этом ранее мы установили, что МНА катализируют образование цветного продукта в реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-ААП – H_2O_2) за счет поверхностных микропримесей ионов железа и меди [15]. В этой работе было показано, что предварительная обработка МНА хелатором двухвалентных ионов ЭДТА с последующей отмывкой наночастиц от избытка реагента снижала выход продукта катализируемой ими реакции в два раза и более.

Учитывая изложенные выше факты, мы предполагаем, что более эффективное образование продукта при использовании комплекса МНА–оксидаза происходит двумя путями – ферментативно (за счет иммобилизованной оксидазы) и неферментативно (с участием ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} на поверхности МНА). В пользу этого свидетель-

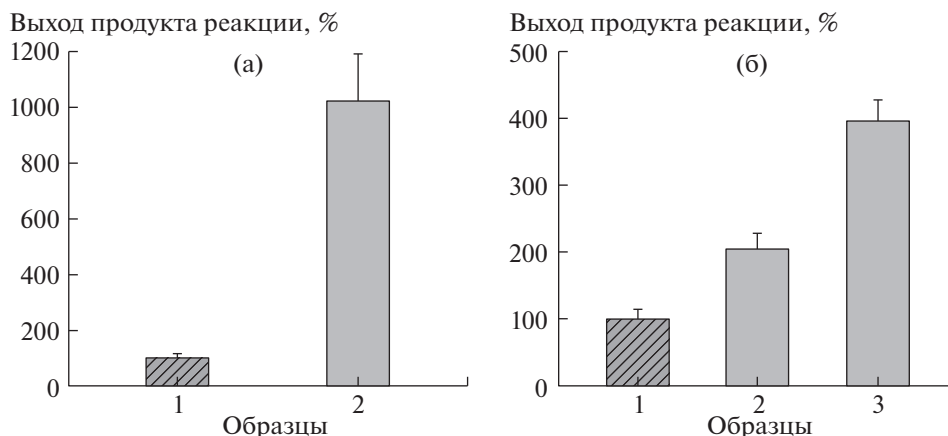


Рис. 2. Выход цветного продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП, отражающий эффективность функционирования экстраклеточной оксидазы из базидиомицета *N. nambi* в образцах с одинаковым количеством фермента. (а): 1 – свободная оксидаза (финальный препарат фермента), 2 – иммобилизованная оксидаза (комплекс МНА–фермент); (б): свободная оксидаза без (1) и в присутствии 50 μM Fe²⁺ (2) и 50 μM Cu²⁺ (3) соответственно. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы в рядах измерений на значение выхода продукта при измерении активности свободной оксидазы в финальном ферментном препарате.

ствуют результаты дополнительных исследований, в которых было установлено, что добавки ионов железа или меди (концентрация в пробе 50 μM) в содержащую свободный фермент реакционную смесь увеличивали выход продукта по сравнению с контролем в 2 и 4 раза соответственно (рис. 2б).

В свою очередь, полученные данные позволяют рассматривать МНА как усилитель реакции

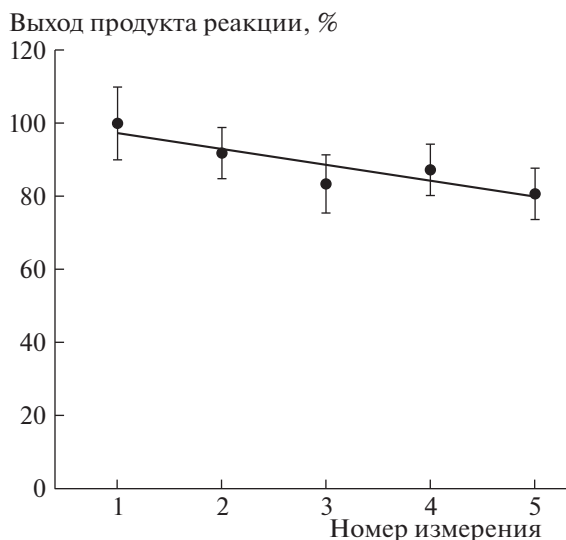


Рис. 3. Выход продукта реакции соокисления (фенол – 4-ААП) при последовательном многократном использовании комплекса МНА–оксидаза для определения фенола в водных пробах с одинаковой концентрацией аналита. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на значения выхода продукта при первом тестировании аналита.

