

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Mantas Puida

KOMPIUTERINIS STRUKTŪRINIŲ INOVACIJŲ
BIOJUTIKLIUOSE MODELIAVIMAS

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, informatika (09 P)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2004–2009 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Feliksas Ivanauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika – 09P).

Turinys

<u>Santrumpos ir žymėjimai</u>	4
<u>1 Įžanga</u>	7
1.1 Tyrimų sritis	8
1.2 Tyrimo objektas	10
1.3 Darbo tikslai	10
1.4 Pagrindiniai rezultatai ir naujumas	11
1.5 Ginami teiginiai	12
1.6 Darbo rezultatų pristatymas ir publikavimas	13
1.7 Disertacijos struktūra	14
<u>2 Literatūros apžvalga</u>	16
2.1 Biojutikliai	16
2.2 Biojutiklių matematinis modeliavimas	22
2.3 Biojutiklių skaitinis modeliavimas	27
<u>3 Kompiuterinio modeliavimo pritaikymas įvertinant lipazės aktyvumą, kai substratas ištirpinamas micelėse</u>	30
3.1 Įvadas	30
3.2 Fizinis modelis	30
3.3 Matematinis modelis	31
3.4 Kompiuterinis modeliavimas ir jo rezultatai	34
3.5 Išvados	38
<u>4 Kompiuterinio modeliavimo pritaikymas tiriant lipazės aktyvumo matavimo sistemą, kurioje elektrodas padengiamas substratu</u>	39
4.1 Įvadas	39
4.2 Fizinis modelis	39
4.3 Matematinis modelis	40
4.4 Kompiuterinis modeliavimas ir jo rezultatai	48
4.5 Išvados	50
<u>5 Biojutiklio su valdoma membrana ir jį veikiančių išorės veiksnių kompiuterinis modeliavimas</u>	52
5.1 Įvadas	52
5.2 Fizinis modelis	53
5.3 Matematinis modelis	54
5.4 Kompiuterinis modeliavimas ir jo rezultatai	58
5.5 Išvados	72
<u>6 Išvados</u>	74
<u>7 Literatūra</u>	75
<u>Padėka</u>	79

Santrumpos ir žymėjimai

t	laikas
x	erdvinė koordinatė
h_t	diskretizavimo tinklelio laiko žingsnis
h_x	diskretizavimo tinklelio erdvės žingsnis
S_i^j	substrato koncentracija laiko momentu t_j , erdvės taške x_i .
P_i^j	reakcijos produkto koncentracija laiko momentu t_j , erdvės taške x_i
E_i^j	fermento koncentracija laiko momentu t_j , erdvės taške x_i
$E^*S_i^j$	į micelę prasiskverbusio fermento-substrato komplekso koncentracija laiko momentu t_j , erdvės taške x_i
E^{*j}	į micelę prasiskverbusio fermento koncentracija laiko momentu t_j , erdvės taške x_i
S	substrato koncentracija
S_0	pradinė substrato koncentracija
E	fermento koncentracija
E_0	pradinė fermento koncentracija
E^*	fermento prasiskverbusio į micelę koncentracija
E^*S	į micelę prasiskverbusio fermento-substrato komplekso koncentracija
ES	fermento-substrato komplekso koncentracija
P	reakcijos produkto koncentracija
D_{SE}	substrato difuzijos koeficientas fermentiniame sluoksnyje
D_{PE}	reakcijos produkto difuzijos koeficientas fermentiniame sluoksnyje
D_{SM}	substrato difuzijos koeficientas membranoje
D_{PM}	reakcijos produkto difuzijos koeficientas membranoje
D_{E^*S}	į micelę prasiskverbusio fermento-substrato komplekso difuzijos koeficientas
D_{E^*}	į micelę prasiskverbusio fermento difuzijos koeficientas
D_S	substrato difuzijos koeficientas
D_P	reakcijos produkto difuzijos koeficientas

i	srovės stipris (ar jam proporcingas dydis)
F	Faraday konstanta
D	difuzijos koeficientas
C	medžiagos koncentracija
B	jautris
S_{linear_range}	jutiklio tiesinio atsako diapazonas
d	jutiklio storis
E	fermentas
ES	fermento-substrato kompleksas
E^*	fermentas prasiskverbęs į micelę
E^*S	į micelę prasiskverbusio fermento-substrato kompleksas
S	substratas
P	fermentinės reakcijos produktas
k_1	fermentinės reakcijos pirmos pakopos greičio konstanta
k_2	fermentinės reakcijos pirmos pakopos grįžtamosios reakcijos greičio konstanta
k_{cat}	fermentinės reakcijos antros pakopos greičio konstanta
k_p	fermento prasiskverbimo į micelę greičio konstanta
k_d	fermento pasišalinimo iš micelės greičio konstanta
k_{-1}	fermentinės reakcijos pirmos pakopos grįžtamosios reakcijos greičio konstanta
K_M	Michaelis konstanta
V_{max}	Maksimalus reakcijos produkto gamybos greitis
K_P	inhibicijos konstanta
I	micelės paviršiaus plotas
V	bendras tirpalo tūris
W	Lamberto W funkcija
T	temperatūra
k_e	elektrodinės (elektrocheminės) reakcijos greičio konstanta
t_e	elektrodo įjungimo laiko momentas
t_m	membranos įjungimo laiko momentas

pH_V	fermento aktyvumo optimumo pH
pH_M	membranos pralaidumo optimumo pH
EC 3.1.1.3	triacilglicerol hidrolazė
PDCHQ	O-palmitoil-2,3-dicianohidrochinonas
FPONDS	9-(5'-ferocenilpentanoiloksi)nonil disulfidas

1 Įžanga

Skaitinis (kompiuterinis) modeliavimas yra labai svarbus mokslinių tyrimų metodas, be kurio šiandien sunkiai įsivaizduojami moksliniai tyrimai srityse, kuriose susiduria kelios disciplinos. Būtent tokiose srityse geriausiai atsiskleidžia kompiuterinio modeliavimo teikiami privalumai, tokie kaip laiko, fizinių bei žmogiškųjų resursų taupymas, o neretai ir kokybiškai naujų žinių apie tiriamą sistemą gavimas, kurių tiesiogiai nebūtų galima gauti atliekant fizinius eksperimentus. Viena tokių sričių, kur susiduria kelios disciplinos ir kur kompiuterinis modeliavimas gali būti itin naudingas, yra biojutikliai. Šie jutikliai yra maži analitiniai prietaisai, gebantys greitai analizuoti aplinką ir padedantys kontroliuoti sudėtingus biotechnologinius procesus ar išpėti visuomenę apie galimai grėšiantį pavojų. Jau istoriškai pirmieji biojutikliai, skirti gliukozės kiekiui kraujyje nustatyti, neatpažįstamai pakeitė sergančiųjų diabetu gyvenimą. Šiandien su biojutikliais galima susidurti kone kasdien tokiose svarbiuose srityse kaip medicina, aplinkosauga, terorizmo prevencija. Tačiau biojutiklių panaudojimo sritis tuo neapsiriboja: jie sėkmingai naudojami įvairiose pramonės srityse, kur reikia kontroliuoti sudėtingus technologinius procesus, tokiose kaip maisto, popieriaus, tirpiklių ir kt. Tobulinant esamus ir kuriant naujus biojutiklius galima išplėsti jų panaudojimo sritis, tiek kokybiškai, tiek kiekybiškai pagerinti pramoninius produktus, visuomenės sveikatos apsaugą bei saugumą nuo terorizmo grėsmių. Naujų biojutiklių kūrimas ir egzistuojančių tobulinimas yra ta sritis, kurioje susiduria kelios disciplinos: fizika, chemija, matematika ir informatika. Procesai, vykstantys biojutiklyje, tokie kaip difuzija, elektrodu tekanti srovė ir kt. priklauso fizikos sričiai, kiti, tokie kaip medžiagų skilimas veikiant fermentams – biochemijai, o fermentinės reakcijos produktų oksidacija ant elektrodo – elektrochemijai. O tam, kad perprasti kaip biojutikliai veikia ir kokių kiekybinių parametrų tikėtis esant vienoms ar kitoms aplinkos sąlygoms, bandoma vykstančius procesus ir juos nusakančius kiekybinius parametrus aprašyti matematinėmis lygtimis, kitaip tariant, sudaromi ir analizuojami biojutiklių matematiniai modeliai. Ne visada šiuos procesus aprašančias lygtis galima išspręsti analitiniais metodais, todėl dažnai kiek sudėtingesnių sistemų matematinių modelių lygtis tenka

spręsti skaitiniais metodais pasitelkiant kompiuterius. Šių sričių žinių bendras panaudojimas yra raktas į sėkmingą biojutiklių tobulinimą.

