

Ферменты и их формы, используемые для обнаружения фосфорорганических соединений

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

УДК 543.94:[623.459; 504.054]

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-1-22-41>

И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, 119991, Российская Федерация,
г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Поступила 20.01.2021 г. Принята к публикации 20.03.2021 г.

Ферменты способны эффективно взаимодействовать с различными фосфорорганическими соединениями (ФОС), вступая с ними в (био)химические реакции. Изменение исходной активности ферментов в результате их ингибирования ФОС, образование продуктов деструкции ФОС под действием гидролитических ферментов и пр. могут быть определены с использованием разных физико-химических методов и использованы в биоаналитических системах для определения концентраций ФОС. Цель обзора – анализ основных научных результатов, достигнутых за последние 10 лет в развитии аналитических систем на основе ферментов, статья предназначена для разработчиков детекторов ФОС. Показано, что требования к чувствительности биосенсоров исходят из норм содержания анализируемых веществ, детектируемых в/на объектах, подлежащих обязательному контролю. Основой для разработки наибольшего числа ультрачувствительных биосенсоров являются холинэстеразы, хотя и другие ферменты также могут успешно использоваться в роли биочувствительного элемента. Наиболее технологичным решением, приближенным к практическому внедрению, можно считать биоаналитические системы, использующие иммобилизованные ферменты. Улучшение пределов обнаружения ФОС может быть достигнуто за счет использования нанообъектов вкуче с современными методами регистрации сигнала, например, с наномеханическими детекторами и преобразователями сигнала. Это сочетание технических решений обеспечивает чувствительность анализа ФОС вплоть до пг/л. Существенное развитие в настоящее время получили «безреагентные» системы, ставшие основой для производства большого числа коммерчески доступных «стрипов» (тест-полосок) для экспрессного определения ФОС. Современные запросы стимулируют бурное развитие портативных и особенно «мобильных, портативных» биосенсоров, способных закрепляться, в том числе, на одежде. Прогресс, достигнутый в области создания аффинных аминокислотных последовательностей, в перспективе позволит создавать ферментные биосенсоры на любой поверхности.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза; биочувствительный элемент; бутирилхолинэстераза; пестициды; гидролиз; иммобилизация; ингибирование; мутагенность; нейротоксичность; онкогенность; органофосфатгидролаза; фермент; фосфорорганические соединения; чувствительность анализа.

Библиографическое описание: Лягин И.В., Ефременко Е.Н. Ферменты и их формы, используемые для обнаружения фосфорорганических соединений // Вестник войск РХБ защиты. 2021. Т. 5. № 1. С. 22–41. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-1-22-41>

Пестициды активно применяются в сельском хозяйстве, поскольку это позволяет поддерживать высокий уровень производства целевой продукции. Использование пестицидов

в мировом сельскохозяйственном производстве ежегодно составляет порядка 4,3 млн т [1]. Более 60 % – фосфорорганические соединения (ФОС), большую часть из них составляют фун-

гициды и гербициды [2]. Накопление пестицидов в объектах окружающей среды приводит к ряду негативных последствий для здоровья людей, обусловленных их мутагенностью, нейротоксичностью и онкогенностью. Среди вредителей растений распространяется устойчивость к длительно используемым химическим средствам защиты, что заставляет хозяйства увеличивать частоту их применения или комбинировать разные пестициды, осуществляя их одновременное введение в максимально допустимых концентрациях. Биоаккумуляция пестицидов в экосистемах в силу их гидрофобности и проявления кумулятивного эффекта делают необходимым разработку способов высокочувствительного определения и тщательного контроля присутствия ФОС в самых разнообразных объектах.

Для лабораторных исследований ФОС общеприняты и широко распространены хроматографические, спектрометрические и электрохимические методы анализа [3], однако они не позволяют проводить определение ФОС *in situ*. Эту задачу решают биосенсоры¹ [4, 5]. Среди них наиболее эффективны биосенсоры, использующие ферменты в качестве биочувствительных элементов [6, 7] (рисунок 1). ФОС способны по-разному взаимодействовать с ферментами и могут быть как ингибиторами, так и субстратами для них [2, 9]. Для гарантированного внедрения в практику такие биосенсоры должны обеспечивать экспрессность анализа, его селективность и эффективность, то есть быть пригодными для количественного определения ФОС. Влияние на них различных нецелевых веществ, содержащихся в анализируемых образцах [8], должно быть сведено к минимуму.

Цель обзора – анализ основных научных результатов, достигнутых за последние 10 лет в развитии аналитических систем на основе ферментов, предназначенных для определения ФОС.

Особое внимание при подготовке обзора уделено новым научным идеям, реализованным в междисциплинарных исследованиях. В данной статье не рассматривались иммуноферментные методы анализа [10], аналитические системы на основе аптамеров [11] и молекулярно импринтированных полимеров [12].

Принцип действия ферментов, используемых для определения пестицидов. Требования к чувствительности биосенсоров исходят из норм содержания пестицидов, детектиру-



Рисунок 1 – Примеры некоторых биоаналитических систем на основе ферментов для определения ФОС (схема авторов, составлена на основе рисунков и фотографий, находящихся в свободном доступе в сети «Интернет»)

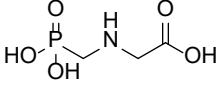
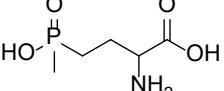
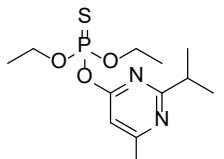
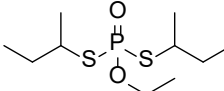
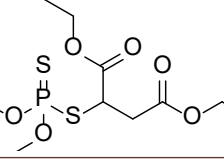
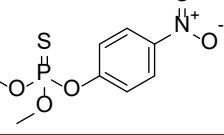
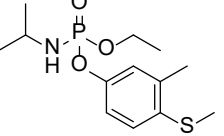
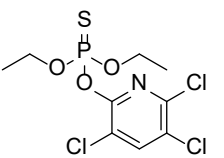
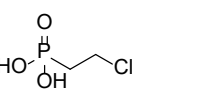
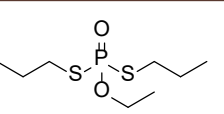
емых в/на объектах, подлежащих обязательному контролю (таблица 1).

Для достижения приемлемо высоких эксплуатационных характеристик может варьироваться как применяемый биочувствительный элемент (фермент), так и метод усиления и регистрации аналитического сигнала. Удачная комбинация этих составных элементов (биочувствительной, усиливающей и регистрирующей) биосенсоров позволяет достичь очень высокой чувствительности таких аналитических систем (до нг/л и даже лучше). Причем в настоящее время стала возможной разработка ферментных биосенсоров, ориентированных на конкретные аналитические задачи, что достигается благодаря использованию современных физико-химических методов исследований и накопленным эмпирическим данным. Ряд таких биосенсоров уже сегодня коммерчески доступен, и интерес к ним у потенциальных потребителей только повышается.

Токсичность для человека и животных пестицидов обуславливается их способностью к инактивации разных ферментов из различных

¹ Биосенсор (по определению ИЮПАК) – это прибор (или метод), который использует специфичные биохимические реакции, опосредованные отдельными ферментами, иммуносистемами, тканями, органеллами или целыми клетками, чтобы детектировать химические соединения, обычно с помощью электрических, термальных или оптических сигналов.

Таблица 1 – Примеры некоторых фосфорорганических пестицидов и нормы их содержания в пищевых продуктах

Пестицид*	Структурная формула	Допустимый уровень содержания**, мг/кг	Допустимый уровень потребления**, мкг/сут/кг
Глифосат		0,05-15	0-1000
Глюфосинат		0,02-3	0-10
Диазинон		0,01-2	0-5
Кадусафос		0,01	0-0,5
Малатион		0,01-13	0-300
Метилпаратион		0,05-5	3
Фенамифос		0,005-0,05	0-0,8
Хлорпирифос		0,01-20	0-10
Этефон		0,01-7	0-50
Этопрофос		0,01-0,2	0-0,4

* Глифосат (N-(фосфометил)-глицин), глюфосинат (2-амино-4-(метилфосфин)бутановая кислота), диазинон (O,O-диэтил-O-(2-изопропил-6-метилпиримидин-4-ил) тиофосфат), кадусафос (S,S-диизобутил-O-этилдитиофосфат), малатион (O,O-диметил-S-(1,2-дикарбэтоксэтил) дитиофосфат), метилпаратион (O,O-диметил-O-(4-нитрофенил) тиофосфат), фенамифос (N-изопропиламидо-O-(3-метил-4-метилтиофенил)-O-этилфосфат), хлорпирифос (O,O-диэтил-O-(3,5,6-трихлорпиримидин-2-ил) тиофосфат), этефон (2-хлорэтилфосфоновая кислота), этопрофос (S,S-дипропил-O-этилдитиофосфат)

** Указаны диапазоны, отражающие максимальные уровни ФОС в различных пищевых продуктах, согласно Кодексу Алиментарииус ФАО/ВОЗ (<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>). Дата обращения: 10.12.2020)

биологических источников [2, 9, 13]. Используя современные подходы к рациональному дизайну ферментов, становится возможным создание ферментных биосенсоров под конкретные задачи, например, путем точечных химических модификаций молекулы белка, за счет его дополнительной стабилизации и т.д.

Все ФОС в той или иной степени ингибируют ацетил- (AChE) и бутирилхолинэстеразы (BChE). Оба этих фермента содержат в своем активном центре аминокислотный остаток серина (рисунок 2А), являющийся ключевым для проявления ими каталитической активности в отношении ацетил- и бутирилхолина. Фосфорилирование данного остатка под действием ФОС приводит к практически необратимому ингибированию этих ферментов. Как следствие этого, по снижению ферментной активности в результате контакта с аналитом, содержащим пестицид(ы), представляется возможным с высокой чувствительностью детектировать эти ингибиторы, так как в данном случае один и тот же фермент выступает в качестве чувствительного элемента и усилителя сигнала.

Современные микро- и наномеханические приборы позволяют даже обойтись без подобного усиления сигнала за счет регистрирования непосредственного взаимодействия фермента и ингибитора. Высокая аффинность связывания холинэстераз с ФОС вкуче с высокочувствительными методами определения их ферментативной активности позволяет определять крайне низкие концентрации ингибиторов, что делает эти ферменты прекрасным объектом для исследований и служит основой для разработки большого числа ультравысоких биосенсоров.

