

Биосенсоры для определения ингибиторов ферментов в окружающей среде

Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников, Е.Б.Никольская

Казанский государственный университет

420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, факс (843) 238–0412

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова Российской академии наук

194223 Санкт-Петербург, просп. М.Тореза, 44, факс (812) 552–3012

Рассмотрены особенности функционирования и практического применения ферментных биосенсоров, предназначенных для определения ингибиторов ферментов — загрязнителей окружающей среды. Отмечено влияние способа детектирования скорости ферментативной реакции, метода иммобилизации ферментов, состава реакционной среды на аналитические характеристики определения ингибиторов. Обобщены литературные данные по созданию биосенсоров для обнаружения пестицидов и тяжелых металлов. Особое внимание уделено использованию в эколого-аналитическом контроле биосенсоров на основе холинэстераз. Рассмотрены подходы к оценке кинетических параметров ингибирования, выделены факторы, влияющие на селективность и чувствительность определения ингибиторов в объектах окружающей среды.

Библиография — 195 ссылок.

Оглавление

I. Введение	1142
II. Биосенсоры. Общая характеристика и особенности функционирования	1143
III. Оценка кинетических параметров ингибирования	1151
IV. Оптимизация рабочих условий определения ингибиторов	1153
V. Биосенсоры на основе холинэстераз	1156
VI. Заключение	1163

I. Введение

В последние годы большое значение в исследовательской работе приобрели биохимические методы анализа. Информацию о качественном и количественном составе объекта исследования получают, изучая *in vitro* и *in vivo* биохимические процессы, протекающие с участием ферментов, антител, ДНК и т.д. Главное достоинство биохимических методов состоит в том, что при формировании аналитического сигнала моделируются процессы, протекающие в живой природе. В результате появляется уникальная возможность быстрого и селективного детектирования биологически активных веществ и уточнения механизма их действия на живые организмы.^{1,2}

Ферментативные методы анализа относятся к числу биохимических. Ферменты — высокоэффективные катализаторы белковой природы — давно привлекают внимание химиков-аналитиков.^{2,3} Уникальные свойства ферментов,

такие как высокая избирательность и чувствительность в отношении специфических субстратов, функционирование в водных средах при температуре окружающей среды,^{4,5} делают их идеальными аналитическими реагентами в различных вариантах кинетических методов определения биологически активных веществ. Развитие ферментативных методов анализа в определенной степени было связано с потребностями клинического и токсикологического анализа (определение основных метаболитов, диагностика заболеваний и дисфункций отдельных органов организма по изменению состава биологических жидкостей).

Возможности использования ферментов для определения специфических субстратов и эффекторов стали обсуждаться с конца 1940-х годов, когда начались систематические исследования свойств ферментов *ex vivo*. Однако трудоемкость выделения ферментов, их неустойчивость в растворах, высокая себестоимость анализа препятствовали практическому внедрению разработанных методик. В результате вплоть до начала 1970-х годов ферментативные методы считались неконкурентоспособными по сравнению с традиционным физико-химическим анализом. Коренное изменение ситуации стало возможным благодаря, во-первых, успехам инженерной энзимологии и промышленной биотехнологии (было налажено масштабное производство многих ферментных препаратов, что резко снизило их себестоимость), во-вторых, разработке новых способов стабилизации ферментов, в том числе путем их закрепления (иммобилизации) на инертных носителях.⁶ Немаловажное значение для развития ферментативных методов анализа имело также создание специализированных средств измерения — биосенсоров.^{2,3}

Г.А.Евтюгин. Кандидат химических наук, доцент кафедры прикладной экологии КГУ. Телефон: (843) 238–0412.

Г.К.Будников. Доктор химических наук, заведующий кафедрой аналитической химии того же университета. Телефон: (843) 231–5416.

Е.Б.Никольская. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник ИЭФБ РАН.

Область научных интересов авторов: био- и электроаналитическая химия, ферментативный катализ, биохимические сенсоры.

Дата поступления 13 апреля 1999 г.

В них ферменты интегрированы в единую систему со средством измерения биохимического сигнала (сенсором, трансдюсером) и реакционной средой, содержащей необходимые стабилизаторы, эффекторы и другие низкомолекулярные компоненты, необходимые для устойчивого функционирования фермента. С появлением биосенсоров обеспечение необходимых условий эксперимента и измерение аналитического сигнала стали рутинными операциями, доступными пользователям, не имеющим специальных знаний и навыков в области биохимии. Именно создание биосенсоров обусловило коммерческое использование ферментов для определения биологически активных соединений. В 1996 г. мировой объем продаж биосенсоров составил 508 млн. долл. США (в том числе медицинских, предназначенных для определения глюкозы, мочевины, молочной кислоты и других важнейших метаболитов, ~70% от общего объема продаж).⁷

Коммерческий успех медицинских биосенсоров обусловлен не только их востребованностью и значительными финансовыми вложениями в соответствующие научные разработки. При достаточно высокой нижней границе обнаружения содержания метаболитов (на уровне 10^{-4} моль · л⁻¹) основным требованием к методу определения является его высокая селективность. Таким образом, в медицинских биосенсорах в наибольшей степени реализуются преимущества ферментов как аналитических реагентов.

Принципиально иная ситуация складывается при ферментативном контроле загрязнителей окружающей среды. О коммерческом использовании можно говорить только относительно биосенсоров на основе холинэстераз (ХЭ), предназначенных для детектирования остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в водах и сельскохозяйственной продукции,⁸ а также иммуноферментных диагностических гаптен-антител. Причины, затрудняющие практическое применение ферментативных методов в экологическом мониторинге, связаны с особенностями объектов контроля и более жесткими требованиями к аналитическим характеристикам определения загрязнителей окружающей среды по сравнению с объектами контроля в клиническом анализе.⁹

В связи с тем, что требования к предельно допустимым содержаниям токсикантов периодически ужесточаются, необходимо разрабатывать новые методы, позволяющие определять загрязняющие вещества (например, диоксины, пестициды в питьевой воде и продуктах питания, радиоактивные нуклиды) на уровне 10^{-12} моль · л⁻¹ (см.¹⁰). Столь низкие концентрации можно определить лишь в том случае, если загрязнитель является не субстратом, а эффектором (ингибитором или активатором) соответствующего ферментативного процесса.

Кроме того, качественный и количественный состав основных компонентов объектов эколого-аналитического контроля (природных, сточных вод, почв, осадков сточных вод и др.) значительно разнообразнее, чем состав биологических сред, контролируемых с помощью медицинских биосенсоров. Вследствие этого предъявляются дополнительные требования к селективности биохимического сигнала и способам его измерения. В присутствии многих веществ, таких как соли щелочных, щелочноземельных металлов, биогенные амины и фенолы, поверхностно-активные вещества, меняется не только скорость ферментативной реакции, но и ее чувствительность к присутствию ингибиторов. Использование биосенсоров может быть ограничено неустойчивостью проб во времени, высокой минерализацией (особенно в случае сточных вод и экстрактов из иловых осадков), присутствием микрогетерогенных примесей (взвеси и эмульсии), окрашенных соединений и т.д. Для преодоления указанных ограничений необходимы специальные методические подходы. Следует отметить, что использование биосенсоров для анализа объектов окружающей среды имеет прин-

ципиальные особенности по сравнению с их использованием в медицинских целях.¹¹

В настоящем обзоре на основе анализа литературных данных обобщены подходы к созданию биосенсоров, предназначенных для определения ингибиторов ферментов — загрязнителей окружающей среды, а также показаны возможности направленного регулирования селективности и чувствительности таких биосенсоров в отношении определяемых токсикантов.

II. Биосенсоры. Общая характеристика и особенности функционирования

Биосенсорами называют устройства, включающие биологический элемент (фермент, культуру клеток, микроорганизмы, биологические ткани, антитела и т.д.) и средства измерения реакции (отклика) этого элемента на изменение качественного состава среды.^{3,11} Некоторые авторы, говоря о биосенсорах, имеют в виду надмолекулярный уровень организации биологического компонента, разделяя тем самым понятия «ферментный, иммунный сенсор» и «биосенсор» (микробный или тканевый).¹²

Общая схема биосенсора представлена на рис. 1. Независимо от назначения, в ней всегда можно выделить три конструктивные части, определяющие операционные и аналитические характеристики биосенсора: сенсор, собственно биологический компонент и реакционная среда. Последняя включает, помимо определяемого вещества (субстрата или эффектора), стабилизаторы фермента, индифферентный электролит, маскирующие реагенты, компоненты буферного раствора и т.д.

Выбор способа детектирования аналитического сигнала обуславливает не только удобство работы с биосенсором, но и предел обнаружения субстрата. Предпочтение отдается универсальным методам и однотипным детекторам, позволяющим регистрировать скорость различных ферментативных реакций. Применительно к электрохимическим биосенсорам это кислородный электрод Кларка, амперометрические сенсоры пероксида водорода, рН-метрические электроды и полевые транзисторы, кондуктометрические ячейки. Широкое распространение в последнее время получили планарные тонко- и толстопленочные электроды на основе углеродистых материалов и металлов, наносимых печатным способом или напылением на пластиковые или керамические подложки.^{13,14}

Селективность детектирования сигнала с помощью сенсора достигается путем подбора рабочих условий измерения (потенциала электрода, состава реакционной среды) и оптимизации конструкции биосенсора. Так, применение медиаторов электронного переноса позволяет снизить рабочий потенциал электрода и исключить побочное окисление (восстановление) электроактивных примесей, присутствующих в пробе.¹⁵ Использование дополнительных мембран уменьшает влияние буферной емкости пробы и рН рабочего раствора на отклик рН-метрических биосенсоров.¹⁶

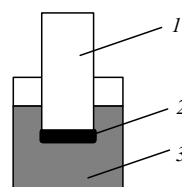


Рис. 1. Общая схема биосенсора.

1 — сенсор (электрод); 2 — биологический элемент; 3 — рабочий раствор — реакционная среда, содержащая определяемый компонент.

Общие требования к биосенсорам, предназначенным для эколого-аналитического контроля, были сформулированы Агентством по охране окружающей среды США.^{11, 17} Основные требования следующие: низкая стоимость одного определения (1–15 долл. США), возможность обнаружения токсиканта на уровне $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ – $1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, диапазон определяемых содержаний не менее двух порядков величины; продолжительность анализа 1–60 мин, отсутствие или минимальное питающее напряжение, специфичность к одному или группе родственных соединений, простота подготовки проб, возможность работы персонала после кратковременной (1–3 ч) подготовки и возможность переносить все устройство одним человеком или перевозить его на автомобиле.

1. Выбор фермента

При выборе биологического компонента (фермента) для включения в состав биосенсора обычно исходят из представлений о путях биохимической трансформации вещества (при определении субстратов) или механизме его токсического действия (при определении ингибиторов). Очевидно, что многообразие живых организмов и охарактеризованных ферментов дает потенциальную возможность детектировать практически любое биологически активное вещество, причем различными способами. Дополнительные возможности появляются при сочетании в одном биосенсоре нескольких ферментов, осуществляющих последовательное превращение субстрата. В каждом конкретном случае принимаются во внимание доступность фермента (простота выделения или наличие коммерческих препаратов), стабильность при хранении и иммобилизации, наличие удобных для аппаратного оформления способов детектирования, требуемые пределы обнаружения и диапазоны определяемых содержаний субстрата/ингибитора. Изменение аналитических характеристик определения ингибиторов в рамках одной фермент-субстратной системы достигается путем варьирования источника фермента, способа иммобилизации, условий измерения отклика и проведения стадии инкубирования.

В табл. 1 приведены данные по применению ферментов для определения ингибиторов — загрязнителей окружающей среды (за исключением ХЭ, рассматриваемых ниже), опубликованные в 1993–1998 гг. Результаты, полученные в более ранний период, нашли отражение в обзорах^{1, 9–11}. Необходимо отметить, что далеко не во всех публикациях приводятся аналитические характеристики определения ингибитора (предел обнаружения или нижняя граница определяемых содержаний, чувствительность определения, диапазон определяемых содержаний). Во многих случаях авторы используют биосенсор для демонстрации работоспособности самой идеи определения токсиканта с помощью иммобилизованного фермента (см., например,⁴¹) или для расчета кинетических параметров ингибирования, обычно в сравнении с ингибированием нативного фермента. Это затрудняет сопоставление результатов, полученных разными авторами.

Основную часть публикаций, посвященных практическому использованию ферментативных методов анализа, составляют работы по изучению биосенсоров, включающих пероксидазу, тирозиназу и уреазу. Другие ферментные системы упоминаются в ограниченном числе работ, хотя их потенциальные возможности значительны.

Для определения органических соединений применяют пероксидазу из хрена, устойчивую к действию денатурирующих реагентов и повышенных температур, обладающую высокой удельной активностью, надежную и чувствительную при определении скорости ферментативной реакции. По скорости пероксидазного окисления различных субстратов можно измерять концентрацию пероксида водорода, поэтому данный фермент часто используют в составе биферментных биосенсоров для определения субстратов или

эффекторов оксидоредуктаз.^{2, 3} Тирозиназа (полифенолоксидаса) выполняет сходные биохимические функции, окисляя различные биогенные фенолы.

Ингибиторы пероксидазы и тирозиназы могут блокировать активный центр ферментов (за счет комплексообразования металлокофакторов и разобщения цепи переноса электрона) или оказывать неспецифическое инактивирующее действие, нарушая третичную структуру белка. Например, при определении Hg(II) и Fe(III) с помощью пероксидазы с фотометрическим детектированием сигнала,^{53–55} а также производных фенилтиомочевины с помощью электрохимического тирозиназного биосенсора²² достигнуты достаточно малые пределы обнаружения, что позволило рекомендовать данные методы для прямого определения токсикантов в объектах окружающей среды без концентрирования пробы.

Основное преимущество пероксидазы и тирозиназы по сравнению с другими ферментами состоит в возможности их использования в составе биосенсоров для измерений в органических или водно-органических средах,^{56–58} в том числе для определения ингибиторов.^{22, 29, 31–33, 59, 60} Это позволяет использовать биосенсоры в качестве детекторов в жидкостной хроматографии⁶¹ и проводить определения ингибиторов непосредственно в органических экстрактах. Устойчивость ферментов в органических растворителях в целом ниже, чем в привычной среде, однако существуют определенные методы их стабилизации.⁶² В ингибиторных биосенсорах, функционирующих в водно-органических и неводных средах, ферменты включают в гидрофильные полимеры на основе полианилина,⁶¹ гидрофильного сополимера поливинилхлорида и пиррола Eastman AQ,^{31–34} в гидрогели на основе гидроксипеллелюлозы²⁹ и метилтриэтоксисилана.³⁵ Для появления электропроводности в органический растворитель добавляют 1–20% буферного раствора или соли тетраалкиламмония. Кинетические параметры как самой ферментативной реакции, так и взаимодействия фермента с ингибитором зависят от природы растворителя и ингибитора. Обычно присутствие полярных органических растворителей, смешивающихся с водой, снижает чувствительность биосенсора к обратимым ингибиторам тирозиназы и пероксидазы — производным тиомочевины и дитиокарбаматам. Неполарные растворители незначительно влияют на кинетику ингибирования.

Уреаза катализирует гидролиз мочевины. Высокая субстратная специфичность фермента, а также легкость потенциометрического или фотометрического определения продукта гидролиза — аммиака — обусловили практическое использование уреазы для определения остаточных количеств солей тяжелых металлов в объектах окружающей среды.

Так, для определения ингибиторов уреазы в природных и сточных водах предложена проточная система, состоящая из 26 стеклянных капиллярных трубок общим объемом 100 мкл. На внутренней поверхности капилляров путем физической сорбции в присутствии желатина закрепляли уреазу.⁶³ Через трубки с помощью перистальтического насоса последовательно прокачивали образец воды (15–240 мин) и раствор субстрата (20 мин), уреазную активность контролировали потенциометрическим методом по концентрации образующегося аммиака. Активность иммобилизованной уреазы сохранялась при непрерывной прокачке растворов в течение 8 ч. С помощью системы обнаружено присутствие в водах $1 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot \text{л}^{-1}$ карбарила (инкубирование 4 ч), $1 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-9}$ моль $\cdot \text{л}^{-1}$ солей меди(II) (инкубирование 1 и 4 ч). Похожую индикаторную систему на основе уреазного реактора (колонка, заполненная стеклянной крошкой с уреазой, иммобилизованной на поверхности) использовали для оценки суммарного загрязнения вод тяжелыми металлами.⁶⁴ Концентрацию аммиака контролировали фотометрическим (с помощью реактива Несслера) или

Таблица 1. Характеристики методов определения ингибиторов в окружающей среде и параметры определения: диапазон определяемых концентраций (c , моль $\cdot$ л $^{-1}$), предел обнаружения (ПО, моль $\cdot$ л $^{-1}$), концентрация ингибитора, вызывающая 50%-ное снижение отклика биосенсора (I_{50} , моль $\cdot$ л $^{-1}$).