1.1 Tyrimų sritis

Biojutikliai, kaip ir imunologinės technologijos, genų bei baltymų inžinerija, yra viena sparčiausiai besivystančių biotechnologijos sričių, tiek tyrimų, tiek taikymų prasme. Kaip minėta aukščiau, biojutikliai yra analitiniai prietaisai sudaryti iš biologiškai aktyvios medžiagos, kuri reaguodama į analizą (analizuojamą medžiagą) generuoja signalą, o signalo keitimo ar detekcijos elementas paverčia šį signalą į patogesnę analizavimui formą (pvz. elektrinę) [Schell92, Blum91]. Kaip jautrusis biologinės kilmės elementas gali būti naudojami fermentai, antikūniai ar net visos ląstelės, o kaip signalo keitimo sistema gali būti naudojami elektrodai, fotoelementai ir kitos priemonės. Praktikoje plačiausiai paplitę fermentiniai amperometriniai biojutikliai.

Šiandien biojutikliai taikomi įvairiose srityse: medicinoje, aplinkosaugoje, bioterorizmo grėsmių prevencijoje, patogenų bei toksinų detekcijoje, maisto, popieriaus, tirpiklių ir kt. pramonės šakose. Paprastai jie naudojami ten, kur analitinė laboratorijos įranga nėra prieinama ar kai ilgas tyrimo laikas nėra priimtinas. Biojutikliai savo savybėmis gerai tinka tokiam pritaikymui, nes yra nedideli, mobilūs, jautrūs ir greitai [Schmi98, Born99, Houde04, Blum91]. Biojutiklių tolimesnis tobulinimas išlieka aktualia problema, nes būtent tobulinant biojutiklius plečiama jų panaudojimo sritis. Pavyzdžiui konstrukcinės biojutiklių inovacijos, labai svarbios siekiant sukurti implantuojamus biojutiklius, kurie būtų biologiškai suderinami, ir implantuoti į kūną galėtų patikimai funkcionuoti ilgą laiką [Tran93, Yang06, Yu06].

Kitas naujo biojutiklio pritaikymo pavyzdys, tai lipazės, triacilglicerolhidrolazės (EC 3.1.1.3), skaldančios triacilglicerolius alyvos / vandens paviršiuje ir plačiai pritaikomos maisto, popieriaus, farmacijos, kosmetikos, odos ir tekstilės pramonėje aktyvumo jutiklis [Schmi98, Houde04]. Paprastai fermento aktyvumo tyrimas atliekamas titravimo būdu ir tam reikia laboratorinės įrangos, o tas ne visuomet praktiška. Neseniai buvo publikuotas naujoviškas šios lipazės amperometrinis aktyvumo nustatymo metodas [Ignat05]. Publikacijoje aprašytoje analitinėje sistemoje kaip lipazės substratas panaudotas sintetinis junginys O-palmitoil-2,3-dicianohidrochinonas (PDCHQ), turintis tiek esterio, tiek elektroaktyvias hidrochinono grupes. PDCHQ molekulės ištirpintos Triton X-100

micelėse, o fermentinės hidrolizės produktas, 2,3-dicianohidrochinonas, difuzijos dėka lengvai oksidavosi ant elektrodo, šio proceso sparta proporcinga lipazės aktyvumui [Ignat05, Bard01].

Dar vienas naujoviškas šios lipazės aktyvumo nustatymo būdas buvo pasiūlytas tos pačios autorių grupės [Valin05]. Šis metodas išsiskiria tuo, kad elektrodas yra padengiamas substratu. Padengimas suformuojamas užlašinant mažą kiekį 9-(5'-ferocenilpentanoiloksi) nonil disulfido (FPONDS; $[\text{Fc}-(\text{CH}_2)_4\text{COO}(\text{CH}_2)_9\text{S}-]_2$) etanolio tirpalo ant auksinio elektrodo paviršiaus padengto heksanetiolio savaime susiformuojančiu monosluoksniu. Redoksoaktyvios FPONDS feroceno grupės generuoja amperometrinį signalą, kurio intensyvumas proporcingas FPONDS molekulių skaičiui ant elektrodo paviršiaus. Elektrocheminio signalo gesimo greitis proporcingas lipazės aktyvumui.

Aukščiau aprašyti naujoviški biojutikliai skiriasi nuo tradicinių tuo, kad biologinės kilmės jautrioji medžiaga yra ne fermentas, kaip įprasta, o jo substratas. Tai yra struktūrinė inovacija. Kita galima struktūrinė biojutiklio inovacija – valdomo laidumo membrana. Teorinių galimybių sukurti tokį biojutiklį yra, t.y. egzistuoja medžiagos kurių laidumas priklauso nuo įgauto krūvio ar terpės pH [Shimi88]. Tačiau, norint įsitikinti tokio hipotetinio biojutiklio praktiškumu, paprasčiausia tai padaryti pasitelkiant matematinį bei skaitinį modeliavimą.

Skaitinis biojutiklių modeliavimas yra vienas svarbiausių įrankių, naudojamų kuriant naujus ir tobulinant egzistuojančius biojutiklius. Pagrindinis skaitinio modeliavimo tikslas yra nustatyti, kurie veiksniai (tokie kaip cheminių reakcijų greitis, difuzijos greitis, bioaktyvaus elemento aktyvumas ir t.t.) labiausiai lemia biojutiklio atsaką į analito koncentraciją bei laikinę jo charakteristiką. Matematinis modelis aprašo biojutiklyje vykstančius fizinius bei cheminius procesus, o pagal šį modelį atliekant skaitinį modeliavimą (išsprendžiant sistemą aprašančias lygtis skaitiškai) galima stebėti bei modifikuoti šių procesų parametrus norimu masteliu. Paprastai biojutiklyje vyksta keletas procesų, tai fermento reakcija su substratu, gauto komplekso skilimas, skilimo produkto oksidacija / redukcija ant elektrodo, taip pat visų šių medžiagų difuzija. Vienu eksperimentu negalima įvertinti visų šių procesų santykinę svarbą galutiniam biojutiklio atsakui [Coop04]. Tačiau, jei atliekama eksperimentų serija su įvairiomis sąlygomis ir šių eksperimentų rezultatai lyginami su kinetiniu biojutiklio modeliu, tuomet galima

tikėtis daug geresnio sistemos supratimo. Tad matematinis biojutiklio modelis yra tas instrumentas, kuris leidžia tikslingai planuoti būsimus eksperimentus bei pagerinti biojutiklių parametrus konkrečioms taikymams. Ir atvirkščiai, jei nebūtų patikimo biojutiklio matematinio modelio, tuomet tyrėjams reiktų atlikti didelį kiekį fizinių eksperimentų, kad bandymų ir klaidų keliu gauti tokį patį žinių, kaip veikia sistema, kiekį [Coop04]. Taigi skaitinis modeliavimas ne tik taupo laiką bei resursus reikalingus atlikti fiziniams eksperimentams, bet ir leidžia praplėsti žinias bei supratimą kaip veikia konkreti bioanalitinė sistema, kas yra būtina siekiant efektyviai tobulinti biojutiklius.

1.2 Tyrimo objektas

Šios disertacijos tyrimo objektas yra matematiniai bei skaitiniai modeliai aprašantys naujoviškų biojutiklių, skirtų lipazės aktyvumui nustatyti, veikimą. Taip pat fiziniai parametrai lemiantys šių jutiklių atsaką. Kiti šios disertacijos objektai – matematinis bei skaitinis modeliai aprašantys biojutiklį su valdoma membrana, šiame jutiklyje vykstantys procesai, jo atsaką lemiantys veiksniai.

1.3 Darbo tikslai

- Parinkti bei pritaikyti matematinį ir skaitinį modelius lipazės aktyvumo nustatymo biojutikliui, kuriame naudojamas substratas ištirpintas micelėse. Praktiškai įvertinti parinkto modelio tinkamumą bei iširti pagal šį modelį veikiančio biojutiklio atsako laiką.
- Parinkti bei pritaikyti matematinį ir skaitinį modelius lipazės aktyvumo nustatymo biojutikliui, kuriame naudojamas elektrodo padengimas plonu substrato sluoksniu. Praktiškai įvertinti parinkto modelio tinkamumą bei iširti pagal šį modelį veikiančio biojutiklio savybes.
- Pasitelkiant skaitinį modeliavimą iširti biojutiklio patobulinimo galimybes bei praktiškumą, įprastą statinę membraną pakeičiant valdoma.

1.4 Pagrindiniai rezultatai ir naujumas

Skaitinio modeliavimo būdu apskaičiuota kaip veiks bioelektroanalitinė sistema, skirta *Thermomyces lanuginosus* lipazės aktyvumo nustatymui, kai substratas ištirpinamas micelėse, pagal paprastą vieno difuzijos sluoksnio modelį. Nustatyta, kad [Verger72] aprašytą kinetinį modelį papildžius kinetine substrato lygtimi, gaunamas geras sutapimas su eksperimentiniais duomenimis. Remiantis skaitinio modeliavimo rezultatais pasiūlytas originalus kinetinių konstantų rinkinys, aprašantis *Thermomyces lanuginosus* lipazės sąveiką su sintetiniu substratu O-palmitoil-2,3-dicianohidrochinonas, kuris ištirpintas micelėse. Nustatyta, kad papildomo difuzijos sluoksnio įvedimas (taikant besisukančio elektrodo metodą) sumažino pradinį sistemos atsaką (t.y. srovės stiprumą kai fermentas įleidžiamas į sistemą). Skaitmeniniai eksperimentai taip pat parodė, kad išorinio difuzijos sluoksnio susiaurinimas, leistų gauti stipresnį sistemos atsaką.