Другими примерами ферментов, ингибируемых ФОС, являются кислая и щелочная фосфатазы (рисунок 2Б). Моноэфиры фосфатов используются ими в качестве естественных субстратов, поэтому ди- и триэфиры фосфатов, т.е. типичные ФОС, зачастую являются конкурентными ингибиторами фосфатаз. Как и холинэстеразы, фосфатазы могут выступать в роли биочувствительного элемента и усилителя сигнала одновременно. Однако в силу обратимого типа их ингибирования чувствительность определения ФОС всегда будет существенно ниже при использовании фосфатаз в биосенсорах, чем в случае холинэстераз.

Каталитически модифицировать ФОС могут и другие ферменты [2, 9]. Например, под действием гидролаз (рисунок 2В) образуются продукты гидролиза ФОС, которые можно выявить непосредственно (спектрофотометрически, электрохимически и т.д.) или опосредованно при использовании различных систем преобразования аналитического сигнала. С

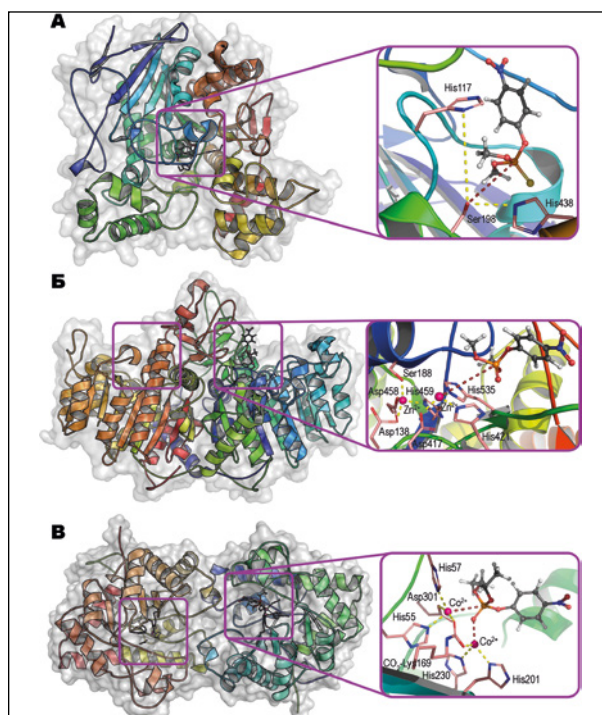


Рисунок 2 – Структура:
 А – ацетилхолинэстеразы (PDB 2WG2),
 Б – димера щелочной фосфатазы (PDB 4KJG),
 В – димера органофосфатгидролазы (PDB 1QW7).
 Конфигурации активных центров у данных ферментов представлены согласно [9]

целью дальнейшего улучшения аналитических характеристик самого анализа ФОС такие гидролазы могут быть скомбинированы с другими ферментами, например, с холинэстеразами, что будет обсуждаться далее.

Растворимые формы ферментов в анализе ФОС. Наиболее простой вариант для массового анализа ФОС в объектах окружающей среды – использование ферментов в растворимом виде (таблица 2).

Расширение научных знаний, в первую очередь в области биокатализа и структурной химии белков, сыграло свою роль в развитии ферментативных биочувствительных элементов. В настоящее время в качестве биочувствительных элементов в системах детекции активно используются ферменты, полученные в результате генетической модификации [32, 33, 41]. Рекомбинантные ферменты привлекают к себе внимание исследователей ввиду возможности их гибкой модификации под исходные требования и аналитические задачи. Физико-химические, в том числе каталитические, характеристики (рН-оптимум действия, субстратная специфичность действия, термостабильность и т.п.) целевого фермента могут быть изменены и улучшены путем введения отдельных точечных мутаций или даже целых

Таблица 2 – Примеры применения ферментов в растворимой форме для определения фосфорорганических пестицидов

Фермент*	Способ определения наличия в образце ФОС	Предел обнаружения** [источник]
AChE	Флуоресценция и/или оптическое поглощение родамина Б	0,1 мкг/л диазинона, 0,3 мг/л малатиона, 1 мкг/л фората (в реальных образцах: от 0,1 мкг/л, извлечение 77–109 %) [14]
	Флуоресценция наночастиц NaGdF ₄ :Yb,Tm	50 нг/л диазинона (в реальных образцах: от 0,5 мкг/л, извлечение 84–107 %) [15]
	Флуоресценция наночастиц NaYF ₄ :Yb,Er	2 нг/л МРТ (в реальных образцах: от 30 нг/л, извлечение 96–110 %) [16]
	Флуоресценция BSPOTPE@MnO ₂ /SiO ₂ NPs	1 мкг/л РХ (10 мкг/л на тест-полоске) (в реальных образцах: от 5 мкг/л, извлечение 98–104 %) [17]
	Флуоресценция углеродных QDs	14 нг/л РХ, 33 нг/л малатиона, 17 нг/л метамидофоса (в реальных образцах: от 0,3 мкг/л, извлечение 93–110 %) [18]
	Флуоресценция N,Cl-допированных углеродных QDs	30 нг/л РХ (в реальных образцах: от 1 мкг/л, извлечение 92–109 %) [19]
	Флуоресценция свидетеля (тетрафенилэтена)	8 мкг/л диметоата (в реальных образцах: от 50 мкг/л, извлечение 98–112 %) [20]
	Флуоресценция метки (FITC)	в реальных образцах: 0,6 мкг/л CPS (извлечение – н/д) [21]
	Флуоресценция метки (флуоресцеина)	1,4 мкг/л ометоата, 1 мкг/л DCP (в реальных образцах: от 5 мкг/л, извлечение 100–102 %) [22]
	Флуоресценция пары свидетелей (скополетина и 10-ацетил-феноксазин-3,7-диола)	1,6 нг/л DCP (в реальных образцах: от 5 нг/л, извлечение 92–106 %) [23]
	Оптическое поглощение grQD/AuNPs	0,7 мкг/л CPS (в реальных образцах: от 30 мкг/л, извлечение 93–105 %) [24]
	Оптическое поглощение PtNPs	20 мкг/л DCP (в реальных образцах, извлечение 85–97 %) [25]
	Оптическое поглощение продукта (индофенола)	0,8 мг/л CPS, 0,4 мг/л фоксима, 1,3 мг/л триазофоса, 1,4 мг/л метамидофоса (в реальных образцах: от 0,8 мг/кг, извлечение 75–108 %) [26]
Оптические свойства микрочастиц жидких кристаллов	1 нг/л диметоата (в реальных образцах: от 1 нг/л, извлечение – н/д); [27]	
EST2	Флуоресценция продукта (4-метилумбеллиферола)	6 мкг/л РХ (в реальных образцах: от 72 мкг/л, извлечение – н/д) [28]
OPH	Флуоресценция CdTe QDs	18 мкг/л МРТ (в реальных образцах: от 50 мг/л или мг/кг, извлечение 96–117 %) [29]
	Флуоресценция CuInS ₂ QDs	15,8 мкг/л МРТ (в реальных образцах: от 100 мкг/л или мкг/кг, извлечение 90–105 %) [30]
	Флуоресценция Mn-ZnS QDs	5 мкг/л МРТ (в реальных образцах: от 50 мкг/л, извлечение 81–99%) [31]
OPH-His ₆	Флуоресценция метки (пирина)	2 мкг/л РХ, 10 мкг/л МРТ [32]
		20 мкг/л РХ, 50 мкг/л МРТ, 50 мкг/л кумафоса (в реальных образцах: от 50 мкг/л, извлечение 90–125 %) [33]
Пероксидаза хрена	Оптическое поглощение / флуоресценция продукта	2 мг/л (UV/Vis) и 4 мкг/л (FL) глифосата [34]
Трипсин	Флуоресценция CdTe QDs	40 нг/л МРТ (в реальных образцах: от 0,2 мкг/л или мкг/кг, извлечение 95–110 %) [35]
Щелочная фосфатаза	Флуоресценция продукта (β-нафтола)	1,34 мг/л фенитротриона (в реальных образцах: от 10 мг/л, извлечение 96–100 %) [36]
	Флуоресценция продукта (аскорбиновой кислоты), конъюгированной с о-фенилендиамином	15 нг/л CPS (в реальных образцах: от 5 мкг/кг, извлечение 94–107 %) [37]
AChE в комбинации с холин-оксидазой	Флуоресценция CdTe QDs	1 мкг/л DCP (в реальных образцах: от 170 мкг/л, извлечение 97–101 %) [38]
	Флуоресценция графеновых QDs	172 мкг/л DCP, 84 мкг/л МРХ (в реальных образцах: 2 мг/л, извлечение 101–112 %) [39]
AChE в комбинации с пероксидазой хрена	Флуоресценция N-допированных углеродных QDs с 2,3-диаминофеназином	3,2 мкг/л DCP, 13 мкг/л МРТ (в реальных образцах: от 0,1 мг/кг DCP, извлечение 93–106 %; от 0,1 мг/кг МРТ, извлечение 93–106 %) [40]

Продолжение таблицы 2

Фермент*	Способ определения наличия в образце ФОС	Предел обнаружения** [источник]
His ₆ -Z-S-ORH-Z в комбинации с пероксидазой хрена	Хроноамперометрия	7,56 мг/л дихлофентиона [41]

* Используемые сокращения: AChE – ацетилхолинэстераза, BSPOTPE@MnO₂/SiO₂ NPs – покрытые 1,2-бис[4-(3-сульфатопропоксил) фенил]-1,2-дифенилэтаном и MnO₂ наночастицами наночастицы SiO₂, EST₂ – эстераза 2, FITC – флуоресцеин 5(6)-изотиоцианат, grQD/AuNPs – покрытые золотыми наночастицами графеновые квантовые точки, His₆-Z-S-ORH-Z – мутантная ОРН содержит His6-последовательность на N-конце молекулы белка, α-спиральный лейциновый домен “застежку” (аналогичный домен также расположен на C-конце) и неструктурированный глицин-богатый домен для увеличения растворимости, ОРН – органофосфатгидролаза, ОРН-His₆ – содержащая гексагистидиновую последовательность на C-конце молекулы белка ОРН, QDs – квантовые точки, пиранин – 8-гидроксипирен-1,3,6-трисульфат натрия.

