

УДК 543.054/.645

СЕЛЕКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ИМПРИНТИРОВАННОЙ ГЛЮКООКСИДАЗЫ

© 2023 г. П. С. Пиденко^а, К. Ю. Пресняков^а, Д. Д. Дрозд^а, Н. А. Бурмистрова^а, *

^аСаратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: naburmistrova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Разработана методика синтеза высокоселективного сорбента на основе импринтированного белка (ИБ) – глюкооксидазы (ГО) – и коммерчески доступных микрочастиц SiO₂ для сорбции микотоксина зеараленона, продуцируемого грибами вида *Fusarium*. Впервые предложено использование 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля процесса очистки ИБ. Оценена возможность замены молекулы зеараленона в качестве молекулы шаблона на структурные аналоги, обладающие более низкой токсичностью. Определены аналитические характеристики определения зеараленона с использованием импринтированной ГО в качестве рецепторного элемента в иммуоферментном анализе: предел обнаружения – 5 нг/мл, линейный диапазон определяемых концентраций – 11–112 нг/мл. Показаны высокие сорбционные характеристики синтезированного сорбента на основе ИБ (сорбционная емкость – 7.6 мкг/мг сорбента, импринтинг фактор – 2.5).

Ключевые слова: молекулярный импринтинг, импринтированные белки, глюкозооксидаза, зеараленон, флуоресценция, 3D флуоресцентная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0044450223090104, EDN: ZXCFYJ

Микотоксины – вторичные метаболиты, продуцируемые грибами, принадлежащими к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* [1]. В настоящее время зарегистрировано более 500 микотоксинов, среди которых наибольшую опасность для сельского хозяйства, здоровья человека и животных представляют группы афлатоксинов, охратоксинов, фумонизинов, а также патулин, vomitоксин и зеараленон (ЗЕА) [2]. Зеараленон – нестероидный эстрогенный микотоксин, продуцируемый несколькими видами грибов *Fusarium*, преимущественно известный как патоген зерновых культур [3]. Структура ЗЕА аналогична природным эстрогенам, что обуславливает высокое сродство связывания с сайтами эстрогенных рецепторов клеток и, как результат, приводит к снижению уровня прогестерона и сывороточного тестостерона в кровотоке. Это является причиной многочисленных клеточных изменений, бесплодия, снижения частоты беременностей у животных (свиней, овец, свиней и крупного рогатого скота), а также гиперактивных эстрогенных нарушений у человека [2, 4].

На территории РФ контроль уровней микотоксинов проводится в зерне, используемом в пищевых и кормовых целях [5], и продуктах питания [6]. Предельно допустимое содержание ЗЕА в

зерне злаковых (пшеница, ячмень, кукуруза), применяемых в пищевых целях, составляет 1 мг/кг, для зернобобовых и масличных культур предельные значения не установлены. Для всех видов зерна кормовых культур предельно допустимое содержание ЗЕА установлено на уровне 1 мг/кг. Согласно нормам [6], предельно допустимые уровни ЗЕА для ферментных препаратов грибного происхождения и продуктов, содержащих пшеничную, ячменную и кукурузную муку, составляют не более 5 мкг/кг; в крупе, толокне, хлопьях, муке, макаронных изделиях, хлебе и хлебобулочных изделиях пшеничного, ячменного и кукурузного происхождения – 0.2 мг/кг. Предельно допустимые уровни содержания ЗЕА в кормовых культурах, установленные Европейской комиссией [7], составляют 2 мг/кг, за исключением кукурузы (не более 3 мг/кг), а в продуктах питания аналогичны требованиям законодательства РФ.