Pasiūlytas *Thermomyces lanuginosus* fermento aktyvumo nustatymo, naudojant substratu padengtą elektrodą, originalus kinetinis modelis davė gerą sutapimą tarp modeliavimo ir eksperimentinių duomenų. Pagal fizinio eksperimento analizės rezultatus, nustatyta, kad substrato (FPONDS) koncentracijos mažėjimas pasireiškia dviem skirtingomis priklausomybėmis nuo laiko: pirma – eksponentinė, antra – t^{-1} tipo. Tai rodo, kad sistemą aprašančios lygčių sistemos dS/dt lygtyje konkuruoja du nariai: pirmos ir antros eilės (substrato koncentracijos atžvilgiu). Skaitmeninio modeliavimo rezultatai parodė, kad geras eksperimento ir modeliavimo duomenų sutapimas galimas tik tuomet, kai atsižvelgiama į netiesinį nusiplovimo procesą. Šis procesas gali būti paaiškintas, kaip dviejų skirtingo greičio tiesinio nusiplovimo procesų (greitas substratas-substratas sluoksnių nusiplovimas ir lėtas substratas-elektrodas sluoksnio nusiplovimas) bendras veikimas. Šis modelis remiasi tuo, kad substratas formuoja vos kelių molekulių storio sluoksnį ant elektrodo paviršiaus, tad nusiplovimo greičio konstanta keičiasi (tiesiškai) su substrato koncentracija nuo didelės, kai nusiplauna silpnai sukibę substratas-substratas sluoksniai iki mažos, kai nusiplauna substratas-elektrodas sluoksnis. Ir visas šis procesas bendrai matomas kaip antros eilės narys substrato koncentracijos atžvilgiu.

Pasiūlytas originalaus biojutiklio su valdoma išorine membrana matematinis modelis atsižvelgiantis į terpės pH bei temperatūrą. Identifikuoti biojutiklio parametrai,

leidžiantys nustatyti kada biojutiklis pereina iš vieno darbo režimo į kitą. Išnagrinėti keli specialūs atvejai, kai fermento aktyvumas ir membranos laidumas priklauso nuo pH. Nustatyta, kad jutiklio atsako laikas jautrus jutiklio darbo režimui, ir ypatingai jautrus ribinėje srityje. Giliame difuziniame režime jutiklio tiesinio atsako diapazonas gali būti išplėstas keliomis eilėmis. Išnagrinėta kaip veiktų biojutiklis kaupimo-stripingo režime, jei turėtų valdomą laiką membraną. Skaitinio modeliavimo būdu nustatyta, kad tinkamai parinkus membranos įjungimo laiką galima gauti žymiai stipresnį biojutiklio atsaką, su sąlyga, kad reakcijos produktas menkai inhibuoja fermentinę reakciją.

1.5 Ginami teiginiai

1. Pasiūlytas kinetine substrato lygtimi papildytas modelis, aprašantis lipazės aktyvumo nustatymo biojutikliui, kuriame naudojamas substratas ištirpintas micelėse. Papildytas modelis gerai tinka šiam jutikliui modeliuoti, jei daroma prielaida kad biojutiklis yra uždaras (nei substrato, nei fermento papildomai nepatenka).
2. Pasiūlytas netiesiniu nusiplovimo nariu papildytas matematinis modelis aprašantis lipazės aktyvumo nustatymo biojutiklį, kuriame naudojamas plonu substrato sluoksniu padengtas elektrodas. Pasiūlytas modelis jutikliui modeliuoti tinka geriau nei tradicinis kinetinis modelis.
3. Skaitinio modeliavimo būdu nustatyta, kad biojutiklio statinę membraną pakeitus membrana, kurios laidumas netiesiškai kinta kartu su terpės pH, galima sukonstruoti lengvai perkonfigūruojamą (perjungiant iš kinetinio į difuzinį režimą) biojutiklį, kuris vienoje konfigūracijoje būtų itin jautrus, o kitoje turėtų platų tiesinio jautrumo diapazoną.
4. Skaitinio modeliavimo būdu nustatyta, kad biojutiklis su šuoliškai laike valdoma membrana turi pranašumą prieš biojutiklį su statine membrana, tuomet kai jutiklis dirba kaupimo-stripingo režime, o reakcijos produktas silpnai inhibuoja fermentinę reakciją.

1.6 Darbo rezultatų pristatymas ir publikavimas

Darbo rezultatai pristatyti:

1. Tarptautiniame seminare „20th Nordic Seminar on Computational Mechanics“, vykusiame 2007 m. Gioteburge (Švedija), perskaitytas pranešimas "Computational Modeling of the Substrate Wash off in Electrobioanalytical System" (bendraautorai F.Ivanauskas, V.Razumas).
2. Lietuvos Matematikų Draugijos XLIX konferencijoje, vykusioje 2008 m. Kaune, perskaitytas pranešimas „Valdomos membranos panaudojimas tobulinant biojutiklius“ (bendraautorai F.Ivanauskas, V.Laurinavičius).
3. Tarptautinėje 12-ojoje Matematinio Modeliavimo ir Analizės konferencijoje, vykusioje 2007 m. Trakuose, perskaitytas pranešimas „Computational Modeling Of The Amperometric Bioanalytical System For Lipase Activity Assay: A Time-dependent Response“ (bendraautorai F.Ivanauskas, I.Ignatjev, G.Valinčius, V.Razumas).
4. Lietuvos Matematikų Draugijos XLVIII konferencijoje, vykusioje 2007 m. Vilniuje, perskaitytas pranešimas “Lipaze paremtų biojutiklių kompiuterinio modeliavimo ir praktinių rezultatų palyginimas” (bendraautorai F.Ivanauskas, I.Ignatjev, G.Valinčius, V.Razumas).
5. Lietuvos Matematikų Draugijos XLVII konferencijoje, vykusioje 2006 m. Kaune, perskaitytas pranešimas “Plonų biojutiklių kompiuterinis modeliavimas” (bendraautorai F.Ivanauskas, V.Razumas).

Darbo rezultatai publikuoti:

1. M. Puida, F. Ivanauskas, I. Ignatjev, G. Valinčius, V. Razumas, Computational modeling of the amperometric bioanalytical system for lipase activity assay: a time-dependent response. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 12 (3), p. 245–251, 2007.
2. M. Puida, F. Ivanauskas, I. Ignatjev, G. Valincius, V. Razumas, Computational modeling of the electrochemical system of lipase activity detection, *Sensors*, 8 (6), p. 3873-3879, 2008.

3. M. Puida, F. Ivanauskas, V. Laurinavicius, Mathematical modeling of the action of biosensor possessing variable parameters, (2009 m. gegužės 1d. priimtas publikavimui *Journal of Mathematical Chemistry*).

Darbo rezultatų publikacijos konferencijų medžiagoje:

1. M. Puida, F. Ivanauskas, V. Razumas. *Computational modeling of the substrate wash off in electrobionalytical system*, Proceedings of the 20th Nordic seminar on computational mechanics / edited by R. Larsson, K. Runesson. Goteborg, 2007.

Publikacijos kitomis temomis:

1. M. Puida, F. Ivanauskas. Light beam phase retrieval in nonlinear media: a computer simulation, *Lietuvos matematikos rinkinys*, t. 45, spec. nr., p. 504-508, 2005.
2. V. Jukna, G. Tamosauskas, G. Valiulis, M. Aputis, M. Puida, F. Ivanauskas, A. Dubietis, Filamentation of ultrashort light pulses in a liquid scattering medium, *APPLIED PHYSICS B-LASERS AND OPTICS*, 94 (1), 2009.

1.7 Disertacijos struktūra

1-ame skyriuje apibrėžiama tyrimų sritis, tyrimo objektas, nustatomi darbo tikslai. Glaustai pateikiami pagrindiniai rezultatai ir jų naujumas. Suformuluojami ginami teiginiai. Pateikiamas publikacijų bei darbo rezultatų pristatymo sąrašas, glausta disertacijos struktūra.

2-ame skyriuje pateikiama išsami tyrimų srities literatūros apžvalga. Apžvelgiama kas yra biojutikliai, kokie jų tipai, kuo jie aktualūs, kuriomis kryptimis vykdomi jų tyrimai ir kaip jie siejasi su šios disertacijos tyrimų objektais. Taip pat apžvelgiama kokie matematiniai modeliai taikomi biojutiklių modeliavime, kokie jų privalumai ir trūkumai, kurie metodai taikomi esant tam tikroms prielaidoms. Kartu pateikiama skaitinių metodų, skirtų biojutiklius aprašančių lygčių sprendimui, santrauka bei analizė,

pateikiama argumentacija, kodėl šie metodai pasirinkti kaip skaitinio uždavinio sprendimo įrankiai.

