

Ферменты в технологии уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ

Е. Н. Ефременко, И. В. Лягин, В. В. Завьялов, С. Д. Варфоломеев,
Н. В. Завьялова, В. И. Холстов

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ФГУ «27 Научный центр Министерства обороны РФ»
Федеральное агентство по промышленности*

Для утилизации реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), одним из наиболее привлекательных представляется биотехнологический подход, основанный на применении ферментных технологий [1, 2]. Данный подход позволяет нейтрализовать остаточные концентрации ФОВ в составе реакционных масс, не требует использования высоких температур, избыточного давления, щелочной среды.

В результате поиска источников выделения ферментов, активных по отношению к ФОВ [3, 4] и пригодных с точки зрения возможности масштабирования их производства, выбор был остановлен на органофосфатгидролазе (ЕС 3.1.8.1) [5]. Этот фермент характеризуется широкой субстратной специфичностью и является единственным из всех известных ферментов, способным гидролизовать вещество типа Vx наряду с заринном, зоманом и другими субстратами, содержащими P—F связь.

Органофосфатгидролаза может найти применение на разных этапах работ по уничтожению ФОВ: для гидролиза остаточных ФОВ в составе реакционных масс и снижения уровня их токсичности; в составе индивидуальных самодезгазирующих средств защиты от воздействия ФОВ; в составе препаратов и средств, предназначенных для дегазации технического инвентаря, оборудования и помещений; как активный компонент биосенсорных систем для определения низких концентраций ФОВ.

Подходы к получению активной формы органофосфатгидролазы

Внедрение этого фермента в практику связано с решением двух основных проблем: с разработкой высокопродуктивных систем экспрессии гена, кодирующего синтез фермента, и с созданием основ технологии получения органофосфатгидролазы в активной растворимой форме.

Использование клеток бактерий *E.coli* для экспрессии гена органофосфатгидролазы, выделенного из различных микробных источников, позволяет получать высокоактивный фермент с выходом целевого белка, существенно превышающим уровень его накопления в природных штаммах [6–8]. При этом рекомбинантный фермент проявляет каталитическую активность по отношению к различным ФОВ.

Помимо решения задачи получения суперпродуктов рекомбинантной органофосфатгидролазы пред-

принимались попытки с помощью методов геной инженерии улучшить субстратную специфичность фермента по отношению к ФОВ. Наибольшего успеха здесь достигли американские исследователи [9]. Так, путем сайт-направленного мутагенеза активного центра фермента двойной заменой H254R и H257L удалось повысить эффективность его действия по отношению к диметону С (прямоу аналогу Vx) более, чем в 6,5 раз. Вместе с тем подобная замена привела к снижению эффективности действия фермента по отношению к диизопропилфторфосфату (ДФФ) (аналогу зарина и зомана) в 115 раз. Таким образом, положительные эффекты генетических манипуляций в отношении одного субстрата компенсировались отрицательными результатами в отношении других P-F-содержащих субстратов.

В другом случае удалось осуществить более удачную генетическую замену L136Y [10], при которой эффективность действия фермента к диметону С увеличилась в 2,5 раза, а по отношению к ДФФ наблюдалось лишь ее незначительное снижение (на 4%) от исходного уровня. В этой же работе исследователи столкнулись с тем фактом, что результаты исследования с использованием аналогов ФОВ не дают адекватного ответа. Несмотря на выдающийся результат в отношении диметона С, улучшение каталитических характеристик фермента по отношению к веществу Vx составило всего 33%. Таким образом, можно заключить, что нет прямой зависимости между результатами, полученными при исследовании гидролиза ФОВ и их структурных аналогов, поэтому необходимо проводить исследования с применением реальных отравляющих веществ.