Негативное воздействие ЗЕА и его производных на здоровье человека и животных, проявляющееся в различных иммунотоксических и генотоксических эффектах, обуславливает необходимость разработки эффективных методов концентрирования, определения и инактивации ЗЕА в природных матрицах [8, 9]. По сравнению с химическими и физическими подходами биологические методы

детоксикации и инактивации, предусматривающие биотрансформацию микотоксинов в менее токсичные метаболиты, как правило, являются более продуктивными [2]. В работах [2, 10] рассмотрены различные методы разложения и биodeградации микотоксинов, в том числе ЗЕА, с использованием ферментов микробного происхождения. Среди этих методов наибольшее распространение получил метод, основанный на расщеплении лактонового кольца, катализируемом ферментами гидролазами. Разрушение структуры ЗЕА приводит к нарушению эстрогенной активности и устранению воздействия на клетки живых организмов. Другим путем инактивации ЗЕА является использование высокоселективных сорбентов на основе молекулярно импринтированных полимеров (МИП), позволяющих эффективно выделять микотоксины из биологических матриц [11]. В этом плане определенный интерес представляют импринтированные белки (ИБ), обладающие большей биосовместимостью по сравнению с МИП на основе органических полимеров. К преимуществам ИБ следует также отнести высокую селективность к молекулам-шаблонам [12–15] и возможность использования доступных реагентов – белковых молекул и сшивающих мономеров [16].

Авторами работ [13, 14, 17] показана возможность создания ИБ, специфичных к ЗЕА, на основе альбумина из белка куриных яиц (овальбумина) и бычьего сывороточного альбумина, характеризующихся достаточно высоким значением импринтинг фактора (ИФ) 2.2. Возможным путем повышения сорбционной емкости ИБ является использование матричной белковой молекулы с большой площадью поверхности, например глюкозооксидазы (ГО) [15]. Альтернативным способом стабилизации ИБ и расширении области их практического применения может являться их иммобилизация на поверхности носителей, в частности неорганических наночастиц [17–21].

В настоящей работе изучены свойства ИБ, специфичных к ЗЕА (анти-ЗЕА ИБ), на основе ГО, синтезированных с использованием в качестве молекул шаблона ЗЕА и его структурных аналогов (4-гидроксикумарин, кумарин), проявляющих более низкую токсичность. Оценена возможность иммобилизации анти-ЗЕА ИБ на поверхности наночастиц SiO₂, модифицированных полианилином (ПАНИ), и их использования в качестве селективного к ЗЕА сорбента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Использовали ГО из *Aspergillus niger*, (Тип 7, 1000 У/мг), ЗЕА, 4-гидроксикумарин (4-ГК, 98%), кумарин (98%), глутаровый альдегид (ГА, 25% водн.), анилина гидрохлорид и пероксидсульфат аммония (Merck KGaA, Германия), ультрафильтрационные пробирки 30000 MWCO (JET Bio-Filtration Co. Ltd., Китай), диализные

мешки 10000 MWCO (Thermo Scientific Inc., США). В качестве носителя использовали наночастицы Аэросил™ 200 (SiO₂, Evonik GmbH, Германия). Для приготовления буферных растворов использовали NaH₂PO₄·2H₂O и Na₂HPO₄·12H₂O (ООО “РеаХим”, Россия). Для приготовления всех растворов использовали бидистиллированную воду (БД) с удельным сопротивлением ~18 МОм/см.

Спектры флуоресценции растворов регистрировали на флуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies Inc., США), спектры поглощения – на спектрофотометре UV–1800 (Shimadzu Co., Япония). pH растворов измеряли с помощью pH-метра AB33PH (Ohaus Co., США) с применением электрода ST310.

Ферментативную активность ИБ и неимпринтированных ИБ (нИБ) оценивали по тушению люминесцентного субстрата, состоящего из коллоидного раствора квантовых точек, стабилизированных дигидролипоевой кислотой (CdZnSeS/ZnS@ДЛК), в глюкозе (1 мг/мл в БД) [22]. Измерение скорости ($t = 60$ мин) изменения интенсивности люминесценции квантовых точек (КТ) ($\lambda_{\text{исп}} = 530$ нм) проводили в микропланшетном ридере Synergy H1 (BioTek Instruments, США).

Аналитические характеристики синтезированных ИБ определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с заменой анти-ЗЕА антител на анти-ЗЕА ИБ согласно методике [13]. Для иммобилизации использовали растворы ИБ с концентрацией 20 мкг/мл и конъюгата зеараленон-пероксидаза хрена (ЗЕА-ПХ, 1/100000) в фосфатном буферном растворе (ФСБ) с pH 7.4, (0.1 М).