3-ame skyriuje aprašoma biojutiklio, skirto matuoti lipazės aktyvumui, kai substratas ištirpinamas micelėse, tyrimo metodika, tyrimo rezultatai bei išvados. Pirmame poskyryje pateikiamas trumpas įvadas į nagrinėjamo biojutiklio problematiką. Antrame šio skyriaus poskyryje pateikiamas fizinis sistemos modelis. Trečiame poskyryje pateikiami du matematiniai modeliai. Ketvirtame poskyryje aprašomas skaitinis modeliavimas ir jo rezultatai. Penktame poskyryje pateikiamos tyrimo išvados.

4-ame skyriuje aprašoma biojutiklio, skirto matuoti lipazės aktyvumui, kai elektrodas padengiamas substratu, tyrimo metodika, tyrimo rezultatai bei išvados. Pirmame poskyryje pateikiamas trumpas įvadas į nagrinėjamo biojutiklio problematiką. Antrame šio skyriaus poskyryje pateikiamas fizinis sistemos modelis. Trečiame poskyryje pateikiamas tradicinis ir patobulintas matematiniai modeliai. Ketvirtame poskyryje aprašomas skaitinis modeliavimas ir jo rezultatai. Penktame poskyryje pateikiamos tyrimo išvados.

5-ame skyriuje aprašoma dviejų teorinių biojutiklių su valdomomis membranomis tyrimo metodika, tyrimo rezultatai bei išvados. Pirmame poskyryje pateikiamas trumpas įvadas į nagrinėjamų biojutiklių problematiką. Antrame šio skyriaus poskyryje pateikiamas fizinis sistemos modelis. Trečiame poskyryje pateikiami kiek skirtingais principais veikiančių biojutiklių matematiniai modeliai. Ketvirtame poskyryje aprašomas skaitinis modeliavimas ir jo rezultatai. Penktame poskyryje pateikiamos tyrimo išvados.

6-ame skyriuje pateikiamos svarbiausios darbo išvados.

7-ame skyriuje pateikiamas cituojamos literatūros sąrašas.

2 Literatūros apžvalga

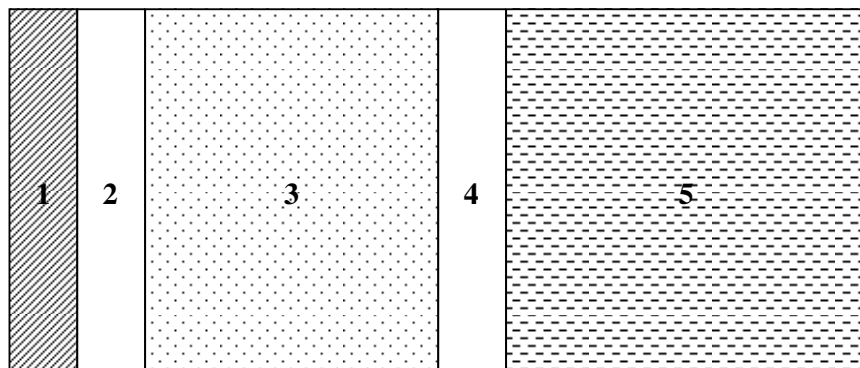
2.1 Biojutikliai

Įvairioje literatūroje biojutiklis apibrėžiamas gana skirtingai. Plačiaja prasme jis apibrėžiamas kaip analitinis prietaisas, reaguojantis į biologinės kilmės medžiagų koncentraciją ar aktyvumą. Šiame apibrėžime neminimi jokie reikalavimai tokio jutiklio sandarai. Tad praktiškai bet koks jutiklis, fiziškai ar chemiškai reaguojanti į biologinės kilmės medžiagas, gali būti vadinamas biojutikliu. Netgi elektrodas implantuotas į gyvo organizmo audinius gali būti vadinamas biojutikliu [Blum91]. Siaurąja prasme biojutikliu vadinamas analitinis prietaisas, kuriame kaip jautrusis elementas panaudotas biologinės kilmės medžiaga. Taip apibrėžtus biojutiklius ir nagrinėsime šiame darbe.

Pirmieji tokį biojutiklį aprašė Clark ir Lyons [Clark62]. Jų aprašytas biojutiklis buvo sudarytas iš deguonies elektrodo, veikiančio kaip signalo keitiklis, ir jautriosios medžiagos – gliukozės oksidazės fermento, o tiriamoji medžiaga buvo gliukozė. Šis jutiklis išnaudojo tai, kad fermentiniu būdu oksiduojant gliukozę susidaro vandenilio peroksidas (H_2O_2) ir pastarojo koncentracija galėjo būti stebima elektrocheminiais metodais. Fermentui apsaugoti buvo panaudota selektyviai laidži membrana. Tokia jutiklio konstrukcija padėjo stipriai pagerinti amperometrinės sistemos laidumą.

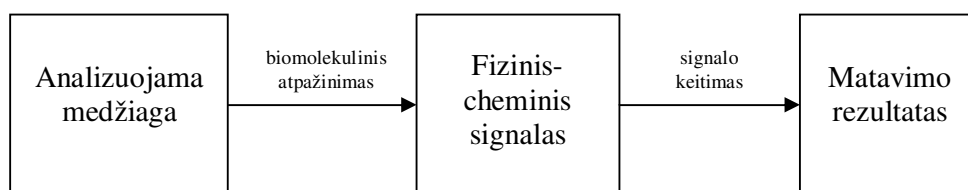
Vėlesniais laikais ši technika buvo tobulinama parenkant skirtingus elektrodus, skirtingus fermento imobilizavimo metodus, skirtingas jautriasias medžiagas, o taip pat amperometrija kartais buvo keičiama potenciometrija [Guilb69].

Su laiku taip pat nusistovėjo ir abstrakti biojutiklio struktūra: jautrusis biologinės kilmės elementas ir signalo keitimo elementas. Tipiška biojutiklio struktūrinė schema pavaizduota 2.1 pav. [Buerk95]:



2.1 pav. Tipiška biojutiklio struktūrinė schema: 1 – signalo keitiklis / detektorius (pvz. elektrodas), 2 – vidinė membrana, 3 – biologinis elementas, 4 – išorinė dalinai laidi membrana, 5- analito tirpalas.

Jautriojo elemento paskirtis – atpažinti tiriamosios medžiagos koncentraciją ar aktyvumą. Signalo keitimo elemento paskirtis jautriojo elemento sugeneruotą signalą paversti į praktiškesnę formą (dažniausiai elektrinę). Kaip jautrieji elementai pradėti naudoti ne tik fermentai, bet ir antikūniai ar net visos ląstelės. Signalo konversijos elementas gali veikti elektrocheminiu, optiniu, ar masės variacijos būdu [Blum91]. Tipiška biojutiklio veikimo schema pavaizduota 2.2 pav.



2.2 pav. Jautrusis elementas atpažįsta analizuojamą medžiagą ir suformuoja fizinį-cheminį signalą, kuris signalo keitimo elemento paverčiamas į praktiškesnę formą, t.y. suformuoja matavimo rezultatą.

Biologinės kilmės jautrusis elementas, skirtas atpažinti konkrečią medžiagą, savo darbą atlieka puikiai, bet praktiškai neatpažįsta kitų medžiagų. Pavyzdžiui, gliukozės oksidazė labai specializuotas fermentas, o alkoholio oksidazė atpažįsta gana platų alkoholių spektrą. Tokių medžiagų jautrumas yra prigimtinė savybė, kuri sunkiai pasiduoda modifikavimui. Tačiau signalo keitimo sistema gali būti parenkama šiek tiek paprasčiau. Yra keletas universalių metodų atpažinti įvykusią reakciją, pavyzdžiui, šilumos kiekio variacija (praktiškai kiekviena reakcija yra susijusi su šilumos kiekio pokyčiu). Kitas universalus metodas – masių variacija, leidžianti atpažinti molekules pagal masę, ypatingai tinkanti antigenų-antikūnių reakcijų stebėjimui.

Atkreiptinas dėmesys, kad šios biologinės sistemos turi didelį panaudojimo potencialą, bet tuo pačiu metu yra labai jautrios aplinkos sąlygoms. Dauguma fermentų denatūruojasi temperatūroje aukštesnėje nei 100°C, o veikia tik siaurame 15-40°C temperatūrų ruože. Dauguma fermentų yra aktyvūs tik tam tikrame pH intervale ir aktyvumo maksimumo pH reikšmė turi būti suderinama su signalo keitimo sistemos veikimo pH intervalu. Taip pat pastebėtina, kad dauguma tokių sistemų veikia tik tirpaluose, retesniais atvejais dujinėje fazėje [Blum91].