Фермент	Способ детектирования	Условия измерения, стабилизации фермента	Ингибитор	Параметры определения ингибиторов			Ссыл-ки
				c	ПО	I_{50}	
Цитохром-оксидаза (КФ 1.9.3.1)	Амперометрический (циклическая вольтамперометрия)	Фермент включен в угольную пасту совместно с азолектином и цитохромом С из сердца лошади. Фосфатный буферный раствор, рН 7.0	Цианиды	$(0.5-12) \cdot 10^{-6}$	—	—	18
	Амперометрический (линейная вольтамперометрия)	Электрохимическая полимеризация пиррола на золотом планарном электроде с последующей иммобилизацией фермента глутаровым альдегидом. Фосфатный буферный раствор, рН 7.0	Атразин	—	$5 \cdot 10^{-6}$ (см. ^a) — $1 \cdot 10^{-5}$ (см. ^b)	—	19
	Пульс-амперометрия, хронокулонометрия	Иммобилизация фермента кросс-сшивкой с глутаровым альдегидом на поверхности стеклоуглеродного электрода совместно с медиатором 1,2-нафтахинон-4-сульфонатом. Фосфатный буферный раствор, рН 7.0	Бензойная кислота	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-6}$ (см. ^c)	—	20
	УФ/видимая спектрофотометрия	Фермент, миоглобин и гемоглобин включены в золь-гелевую матрицу	Оксиды азота(II), углерода(II)	На уровне 10^{-6}	—	—	21
	Амперометрический (циклическая вольтамперометрия)	Фермент включен в угольную пасту (4%). Фосфатный буферный раствор, рН 7.0. Субстрат — пирокатахин	Цианиды	—	$1 \cdot 10^{-5}$	—	18
Тирозиназа (КФ 1.14.18.1)	Амперометрический (электрод Кларка)	Сорбция на бумаге с последующим покрытием диализной мембраной. Гексан, насыщенный фосфатным буферным раствором, рН 7.0. Субстрат — пирокатахин	Фенилтиомочевина <i>N,N</i> -Дифенилтиомочевина Фенилэтилтиомочевина Бензилтиомочевина Изопропилтиомочевина Аллилтиомочевина	— — — — — —	$0.013 \cdot 10^{-6}$ $0.045 \cdot 10^{-6}$ $0.078 \cdot 10^{-6}$ $0.104 \cdot 10^{-6}$ $0.137 \cdot 10^{-6}$ $0.181 \cdot 10^{-6}$	$0.80 \cdot 10^{-6}$ $1.83 \cdot 10^{-6}$ $3.08 \cdot 10^{-6}$ $4.58 \cdot 10^{-6}$ $5.55 \cdot 10^{-6}$ $6.91 \cdot 10^{-6}$	22
	Амперометрический (линейная вольтамперометрия)	Фермент иммобилизован на поверхности электрода. Фосфатный буферный раствор, рН 7.4. Субстрат — фенол	Бензойная кислота, тио-мочевина, пропилаллат	—	—	—	23
	Амперометрический (по току восстановления хинона)	Иммобилизация в полипирроле, образующемся на электроде при окислении замещенного пиррола. Субстраты — пирокатахин, допамин, леводопа, адриналин. Фосфатный буферный раствор, насыщенный воздухом, рН 6.5	3,4-Дихлорфенол Хлоризопронилфенил-карбамат 3-Хлоранилин Атразин Цианид	— — — — —	$0.4 \cdot 10^{-6}$ $2 \cdot 10^{-6}$ $2 \cdot 10^{-6}$ $4 \cdot 10^{-6}$ $0.02 \cdot 10^{-6}$	— — — — —	24
	Амперометрический (измерение стационарного сигнала)	Включение фермента в угольную пасту на основе минерального масла без сшивающего реагента (объемный или планарный электроды). Субстрат — фенол. Фосфатный буферный раствор, рН 7.4	Гидразин Метилгидразин Диметилгидразин	— — —	— — —	$4.5 \cdot 10^{-4}$ $5.5 \cdot 10^{-4}$ $6.3 \cdot 10^{-4}$	25
	Амперометрический, циклическая и пульс-амперометрия, хронокулонометрия	Иммобилизация фермента на поверхности стеклоуглеродного электрода кросс-сшивкой глутаровым альдегидом без носителя. Фосфатный буферный раствор, рН 7.0. Медиатор — красная кровяная соль	Цианиды	На уровне $10^{-3} - 10^{-4}$ (см. ^c)	—	—	26

Таблица 1 (продолжение).

Фермент	Способ детектирования	Условия измерения, стабилизации фермента	Ингибитор	Параметры определения ингибиторов			Ссыл-ки
				ϵ	ПО	I_{50}	
Тирозиназа (КФ 1.14.18.1)	Амперометрический (измерение стационарного сигнала)	Планарные печатные углеродные электроды на керамической подложке (рабочая область 1×5 мм), фермент включен в углеродную пасту. Субстрат — пирокатехин. Фосфатный буферный раствор, рН 7.4	Диэтилдитиокарбамат Бензойная кислота	—	$2 \cdot 10^{-6}$	$9.2 \cdot 10^{-5}$	27
			4,6-Динитро- <i>o</i> -крезол	—	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-4}$	
			Тиомочевина	—	$9 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-4}$	
			2,4-Д	—	$4 \cdot 10^{-6}$	—	
	Амперометрический (линейная вольтамперометрия)	Ткань плодового тела шампиньона как источник тирозиназной активности, включенная в угольную пасту. Субстрат — пирокатехин. Фосфатный буферный раствор, рН 7.4.	Диэтилдитиокарбамат Бензойная кислота	—	—	$7 \cdot 10^{-6}$	28
			Тиомочевина	—	—	$4 \cdot 10^{-5}$	
			Бензойная кислота	—	—	$5.8 \cdot 10^{-5}$	
			Тиомочевина	—	—	$6.2 \cdot 10^{-5}$	
	То же	Включение фермента в кригель на основе гидроксицеллюлозы. Измерения в хлороформе, хлорбензоле, 1,2-дихлорбензоле, содержащих тетраэтиламмонийперхлорат	Бензойная кислота в хлороформе в хлорбензоле в 1,2-дихлорбензоле	$(1-16) \cdot 10^{-6}$ $(10-85) \cdot 10^{-6}$ $(10-30) \cdot 10^{-6}$	$0.05 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-6}$ $5 \cdot 10^{-6}$	—	29
			Тиомочевина в хлороформе в хлорбензоле в 1,2-дихлорбензоле	$(1-35) \cdot 10^{-6}$ $(5-100) \cdot 10^{-6}$ $(25-85) \cdot 10^{-6}$	$0.5 \cdot 10^{-6}$ $2 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-5}$	—	
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)	Амперометрический, кулонометрический	Тирозиназа иммобилизована на поверхности электрода Кларка совместно с медиатором 1,2-нафтахинон-4-сульфонатом	2-Меркаптоэтанол в хлороформе в хлорбензоле в 1,2-дихлорбензоле	$(0.5-70) \cdot 10^{-6}$ $(0.1-35) \cdot 10^{-6}$ $(0.5-70) \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-7}$ $0.05 \cdot 10^{-6}$ $0.5 \cdot 10^{-6}$	—	30
			Диазирон	—	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-3}$	
			Дихлорфос	—	$7.5 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-5}$	
			Тиомочевина в метаноле в ацетоне в бутаноле-2 в ацетонитриле	—	—	—	
	Амперометрический, фотометрический	Иммобилизация фермента включением в полимерную пленку Eastman Kodak 55D на поверхности Pt-электрода. Измерения в ацетонитриле, метаноле, ацетоне и бутаноле-2, содержащих 1.5% воды и пероксид бутанона. Субстрат — фенилендиамин	Этиленгликоль в метаноле в ацетоне в бутаноле-2 в ацетонитриле	—	—	—	31–33
			Метилизотиомочевина в метаноле в ацетоне в бутаноле-2 в ацетонитриле	—	—	—	
			Метилизотиомочевина в метаноле в бутаноле-2	—	—	—	
			Меркаптоэтанол в ацетонитриле	—	—	—	
	Амперометрический (циклическая вольтамперометрия)	Иммобилизация фермента включением в полимерную пленку Eastman Kodak 55D на поверхности стеклотвердого электрода. Измерения в ацетонитриле, метаноле и ацетоне, содержащих 1.5% воды, пероксид бутанона и диметилферроцен	Тиомочевина в ацетонитриле	—	—	—	34
			Тиомочевина в ацетонитриле	—	—	$2.4 \cdot 10^{-4}$	
			в метаноле	—	—	$18.9 \cdot 10^{-4}$	
			в ацетоне	—	—	$3.5 \cdot 10^{-4}$	

Таблица 1 (продолжение).

Фермент	Способ детектирования	Условия измерения, стабилизации фермента	Ингибитор	Параметры определения ингибиторов			Ссылки
				c	ПО	I_{50}	
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)	Амперометрия (линейная вольтамперометрия)	Включение фермента в гель на основе метилтриэтоксисилана на поверхности стеклоуглеродного электрода, модифицированного Os-содержащим полимером. Фосфатный буферный раствор под аргоном, pH 5.5	Метилизоцианат ^d	$(4-40) \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$	—	35
Алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13)	Кондуктометрический (планарные Pt-микроэлектроды)	Иммобилизация на активной поверхности полевого транзистора парами глутарового альдегида в пленке бычьего сычужного альбумина и декстрина. Трис-буферный раствор, pH 7.5. Субстрат — формальдегид	Hg(II)	$(1-100) \cdot 10^{-6}$	—	—	36
Каталаза (КФ 1.11.1.6)	Амперометрический (измерение стационарного сигнала)	Фермент иммобилизован в полиакриламидном теле, мембраны крепились непосредственно на тefлоновую мембрану электрода Кларка. Измерения в проточно-инжекционном режиме. Субстрат — пероксид водорода. Фосфатный буферный раствор, pH 7.0	Фториды Цианиды	10^e 100^e	1^e 1.5^e	— —	37
Альдегиддегидрогеназа (КФ 1.2.1.5) и диафороаза (КФ 1.8.1.4)	Амперометрический (линейная вольтамперометрия)	Иммобилизация диафороазы в мембране на основе сополимера стирилпиридина и винилового спирта (PVA-SbQ). Альдегиддегидрогеназа иммобилизована в той же мембране или добавляется к рабочему раствору. Фосфатный буферный раствор, pH 7.5. Субстрат — пропионовый альдегид	Цинк и манеб Цинк	0.15^e $7.4^e, 1.5^e$	— —	— —	38, 39
Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4)	Потенциометрический (рН-ИСПТ)	Иммобилизация на активной поверхности полевого транзистора парами глутарового альдегида в пленке бычьего сычужного альбумина	Cu(II) Co Sn Pb Ni Cd	$4.0-3.0^f$ $4.2-3.2^f$ $3.8-2.0^f$ $3.5-2.2^f$ $3.8-2.0^f$ $2.0-1.5^f$	— — — — — —	— — — — — —	40, 41
То же	То же	Иммобилизация на активной поверхности полевого транзистора парами глутарового альдегида в пленке бычьего сычужного альбумина и декстрина. Трис-буферный раствор, pH 7.5	Ag(I)	$(1-100) \cdot 10^{-6}$	—	—	37
β -Гликозидаза (КФ 3.2.1.21), манделонитрил-лаза (КФ 1.11.1.7), пероксидаза	»	Синхронизация трех ферментов на активной поверхности полевого транзистора парами глутарового альдегида в пленке бычьего сычужного альбумина. Цитратный буферный раствор, pH 6.0	Цианогенные гликозиды на примере аминдалина	$(1-30) \cdot 10^{-5}$	—	—	42

Таблица 1 (продолжение).

Фермент	Способ детектирования	Условия измерения, стабилизации фермента	Ингибитор	Параметры определения ингибиторов		Ссыл-ки			
				ϵ	I_{50}				
Прочие оксидоредуктазы									
L-глицерофосфатоксидаза пируватоксидо-лактатдегидрогеназа	Амперометрический (электрод Кларка)	Иммобилизация на поверхности электрода Кларка. Трис-буферный раствор	HgCl ₂	—	$20 \cdot 10^{-6}$	43			
			HgCl ₂	—	$0.05 \cdot 10^{-6}$				
			HgCl ₂	—	$1 \cdot 10^{-6}$				
			AgNO ₃	—	$0.1 \cdot 10^{-6}$				
			CdCl ₂	—	$10 \cdot 10^{-6}$				
			ZnCl ₂	—	$10 \cdot 10^{-6}$				
			Pb(CH ₃ COO) ₂	—	$50 \cdot 10^{-6}$				
			CuSO ₄	—	$25 \cdot 10^{-5}$				
			Hg(II)	—	0.05 ^g	44			
			Cu(II)	—	0.05 ^g				
алкогольоксидаза глицерин-3-фосфатоксидаза холиноксидаса глутатион-оксидаса саркозиноксидаса	Амперометрический (по стационарному сигналу)	Оксидоредуктазы иммобилизованы путем кросс-сшивки глутаровым альдегидом в пленке бычьего сывороточного альбумина или на активированном нейлоне (Immobilon), на поверхности планарного рутенизированного (0.5%) угольно-пастового электрода. Физиологический буферный раствор Дульбекко, инкубирование 5 мин	Hg(II)	—	—				
			V(V)	—	—				
			Se(IV)	—	0.015 ^g				
			Ni	—	0.10 ^g				
			Гидролитические ферменты						
			Эстераза печени (КФ 3.1.1.1)	Фотометрический (по поглощению NADH)	Соиммобилизация на стекле эстеразы и NAD-зависимой алкогольдегидрогеназы. Определение в проточно-инжекционном режиме продукта ферментативного гидролиза субстрата (этилпропионат) — этанола, окисляющегося под действием алкогольдегидрогеназы	Фториды	$(0.8-8) \cdot 10^{-6}$	—	45
			Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2)	Амперометрический (измерение стационарного сигнала)	Иммобилизация фосфатазы (препарат или срез ткани клубня картофеля) совместно с глюкозооксидазой на активированном нейлоне с помощью полиацетилена. Рт-электрод. Субстрат — глюкозо-6-фосфат. Фосфатный буферный раствор, рН 6.6. Определение ингибирующего действия в цитратном буферном растворе, рН 6.0, 30 °С	Пестициды ^h малатион метилпаратион параоксон	$4.4-15^e$ ($3.0-2.0$) ^e $0.7-12^e$ ($0.7-8.0$) ^e $6.2-18.3^e$ $(3.1-2.0)^e$	3^e (1.5) ^e 0.5^e (0.3) ^e 5^e (1.5) ^e 40^e (40) ^e	46
						альдикарб Hg(II)	$46-125^e$ ($46-125$) ^e —	— 1 —	47

Таблица 1 (окончание).

Фермент	Способ детектирования	Условия измерения, стабилизации фермента	Ингибитор	Параметры определения ингибиторов			Ссыл-ки
				c	ПО	I_{50}	
Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1)	Потенциометрический	Иммобилизация кросс-сшивкой глутаровым альдегидом в пленке бычьего альбумина на поверхности диализной мембраны. Трис-буферный раствор, рН 7.0, 34°C. Субстрат — α -D-глюкозо-1-фосфат	Hg(II)	1	—	—	47
	Амперометрический (измерение стационарного сигнала)	Сорбция совместно с глюкозооксидазой на поверхности планарного рутенизированного угольного электрода. Субстрат — глюкозо-6-фосфат. Регистрация тока окисления пероксида водорода — продукта ферментативного окисления глюкозы, образующейся при гидролизе субстрата. Измерение ингибирующего эффекта в глициновом буферном растворе, рН 9.0. Инкубирование 10 мин	Дихлорфос	$10^{-8} - 10^{-5}$ (см. ²)	$6 \cdot 10^{-8}$ (см. ²)	—	48
Уреаза (КФ 3.5.1.5)	Флуориметрический	Фермент иммобилизован на поверхности стекла, измерения в проточном детекторе	Hg(II)	$0.5 - 100$ ^g	—	—	49
	Кондуктометрический (планарные Pt-микроэлектроды)	Иммобилизация на активной поверхности полевого транзистора парами глутарового альдегида в пленке бычьего сыворо-точного альбумина в присутствии стабилизатора — глицерина. Трис-буферный раствор, рН 7.4. Субстрат — мочевина. Оценка ингибирования в кинетическом режиме (по скорости изменения сигнала после добавления субстрата)	Hg(II) Cu(II) Cd Co(II) Pb Sr	$(1 - 50) \cdot 10^{-6}$ $(2 - 100) \cdot 10^{-6}$ $(5 - 200) \cdot 10^{-6}$ $(1 - 50) \cdot 10^{-5}$ $(2 - 500) \cdot 10^{-5}$ $(1 - 500) \cdot 10^{-4}$	— — — — — —	— — — — — —	50
Потенциометрический (рН-ИСПТ)		Сорбция на поверхности полевого транзистора с покрытием полимерной пленкой NaIop. Трис-буферный раствор, рН 7.0. Субстрат — мочевина	Ag Hg(II) Cu(I)	— — —	$0.2 \cdot 10^{-6}$ $1.5 \cdot 10^{-6}$ $3 \cdot 10^{-6}$	— — —	51
	То же	Иммобилизация на активной поверхности полевого транзистора парами глутарового альдегида в пленке нитрата целлюлозы. Трис-буферный раствор, рН 7.4. Субстрат — мочевина	Hg(II) Cu Co Cd Ni Pb Sn	$8.7 - 3.5$ ^f $6.7 - 3.3$ ^f $5.8 - 2.8$ ^f $5.8 - 2.2$ ^f $5 - 3$ ^f $4.8 - 3.2$ ^f —	— — — — — — —	— — — — — — —	40
»		Сорбция на поверхности полевого транзистора с покрытием полимерной пленкой поли(4-винилпирролидона). Трис-буферный раствор, рН 7.0. Измерение относительно восстановления активности фермента, ингибированного раствором CuCl ₂ . Субстрат — мочевина	ЭДТА	$5 - 500$ ^e	—	—	52

Примечание. Приняты следующие обозначения: 2,4-Д — дихлорфеноксиуксусная кислота, рН-ИСПТ — рН-чувствительный ионоселективный полевой транзистор, NADH — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида, ЭДТА — этилендиаминтетраацетат.
^a Получено гидродинамическим методом. ^b Получено проточным методом. ^c Оценка по градуировочным графикам. ^d Определению не мешают тиомочевина, роданины, азиды до концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹. ^e Размерность мкг $\cdot$ л⁻¹. ^f Приведены значения $rs = -\lg c$ (моль $\cdot$ л⁻¹). ^g Размерность мг $\cdot$ л⁻¹. ^h Параметры определения ингибиторов для указанных пестицидов получены с использованием биферментного и гибридного (числа в скобках) биосенсоров.

потенциометрическим методом. Пределы обнаружения большинства тяжелых металлов составили $(1-2) \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, железа — $10^{-8}-10^{-9}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$. Селективности определения отдельных металлов достичь не удалось. Система была опробована при контроле загрязнения источников питьевой воды Московской области.

Несколько лучше аналитические характеристики определения ионов металлов с помощью уреазных биосенсоров на основе рН-чувствительных полевых транзисторов. Улучшение достигается как за счет применения очень тонких мембран, контактирующих с электродом, так и за счет покрытия датчика ионообменными полимерами, позволяющими концентрировать катионы на его поверхности.^{51, 52}

Микроорганизмы и срезы биологических тканей, включаемые в биосенсоры, в некоторых случаях могут рассматриваться как источники соответствующей ферментативной активности. При этом вероятно повышение стабильности отклика и снижение себестоимости биосенсора, поскольку ферменты находятся в привычном микроокружении в присутствии необходимых стабилизаторов и эффекторов. В клетках имеются естественные механизмы защиты ферментов от аутоокисления, гидролиза под действием протеолитических ферментов. Кроме того, за счет катаболических внутриклеточных процессов деления клеток происходит постоянное воспроизводство инактивированных ферментов. В табл. 1 приведены примеры использования срезов плодового тела гриба как источника тирозиназы,²⁸ картофеля — как источника кислой фосфатазы.⁴⁶

Принципиально новые возможности имеют биосенсоры с использованием целых биохимических циклов, в которых в качестве аналитического сигнала измеряется подавление той или иной биохимической функции. Прежде всего следует упомянуть биосенсоры для определения гербицидов (альгицидов), а также для оценки общей токсичности в отношении респираторной активности микроорганизмов.

