

БИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИНДИКАТОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА И ГЛЮКОЗЫ НА ОСНОВЕ НАНОАЛМАЗОВ И ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ГРИБНЫХ ОКСИДАЗ

Ронжин Н.О., Могильная О.А., Артеменко К.С., Бондарь В.С.

Институт биофизики Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»

Академгородок, д. 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: ronjol@mail.ru

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. С помощью адсорбции экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) светящегося гриба *Neonothopanus nambi* на модифицированные наноалмазы (МНА) детонационного синтеза сконструирована бифункциональная индикаторная система для обнаружения глюкозы и фенола в водной среде. Установлено, что изучаемые ферменты прочно связываются частицами МНА и проявляют после этого каталитическую активность. В модельных экспериментах *in vitro* показано, что полученная индикаторная система (комплекс МНА-ферменты) может многократно использоваться для тестирования глюкозы и фенола и проявляет функциональную активность в течение длительного (до 1 месяца) хранения при 4 °С. Полученные данные открывают перспективы конструирования на основе частиц МНА и ферментов высших грибов нового класса многоцветных индикаторных тест-систем для медицинской и экологической аналитики.

Ключевые слова: наноалмазы, светящийся гриб, мицелий, β -глюкозидаза, глюкозооксидаза, пероксидаза, индикаторная система.

Создание новых эффективных аналитических средств биомедицинского назначения является одной из актуальных биотехнологических задач. Ученые многих стран мира изучают возможности конструирования таких систем индикации и диагностики посредством иммобилизации различных биомаркеров (прежде всего, ферментов) на разных типах носителей. Общеизвестно, что индикаторные системы на основе ферментов в значительном числе случаев обеспечивают высокую селективность и чувствительность детекции аналитов, обладают относительной простотой и быстротой анализа. Для разработки новых аналитических средств перспективными носителями являются наночастицы разной физико-химической природы – исследованиям их применимости в создании тест-систем для медицинской диагностики и экологического мониторинга посвящено большое количество работ [1-8].

Следует сказать, что при создании средств индикации и диагностики часто используемыми пептидными биомаркерами являются ферменты класса оксидоредуктаз (КФ 1). В частности, изучается возможность конструирования аналитических тест-систем с помощью иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидаз на разных носителях (в том числе, наночастицах) [5, 9-11]. Для исследователей, которые работают в данной области, интерес могут представлять оксидазы высших грибов, в частности, глюкозооксидаза и пероксидазы. Эти ферменты базидиомицетов достаточно хорошо исследованы, изучается их применимость в аналитике [12, 13]. Для иммобилизации биомаркеров при конструировании аналитических тест-систем в качестве матрицы могут быть использованы модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, обладающие высокой седиментационной устойчивостью в водных суспензиях и адаптированные для биомедицинских исследований [14, 15]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, прежде всего, химически полиморфной, активной поверхности [16, 17], МНА проявляют высокие адсорбционные свойства к различным соединениям (включая, соединения пептидной природы) [18-21].

В недавних исследованиях мы показали, что обработка β -глюкозидазой или хитиназой инкубируемого в деионизованной воде мицелия светящегося гриба *Armillaria borealis* приводит к выходу грибных экстраклеточных оксидаз в среду инкубации [22]. Эти данные имеют самостоятельное биотехнологическое значение и демонстрируют возможности в относительно мягких условиях получать из биомассы мицелия базидиомицетов препараты, обогащенные экстраклеточными грибными ферментами и содержащие малое количество балластных примесей. В свою очередь, это создает предпосылки для упрощения их дальнейшего выделения в чистом виде. В то же время, наличие таких препаратов открывает перспективы в изучении их применимости для создания новых индикаторных и диагностических тест-систем с помощью иммобилизации экстраклеточных грибных ферментов на разных носителях, например, МНА.

Цель настоящего исследования состояла в изучении применимости МНА и экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) из светящегося гриба *Neonothopanus nambi* для конструирования бифункциональной индикаторной системы определения глюкозы и фенола и оценке ее пригодности для аналитических целей.