** В случае испытаний на реальных образцах указан предел обнаружения или минимальная концентрация пестицидов, подвергнутая анализу, а также степень извлечения пестицидов по сравнению с референсным методом анализа (ВЭЖХ, ГХМС и т.п.). н/д – данные отсутствуют. Детектируемые соединения: CPS – хлорпирифос (О,О-диэтил-О-(3,5,6-трихлорпиримидин-2-ил) тиофосфат), DCP – дихлофос (О,О-диметил-О-(2,2-дихлорвинил) фосфат), МРТ – метилпаратион (О,О-диметил-О-(4-нитрофенил) тиофосфат), МРХ – метилпараоксон (О,О-диметил-О-(4-нитрофенил) фосфат), РХ – параоксон (О,О-диэтил-О-(4-нитрофенил) фосфат), глифосат (N-(фосфонометил)-глицин), диазинон (О,О-диэтил-О-(2-изопропил-6-метилпиримидин-4-ил) тиофосфат), диметоат (О,О-диметил-S-[2-(метиламино)-2-оксоэтил] дитиофосфат), дихлофентион (О,О-диэтил-О-(2,4-дихлорфенил) тиофосфат), кумафос (О,О-диэтил-О-(3-хлор-4-метил-2-оксо-2Н-хромен-7-ил) тиофосфат), малатион (О,О-диметил-S-(1,2-дикарбэтоксизтил) дитиофосфат), метамидофос (О,С-диметил фосфорамидтиоат), ометоат (О,О-диметил-S-(метилкарбамоилметил) тиофосфат), триазофос (О,О-диэтил О-(1-фенил-1Н-1,2,4-триазол-3-ил) тиофосфат), фенитротион (О,О-диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил) тиофосфат), фоксим (О,О-диэтил-О-(α-циано-бензильденамино) тиофосфат), форат (О,О-диэтил-S-[[этилсульфанил)метил] дитиофосфат).

дополнительных аминокислотных последовательностей на N- или C-конец молекулы белка [32, 33, 41]. Последнее значительно упрощает процедуру выделения и очистки таких ферментов за счет использования аффинной препаративной хроматографии и, тем самым, снижает трудоемкость процесса получения аналитических систем на основе рекомбинантных ферментов и их стоимость.

Для регистрации аналитического сигнала при определении ФОС возможно использование разных методов, но в силу простоты проведения самого анализа предпочтение отдается оптическим методам, наиболее чувствительным из которых является флуоресцентный (см. таблицу 2). Для этого во многих современных аналитических системах применяются флуоресцирующие субстраты, либо субстраты, которые под действием ферментов превращаются во флуоресцирующие продукты, либо ферменты, содержащие специально введенные флуоресцирующие метки. Растущую популярность в таких биоаналитических системах демонстрирует привлечение нанообъектов и, в частности, квантовых точек² [15–19, 24, 25, 29–31, 35, 38–40]. Чувствительность определения ФОС в реальных образцах может существенно увеличиваться (на 2–3 порядка, вплоть

до нг/л) [15, 16, 18, 35] по сравнению с аналогичными системами, не использующими данный подход. Такая чувствительность уже достаточна, чтобы аналитические системы были пригодны для определения ФОС в полном соответствии с предъявляемыми требованиями к их максимально допустимому содержанию в тестируемых объектах (см. таблицу 1), и чтобы они были конкурентоспособными в ряду с другими, неферментными аналитическими методами определения ФОС.

Многие рассматриваемые ферментные биоаналитические системы не могут дискриминировать между разными соединениями, поэтому требуется разработка особых процедур (пробоподготовка, схема проведения анализа и т.д.) для нивелирования этого недостатка. Тем не менее, уже сейчас применение таких аналитических систем возможно для экспресс-тестирования образцов *in situ* для группового анализа наличия токсикантов.

Электрохимический метод вкупе с растворимыми ферментами дает менее приемлемые результаты в сравнении с оптическими методами определения ФОС и, в частности, с флуоресцентными [41]. Невысокая чувствительность анализа вместе со сложной методической реализацией не обеспечивают создание экс-

² Квантовая точка – это наноразмерная частица полупроводникового материала, которая обладает флуоресценцией при облучении светом или под действием электрического тока, спектр которой зависит не только от состава материала и его микроокружения, но и от геометрических свойств частиц (так называемые квантовые эффекты).

Таблица 3 – Примеры биосенсоров на основе иммобилизованных ферментов, применяемых для определения разных пестицидов

Фермент*	Способ иммобилизации	Способ определения пестицидов и предел обнаружения**	Остаточная активность (условия испытаний) [источник]
<i>Физическая иммобилизация</i>			
AChE	Коммерчески доступный электрод (адсорбция на платиновом электроде)	Амперометрический, 33,5 мкг/л СРО (в реальных образцах: 33,5 мкг/л, извлечение – н/д)	90 % (10 измерений) [42]
	Адсорбция на композите PB@CS/AuNPs@βCD/RGO/GCE ⁶⁾	Амперометрический, 4,14 нг/л малатиона	92 % (28 сут хранения) [43]
	Адсорбция на композите PANI@HCNSs/GCE	Квадратновольтная вольтамперометрия, 160 нг/л малатиона (в реальных образцах: от 1 мкг/л, извлечение 98–111 %)	96 % (15 сут хранения) [44]
	Адсорбция на композите NF-Fe ₂ O ₃ @C/CPE и покрытие нафионом	ДИВА, 3,2 пг/л РХ (в реальных образцах: от 0,5 нг/л, извлечение 99–104 %)	93 % (14 сут хранения) [45]
	Адсорбция на композите AuNRs/GCE или Au@AgNRs/GCE	Хроноамперометрический, 0,19 мкг/л РХ, 0,89 мкг/л диметоата (в реальных образцах: от 0,28 мкг/л, извлечение 96–100 %)	93 % (30 сут хранения) [46]
	Адсорбция на композите PEDOT-MWCNTs/FTO	ДИВА, 0,33 пг/л малатиона (в реальных образцах: от 0,33 пг/л, извлечение 96–98 %)	89 % (30 сут хранения) [47]
	Адсорбция на композите FePP@CPTES-MWCNTs/GCE	ДИВА, 7 нг/л монокротофоса (в реальных образцах: от 220 нг/л, извлечение 89–104 %)	50 % (49 сут хранения) [48]
	Адсорбция на пленку хитозана на композите MWCNTs/DCHP/SPE	Циклическая вольтамперометрия, 50 нг/л РХ (в реальных образцах: 100 мкг/л, извлечение 88–102 %)	82 % (30 сут хранения) [49]
	Адсорбция на MWCNTs/GCE	Циклическая вольтамперометрия, 27 нг/л РХ (в реальных образцах: от 1,4 мкг/л, извлечение 97–104 %)	54 % (9 измерений в течение 32 сут) [50]
	Адсорбция на композите Ce/Uio-66@MWCNTs/GCE	Амперометрический, 1,1 нг/л РХ (в реальных образцах: от 2,8 мкг/л, извлечение 95–102 %)	85 % (20 сут хранения) [51]
	Адсорбция на композите CNTs-NH ₂ /AgNPs@N-F-MoS ₂ /GCE	ДИВА, 1 нг/л CPS, 50 пг/л монокротофоса (в реальных образцах: от 1,8 мкг/л, извлечение 95–104 %)	93 % (30 сут хранения) [52]
	Включение в пленку хитозана на композите Pd@AuNRs/GCE и покрытие нафионом	ДИВА, 1 нг/л РХ (в реальных образцах: от 14 нг/л, извлечение 99–105 %)	80% (30 сут хранения) [53]
	Включение в пленку хитозана на композите AgNPs@TiC/GCE	ДИВА, 1,1 пг/л малатиона (в реальных образцах: от 3,3 пг/л, извлечение 87–112 %)	87 % (30 сут хранения) [54]
	Включение в пленку хитозана на композите Pd@CuNWs/GCE	ДИВА, 1,5 нг/л малатиона (в реальных образцах: 200 нг/л, извлечение 99–114 %)	91 % (30 сут хранения) [55]
	Включение в пленку хитозана на композите CoNiB/GCE и покрытие нафионом	ДИВА, 1 нг/л CPS (в реальных образцах: от 10,5 нг/л, извлечение 96–105 %)	85 % (20 сут хранения) [56]
Включение в криоструктурат CdTe QDs	Флуоресцентный, 0,33 нг/л РХ, 0,27 нг/л РТ, 2,6 нг/л DCP (в реальных образцах: от 1,1 мкг/л, извлечение 99–109 %)	н/д [57]	
BChE	Адсорбция на композит рNIPAM-co-DMAPMA/SPE-MnO ₂	Амперометрический, 2,7 нг/л СРО, 1,7 нг/л диазинон-оксона	65 % (45 сут хранения) [58]
AChE или BChE	Адсорбция на целлюлозную или стеклянную нановолокнистую подложку	Колориметрический, 0,1 мг/л диэтилхлорфосфата	75–88 % (10 сут при 60°C) [59]