Биосенсоры для измерения содержания химических соединений, обладающих фитотоксическим действием, включают в качестве биологического компонента хлоропласты (в виде цельных клеток одноклеточных микроводорослей,⁶⁵⁻⁶⁷ или в составе тилакоидных мембран, выделенных из таких клеток).⁶⁸ При освещении хлорофилла генерируется фототок, измеряемый по току окисления акцепторов электронов, добавляемых в раствор вместо природного акцептора — диоксида углерода. В качестве медиаторов используют феррицианид,⁶⁸ растворимые производные ферроцена,^{65, 66} диаминодурол.⁶⁷ Уменьшение фототока является мерой гербицидного действия токсикантов. Так, при использовании клеток *Synechococcus sp.* предел обнаружения триазиновых пестицидов составляет 2 мкг $\cdot$ л $^{-1}$, а при использовании клеток *Chlorella vulgaris* — ~ 1 мкг $\cdot$ л $^{-1}$. В случае применения тилакоидных мембран из культуры клеток шпината 50%-ное снижение фототока наблюдалось при концентрации диурона $1 \cdot 10^{-6}$, атразина — $9 \cdot 10^{-6}$, нитрита натрия — $5.5 \cdot 10^{-4}$, сульфата натрия — $1.7 \cdot 10^{-3}$, солей Cu(II) — $7.2 \cdot 10^{-3}$, Pb — $1 \cdot 10^{-3}$, Hg(II) — $1.8 \cdot 10^{-3}$, Zn — $2 \cdot 10^{-3}$, Cd — $4 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$. Приведенные данные показывают, что биосенсоры на основе хлоропластов и микроводорослей перспективны в первую очередь для определения остаточного содержания гербицидов. По чувствительности определения ионов металлов они, безусловно, проигрывают ферментным биосенсорам (см. табл. 1).

В микробных биосенсорах для определения токсических веществ в водной среде измеряют биохимическое потребление кислорода (БПК).⁶⁹⁻⁷¹ По скорости поглощения кислорода клетками, иммобилизованными на мембране кислородного электрода, можно оценить величину БПК в течение 15–40 мин (для сравнения, в склянном методе — в течение 5–20 сут). Присутствие токсических веществ снижает скорость потребления кислорода. Мерой токсичности служит снижение скорости потребления кислорода (респираторной активности) при одновременном введении в раствор пробы и питательного вещества. Можно также качественно оценить бактерицидные свойства по появлению характерного перегиба на кривой потребления кислорода при последовательном введении в раствор питательных веществ и токсиканта.⁷²⁻⁷⁴ На основе некоторых микробных биосенсоров созданы промышленные системы контроля токсичности сточных вод (например, Toxiguard,⁷³ ROD-TOX^{72, 75}). Микробные биосенсоры токсичности позволяют детектировать различные вещества с широким спектром токсического действия — от нарушения трансмембранного переноса кислорода (поверхностно-активные вещества, нефтепродукты) до разобщения окислительного фосфорилирования и ингибирования оксидоредуктаз (фенолы, цианиды, ионы тяжелых металлов). В то же время адаптивные защитные механизмы детоксикации снижают чувствительность микробных биосенсоров к отдельным группам токсикантов по сравнению с ферментными электродами. Так, для дрожжевого электрода предел обнаружения ионов Cu(II) составляет 0.2 мкг $\cdot$ л $^{-1}$ (см.¹).

Помимо респираторной активности для оценки токсичности можно измерять уровень люминесценции люциферазных микроорганизмов (биосенсорный вариант теста Microtox).⁷⁶ В работе⁷⁷ описан также электрод с иммобилизованным ревертантным штаммом *Salmonella*, позволяющий проводить скрининг мутагенной активности химических соединений.

Мимо респираторной активности для оценки токсичности можно измерять уровень люминесценции люциферазных микроорганизмов (биосенсорный вариант теста Microtox).⁷⁶ В работе⁷⁷ описан также электрод с иммобилизованным ревертантным штаммом *Salmonella*, позволяющий проводить скрининг мутагенной активности химических соединений.

2. Влияние иммобилизации фермента

Иммобилизация фермента обычно приводит к существенному изменению аналитических характеристик определения ингибиторов. Основными причинами изменения чувствительности фермента к ингибитору при переходе от нативного к иммобилизованному ферменту являются,^{3, 5} во-первых, диффузионное торможение переноса реагентов (субстрата, ингибитора, продукта) в мембране, включая стерическое ограничение доступности активного центра фермента для высокомолекулярных ингибиторов и/или субстратов (например, протеолитических ферментов); во-вторых, изменение микроокружения фермента (буферной емкости, диэлектрической проницаемости, ионного состава) и связанное с ним изменение электростатических взаимодействий и коэффициентов активности реагентов.

К настоящему времени не найдено однозначных свидетельств того, что изменение родства фермента к субстрату или ингибитору в результате иммобилизации может быть обусловлено изменением третичной или четвертичной структуры белка. В результате физической сорбции или ковалентной сшивки белковых глобул с помощью бифункциональных реагентов модифицируется незначительное число поверхностных функциональных групп. Активный и аллостерический центры занимают ничтожную долю общей поверхности белковой глобулы, поэтому изменение их структуры в процессе иммобилизации маловероятно.

Оптимизация процедуры иммобилизации ориентирована на сохранение ферментативной активности иммобилизованного фермента и предполагает мягкое, щадящее воздействие, направленное на сохранение окружения активного центра. Это позволяет рассматривать ферментсодержащую пленку на поверхности сенсора как твердый раствор, в котором нативный белок равномерно распределен и «зафиксирован» в однородной среде, более плотной и вязкой, чем вода. При всей условности, такая модель во многих случаях адекватно описывает поведение биосенсоров, включающих иммобилизованный фермент.

Диффузионное торможение переноса реагентов является основной причиной расхождения результатов определения ингибиторов с помощью нативного и иммобилизованного фермента. В зависимости от соотношения скоростей пере-

носа субстрата в мембрану и его ферментативного превращения, можно выделить два режима функционирования биосенсора,^{3,78} отличающихся стационарным распределением субстрата в мембране.

Кинетический режим. Скорость переноса субстрата из раствора в мембрану и скорость диффузии субстрата в мембране выше скорости ферментативного превращения субстрата. Реагирующие частицы равномерно распределены в мембране, активные центры фермента насыщены субстратом. В этом случае образование продукта (а следовательно, и отклик биосенсора) определяются исключительно кинетикой ферментативной реакции. Данный режим наиболее благоприятен с точки зрения детектирования эффекторов фермента. В то же время любое снижение ферментативной активности в результате вымывания, спонтанной инактивации, микробной деградации приводит к изменению отклика. Кинетический режим наблюдается при низкой удельной активности иммобилизованного фермента, небольшой толщине мембраны, отсутствии торможения переноса субстрата на границе раздела мембрана – раствор.

Диффузионный режим. Активность фермента высока, так что диффузионный перенос полностью не компенсирует убыль концентрации субстрата в ферментативной реакции. В результате ферментсодержащая мембрана не насыщена ферментом, и часть активных центров свободна. Отклик электрода устойчив и остается постоянным при колебаниях активности иммобилизованного фермента, пока не изменится режим реагирования. Диффузионный режим наблюдается при высокой удельной активности фермента, при торможении переноса субстрата (например, при использовании дополнительных покровных мембран, снижающих скорость переноса субстрата из раствора в ферментсодержащий слой).¹⁶

В диффузионном режиме реагирования чувствительность определения ингибиторов ниже, чем в кинетическом. Снижение концентрации активных центров фермента в результате взаимодействия с ингибитором частично компенсируется вовлечением в ферментативную реакцию свободных активных центров, не участвовавших в процессе. Это происходит независимо от механизма взаимодействия ингибитора с ферментом. Так, при переходе от нативного к иммобилизованному ферменту пределы обнаружения Hg(II) с помощью холиноксидазы увеличиваются в 2 раза, с помощью глицерин-3-фосфатоксидазы — в 2.5 раза; Hg(II) с помощью лактатоксидазы, глутаматоксидазы, Cd с помощью оксидазы D-аминокислот, V(V) с помощью алкогольоксидазы — более чем в 20 раз.⁴⁴ Более того, многие ионы металлов не меняют активности иммобилизованных препаратов, но являются ингибиторами только нативных ферментов. При использовании люминесцентного биосенсора, включающего ХЭ, холиноксидазу, пероксидазу, предел обнаружения параоксона составил 0.75 мкг·л⁻¹, если ХЭ была в растворе, а два других фермента — в акрилатном геле, и 125 мкг·л⁻¹, если иммобилизованы были все три фермента.⁷⁹

Диффузионный и кинетический режимы функционирования биосенсора являются предельными, между ними — обширная переходная область, в которой отклик биосенсора зависит как от кинетических параметров ферментативной реакции, так и от коэффициентов диффузии реагентов. Математическое описание отклика в функции кинетических и диффузионных параметров досконально разработано как для амперометрических, так и для потенциометрических биосенсоров.^{3,80–84} Правда, модели не учитывают рН-зависимости скорости ферментативной реакции. Это является достаточно грубым приближением, учитывая, что в условиях измерения отклик биосенсора рН ферментсодержащей мембраны может меняться на 1–3 единицы.

Моделирование влияния ингибитора на отклик биосенсора не проводилось. Это относится как к стационарному

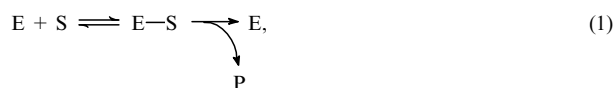
отклику, так и к кривой изменения отклика биосенсора во времени после введения в раствор субстрата (динамический или переходный отклик). Вероятно, это связано с существенным усложнением математической модели по сравнению с описанием кинетики ферментативной реакции иммобилизованного фермента. Кроме того, в большинстве случаев неизвестны необходимые для моделирования кинетические параметры отдельных стадий ингибирования.

В простейшем случае влияние ингибитора можно описать, базируясь на математических моделях отклика биосенсора в отсутствие ингибитора. Если распределение ингибитора в мембране равномерно, снижение отклика биосенсора можно моделировать, используя расчетные кривые зависимости отклика биосенсора от концентрации субстрата, полученные для различных скоростей ферментативной реакции. Изменение отклика биосенсора в результате контакта с ингибитором будет аналогично тому, которое наблюдалось бы в случае, если для приготовления мембраны взяли меньшее количество фермента.

При таком подходе невозможно учесть влияние иммобилизации фермента на механизм ингибирования. В частности, при переходе от нативной к иммобилизованной ХЭ наблюдается изменение механизма ингибирования *N*-метил-4-пиперидинилбензилатом или такрином (1,2,3,4-тетрагидро-9-аминоакридином),⁸⁵ обусловленное скорее стерическими факторами (ограничением доступа ингибитора в мембрану или изменением соотношения концентраций ингибитора и субстрата в мембране по сравнению с таким соотношением в растворе), чем изменением механизма взаимодействия ингибитор–фермент. Дополнительные сложности вносит необходимость учета конечной скорости переноса ингибитора в мембрану.

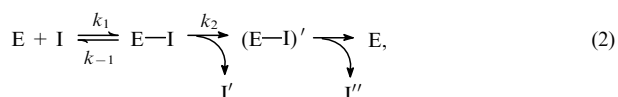
III. Оценка кинетических параметров ингибирования

Выбор метода количественной оценки воздействия ингибитора на иммобилизованный фермент, входящий в состав биосенсора, определяется характером взаимодействия в системе фермент–субстрат–ингибитор и способом измерения аналитического сигнала, реализованным в конструкции биосенсора. При дальнейшем изложении предполагается, что ферментативный процесс протекает в соответствии с классическим механизмом Михаэлиса–Ментен^{4,5}



где *E* — фермент, *S* — субстрат, *E–S* — фермент-субстратный комплекс и *P* — продукт ферментативной реакции.

Одной из наиболее важных характеристик механизма ингибирования является обратимость взаимодействия ингибитора с активным центром фермента. При взаимодействии фермента и ингибитора в отсутствие субстрата различают обратимое и необратимое ингибирование в зависимости от пути расщепления фермент-ингибиторного комплекса



где *I* — ингибитор, *E–I* — фермент-ингибиторный комплекс, *I'*, *I''* — продукты распада ингибитора. Если комплекс *E–I* распадается с одновременным расщеплением исходного ингибитора, ингибирование называют необратимым ($k_2 \gg k_{-1}$); когда превалирует диссоциация комплекса на исходные молекулы ($k_{-1} \gg k_2$), ингибирование относят к обратимому.

Указание на тип ингибирования не позволяет судить о возможности восстановления ферментативной активности после взаимодействия ингибитора с ферментом. Карбаминаты оказывают необратимое ингибирующее действие на ХЭ, однако спонтанный гидролиз карбамоилированной ХЭ протекает достаточно быстро до полного восстановления активности фермента. Так, константа скорости реактивации карбамоилированной ацетилхолинэстеразы (АХЭ) из электрического угря $(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})-\text{АХЭ}$ составляет 0.012 мин^{-1} ; для сравнения такая константа для фосфорилированной АХЭ составляет 10^{-5} , а для гидролиза ацетилированного фермента при ферментативном расщеплении субстрата — $6 \cdot 10^5 \text{ мин}^{-1}$ (см.⁸⁶). Ингибирование уреазы ионами тяжелых металлов должно быть обратимым, однако для восстановления ферментативной активности требуется применение комплексонов, например ЭДТА.^{51,52} Токсичные необратимые ингибиторы, например загрязнители-ксенобиотики, более опасны для живого организма, чем обратимые ингибиторы, вследствие низкой скорости спонтанной реактивации и отсутствия эффективных механизмов детоксикации.

1. Необратимое ингибирование

Необратимое ингибирование количественно оценивают по уровню ферментативной активности до и после контакта фермента с ингибитором. Если концентрация ингибитора значительно больше концентрации активных центров фермента, необратимое ингибирование описывается кинетическим уравнением второго порядка⁸⁷

$$\ln \frac{v_0}{v_t} = k_{\text{II}} c_1 \tau, \quad (3)$$

где v_0 и v_t — начальные скорости ферментативной реакции до и после контакта фермента с ингибитором соответственно, k_{II} — бимолекулярная константа скорости ингибирования, c_1 — концентрация ингибитора, τ — продолжительность взаимодействия фермента и ингибитора (стадии инкубирования). Величина k_{II} определяется природой фермента и ингибитора, условиями протекания реакции и зависит от констант скорости отдельных стадий. В частности, при $\tau \rightarrow 0$

$$k_{\text{II}} \rightarrow \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}.$$

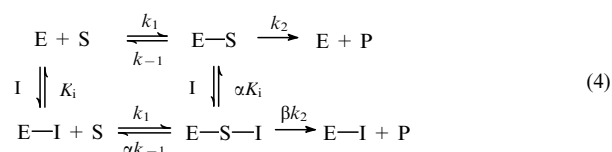
Величина k_{II} лучше характеризует ингибирующую способность токсиканта, чем I_{50} , поскольку позволяет сравнивать результаты, полученные в разных экспериментальных условиях, в частности для различных τ .

Если концентрации активных центров фермента и ингибитора сопоставимы, то при строго необратимом ингибировании наблюдается линейная зависимость между относительным снижением скорости ферментативной реакции и концентрацией ингибитора. Однако применительно к биосенсорам такая зависимость не реализуется, поскольку для точного измерения отклика удельная активность иммобилизованного фермента должна быть, как правило, достаточно высокой.

При необратимом характере ингибирования (низкой скорости спонтанной реактивации) наблюдается зависимость ингибирующего эффекта от продолжительности инкубирования, а градуировочный график определения ингибитора линеен в координатах $c_1 - \ln(v_0/v_t)$ и проходит через начало координат. Кроме того, относительное снижение активности фермента (отклика биосенсора) в результате инкубирования не зависит от концентрации субстрата, что особенно важно для оптимизации условий определения ингибитора.

2. Обратимое ингибирование

Кинетическое описание обратимого ингибирования сложнее, чем необратимого, поскольку взаимодействие активного центра, субстрата и ингибитора может протекать различным образом



Здесь E-S-I — фермент-субстрат-ингибиторный комплекс, K_i и αK_i — константы равновесия взаимодействия фермента и ингибитора, k_1 , k_{-1} , k_2 , αk_{-1} , βk_2 — константы скорости соответствующих стадий ферментативной реакции. Обычно для ингибиторов $\alpha > 1$ и $\beta < 1$, но при $\beta \rightarrow 0$ коэффициент α может быть < 1 . Для активаторов ферментов, кинетика действия которых описывается тем же уравнением, $\alpha < 1$, $\beta > 1$.

Зная зависимости скорости реакции от концентраций субстрата и ингибитора, можно определить тип ингибирования и константы K_i и αK_i .^{88,89} На практике часто встречаются предельные случаи. Так, если $\alpha \rightarrow \infty$, имеет место полное конкурентное ингибирование. К этому случаю относится также взаимодействие фермента с необратимым ингибитором в присутствии субстрата. Если $\alpha \rightarrow 0$, ингибирование называют бесконкурентным. Соответствующие константы образования ингибиторных комплексов K_i и αK_i называют константами конкурентного и бесконкурентного ингибирования. Смешанный тип ингибирования характеризуется сочетанием конкурентного и бесконкурентного торможения, т.е. идет связывание ингибитора и с активным центром фермента, и с фермент-субстратным комплексом. Неконкурентное ингибирование является частным случаем смешанного ингибирования при $\alpha = 1$, $\beta = 0$.

По зависимости относительного изменения скорости ферментативной реакции от концентраций субстрата и ингибитора определяют конкурентную (K) и неконкурентную (K') составляющие смешанного ингибирования

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{K_M(1 + c_1/K) + c_s(1 + c_1/K')}{K_M}, \quad (5)$$

где v_0 — скорость реакции в отсутствие ингибитора, v_i — скорость реакции в присутствии ингибитора, K_M — константа Михаэлиса ферментативной реакции в отсутствие ингибитора.

Суммарное ингибирующее действие выражает приведенная константа ингибирования

$$\bar{K}_i = \frac{K_i K'_i}{K_i + K'_i}.$$

Константы k_{II} и K_i характеризуют чувствительность фермент-субстратной системы к ингибитору. Их значения могут быть использованы для идентификации ингибиторов с помощью набора ферментов, характеризующихся различной чувствительностью к токсикантам. Если эксперименты проводят в одинаковых условиях (время инкубирования для необратимых ингибиторов, концентрация субстрата для обратимых ингибиторов), то достаточно определить относительные изменения скорости реагирования по формулам:

необратимое ингибирование

$$\frac{(k_{\text{II}})_1}{(k_{\text{II}})_2} = \left(\ln \frac{v_0}{v_i} \right)_1 / \left(\ln \frac{v_0}{v_i} \right)_2;$$

обратимое ингибирование

$$\frac{(\bar{K}_i)_1}{(\bar{K}_i)_2} = \frac{\left(\frac{v_0}{v_i}\right)_1}{\left(\frac{v_0}{v_i}\right)_2}.$$

Индексы 1 и 2 относятся к кинетическим данным, полученным с использованием ферментных препаратов, различающихся степенью чистоты, способом и источником выделения и т.д.⁹⁰

Аналогично оценивают относительную чувствительность ферментов к определенной группе ингибиторов. Например, чувствительность ХЭ из разных источников можно характеризовать относительной величиной

$$\exp\left(\sum_n \frac{\ln(k_{\Pi}^i/k_{\Pi}^0)}{n}\right),$$

где индекс i относится к ферменту, относительная чувствительность которого рассчитывается, индекс 0 — к ферменту, по которому определяется чувствительность, n — число ингибиторов. Для каждого инсектицида устанавливается отношение соответствующих констант ингибирования k_{Π} и проводится суммирование по всем изученным пестицидам.⁹¹

Оценка параметров ингибирования в случае иммобилизованных ферментов, в том числе включенных в состав биосенсоров, возможна в случае кинетического режима реагирования. Лучше всего для этого подходят биосенсоры, в которых фермент иммобилизован на поверхности электрода (без носителя) или в тонком гидрофильном слое, существенно не меняющем коэффициенты диффузии субстрата и ингибитора. В качестве носителя могут использоваться альбумин, полисилоксаны, силикаты, гидрофильные полимеры типа Eastman AQ 55D и т.д.