соокисления и прогнозировать увеличение чувствительности системы индикации фенола, создаваемой на основе МНА и экстраклеточной оксидазы базидиомицета *N. nambi*. Мы предполагаем также, что эффект МНА, как усилителя, может быть использован и для повышения эффективности иных диагностических систем, создаваемых на основе МНА и других оксидазных ферментов, катализирующих образование пероксида водорода.

В модельных экспериментах нами была продемонстрирована применимость полученного индикаторного комплекса МНА–оксидаза для многократного определения фенола в водной среде (рис. 3). Из представленных данных видно, что, по крайней мере, при последовательном пятикратном использовании одного и того же образца комплекса для тестирования проб с одинаковой концентрацией аналита регистрируется практически одинаковый выход цветного продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП. Наблюдаемое в ходе последовательных измерений снижение выхода продукта может быть вызвано частичной инактивацией фермента. В частности, это может происходить при многократном ресуспендировании и осаждении комплекса МНА–оксидаза на стадиях его отмывок от остатков компонентов и продукта реакции.

В исследованиях мы установили, что иммобилизованная на МНА оксидаза из базидиомицета *N. nambi* проявляет функциональную активность и катализирует образование продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП после длительного хранения водной суспензии комплекса МНА–фермент при 4°C (рис. 4). Из представленных данных видно, что даже после двух месяцев хра-



Рис. 4. Выход продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП, катализируемой комплексом МНА–оксидаза, в зависимости от времени его хранения в ДИ воде при 4°C. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на значения выхода продукта при титровании анализа с использованием свежеприготовленного комплекса. На вставке приведен пример образования продукта реакции, катализируемой свободным ферментом после хранения его водных образцов два месяца при 4°C: без (1) и после (2) предварительной инкубации в присутствии 10 мМ ФАД. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на значения выхода продукта в контроле.

нения в этих условиях адсорбированный на наночастицы фермент обеспечивал выход до 70% продукта реакции, по сравнению с выходом, который наблюдался при использовании свежеприготовленного комплекса МНА–оксидаза. Мы предполагаем, что снижение активности оксидазы при длительном хранении, как и частичная ее инактивация при многократном использовании комплекса МНА–оксидаза (рис. 3), не являются следствием потери ферментом ФАД. В модельных экспериментах было показано, что предварительная инкубация в присутствии ФАД (концентрации в пробе 0.1, 1.0 и 10 мМ) водных образцов фермента, длительное время (два месяца) хранившихся при 4°C, не увеличивала выход продукта реакции, по сравнению с контролем (рис. 4, вставка).

Таким образом, на основе экстраклеточной оксидазы из базидиомицета *N. nambi* в качестве сенсора и МНА детонационного синтеза, как носителя, создана система индикации фенола. Установлено, что при адсорбции фермент прочно связывается с наночастицами и проявляет каталитическую активность в реакции соокисления фенола с 4-ААП без участия экзогенного пероксида водорода. Обнаружен эффект значительно

большого выхода продукта реакции при использовании комплекса МНА–оксидаза, по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента. Высказано предположение, что более эффективное образование продукта в присутствии комплекса обеспечивается участием ферментативного (за счет иммобилизованной оксидазы) и неферментативного (за счет примесей ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} на поверхности МНА) механизмов. В свою очередь, выявленный эффект позволяет прогнозировать увеличение чувствительности созданной системы индикации. В модельных экспериментах показана применимость комплекса МНА–оксидаза для многократного определения фенола в водных образцах. Установлено, что иммобилизованный на наночастицы фермент проявляет активность при длительном (два месяца) хранении водной суспензии комплекса МНА–оксидаза при 4°C и катализирует образование продукта реакции соокисления. В целом результаты выполненных исследований открывают перспективы конструирования на основе МНА и экстраклеточной оксидазы гриба *N. nambi* новой эффективной многоцветной индикаторной системы для экологического мониторинга загрязнений водной среды фенолом. Получение данного фермента в гомогенном виде для установления его структуры и функциональных особенностей является приоритетной задачей дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knop D., Yarden O., Hadar Y. The Ligninolytic Peroxidases in the Genus *Pleurotus*: Divergence in Activities, Expression, and Potential Applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 1025–1038.
2. Li F., Ma W., Wu X., et al. Luminol, Horseradish Peroxidase, and Glucose Oxidase Ternary Functionalized Graphene Oxide for Ultrasensitive Glucose Sensing // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. P. 543–552.
3. Sarma R., Islam M., Running M., et al. Multienzyme Immobilized Polymeric Membrane reactor for the Transformation of a Lignin Model Compound // Polymers. 2018. V. 10. № 4. P. 463.
4. Galperin I., Javeed A., Luig H., et al. An aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization, and application in a 2-enzyme system // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 8021–8030.
5. Qiu H., Li Y., Ji G., et al. Immobilization of Lignin Peroxidase on Nanoporous Gold: Enzymatic Properties and in situ Release of H_2O_2 by Co-immobilized Glucose Oxidase // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 3837–3842.
6. Ghoshdastider U., Wu R., Trzaskowski B., et al. Molecular Effects of Encapsulation of Glucose Oxidase Dimer by Graphene // RSC Adv. 2015. V. 5. P. 13570–13578.