В исследованиях использовали МНА, полученные из наноалмазов детонационного синтеза российского производства (ООО «Реал-Дзержинск», Россия) разработанным нами ранее способом [14]. В экспериментах использовали фракцию МНА со средним размером кластеров наночастиц (d_{50}) в гидрозолях 50 нм, выделенную из водной суспензии МНА дифференциальным центрифугированием (Centrifuge Avanti J-E, «Beckman Coulter»,

USA). Распределение размеров кластеров МНА в полученной фракции оценивали с помощью Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd.», UK). Сухой порошок МНА получали высушиванием выделенной фракции в роторном испарителе Rotavapor R-215 («Buchi», Switzerland). Для работы использовали гидрозоль МНА с концентрацией 10,0 мг/мл, который готовили добавлением к навеске порошка наночастиц деионизованной (ДИ) воды, полученной с помощью системы Milli-Q System («Millipore», USA).

В работе использовали мицелий светящегося базидиомицета *N. nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) ИБФ СО РАН, ФИЦ «КНЦ СО РАН», который получали при культивировании гриба в погруженных условиях. Процесс выращивания гриба останавливали на 7-9 сутки при переходе в стационарную стадию роста, когда питательные вещества в среде культивирования истощались, и прирост биомассы мицелия замедлялся. Выращенные пеллеты мицелия многократно промывали большими объемами ДИ воды для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Для получения экстраклеточных оксидаз гриба пеллеты мицелия обрабатывали β-глюкозидазой (КФ 3.2.1.21) из сладкого миндаля («Serva», Germany), раствор фермента готовили в 10 мМ фосфатном буфере (рН 6,0). Отмытые пеллеты помещали в свежую ДИ воду, содержащую β-глюкозидазу (концентрация фермента 0,5 МЕ/мл), и инкубировали при 25 °С в течение 24 ч при постоянном, медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин на шейкере OS-10 («BIOSAN», Latvia). После инкубации пеллет воду отбирали и диализовали ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 30 кДа на системе Stirred Cell («EMD Millipore Amicon, Darmstadt», Germany) для концентрирования полученных экстраклеточных ферментов и удаления низкомолекулярных балластных примесей. Для более полного удаления низкомолекулярных соединений в ходе ультрафильтрации проводили трехкратную замену ДИ воды в диализуемом образце. Полученную надмембранную фракцию (концентрат) использовали в экспериментах. Концентрацию белка в образцах ферментных растворов определяли микробулетным методом.

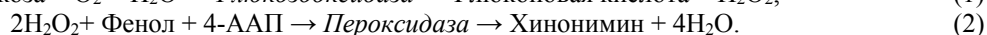
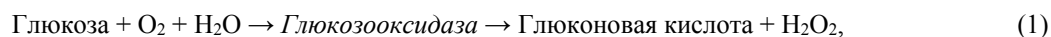
Индикаторные комплексы МНА-ферменты получали адсорбцией изучаемых оксидаз на наночастицы. Для этого аликвоты концентрата и гидрозоля МНА смешивали при весовом соотношении компонентов 1:1 (белок : наночастицы). Суспензии инкубировали при 23 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании на шейкере OS-10 со скоростью 150 об/мин. МНА с иммобилизованными ферментами собирали центрифугированием при 16000 g (Centrifuge 5415R, «Eppendorf», Germany) в течение 10 мин при 4 °С. Супернатанты отбирали для оценки количества не связавшихся с МНА ферментов. Для проверки десорбции связавшихся с наночастицами оксидаз осадки МНА трижды промывали разными элюентами. В этих целях использовали раствор 120 мМ NaCl и буферы разного состава: фосфатный (100 мМ, рН 7,0), Трис-HCl (50 мМ, рН 6,5) и Бис-трис-пропановый (50 мМ, рН 6,5). Осадки МНА каждый раз ресуспендировали в новой порции промыточного раствора, собирали центрифугированием и отбирали супернатанты для оценки пероксидазной и глюкозооксидазной активностей. Отмытые комплексы МНА-ферменты ресуспендировали в ДИ воде и использовали для исследований.

В работе использованы следующие реагенты: 4-аминоантипирин (4-ААП) и D-глюкоза квалификации «ч.д.а.» («Реахим», Россия), фенол («Fluka», Germany), 3 %-й раствор пероксида водорода (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», Россия). Рабочие растворы реагентов готовили *in situ* в ДИ воде.