Продолжение таблицы 3

Фермент*	Способ иммобилизации	Способ определения пестицидов и предел обнаружения**	Остаточная активность (условия испытаний) [источник]
EST2	Адсорбция на нитроцеллюлозной мембране	Колориметрический, 2,75 мг/л РХ (в реальных образцах с растворимым ферментом: от 2,75 мг/л, извлечение – н/д)	100 % (60 сут хранения) [60]
MPH	Адсорбция на композите Fe ₃ O ₄ /AuNPs/SPE	Квадратновольтная вольтамперометрия, 0,1 мкг/л МРТ	80 % (30 сут хранения) [61]
MPH-GST	Ад(б)сорбция на/в мембране из PVDF (Immobilon™-PSQ)	Колориметрический, 1 мг/л МРТ (без колориметра, в реальных образцах: от 10 мг/л, извлечение 75–93 %)	80 % (84 сут хранения), 93 % (6 измерений) [62]
OPH	Включение в пленку нафiona на NPGPD-co-UDMA	Квадратновольтная вольтамперометрия, 1 мг/л МРХ (в реальных образцах: от 10 мг/л, извлечение 84–93 %)	100 % (12 измерений) [63]
His6-OPH	Адсорбция на пленке N@RGO	Амперометрический, 37,7 мкг/л РХ	90 % (100 измерений)[64]
	Включение в пленку нафiona на композите MC/CB/GCE	Амперометрический, 33 мкг/л РХ	н/д [65]
Конъюгат OPH и пиранина	Адсорбция на AgNPs, покрытых силикагелем	Флуоресцентный, 1 мкг/л РХ	н/д [66]
Разные модификации AChE	Включение в пленку ковалентно сшитого поливинилового спирта на SPE	Амперометрический, 1,7 нг/л СРО, 68 нг/л малаоксона (в реальных образцах, совместно: от 33,5 нг/л, извлечение 82–140 %)	100 % (20 измерений) [67]
		Амперометрический, 37 нг/л СРО, 0,31 мкг/л CFV, 64 нг/л метилазинфос-оксона (в реальных образцах, совместно: от 30 нг/л, извлечение 92–111 %)	н/д [68]
	Включение в пленку композита поливинилового спирта с наночастицами Fe-Ni на SPE	Амперометрический, 32 нг/л фосмета (в реальных образцах: от 32 мкг/л, извлечение 96%)	100 % (30 сут хранения) [69]
AChE в комбинации с холин-оксидазой	Включение в Cu ₃ (PO ₄) ₂ «наночветы»	Колориметрический, 10 нг/л РХ или 0,5 мг/л невооруженным глазом (в реальных образцах: от 5 мкг/л, извлечение 83–112 %)	70 % (5 измерений) [70]
AChE в комбинации с холин-оксидазой и пероксидазой хрена	Адсорбция на целлюлозной бумаге	Хемилюминесцентный, 14,5 мг/л хлорпирифос-метила (в реальных образцах: от 194 мг/л, извлечение 92–99 %)	40 и 80 % (при хранении при 20 и 4°С в течение 1–2 недель соответственно) [71]
<i>Химическая иммобилизация</i>			
AChE	Ковалентная сшивка с помощью EDC/NHS с золотой подложкой на пьезоэлектрическом осцилляторе AlN	Изменение частоты осцилляции у резонатора, 11,8 нг/л РХ	н/д [72]
	Ковалентная сшивка с помощью EDC/NHS с золотой подложкой на пьезоэлектрическом осцилляторе ZnO	Изменение частоты осцилляции у резонатора, 4,95 нг/л РХ	86 % (15 сут хранения) [73]
	Ковалентная сшивка с помощью Sulfo-LC-SPDP с золотой подложкой на пьезоэлектрическом осцилляторе AlN	Изменение частоты осцилляции у резонатора, 14,6 нг/л РХ (в реальных образцах: от 1,4 мкг/л, извлечение 91–109 %)	91 % (10 сут хранения) [74]
	Ковалентная сшивка с помощью EDC/NHS с карбоксилированным хитозаном на композите AgNC/RGO/GCE	ДИВА, 24,2 нг/л фоксима	92 % (30 сут хранения) [75]

Продолжение таблицы 3

Фермент*	Способ иммобилизации	Способ определения пестицидов и предел обнаружения**	Остаточная активность (условия испытаний) [источник]
AChE	Ковалентная сшивка с помощью эпихлоргидрина с хитозаном на поверхности целлюлозной бумаги	Колориметрический, 200 мг/л CPS, 10 мг/л диазинона, 4 мг/л фенамифоса, 500 мг/л малатиона, 25 мг/л профенофоса, 50 мг/л темефоса	н/д [76]
	Ковалентная сшивка с помощью EDC/NHS с PAAM/2D PSPC	Светорассеяние, 0,02 пг/л диптерекса	н/д [77]
		Светорассеяние, 0,01 пг/л зарина	н/д [78]
MPH	Ковалентная сшивка с помощью EDC/NHS с AuNPs на GCE, покрытого PEG	Амперометрический, 70 нг/л MPT (в реальных образцах: 20 мкг/л, извлечение 93-107 %)	90 % (70 сут хранения) [79]
OPH	Ковалентная сшивка с помощью DSC с пористым силикагелем и покрытие PDMAEMA	Измерение эффективной оптической толщины, 9,9 мг/л MPX	н/д [80]
	Ковалентная сшивка с помощью глутарового альдегида с хитозаном на GCE	Амперометрический, 0,55 мг/л PX, PT или MPT	50 % (1 сут хранения) [81]
His ₆ -OPH	Ковалентная сшивка с помощью DCC/HDA с UiO-66-NH ₂	Флуоресцентный, 10 мкг/л MPT (в реальных образцах: от 1 мг/л, извлечение 95-105 %)	80 % (60 сут хранения), 70 % (8 измерений) [82]
	Ковалентная сшивка с помощью EDC/sNHS с BTC и включение в Tb-BTC	Колориметрический, 0,6 мкг/л MPT	65 % (60 сут хранения), 65 % (5 измерений) [83]
OPAA	Ковалентная сшивка с помощью глутарового альдегида с SPE	Фторидчувствительный электрод, 18 мг/л DFP	65 % (12 сут хранения) [84]
Липаза	Ковалентная сшивка с помощью глутарового альдегида с PAN/AuNPs/Au	Кондуктометрический, 60 мкг/л диазинона, 26 мкг/л MPT, 25 мкг/л MPX (в реальных образцах: от 1,5 мг/л, извлечение 67-86 %)	55 % (30 сут хранения) [85]
Параоксоназа 1	Ковалентная сшивка с помощью глутарового альдегида с 0,2-мм медной решеткой для TEM и формирование жидкого кристалла	Оптическое пропускание, 0,28 мг/л PX	н/д [86]
Разные модификации AChE	Ковалентная сшивка с композитной нановолокнистой мембраной хитозана с поливиниловым спиртом на SPE	Амперометрический, 61 нг/л метилпиримифоса (в реальных образцах: от 9,2 мкг/л, извлечение 96-102 %)	90 % (42 сут хранения) [87]
AChE в комбинации с OPH	Ковалентная сшивка с помощью EDC/NHS с MWCNTs и нанесение на модифицированный GCE	Амперометрический, 0,14 мг/л PX	н/д [88]
<i>Аффинная иммобилизация</i>			
His ₆ -AChE	Связывание с магнитными частицами, покрытыми IDA и заряженными ионами Ni ²⁺	Амперометрический, 14,4 нг/л CPO (в реальных образцах: 100 нг/л, извлечение 96-103 %)	100 % (11 сут хранения) [89]
Csg2-EPSPS	Связывание с полистироловой или стеклянной подложкой	Колориметрический, 8,5 мкг/л глифосата	н/д [90]

Продолжение таблицы 3

Фермент*	Способ иммобилизации	Способ определения пестицидов и предел обнаружения**	Остаточная активность (условия испытаний) [источник]
His ₆ -MPH	Связывание с агарозой, модифицированной NTA и заряженной ионами Ni ²⁺	Колориметрический, 1 мг/л МРТ	н/д [91]
His ₆ -GBP-OPH	Связывание с золотым электродом	Хроно-амперометрический, 10 нг/л РХ	н/д [92]
	Связывание с AuNPs на RGO	Амперометрический, 26,3 мкг/л РХ	н/д [93]
His ₆ -AChE в комбинации с OPH	Связывание His ₆ -AChE с магнитными частицами, покрытыми IDA и заряженными ионами Ni ²⁺ , и ковалентная иммобилизация OPH на сефарозе	Амперометрический, 4 нг/л СРО, 5 нг/л CFV (в реальных образцах: от 2 мкг/л, извлечение – н/д)	н/д [94]
Конъюгат биотина и пероксидазы хрена	Связывание биотина с стрептавидином, пришитого к SPE	Квадратновольтная вольтамперометрия, 45 нг/л глифосата (в реальных образцах: от 50 нг/л, извлечение 71–98 %)	96 % (9 измерений в течение 40 сут) [95]

* Используемые сокращения: AgNC/RGO/GCE – покрытый нанокластерами серебра восстановленный оксид графена на поверхности стеклоуглеродного электрода, AgNPs@TiC/GCE – покрытые серебряными наночастицами нанослоу карбида титана на GCE, Au@AgNRs/GCE – серебрено-золотые наноцилиндры на GCE, AuNRs/GCE – золотые наноцилиндры на GCE, BChE – бутирилхолинэстераза, BTC – бензил-1,3,5-трикарбоновая кислота, Csg2-EPSPS – гибридный фермент из гидрофобина Csg2 и 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы, Ce/Uio-66@MWCNTs/GCE – покрытые металлорганическим каркасным соединением Ce/Uio-66 мультистенные углеродные нанотрубки на GCE, CNTs-NH2/AgNPs@N-F-MoS₂/GCE – модифицированные аминоклассами углеродные нанотрубки на N,F-допированных нанолитах MoS₂ с серебряными наночастицами на поверхности GCE, CoNiB/GCE – наноструктурированный борид кобальта-никеля на GCE, DCC/HDA – N,N'-дициклогексил-карбодиимид и гексаэтилендиамин, DSC – N,N'-дисукцинимидил карбонат, EDC/NHS – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид и N-гидроксисукцинимид, Fe₃O₄/AuNPs/SPE – сшитые наночастицы железа и золота на поверхности углеродного печатного электрода, FePP@CPTES-MWCNTs/GCE – композит Fe(III)-содержащего порфирина с покрытыми 3-хлорпропил-триэтоксисилоном мультистенными углеродными нанотрубками на GCE, His₆-AChE – содержащая His₆-последовательность на N-конце молекулы белка AChE, His₆-GBP-OPH – органофосфатгидролаза с генетически введенными на N-конце золото-связывающим пептидом и His₆-последовательностью, His₆-MPH – содержащая His₆-последовательность на N-конце молекулы белка MPH, His₆-OPH – содержащая His₆-последовательность на N-конце молекулы белка OPH, IDA – иминодиуксусная кислота, MC/CB/GCE – мезопористый и технический углерод на GCE, MPH – метилпаратионгидролаза, MPH-GST – гибридный фермент из MPH и глутатион-S-трансферазы, MWCNTs/DCHP/SPE – MWCNTs и дициклогексилфталат на SPE, N@RGO – композит нафиона с RGO, NF-Fe₂O₃@C/CPE – покрытый нафионом металл-органический каркасный материал из оксида железа и углерода на поверхности углеродного электрода, NPGPD-co-UDMA – сополимер неопентилгликоль пропоксил диакрилата и уретан диметакрилата, NTA – нитрилтриуксусная кислота, OPAA – кислая органофосфатангидролаза, PB@CS/AuNPs@βCD/RGO/GCE – покрытый берлинской лазурью в сульфате хитозана и AuNPs с β-циклодекстрином RGO на GCE, PAAM/2D PSPC – полиакриламидный гель на двумерном полистирольном фотонном кристалле, PAN/AuNPs/Au – покрытые полиаллиламиноом AuNPs на поверхности золотого электрода, PANI@HCNSs/GCE – покрытые полианилином полые углеродные наносферы на GCE, Pd@AuNRs/GCE – палладиево-золотые наноцилиндры на GCE, Pd@CuNWs/GCE – палладиево-медные нанонити на GCE, PEDOT-MWCNTs/FTO – пришитый к мультистенным углеродным нанотрубкам поли(3,4-этилен-диокситиофен) на поверхности электрода в виде допированного фтором оксида олова, PEG – полиэтиленгликоль, pNIPAM-co-DMAEMA/SPE-MnO₂ – сополимер поли-N-изопропилакриламида и поли-(3-(N,N-диметиламино)-пропилметакриламида на поверхности MnO₂-модифицированного SPE, PVDF – поливинилиденфторид, PDMAEMA – поли-2-диметиламино-этил метакрилат, Sulfo-LC-SPDP – сульфосукцинимидил-6-[3-(2-пиридилтио)пропионамид]-гексаноат натрия, Tb-BTC – металл-органический каркасный материал из тербия и бензил-1,3,5-трикарбоновой кислоты, TEM – просвечивающая электронная микроскопия, Uio-66-NH₂ – металл-органический каркасный материал из циркония и аминотерфталевой кислоты, ДИВА – дифференциальная импульсная вольтамперометрия.