Косвенным свидетельством отсутствия диффузионных ограничений является выполнимость уравнений формальной кинетики по Михаэлису–Ментен. В частности, для тирозиназного или пероксидазного биосенсоров мерой скорости ферментативного процесса может служить ток (I) восстановления продукта (хинона) или окисленной формы медиатора. Градуировочная зависимость для субстрата линейризуется в двойных обратных координатах $I^{-1} - c_S^{-1}$, а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, дает величину K_M^{-1} , аналогично уравнению Лайнуивера–Берка. Используют и другие анаморфозы кинетических кривых, известные для гомогенной ферментативной кинетики. Так, градуировочный график определения обратимого конкурентного или неконкурентного ингибитора при постоянной концентрации субстрата линейризуется в координатах $I^{-1} - c_I^{-1}$, при этом по отрезку, отсекаемому на оси абсцисс, оценивают константу ингибирования K_i .²⁴

В некоторых случаях вместо отклика биосенсора предпочтительнее использовать степень ингибирования фермента (Y). Тогда появляется возможность применять в расчетах данные, полученные для различных экспериментальных условий. Например, величина Y связана с откликом амперометрического биосенсора соотношением

$$Y = \frac{c_{E-I}}{c_{E-I} + c_E} = \frac{c_I}{c_I + K_i} = \frac{\Delta I}{I_0}, \quad (7)$$

где c_{E-I} , c_E и c_I — концентрации фермент-ингибиторного комплекса, свободных центров фермента и ингибитора соответственно, ΔI — изменение отклика биосенсора в результате ингибирования и I_0 — отклик биосенсора до контакта фермента с ингибитором.^{29,31–34} При выводе уравнения (7) *a priori* предполагался полный конкурентный характер ингибирования: только в этом случае снижение отклика будет пропорционально концентрации фермент-ингибиторного комплекса.

В практических целях для определения K_i линейризуют соотношение (7) в координатах $Y/c_I - Y$ (уравнение Скэтчарда)³¹

$$\frac{Y}{c_I} = -\frac{Y}{K_i} + \frac{I_0}{K_i} \quad (8)$$

или в координатах $Y/(1-Y) - c_I$ (уравнение Хилла)⁹²

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{I}{I_0 - I} = \left(\frac{c_I}{K_i}\right)^x = \left(\frac{c_I}{I_{50}}\right)^x, \quad (9)$$

где x — эмпирический коэффициент Хилла; $x = 1$ в случае механизма Михаэлиса–Ментен, для органических растворителей значение x увеличивается до 3–4.^{18,22,29} Коэффициент Хилла служит критерием как эффективности катализа I_0/K'_M (K'_M — экспериментальное значение константы Михаэлиса), так и влияния растворителя на кинетику ферментативной реакции.

Уравнения (7)–(9) получены в предположении, что отклик биосенсора пропорционален скорости ферментативной реакции. В целом же зависимость $v - I$ имеет сигмоидный характер и аппроксимируется линейной зависимостью в узком диапазоне концентраций субстрата или ингибитора.

Для необратимого ингибирования бимолекулярную константу ингибирования рассчитывают по уравнению (3). Выразив v_0/v_i через степень ингибирования Y , получим следующее отношение:

$$k_{\Pi} = -\frac{\ln(1-Y)}{c_I \tau}. \quad (10)$$

Графики линейризуются в координатах $\ln(1-Y) - c_I$ либо, если выражать степень ингибирования в процентах, $\ln(100-Y) - c_I$.⁹³

При использовании кинетических параметров k_{Π} , K_i для сравнительной характеристики фермент-ингибиторной специфичности следует помнить, что в них нет прямой информации об аналитических характеристиках определения ингибиторов, таких как предел обнаружения или диапазон определяемых содержаний.

IV. Оптимизация рабочих условий определения ингибиторов

1. Концентрация субстрата

При выборе рабочих условий эксперимента определяющее значение имеет подбор рабочей концентрации субстрата. Для необратимого ингибирования относительное снижение скорости ферментативной реакции не зависит от условий измерения. Если принять статистически значимым изменение скорости ферментативной реакции на 15–25%, то предел обнаружения, оцененный по уравнению (3), составит $(0.13 - 0.22)/k_{\Pi}\tau$. В частности, при определении фосфорорганических пестицидов ($\tau = 2 - 30$ мин, $k_{\Pi} = 10^5 - 10^7$ моль $^{-1}$ ·л·мин $^{-1}$) расчетное значение предела обнаружения на уровне $10^{-9} - 10^{-7}$ моль·л $^{-1}$, что согласуется с литературными данными по ферментативному определению пестицидов с помощью нативной ХЭ.^{8,86,94}

Чтобы найти отношение v_0/v_i , можно использовать любые свойства системы, линейно связанные с концентрациями реагентов, например время достижения заданной (обычно не более 30%) степени превращения субстрата:

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{t_i}{t_0},$$

где t_0 и t_i — времена ферментативных реакций до и после контакта фермента с ингибитором соответственно.

Выбор малых начальных концентраций субстрата ($c_S \ll K_M$) имеет свои преимущества. Так, если субстрат участвует в нескольких ферментативных реакциях (примеси в исходном препарате ферментов с низкой субстратной специфичностью, существенное различие кинетических параметров изоферментов) или если с одним и тем же ферментом реагируют несколько субстратов, общий вид уравнения скорости целевой ферментативной реакции усложняется

$$v_0^1 = \frac{v_{\max}^1 c_S^1}{\left[1 + \sum_{i=2}^n \frac{c_S^i}{K_M^i}\right] K_M^1 + c_S^1}, \quad (11)$$

где $v_{\max}^1$ — максимальная скорость ферментативной реакции; индекс 1 относится к целевой ферментативной реакции, скорость которой изучают, а индекс i — к параллельно протекающим реакциям с конкурирующими субстратами ферментами. Если же начальную концентрацию субстрата c_S^1 выбрать достаточно малой ($c_S^1 \ll K_M^1$), уравнение упрощается

$$v_0^1 = \frac{v_{\max}^1}{K_M^1} c_S^1,$$

и влиянием параллельно протекающих реакций можно пренебречь.⁹⁵

Для конкурентного и конкурентно-смешанного ($\alpha > 1$) ингибирования предел обнаружения ингибитора уменьшается с увеличением концентрации субстрата. При $c_S \ll K_M$ предел обнаружения загрязнителей окружающей среды наиболее распространенными методами (при $K_i = 10^{-4} - 10^{-6}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) составляет $(0.15 - 0.25) K_i$ (порядка $10^{-5} - 10^{-7}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$).

При $c_S \gg K_M$ предел обнаружения неконкурентного ингибитора ($\alpha = 1$) не зависит от концентрации субстрата. Для бесконкурентного и неконкурентно-смешанного ($\alpha < 1$) типов ингибирования предел обнаружения ингибитора снижается с увеличением концентрации субстрата. В остальных случаях увеличение концентрации субстрата сопровождается увеличением предела обнаружения ингибитора.

При оценке предела обнаружения необходимо помнить, что определение ингибирующего эффекта основано на результатах двух измерений отклика — до и после контакта фермента с ингибитором. Поэтому минимальное значение степени ингибирования определяется удвоенной погрешностью измерения отклика биосенсора на субстрат. В качестве предварительной оценки можно использовать метрологическую характеристику сенсора, входящего в состав биосенсора. Так, стационарный ток окисления или восстановления на твердых электродах может быть измерен с погрешностью $\sim 1 - 2\%$, потенциал ионоселективного электрода — $\sim 3\%$. Следовательно, минимально значимое ингибирование соответствует снижению амперометрического отклика не менее чем на $2 - 4\%$ и потенциометрического — $\sim 6\%$. Даже в тех случаях, когда градуировочный график для определения ингибитора строится по абсолютной величине отклика, предполагается, что начальный отклик биосенсора (до его контакта с ферментом) постоянен. Другими словами, погрешность измерения отклика биосенсора после контакта с ингибитором включает погрешность измерения отклика на субстрат. С учетом этого при выборе способов детектирования с использованием необратимых, неконкурентных, бесконкурентных и неконкурентно-смешанных ингибиторов предпочтение следует отдавать тем способам, которые обеспечивают более точное измерение отклика биосенсора, а не возможность определения более низкой концентрации субстрата. В других случаях преимущество будут иметь сенсоры, для которых возможно максимально уменьшить рабочую концентрацию субстрата.

2. Реактивация фермента

Восстановление ферментативной активности после измерения ингибирующего эффекта — обязательная процедура, необходимая для достижения многократности использования биосенсора. Для обратимых ингибиторов она достигается промывкой биосенсора или ферментсодержащей мембраны рабочим буферным раствором, в который могут быть добавлены стабилизаторы или кофакторы фермента для предотвращения его инактивации. В некоторых случаях процесс естественной реактивации протекает столь медленно, что в реальных условиях эксперимента необходимо использовать специальные реагенты, ускоряющие расщепление фермент-ингибиторного комплекса. Например, при определении тяжелых металлов — это комплексообразователи или осадители (ЭДТА, иодид калия, серосодержащие органические соединения, такие как цистеин, дитиотреитол и др.);^{36, 51, 52, 96, 97} при анализе органических ингибиторов в качестве реактиваторов часто применяют антитоды — вещества, используемые как противоядия при отравлении человека. Так, для реактивации ХЭ после ее контакта с фосфорорганическими соединениями используют 2-РАМ (2-пиридинальдоксим метиодид) или ТМБ-4 (1,1-триметиленбис(4-оксиминометил)пиридинийдидбромид моногидрат), ускоряющие гидролиз фосфорилированного активного центра фермента.⁹⁸

Эффективность реактивации зависит от природы реактиватора, степени ингибирования фермента, природы носителя, времени между ингибированием и реактивацией. К примеру, в результате реактивации фосфорилированной ХЭ при степени ингибирования $\sim 70\%$ восстанавливается $95 - 100\%$ исходной активности, так что можно провести $15 - 20$ измерений с одним и тем же препаратом иммобилизованного фермента.⁸ Если в качестве ингибитора выступают соли тяжелых металлов, реактивация составляет $70 - 80\%$, если фермент иммобилизован в нитрате целлюлозы,⁹⁶ и $\sim 100\%$, если в качестве носителя выступает желатин.⁹⁷

Действие реактиваторов так же, как и самих ингибиторов, является строго избирательным, поэтому реактиваторы могут использоваться для разделения ингибирующего эффекта отдельных токсикантов, находящихся в одном растворе, и для селективного определения отдельных ингибиторов. Так, предложено определять ионы Fe(III) по их реактивирующему действию на пероксидазу, ингибированную цианидами или салициловой кислотой,⁵³ ЭДТА — по реактивирующему действию на уреазу, ингибированную ионами Cu(II).⁵² Добавки иодида натрия позволяют разделить ингибирующее действие Ag(I) и Hg(II) и других ионов тяжелых металлов на уреазу⁵¹ и на ХЭ.⁹⁸

Действие избыточных количеств реактиваторов может снизить активность фермента, вплоть до полной и необратимой инактивации в результате удаления из активного центра кофакторов или образования более сильных ингибиторов — продуктов взаимодействия реактиватора и удаляемого токсиканта.⁹⁹ Но в некоторых случаях реактиваторы, наоборот, выступают как аллостерические активаторы ферментов.

3. Кислотность рабочего раствора

Активность фермента и его чувствительность к ингибитору имеют выраженную pH-зависимость, поэтому при определении ингибиторов большую роль играет правильность подбора буферного раствора и его pH.

В подавляющем большинстве работ оптимизация состава среды измерения ориентирована на достижение максимального отклика биосенсора на субстрат, а не на ингибитор. Действительно, во многих случаях, особенно для необратимого и неконкурентного обратимого ингибирования, значение pH среды, соответствующее максимальному

ингибирующему действию, достаточно близко к значению рН, соответствующему оптимальному функционированию фермента (например, при определении цианидов с помощью цитохромоксидазы,¹⁸ дитиокарбаминатов, цианидов — с помощью тирозиназы и пероксидазы,^{27, 59} фосфорорганических пестицидов — с помощью ХЭ и тирозиназы^{8, 30}). Во всех случаях, когда ингибиторы оказывают конкурентное или необратимое ингибирующее действие, максимальная чувствительность отклика амперометрического биосенсора к ингибитору характеризуется отношением I_0/K_i и определяется величиной отклика биосенсора на субстрат.

Во многих случаях рН буферного раствора может существенно влиять на степень ингибирования. В частности, такое влияние наблюдается, если ингибитор участвует в кислотно-основных реакциях, причем только одна из равновесных форм взаимодействует с ферментом. Например, рН-зависимость ингибирующего действия ионов металлов на ХЭ обусловлена накоплением в растворе гидроксокомплексов металлов MOH^+ , оказывающих конкурентное ингибирующее действие на фермент.¹⁰⁰ В результате действие ионов Cu(II) , Ni , Fe(II) проявляется в очень узком диапазоне рН, ограниченном в щелочной области началом выпадения соответствующих гидроксидов. Вероятно, с гидролитической устойчивостью ингибитора связано оптимальное значение рН, равное 5.0, при определении ионов Hg(II) с помощью пероксидазы в присутствии тиомочевин.⁵³ Коллоидные растворы гидроксидов тяжелых металлов также способны ингибировать ферменты, по крайней мере, при достаточно продолжительной инкубации. Так, ингибирующее действие солей двухвалентной ртути на уреазу изучали при рН 8.9,¹⁰¹ наибольшее ингибирующее действие ионов бериллия на щелочную фосфатазу проявляется при рН 9.8.¹⁰²

Другая причина смещения рН от оптимальных значений — неустойчивость ингибитора. Некоторые фосфорорганические пестициды спонтанно гидролизуются в щелочной среде, что заметно снижает воспроизводимость ингибирования нативной и иммобилизованной ХЭ.⁸

При иммобилизации фермента может измениться значение рН, соответствующее оптимальной ферментативной активности, и чувствительность фермента к ингибитору. Это обусловлено изменением констант ионных равновесий вследствие различий диэлектрической проницаемости, а также ионной силы микроокружения активного центра фермента и раствора. Носитель фермента и балластный белок как полиэлектролиты могут выполнять ионообменные функции, дополнительно увеличивая буферную емкость микроокружения фермента и уменьшая скорость отвода в раствор ионов водорода, образующихся в ферментативной реакции.^{78, 103} Поэтому результаты исследования нативных ферментов требуют уточнений при переходе к иммобилизованным ферментам. Так, при иммобилизации ХЭ путем микрокапсулирования в тринитрате целлюлозы максимум ферментативной активности и чувствительности к фосфорорганическим пестицидам смещается в щелочную область, до рН 9–10.¹⁰⁴ При иммобилизации того же фермента на бумаге оптимум рН не меняется (7.5–8), но уменьшается чувствительность отклика биосенсора к рН раствора по сравнению с аналогичной зависимостью в случае нативного фермента.⁸

Иногда при изменении рН-зависимости ингибирования в результате иммобилизации расширяется круг определяемых соединений. Так, гидразониевые соли диалкилдитиофосфатов проявляют ингибирующее действие на карбоксиэстеразу микроорганизмов при рН 3.5–4.5 и не действуют на нативную ХЭ. В то же время они обратимо ингибируют тот же фермент, иммобилизованный на бумаге, с положим максимумом при рН 6.0.¹⁰⁵

При включении иммобилизованных ферментов в состав биосенсоров рабочий диапазон рН может сужаться из-за неустойчивости материала сенсора. Например, разрушение

материала электрода ограничивает максимальное значение рН функционирования холинэстеразного биосенсора на основе угольно-эпоксидной композиции:¹⁰⁶ определение фосфорорганических пестицидов проводилось при рН 7.0, хотя максимум активности фермента находился в диапазоне рН 8.0–9.0. При использовании медиаторов электронного переноса отклик оксидоредуктазных биосенсоров также приобретает рН-зависимость, связанную с изменением редокс-потенциала медиатора.^{35, 107, 108}

4. Присутствие эффекторов

Действие веществ, присутствующих в растворе и влияющих на активность фермента, складывается неаддитивно. Исключение составляют лишь необратимые ингибиторы в низких концентрациях.

Присутствие обратимого эффектора и субстрата снижает необратимое ингибирующее действие благодаря так называемому защитному эффекту.¹⁰⁹ На стадии инкубирования активный центр фермента связывается с обратимым эффектором в лабильный комплекс, недоступный воздействию необратимого ингибитора. После добавления субстрата комплекс распадается, и наблюдается частичное восстановление ферментативной активности. В большинстве случаев защитный эффект ухудшает аналитические характеристики определения необратимых ингибиторов: любые эффекторы, содержащиеся в анализируемом образце, в том числе такие распространенные, как соли щелочных и щелочноземельных металлов, в определенных концентрациях могут повышать предел обнаружения необратимого ингибитора. Поэтому в методиках ферментативного определения загрязнителей окружающей среды оговаривается максимально допустимое содержание солей в образце, независимо от того, идет ли речь об использовании нативного фермента или биосенсора.

В ряде случаев установлено синергическое действие эффекторов фермента, позволяющее либо существенно снизить предел обнаружения ингибитора, либо повысить селективность определения. Так, пероксидаза позволяет с высокой чувствительностью определять содержание солей тяжелых металлов, причем ингибирующее действие Hg(II) , Pb , Cd и Bi(III) возрастает после предварительного инкубирования фермента с тиомочевинной — реагентом, проявляющим неспецифическое инактивирующее действие на ферменты, а для Bi(III) — в присутствии 1,4-дитиотреитола.^{54, 55} При использовании в качестве субстрата *o*-дианизидина предел обнаружения Hg(II) составляет $1 \cdot 10^{-5} \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, а 3,3,5,5-тетраметилбензидина — $3 \cdot 10^{-6} \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Определению мешают лишь кадмий и висмут соответственно при 1000- и 10000-кратных избытках по отношению к ртути. Напротив, ртутьорганические соединения снижают ингибирующее действие серосодержащих соединений (фенилтиомочевин, 1,4-дитиотреитола). Таким образом, меняя продолжительность инкубационного периода, природу субстрата и второго эффектора, можно варьировать селективность и чувствительность метода.