Наличие глюкозооксидазной и пероксидазной активностей в концентрате до и после его обработки МНА, в промыточных растворах, а также активность иммобилизованных на наночастицы ферментов, оценивали реакцией окислительного азосочетания. Реакция катализируется пероксидазой с образованием окрашенного продукта (хинонимин):



При определении глюкозооксидазной активности образование цветного продукта обеспечивается двумя последовательными реакциями:



При тестировании пероксидазной активности конечная концентрация ингредиентов в объеме реакционной смеси составляла: 0,03 % H₂O₂, 0,10 мг/мл 4-ААП, 0,56 мг/мл фенола. При определении глюкозооксидазной активности в реакционную смесь вместо пероксида водорода добавляли глюкозу в концентрации 10 мг/мл. В обоих случаях реакцию инициировали добавкой 100 мкл исследуемого раствора свободных ферментов или 500 мкл суспензии комплексов МНА-ферменты. После добавления всех ингредиентов образцы перемешивали в течение 3 секунд на Vortex-Genie 2 g-560E («Scientific Industries, Inc.», USA) и инкубировали при температуре 23 °С в течение 30 мин. Количество образовавшегося цветного продукта оценивали на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Japan) по величине оптической плотности при длине волны 506 нм. При определении активности ферментов, иммобилизованных на наночастицы, после проведения реакции комплексы МНА-ферменты удаляли из образцов центрифугированием (Centrifuge 5415R). Супернатанты отбирали и оценивали количество образовавшегося продукта.

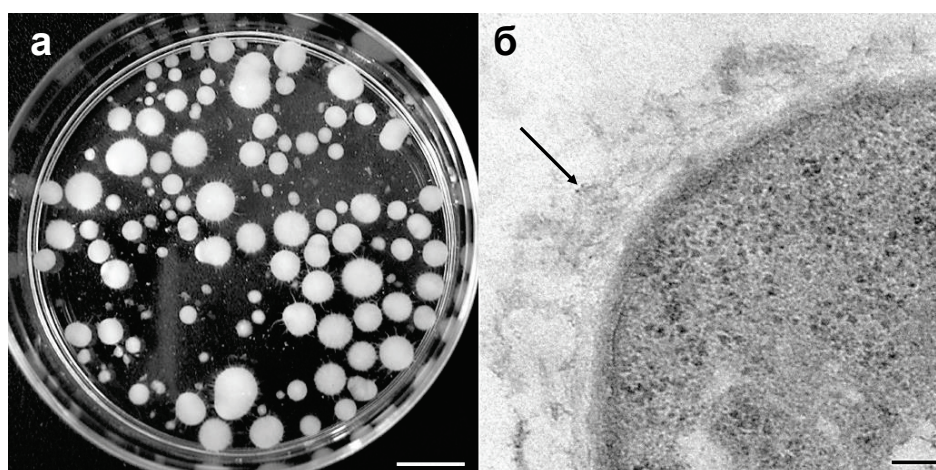


Рисунок 1. Внешний вид пеллет мицелия *N. nambi* (а), масштаб 10 мм; ультраструктурное изображение грибной гифы с развитой слизистой капсулой (показано стрелкой) (б), масштаб 100 нм

Микроскопические исследования мицелия выполнены на световом микроскопе Axiolmager M2 («Carl Zeiss», Germany). При электронно-микроскопических исследованиях мицелия подготовку препаратов для получения ультратонких срезов проводили по стандартной методике. Срезы просматривали на электронном микроскопе HT770 («Hitachi», Japan).

Как показали эксперименты, выбранный нами способ глубинного выращивания гриба *N. nambi* позволяет получать пеллеты мицелия шарообразной формы (рис. 1а), имеющие шероховатую поверхность за счет большого количества выростов – пучков гиф. При использованных в работе условиях культивирования гриба (объем питательной среды, скорость ее перемешивания, температура и время выращивания) диаметр получаемых пеллет составлял 2-7 мм.

При световой микроскопии ультратонких срезов мицелия было показано, что клеточная стенка гиф имеет двух- или многослойное строение, к цитоплазматической мембране прилегает более плотный слой. Снаружи клеточная стенка гиф покрыта слизистой капсулой, которая визуализируется как более рыхлый, в отличие от клеточной стенки, сетчатый слой (рис. 1б). Известно, что экстраклеточные оксидазы высших грибов локализируются в клеточной стенке и слизистой капсуле клеток [23-25]. Основными компонентами клеточной стенки являются хитин, β -D-глюкан и гликопротеины. Снаружи клеточная стенка гиф покрыта полисахаридной капсулой, которая имеет поры и также состоит из β -D-глюкана [26-29]. Во внешней оболочке гифы и межклеточном пространстве разветвленные глюканы формируют гелеобразную сеть, которая необходима для функционирования иммобилизованных в ней ферментов, в частности, пероксидаз [26-28].