Сорбционные свойства анти-ЗЕА ИБ, иммобилизованных на поверхности частиц SiO₂ (анти-ЗЕА ИБ@SiO₂), и частиц SiO₂, модифицированных ПАНИ (анти-ЗЕА ИБ@ПАНИ@SiO₂), оценивали методом ВЭЖХ с УФ-детектором (LC–20AD Shimadzu, Япония) на колонке Waters Spherisorb ODS2 C18 Column (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) в режиме термостатирования (25°C) со скоростью потока 1.0 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0.1%-ный водный раствор H₃PO₄ и ацетонитрил в соотношении 60 : 40 (по объему), элюирование осуществляли в изократическом режиме.

Для математических расчетов использовали программное обеспечение OriginPro 2022 (Origin-Lab Co., США).

Синтез и очистка анти-ЗЕА ИБ. Синтез антиЗЕА ИБ проводили по известной методике [12, 14] с незначительными изменениями. В водный раствор ГО (1 мг/мл, 15 мкМ) вносили 0.1 М HCl до pH 3.0, перемешивали в течение 10 мин и добавляли 0.1 мл 640 мкМ раствора молекулы шаблона (ЗЕА, 4-ГК, кумарин). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин, добавляли 0.1 М раствор NaOH до pH 9.0 и вносили 0.1 мл 1%-ного водного раствора ГА. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин и выдер-

живали 12 ч при 4°C. нИБ синтезировали по аналогичной методике, но вместо раствора молекулы шаблона вносили равный объем этанола.

Синтезированные анти-ЗЕА ИБ и нИБ очищали методом диализа против ФСБ с рН 6.5 (0.1 М) в течение 6 ч с заменой диализата каждые 60 мин, затем против ФСБ с рН 7.4 (0.1 М) в течение 18 ч.

Растворы ИБ и нИБ концентрировали центрифугированием в ультрафильтрационных пробирках (30000 MWCO) при 3000 g и 4°C в течение 7 мин. Полученные образцы хранили в стеклянных флаконах из темного стекла при 4°C.

Синтез анти-ЗЕА ИБ@ПАНИ@SiO₂. Наночастицы SiO₂ (50 мг) диспергировали в 10 мл 0.01 М раствора анилина гидрохлорида в HCl (рН 4) с использованием ультразвуковой обработки в течение 10 мин. В полученный раствор при постоянном перемешивании в течение 4 ч при 0°C по каплям вносили 0.2 мл 0.05 М раствора пероксида сульфата аммония, раствор выдерживали 12 ч. Модифицированные частицы ПАНИ@SiO₂ осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин, промыли БД для удаления непрореагировавших компонентов, сушили в вакууме при 50°C в течение 24 ч. ИБ иммобилизовали на поверхности частиц массой 5 мг SiO₂ и ПАНИ@SiO₂ методом физической адсорбции по известным методикам [23–25]. Частицы, модифицированные ИБ, осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин и после удаления надосадочной жидкости использовали для изучения их сорбционных свойств.

Изучение сорбционных свойств анти-ЗЕА ИБ@SiO₂ и анти-ЗЕА ИБ@ПАНИ@SiO₂. Полученные частицы вносили в 1 мл раствора ЗЕА с концентрацией 50 мкг/мл в 0.1 М ФСБ с рН 7.4 и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 30 мин (50 об/мин). Концентрацию ЗЕА в надосадочной жидкости определяли методом ВЭЖХ-УФ после осаждения частиц центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. ИФ находили как соотношение площадей хроматографических пиков надосадочной жидкости, после сорбции на ИБ и нИБ: ИФ = $\frac{S_{\text{нИБ}}}{S_{\text{ИБ}}}$ [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор сорбционной системы. Методика синтеза ИБ основана на предложенном в работе [16] способе синтеза импринтированного овальбумина для придания белку ферментативных свойств глутатионпероксидазы, успешно примененном при создании сенсорных систем для определения микотоксинов в модельных и реальных объектах с ИФ ~2.4 [12–14]. Дальнейшие исследования [27] показали, что наибольший ИФ (~3.1) достигается при использовании иммуноглобулинов G в качестве матричного белка. В то же время при создании рецепторного элемента на основе ГО, специ-

фичного к высокомолекулярной молекуле-шаблону (овальбумину), достигнут ИФ ~4. Эти факты свидетельствуют о возможности повышения сорбционных свойств ИБ при использовании матричной белковой молекулы с большой площадью поверхности, что и обусловило выбор ГО для наших исследований.