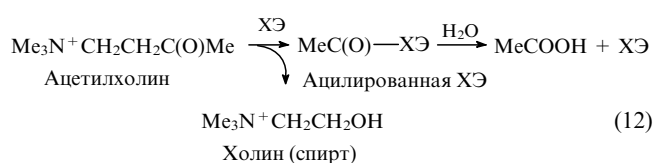
В присутствии ионов магния повышается чувствительность определения ионов цинка¹¹⁰ и бериллия¹⁰² с помощью щелочной фосфатазы, но обычно снижается воспроизводимость сигнала. Резкое увеличение чувствительности ХЭ к пестицидам (хлорофосу, 2,4-Д, ДДТ) и тяжелым металлам отмечено¹⁰⁴ в измерениях отклика в щелочной среде в боратном буфере при наличии ионов кальция. Эффект проявляется в достаточно узком диапазоне рН и концентраций эффектора. Интересно, что 2,4-Д и ДДТ не ингибируют нативную ХЭ, так что речь может идти либо о совместном действии ионов кальция и молекул пестицида на активный центр фермента, либо о косвенной индикации токсикантов, например, по снятию активирующего действия ионов кальция на ХЭ при его включении в комплекс с ингибитором или в

результате пространственного блокирования доступа гидрофобных молекул пестицида в ферментсодержащую мембрану.

V. Биосенсоры на основе холинэстераз

Холинэстераза наиболее широко применяется, поэтому она заслуживает отдельного рассмотрения. На долю этого фермента приходится до 60% всех публикаций, связанных с использованием биосенсоров. Интерес к ХЭ специалистов в области эколого-аналитического контроля и токсикологии обусловлен широким кругом ингибиторов, охватывающим такие распространенные токсиканты, как фосфорорганические соединения, соли тяжелых металлов, поверхностно-активные вещества.^{8, 86, 94}

Ацетилхолинэстераза обеспечивает гидролитическое расщепление природного нейротрансмиттера — ацетилхолина, т.е. отвечает за дискретность прохождения нервного импульса.¹¹¹



Различные виды ХЭ отличаются субстратной специфичностью: ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7) с наибольшей скоростью гидролизует ацетилхолин и не способна гидролизовать бутирилхолин. Активность АХЭ ингибируется в избытке субстрата, поскольку реакцию деацилирования тормозит связывание второй молекулы ацетилхолина с анионным участком ацилфермента.¹¹² Бутирилхолинэстераза (БХЭ, КФ 3.1.1.8) с наибольшей эффективностью катализирует гидролиз бутирилхолина, но может также реагировать с ацетилхолином. Поэтому ее называют еще ложной, или неспецифической, в отличие от истинной, специфической АХЭ.

В настоящее время в промышленных масштабах выпускают различные препараты ХЭ, в том числе наиболее популярные в ферментативных методах анализа АХЭ из электрического угря («Sigma», США; «Boehringer», Германия) и БХЭ из сыворотки крови лошади (АО «Биомед», Пермь; «Sigma», США). Препараты выпускают в кристаллической форме, АХЭ — также в растворе сульфата аммония.

Необратимыми ингибиторами ХЭ являются многие органические эфиры фосфорной, фосфоновых и пиррофосфорной кислот, карбаминаты, эфиры сульфоновых кислот. Их действие на активность ХЭ специфично, они ковалентно связываются с активным центром фермента, образуя фосфорилированную (карбамоилированную, сульфонируемую) ХЭ. Тионовые фосфорорганические соединения (метафос, диазинон, карбофос и др.) проявляют очень слабое обратимое ингибирующее действие на ХЭ *in vitro*. Это связано с неспособностью атома тионной серы образовывать водородные связи с гидроксильной группой серина-200. При попадании в организм насекомых тиофосфорные пестициды окисляются под действием неспецифических оксидаз до кислородных аналогов: из метафоса образуется параоксон, из карбофоса — малаоксон и т.д.¹¹³ В результате ингибирующее действие пестицидов возрастает в 10 000 раз и более. Метаболическая активация инсектицида в результате так называемого летального синтеза снижает риск острого отравления для человека при сохранении высокой инсектоакарицидной активности препаратов. При определении тионовых пестицидов с помощью ХЭ их предварительно окисляют в соответствующие кислородные аналоги бромной водой¹¹⁴ или 50%-ной азотной кислотой.¹¹⁵ Разработана также эффективная методика окисления тиофосфатов хло-

ром или бромом, генерируемыми *in situ* в гальваностатическом электролизе.¹¹⁶

Обратимыми ингибиторами ХЭ являются соли четвертичных аммониевых оснований, акридиновые производные, ионы металлов. Активность ХЭ снижается также в присутствии полярных органических растворителей, смешивающихся с водой.¹¹⁷

Холинэстеразу широко применяют для определения остаточного количества фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в воде, водных и водно-органических экстрактах из растительного материала, почв, продуктов питания. В табл. 2 приведены литературные данные за 1993–1998 гг. о холинэстеразных биосенсорах, предназначенных для определения пестицидов.

Фермент-ингибиторная специфичность. Аналитические характеристики определения ингибиторов ХЭ в значительной степени зависят от источника фермента. Наибольшей чувствительностью к фосфорорганическим пестицидам отличаются ХЭ насекомых.^{91, 150, 151} Так, константа ингибирования k_{II} ДДВФ составляет $5 \cdot 10^5$ моль⁻¹·л·мин⁻¹ для ХЭ из *Drosophila melanogaster*; а для АХЭ из эритроцитов крови быка она $< 10^3$ моль⁻¹·л·мин⁻¹ (см.⁹¹). Холинэстераза из таракана-пруссакса позволяет определять ДДВФ в концентрации $8 \cdot 10^{-9}$ моль·л⁻¹, тогда как при использовании ферментов из млекопитающих в тех же условиях предел обнаружения в 10–100 раз больше.¹⁵⁰ Холинэстеразы из насекомых чувствительны также к действию хлорорганических пестицидов (2,4-Д, ДДТ и др.), оказывающих, по-видимому, обратимый ингибирующий эффект.

Указанные ферменты сложно выделить в достаточных количествах, поэтому их практическое применение ограничено. В будущем, возможно, ситуация изменится благодаря развитию геной инженерии. Уже описано получение АХЭ *Drosophila melanogaster* путем включения в генетический аппарат микроорганизмов мутантного гена, ответственного за синтез фермента. Удалось получить несколько миллиграммов АХЭ на литр культуральной жидкости. Такой ферментный препарат, хотя и имеет более низкую активность, чем природная АХЭ из того же источника, отличается более высокой чувствительностью к фосфорорганическим и карбаминатным пестицидам.⁹¹

Для аналитического определения ингибиторов перспективны ХЭ из сыворотки крови¹⁵² и головного мозга рыб,¹⁵³ птиц,¹⁵⁴ зрительного ганглия кальмара.¹⁵⁵ Проблемы низкой устойчивости могут быть частично решены путем иммобилизации ферментов в желатине или агаре.

В большинстве холинэстеразных биосенсоров используют всего три коммерческих препарата ХЭ — АХЭ из электрического угря *Electrophorus electricus*, из эритроцитов крови быка и БХЭ из сыворотки крови лошади. Сопоставление аналитических характеристик (см. табл. 2) показывает, насколько трудно оценить фермент-ингибиторную специфичность для различных биосенсоров. Так, предел обнаружения параоксона по ингибированию АХЭ из электрического угря варьирует от $n \cdot 10^{-7}$ (см.^{47, 134}) до $4 \cdot 10^{-11}$ моль·л⁻¹ (см.¹³⁶), для хлорофоса (трихлорфоса) и его действующего начала ДДВФ расхождение порога обнаружения составляет 5 порядков величины — от $n \cdot 10^{-11}$ (см.¹⁰⁴) до $n \cdot 10^{-6}$ моль·л⁻¹ (см.¹³⁴).

Экспериментальные значения k_{II} , найденные для АХЭ из электрического угря, меньше, чем для БХЭ из сыворотки крови лошади. Они составляют по различным данным соответственно $< 10^3$ – $4 \cdot 10^4$ и $8 \cdot 10^4$ – $2 \cdot 10^5$ моль⁻¹·л·мин⁻¹ (см.^{86, 91, 156}). В то же время чувствительность определения хлорофоса с помощью ацетилхолинэстеразных биосенсоров выше, а предел обнаружения — ниже, чем соответствующие аналитические характеристики бутирилхолинэстеразных биосенсоров. Причина этого расхождения, как и многих других подобных расхождений, может быть связана с диффузионным торможением реагирования. Коммерческие препа-

Таблица 2. Характеристики методов определения пестицидов с помощью биосенсоров на основе ХЭ и параметры определения: диапазон определяемых концентраций (c , моль $\cdot$ л $^{-1}$) и ПО (моль $\cdot$ л $^{-1}$).

Источник фермента, субстрат	Иммобилизация/стабилизация	Способ детектирования	Условия определения	Пестицид	Параметры определения		Примечание	Ссылки
					c	ПО		
Потенциометрические биосенсоры								
АХЭ из электрического утря, БХЭ из сыворотки крови лошади, ацетил- и бутирилхолин	Кросс-сшивка с альбумином парами глутарового альдегида	рН-ИСПТ; кондуктометрический (Pt-электроды)	Фосфатный буферный раствор, $2.5 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, рН 7.4, $c_s = 8 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, инкубирование 10 мин	Трихлорфон	–	10^{-7} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-6}	АХЭ БХЭ АХЭ БХЭ	118–120
			Цитратный буферный раствор, 0.1 моль $\cdot$ л $^{-1}$ + MgCl ₂ , рН 7.2, $c_s = 1 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, инкубирование 10 мин	Хлорофос	–	$2 \cdot 10^{-7}$ $2 \cdot 10^{-6}$	Проточно-инжекционный режим	121
АХЭ из электрического утря, ацетилхолин	Сорбция на активированном нейлоне (биодин и иммунодин)	рН-ИСПТ	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0 и 9.0, $c_s = 2 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$	Малатион	–	0.1 ^a	Инкубирование 1 ч	122
БХЭ из сыворотки крови лошади, бутирилхолин	Кросс-сшивка полиэтиленмин-ом с пероксидазой и холинсидазой на угольных электродах	Стеклоуглеродный электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.5, $c_s = 1 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, инкубирование 10 мин	Трихлорфон	$10^{-9} - 10^{-5}$ –	– $2 \cdot 10^{-13}$	Нативная БХЭ Иммобилизованная БХЭ	123
			Фосфатный буферный раствор, рН 7.9, $c_s = 2 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, инкубирование 10 мин	Диазинон Золон ДДВФ	0.003–0.3 ^a 0.002–0.3 ^a 0.001–0.4 ^a 0.004–0.4 ^a 0.004–0.7 ^a 0.5–5.0 ^a 0.2–1.0 ^a 0.1–2.0 ^a	– – – – – – – –	Бумага, желатин НЦ Бумага Желатин НЦ Бумага Желатин НЦ	93, 124
	Кросс-сшивка глутаровым альдегидом на бумаге, в желатине и нитрате целлюлозы (НЦ)	Стекланный рН-ИСЭ	То же	Диазинон в присутствии СПАВ	–	На уровне 10^{-9}		125
				ДДВФ Фозалон	$6.7 - 3.5^b$ $7.5 - 5^b$	– –		40
Амперометрические биосенсоры								
АХЭ из электрического утря, ацетилтиохолин	БХЭ в рабочем буферном растворе	Холиноксидазный сенсор на основе Pt–H ₂ O ₂ -сенсора	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0, БХЭ 0.4 Е $\cdot$ мл $^{-1}$, 30°С, $c_s = 3 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$	Параоксон	–	0.5 ^c	Инкубирование 30 мин	126
			–	–	0.2 ^c	Инкубирование 1 ч		
АХЭ из электрического утря, ацетилтиохолин	Включение в угольную пасту с эпоксидной смолой	Угольно-пастовый электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0, $c_s = 1 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$	Карбофуран Карбарил Параоксон Дихлорфос	– – – –	2.2 ^c 20 ^c 2.7 ^c 22 ^c	Без инкубации	106

Таблица 2 (продолжение).

Источник фермента, субстрат	Иммобилизация/стабилизация	Способ детектирования	Условия определения	Пестицид	Параметры определения		Примечание	Ссылки
					ϵ	ПО		
АХЭ из эритроцитов кро- ви быка, ацетилтиохолин	Кросс-сшивка карбодимидом на стеклоглелерде	Вращающийся дисковый электрод	Универсальный буферный раствор, рН 8.0	Трихлорфон	—	—	$K_i = 5.7 \cdot 10^{-7}$ (см. ^g) $pI_{50} = 4.37^e$	127, 128
АХЭ из электрического утря, 4-аминофенил- ацетат	Кросс-сшивка с альбумином на найлоне глутаровым альдегидом	Платиновый электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 8.0, $\epsilon_s = 1.2 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л ⁻¹ , инкубирование 5 мин	Карбарил Параоксон	$5 \cdot 10^{-7} - 5 \cdot 10^{-5}$ $5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-7}$ $1 \cdot 10^{-7}$		129, 130
АХЭ из электрического утря, ацетилхолин	Кросс-сшивка глутаровым альдегидом	Холиноксидазный сенсор на основе Pt-H ₂ O ₂ -электрода	Фосфатный буферный раствор + 0.1% NaN ₃ , рН 7.0, инкубирование 30 мин, $\epsilon_s = 5 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л ⁻¹	Параоксон	$1.5 - 15^b$	1.3^b		131
АХЭ из электрического утря, ацетилтиохолин	Включение в фотополлимери- зуемый гель PVA-SbQ (8%)	Платиновый электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 8.0, инкубирование 30 мин, $\epsilon_s = 1.2 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л ⁻¹ , 30°C	Параоксон	$10^{-10} - 10^{-5}$	—	Проточно-инжек- ционное опреде- ление	132
АХЭ из эритроцитов кро- ви быка, ацетилтиохолин	Кросс-сшивка глутаровым альдегидом на магнитном носителе	То же	Фосфатный буферный раствор, рН 8.0	Карбофуран	—	3^b	$k_{II} = 2.6 \cdot 10^{-5}$ (см. ^d)	133
				Параоксон- этил	—	3^b	$k_{II} = 2.1 \cdot 10^{-5}$ (см. ^d)	
				Параоксон- метил	—	7^b	$k_{II} = 1.8 \cdot 10^{-5}$ (см. ^d)	
				Малаоксон	—	7^b	$k_{II} = 1.4 \cdot 10^{-5}$ (см. ^d)	134
АХЭ из электрического утря, БХЭ из сыворотки крови лошади, ацетилтиохолин	Кросс-сшивка двух ферментов и альбумина глутаровым альдегидом	Угльно-пастовый электрод с фтало- цианином кобальта	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0, $\epsilon_s = 5 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л ⁻¹ , 30°C	Карбарил Дихлорфос Параоксон	$5 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-7}$		Без инкубиро- вания	
АХЭ из электрического утря, ацетилтиохолин	Кросс-сшивка карбодимидом на поверхности электрода	Угльно-пастовый электрод с фтало- цианином кобальта	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0, $\epsilon_s = 1 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л ⁻¹ , 37°C, инкубирование 5 мин	Параоксон	—	$3 \cdot 10^{-8}$	Экстракция гептаном	135
	То же	То же	То же, но инкубирование 20 мин	Дихлорфос Параоксон	— —	$6 \cdot 10^{-9}$ $4 \cdot 10^{-11}$		136
АХЭ из эритроцитов быка (be), человека (he), элект- рического утря (ee), БХЭ из сыворотки крови лошади (hu), ацетил- и бутирилтиохолин	Кросс-сшивка с альбумином глутаровым альдегидом	Платиновый микропланарный электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0, $\epsilon_s = 1 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л ⁻¹ , инкубирование 10 мин	Альдикарб	—	$430.^e$ $190.^e$ $3200.^e$ $630.^e$	Соответственно для АХЭ (be), АХЭ (ee), БХЭ (he) БХЭ (hu) То же	137, 138
				Карбарил	—	$30.^e$ $0.092.^e$ $1300.^e$ $>$		
				Карбофуран	—	$> 10^4$ (см. ^g) $3.1.^e$ $0.08.^e$ $>$		
				Метомил	—	$150.^e$ $360.^e$ $39.^e$ $0.19.^e$ $>$		
				Пропоксур	—	$0.88.^e$ $1.9.^e$ $1.5.^e$ $0.68.^e$ $>$ $> 10^4$, $11000.^e$		

Таблица 2 (продолжение).

Источник фермента, субстрат	Иммобилизация/стабилизация	Способ детектирования	Условия определения	Пестицид	Параметры определения		Примечание	Ссылки
					c	ПО		
АХЭ из электрического утря, ацетилхолин	Ковалентная иммобилизация карбодимидом на аффинной мембране UltraBind	Холиноксидазный сенсор на основе Pt-электрода Кларка	Фосфатный буферный раствор, 0.01 моль · л ⁻¹ , рН 7.0, 30°C, c _s = 1 · 10 ⁻² моль · л ⁻¹ , инкубирование 10 мин	Параоксон	—	1 · 10 ⁻⁸ 1 · 10 ⁻⁸	Нативная АХЭ, буфер Нативная АХЭ, 0.05% ацетона или 5% циклогексана Иммобилизованная АХЭ, буфер или 1% ацетона Иммобилизованная АХЭ, 1% циклогексана	139
АХЭ из эритроцитов быка, из электрического утря, БХЭ из сыворотки крови лошади, ацетил- и бутирилхолин	Включение в угольную пасту ферментов, иммобилизованных на аминированном силикагеле	Pt-электрод в сочетании с ферментным реактором	Фосфатный, трис-, боратный растворы, рН 6.0–10.0, c _s = 1 · 10 ⁻⁴ моль · л ⁻¹	Карбофуран	—	2.2 ^c 22.1 ^c 2.0 ^c 2.8 ^c 3.6 ^c	АХЭ БХЭ АХЭ АХЭ БХЭ	140
АХЭ из электрического утря, ацетилхолин	Включение в фотополимеризуемый гель ПВА-SbQ (8%)	Pt-электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 8.0, c _s = 1.2 · 10 ⁻³ моль · л ⁻¹ , 30°C	Дигтерекс	—	5.6 · 10 ⁻⁶		141
АХЭ из электрического утря, ацетилхолин	Включение в пленку Ленгмюра – Блоджетт совместно с холин-оксидазой	Pt-микроэлектрод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.5, c _s = 1 · 10 ⁻³ моль · л ⁻¹	Трихлорфон	—	На уровне 10 ⁻⁶		142
БХЭ из сыворотки крови лошади, бутирилхолин	Кросс-сшивка карбодимидом в агарозном геле в порах угольного электрода	Пористый угольный электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.0, медиатор Meldola Blue, c _s = 4 · 10 ⁻⁴ моль · л ⁻¹ , проточно-инжекционный режим	Параоксон		1.4 ^c		143
БХЭ из сыворотки крови лошади, бутирилхолин	Включение в гель на основе каррагинана совместно с холин-оксидазой	Электрод Кларка	Смесь тексана и хлороформа (1 : 1), насыщенная водой, c _s = 2 · 10 ⁻³ моль · л ⁻¹ , инкубирование 5–20 мин	Параоксон Малатин Этилпаратин Альдикарб Карбарил	9.4–56.4 10.0–40.0 1.0–10.0 10.0–60.0 1.0–10.0	4.5 ^c 4.5 ^c 0.5 ^c 4.5 ^c 0.5 ^c		144
АХЭ из электрического утря, БХЭ из сыворотки крови лошади, ацетил-, бутирилхолин	Кросс-сшивка с альбумином глутаровым альдегидом на нитрате целлюлозы, бумаге	Угольно-пастовый электрод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.9, c _s = 6 · 10 ⁻⁵ моль · л ⁻¹ , проточно-инжекционный режим	Диазинон	8.2–6.3 ^b	—		145
<i>Прочие методы</i>								
АХЭ из электрического утря, БХЭ из сыворотки крови лошади, ацетил-, бутирилхолин	Кросс-сшивка с альбумином глутаровым альдегидом	Кондуктометрический, микропланарные Pt-электроды	Фосфатный буферный раствор, рН 7.5, c _s = 8 · 10 ⁻³ моль · л ⁻¹ , инкубирование 10–60 мин	Параоксон-метил Параоксон Трихлорфон	5 · 10 ⁻⁷ 1 · 10 ⁻⁸ 5 · 10 ⁻⁷ 5 · 10 ⁻¹¹	— — — —	Нижняя граница определяемых содержаний Инкубирование 10 мин	146

Таблица 2 (окончание).