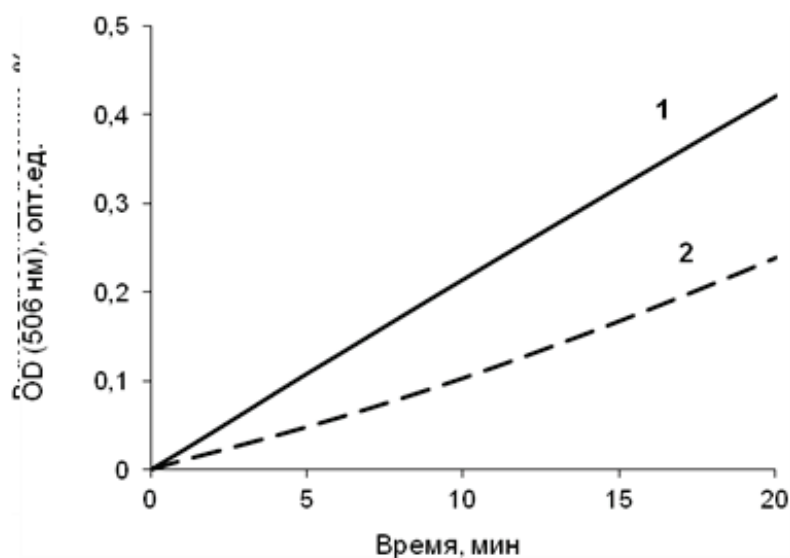


Рисунок 2. Динамика образования цветного продукта реакции окислительного азосочетания, катализируемой экстраклеточными оксидазами гриба *N. nambi* в концентрате: тестирование проведено с использованием смеси глюкоза–4-ААП–фенол (1) и смеси H_2O_2 –4-ААП–фенол (2)

В экспериментах было установлено, что после инкубации мицелия *N. nambi* в ДИ воде, содержащей β -глюкозидазу, в ней регистрируется наличие глюкозооксидазной и пероксидазной активностей. На это указывают результаты тестирования концентрата при проведении реакции азосочетания в двух вариантах – с использованием смесей реагентов H_2O_2 – 4-ААП – фенол и глюкоза – 4-ААП – фенол (рис. 2). В обоих случаях наблюдается образование окрашенного продукта. Из приведенного рисунка следует, что образование продукта идет эффективнее при определении глюкозооксидазной активности. Мы предполагаем, что меньший выход продукта при тестировании пероксидазной активности мог быть связан с неоптимальной концентрацией пероксида водорода, выбранной нами для проведения реакции. В дальнейших экспериментах для определения активности изучаемых оксидаз была использована смесь реагентов глюкоза – 4-ААП – фенол. В этом случае в катализе участвуют оба изучаемых фермента, и образование продукта свидетельствует об их функциональной активности.

Полученные результаты указывают на выход экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambi* в среду инкубации при обработке мицелия β -глюкозидазой и согласуются с механизмом действия этого фермента – гидролиз концевых остатков β -D-глюканов. Как уже говорилось выше, разветвленные глюканы образуют гелеобразную сеть во внешней оболочке гиф и межклеточном пространстве, в которой локализованы экстраклеточные оксидазы. Очевидно, что при распаде гелеобразной сети под действием β -глюкозидазы эти ферменты будут выходить во внешнюю среду.

Исследования показали, что обработка концентрата МНА сопровождается эффективной адсорбцией изучаемых ферментов на наночастицы (рис. 3). Как видно из рисунка, после обработки и удаления МНА центрифугированием выход продукта реакции в супернатанте составлял около 10 %, по сравнению с выходом в исходном концентрате. Было установлено, что изучаемые экстраклеточные оксидазы гриба *N. nambi* прочно связываются частицами МНА – трехкратная отмывка частиц разными элюентами не приводила к десорбции ферментов (рис. 3). При всех использованных нами вариантах элюции суммарный выход продукта в промывках составлял не более 2 % по сравнению с выходом в исходном концентрате. Феномен столь прочного связывания частицами МНА экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambi* пока непонятен и требует дальнейшего изучения. При этом было показано, что иммобилизованные на частицах МНА оксидазы проявляют функциональную активность и катализируют образование цветного продукта в ходе двухстадийной реакции глюкозооксидаза-пероксидаза(ы) (рис. 3).