Наряду с генетическими манипуляциями путем сайт-направленного мутагенеза, популярность приобрел другой подход к модификации фермента, основанный на генетическом введении на N- или C-конец молекулы белка дополнительной аминокислотной последовательности. Этот подход позволяет, с одной стороны, упростить процедуру очистки фермента [11], а с другой — придать ферменту новые свойства, например, возможность визуализации белка при введении в его структуру гибридного партнера, обладающего флуоресценцией [12] или гидрофобностью [13]. Так, при введении гексагистидиновой последовательности (His₆) на N-конец молекулы органофосфатгидролазы (ОФГ) [14] удалось не только упростить процесс получения очищенного фермента His₆-ОФГ, но и существенно улучшить эффективность его каталитиче-

ского действия к ДФФ (в 140 раз), Vx (в 2,2 раза) и зарину (в 7 раз) при pH = 7,5 [15] по сравнению с немодифицированным ферментом даже при том, что pH-оптимум модифицированного фермента смещается в область щелочных значений pH [16]. К недостатку метода генетического модифицирования следует отнести снижение уровня синтеза получаемых производных органофосфатгидролазы в клетках по сравнению с синтезом немодифицированного фермента. Тем не менее достигаемое удешевление конечного продукта, получаемого методом генетического модифицирования, — существенный фактор для практического применения фермента.

Таким образом, в случае оптимизации условий получения рекомбинантных форм органофосфатгидролазы открывается возможность использования фермента в технологии детоксикации ФОВ.

Применение органофосфатгидролазы в технологии разложения фосфорорганических отравляющих веществ

Следует сказать, что все известные разработки относительно применения ферментных технологий для целей уничтожения ФОВ касаются исключительно разложения чистых отравляющих веществ ферментами разной степени очистки [17–22], а какая-либо открытая информация об исследованиях ферментативного гидролиза фосфорорганических соединений в составе сложных смесей, какими являются реакционные массы, получаемые по российской технологии уничтожения ФОВ, отсутствует.

Успешные результаты по применению His₆-ОФГ для гидролиза чистых отравляющих веществ послужили основанием для проведения испытаний данного фермента в реакциях гидролиза ФОВ в составе реакционных масс [15]. Установлено, что в случае реакционных масс, содержащих 6 · 10⁻⁶ М зарина, основной токсичный компонент может быть полностью гидролизован за 0,5 ч с помощью как His₆-ОФГ, так и немодифицированного фермента. При содержании 7 · 10⁻⁶ М вещества типа Vx за тот же интервал време-

ни степень конверсии основного токсичного вещества составила 93 и 81% при использовании His₆-ОФГ и немодифицированного фермента, соответственно. На сегодняшний день данная разработка наиболее близко стоит к реализации ее в технологии разложения ФОВ.

Говоря о перспективах использования органофосфатгидролазы в технологии уничтожения ФОВ, отметим, что, бесспорно, наиболее привлекательными способами решения технологических задач представляются непрерывные технологии, основанные на применении проточных реакторов, заполненных иммобилизованными формами фермента. В настоящее время идет активный поиск путей стабилизации ферментов и их максимальной адаптации к практическому использованию [23, 24], создания промышленных биокатализаторов путем иммобилизации органофосфатгидролазы и ее генетических производных на различных носителях.

Иммобилизация органофосфатгидролазы позволяет существенным образом увеличить стабильность фермента к воздействию различных факторов: pH среды, повышенной температуры, высоких концентраций субстратов или продуктов реакции, к присутствию органических растворителей и т.д. [25, 26]. Кроме этого, использование иммобилизованных препаратов обеспечивает возможность их многократного применения, что существенно снижает стоимость технологии в целом.

Известно несколько вариантов реализации данного подхода к созданию биокатализаторов, которые гидролизуют ФОВ и их аналоги (табл. 1). Один из подходов — это ковалентное связывание фермента с матрицей носителя [25]. В качестве носителя в [25] были использованы различные формы нейлона: в виде порошка, гранул, мембран и трубок, поверхность которых предварительно активировали глутаровым альдегидом. Достоинством данного метода является отсутствие десорбции фермента с носителя, что позволяет проводить технологический процесс с высокими скоростями. К недостаткам метода следует отнести боль-

Таблица 1

Каталитические характеристики иммобилизованной органофосфатгидролазы в реакциях гидролиза фосфорорганических отравляющих веществ и их структурных аналогов

Иммобилизация	Носитель	Субстрат	Степень конверсии субстрата, %	Ссылка
Препараты для технологии разложения ФОВ				
Ковалентное связывание с помощью глутарового альдегида	Нейлон	ДФФ	20	[25]
Физическая адсорбция	Тритил-агароза	ДФФ	22,5	[27]
Ковалентное связывание с помощью изоцианатпропилового спирта	Силикагель Полиуретан	ДФФ	95 45	[29]
Препараты для защитных материалов				
Физическая адсорбция	Латексная краска	Зоман ДФФ Vx	62 32 45	[48, 49]
Ковалентное связывание с помощью глутарового альдегида	Хитозановый гель на тканевой подложке	ДФФ	100	[46]
Физическая адсорбция	Акрилатный гель на тканевой подложке	Зоман Зарин Vx	100	[45]

шие потери активности фермента при его иммобилизации (на два порядка и более).