Kita svarbi problema yra kaip imobilizuoti jautriąją medžiagą bei apsaugoti nuo aplinkos poveikio. Ši problema sprendžiama jautriąją medžiagą įterpiančią gelį arba pridengiant selektyviai laidžią membrana. Su šio uždavinio sprendimu susijęs ir kitas nepageidautinas veiksnys – interferencija, t.y. signalo keitimo sistema, turinti platinos elektroda, reaguotų tiek į vandenilio peroksido molekules, tiek į askorbo rūgšties molekules, šiuo atveju taip pat padeda selektyvaus laidumo membranos. Kartais biojutiklis konstruojamas pasitelkiant kelias membranas: vieno tipo membrana montuojama ant elektrodo ir apsaugo nuo signalo interferencijos, o kito tipo membrana montuojama ant fermentinio sluoksnio, praleidžia tik tiriamąją medžiagą ir apsaugo fermentą nuo išorės poveikio.

Šiuo metu biojutikliams keliami šie reikalavimai: selektyviai, nuolatos, greitai ir tiksliai reaguoti į tiriamąją medžiagą, taip pat pageidautina, kad nereiktų pridėti jokių papildomų medžiagų. Paprastai, šiems reikalavimams patenkinti, biojutiklis konstruojamas integruojant jautrijį elementą kartu su signalo konversijos sistema. Todėl daugeliu atveju biojutiklis yra smulkus (rašiklio dydžio) prietaisas. Kai kuriais atvejais signalo konversijos sistema turi būti atskirta nuo jautriojo elemento, pavyzdžiui, kai nesuderinami jų veikimo terpės pH. O kai naudojama optinė signalo konversijos sistema, tuomet fermentu padengiama skaidraus vamzdelio vidinė sienelė, o tiriamoji medžiaga leidžiama tuo vamzdeliu, o liuminiscencinės reakcijos rezultatas stebimas iš išorės. Tipiško biojutiklio veikimo greitis, lyginant su alternatyviais metodais, labai geras, pavyzdžiui fermentinio biojutiklio atsako laikas apie 30 sek., imunologinio – 15 min., o mikrobiologinio – 30 min [Blum91]. Idealiu atveju siekiama, kad biojutiklis veiktų nuolatos ir be jokių papildomų medžiagų, t.y. kad jutiklį būtų galima talpinti tiesiai į tiriamąją aplinką. Tačiau ne visada reikia visais atžvilgiais idealaus jutiklio, tad praktikoje yra pritaikymų ir vienkartiniams bei gana lėtiems jutikliams.

Šiuos kokybinius jutiklio parametrus svarbu įvertinti skaičiais, nes tik taip objektyviai galima palyginti skirtingus biojutiklius ir nustatyti, kuris būtų tinkamesnis konkrečiam uždaviniui spręsti. Pirmas svarbus biojutiklio parametras – jo generuojamo signalo stiprumas. Elektrocheminiu procesu paremto biojutiklio signalas paprastai yra el. srovė ir kuo ta srovė stipresnė, tuo tikslesnis ir jautresnis biojutiklis. Elektrocheminio biojutiklio nusistovėjusios srovės stiprumas priklauso nuo elektrodo geometrijos, chem. medžiagų difuzijos iš elektrolito, bei ant elektrodo paviršiaus vykstančių reakcijų spartos. Plokščio elektrodo atveju, kai medžiagų judėjimas vyksta tik dėl difuzijos, procesas modeliuojamas vienmate Ficko lygtimi:

$$i = \pm nFD \left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=0} \quad (2.1)$$

čia: i – srovės stipris, n – elektrocheminėje reakcijoje dalyvaujančių elektronų skaičius, F – Faraday konstanta, D – reakcijoje dalyvaujančios medžiagos difuzijos koeficientas, C – elektrocheminėje reakcijoje dalyvaujančios medžiagos koncentracija, x – erdvinė koordinatė statmena elektrodo paviršiui kryptimi [Buerk95].

Antras svarbus parametras – jautrumas. Paprastai jautrumas apibrėžiamas kaip jutiklio nusistovėjusio atsako pokytis tenkantis analizuojamos medžiagos koncentracijos vienetiniam pokyčiui:

$$B_{\text{inf}} = \frac{\Delta i}{\Delta C}, \quad (2.2)$$

čia i – biojutiklio atsakas, C – tiriamosios medžiagos koncentracija. Verta pastebėti, kad dažniausiai biojutiklis tiesiogiai matuoja ne tiriamosios medžiagos koncentracijos, o kažkokį tarpinį produktą, kuris gaunamas jautriajam elementui (pvz. fermentui) sąveikaujant su tiriamąją medžiaga, tad svarbu, kad šitos tarpinės medžiagos koncentracija tiksliai atitiktų tiriamosios medžiagos koncentraciją ir jos pokyčius. Dažnai jutikliuose matuojamas ne nusistovėjęs sistemos atsakas, o atsako dinamika, tad į jautrio apibrėžimą įvedamas ir laiko pokytis [Buerk95]:

$$B_t = \frac{\Delta i}{\Delta C \cdot \Delta t}, \quad (2.3)$$

čia: t – laikas. Yra daug faktorių lemiančių biojutiklio jautrumą: jutiklio fiziniai matmenys, membranos storis bei įvairūs procesai, kurie veikia jautriojo elemento ir

paties jutiklio aktyvumą. Idealiu atveju siektina, kad biojutiklio jautrumas išliktų vienodas visą eksploataavimo laiką.

Kadangi biojutiklis yra matavimo prietaisas, tai labai svarbu kaip lengvai jis kalibruojamas, t.y. kiek skirtingų kontrolinių matavimų jam sukalibruoti reikia. Taip pat svarbu kaip dažnai jutiklį reikia kalibruoti, idealiu atveju jutiklis turėtų būti kalibruojamas vieną kartą. Su kalibruojamumu glaudžiai susijęs jutiklio tiesiškumas. Idealiu atveju jutiklis turėtų tiesiškai reaguoti į tiriamos medžiagos koncentracijas nuo nulio iki maksimalios koncentracijos, kiek tiriamos medžiagos galima ištirpinti konkrečiame tirpiklyje. Realybėje šis intervalas yra daug siauresnis. Tas nesudaro didelės problemos, kol kalibracijos kreivė gali būti gauta pakankamai tiksli, kad interpretuoti biojutiklio signalus. Kartais tas sprendžiama kreivės atskirus regionus aproksimuojant tiesėmis. Kai kurių biojutiklių jautrumas yra pseudologaritminis ($\Delta I / \Delta \ln C$) ir nors šie jutikliai klasifikuojami kaip netiesiniai, tačiau analizuojant duomenis pseudologaritminėje skalėje gaunama tiesė, kas supaprastina kalibravimo procesą [Buerk95].

Biojutiklio jautrumo apatinę ribą labiausiai lemia signalo keitiklio interferencija su aplinka, pavyzdžiui, elektrocheminiam procesui įtakos turi aplinkoje esančių kitų medžiagų jonų koncentracija. Šiam procesui nemažą įtaką turi ir foninė srovė, kuri susidaro dėl srovės nutekėjimo procese, skirtingų metalų sandūrų ar dėl paties elektrocheminio proceso. Tuomet tikrasis jutiklio signalas gaunamas iš išmatuotojo atėmus foninę srovę:

$$i = i_{\text{išmatuota}} - i_{\text{foninė}}, \quad (2.4)$$

Tuo tarpu matavimų viršutinė riba yra lemiamą (fermentinio biojutiklio atveju) Michaelis-Menten kinetikos, kitaip tariant fermento aktyvumo maksimumo [Buerk95, Schell92]. O jutiklio tiesinio atsako diapazonas paprastai būna dar siauresnis nei jautrumo intervalas, nes jutikliui veikiant arti jautrumo ribos jo atsakas yra stipriai netiesinis.

Kitas svarbus biojutiklio kokybinis parametras – atsako nusistovėjimo laikas. Jis apibrėžiamas kaip laikas reikalingas jutiklio signalui visiškai nusistovėti. Iš principo šis laikas yra begalinis vien dėl atsako kreivės eksponentinio pobūdžio. Todėl praktikoje imamas laikas, per kurį jutiklio signalas pasiekia kažkokią nusistatytą santykinę ribą

lyginant su teorine galutine signalo reikšme. Šis laikas ir laikomas nusistovėjimo laiku. Kuo ši riba pasirenkama arčiau teorinės reikšmės, tuo gauti matavimai yra tikslesni. Praktiškai nusistovėjimo laikas parodo kaip greitai jutiklis gali pateikti informaciją apie tiriamosios medžiagos koncentracijos pasikeitimą tirpale, kitaip sakant nusako atsako užvėlinimą. Nusistovėjimo laiką lemia difuzija, t.y. jis proporcingas jutiklio storio kvadrato ir difuzijos koeficiento santykiui: d^2 / D . Tačiau kartais jutiklyje fiksuojamas ne nusistovėjęs signalas, o jo gradientas, tuomet nebūtina laukti visą nusistovėjimo laiką [Schell92, Tran93].