Для стабилизации ИБ использовали их иммобилизацию на поверхности наночастиц SiO₂. Выбор наночастиц SiO₂ обусловлен следующими факторами: (1) высокими эксплуатационными характеристиками материала, в том числе соответствие требованиям “зеленой” химии; (2) наличием различных протоколов модификации поверхности SiO₂, в том числе ПАНИ [28]; (3) возможностью физической адсорбции молекул ГО на поверхности SiO₂ до и после модификации. Немаловажным фактором является и возможность снижения стоимости сорбента при использовании коммерчески доступного продукта.

Применение 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля процесса очистки импринтированного белка. Одной из важных стадий синтеза ИБ является очистка матричной белковой молекулы от молекул шаблонов. В случае низкомолекулярных молекул шаблонов для этого применяют диализ [12, 13, 16]. Однако влияние времени и количества диализных циклов на процесс очистки ИБ ранее не изучали. Нами показана возможность контроля процесса очистки ИБ в процессе диализа путем регистрации флуоресценции ГО и ЗЕА в растворе при разных $\lambda_{\text{возб}}$ (3D флуоресцентная спектроскопия). Результаты представлены на рис. 1.

Установлено, что через 5 ч после начала диализа в ФСБ с рН 6.5 достигается стабилизация интенсивности сигнала флуоресценции ГО, что может быть обусловлено удалением из раствора аминокислотных остатков, образовавшихся на стадии денатурации ГО при синтезе ИБ. В то же время полное удаление молекул шаблона наблюдается только после смены диализата (ФСБ с рН 7.4) и дополнительного диализа в течение 18 ч.

Аналитические характеристики импринтированного белка. Синтезированные ИБ использовали для определения ЗЕА конкурентным ИФА (ИБ-ИФА). Градуировочные зависимости для определения ЗЕА при использовании ИБ, синтезированных с ЗЕА (анти-ЗЕА ИБ) и его структурными аналогами 4-ГК (анти-4-ГК ИБ) и кумарином (анти-кумарин ИБ) в качестве молекул-шаблонов, представлены на рис. 2. Линейные диапазоны определяемых содержаний и пределы обнаружения (c_{min}) ЗЕА при использовании анти-ЗЕА ИБ, анти-4-ГК ИБ и анти-кумарин ИБ составляют 11–112 нг/мл ($c_{\text{min}} = 5$ нг/мл, 100 мкг/кг), 30–142 нг/мл ($c_{\text{min}} = 12$ нг/мл, 240 мкг/кг) и 54–183 нг/мл ($c_{\text{min}} = 25$ нг/мл, 500 мкг/кг) соответственно. Таким образом, аналитические характеристики анти-ЗЕА ИБ показывают их перспективность для определения

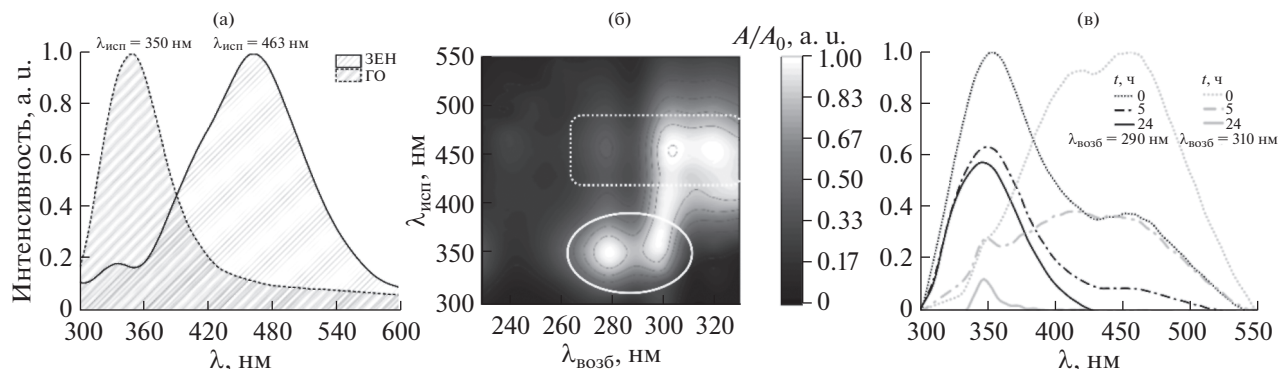


Рис. 1. (а): Спектры флуоресценции глюкооксидазы и зearаленона, (б): результаты 3D флуоресцентной спектроскопии до очистки (области локализации сигнала глюкооксидазы и зearаленона выделены линией и пунктиром соответственно), (в): спектры флуоресценции раствора импринтированного белка во время диализа.