В работе [27] был использован другой подход, а именно, физическая иммобилизация фермента в матрице трифенилметил-агарозы (тринил-агарозы). Преимущества этого метода заключаются в простоте его исполнения и отсутствии потерь активности фермента. Отрицательными же сторонами являются, во-первых, высокая стоимость и гидрофобность носителя, в результате чего возможна усиленная сорбция гидрофобного субстрата и локальное повышение его концентрации, что приводит в конечном счете к ингибированию иммобилизованного фермента, во-вторых, данный носитель подвержен деформации и неспособен выдерживать высокие скорости материальных потоков в промышленных условиях.

Несмотря на то, что существует много интересных разработок на основе иммобилизованной органофосфатгидролазы и ее генетически модифицированных аналогов [12, 28–31], пока их испытания проводятся лишь на фосфорорганических пестицидах, как правило, параоксоне или в лучшем случае ДФФ, и говорить о каких-то реальных перспективах их применения в технологии уничтожения ФОВ еще рано. Вместе с этим нельзя не отметить тот факт, что применение микробных клеток, обладающих ОФГ-активностью наряду со способностью разрушать продукты гидролиза ФОВ, может оказаться эффективным в технологии уничтожения ФОВ. В этом случае может быть гарантировано получение конечного продукта с минимальной токсичностью и экологической нагрузкой на окружающую среду. Применение клеток микроорганизмов в иммобилизованном виде, согласно [26, 32, 33], должно способствовать увеличению их метаболической стабильности и жизнеспособности.

Наиболее эффективным носителем для подобной иммобилизации, как показала практика, является криогель поливинилового спирта. Причин тому несколько и, в частности, то, что этот полимер производится в крупных масштабах и он дешевый; образующийся из полимера криогель характеризуется наряду с высокой механической прочностью наличием макропористой структуры, обеспечивающей благоприятные условия для массопереноса, осуществляемого в результате метаболической активности клеток [34, 35]; носитель оказывает значительное стабилизирующее действие на целостность клеточных стенок и тем самым способствует увеличению резистентности клеток к негативному влиянию агрессивной среды. Стоит также отметить, что иммобилизованная биомасса более стабильна при хранении, а также за счет иммобилизации возможно достижение более высоких концентраций клеток в единице объема реактора.

Перспективы применения органофосфатгидролазы в качестве компонента средств защиты

Процесс ферментативного разложения ФОВ может быть использован для создания высокоэффективных средств защиты персонала, а также для проведения мероприятий по обработке помещений, оборудования и тары, задействованных в технологических процессах.

Наиболее эффективными в составе средств индивидуальной защиты являются материалы, обеспечивающие не только достаточно сильную сорбцию и

удержание отравляющих веществ, но и осуществляющие их разложение (дегазацию). Так, известны эффективные защитные материалы, в состав которых в качестве сорбентов и одновременно катализаторов разложения ФОВ входят оксиды металлов [36, 37] или комплексные соли металлов [38]. Такие защитные материалы при контакте их с веществом Vx или зоманом в концентрации 10 г/м² вызывают их разложение на 59 и 98%, соответственно, за 24 ч. Однако использование этих катализаторов приводит к колоссальному удорожанию самих защитных материалов, поскольку эффективный гидролиз достигается лишь при высоком содержании катализаторов (до 65% от массы сорбента) и высокой степени их измельчения (размер гранул до 250 мкм).