** В случае испытаний на реальных образцах указан предел обнаружения или минимальная концентрация пестицидов, подвергнутая анализу, а также степень их извлечения по сравнению с референсным методом анализа (ВЭЖХ, ГХМС и т.п.). н/д – данные отсутствуют. Детектируемые соединения: СРО – хлорпирифос-оксон (О,О-диэтил-О-(3,5,6-трихлорпиримидин-2-ил) фосфат), CFV – хлорфенвинфос (О,О-диэтил-О-[2-хлор-1-(2,4-дихлорфенил)винил] фосфат), DFP – О,О-диизопропил фторфосфат, РТ – паратион (О,О-диэтил О-(4-нитрофенил) тиофосфат), диазинон-оксон (О,О-диэтил-О-(2-изопропил-6-метилпиримидин-4-ил) фосфат), диптерекс (О,О-диметил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил)-фосфонат), зарин (О-изопропил-метилфосфоната фторангидрид), малаоксон (О,О-диметил-S-(1,2-дихлорэтоксидил) тиофосфат), метилазинфос-оксон (О,О-диметил-S-[(4-оксо-1,2,3-бензотриазин-3(4Н)-ил)метил] тиофосфат), метилпиримифос (О,О-диметил-О-(2-дизетиламино-6-метилпиримидин-4-ил) тиофосфат), монокротофос (О,О-диметил-О-[(E)-1-метил-2-(метилкарбамоил)винил] фосфат), профенофос (О-(4-бром-2-хлорфенил)-О-этил-S-пропил тиофосфат), темефос (О,О,О',О'-тетраметил О,О'-сульфанедиил-бис(1,4-фенилен)] бис-тиофосфат), фенамифос (О-этил-О-[3-метил-4-(метилтио)фенил]-1-метилэтил)фосфороамидат), фосмет (О,О-диметил-S-(N-фталимидометил)дитиофосфат).

пресс-тестов, поэтому данное направление на основе растворимых форм ферментов в настоящее время практически не развивается. И эта ситуация в корне отличается от той, что наблюдается в развитии биоаналитических систем на основе иммобилизованных форм ферментов, для которых электрохимические методы позволяют получать действительно впечатляющие результаты.

Иммобилизованные ферменты в биосенсорных системах для определения ФОС. Более технологичным решением, приближенным к практическому внедрению, можно считать биоаналитические системы, использующие иммобилизованные ферменты [96] (таблица 3).

При физическом методе иммобилизации ферментов производится их фиксация на/в какой-либо подложке за счет нековалентных взаимодействий, например, при адсорбции на поверхности носителя, абсорбции в порах носителя, инкапсулировании [42–71] и т.д. К преимуществам данного способа следует отнести простоту получения и регенерации биочувствительных элементов. Недостатком же является их сниженная стабильность, которая обусловлена возможностью десорбции фермента. Как следствие этого, наблюдается постепенное снижение аналитического сигнала, которое должно специально контролироваться и учитываться при анализе ФОС, особенно при их определении в реальных образцах.

При химическом методе иммобилизации фермент прочно закрепляется на/в носителе за счет ковалентного связывания [72–88], а потому свободная десорбция невозможна или существенно снижена. В качестве сшивающих агентов могут применяться различные химические вещества, реакционноспособные к взаимодействию с поверхностными функциональными группами белка. Чаще всего используется глутаровый альдегид, реагирующий с аминогруппами, и карбодимид, реагирующий с карбоксильными группами аминокислотных остатков в белке.

Иммобилизация за счет образования дисульфидных связей применяется крайне редко, так как ферментов с поверхностными аминокислотными остатками цистеина мало, а реакции с внутренними тиольными группами сопровождаются нарушением структуры белка и, как следствие, потерей им каталитической активности. Хотя при химической иммобилизации и наблюдается существенная стабилизация ферментативной активности иммобилизуемого фермента против инактивирующего действия различных факторов, одновременно с этим происходит значительная (от 30 до 90 %) потеря исходной активности за счет неселективного действия сшивающих агентов. Поэ-

тому применяются различные ухищрения с целью компенсации этого недостатка и увеличения эффективности действия создаваемых биочувствительных элементов.

При металл-хелатирующей иммобилизации ферментов удается избежать большинства перечисленных недостатков физических и химических методов [89–95]. Так, по сравнению с физическим методом иммобилизации увеличивается прочность связывания иммобилизуемого фермента с носителем за счет специфического взаимодействия аминокислотных остатков белка с носителем, содержащим хелатирующие функциональные группы и заряженным определенными ионами металла. При этом удается избежать увеличенных потерь ферментативной активности, как в случае ковалентного связывания белка с носителем в результате действия сшивающих агентов. В целом, для аффинной иммобилизации характерны простота и эффективность. Однако для нее требуется предварительная генетическая модификация фермента путем введения в него дополнительной аминокислотной последовательности, специфично взаимодействующей с аффинным носителем. Это требует дополнительных исследований и/или трудозатрат. Вместе с этим, такой подход позволяет достаточно гибко управлять свойствами получаемого биочувствительного элемента и направленно конструировать его под конкретные практические задачи за счет введения разных генетических модификаций в один и тот же фермент.

В качестве носителей для иммобилизации могут быть использованы самые разнообразные материалы неорганической и органической природы. В последнее время широчайшее распространение в качестве основы для создаваемых ферментных биочувствительных элементов получили композитные материалы и, в том числе, наноматериалы [43–57, 61, 64–66, 69, 70, 75, 79, 85, 88, 93]. Причем последние позволяют значительно улучшить аналитические характеристики разрабатываемых биоаналитических систем (с пределом обнаружения вплоть до пг/л [45, 47, 52, 54]) и создать новые возможности для детекции ФОС.

Благодаря ко-иммобилизации одновременно нескольких ферментов в одном биочувствительном элементе стало возможным конструирование сложных многокомпонентных (мультиферментных) биоаналитических систем с требуемыми характеристиками. В этом случае в биосенсорах могут объединяться ферменты различной природы или разные модификации одного и того же фермента. В результате становится возможным задействовать большее число различных ферментов, а не только те,

которые взаимодействуют непосредственно с ФОС. Кроме того, зачастую таким путем может быть исключено влияние мешающих определению соединений и/или условий, особенно в случае анализа ФОС в реальных объектах. Тем самым объединение в одной биоаналитической системе разных ферментов позволяет достигать таких характеристик самого анализа, которые не доступны при использовании этих компонентов по отдельности. Более того, при этом становится возможным проводить дискриминационный анализ разных соединений, присутствующих одновременно в смеси и в анализе, в том числе с привлечением искусственных нейронных сетей и хемометрики [97].

Детектирование сигнала биоаналитических элементов, полученных в виде иммобилизованных ферментов, осуществляют преимущественно оптическими и электрохимическими методами, которые обеспечивают сравнимую чувствительность в модельных системах (вплоть до нг/л), но при анализе ФОС в реальных образцах электрохимические методы демонстрируют определенные преимущества в определяемых концентрациях фосфорорганических пестицидов. Вместе с этим оптические и электрохимические методы полностью удовлетворяют запросам практики (см. таблицу 1), и их использование позволяет решать имеющиеся аналитические задачи.

Сегодня большой интерес у разработчиков биосенсоров вызывают «безреагентные» тест-системы, например, на основе микрофлюидных чипов [57] или стрипов (тест-полосок) [59]. Биочувствительные элементы обычно получают путем ко-иммобилизации субстрата и/или «свидетеля» реакции фермента и ФОС с ферментом (или ферментами) в разных зонах применяемой подложки. Движущийся фронт аналита приводит к смешиванию реагентов и генерации аналитического сигнала, который может фиксироваться портативным прибором (например, смартфоном) или даже невооруженным глазом. Современным развитием этого направления исследований стало появление, так называемых, «мобильных, портативных» миниатюрных чипов [98], которые могут наклеиваться на одежду или даже прямо на кожу. В настоящее время такие стрип-биосенсоры уже коммерчески доступны (таблица 4).