ЗЕА в зерне различного назначения и продуктах питания, а анти-4-ГК ИБ и анти-кумарин ИБ – в зерне, предназначенном для кормовых и пищевых целей на уровнях, рекомендуемых в РФ.

Ферментативные свойства импринтированного белка. Стадии синтеза ИБ предполагают существенное изменение кислотности среды, что может приводить к снижению ферментативной активности ГО из-за изменения конформационной структуры белка как на вторичном, так и на третичном уровнях [29]. В связи с этим изучали влияние синтеза ИБ на ферментативную активность ГО, которое оценивали по тушению КТ на основе твердых растворов [30].

Ферментативную активность ГО, ИБ и нИБ (50 мкг/мл) определяли в 0.01 М ФСБ с рН 6.5, что соответствовало оптимальным условиям проявления активности фермента [31]. На рис. 3 представлены кинетические кривые тушения люминесценции субстрата КТ ($\lambda_{\text{всп}} = 530$ нм) в присутствии

нативной и импринтированной ГО. Согласно полученным данным, ферментативная активность ИБ составила 1081 U/мг, а нИБ, 1177 U/мг, что на 8.1 и 17.7% выше, чем у исходной ГО. Это подтверждает тот факт, что белковая структура ГО не разрушается в процессе синтеза и очистки ИБ, при этом увеличение ферментативной активности, скорее всего, обусловлено увеличением степени очистки ГО вследствие многостадийного процесса очистки и концентрирования фермента при синтезе ИБ.

Иммобилизация импринтированного белка на поверхности наночастиц. Физическая сорбция является самым простым методом иммобилизации фермента на SiO_2 [24, 32]. Сорбция ГО на SiO_2 обусловлена слабыми Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, образованием водородных связей, а также электростатическими взаимодействиями между молекулами фермента и силанольными группами на поверхности наночастиц [24]. Син-

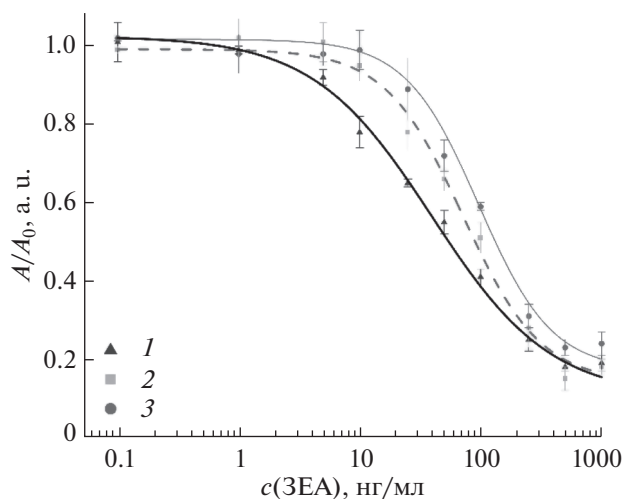


Рис. 2. Градуировочные зависимости для определения зearаленона методом ИБ-ИФА для анти-ЗЕА ИБ (1), анти-4-ГК ИБ (2), анти-кумарин ИБ (3).