Альтернативу химическим катализаторам, вводимым в защитные фильтрующе-сорбирующие самодегазирующиеся материалы, могут составить ферменты, способные высокоспецифично катализировать гидролиз токсичных веществ. Преимущества фильтрующе-сорбирующих материалов на основе ферментов обусловлены тем, что скорости разложения ФОВ под действием, например, органофосфатгидролазы, превышают скорости реакций, катализируемых химическими реагентами [3], и при этом одинаковая степень конверсии ФОВ достигается при существенно меньших количествах ферментов, чем в реакциях с химическими катализаторами.

Очевидно, что наиболее целесообразно использование ферментов в иммобилизованной форме, которая обеспечивает длительное сохранение каталитической активности ферментов и упрощает процедуру их введения в структуру защитных материалов.

В США разработан фильтрующе-сорбирующий самодегазирующий материал, представляющий собой полиуретановую губку, содержащую ковалентно иммобилизованную органофосфатгидролазу и частицы активного угля [39]. Включение активного угля в сорбент и иммобилизация фермента осуществляются непосредственно в процессе полимеризации и формирования полиуретанового носителя. Максимальная концентрация фермента в составе такого материала составляет 8 мг/см². Данный материал предназначен для детоксикации зарина, зомана и вещества Vx в составе индивидуальных средств защиты [28], однако из открытой печати пока известны результаты его успешного применения только в отношении фосфорорганических пестицидов [40–43].

Другой разработанный фильтрующе-сорбирующий самодегазирующий защитный материал состоит из трех слоев. Верхний слой выполнен из полипропилена, поликарбоната или бутилированного каучука. Этот слой, контактирующий в случае поражения с каплями токсичных веществ, предотвращает проникание жидкой фазы веществ во внутренние слои материала и обеспечивает равномерный подвод их паров к внутренним слоям материала. Средний слой предназначен для сорбции паров токсичных веществ и их дегазации. Он состоит из резины или вспененного пластика с импрегнированными частицами активного угля, ферментом фосфорилфосфатазой и иодбензойной кислотой [44]. Нижний слой, непосредственно прилегающий к кожному покрову, представляет собой целлюлозосодержащий материал. Недостатком данного за-

щитного материала является ограничение его каталитических возможностей из-за наличия резины или вспененного пластика, что не способствует удерживанию в микроокружении фермента воды, необходимой для катализа.

В России также разработан ферментосодержащий материал, предназначенный для использования в составе средств индивидуальной защиты от ФОВ. Действие данного материала основано на одновременной сорбции и детоксикации (гидролизе) ФОВ под действием иммобилизованного фермента His₆-ОФГ [45]. В качестве носителя для физической иммобилизации фермента используется сорбент на основе акрилата, который обладает колоссальной сорбционной емкостью и способен удерживать большие количества сорбируемых веществ. Такой фильтрующе-сорбирующий самодезагазирующийся материал при нанесении на его поверхность вещества типа Vx, зомана или зарина в концентрации 10 г/м² обеспечивает нейтрализацию их паров при температуре до 45 °С на 100% за 3–7 ч при рН = 7,8–10,5, гарантируя отсутствие паров токсичного химиката за слоем защитного материала на протяжении не менее 96 ч. Данный материал полностью сохраняет свои защитные свойства после хранения в герметичной упаковке до 12 месяцев.

Другим вариантом материала, содержащего органофосфатгидролазу и предназначенного для гидролиза следов фосфорорганических веществ после удаления их с различных твердых поверхностей, в том числе кожи, является ткань, покрытая хитозановыми гелями, обеспечивающими повышенную влагопоглощающую способность материала [46, 47]. Такая ткань может длительное время храниться без микробной контаминации во влажном состоянии в герметичных контейнерах и сохранять готовность к непосредственному применению.

Еще один тип защитных ферментосодержащих средств, разработанный компанией Reactive Surfaces Ltd. (США), — это биокаталитические латексные краски, включающие органофосфатгидролазу [48, 49], которые наносятся на защищаемую поверхность (стены помещений, реакторы и др.). Как показали исследования, степень конверсии ФОВ под действием биоактивных красок не достигает 100%, по-видимому, вследствие ограничения в количестве воды в микроокружении фермента, необходимой для каталитической реакции. В то же время установлено, что смачивание поверхности, покрытой биоактивной краской, активизирует ферментативный катализ.