В экспериментах была продемонстрирована многократность использования полученного комплекса МНА-ферменты для детекции (рис. 4). Видно, что при последовательном четырехкратном проведении реакции азосочетания с использованием одного и того же комплекса наблюдается практически одинаковый выход цветного продукта. С одной стороны, это указывает на то, что иммобилизация экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambi* на МНА позволила получить индикаторную тест-систему многократного действия. В то же время, следует подчеркнуть, что полученный комплекс МНА-ферменты является бифункциональной системой индикации, которая может быть использована в медицинской диагностике для определения глюкозы и в экологическом мониторинге для обнаружения фенола.

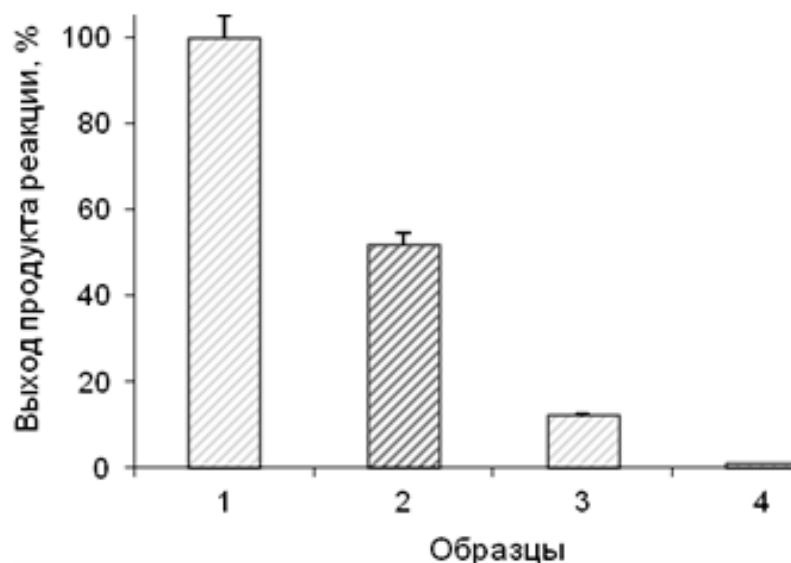


Рисунок 3. Выход продукта реакции азосочетания, катализируемой экстраклеточными оксидазами гриба *N. nambi* в образцах: концентрат (1), комплекс МНА-ферменты (2), супернатант после обработки концентрата наночастицами (3), суммарная отмывка комплекса МНА-ферменты раствором 120 мМ NaCl (4); данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на выход продукта в концентрате

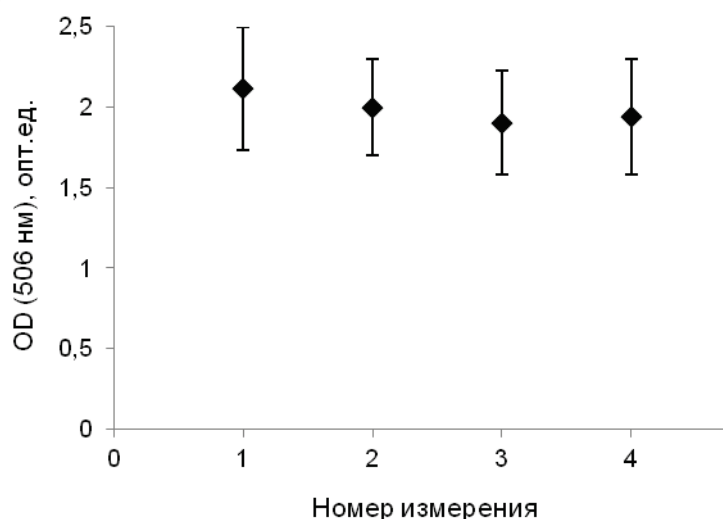


Рисунок 4. Выход продукта реакции азосочетания, катализируемой комплексом МНА-ферменты при его последовательном четырехкратном использовании

В исследованиях было установлено, что иммобилизованные на наночастицы оксидазы сохраняют свою функциональную активность при длительном (в течение месяца) хранении комплекса МНА-ферменты в виде водной суспензии при 4 °С (рис. 5). Это позволяет говорить о высокой стабильности полученной индикаторной тест-системы. Из представленных данных видно, что при хранении в течение указанного периода времени тест-система обеспечивает практически одинаковый выход цветного продукта реакции азосочетания.