Источник фермента, субстрат	Иммобилизация/стабилизация	Способ детектирования	Условия определения	Пестицид	Параметры определения		Примечание	Ссылки
					c	ПО		
ХЭ, индоксилацетат	Золь-гель-иммобилизация в тетраметилортосиликате	Флуоресцентный оптод	Фосфатный буферный раствор, рН 7.5, $c_s = 1.63 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$	Фенитротрион Азинфосэтил Метидатион Налед Мекарбам	— — — — —	17.8 ^b 17.9 ^b 37.6 ^b 0.36 ^b 13.9 ^b		147
АХЭ из электрического утря, ацетилхолин	Ковалентная иммобилизация изотиоцианатом на стекле	Оптоволоконный сенсор, изменение окраски бромтиолового синего	Трис-буферный раствор, рН 7.5, $c_s = 1 \cdot 10^{-1}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$	Параоксон Карбофуран	$5 \cdot 10^{-7} - 5 \cdot 10^{-6}$ $5 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-7}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$ $1.5 \cdot 10^{-8}$		148
АХЭ из электрического утря, 3-индолиацетат	Кросс-сшивка парами глутарового альдегида	Пьезокристаллический сенсор	Фосфатный буферный раствор, инкубирование 5 мин	Параоксон Карбарил	— —	$5 \cdot 10^{-8}$ $1 \cdot 10^{-7}$		149

Примечание. Приняты следующие обозначения: рН-ИСЭ — рН-чувствительный ионоселективный электрод, ДДВФ — диметил(2,2-дихлорвинил)фосфат, СПАВ — синтетическое поверхностно-активное вещество.

^aРазмерность мг $\cdot$ л $^{-1}$.

^bПриведены значения $p_c = -\lg c$ (моль $\cdot$ л $^{-1}$).

^cРазмерность мкг $\cdot$ л $^{-1}$.

^dРазмерность моль $^{-1}$ $\cdot$ л $\cdot$ мин $^{-1}$.

^eРазмерность моль $\cdot$ л $^{-1}$.

раты АХЭ из электрического угря, как правило, имеют высокую удельную активность, иногда в сотни раз превышающую активность БХЭ из сыворотки крови лошади. Последняя при иммобилизации образует более плотные по сравнению с иммобилизованной АХЭ пленки с высоким содержанием балластного белка. В результате биосенсоры функционируют в диффузионно-кинетическом режиме, и ингибирующее действие пестицида снижается.

Следует отметить, что в некоторых ранних работах предпринимались попытки определения тионовых пестицидов без их предварительного окисления. Так, пределы обнаружения малатиона (карбофоса) без предварительного окисления составили 0.1 (см.¹²²) и даже 1.6–4.6 мг·л⁻¹ (см.^{157, 158}), тогда как после окисления бромной водой — $n \cdot 10^{-4}$ мг·л⁻¹ (см.¹⁵⁹).

С точки зрения токсикологии показательна реакция ингибирования именно АХЭ. Рассчитанные значения константы ингибирования АХЭ (k_{II}) коррелируют со средними летальными концентрациями (ЛК₅₀) для мышей и крыс, а также с санитарно-гигиеническими нормативами ПДК для природных водоемов.^{86, 113, 134} Тем не менее применение БХЭ в составе биосенсоров дает в целом сопоставимые пределы обнаружения пестицидов, отличающиеся не более чем в 100 раз, причем в обе стороны (см. табл. 2). С целью расширения круга определяемых соединений некоторые исследователи идут на сознательное снижение селективности отклика биосенсора, используя совместно несколько ХЭ из различных источников.^{115, 160} С той же целью используют гомогенаты тканей или биологические жидкости с эстеразной активностью (кровь, гомогенаты печени и т.д.).^{161–163} Подбирая субстрат различной специфичности, можно регулировать набор эстераз, активность которых регистрируется. Так, использование индофенилацетата позволяет фиксировать суммарный отклик БХЭ и карбоксилэстераз. С помощью ацетил(тио)холина выделяется отклик АХЭ и БХЭ, а с помощью бутирил(тио)холина — сигнал БХЭ. Это расширяет возможности идентификации токсикантов.

Иммобилизация (стабилизация) ХЭ в ряде случаев имеет определяющее значение. При иммобилизации снижается (реже — повышается) чувствительность биосенсора к ингибитору по сравнению с использованием нативного фермента. Обычно применяют ковалентную иммобилизацию путем кросс-сшивки ХЭ на поверхности электрода или на соответствующем носителе с помощью глутарового альдегида (в парах, в водном растворе)^{118–120, 129, 130, 133, 134, 137, 138, 149} либо карбодиимида (см.^{127, 128, 135, 136, 140}). Снижение активности фермента при ковалентной иммобилизации зависит от концентрации сшивающего реагента, продолжительности обработки, исходной активности фермента и природы носителя. Потери минимальны (20–40% от исходной активности фермента) при получении белковых пленок на основе альбумина, желатина, которые также связываются сшивающим реагентом, и при иммобилизации ХЭ на аминированных носителях типа Immobilon или Biodin. Высокоактивные ферментсодержащие мембраны получают при включении фермента в гидрофильные гели на основе акриламидов,^{79, 159} сополимера поливинилхлорида и пиридина,^{132, 142} полиэтиленimina,^{121, 123} тетраметилортосиликата,¹⁴⁷ полиуретана.¹⁶⁴ Биосенсоры на основе таких мембран характеризуются быстрым откликом на субстрат, однако время жизни иммобилизованного фермента существенно меньше, чем при ковалентной иммобилизации на инертных носителях.

В полевых условиях особенно удобно использовать биосенсоры с датчиком с накладными мембранами, которые легко сменить при инактивации фермента. Для получения накладных мембран используют инертные носители, придающие необходимую механическую прочность. Это могут быть нейлон,^{122, 125, 145, 165, 166} бумага и производные целлюлозы,^{40, 93, 96, 104, 105, 124, 167, 168} гидроксид алюминия,^{164, 169} про-

мышленно выпускаемые мембраны для диализа, иммуноблоттинга или носители для аффинной хроматографии.^{122, 140, 141}

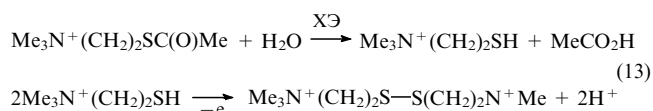
Наибольшие потери (до 99% исходной активности ХЭ) наблюдались при сшивке глобул фермента водными растворами глутарового альдегида на инертных носителях, не взаимодействующих со сшивающим реагентом,¹²⁴ таких как тринитрат целлюлозы или бумага. Столь значительные потери фермента «компенсируются» высокой устойчивостью полученных мембран при хранении (до полугода в сухом состоянии при комнатной температуре) и использовании (более двух недель в буферном растворе в составе биосенсора).

Как правило, при иммобилизации ХЭ не предполагают использовать дополнительные водорастворимые стабилизаторы фермента. Тем не менее, иногда в буферный раствор вводят 0.1–3% глицерина, глицина, неионогенных синтетических поверхностно-активных веществ (СПАВ), 0.01–0.05% желатина, в случае АХЭ — соли магния и кальция, стабилизирующие активность нативного фермента.

При использовании в аналитических целях ХЭ в водном растворе стабилизаторы необходимы, поскольку устойчивость даже свежеприготовленных растворов невелика: ХЭ из насекомых полностью инактивируются в течение нескольких часов,¹⁷⁰ АХЭ из электрического угря устойчивы в концентрированном растворе сульфата аммония. Стабилизаторы могут повышать устойчивость фермента при хранении. Они формируют пленки, в которых фермент находится в твердом растворе. Такие препараты легко растворяются и образуют устойчивые растворы, активность которых не меняется в процессе измерения ингибирующего эффекта. В других случаях стабилизаторы добавляют с той же целью непосредственно в раствор фермента. Введение стабилизаторов снижает также потери ферментативной активности в процессе иммобилизации.¹³⁶ В качестве стабилизаторов ХЭ используют производные целлюлозы, декстрина, другие полиспирты, некоторые неионогенные СПАВ. Их действие может быть обусловлено подавлением неспецифической сорбции белка на стекле или пластике, связыванием ингибиторов (прежде всего ионов переходных металлов) в инертные комплексы, стабилизацией третичной структуры белка. Описано включение ХЭ в пленки трегалозы¹⁶⁹ и *N*-фталилхитозана^{73, 116, 155, 171} с целью создания колориметрических индикаторных устройств для определения ингибиторов ХЭ. Присутствие стабилизаторов подавляет мешающее действие ионов металлов и практически не меняет кинетических характеристик необратимого ингибирования ХЭ фосфорорганическими пестицидами.

При уменьшении диффузионных ограничений реагирования, т.е. в случае более тонкой мембраны и меньшей удельной активности фермента, результаты определения ингибитора, полученные с помощью нативного и иммобилизованного ферментов, сближаются. Поэтому определенное преимущество получают амперометрические биосенсоры, позволяющие за счет более высокой чувствительности определения субстрата использовать мембраны с меньшей активностью фермента, чем в потенциометрических биосенсорах.

Вместе с тем, если сравнивать работу потенциометрических и амперометрических биосенсоров в одних и тех же условиях, преимущества амперометрического детектирования становятся не столь очевидными.⁹⁴ Так, при использовании накладных мембран с ХЭ, иммобилизованной на нейлоне, нитрате целлюлозы или в желатине, потенциометрический биосенсор показал меньшие пределы обнаружения параоксона и ДДВФ.^{93, 172} Возможно, это связано с мешающим влиянием фарадеевских процессов, в частности с дополнительным выделением ионов водорода при окислении тиохолина на электроде.



Расчет бимолекулярных констант ингибирования с использованием градуировочных графиков определения пестицидов с помощью потенциометрического биосенсора с накладными мембранами по уравнению (10) дал завышенные значения по сравнению с ингибированием нативного фермента в тех же условиях. Причиной повышения чувствительности при определении пестицидов с применением иммобилизованной ХЭ может быть сорбционное накопление пестицида на инертном носителе. В частности, это подтверждается тем, что неионогенные СПАВ в концентрациях, не влияющих на активность нативной ХЭ, оказывают дифференцирующее действие на отклик холинэстеразного биосенсора к различным ингибиторам: необратимое ингибирующее действие пестицидов усиливается, а обратимое ингибирующее действие фторидов или ионов тяжелых металлов уменьшается. Присутствие небольших количеств СПАВ подавляет также защитное действие обратимых ингибиторов при определении фосфорорганических пестицидов.¹²⁵ Подобное явление обусловлено сорбцией СПАВ на поверхности мембраны, в результате которой облегчается перенос в мембрану гидрофобных органических молекул пестицидов и затрудняется переход небольших гидрофильных ионов — обратимых ингибиторов ХЭ. Влияние СПАВ максимально при использовании гидрофильных носителей (бумага, нейлон) и минимально для нитратцеллюлозных мембран. В том же ряду меняется различие бимолекулярных констант ингибирования, рассчитанных для нативного и иммобилизованного ферментов. Для гидрофобного нитрата целлюлозы расхождение максимально, для гидрофильной бумаги и желатина — практически отсутствует.^{173, 174}

Повышение чувствительности определения ингибиторов при иммобилизации фермента наблюдалось не только для ХЭ. Зафиксировано снижение пределов обнаружения тяжелых металлов с помощью оксидоредуктаз при их иммобилизации в пленке альбумина: для Hg(II) — с 0.25 до 0.05, для Cu(II) — с 1.00 до 0.05 (алкогольоксидаза), для Ni — с 1.00 до 0.10 (саркозиноксидаза), для Se(IV) — с 0.50 до 0.015 мг · л⁻¹ (глутатионоксидаза).⁴⁴ Возможно, что в этих случаях, помимо неспецифической сорбции, важную роль играет электростатическое взаимодействие ионов металлов с заряженным носителем.

Мониторинг объектов окружающей среды. Практически все данные, приведенные в табл. 2, относятся к модельным растворам, содержащим лишь один ингибитор ХЭ. Применение холинэстеразных биосенсоров для анализа реальных объектов осложнено, во-первых, наличием в пробах значительных количеств природных эффекторов фермента (ионов щелочноземельных металлов, биогенных аминов и др.) и, во-вторых, совместным присутствием нескольких ингибиторов с различными механизмами действия. Это существенно усложняет интерпретацию данных: приходится либо удовлетвориться качественной индикацией присутствия в пробе веществ антихолинэстеразного действия, либо использовать методы предварительного разделения, теряя при этом основные преимущества ферментативных методов анализа — простоту и экспрессность.

В настоящее время налажено промышленное производство тест-устройств на основе ХЭ, предназначенных для контроля остаточных количеств фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания. Это индикаторные наборы с колориметрической индикацией, выпускаемые фирмами «Boehringer Mannheim» (Германия)¹⁷⁵ и «Omicron Environmental Diagnostic Inc.» (США).¹⁷⁶ Они обеспечивают возможность качест-

венного детектирования фосфорорганических пестицидов с пределами обнаружения 0.05–30 мкг · л⁻¹.

В 1970-х годах фирма «Midwest Research Institute» (США) выпускала семейство автоматизированных сигнализаторов САМ-1,2 (Continuous Alarm Monitor), представляющих собой адаптированные к гражданским нуждам сигнализаторы боевых отравляющих веществ нервно-паралитического действия.¹⁶⁴ Сигнализаторы снабжены насосами и аспираторами и работают в полуавтоматическом режиме. С их помощью определяют присутствие в воде и воздухе следующих минимальных количеств пестицидов, мг · л⁻¹: параоксона — 0.1, ДДВФ — 0.2, диазинона — 0.2, дурсбана — 4.3, дифоната — 10, малатиона — 17–70 (в зависимости от марки коммерческого препарата), темика — 0.5, фурадана — 0.75, мезулона — 12, севина — 20. В процессе эксплуатации предусмотрены автоматизированная замена ферментсодержащего полиуретанового реактора, цикл электрохимической очистки электродов, звуковая индикация сигнала о загрязнении.

Для контроля качества вод реки Сена (Франция) использовался потенциометрический биосенсор на основе рН-метрического стеклянного электрода и АХЭ, иммобилизованной на его поверхности в желатине.^{177, 178} Пределы обнаружения пестицидов с помощью такого биосенсора составили, мг · л⁻¹: этилпараоксона — 0.003, метилпараоксона — 0.005, малатиона, этил- и метилпаратиона — 0.014. В ряде стран, в том числе и в России, выпускаются индикаторные трубки на основе ХЭ и хромогенных субстратов для стандартных аспирационных устройств отбора воздуха.¹⁷⁹

В настоящее время возможность использования ХЭ в эколого-аналитическом контроле в первую очередь связана с формированием рынка дешевых электрохимических датчиков, которые могут стать основой массового производства одноразовых холинэстеразных биосенсоров, совместимых со стандартной измерительной техникой (вольтамперографами, иономерами). Датчики могут производиться методом фотолитографии. Благодаря высокотехнологичной схеме производства, малым собственным размерам (несколько квадратных миллиметров) и низкому расходу фермента (~0.1 Е на один электрод), себестоимость таких биосенсоров составит от 1 до 5 долл. США. Уже производятся рН-чувствительные полевые транзисторы и микропланарные кондуктометрические устройства.^{118–120} Разработана технология изготовления печатных металлизированных и угольно-пастовых электродов на пластиковой подложке.¹⁸⁰ Стоимость оборудования, необходимого для их производства, составляет ~30 000 долл. США, что сопоставимо со стоимостью универсального вольтамперографа. В настоящее время печатные электроды выпускаются в Чехии,¹³³ Италии,^{180, 181} Германии.¹⁸² Все они представляют собой комбинацию из рабочего, вспомогательного электрода и электрода сравнения (Ag/AgCl) различной геометрии, смонтированных в едином блоке, иногда попарно для измерений в дифференциальном режиме.

Развитие элементной базы требует адекватного решения методических проблем. Влияние матрицы анализируемого объекта, по-видимому, не имеет решающего значения, как предполагалось ранее.¹¹⁵ Описано применение биосенсоров для определения остаточных количеств фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в овощах, фруктах, соках,^{137, 138, 183} почвах и иловых осадках.^{134, 184} При анализе поверхностных вод единственное ограничение связано с минерализацией, которая не должна превышать 0.1 моль · л⁻¹ (см.^{122, 177}). Следует, правда, оговориться, что правильность определения пестицидов с помощью биосенсоров проверяли методом добавок, а не независимыми методами. Лишь при определении карбаминатных пестицидов в овощах,¹³⁸ фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в фруктах и овощах,¹⁸³ фосфорорганических пестицидов в природных водах (при замораживании и последующем

размораживании контрольных образцов)¹²⁸ правильность определения контролировали с помощью хроматографии. Расхождения результатов составляли ~30%, что признано удовлетворительным.

Разработаны методы упрощенной подготовки проб, позволяющие избежать трудоемкой операции удаления органического растворителя. Так, экстракция ацетоном в течение 10 мин с последующим 10-кратным разбавлением экстракта позволяет надежно регистрировать не более $0.1 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ таких пестицидов, как диазинон, хлорофос или тетраэтилмонотиопирфосфат в зерне пшеницы и в комбикормах.¹⁷² Следует оговориться, что степень экстракции данным способом составляет 60–80%, так что речь может идти только об индикации опасного загрязнения указанных продуктов пестицидами.