7. Koenig M., König U., Eichhorn K., et al. In-situ-Investigation of Enzyme Immobilization on Polymer Brushes // *Front. Chem.* 2019. V. 7. P. 101.
8. Giannakopoulou A., Patila M., Spyrou K., et al. Development of a Four-Enzyme Magnetic Nanobiocatalyst for Multi-Step Cascade Reactions // *Catalysts*. 2019. V. 9. № 12. P. 995.
9. Ronzhin N., Baron A., Puzyr A., et al. Modified Nanodiamonds as a New Carrier for Developing Reusable Enzymatic Test-systems for Determination of Physiologically Important Substances // *Modern Clinical Medicine Research*. 2018. V. 2. P. 7–17.
10. Mogilnaya O., Ronzhin N., Artemenko K., et al. Nanodiamonds as an Effective Adsorbent for Immobilization of Extracellular Peroxidases from Luminous Fungus *Neonothopanus nambi* to Construct a Phenol Detection System // *Biocatal. Biotransform.* 2019. V. 37. P. 97–105.
11. Ронжин Н.О., Могильная О.А., Артеменко К.С., и др. Экстраклеточные оксидазы базидиомицета *Neonothopanus nambi*: выделение и некоторые свойства // Доклады РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 490. № 1. С. 49–54.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
13. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа; 1981.
14. Бондарь В.С., Пузырь А.П. Наноалмазы для биологических исследований // *Физика твердого тела*. 2004. Т. 46. № 4. С. 698–701.
15. Ronzhin N., Puzyr A., Bondar V. Detonation Nanodiamonds as a New Tool for Phenol Detection in Aqueous Medium // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2018. V. 18. P. 5448–5453.

REUSABLE SYSTEM FOR PHENOL DETECTION IN AN AQUEOUS MEDIUM BASED ON NANODIAMONDS AND EXTRACELLULAR OXIDASE FROM BASIDIOMYCETE *Neonothopanus nambi*

N. O. Ronzhin^{a, #}, O. A. Mogilnaya^a, E. D. Posokhina^a, and V. S. Bondar^a

^a Institute of Biophysics, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center”, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

[#]e-mail: roniol@mail.ru

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendji

A reusable system for phenol determination in an aqueous medium was obtained by adsorption of extracellular oxidase from fungus *Neonothopanus nambi* onto modified nanodiamonds (MND) synthesized by detonation. It was found that the enzyme strongly binds to MND and exhibits catalytic activity in the reaction of co-oxidation of phenol with 4-aminoantipyrine without the addition of hydrogen peroxide. In the presence of the MND–oxidase complex, a significantly (by an order of magnitude) higher yield of the reaction product is recorded as compared to the yield in the presence of a free enzyme; the mechanism of the revealed effect is discussed. Model experiments have demonstrated the multiple use of the MND–oxidase complex for testing phenol in aqueous samples. The immobilized enzyme exhibits functional activity during long-term (2 months) storage of the MND–oxidase complex at 4°C. The data obtained create the prerequisites for using the created system in environmental monitoring of water pollution with phenol.

Keywords: nanodiamond, extracellular oxidase, basidiomycete *Neonothopanus nambi*, indication system, phenol