Ферменты, применяемые как биочувствительные элементы для определения ФОС, без выделения их из клеток. Ферменты, которые используются при разработке биосенсоров, могут находиться не только в растворе или в искусственном иммобилизованном состоянии, но и в составе клеток микроорганизмов. С одной стороны, при таком подходе не требуется проведение отдельной проце-

дуры выделения ферментов, находящихся внутри или на поверхности клеток (живых и неживых, но сохраняющих свою целостность). Это обеспечивает поддержание природного микроокружения ферментов и, как следствие, их активное и стабильное биокаталитическое состояние. С другой стороны, возникают дополнительные диффузионные затруднения для массообменных процессов в ходе анализа ФОС, что может приводить к существенному снижению чувствительности биосенсоров по сравнению с растворимыми или иммобилизованными формами ферментами.

Для усиления первичного аналитического сигнала в рекомбинантных клетках микроорганизмов часто дополнительно повышают уровень биосинтеза фермента, необходимого для детекции ФОС [99–106]. В то же время методы генетической инженерии позволяют точно управлять локализацией фермента в клетке в клеточной стенке, периплазме, цитоплазме после экспрессии соответствующего гена. В результате максимального приближения местоположения ферментов внутри клетки к поверхности клеток [100–104] удается увеличить эффективную каталитическую активность за счет уменьшения массообменных затруднений, что увеличивает чувствительность определения ФОС и увеличивает скорость получения пропорционального отклика. Необходимо, однако, отметить, что из-за того, что количество целевого рекомбинантного фермента типично не может превышать нескольких процентов от суммы всех синтезируемых клеточных белков, этот метод повышения уровня каталитической активности имеет определенные ограничения.

Другим методом уменьшения диффузионных ограничений для внутриклеточных ферментов, применяемых для определения ФОС, является использование специальных химических пермеабиллизаторов, увеличивающих проницаемость клеточной стенки. Вместе с облегченной диффузией ФОС извне также усиливается и поток клеточного содержимого наружу вплоть до потери клетками их целостности при любых механических воздействиях (например, при перемешивании, промывке буферными растворами и др.). Чтобы избежать такого нарушения целостности, частично пермеабиллизованные клетки обрабатывают различными сшивающими агентами, покрывают гелевыми матрицами, включают в полимерные носители и т.д., то есть применяют различные методы иммобилизации и стабилизации клеток [99, 103]. Для регистрации аналитического сигнала от ферментов, находящихся внутри подобных клеток, применяют те же самые оптические, электрохимические и прочие указанные выше методы, позволяющие осуществлять детекцию

Таблица 4 – Примеры коммерчески доступных ферментных препаратов для определения пестицидов с оптической регистрацией сигнала.*Все представленные образцы в качестве основы используют разные формы AChE*

Название	Производитель	Предел обнаружения	Интернет сайт*
aCella™-AChE	Cell Technology	1,6 мг/л малатиона	www.celltechnology.com
AgriChem™	Institute of Microchemical Technology	0,4 мкг/л CPS, 1 мкг/л PT, 0,8 мкг/л диазинона**	www.i-mt.co.jp/en/products/agrichem
Automatic Pesticide Meter (G9 SAR)	Purnamalab	-	www.purnamalab.com
CideLite	Charm Sciences	0,3 мкг/л CPS, 0,1 мкг/л кумафоса, 10 мкг/л малатиона, 0,1 мкг/л МРТ**	www.charm.com
MAIA Pesticide MultiTest	Liofilchem	10 мкг/кг РХ (в реальных образцах)	www.liofilchem.net
NIDS ® ACE III-C	ANP Health	2 мг/л фенамифоса	www.anphealth.com
Organophosphate/ Carbamate (OP/C) Assay Kit	Abraxis	0,5 мкг/л CPS, 1,2 мкг/л малатиона, 0,6 мкг/л диазинона**	www.abraxis.eurofins-technologies.com
Pesticide Detection Cards	RenekaBio	0,3 мг/л DCP, 1,7 мг/л PT, 2 мг/л малатиона**	www.renekabio.com

*Дата запроса информации в Интернете – 13.01.2021 г.

**Приведены лишь некоторые характеристики. Чтобы ознакомиться с другими параметрами (для остальных соединений), рекомендуется обращаться к инструкции набора реагентов или на сайт производителя.

ФОС [99–106]. В зависимости от комбинации разных функциональных частей биосенсора могут достигаться самые разные уровни определения ФОС (вплоть до пг/л [104, 106]).

На уровне целых клеток также возможен биосинтез и использование так называемых рекомбинантных фьюжен-белков, представляющих собой комбинации ферментов, участвующих в гидролизе ФОС, с другими белками, например, с зеленым флуоресцентным белком [102], которые ко-экспрессируются на поверхности клеток, и при этом выступают в роли «свидетеля» происходящих ферментативных реакций с ФОС. То есть партнер целевого фермента реагирует на появление продуктов реакции ФОС с основным ферментом. Это, в свою очередь, позволяет расширить спектр определяемых соединений (продуктов деструкции ФОС) и используемых для этого объектов (белков или «партнеров-свидетелей» небелковой природы).

Заключение

Ферментные биоаналитические системы, предназначенные для определения ФОС, представляются достаточно развитым направлением науки, достигшим в своем развитии появления готовых коммерческих продуктов (см. таблицу 4). Оптические, электрохимические, микрохимические и др. методы могут применяться и применяются в настоящее время для преобразования аналитического сигнала ферментных биочувствительных элементов в доступный для регистрации и интерпретации

результат. За счет комбинации различных ферментов и регистрирующих систем создаются биосенсоры с требуемой чувствительностью, производительностью и стоимостью. Последний критерий представляется наиболее важным для широкого распространения и практического использования ферментных биосенсоров (см. таблицу 4). Именно этот показатель является ключевым для массового мониторинга ФОС, например, в объектах окружающей среды, в составе сельскохозяйственной продукции и т.д. Ожидается, что в ближайшее время из списка существующих разработок, которые полностью удовлетворяют современным требованиям к чувствительности анализа ФОС в реальных объектах (см. таблицу 1), для практического применения будут выбраны те, что отличаются исключительной простотой использования обычными потребителями.

Дальнейшее улучшение пределов обнаружения ФОС может быть достигнуто за счет использования разнообразных нанообъектов в купе с современными методами регистрации сигнала, например, с наномеханическими детекторами и преобразователями сигнала [107]. Это обеспечивает чувствительность анализа ФОС вплоть до пг/л, но, видимо, еще не является пределом в детекции ФОС.

Ввиду простоты использования для обычных пользователей большой интерес наблюдается к «безреагентным» системам. Значительный прогресс в этой области стал основой для производства большого числа коммерчески доступных «стрипов» (тест-полосок) для экс-

прессного определения ФОС (см. таблицу 4). При таком техническом решении для специфического и чувствительного обнаружения ФОС возможна не только оптическая, но и электрохимическая детекция ФОС [108].

Современные запросы стимулируют бурное развитие портативных и, особенно, «мобильных, портативных» биосенсоров, закрепляемых на различных поверхностях и, в том числе, на одежде [109]. И хотя пока очень малое число исследований посвящено именно ферментным биочувствительным элементам в составе таких биосенсоров на ФОС [97], очевидно, что значительный прогресс в данной области можно ожидать в ближайшие годы. Прогресс, достигнутый в области создания аффинных аминокислотных последовательностей [110] в перспективе позволит создавать ферментные биосенсоры на любой поверхности. Причем такое связывание рекомбинантных белков будет не только прочным, но и специфичным, как и любое другое аффинное взаимодействие. В свою очередь, это

позволит расширить число ферментных биосенсоров, адаптированных к классическим хроматографическим методам определения [111], открывая новую нишу возможного использования этих ферментов.

Пока использование ферментных биосенсоров для определения ФОС в объектах окружающей среды остается незначительным. Наиболее предпочтительными областями применения ферментных биосенсоров по-прежнему являются сырье и продукты сельского хозяйства и/или пищевой промышленности, изделия легкой промышленности, водные и почвенные ресурсы и т.д. Большой потенциал у ферментных биосенсоров может быть раскрыт в биомедицине [112] и, в том числе, в минимально инвазивных методах контроля [62]. Согласно проведенному анализу, эта область знаний, очевидно, находится в динамическом развитии, которое основано на активном комбинировании современных достижений и опыта специалистов из разных научных направлений.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды» (АААА-А21-121011290089-4).

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Список источников/References

1. Лягин И.В., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферментные биосенсоры для определения пестицидов // Успехи химии. 2017. Т. 86. С. 339–355. <https://doi.org/10.1070/RCR4678>
2. Lyagin I.V., Efremenko E.N., Varfolomeev S.D. Enzymatic biosensors for determination of pesticides // Russ. Chem. Rev. 2017. V. 86. P. 339–355. <https://doi.org/10.1070/RCR4678> (in Russian).
3. Фосфорорганические нейротоксины: монография / Под ред. Варфоломеева С.Д., Ефременко Е.Н. М.: РИОР, 2020 380 с. <https://doi.org/10.29039/02026-5>
4. Organophosphorus Neurotoxins: monograph / Eds. Varfolomeev S.D., Efremenko E.N. Moscow: RIOR, 2020. 380 p. <https://doi.org/10.29039/02026-5> (in Russian).
5. Samsidar A., Siddiquee S., Md Shaarani S. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs // Trends Food Sci. Technol. 2018. V. 71. P. 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.011>
6. Rotariu L., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N., Bala C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants trends and perspective // Trac-Trends Anal. Chem. 2016. V. 79. P. 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017>
7. Díaz-González M., Gutiérrez-Capitán M., Niu P., et al. Electrochemical devices for the detection of priority pollutants listed in the EU water framework directive // Trac-Trends Anal. Chem. 2016. V. 77. P. 186–202. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.023>
8. Songa E.A., Okonkwo J.O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review // Talanta. 2016. V. 155. P. 289–304. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.046>
9. Amine A., Arduini F., Moscone D., Paleschi G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 76. P. 180–194. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.010>