Paskutiniaisiais metais biojutikliai ne tik tobulėjo kokybiškai, bet ir plėtėsi jų panaudojimo sritis bei principinė struktūra. Vienas naujų biojutiklių pritaikymo pavyzdžių aprašytas [Valin05] publikacijoje. Paprastai fermentiniuose jutikliuose tiriamoji medžiaga veikia kaip substratas biojutiklio viduje esančiam fermentui, o elektrodas reaguoja į fermentinės reakcijos produktą. Tačiau šiame straipsnyje aptariamas biojutiklis veikia atvirkščiai – tiriamoji medžiaga yra fermentas (t.y. tiriamas fermento aktyvumas), o biojutiklį sudaro specialiai paruoštas ir substratu padengtas elektrodas. Tokio biojutiklio elektrodo signalą generuoja substrato aktyviosios feroceno grupės, o veikiamos fermento šios grupės yra pašalinamos nuo elektrodo paviršiaus, tuo pačiu mažėja ir elektrodo signalo stiprumas. Veikiant skirtingo aktyvumo fermentu gaunamos skirtingo signalo gesimo greičiai. Toks matavimo metodas leistų sukurti mikrosensorių tiesiogiai matuojantį fermento aktyvumą, skirtingai nei kiti metodai, tokie kaip: pH stat, titravimas, kalorimetrija ir kt. [Valin05]. Siekiant sukurti tokį prietaisą svarbu ne tik atlikti cheminius eksperimentus, bet ir atlikti matematinį bei skaitmeninį modeliavimą, nes svarbu išsiaiškinti, kokios prigimties procesai lemia biojutiklio signalo formą ir kaip lengvai toks biojutiklis galėtų būti kalibruojamas.

Kitas naujas lipazės aktyvumo matavimo būdas aprašytas publikacijoje [Ignat05]. Šiame straipsnyje aprašytame biojutiklyje jautrioji medžiaga yra lipazės substratas, o tiriamoji medžiaga yra lipazė. Tačiau, skirtingai nuo aukščiau aprašyto jutiklio, substratas nėra padengiamas ant elektrodo paviršiaus, o ištirpintas Triton X-100 micelėse. Toks substrato imobilizavimo būdas apsaugo jį nuo savaiminio oksidavimosi ant elektrodo. Publikacijoje pateikiami eksperimentiniai duomenys, tačiau tiesiogiai iš jų sunku nustatyti visų vykstančių procesų kinetines konstantas. Tą galima nustatyti pritaikant matematinį modelį ir atlikus skaitmeninių eksperimentų seriją.

2.2 Biojutiklių matematinis modeliavimas

Dauguma fermentinių biojutiklių paklūsta Michaelis-Menten kinetikai, kuri aprašoma šia schema:



čia: E – fermentas, S – substratas, ES – fermento substrato kompleksas, P – reakcijos produktas, k_1 - fermentinės reakcijos pirmos pakopos greičio konstanta, k_2 - fermentinės reakcijos pirmos pakopos grįžtamosios reakcijos greičio konstanta, k_{cat} - fermentinės reakcijos antros pakopos greičio konstanta. Tuomet reakcijos produkto formavimosi greitis bus:

$$v = k_{cat} \cdot ES, \quad (2.6)$$

čia ES – fermento-substrato komplekso koncentracija. Nusistovėjus procesui ES koncentracija išlieka pastovi, t.y. komplekso susidarymo ir skilimo greičiai yra vienodi, tuomet galioja ši lygybė:

$$k_1 E \cdot S = k_2 \cdot ES + k_{cat} \cdot ES, \quad (2.7)$$

čia: E – fermento koncentracija, S – substrato koncentracija. Tariant, kad substrato koncentracija S nesikeičia proceso metu (t.y. substrato yra daug) ir yra lygi pradinėi koncentracijai S_0 . Tuo pačiu turi galioti ir fermento koncentracijos tvermės dėsnis – $E = E_0 + ES$, čia E_0 – pradinė fermento koncentracija. Šią lygybę susiejus su lygtimis (2.6)-(2.7) gauname:

$$v = \frac{k_{cat} E_0 \cdot S}{\frac{k_2 + k_{cat}}{k_1} + S}. \quad (2.8)$$

Santykis $(k_2+k_{cat})/k_1$ vadinamas Michaelis konstanta ir paprastai žymimas K_M . Šios konstantos prasmė yra substrato koncentracija kuriai esant fermentinės reakcijos greitis pasiekia pusę teorinio maksimumo [Mich13, Briggs25, Bilit00].

Esant aukštai substrato koncentracijai S , K_M reikšmė tampa santykinai nežymi, tuomet aukščiau užrašyta lygtis supaprastėja:

$$V_{max} = k_{cat} \cdot E_0. \quad (2.9)$$

Taigi maksimalus reakcijos produkto gamybos greitis priklauso tik nuo fermentinės reakcijos kinetinės konstantos k_{cat} ir fermento koncentracijos E_0 . Taigi (2.8) lygtis gali būti perrašyta taip:

$$v = \frac{V_{max} S}{K_M + S}. \quad (2.10)$$

Tuo atveju, kai substrato koncentracija yra žema, tuomet K_M įtaka yra vyraujanti ir formulė supaprastėja:

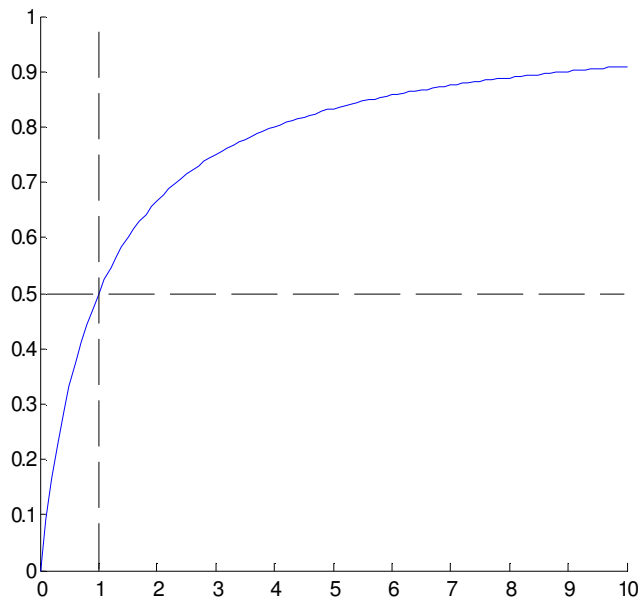
$$v = \frac{V_{max} S}{K_M}. \quad (2.11)$$

Taigi esant mažoms substrato koncentracijoms reakcijos produkto gamyba yra tiesiškai proporcinga substrato koncentracijai [Bilit00].

Pastebėtina, kad (2.10) formulė yra teisinga tol, kol ją išvedant darytos prielaidos yra teisingos, t.y. galioja lygybė:

$$\frac{dES}{dt} = 0. \quad (2.12)$$

Kitas svarbus apribojimas yra tai, kad Michaelis-Menten kinetika remiasi Ficko dėsnio aprašoma difuzija bei termodinaminio judėjimo nulemtais atsitiktiniais molekulių susidūrimais, tačiau tai ne visada galioja biologinėms sistemoms, kuriose fermento aplinka panašesnė į gelį su specifiniais apribojimais nei į skystį [Olsen06]. Tipiškas (2.10) lygties grafinis vaizdas, kai $K_m = 1$, $V_{max} = 1$, pateiktas 2.3 pav.



2.3 pav. Tipiškas (2.10) lygties grafinis vaizdas, kai $K_M=1$, $V_{max}=1$. Grafikas asimptotiškai artėja prie V_{max} didėjant substrato koncentracijai, o reikšmę lygią $V_{max}/2$ įgyja kai substrato koncentracija lygi K_M .

Tam tikrais atvejais galima fermento inhibicija reakcijos produktu (pavyzdžiui kai substratas ir reakcijos produktas konkuruoja dėl fermento aktyvių sričių), tuomet (2.10) lygtis keičiasi taip:

$$v = \frac{V_{max} S}{K_M (1 + P / K_P) + S}. \quad (2.13)$$

čia: P – reakcijos produkto koncentracija, K_P – inhibicijos konstanta [Frey07].

Tipiška biojutiklio struktūra, kai fermentas imobilizuojamas biojutikyje, lemia, kad substratas turi difunduoti į jutiklio vidų. Šio fermentinio sluoksnio viduje vyksta reakcija pagal Michaelis-Menten mechanizmą, o reakcijos produktai difunduoja iš fermentinio sluoksnio į išorinį tirpalą. Todėl šis procesas dažnai vadinamas difuzijos-reakcijos mechanizmu. Matematiškai šis procesas modeliuojamas antros eilės diferencialinėmis lygtimis su dalinėmis išvestinėmis, šios lygtys paprastai sprendžiamos skaitiniais metodais. Difuzijos-reakcijos procesą aprašanti lygtis:

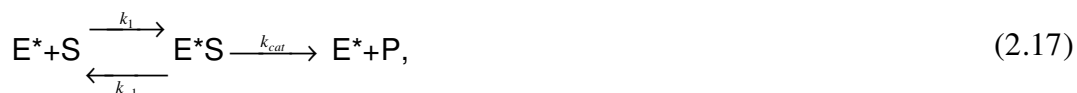
$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} - \frac{V_{max} S}{K_M + S}, \quad (2.14)$$

čia: t – laikas, x – erdvinė koordinatė, D_s – substrato difuzijos koeficientas. Atitinkamai užrašoma reakcijos produkto reakcijos-difuzijos lygtis:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{V_{\max} S}{K_M + S}, \quad (2.15)$$

čia: P – reakcijos produkto koncentracija, D_P – reakcijos produkto difuzijos koeficientas [Buck90, Tran93].