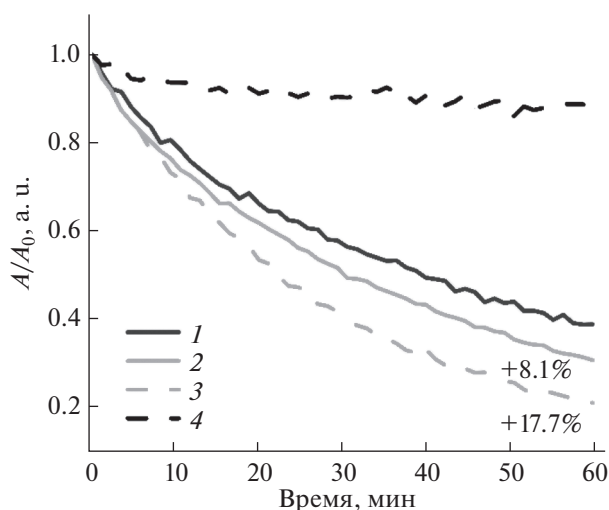


Рис. 3. Кинетические зависимости интенсивности люминесценции субстрата КТ в присутствии глюкооксидазы (1), импринтированного белка (2), неимпринтированного белка (3) и в отсутствие фермента (4).

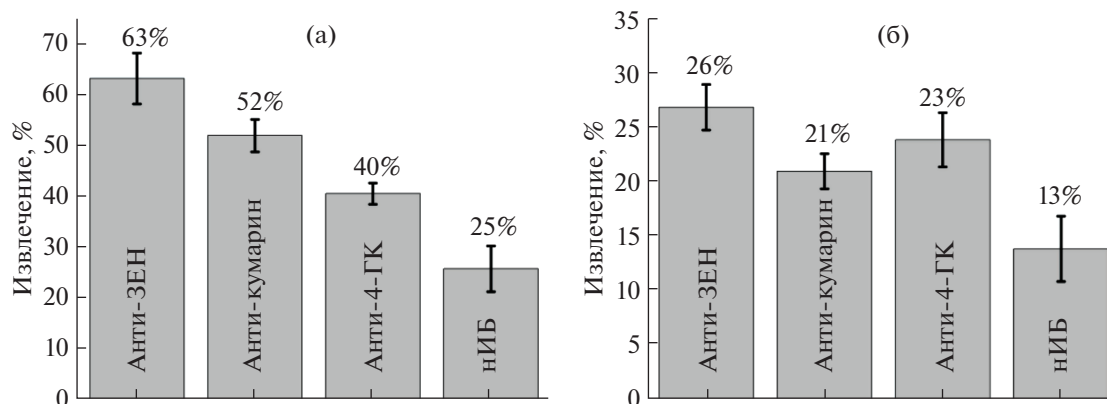


Рис. 4. Степень извлечения зearаленона при использовании импринтированного белка, иммобилизованного на ПАНИ@SiO₂ (а), SiO₂ (б).

тез ПАНИ на поверхности SiO₂ позволяет увеличить эффективность сорбции носителя за счет высококоразвитой заряженной поверхности.

Иммобилизацию ИБ и нИБ проводили в течение 3 ч при 20°C в 0.01 М ФСБ с рН 5.5 и 7.4 на поверхности наночастиц SiO₂ и ПАНИ@SiO₂ соответственно [23, 25]. Степень иммобилизации ИБ и нИБ на поверхности носителя оценивали по изменению интенсивности флуоресценции растворов до и после иммобилизации. Для ПАНИ@SiO₂ и SiO₂ степень иммобилизации составила ~85 и 75% соответственно.

Сорбция зearаленона из модельных растворов. Сравнили сорбционные свойства наночастиц SiO₂ и ПАНИ@SiO₂, модифицированных ИБ и нИБ (рис. 4). Эффективность сорбентов оценивали по изменению площади хроматографического пика ЗЕА в модельных растворах до и после сорбции. Установили, что степень извлечения на сорбентах на основе ПАНИ@SiO₂ больше по сравнению с SiO₂. В зависимости от молекулы-шаблона при синтезе ИБ степень извлечения возрастает в ряду анти-кумарин, анти-4-ГК, анти-ЗЕА ИБ. При этом рассчитанный ИФ составил 1.5, 2.0 и 2.4 для анти-кумарин, анти-4-ГК и анти-ЗЕА ИБ соответственно. Иммобилизации ИБ на поверхности носителей позволяет значительно повысить сорбционную емкость ИБ (до 7.6 мкг/мг) по сравнению с известными данными [14].