Детекция фосфорорганических отравляющих веществ с помощью органофосфатгидролазы в иммобилизованной форме

Способность органофосфатгидролазы гидролизовать ФОВ нашла свое применение в создании высокочувствительных средств детекции отравляющих веществ (табл. 2), которые могут быть использованы в системе аналитического мониторинга технологии уничтожения химического оружия.

Так, реакция разложения фторсодержащих фосфорорганических веществ под действием рекомбинантной органофосфатгидролазы положена в основу функционирования биосенсорной системы, в которой определение накапливающихся фторид-ионов — продуктов ферментативной реакции — осуществляется с помощью ион-селективного электрода [50]. Рабочий диапазон этого биосенсора известен только для вещества ДФФ.

Органофосфатгидролаза, иммобилизованная на углеродных нанотрубках, была использована при создании детектора на основе вольтамперометрии для определения тиолов, образующихся при разложении вещества Vx [51].

Совместное использование органофосфатгидролазы и бутирилхолинэстеразы в составе биосенсорной системы позволяет определять ФОВ в присутствии других ингибиторов холинэстераз в сложной смеси. Комбинация указанных ферментов с дополнительным введением в детекционную систему еще одного фермента — холиноксидазы — обеспечивает определение наноконцентраций ФОВ [52].

Совместно иммобилизованные органофосфатгидролаза и ацетилхолинэстераза на силикагеле также позволяют определять ФОВ в смесях [53]. Присутствие в исследуемом растворе других веществ, в частности 10⁻⁵ М карбаматов, не мешает анализу.

Для увеличения чувствительности биосенсорной системы на основе органофосфатгидролазы был использован фермент, химически модифицированный карбоксинафтолфлуоресцеином, спектр флуоресценции которого меняется в зависимости от рН. Поскольку при ферментативном гидролизе ФОВ происходит изменение рН реакционной среды, то данный метод оказался применим к широкому спектру анализируемых субстратов. С помощью такого биосенсора можно проводить количественный анализ ДФФ при концентрации в диапазоне 2–400 мкМ [54].

Помимо вышеперечисленных биосенсоров, известно большое количество разработок на основе органо-

Таблица 2

Методы определения структурных аналогов ФОВ с применением органофосфатгидролазы

Принцип детектирования	Форма фермента	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	Ссылка
Определение фторид-ионов с помощью ион-селективного электрода	Иммобилизованный фермент на силикагеле	25–5000 для ДФФ	[50]
Ингибирование ацетилхолинэстеразы	То же	0,001–10 для ДФФ	[53]
Ингибирование бутирилхолинэстеразы	Растворимая форма	от 0,0045 для ДФФ	[52]
Определение тиоловых спиртов	Иммобилизованный фермент на углеродных нанотрубках	1–85 для деметона С	[51]
Флуоресценция	Иммобилизованный фермент на полистироле	2–400 для ДФФ	[54]

фосфатгидролазы, предназначенных для дискриминационного определения ФОВ, но пока все они апробированы лишь на отдаленных аналогах отравляющих веществ — пестицидах. Все эти работы можно разделить на две группы: в первой используются иммобилизованные клетки-продуценты органофосфатгидролазы [55, 56], а во второй — иммобилизованный фермент [57–60]. Можно также провести классификацию в зависимости от типа детекции ФОВ: с использованием амперометрических [55, 57], потенциометрических [56, 58], спектрометрических [59], pH-чувствительных детекторов [60].

Оценивая общую ситуацию в развитии детекционных систем на основе органофосфатгидролазы, следует отметить, что сегодня прослеживается, с одной стороны, усложнение биосенсоров по числу используемых компонентов, а с другой — увеличение точности и расширение диапазона определяемых концентраций аналогов ФОВ.

Заключение

Изучение возможности использования ферментов, способных осуществлять гидролиз ФОВ, является одним из главных направлений исследований в рамках проблемы детоксикации ФОВ. Наиболее интенсивно разработки в этой области проводятся в США [23, 61], России [57], Великобритании [62] и Австралии [24].

Совокупность современных достижений в химической энзимологии, биотехнологии и сенсорных технологиях позволила создать базу для развития нового ферментативного подхода к решению ключевых проблем в области разработки технологии уничтожения химического оружия и предложить ряд целесообразных и эффективных решений.