Таким образом, результаты проведенных исследований демонстрируют применимость МНА взрывного синтеза и экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) светящегося гриба *Neonothopanus nambi* для создания многократной бифункциональной индикаторной системы, позволяющей проводить определение глюкозы и фенола. Это открывает перспективы конструирования на основе МНА и ферментов высших грибов нового класса полифункциональных тест-систем индикации и диагностики многократного действия для медицинской и экологической аналитики.

Исследования выполнены при финансовой поддержке из средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 0356-2017-0020).

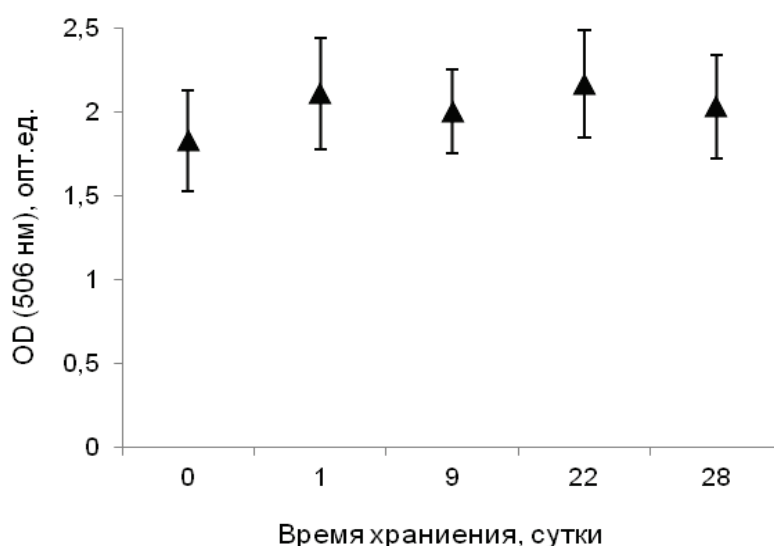


Рисунок 5. Выход продукта реакции азосочетания, катализируемой комплексом МНА-ферменты в зависимости от времени его хранения в ДИ воде при 4 °С

Список литературы / References:

1. Artiles M., Rout C.S., Fisher T.S. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, vol. 63, pp. 1352-1360.
2. Zamborini F.P., Bao L., Dasari R. Nanoparticles in measurement science. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 84, pp. 541-576.