8. Narendaran S.T., Meyyanathan S.N., Babu B. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques // *Food Res. Int.* 2020. V. 133. P. e109141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109141>
9. Lyagin I., Efremenko E. Enzymes, reacting with organophosphorus compounds as detoxifiers: diversity and functions // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. e1761. <https://doi.org/10.3390/ijms22041761>
10. Hua X., Eremin S.A., Liu F., Wang M. Antibody developments and immunoassays for organophosphorus chemicals: a review // *Curr. Org. Chem.* 2017. V. 21. P. 2640–2652. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170428122718>
11. Duan N., Wu S., Dai S. et al. Advances in aptasensors for the detection of food contaminants // *Analyst.* 2016. V. 141. P. 3942–3961. <https://doi.org/10.1039/c6an00952b>
12. Mahmoudpour M., Torbati M., Mousavi M.-M. et al. Nanomaterial-based molecularly imprinted polymers for pesticides detection: recent trends and future prospects // *TrAC-Trends Anal. Chem.* 2020. V. 129. P. e115943. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115943>
13. Mangas I., Estevez J., Vilanova E., França T.C. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases // *Toxicology.* 2017. V. 376. P. 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.006>
14. Liu D., Chen W., Wei J. et al. A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 4185–4191. <https://doi.org/10.1021/ac300545p>
15. Wang P., Li H., Hassan M.M. et al. Fabricating an acetylcholinesterase modulated UCNPs-Cu²⁺ fluorescence biosensor for ultrasensitive detection of organophosphorus pesticides-diazinon in food // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. P. 4071–4079. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07201>
16. Long Q., Li H., Zhang Y., Yao S. Upconversion nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer assay for organophosphorus pesticides // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 68. P. 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.046>
17. Wu X., Wang P., Hou S. et al. Fluorescence sensor for facile and visual detection of organophosphorus pesticides using AIE fluorogens-SiO₂-MnO₂ sandwich nanocomposites // *Talanta.* 2019. V. 198. P. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.082>
18. Korram J., Dewangan L., Nagwanshi R. et al. A carbon quantum dot-gold nanoparticles system as a probe for the inhibition and reactivation of acetylcholinesterase // *New J. Chem.* 2019. V. 43. P. 6874–6882. <https://doi.org/10.1039/C9NJ00555B>
19. Yang M., Liu M., Wu Z. et al. Carbon dots co-doped with nitrogen and chlorine for "off-on" fluorometric determination of the activity of acetylcholinesterase and for quantification of organophosphate pesticides // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. e585. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3715-z>
20. Cai Y., Fang J., Wang B. et al. A signal-on detection of organophosphorus pesticides by fluorescent probe based on aggregation-induced emission // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2019. V. 292. P. 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.123>
21. Silletti S., Rodio G., Pezzotti G. et al. An optical biosensor based on a multiarray of enzymes for monitoring a large set of chemical classes in milk // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2015. V. 215. P. 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.03.092>
22. Huang N., Qin Y., Li M. et al. A sensitive fluorescence assay of organophosphorus pesticides using acetylcholinesterase and copper-catalyzed click chemistry // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 3436–3441. <https://doi.org/10.1039/C9AN00260J>
23. Yao T., Liu A., Liu Y. et al. Ratiometric fluorescence sensor for organophosphorus pesticide detection based on opposite responses of two fluorescence reagents to MnO₂ nanosheets // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 145. P. e111705. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111705>
24. Chungchai W., Amatongchai M., Meelapsom R. et al. Development of a novel three-dimensional microfluidic paper-based analytical device (3D-μPAD) for chlorpyrifos detection using graphene quantum-dot capped gold nanocomposite for colorimetric assay // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2020. V. 100. P. 1160–1178. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1650921>
25. Cao J., Wang M., She Y. et al. Rapid colorimetric determination of the pesticides carbofuran and dichlorvos by exploiting their inhibitory effect on the aggregation of peroxidase-mimicking platinum nanoparticles // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. e390. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3485-7>
26. Jin L., Hao Z., Zheng Q. et al. A facile microfluidic paper-based analytical device for acetylcholinesterase inhibition assay utilizing organic solvent extraction in rapid detection of pesticide residues in food // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1100. P. 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.067>
27. Duan R., Hao X., Li Y., Li H. Detection of acetylcholinesterase and its inhibitors by liquid crystal biosensor based on whispering gallery mode // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2020. V. 308. P. e127672. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127672>
28. Cetrangolo G.P., Gori C., Rusko J. et al. Determination of picomolar concentrations of paraoxon in human urine by fluorescence-based enzymatic assay // *Sensors.* 2019. V. 19. P. e4852. <https://doi.org/10.3390/s19224852>
29. Yan X., Li H., Wang X., Su X. A novel fluorescence probing strategy for the determination of parathion-methyl // *Talanta.* 2015. V. 131. P. 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.032>
30. Yan X., Li H., Yan Y., Su X. Selective detection of parathion-methyl based on near-infrared CuInS₂ quantum dots // *Food Chem.* 2015. V. 173. P. 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.152>
31. Zhang F., Liu Y., Ma P. et al. A Mn-doped ZnS quantum dots-based ratiometric fluorescence probe

- for lead ion detection and "off-on" strategy for methyl parathion detection // *Talanta*. 2019. V. 204. P. 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.071>
32. Thakur S., Kumar P., Reddy M.V. et al. Enhancement in sensitivity of fluorescence based assay for organophosphates detection by silica coated silver nanoparticles using organophosphate hydrolase // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2013. V. 178. P. 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.010>
33. Thakur S., Reddy M.V., Siddavattam D., Paul A.K. A fluorescence based assay with pyranine labeled hexa-histidine tagged organophosphorus hydrolase (OPH) for determination of organophosphates // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2012. V. 163. P. 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.024>
34. Ibarra Bouzada L.M.E., Hernández S.R., Kergaravat S.V. Glyphosate detection from commercial formulations: comparison of screening analytic methods based on enzymatic inhibition // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2021. in press. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1691176>
35. Yan X., Li H., Han X., Su X. A ratiometric fluorescent quantum dots based biosensor for organophosphorus pesticides detection by inner-filter effect // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 74. P. 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.020>
36. Diaz A.N., Sanchez F.G., Aguilar A. et al. Fast stopped-flow enzymatic sensing of fenitrothion in grapes and orange juice // *J. Food Compos. Anal.* 2015. V. 42. P. 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.005>
37. Dong J., Yang H., Li Y. et al. Fluorescence sensor for organophosphorus pesticide detection based on the alkaline phosphatase-triggered reaction // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1131. P. 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.048>
38. Meng X., Wei J., Ren X. et al. A simple and sensitive fluorescence biosensor for detection of organophosphorus pesticides using H₂O₂-sensitive quantum dots/bi-enzyme // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 47. P. 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.053>
39. Sahub C., Tuntulani T., Nhujak T., Tomapatanaget B. Effective biosensor based on graphene quantum dots via enzymatic reaction for directly photoluminescence detection of organophosphate pesticide // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2018. V. 258. P. 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.072>
40. Huang S., Yao J., Chu X. et al. One-step facile synthesis of nitrogen-doped carbon dots: a ratiometric fluorescent probe for evaluation of acetylcholinesterase activity and detection of organophosphorus pesticides in tap water and food // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. P. 11244–11255. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03624>
41. Sahin A., Dooley K., Crokek D.M. et al. A dual enzyme electrochemical assay for the detection of organophosphorus compounds using organophosphorus hydrolase and horseradish peroxidase // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2011. V. 158. P. 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.06.034>
42. Drechsel L., Schulz M., von Stetten F. et al. Electrochemical pesticide detection with AutoDip-a portable platform for automation of crude sample analyses // *Lab Chip.* 2015. V. 15. P. 704–710. <https://doi.org/10.1039/c4lc01214c>
43. Zhao H., Ji X., Wang B. et al. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles-β-cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 65. P. 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.007>
44. He L., Cui B., Liu J. et al. Novel electrochemical biosensor based on core-shell nanostructured composite of hollow carbon spheres and polyaniline for sensitively detecting malathion // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2018. V. 258. P. 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.161>
45. Wei W., Dong S., Huang G. et al. MOF-derived Fe₂O₃ nanoparticle embedded in porous carbon as electrode materials for two enzyme-based biosensors // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2018. V. 260. P. 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.207>
46. Lang Q., Han L., Hou C. et al. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide // *Talanta*. 2016. V. 156–157. P. 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.002>
47. Kaur N., Thakur H., Prabhakar N. Conducting polymer and multi-walled carbon nanotubes nanocomposites based amperometric biosensor for detection of organophosphate // *J. Electroanal. Chem.* 2016. V. 775. P. 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.05.037>
48. Zou B., Chu Y., Xia J. Monocrotophos detection with a bienzyme biosensor based on ionic-liquid-modified carbon nanotubes // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. P. 2905–2914. doi:10.1007/s00216-019-01743-z
49. Chen D., Liu Z., Fu J. et al. Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes/dicyclohexyl phthalate modified screen-printed electrode for detection of chlorpyrifos // *J. Electroanal. Chem.* 2017. V. 801. P. 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.032>
50. Thakkar J.B., Gupta S., Prabha C.R. Acetylcholine esterase enzyme doped multiwalled carbon nanotubes for the detection of organophosphorus pesticide using cyclic voltammetry // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 137. P. 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.162>
51. Mahmoudi E., Fakhri H., Hajian A. et al. High-performance electrochemical enzyme sensor for organophosphate pesticide detection using modified metal-organic framework sensing platforms // *Bioelectrochemistry.* 2019. V. 130. P. e107348. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107348>
52. Song D., Wang Y., Lu X. et al. Ag nanoparticles-decorated nitrogen-fluorine co-doped monolayer MoS₂ nanosheet for highly sensitive electrochemical sensing of organophosphorus pesticides // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2018. V. 267. P. 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.016>
53. Lu X., Tao L., Song D. et al. Bimetallic Pd@

Au nanorods based ultrasensitive acetylcholinesterase biosensor for determination of organophosphate pesticides // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2018. V. 255. P. 2575–2581. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.063>

54. Jiang Y., Zhang X., Pei L. et al. Silver nanoparticles modified two-dimensional transition metal carbides as nanocarriers to fabricate acetylcholinesterase-based electrochemical biosensor // *Chem. Eng. J.* 2018. V. 339. P. 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.111>

55. Song D., Li Y., Lu X. et al. Palladium-copper nanowires-based biosensor for the ultrasensitive detection of organophosphate pesticides // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 982. P. 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.004>