Kaip jau minėta aukščiau, Michaelis-Menten kinetika ne visada gali būti taikoma tiesiogiai, vienas iš tokių atvejų yra lipolitinių fermentų kinetika. Šių fermentų reakcijos pasižymi tuo, kad jos vyksta ant dvimačio (micelės) paviršiaus. Tipiški reakcijos žingsniai: fermentas praskverbia į micelę



prasiskverbęs fermentas ir substratas sudaro kompleksą, kuris skyla į fermentą ir reakcijos produktą. Čia: E^* – į micelę prasiskverbęs fermentas, E^*S – prasiskverbusio fermento ir substrato kompleksas. Lygčių sistema aprašanti šiuos procesus:

$$\begin{aligned} E_0 &= E + E^* \frac{I}{V} + E^*S \frac{I}{V}, \\ \frac{dE^*S}{dt} &= k_1 E^* \cdot S - (k_{cat} + k_{-1}) E^*S, \\ \frac{dE^*}{dt} &= k_p E + (k_{cat} + k_{-1}) E^*S - (k_d + k_1 S) E^*, \\ \frac{dP}{dt} &= k_{cat} E^*S, \end{aligned} \quad (2.18)$$

čia: I – micelės paviršiaus plotas; V – bendras tūris, k_p , k_d , k_1 , k_{cat} , k_{-1} – reakcijos lygčių kinetinės konstantos [Verger72].

Ilgą laiką lygties (10) išreikštinis sprendinys buvo žinomas tik laikui, substrato atžvilgiu:

$$t = \frac{S - S_0}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \ln \left(\frac{S_0}{S} \right), \quad (2.19)$$

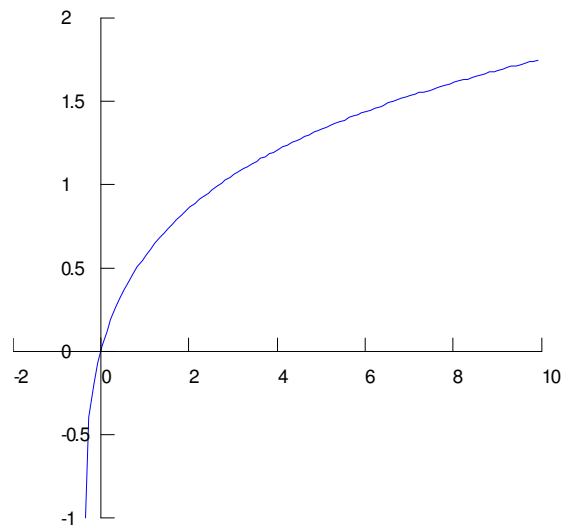
čia: S_0 – pradinė substrato koncentracija. Ši formulė gaunama padarius prielaidą (2.12) [Keller88]. Tik 1997 metais pritaikius Lamberto W funkciją rastas išreikštinis sprendinys Michaelis-Menten lygties sprendinys substratui laiko atžvilgiu:

$$S = K_m W \left\{ \frac{S_0}{K_m} \exp\left(\frac{S_0 - V_{\max} t}{K_m}\right) \right\}, \quad (2.20)$$

čia: W – Lamberto W funkcija, kuri apibrėžiama kaip funkcijos

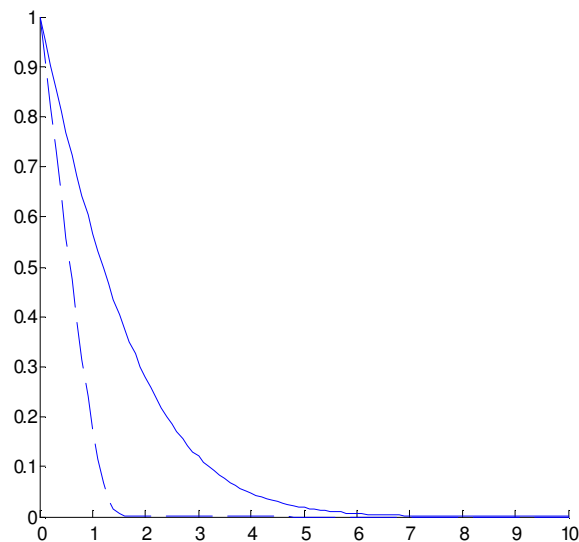
$$f(W) = W \exp(W), \quad (2.21)$$

atvirkštinė funkcija [Schne97]. Šios funkcijos grafinis vaizdas srityje $[-\exp(-1), 10]$:



2.4 pav. Lamberto W funkcijos grafinis vaizdas.

Tipiškas Michaelis-Menten lygties sprendinio substratui laiko atžvilgiu grafinis vaizdas:



2.5 pav. Substrato priklausomybės nuo laiko tipiškas vaizdas. Brūkšninė linija pateikta priklausomybė, kai K_m yra 10 kartų mažesnis.

Tačiau šio sprendinio nepakanka reakcijos-difuzijos lygtims (2.14)-(2.15) spręsti, pastarosios paprastai sprendžiamos pasitelkiant skaitinius metodus.

2.3 Biojutiklių skaitinis modeliavimas

Kaip minėta aukščiau, analitinis difuzijos-reakcijos lygčių su dalinėmis išvestinėmis (2.14)-(2.15) sprendimas yra problematiškas. Todėl jos dažniausiai sprendžiamos skaitiniais metodais, pasitelkiant baigtinių skirtumų metodą. Baigtinių skirtumų metodo esmė yra išspręsti diferencialines lygtis, jas aproksimuojant baigtinio kintamųjų kiekio lygčių sistema. Tarkime, kad sprendžiama (2.14) lygtis.

Pirmas žingsnis – sprendimo srities diskretizavimas pasirinktu žingsniu. Jei sritis, kurioje ieškomas sprendinys yra dvimatė (laikas + erdvė) - $[0 \leq t \leq T] \times [0 \leq x \leq X]$, tuomet pasirinkus laiko koordinatės diskretizavimo žingsnį lygų h_t , o erdvės koordinatės diskretizavimo žingsnį lygų h_x , sudaromas diskretusis tinklas [Samar01]:

$$\bar{\omega}_{h,h_x} = \{(x_i = ih_x, t_j = jh_t)\}, \quad i = 0, 1, \dots, N, \quad j = 0, 1, \dots, M, \quad (2.22)$$

Funkcijos reikšmės tuomet bus skaičiuojamos tik šio diskretaus tinklo taškuose, priimant tokį žymėjimą:

$$S_i^j = S(t_j, x_i). \quad (2.23)$$

Antras žingsnis – diferencialinių operatorių aproksimavimas baigtiniais skirtumais:

$$\frac{\partial S}{\partial t}(t_{j+1}, x_i) \rightarrow S_t = \frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t}, \quad (2.24)$$

$$\frac{\partial^2 S}{\partial x^2}(t_j, x_i) \rightarrow S_{xx} = \frac{S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j}{h_x^2}. \quad (2.25)$$

Šios aproksimacijos gaunamos paėmus pirmuosius Taylora eilutės narius [Samar01, Čiegis03].

Trečias žingsnis – skirtuminės lygties užrašymas ir jos sprendimas. Šiuo atveju diferencialinių operatorių bei funkcijos reikšmių aproksimacijos (2.23-2.25) įstatomos į (2.14) lygtį:

$$\frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t} = D_S \frac{S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j}{h_x^2} - \frac{V_{\max} S_i^j}{K_M + S_i^j}, \quad i = 1, \dots, N-1, \quad j = 0, \dots, M-1. \quad (2.26)$$