Если нет информации о природе токсиканта, то снижение отклика биосенсора не может быть соотнесено с концентрацией вещества. Различие бимолекулярных констант ингибирования не позволяет принять степень ингибирования в качестве меры суммарного содержания (молярного или массового) пестицидов даже в отсутствие осложняющих факторов (диффузионного торможения реагирования, защитного действия эффекторов). Для таких случаев предложена концепция эталонного токсиканта, согласно которой суммарное содержание пестицидов выражается в соответствии с оказываемым ингибирующим действием в единицах концентрации пестицида-эталона. В качестве стандарта предложены ДДВФ,¹⁶⁴ параоксон,¹³² паратион,¹¹⁵ карбарил.^{180, 181} Пересчет ингибирующего действия других пестицидов производится по коэффициентам относительной токсичности. Для их определения используют модельные растворы пестицидов, взятых в равных концентрациях, и рассчитывают отношение степени ингибирования ХЭ (относительное снижение отклика биосенсора). Безусловно, указанные коэффициенты не равны отношению констант ингибирования и зависят от экспериментальных факторов, в том числе от выбора концентрации пестицидов. Такие же ограничения имеют расчеты содержания пестицидов в единицах кратности превышения ПДК.

Дополнительные возможности дифференциации отклика дает использование нескольких биосенсоров, в том числе включающих разные ферменты. В отличие от упоминавшегося выше определения отношения констант ингибирования $(k_{II})_1/(k_{II})_2$ в этом случае результат получается одновременно, что позволяет использовать набор биосенсоров^{47, 63, 185} (или многоканальный мультисенсор^{40, 41}) для измерений *on line* или даже в потоке.

В дополнение к ХЭ используют гидролитические ферменты — уреазу,^{40, 41} кислую и щелочную фосфатазу,^{47, 185} а также глюкозооксидазу.^{40, 41} К сожалению, фермент-ингибиторная специфичность указанного набора ферментов не позволяет проводить одновременное определение качественного и количественного состава ингибиторов. В лучшем случае с использованием хемотретрических методов удастся провести качественную интерпретацию результатов, выделив, например, вклады ионов ртути(II) и суммы пестицидов.¹⁸⁵ Но и при этом остается открытым вопрос о взаимном влиянии компонентов, находящихся в одном растворе (пробе), поскольку информация об относительной чувствительности откликов биосенсоров получена с использованием однокомпонентных растворов. Даже с применением методов планирования эксперимента для выбора условий измерения сигнала ингибиторов возможность разделения вклада отдельных ингибиторов установлена для достаточно высоких ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) концентраций, тысячекратно превышающих установленные санитарно-гигиенические нормативы.

В какой-то степени интерпретации результатов измерения может помочь селективность действия реактиваторов. Так, с помощью ЭДТА и иодида натрия можно подавить антихолинэстеразное действие ионов металлов, выделив тем

самым токсическое действие пестицидов.^{1, 97} И наоборот, добавляя в тестируемую пробу ХЭ, можно связать присутствующие следовые количества пестицидов антихолинэстеразного действия, а затем измерить токсический эффект других загрязняющих веществ, используя другие ферменты или индикаторные организмы.¹

В другом подходе сам факт ингибирования ХЭ рассматривается как свидетельство загрязненности пробы, без привязки к ее качественному и количественному составу.¹⁸⁶ Такой подход хорошо известен в токсикологии, где имеется специальный термин — «антихолинэстеразная активность» вещества или исследуемого объекта.^{187, 188} Активность АХЭ крови или головного мозга служит мерой хронического отравления живых организмов сублетальными концентрациями пестицидов.^{189, 190} Общее ингибирующее действие токсикантов — антихолинэстеразная активность среды — может использоваться и для обнаружения опасного уровня загрязнения, и для выявления основных тенденций изменения содержания токсикантов. Так, при изучении ингибирующего действия иловых осадков рек Моравского бассейна с помощью биосенсора на основе АХЭ из электрического угря установлена связь между сигналом биосенсора (ингибирование оценивалось по относительному изменению динамического отклика) и интенсивностью сельскохозяйственной нагрузки территории.¹³⁴ В результате биотестирования методами, принятыми в биологическом контроле поверхностных и сточных вод, найдена корреляция между степенью ингибирования БХЭ, иммобилизованной на бумаге или нитрате целлюлозы, и показателями смертности или задержки развития гидробионтов (ветвистоусые рачки *Daphnia magna Straus* и протококковые водоросли *Chlorella vulgaris Beyer*).^{191, 192} Такое соответствие установлено в первую очередь для специфических ингибиторов ХЭ. При анализе же реальных объектов окружающей среды (природные и сточные воды) отмечены расхождения между данными различных методов. Например, при исследовании более 200 образцов сточных вод промышленных и сельскохозяйственных предприятий с помощью холинэстеразного потенциометрического биосенсора и теста на острую токсичность вод для инфузорий *Paramecium caudatum* удалось разделить все сточные воды на три группы по источнику загрязнения: 1) воды предприятий машиностроительного комплекса, загрязненные преимущественно тяжелыми металлами (высокий уровень смертности *Paramecium caudatum* при средних значениях ингибирования ХЭ); 2) воды нефтехимического комплекса, предприятий пищевой промышленности, загрязненные нефтепродуктами, жирами и другими высокомолекулярными органическими соединениями (высокий уровень смертности *Paramecium caudatum* при отсутствии ингибирующего действия на ХЭ); 3) воды сельскохозяйственных предприятий, поверхностного стока в сельской местности (отсутствие токсичности для инфузорий, низкий и средний уровень ингибирования ХЭ).¹⁹³

Методы, сочетающие биологические, биохимические показатели качества вод (а в перспективе — и другие обобщенные гидрохимические показатели) — представляются весьма перспективными, прежде всего благодаря возможности расширения круга потенциальных токсикантов, обнаруживаемых в объектах окружающей среды.

VI. Заключение

Стремительное развитие ферментативных методов контроля объектов окружающей среды стало возможным благодаря сочетанию фундаментальных и прикладных исследований, ведущихся на стыке биохимии, биотехнологии, токсикологии, аналитической химии, экологического мониторинга. С появлением биосенсоров сложные, чисто лабораторные методы биохимических исследований трансформировались в компактные средства измерения, доступные необученному

персоналу, в том числе для использования вне лабораторной базы.

Не следует думать, что создание биосенсоров сводится к подбору подходящего детектора и иммобилизации фермента. Исследователям приходится решать весьма сложные проблемы, связанные с особенностями функционирования ферментов в составе ферментсодержащих мембран, оптимизацией условий измерения, влиянием компонентов матрицы. Переход от нативного фермента к биосенсору суживает экспериментальные возможности по изучению действия биологически активных веществ — ограничены минимальная концентрация субстрата и удельная активность фермента, функционирование биосенсора иногда требует заведомо неоптимальных условий, ограниченных параметрами детектирования или спецификой применения. Оптимизация конструкции биосенсора, выбор рабочих условий его функционирования всегда представляют собой компромисс между требованиями к точности измерения отклика, чувствительности определения ингибитора (субстрата) и ограничениями, накладываемыми реальными условиями полевого эксперимента.

Осознание специфики функционирования биосенсоров, предназначенных для оценки токсического действия загрязнителей окружающей среды, привело к появлению разнообразных научных разработок, готовых к коммерческому использованию. В первую очередь это относится к одно-разовым биосенсорам на основе печатных и полупроводниковых сенсоров, а также к простейшим индикаторным устройствам с визуальной индикацией сигнала. Пока их практическое использование ограничивается сложностью интерпретации результатов и неадекватной нормативной базой, не позволяющей использовать данные биохимические методы контроля в экологической экспертизе. По этой причине в эколого-аналитическом контроле находят некоторое применение лишь холинэстеразные биосенсоры, при том что биосенсоры позволяют определять практически весь спектр приоритетных токсикантов, исключая лишь диоксины и радиоактивные элементы.

Тем не менее перспективы развития биосенсоров для определения загрязнителей окружающей среды представляются многообещающими. Это связано в первую очередь с их востребованностью. Методы с использованием биосенсоров выгодно отличаются от современных методов токсикологического и биологического контроля. Их преимущества: миниатюрность аппаратуры, простота измерения сигнала, возможность включения в состав автоматизированных средств контроля, и, не в последнюю очередь, возможность количественной оценки измеряемого токсикологического эффекта. На наш взгляд, дальнейшее совершенствование биосенсоров будет проходить в трех направлениях.

1. Совершенствование элементной базы, направленное на улучшение метрологических и операционных характеристик трансдюсеров; переход к полиферментным сенсорам (мультисенсоры, батареи сенсоров), позволяющим определять не только присутствие ингибиторов в анализируемом объекте, но и их природу.

2. Увеличение числа определяемых соединений, причем не только и не столько за счет расширения номенклатуры используемых ферментов, сколько путем оптимизации рабочих условий измерения и пробоподготовки; дальнейшая разработка и внедрение биосенсоров, функционирующих в органических растворителях, в том числе в качестве детекторов в проточно-инжекционном анализе и жидкостной хроматографии.

3. Развитие методических и методологических основ применения биосенсоров для использования в эколого-аналитическом контроле; создание экспертных систем оценки биологической (физиологической) активности химических веществ, токсичности промышленных сбросов, твердых отходов производства и потребления; сочетание биосенсо-

ров с традиционными методами биологического контроля и повышение за счет этого информативности биохимического контроля; более широкое привлечение методов хемотретической обработки результатов.

Продолжается интеграция различных методов и подходов к эколого-токсикологической оценке объектов окружающей среды. Современные разработки в области биосенсорики уже не ограничиваются использованием ферментов как обычных аналитических реагентов. Биосенсоры применяются как своего рода биохимические модели живых организмов с использованием подходов токсикологии и биотестирования.¹⁹³ Появились первые работы по направленному изменению структуры фермента с целью изменения его ингибиторной специфичности,⁹¹ используются своего рода «искусственные ферменты» — олигонуклеотиды или полимеры, синтез и отбор которых произведен по критерию молекулярного распознавания конкретного токсиканта.¹⁹⁴

Наконец, накопленный опыт в области биосенсоров послужил базой для создания принципиально новых приборов — ДНК-сенсоров, позволяющих непосредственно контролировать мутагенные и генотоксические свойства загрязнителей окружающей среды.¹⁹⁵ Специфика функционирования таких сенсоров выходит за рамки данного обзора, хотя их значение в развитии новых методов контроля объектов окружающей среды уже сейчас очевидны.

Литература

1. А.А.Туманов, И.А.Китаева, О.В.Барина. *Журн. аналит. химии*, **48**, 6 (1993)
2. *Биосенсоры. Основы и приложения.* (Под ред. Э.Тернера, И.Карубэ, Дж.Уилсона). Мир, Москва, 1992
3. Ю.Ю.Кулис. *Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов.* Мокслас, Вильнюс, 1981
4. Ю.А.Овчинников. *Основы биоорганической химии.* Просвещение, Москва, 1987
5. Э.Фершт. *Структура и механизм действия ферментов.* Мир, Москва, 1980
6. *Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы.* Т. 2. (Под ред. И.В.Березина, В.К.Антонова, К.Мартиника). Изд-во МГУ, Москва, 1976
7. A.P.F.Turner. *New Trends in Biosensor Development. NATO Advanced Research Workshop.* Kiev, 1998
8. Е.Б.Никольская, Г.А.Евтюгин. *Журн. аналит. химии*, **47**, 1358 (1992)
9. Е.Б.Никольская, Г.А.Евтюгин, Т.Н.Шеховцова. *Журн. аналит. химии*, **49**, 452 (1994)
10. В.Н.Майстренко, Р.З.Хамитов, Г.К.Будников. *Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов.* Химия, Москва, 1996
11. K.R.Rogers, C.L.Gerlach. *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 486A (1996)
12. I.Karube. *Biotechnology*, **7a**, 685 (1987)
13. Kh.Z.Brainina, A.M.Bond. *Anal. Chem.*, **67**, 2586 (1995)
14. S.Wring, J.P.Hart. *Analyst*, **117**, 1281 (1992)
15. A.E.G.Cass, G.Davis, G.D.Francis, H.A.O.Hill, W.J.Aston, I.J.Higgins, E.V.Plotkin, L.D.L.Scott, A.P.F.Turner. *Anal. Chem.*, **56**, 667 (1984)
16. A.S.Jdanova, S.Poyard, A.P.Soldatkin, N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet. *Anal. Chim. Acta*, **321**, 35 (1996)
17. K.R.Rogers, L.R.Williams. *Trend. Anal. Chem.*, **14**, 289 (1995)
18. A.Amine, M.Alafandy, J.-M.Kauffmann, M.N.Peki. *Anal. Chem.*, **67**, 2822 (1995)
19. F.A.McArdle, K.C.Persaud. *Analyst*, **118**, 419 (1993)
20. M.H.Smit, G.A.Rechnitz. *Electroanalysis*, **5**, 747 (1993)
21. D.J.Blyth, J.W.Aylott, D.J.Richardson, D.A.Russell. *Analyst*, **120**, 2725 (1995)
22. L.Stancik, L.Macholan, F.Scheller. *Electroanalysis*, **7**, 649 (1995)
23. A.J.Reviejo, C.Fernandez, F.Liu, J.M.Pingarron, J.Wang. *Anal. Chim. Acta*, **315**, 93 (1995)
24. J.L.Besombes, S.Cosnier, P.Labbe, G.Reverdy. *Anal. Chim. Acta*, **311**, 255 (1995)
25. J.Wang, L.Chen. *Anal. Chem.*, **67**, 3824 (1995)