56. Lu X., Li Y., Tao L. et al. Amorphous metal boride as a novel platform for acetylcholinesterase biosensor development and detection of organophosphate pesticides // *Nanotechnology.* 2019. V. 30. e055501. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aace3f>

57. Hu T., Xu J., Ye Y. et al. Visual detection of mixed organophosphorus pesticide using QD-AChE aerogel based microfluidic arrays sensor // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 136. P. 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.036>

58. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Y., Mergel O. et al. Easy-preparable butyrylcholinesterase/microgel construct for facilitated organophosphate biosensing // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 6091–6098. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00732>

59. Matějovský L., Pitschmann V. A strip biosensor with guinea green B and fuchsin basic color indicators on a glass nanofiber carrier for the cholinesterase detection of nerve agents // *ACS Omega.* 2019. V. 4. P. 20978–20986. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02153>

60. Febbraio F., Merone L., Cetrangolo G.P. et al. Thermostable esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as biosensor for the detection of organophosphate pesticides // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 1530–1536. <https://doi.org/10.1021/ac102025z>

61. Zhao Y., Zhang W., Lin Y., Du D. The vital function of Fe₃O₄@Au nanocomposites for hydrolase biosensor design and its application in detection of methyl parathion // *Nanoscale.* 2013. V. 5. P. 1121–1126. <https://doi.org/10.1039/c2nr33107a>

62. Anh D.H., Cheunrungsikul K., Wichitwechkarn J., Surareungchai W. A colorimetric assay for determination of methyl parathion using recombinant methyl parathion hydrolase // *Biotechnol. J.* 2011. V. 6. P. 565–571. <https://doi.org/10.1002/biot.201000348>

63. Mishra R.K., Vinu Mohan A.M., Soto F. et al. A microneedle biosensor for minimally-invasive transdermal detection of nerve agents // *Analyst.* 2017. V. 142. P. 918–924. <https://doi.org/10.1039/c6an02625g>

64. Choi B.G., Park H., Park T.J. et al. Solution chemistry of self-assembled graphene nanohybrids for high-performance flexible biosensors // *ACS Nano.* 2010. V. 4. P. 2910–2918. <https://doi.org/10.1021/nn100145x>

65. Lee J.H., Park J.Y., Min K. et al. A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor

using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 1566–1570. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.013>

66. Tuteja S.K., Kukkar M., Kumar P. et al. Synthesis and characterization of silica-coated silver nanoprobe for paraoxon pesticide detection // *BioNanoScience.* 2014. V. 4. P. 149–156. <https://doi.org/10.1007/s12668-014-0129-6>

67. Mishra R.K., Alonso G.A., Istamboulie G. et al. Automated flow based biosensor for quantification of binary organophosphates mixture in milk using artificial neural network // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2015. V. 208. P. 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.011>

68. Alonso G.A., Istamboulie G., Noguer T. et al. Rapid determination of pesticide mixtures using disposable biosensors based on genetically modified enzymes and artificial neural networks // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2012. V. 164. P. 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.052>

69. El-Moghazy A.Y., Soliman E.A., Ibrahim H.Z. et al. Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly (vinyl alcohol)/Fe–Ni alloy nanocomposite for phosmet detection in olive oil // *Food Chem.* 2016. V. 203. P. 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.014>

70. Jin R., Kong D., Zhao X. et al. Tandem catalysis driven by enzymes directed hybrid nanoflowers for on-site ultrasensitive detection of organophosphorus pesticide // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 141. P. e111473. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111473>

71. Montali L., Calabretta M.M., Lopreside A. et al. Multienzyme chemiluminescent foldable biosensor for on-site detection of acetylcholinesterase inhibitors // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 162. e112232. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112232>

72. Chen D., Wang J., Xu Y. Highly sensitive lateral field excited piezoelectric film acoustic enzyme biosensor // *IEEE Sens. J.* 2013. V. 13. P. 2217–2222. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2012.2237508>

73. Chen D., Wang J., Xu Y., Zhang L. A thin film electro-acoustic enzyme biosensor allowing the detection of trace organophosphorus pesticides // *Anal. Biochem.* 2012. V. 429. P. 42–44. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.002>

74. Chen D., Wang J., Xu Y. et al. Highly sensitive detection of organophosphorus pesticides by acetylcholinesterase-coated thin film bulk acoustic resonator mass-loading sensor // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 41. P. 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.018>

75. Zhang Y., Liu H., Yang Z. et al. An acetylcholinesterase inhibition biosensor based on a reduced graphene oxide/silver nanocluster/chitosan nanocomposite for detection of organophosphorus pesticides // *Anal. Methods.* 2015. V. 7. P. 6213–6219. <https://doi.org/10.1039/C5AY01439E>

76. Badawy M.E.I., Taktak N.E.M. Design and optimization of bioactive paper immobilized with acetylcholinesterase for rapid detection of

- organophosphorus and carbamate insecticides // *Curr. Biotechnol.* 2018. V. 7. P. 392–404. <https://doi.org/10.2174/2211550108666181126121102>
77. Qi F., Lan Y., Meng Z. et al. Acetylcholinesterase-functionalized two-dimensional photonic crystals for the detection of organophosphates // *RSC Adv.* 2018. V. 8. P. 29385–29391. <https://doi.org/10.1039/C8RA04953J>
78. Qi F., Yan C., Meng Z. et al. Acetylcholinesterase-functionalized two-dimensional photonic crystal for the sensing of G-series nerve agents // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. P. 2577–2585. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01700-w>
79. Liu G., Guo W., Yin Z. Covalent fabrication of methyl parathion hydrolase on gold nanoparticles modified carbon substrates for designing a methyl parathion biosensor // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 53. P. 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.025>
80. Krepker M.A., Segal E. Dual-functionalized porous Si/hydrogel hybrid for label-free biosensing of organophosphorus compounds // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. P. 7353–7360. <https://doi.org/10.1021/ac4011815>
81. Stoytcheva M., Zlatev R., Gochev V. et al. Amperometric biosensor precision improvement: application to organophosphorus pesticide determination // *Anal. Methods.* 2014. V. 6. P. 8232–8238. <https://doi.org/10.1039/C4AY01792G>
82. Mehta J., Dhaka S., Paul A.K. et al. Organophosphate hydrolase conjugated UiO-66-NH₂ MOF based highly sensitive optical detection of methyl parathion // *Environ. Res.* 2019. V. 174. P. 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.018>
83. Mehta J., Dhaka S., Bhardwaj N. et al. Application of an enzyme encapsulated metal-organic framework composite for convenient sensing and degradation of methyl parathion // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2019. V. 290. P. 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.116>
84. Goud K.Y., Teymourian H., Sandhu S.S. et al. OPAA/fluoride biosensor chip towards field detection of G-type nerve agents // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2020. V. 320. P. e128344. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128344>
85. Zehani N., Kherrat R., Dzyadevych S.V., Jaffrezic-Renault N. A microconductometric biosensor based on lipase extracted from *Candida rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2015. V. 95. P. 466–479. <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1036864>
86. Chen C.-H., Yang K.-L. A liquid crystal biosensor for detecting organophosphates through the localized pH changes induced by their hydrolytic products // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2013. V. 181. P. 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.036>
87. El-Moghazy A.Y., Soliman E.A., Ibrahim H.Z. et al. Biosensor based on electrospun blended chitosan-poly (vinyl alcohol) nanofibrous enzymatically sensitized membranes for pirimiphos-methyl detection in olive oil // *Talanta.* 2016. V. 155. P. 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.018>
88. Zhang Y., Arugula M.A., Wales M. et al. A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 67. P. 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.036>
89. Dominguez R.B., Alonso G.A., Muñoz R. et al. Design of a novel magnetic particles based electrochemical biosensor for organophosphate insecticide detection in flow injection analysis // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2015. V. 208. P. 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.069>
90. Döring J., Rettke D., Rödel G. et al. Surface functionalization by hydrophobin-EPSPS fusion protein allows for the fast and simple detection of glyphosate // *Biosensors.* 2019. V. 9. P. e104. <https://doi.org/10.3390/bios9030104>
91. Lan W., Chen G., Cui F. et al. Development of a novel optical biosensor for detection of organophosphorus pesticides based on methyl parathion hydrolase immobilized by metal-chelate affinity // *Sensors.* 2012. V. 12. P. 8477–8490. <https://doi.org/10.3390/s120708477>
92. Kim B.S., Kim G.W., Heo N.S. et al. Development of a portable biosensor system for pesticide detection on a metal chip surface integrated with wireless communication // *Food Sci. Biotechnol.* 2015. V. 24. P. 743–750. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0096-x>
93. Yang M., Choi B.G., Park T.J. et al. Site-specific immobilization of gold binding polypeptide on gold nanoparticle-coated graphene sheet for biosensor application // *Nanoscale.* 2011. V. 3. P. 2950–2956. <https://doi.org/10.1039/c1nr10197h>
94. Istamboulie G., Durbiano R., Fournier D. et al. Biosensor-controlled degradation of chlorpyrifos and chlorfenvinfos using a phosphotriesterase-based detoxification column // *Chemosphere.* 2010. V. 78. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.037>
95. Kergaravat S.V., Fabiano S.N., Soutullo A.R., Hernández S.R. Comparison of the performance analytical of two glyphosate electrochemical screening methods based on peroxidase enzyme inhibition // *Microchem. J.* 2021. V. 160, Part A. P. e105654. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105654>
96. Gomari M.M., Saraygord-Afshari N., Farsimadan M. et al. Opportunities and challenges of the tag-assisted protein purification techniques: Applications in the pharmaceutical industry // *Biotechnol. Adv.* 2020. V. 45. P. e107653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107653>
97. Martynko E., Kirsanov D. Application of chemometrics in biosensing: a review // *Biosensors.* 2020. V. 10. P. e100. <https://doi.org/10.3390/bios10080100>
98. Mishra R.K., Barfidokht A., Karajic A. et al. Wearable potentiometric tattoo biosensor for on-body detection of G-type nerve agents simulants // *Sens. Actuator. B-Chem.* 2018. V. 273. P. 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.001>
99. Fleischauer V., Heo J. An organophosphate sensor based on photo-crosslinked hydrogel-entrapped *E. coli* // *Anal. Sci.* 2014. V. 30. P. 937–942. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.937>