* * *

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.515.11.5002).

ЛИТЕРАТУРА

1. Raushel F.M. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, v. 5(3), p. 288–295.
2. Kline B.J., Drevon G., Russell A.J. *Enzymes in Action: Green Solutions for Chemical Problems*. Ed. B. Zwanenburg e. a. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 397–431.
3. Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. *Успехи биол. химии*, 2004, т. 44, с. 307–340.
4. *Enzymes in Action: Green Solutions for Chemical Problems*. Ed. B. Zwanenburg e. a. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 458 p.
5. Ефременко Е., Сергеева В. *Изв. АН. Сер. хим.*, 2001, № 10, с. 1743–1749.
6. Kolakowski J.E., Defrank J.J., Harvey S.P., Szafraniec L.L., Beaudry W.T., Lai K., Wild J.R. *Biocatal. Biotransfor.*, 1997, v. 15(4), p. 297–312.
7. DiSioudi B.D., Miller C.E., Lai K., Grimsley J.K., Wild J.R. *Chem.-Biol. Interact.*, 1999, v. 119–120, p. 211–223.
8. Little J.S., Broomfield C.A., Fox-Talbot M.K., Boucher L.J., MacIver B., Lenz D.E. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, v. 38(1), p. 23–29.
9. DiSioudi B., Grimsley J.K., Lai K., Wild J.R. *Biochemistry*, 1999, v. 38(10), p. 2866–2872.
10. Gopal S., Rastogi V., Ashman W., Mulbry W. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, 2000, v. 279(2), p. 516–519.
11. Ефременко Е., Вотчищева Ю., Плиева Ф., Галаев И., Маттиассон В. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2006, v. 70(5), p. 558–563.
12. Wu C.-F., Cha H.J., Valdes J.J., Bentley W.E. *Biotechnol. and Bioeng.*, 2002, v. 77(2), p. 212–218.
13. Shimazu M., Mulchandani A., Chen W. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, v. 81(1), p. 74–79.
14. Патент РФ № 2255975, 2005.
15. Патентная заявка РФ на изобретение № 2005120422, 2005.
16. Вотчищева Ю.А., Ефременко Е.Н., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д. *Биохимия*, 2006, т. 71(2), с. 216–222.
17. Патент WO № 01/56380, 2001.
18. Патент США № 5589386, 1996.
19. Патент США № 5928927, 1999.
20. Патент США № 6080566, 2000.
21. Hoskin F.-C.G., Walker J.E., Dettbarn W.-D., Wild J.R. *Biochem. Pharmacol.*, 1995, v. 49(5), p. 711–715.
22. Rastogi V.K., Defrank J.J., Cheng T.-C., Wild J.R. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, 1997, v. 241(2), p. 294–296.
23. Ghanem E., Raushel F.M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, v. 207(2), Suppl/ 1, p. 459–470.
24. Singh B.K., Walker A. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2006, v. 30(3), p. 428–471.
25. Caldwell S.R., Raushel F.M. *Appl. Biochem. Biotech.*, 1991, v. 31(1), p. 59–72.
26. Ефременко Е.Н., Лозинский В.И., Сергеева В.С., Плиева Ф.М., Макхлис Т.А., Казанков Г.М., Гладиллин А.К., Варфоломеев С.Д. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 2002, v. 51(2), p. 195–201.
27. Caldwell S.R., Raushel F.M. *Biotechnol. and Bioeng.*, 1991, v. 37(2), p. 103–109.
28. LeJeune K.E., Dravis B.C., Yang F., Hetro A.D., Doctor B.P., Russell A.J. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998, v. 864, p. 153–170.
29. Gill I., Ballesteros A. *Biotechnol. and Bioeng.*, 2000, v. 70(4), p. 400–410.
30. Mansee A.H., Chen W., Mulchandani A. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, v. 32(11-12), p. 554–560.
31. Wang J., Bhattacharyya D., Bachas L.G. *Biomacromolecules*, 2001, v. 2(3), p. 700–705.
32. Ефременко Е.Н. *Biocatalysis and Biocatalytic Technologies*. Ed. G.E. Zaikov. N.-Y.: Nova Science Publishers Inc., 2006, p. 23–37.
33. Kim J.-W., Rainina E.I., Mulbry W.W., Engler C.R., Wild J.R. *Biotechnology Progress*, 2002, v. 18(3), p. 429–436.
34. Lozinsky V.I., Zubov A.L., Titova E.F. *Enzyme Microb. Tech.*, 1996, v. 18(6), p. 561–569.
35. Лозинский В.И. *Успехи химии*, 2002, т. 71(6), с. 559–585.
36. Патент США № 5689038, 1997.
37. Патент США № 6403653, 2002.
38. Патент США № 6410603, 2002.
39. Патент США № 6642037, 2003.
40. LeJeune K.E., Mesiano A.J., Bower S.B., Grimsley J.K., Wild J.R., Russell A.J. *Biotechnol. and Bioeng.*, 1997, v. 54(2), p. 105–114.
41. LeJeune K.E., Wild J.R., Russell A.J. *Nature*, 1998, v. 395(6697), p. 27–28.
42. Havens P.L., Rase H.F. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1993, v. 32(10), p. 2254–2258.
43. LeJeune K.E., Russell A.J. *Biotechnol. and Bioeng.*, 1999, v. 62(6), p. 659–665.
44. Патент США № 4781959, 1988.
45. Патентная заявка РФ на изобретение № 2007102061, 2007.
46. Ефременко Е., Пегудов А., Килдеева Н., Перминов П., Варфоломеев С. *Biocatal. Biotransfor.*, 2005, v. 23(2), p. 103–108.
47. Патент РФ № 2261911, 2005.
48. Патент WO 2004/112482, 2004.
49. McDaniel C.S., McDaniel J., Wales M.E., Wild J.R. *Prog. Org. Coat.*, 2006, v. 55(2), p. 182–188.
50. Simonian A.L., DiSioudi B.D., Wild J.R. *Anal. Chim. Acta*, 1999, v. 389(1-3), p. 189–196.
51. Kanchan A.J., Prouza M., Kum M., Wang J., Tang J., Haddon R., Chen W., Mulchandani A. *Anal. Chem.*, 2006, v. 78(1), p. 331–336.
52. Ефременко Е.В., Курочкин И.Н., Сиглаева Л.В., Еремеев Н.Л., Бармин А.В., Морзунова Т.Г., Кондрашов Ю.В., Райнина Е.И.,