26. M.H.Smit, G.A.Rechnitz. *Anal. Chem.*, **65**, 380 (1993)
27. J.Wang, V.B.Nascimento, S.A.Kane, K.Rogers, M.R.Smyth, L.Angnes. *Talanta*, **43**, 1903 (1996)
28. J.Wang, S.A.Kane, J.Liu, M.R.Smyth, K.Rogers. *Food Technol. Biotechnol.*, **34**, 51 (1996)
29. Q.Deng, S.J.Dong. *Analyst*, **121**, 1979 (1996)
30. W.R.Everett, G.A.Rechnitz. *Anal. Chem.*, **70**, 807 (1998)
31. O.Adeyolu, E.I.Iwuoha, M.R.Smyth. *Talanta*, **41**, 1603 (1994)
32. O.Adeyolu, E.I.Iwuoha, M.R.Smyth. *Anal. Lett.*, **27**, 2071 (1994)
33. O.Adeyolu, E.I.Iwuoha, M.R.Smyth. *Electroanalysis*, **7**, 924 (1995)
34. O.Adeyolu, E.I.Iwuoha, M.R.Smyth. *Anal. Chim. Acta*, **305**, 57 (1995)
35. T.-M.Park, E.I.Iwuoha, M.R.Smyth. *Electroanalysis*, **9**, 1120 (1997)
36. A.P.Soldatkin, Y.I.Korpan, G.A.Zhylyak, C.Martelet, A.V.El'skaya. In *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. Vol. 38. (NATO ASI Ser.)*. (Eds D.P.Nikolelis, U.J.Krull, J.Wang, M.Mascini). Kluwer Academic, Dordrecht, 1997. P. 281
37. K.Stein, J.-U.Hain. *Microchim. Acta*, 93 (1995)
38. J.-L.Marty, T.Noguer. *Analysis*, **21**, 231 (1993)
39. T.Noguer, J.-L.Marty. *Anal. Chim. Acta*, **347**, 63 (1997)
40. N.F.Starodub, Yu.M.Shirshov, A.L.Kukla, N.I.Kanjuk, A.V.Prokhorovich, R.Merker. *Electrochem. Soc. Proc.*, **97**, 799 (1997)
41. F.Starodub, N.I.Karyuk, A.L.Kukla, Yu.M.Shirshov. *Anal. Chim. Acta*, **385**, 461 (1999)
42. V.Volotovskiy, N.Kim. *Electroanalysis*, **10**, 512 (1998)
43. J.-C.Gaeyt, A.Havuz, A.Geloso-Meyer, C.Burstein. *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 177 (1993)
44. D.Compagnone, M.Bugli, P.Imperiali, G.Varallo, G.Palleschi. In *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. Vol. 38. (NATO ASI Ser.)*. (Eds D.P.Nikolelis, U.J.Krull, J.Wang, M.Mascini). Kluwer Academic, Dordrecht, 1997. P. 220
45. J.Marcos, A.Townshend. *Anal. Chim. Acta*, **310**, 173 (1995)
46. F.Mazzei, F.Botre, C.Botre. *Anal. Chim. Acta*, **336**, 67 (1996)
47. T.Danzer, G.Schweidt. *Anal. Chim. Acta*, **318**, 275 (1996)
48. Y.Su, A.Cagnini, M.Mascini. *Chem. Anal.*, **40**, 579 (1994)
49. D.W.Bryce, J.M.Fernandez-Romero, M.D.L.Decastro. *Anal. Lett.*, **27**, 867 (1994)
50. G.A.Zhylyak, S.V.Dzyadevich, Y.I.Korpan, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. *Sens. Actuators B*, **24/25**, 145 (1995)
51. V.Volotovskiy, Y.Nam, N.Kim. *Sens. Actuators B*, **42**, 233 (1997)
52. V.Volotovskiy, N.Kim. *Electroanalysis*, **10**, 61 (1998)
53. Т.Н.Шеховцова, С.В.Чернецкая, И.Ф.Долманова. *Журн. аналит. химии*, **48**, 129 (1993)
54. Т.Н.Шеховцова, С.В.Чернецкая, Е.Б.Никольская, И.Ф.Долманова. *Журн. аналит. химии*, **49**, 862 (1994)
55. Т.Н.Шеховцова, С.В.Чернецкая. *Anal. Lett.*, **27**, 2883 (1994)
56. J.Wang. *Talanta*, **40**, 1905 (1993)
57. J.Wang, Y.Lin. *Anal. Chim. Acta*, **271**, 51 (1993)
58. E.I.Iwuoha, O.Adeyolu, E.Dempsey, M.R.Smyth, J.Liu, J.Wang. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 661 (1995)
59. P.M.T.Pita, A.J.Reviejo, M.F.De Villena, J.M.Pingarron. *Anal. Chim. Acta*, **340**, 89 (1997)
60. E.I.Iwuoha, M.R.Smyth. In *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. Vol. 38. (NATO ASI Ser.)*. (Eds D.P.Nikolelis, U.J.Krull, J.Wang, M.Mascini). Kluwer Academic, Dordrecht, 1997. P. 289
61. O.Adeyolu, E.I.Iwuoha, M.R.Smyth, D.Leech. *Analyst*, **121**, 1885 (1996)
62. R.Z.Kazandjian, J.S.Dordick, A.M.Klibanov. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 417 (1986)
63. G.M.Christensen, B.L.Riedel. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **8**, 277 (1980)
64. Т.А.Черкасова, Ю.А.Лейкин, В.Е.Вонский, М.В.Деева. В кн. *Аналитическая химия объектов окружающей среды. Т. 3. (Тез. докл.)*. С.-Петербург; Сочи, 1991. С. 200
65. D.M.Rawson, A.J.Willmer, M.F.Cardosi. *Tox. Assessment*, **2**, 325 (1987)
66. D.M.Rawson, A.J.Willmer, A.P.F.Turner. *Biosensors*, **4**, 299 (1989)
67. E.A.H.Hall, M.Preuss, J.J.Gooding, M.Hämmerle. In *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. Vol. 38. (NATO ASI Ser.)*. (Eds D.P.Nikolelis, U.J.Krull, J.Wang, M.Mascini). Kluwer Academic, Dordrecht, 1997. P. 227
68. M.Purcell, R.Carpenter. *Water Poll. Res. J. Can.*, **25**, 175 (1990)
69. I.Karube, T.Matsunaga, S.Mitsuda, S.Suzuki. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1535 (1977)
70. J.J.Kulys, K.V.Kadziauskene. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 221 (1980)
71. S.E.Strand, D.A.Carlson. *J. Water. Pollut. Control. Fed.*, **56**, 464 (1984)
72. P.A.Van Rollegheem, Z.Kong, G.Rombouts, W.Verstrate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **59**, 321 (1994)
73. P.Solyom. *Prog. Water Techn.*, **9**, 193 (1977)
74. L.Campanella, G.Vafero, M.Tomassetti. *Sci. Total. Environ.*, **171**, 227 (1995)
75. P.A.Van Rollegheem, W.Verstrate. In *Proceedings of the 5th European Congress on Biotechnology. Vol. 1. (Abstracts of Reports)*. Copenhagen, 1990. P. 161
76. A.A.Bulich. *Aquat. Toxicol. Hazard Assess. ASTM STP*, **667**, 98 (1979)
77. I.Karube, T.Nakahara, T.Matsunaga, S.Suzuki. *Anal. Chem.*, **54**, 1725 (1982)
78. А.А.Клосов. *Методы определения ферментативной активности и их унификация*. Мокслас, Вильнюс, 1979. С. 4
79. A.Roda, P.Rauch, E.Ferri, S.Girotti, S.Ahini, G.Carrea, R.Bovara. *Anal. Chim. Acta*, **294**, 35 (1994)
80. S.Varanasi, R.L.Stevens, E.Ruckenstein. *AIChE J.*, **33**, 558 (1987)
81. S.O.Ogundiran, S.Varanasi, E.Ruckenstein. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 160 (1991)
82. А.Н.Решетиллов. *Прикл. биохимия и микробиология*, **32**, 78 (1996)
83. В.В.Сорочинский, Б.И.Курганов. *Прикл. биохимия и микробиология*, **33**, 138 (1997)
84. A.L.Kukla, Yu.M.Shirshov. *Sens. Actuators B*, **48**, 461 (1998)
85. Л.П.Кузнецова, Л.И.Кутушева, Е.Б.Никольская. *Укр. биохим. журн.*, **62** (6), 42 (1990)
86. P.Skladal. *Food Technol. Biotechnol.*, **34**, 43 (1996)
87. W.N.Aldridge. *Biochem. J.*, **46**, 451 (1950)
88. Т.Келети. *Основы ферментативной кинетики*. Мир, Москва, 1990
89. С.Д.Варфоломеев, В.Г.Гуревич. *Биокинетика*. Фаир, Москва, 1998
90. Е.Б.Никольская, С.Н.Моралев. *Докл. АН*, **354**, 780 (1997)
91. F.Villatte, V.Marcel, S.Estrada-Mondaca, D.Fournier. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 157 (1998)
92. B.C.Hill, S.Marmor. *Biochem. J.*, **279**, 355 (1991)
93. H.C.Budnikov, G.A.Evtugyn. *Electroanalysis*, **8**, 817 (1996)
94. J.-L.Marty, D.Garcia, R.Rouillon. *Trends Analyt. Chem.*, **14**, 329 (1995)
95. A.B.Roy. *Anal. Biochem.*, **165**, 13 (1987)
96. Г.К.Будников, Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, А.В.Волков. *Журн. аналит. химии*, **44**, 2253 (1989)
97. C.Tran-Minh. *Ion-Sele. Electrode Rev.*, **7**, 41 (1985)
98. F.Hobbiger, M.Pitman, P.W.Sadler. *Biochem. J.*, **75**, 363 (1960)
99. Р.И.Волков. *Докл. АН СССР*, **188**, 354 (1961)
100. Е.Б.Никольская. *Журн. аналит. химии*, **38**, 5 (1983)
101. W.H.R.Shaw, D.N.Raval. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3184 (1961)
102. A.Townshend, A.Vaughan. *Talanta*, **16**, 929 (1961)
103. V.Tougu, A.Pedak, T.Kesvaters, A.Aaviksaar. *FEBS Lett.*, **225**, 77 (1987)
104. Э.П.Медянцева, Г.К.Будников, С.С.Бабкина. *Журн. аналит. химии*, **45**, 1386 (1990)
105. Г.А.Евтюгин, Л.В.Ряписова, Е.Е.Стойкова, Л.Б.Кашеварова, С.В.Фридланд, В.З.Латыпова. *Журн. аналит. химии*, **53**, 988 (1998)
106. D.Martorell, F.Cespedes, E.Martinez-Fabregas, S.Alegret. *Anal. Chim. Acta*, **290**, 343 (1994)
107. G.Robinson, D.Leech, M.R.Smyth. *Electroanalysis*, **7**, 952 (1995)
108. M.H.Smit, A.Cass. *Anal. Chem.*, **62**, 2429 (1990)
109. M.S.Dehlawi, A.T.Eldefrawi, M.E.Eldefrawi, N.A.Anis, J.J.Valdes. *J. Biochem. Toxicol.*, **9**, 261 (1994)
110. A.Townshend, A.Vaughan. *Talanta*, **17**, 289 (1970)
111. С.Н.Голиков, В.И.Розенгарт. *Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества*. Наука, Ленинград, 1964
112. Р.М.Крупка. *Biochemistry*, **2**, 76 (1963)
113. В.И.Розенгарт, О.Е.Шерстобитов. *Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов*. Наука, Ленинград, 1974

114. М.А.Клисенко, М.В.Письменная. *Журн. аналит. химии*, **43**, 354 (1988)
115. A.P.Giang, S.A.Hall. *Anal. Chem.*, **23**, 1830 (1951)
116. Г.А.Евтюгин, Е.Е.Стойкова, Р.Р.Искандеров, Е.Б.Никольская, Г.К.Будников. *Журн. аналит. химии*, **52**, 6 (1997)
117. N.Mionetto, J.-L.Marty, I.Karube. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 463 (1994)
118. A.-M.Nyamsi Hendji, N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet, P.Clechet, A.A.Schul'ga, V.I.Strikha, L.I.Nechiporuk, A.P.Soldatkin, W.B.Wlodarski. *Anal. Chim. Acta*, **281**, 3 (1993)
119. S.V.Dzyadevich, A.A.Schul'ga, A.P.Soldatkin, A.-M.Nyamsi Hendji, N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet. *Electroanalysis*, **6**, 752, 1994
120. N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet, P.Clechet, A.-M.Nyamsi Hendji, A.A.Schul'ga, S.V.Dzyadevich, L.I.Nechiporuk, A.P.Soldatkin. *Sens. Mater.*, **8**, 161 (1996)
121. D.M.Ivnitskii, J.Rishpon. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 569 (1994)
122. C.Ristori, M.Del Carlo, M.Martini, A.Barabaro, A.Ancarani. *Anal. Chim. Acta*, **325**, 151 (1996)
123. A.L.Ghindilis, T.G.Morzunova, A.V.Barmin, I.N.Kurochkin. *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 873 (1996)
124. Е.Б.Никольская, Г.А.Евтюгин, Р.Р.Искандеров, В.З.Латыпова. *Журн. аналит. химии*, **51**, 561 (1996)
125. Г.А.Евтюгин, Н.С.Будников, Е.Б.Никольская. *Analyst*, **121**, 1911 (1996)
126. M.Bernabei, S.Chiavarini, C.Cremisini, G.Palleschi. *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 265 (1993)
127. M.Stoycheva. *Anal. Lett.*, **27**, 3065 (1994)
128. M.Stoycheva. *Electroanalysis*, **7**, 660 (1995)
129. C.La Rosa, F.Pariente, L.Hernandez, E.Lorenzo. *Anal. Chim. Acta*, **295**, 273 (1994)
130. C.La Rosa, F.Pariente, L.Hernandez, E.Lorenzo. *Anal. Chim. Acta*, **308**, 129 (1995)
131. C.Cremisini, S.Di Sario, J.Mela, R.Pilloton, G.Palleschi. *Anal. Chim. Acta*, **311**, 273 (1995)
132. J.-L.Marty, N.Mionetto, S.Lacorte, D.Barcelo. *Anal. Chim. Acta*, **311**, 265 (1995)
133. A.Günther, U.Bilitewski. *Anal. Chim. Acta*, **300**, 117 (1995)
134. P.Skládal, M.Fiala, J.Krejčí. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **65**, 139 (1996)
135. P.Skládal, J.Krejčí. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **61**, 985 (1996)
136. J.J.Rippeth, T.D.Gibson, J.P.Hart, I.C.Hartley, G.Nelson. *Analyst*, **122**, 1425 (1997)
137. P.Skládal, G.S.Nunes, H.Yamanaka, M.L.Riberio. *Electroanalysis*, **9**, 1083 (1997)
138. G.S.Nunes, P.Skládal, H.Yamanaka, D.Barcelo. *Anal. Chim. Acta*, **362**, 59 (1998)
139. S.Fennouh, V.Casimiri, C.Burstein. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 97 (1997)
140. D.Martorell, F.Céspedes, E.Martinez-Fabregas, S.Alegret. *Anal. Chim. Acta*, **337**, 305 (1997)
141. G.Turdean, I.Peter, I.C.Popescu, L.Oniciu. *Rev. Roum. Chim.*, **42**, 879 (1997)
142. M.Rehak, M.Snejdarkova, T.Hianik. *Electroanalysis*, **9**, 1072 (1997)
143. M.Khayyami, M.T.P.Pita, N.P.Garcia, G.Johansson, B.Danielsson, P.-O.Larsson. *Talanta*, **45**, 557 (1998)
144. L.Campanella, S.De Luca, M.P.Sammrtino, M.Tomasetti. *Anal. Chim. Acta*, **385**, 59 (1999)
145. Г.А.Евтюгин, А.Н.Иванов, Е.В.Гоголь, J.-L.Marty, Н.С.Будников. *Anal. Chim. Acta*, **385**, 13 (1999)
146. С.В.Дзядевич, А.П.Солдаткин, А.А.Шульга, В.И.Стриха, А.В.Ельская. *Журн. аналит. химии*, **49**, 874 (1994)
147. A.N.Diaz, M.C.R.Peinado. *Sens. Actuators A*, **38–39**, 426 (1997)
148. R.T.Andres, R.Narayanaswamy. *Talanta*, **44**, 1335 (1997)
149. J.M.Abad, F.Pariente, L.Hernandez, H.D.Abruna, E.Lorenzo. *Anal. Chem.*, **70**, 2848 (1998)
150. M.H.Sadar, S.S.Kuan, G.G.Guilbault. *Anal. Chem.*, **42**, 1770 (1970)
151. G.G.Guilbault, M.H.Sadar, S.S.Kuan, D.Casey. *Anal. Chim. Acta*, **52**, 75 (1970)
152. Ю.Г.Жуковский, С.А.Куценко, Л.П.Кузнецова, Е.Е.Сочилина, Е.Н.Дмитриева. *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **30**, 177 (1994)
153. А.с. 1359741 СССР; *Бюл. изобрет.*, (46), 193 (1989)
154. А.П.Бресткин, Ю.Г.Жуковский, Н.Л.Фарцейгер. *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **19**, 138 (1983)
155. Е.Б.Никольская, Л.П.Кузнецова, А.А.Прокопов. *Журн. аналит. химии*, **53**, 749 (1998)
156. Л.И.Кугушева, Л.П.Кузнецова, Е.Б.Никольская, О.В.Ягодина. *Журн. аналит. химии*, **47**, 1478 (1992)
157. P.Skládal, M.Mascini. *Biosens. Bioelectron.*, **7**, 335 (1992)
158. P.Skládal. *Anal. Chim. Acta*, **269**, 281 (1992)
159. C.Tran-Minh, P.C.Pandey, S.Kumaran. *Biosens. Bioelectron.*, **5**, 461 (1990)
160. P.Skládal, M.Pavlik, M.Fiala. *Anal. Lett.*, **27**, 29 (1994)
161. О.А.Малинин. *Ветеринария*, 62 (1980)
162. *Методы определения микроколичеств пестицидов*. (Под ред. М.А.Клисенко). Медицина, Москва, 1984
163. *Лабораторные исследования в ветеринарии. Химико-токсикологические методы. Справочник*. (Под ред. Б.И.Антонова). Агропромиздат, Москва, 1989
164. L.H.Goodson, W.B.Jacobs. *Methods Enzymol.*, **44**, 647 (1976)
165. M.Bernabei, C.Cremisini, M.Mascini, G.Palleschi. *Anal. Lett.*, **24**, 1317 (1991)
166. P.Skládal. *Anal. Chim. Acta*, **252**, 11 (1991)
167. K.Rogers, M.Foley, S.Alter, P.Koga, M.E.Eldefrawi. *Anal. Lett.*, **24**, 191 (1991)
168. J.J.Kulys, J.D'Costa. *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 109 (1991)
169. L.H.Goodson, W.B.Jacobs, A.W.Davis. *Anal. Biochem.*, **51**, 362 (1973)
170. Л.П.Кузнецова, Л.И.Кугушева, Е.Б.Никольская, О.В.Ягодина. *Журн. аналит. химии*, **45**, 1426 (1990)
171. V.K.Nguyen, L.Ehret-Sabatier, M.Goelder, C.Boudier, G.Jamet, J.M.Warter, P.Poindron. *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 18 (1997)
172. Е.Б.Никольская, Г.А.Евтюгин, А.В.Святковский, Р.Р.Искандеров, Е.В.Сунцов, А.А.Прокопов, С.Н.Моралев, Б.Н.Кормилицын, В.З.Латыпова. *Журн. аналит. химии*, **49**, 374 (1994)
173. Н.С.Будников, Г.А.Евтюгин. In *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. Vol. 38. (NATO ASI Ser.)*. (Eds D.P.Nikolelis, U.J.Krull, J.Wang, M.Mascini). Kluwer Academic, Dordrecht, 1997. P. 239
174. Г.К.Будников, Г.А.Евтюгин, Е.П.Ризаева, А.Н.Иванов, В.З.Латыпова. *Журн. аналит. химии*, (1999) (в печати)
175. *Cholinesterase-Hemmtest. Screening Test zur Bestimmung von Cholinesterase Hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden in Wasser*. Boehringer Mannheim, Mannheim. No. 1293460, 1994
176. *InQuest OP/Carbamate Screen*. Ohmicron, Newtown, PA, 1995
177. H.El Yamani, C.Tran-Minh, M.Abdul, M.Dupont. *J. Fr. Hydrol.*, **18**, 67 (1987)
178. H.El Yamani, C.Tran-Minh, M.Abdul, D.Chavanne. *Sens. Actuators*, **15**, 193 (1988)
179. D.Tingfa, Z.Shiguang, T.Mousheng. *Environ. Pollut.*, **57**, 217 (1989)
180. A.Cagnini, I.Palchetti, M.Mascini, A.P.F.Turner. *Microchim. Acta*, **121**, 155 (1995)
181. A.Cagnini, I.Palchetti, I.Lionti, M.Mascini, A.P.F.Turner. *Sens. Actuators B*, **24/25**, 85 (1995)
182. S.F.White, A.P.F.Turner, R.D.Schmid, U.Bilitewski, J.Bradley. *Electroanalysis*, **6**, 625 (1994)
183. I.Palchetti, A.Cagnini, M.Del Carlo, C.Coppi, M.Mascini, A.P.F.Turner. *Anal. Chim. Acta*, **337**, 315 (1997)
184. T.Imato, N.Ishibashi. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 435 (1995)
185. T.Danzer, G.Schwedt. *Anal. Chim. Acta*, **325**, 1 (1996)
186. T.J.Davis, G.W.Malaney. *Water Sewage Works*, **114**, 272 (1967)
187. В.Ф.Крамаренко. *Токсикологическая химия*. Выща школа, Киев, 1989
188. *Фосфорорганические инсектициды. Общее введение. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Т. 63. ВОЗ*, Москва, 1990
189. C.H.Walker, H.M.Thompson. In *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. (Abstracts of Reports)*. Siena, 1992. P. 9
190. M.E.Eldefrawi, K.R.Rogers, N.A.Anis, R.Thompson, J.J.Valdes. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **543**, 114 (1993)
191. С.А.Соколова, Г.А.Евтюгин, Р.Р.Искандеров, А.И.Старцева, В.У.Смирнова, Ю.В.Рыдванский, Ю.С.Котов, С.А.Патин. *Сб. научн. тр. ГосНИОРХ*, **312**, 122 (1990)

192. Г.А.Евтюгин, Р.Р.Искандеров, В.У.Смирнова, В.З.Латыпова, Ю.В.Рыдванский, Л.Н.Пунегова, Г.А.Марченко. *Эколого-токсикологическая характеристика г. Казани и пригородной зоны*. Изд-во Казанск. ун-та, Казань, 1991. С. 126
193. G.A.Evtugyn, E.P.Rizaeva, E.E.Stoikova, H.C.Budnikov. *Electroanalysis*, **9**, 1124 (1997)
194. S.A.Piletsky, H.S.Andersson, I.A.Nicholls. *Macromolecules*, **32**, 633 (1999)
195. L.Shenghui, Y.Jiannong, H.Pingang, E.Yuzhi. *Anal. Chim. Acta*, **335**, 239 (1996)

BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF ENVIRONMENTAL INHIBITORS OF ENZYMES

G.A.Evtugyn, H.C.Budnikov, E.B.Nikolskaya

Kazan State University

18, Ul. Kremlevskaya, 420008 Kazan, Russian Federation, Fax +7(843)238-0412

I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences

44, Prosp. M.Toreza, 194223 St. Petersburg, Russian Federation, Fax +7(812)552-3012

Characteristic features of operation and practical application of enzyme biosensors intended for determination of enzyme inhibitors referred to the common environmental pollutants. The influence of the way of detection of the enzymatic reaction, the method of enzyme immobilization the composition of the reaction medium on the analytical characteristics of determination of inhibitors is considered. Published data on the design of biosensors for the detection of pesticides and heavy metals are summarised. Primary attention was denoted to cholinesterase biosensors. The approaches to the estimation of kinetic parameters of inhibition are considered and factors influencing the selectivity and sensitivity of inhibitor determination in environmental objects are considered. The potentialities and limitations of the detection of environmental pollutants in real samples and in field conditions are discussed.

Bibliography — 195 references.

Received 13th April 1999