3. Fisher P., Fadley C.S. Probing nanoscale behavior of magnetic materials with soft X-ray spectroscopy. *Nanotech. Rev.*, 2012, vol. 1, pp. 5-15.
4. Lad A., Agrawal Y.K. Nanodevices for monitoring toxicological behavior of therapeutic agent. *Rev. Nanosci. Nanotech.*, 2012, vol. 1, pp. 217-227.
5. Ronzhin N.O., Baron A.V., Mamaeva E.S., Puzyr A.P., Bondar V.S. Nanodiamond-based tests systems for biochemical determination of glucose and cholesterol. *J. Biomater. Nanobiotech.*, 2013, vol. 4, pp. 242-246.
6. Hatamie A., Zargar B., Jalali A. Copper nanoparticles: a new colorimetric probe for quick, naked-eye detection of sulfide ions in water samples. *Talanta.*, 2014, vol. 121, pp. 234-238.
7. Yin M., Zhao L., Wei Q., Li H. Rapid colorimetric detection of melamine by H₂O₂-Au nanoparticles. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 32897-32901.
8. Wang Y., Hu S. Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2016, vol. 16, pp. 7852-7872.
9. Ciaurriz P., Bravo E., Hamad-Schifferli K. Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates. *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, vol. 414, pp. 73-81.
10. Yang H., Wei W., Liu S. Monodispersed silica nanoparticles as carrier for co-immobilization of bi-enzyme and its application for glucose biosensing. *Spectrochim. Acta. Part A*, 2014, vol. 125, pp. 183-188.
11. Tan H., Guo S., Dinh N., Luo R., Jin L., Chen C. Heterogeneous multi-compartmental hydrogel particles as synthetic cells for incompatible tandem reactions. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, p. 663.
12. Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M.J., Liers C., Lunde T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, vol. 87, pp. 871-897.
13. Wong C., Wong K., Chen X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 78, pp. 927-938.
14. Puzyr A.P., Bondar V.S. Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability. *RU Patent no. 2252192*, 2005, bull. no. 14.
15. Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Nanodiamonds with novel properties: a biological study. *Diam. Relat. Mater.*, 2007, vol. 16, pp. 2124-2128.
16. Gibson N., Shenderova O., Luo T.J.M., Moseenkov S., Bondar V., Puzyr A., Purtov K., Fitzgerald Z., Brenner D.W. Colloidal stability of modified nanodiamond particles. *Diam. Relat. Mater.*, 2009, vol. 18, pp. 620-626.
17. Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S. Modification and comparative study of commercial nanodiamonds. *Full. Nanotub. Carb. Nanostruct.*, 2015, vol. 23, pp. 93-97.
18. Bondar V.S., Pozdnyakova I.O., Puzyr A.P. Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins. *Phys. Solid State.*, 2004, vol. 46, pp. 758-760.
19. Puzyr A.P., Purtov K.V., Shenderova O.A., Luo M., Brenner D.W., Bondar V.S. The adsorption of aflatoxin B1 by detonation-synthesis nanodiamonds. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2007, vol. 417, pp. 299-301.
20. Purtov K.V., Burakova L.P., Puzyr A.P., Bondar V.S. Interaction of linear and ring forms of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation. *Nanotechnology*, 2008, vol. 19, pp. 1-3.
21. Baron A.V., Osipov N.V., Olkhovskiy I.A., Puzyr A.P., Bondar V.S. Binding the immunoglobulins of human serum by nanodiamonds. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2014, vol. 457, pp. 158-159.
22. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Artemenko K.S., Bondar V.S. Morphological properties and levels of extracellular peroxidase activity and light emission of the basidiomycete *Armillaria borealis* treated with β -glucosidase and chitinase. *Mycosphere*, 2017, vol. 8, pp. 649-659.
23. Daniel G., Nilsson T., Pettersson B. Intra- and extracellular localization of lignin peroxidase during the degradation of solid wood and wood fragments by *Phanerochaete chrysosporium* by using transmission electron microscopy and immuno-gold labeling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, vol. 55, pp. 871-881.
24. Ruel K., Joseleau J.-P. Involvement of an Extracellular Glucan Sheath during Degradation of Populus Wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, pp. 374-384.
25. Takano M., Hayashi N., Nakamura M., Yamaguchi M. Extracellular peroxidase reaction at hyphal tips of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694 and in fungal slime. *J. Wood Sci.*, 2009, vol. 55, pp. 302-307.
26. Latge J.-P., Beauvais A. Functional duality of the cell wall. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014, vol. 20, pp. 111-117.
27. Bowman S.M., Free S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 2006, vol. 28, pp. 799-808.
28. Ene I.V., Walker L.A., Schiavone M., Lee K.K., Martin-Yken H., Dague E., Gow N.A.R., Munro C.A., Brown A.J.P. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *mBio*, 2015, vol. 6, e00986-15 (2015). doi:10.1128/mBio.00986-15
29. Barrasa J.M., Gutierrez A., Escaso V., Gullen F., Martinez M.I., Martinez A.T. Electron and fluorescent microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, pp. 325-332.

BIFUNCTIONAL INDICATOR SYSTEM FOR PHENOL AND GLUCOSE DETECTION BASED ON NANODIAMONDS AND EXTRACELLULAR FUNGAL OXIDASES**Ronzhin N.O., Mogilnaya O.A., Artemenko K.S., Bondar V.S.**

Institute of Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”

Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: roniol@mail.ru

Abstract. A bifunctional indicator system for glucose and phenol detection has been constructed by adsorption of extracellular oxidases (glucose oxidase and peroxidases) of luminous fungus *Neonothopanus nambi* onto modified nanodiamonds (MND) synthesized by detonation. It has been found that the studied enzymes are strongly bound by MND particles and exhibit catalytic activity. Model experiments *in vitro* have shown that created indicator system (MND-enzymes complex) can be repeatedly used for glucose and phenol testing and exhibit their activity after storage at 4 °C for a long time (up to 1 month). The data obtained open the prospects for developing a new class of reusable multifunctional indicating and diagnostic test-systems on the basis of MND particles and higher fungi enzymes for medical and ecological analytics.

Key words: *nanodiamonds, luminous fungus, mycelium, β -glucosidase, glucose oxidase, peroxidase, indicator system.*