Синтезирована импринтированная ГО, специфичная к ЗЕА, изучена возможность замены ЗЕА на менее токсичные структурные аналоги при синтезе ИБ. Проведено сравнение ферментативной активности нативной и импринтированной ГО и показано, что импринтинг существенно не влияет на активность фермента. Синтезированные ИБ успешно применены для аналитического определения ЗЕА методом ИБ-ИФА. Полученные аналитические характеристики позволя-

ют рассматривать возможность использования ИБ для определения ЗЕА в зерне и продуктах питания. Предложена схема создания селективных сорбентов на основе наночастиц SiO₂ и ИБ, иммобилизованных на их поверхности.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22–16–00102). П.С. Пуденко благодарит Совет по грантам Президента РФ (стипендия № СП-1690.2022.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahato D.K., Devi S., Pandhi S., Sharma B., Maurya K.K., Mishra S., Dhawan K., Selvakumar R., Kamle M., Mishra A.K., Kumar P. Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review // *Toxins*. 2021. V. 13. № 2. P. 92. <https://doi.org/10.3390/toxins13020092>
2. Haque M.A., Wang Y., Shen Z., Li X., Saleemi M.K., He C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review // *Microb. Pathog.* 2020. V. 142. Article 104095. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>
3. Gupta R.C., Mostrom M.S., Evans T.J. Zearalenone / *Veterinary Toxicology*. Elsevier, 2018. P. 1055. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00076-3>
4. Taranu I., Braicu C., Marin D.E., Pistol G.C., Motiu M., Balacescu L., Beridan Neagoe I., Burlacu R. Exposure to zearalenone mycotoxin alters in vitro porcine intestinal epithelial cells by differential gene expression // *Toxicol. Lett.* 2015. V. 232. № 1. P. 310. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.10.022>
5. Технический регламент таможенного союза “О безопасности зерна” (ТР ТС 015/2011). clck.ru/33utzE (дата обращения 30.03.2023).
6. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). clck.ru/33uu2q (дата обращения 30.03.2023).
7. E. U. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize

- and maize products, 2007. clck.ru/33vPwZ (дата обращения 30.03.2023).
8. *Fleck S.C., Hildebrand A.A., Müller E., Pfeiffer E., Metzler M.* Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone // *Mycotoxin Res.* 2012. V. 28. № 4. P. 267. <https://doi.org/10.1007/s12550-012-0143-x>
 9. *Moreau M., Lescure G., Agoulon A., Svinareff P., Orange N., Feuilloley M.* Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation: Destruction of mycotoxins by pulsed light // *J. Appl. Toxicol.* 2013. V. 33. № 5. P. 357. <https://doi.org/10.1002/jat.1749>
 10. *Loi M., Fanelli F., Liuzzi V., Logrieco A., Mulè G.* Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives // *Toxins.* 2017. V. 9. № 4. P. 111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>
 11. *Lucci P., David S., Conchione C., Milani A., Moret S., Pacetti D., Conte, L.* Molecularly imprinted polymer as selective sorbent for the extraction of zearalenone in edible vegetable oils // *Foods.* 2020. V. 9. № 10. P. 1439. <https://doi.org/10.3390/foods9101439>
 12. *Gutierrez A.V.R., Hedström M., Mattiasson B.* Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor // *Biotechnol. Reports.* 2016. V. 11. P. 12. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.05.006>
 13. *Pidenko P., Zhang H., Lenain P., Goryacheva I., De Saeger S., Beloglazova N.* Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1040. P. 99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.062>
 14. *Beloglazova N., Lenain P., Tessier M., Goryacheva I., Hens Z., De Saeger S.* Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone // *Talanta.* 2019. V. 192. P. 169. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.042>
 15. *Pidenko P., Presnyakov K., Beloglazova N., Burmistrova N.* Imprinted proteins for determination of ovalbumin // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414. № 18. P. 5609. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04009-3>
 16. *Liu J., Zhang K., Ren X., Luo G., Shen J.* Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 504. № 1. P. 185. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00763-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00763-3)
 17. *Burmistrova N.A., Pidenko P.S., Pidenko S.A., Zacharevich A.M., Skibina Y.S., Beloglazova N.V., Goryacheva I.Y.* Soft glass multi-channel capillaries as a platform for bioimprinting // *Talanta.* 2020. V. 208. Article 120445. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120445>
 18. *Sánchez D.A., Alnoch R.C., Tonetto G.M., Krieger N., Ferreira M.L.* Immobilization and bioimprinting strategies to enhance the performance in organic medium of the metagenomic lipase LipC12 // *J. Biotechnol.* 2021. V. 342. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.022>
 19. *Li B., Duan D., Wang J., Li H., Zhang X., Zhao B.* Improving phospholipase D activity and selectivity by bioimprinting-immobilization to produce phosphatidylglycerol // *J. Biotechnol.* 2018. V. 281. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.343>
 20. *Li K., Wang J., He Y., Cui G., Abdulrazaq M.A., Yan Y.* Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles // *Chem. Eng. J.* 2018. V. 351. P. 258. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.086>
 21. *Haskell A.K., Sulman A.M., Golikova E.P., Stein B.D., Pink M., Morgan D.G., Lakina N.V., Karpenkov A.Yu., Tkachenko O.P., Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M.* Glucose oxidase immobilized on magnetic zirconia: Controlling catalytic performance and stability // *ACS Omega.* 2020. V. 5. № 21. P. 12329. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01067>
 22. *Drozd D.D., Pidenko P.S., Presnyakov K.Y., Strokin P.D., Speranskaya E.S., Goryacheva I.Y.* Dihydrolipoic acid coated alloyed quantum dots / *Saratov Fall Meeting 2019: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine* / Eds. Tuchin V.V., Genina E.A. 2020. V. 1145714. <https://doi.org/10.1117/12.2564393>
 23. *Mahdizadeh F., Eskandarian M.* Glucose oxidase and catalase co-immobilization on biosynthesized nanoporous SiO₂ for removal of dissolved oxygen in water: Corrosion controlling of boilers // *J. Ind. Eng. Chem.* 2014. V. 20. № 4. P. 2378. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.10.016>
 24. *Zhou G., Fung K.K., Wong L.W., Chen Y., Renneberg R., Yang S.* Immobilization of glucose oxidase on rod-like and vesicle-like mesoporous silica for enhancing current responses of glucose biosensors // *Talanta.* 2011. V. 84. № 3. P. 659. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.058>
 25. *Tamer U., Seçkin A.İ., Temur E., Torul H.* Fabrication of biosensor based on polyaniline/gold nanorod composite // *Int. J. Electrochem.* 2011. V. 2011. P. 1. <https://doi.org/10.4061/2011/869742>
 26. *Cai W., Li H.-H., Lu Z.-X., Collinson M.M.* Bacteria assisted protein imprinting in sol-gel derived films // *Analyst.* 2018. V. 143. № 2. P. 555. <https://doi.org/10.1039/C7AN01509G>
 27. *Sakamoto S., Minami K., Nuntawong P., Yusakul G., Putalun W., Tanaka H., Fujii S., Morimoto S.* Bioimprinting as a receptor for detection of kwakhurin // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 8. P. 1064. <https://doi.org/10.3390/biom12081064>
 28. *Ayadi C., Anene A., Kalfat R., Chevalier Y., Hbaieb S.* Molecularly imprinted polyaniline on silica support for the selective adsorption of benzophenone-4 from aqueous media // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2019. V. 567. P. 32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.01.042>
 29. *Janati-Fard F., Housaindokht M.R., Monhemi H.* Investigation of structural stability and enzymatic activity of glucose oxidase and its subunits // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2016. V. 134. P. 16. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.09.008>
 30. *Drozd D.D., Byzova N.A., Pidenko P.S., Tsyupka D.V., Strokin P.D., Goryacheva O.A., Zherdev A.V., Goryacheva I.Yu., Dzantiev B.B.* Luminescent alloyed quantum dots for turn-off enzyme-based assay // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414. № 15. P. 4471. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04016-4>
 31. *Nakamura S., Fujiki S.* Comparative studies on the glucose oxidases of *Aspergillus Niger* and *Penicillium amagasakiense* // *J. Biochem.* 1968. V. 63. № 1. P. 51. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128747>
 32. *Yiu H.H.P., Wright P.A.* Enzymes supported on ordered mesoporous solids: A special case of an inorganic-organic hybrid // *J. Mater. Chem.* 2005. V. 15. № 35-36. P. 3690. <https://doi.org/10.1039/b506090g>