- Варфоломеев С.Д., Завьялова Н.В., Холстов В.И. Хим. и биол. безопасность, 2004, № 3–4(15–16), с. 26–35.
53. *Simonian A.L., Efremenko E.N., Wild J.R.* Anal. Chim. Acta, 2001, v. 444(2), p. 179–186.
54. *Viveros L., Paliwal S., McCrae D., Wild J., Simonian A.* Sensors Actuat. B – Chem., 2006, v. 115(1), p. 150–157.
55. *Yu D., Volponi J., Chhabra S., Brinke C.J., Mulchandani A., Singh A.K.* Biosens. Bioelectron., 2005, v. 20(7), p. 1433–1437.
56. *Rainina E.I., Efremenko E.N., Varfolomeyev S.D., Simonian A.L., Wild J.R.* Ibid., 1996, v. 11, p. 991–1000.
57. *Varfolomeyev S., Kurochkin I., Eremenko A., Efremenko E.* Pure Appl. Chem., 2002, v. 74(12), p. 2311–2316.
58. *Simonian A.L., Good T.A., Wang S.-S., Wild J.R.* Anal. Chim. Acta, 2005, v. 534(1), p. 69–77.
59. *White B.J., Harmon H.J.* Biosens. Bioelectron., 2005, v. 20(10), p. 1977–1983.
60. *Schöning M.J., Arzdorf M., Mulchandani P., Chen W., Muchandani A.* Sensors, 2003, v. 3, p. 119–127.
61. *Lei Y., Mulchandani A., Chen W.* Biotechnol. Progr., 2005, v. 21(3), p. 678–681.
62. *Briseo-Roa L., Hill J., Notman S., Sellers D., Smith A.P., Timperley C.M., Wetherell J., Williams N.H., Williams G.R., Ferscht A.R., Griffiths A.D.* J. Med. Chem., 2006, v. 49(1), p. 246–255.