Pastebėtina, kad ši skirtuminė lygtis užrašoma tik vidiniams srities $\bar{\omega}_{h_x}$ taškams:

$$\omega_{h_x} = \{(x_i = ih_x, t_j = jh_t)\}, \quad i = 1, \dots, N-1, \quad j = 1, \dots, M, \quad (2.27)$$

tuomet išoriniai srities taškai bus:

$$\gamma_{h_x} = \bar{\omega}_{h_x} \setminus \omega_{h_x} \quad (2.28)$$

Iš (2.26) lygties tiesiogiai galima išreikšti substrato koncentraciją S_i^{j+1} laiko momentu t_{j+1} . Šiai koncentracijai apskaičiuoti reikia žinoti koncentracijos reikšmes visuose erdvės taškuose x_i , $i=0, \dots, N$, laiko momentu t_j . Koncentracijos reikšmių apskaičiavimui kraštiniuose srities taškuose reikia žinoti kokie procesai tuose taškuose vyksta ir kokios kraštinės sąlygos jiems užrašomos. Paprastai reakcijos difuzijos lygtims užrašomos fiksuotos koncentracijos (Dirichlet tipo) arba nepralaidumo (Neumano tipo) kraštinės sąlygos [deVries06]:

$$S(t, X) = S_0, \quad (2.29)$$

$$\frac{\partial S}{\partial x}(t, 0) = 0. \quad (2.30)$$

Atitinkamai šios kraštinės sąlygos aproksimuojamos [Samar01]:

$$S_N^j = S_0, \quad (2.31)$$

$$\frac{S_i^j - S_0^j}{h_x} = 0. \quad (2.32)$$

Skaičiuojant pagal šią skirtuminę schemą prireiktų santykinai mažai skaičiavimų (aritmetinių operacijų skaičius proporcingas $(N+1) \times M$), tačiau ši schema yra stabili panašaus tipo lygtims tik tuo atveju kai patenkinama ši nelygybė [Samar01, Čiegis03]:

$$h_t \leq \frac{h_x^2}{2}, \quad (2.33)$$

o skaičiavimų paklaida Ψ_i^j taške t_j , x_i atitinkamai:

$$|\Psi_i^j| \leq C(h_t + h_x^2). \quad (2.34)$$

Siekiant pagerinti skaičiavimų tikslumą bei stabilumą, aproksimacijos konstruojamos naudojant funkcijų reikšmes ne iš prieš tai buvusio laiko sluoksnio (t_j), o iš sekančio – t_{j+1} . Tokiu atveju (26) skirtuminė lygtis transformuojasi į:

$$\frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t} = D_S \frac{S_{i+1}^{j+1} - 2S_i^{j+1} + S_{i-1}^{j+1}}{h_x^2} - \frac{V_{\max} S_i^{j+1}}{K_M + S_i^j}, \quad i = 1, \dots, N-1, \quad j = 0, \dots, M-1, \quad (2.35)$$

ir ši schema vadinama neišreikštine, nes S^{j+1} negalima tiesiogiai išreikšti. Tad norint apskaičiuoti S reikšmes sekančiu laiko momentu reikia išspręsti lygčių sistemą su $N+1$ nežinomaisiais, o norint gauti sprendinį visame laiko intervale, reikės sprendimą pakartoti M kartų. Tai reiškia, kad reikės atlikti daugiau skaičiavimų lyginant išreikštine schema, bet tai yra tos pačios sudėtingo eilės skaičiavimai, nes gauta lygčių sistema (šioms reakcijos-difuzijos lygtims) yra tridiagonalinė ir gali būti efektyviai sprendžiama perkelties metodu [Samar01]. Ši schema yra besąlygiškai stabili, o jos aproksimacijos paklaida [Čiegis03]:

$$|\Psi_i^j| \leq C(h_t + h_x^2). \quad (2.36)$$

Tačiau dažnai skaičiavimuose naudojama ne neišreikštinė schema, o tam tikra jos modifikacija – Crank-Nicolson schema, dar vadinama simetrine schema. Šią schemą pasiūlė Crank ir Nicolson savo 1947-ųjų publikacijoje [Crank47]. Šios schemos ypatybė, kad aproksimuojant imamos funkcijos reikšmės iš sekančio bei esamo laiko sluoksnio, ir iš šių dviejų reikšmių išvedamas aritmetinis vidurkis:

$$\frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t} = D_s \frac{(S_{i+1}^{j+1} - 2S_i^{j+1} + S_{i-1}^{j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2} - \frac{V_{\max}(S_i^{j+1} + S_i^j)}{2(K_M + S_i^j)}, \quad (2.37)$$

$$i = 1, \dots, N - 1, \quad j = 0, \dots, M - 1.$$

Ši schema yra nesąlygiškai stabili, o jos paklaida yra lygi [Samar01, Čiegis03]:

$$|\Psi_i^j| \leq C(h_t^2 + h_x^2). \quad (2.38)$$

Dėl šių savybių pastaroji schema ir pasirinkta daugumai skaitinių modeliavimų atliktų šiame darbe.

3 Kompiuterinio modeliavimo pritaikymas įvertinant lipazės aktyvumą, kai substratas ištirpinamas micelėse

3.1 Įvadas

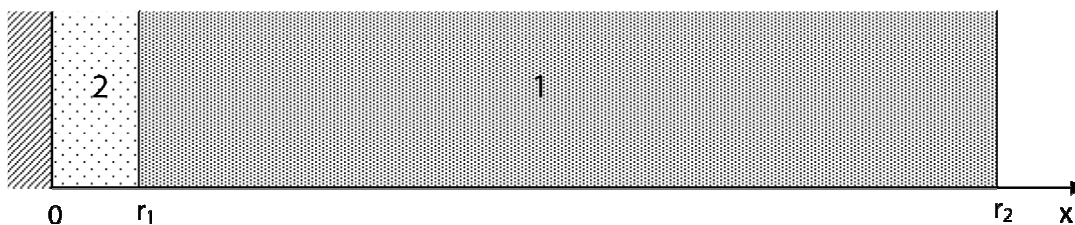
Gana neseniai buvo publikuotas *Thermomyces lanuginosus* amperometrinis lipazės aktyvumo nustatymo metodas [Ignat05]. Lipazės, triacilglicerolhidrolazės (EC 3.1.1.3) skaldančios triacilglicerolius ant aliejaus / vandens ribos, yra plačiai pritaikomos maisto, popieriaus, farmacijos, kosmetikos, odos ir tekstilės pramonėje [Schmi98, Houde04]. Taip plačiai paplitus šiems fermentams yra didelis poreikis greitai ir patikimai nustatyti jų aktyvumą. Elektrocheminis metodas, aprašytas [Ignat05], kaip tik vienas iš tokių.

Šiame skyriuje nagrinėjamoje sistemoje kaip lipazės substratas panaudotas sintetinis junginys O-palmitoil-2,3-dicianohidrochinonas (PDCHQ), turintis tiek esterio tiek elektriškai aktyvias hidrochinono grupes. PDCHQ molekulės ištirpintos Triton X-100 micelėse, o fermentinės hidrolizės produktas, 2,3-dicianohidrochinonas, difuzijos dėka lengvai oksidavosi ant elektrodo. Tokio proceso generuojamą el. srovę elektrode apsprendžia elektriškai aktyvios medžiagos difuzijos koeficientas bei difuzinio sluoksnio storis [Bard01].

[Ignat05] straipsnio autoriai sistemą tyrė nusistovėjimo sąlygomis. Šio darbo tikslas sumodeliuoti ir ištirti šios bioelektroanalitinės sistemos kinetiką.

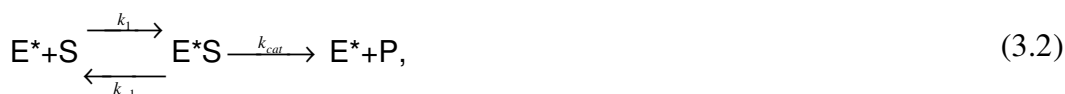
3.2 Fizinis modelis

Supaprastintai modeliuojama bioelektroanalitinė sistema [Ignat05] gali būti aprašoma vienmačiu modeliu (3.1 pav.), padalinant sistemą į dvi dalis: pirmąją – plačią sritį, kurioje vyksta reakcija bei dalelių (molekulių) konvekcija / difuzija, antrąją – siaurą sritį, kurioje vyksta tik reakcijos produkto difuzija. Ši sritis eksperimentiškai gali būti sukurta elektrodo paviršių padengiant membrana, kuri būtų laidži tik reakcijos produktui.



3.1 pav. Biojutiklio schema: 1 – sritis, kurioje vyksta reakcija ir difuzija/konvekcija, 2 – sritis, kurioje vyksta reakcijos produkto difuzija, $x = 0$ – elektrodo paviršius, $x = r_1$ – sričių 1 ir 2 tarpinis paviršius.

Procesai vykstantys srityje 1 schematiškai gali būti aprašomi šia dažniausiai vartojama forma: [Verger72]:



čia: E – fermento tirpalas, E* - fermentas, prasiskverbęs į micelės paviršių, S – substratas ant micelės paviršiaus, E*S – fermento-substrato kompleksas, P – reakcijos produktas. Pagal modelį, srityje 2 vyksta tik reakcijos produkto P difuzija, kurio oksidacija/redukcija ant elektrodo ir generuoja biojutiklio elektrinį signalą. Šis signalas yra tiesiogiai proporcingas reakcijos produkto koncentracijos išvestinei $\left(\frac{\partial P}{\partial x}\right)_{x=0}$ ant elektrodo paviršiaus. Šio dydžio kitimas laike ir yra pagrindinis kompiuterinio modeliavimo objektas.

3.3 Matematinis modelis

Nagrinėjama sistema gali būti aprašyta bent dviem skirtingais matematiniais modeliais:

- i. Darome prielaidą, kad sritis 1 pakankamai didelė, kad medžiagos joje yra pasiskirsčiusios tolygiai (pavyzdžiui dėl konvekcijos). Tuomet medžiagų koncentracijos bus vienodos visoje srityje 1, todėl reakcijas aprašančios lygtys gali būti sprendžiamos viename erdvės taške neatsižvelgiant į difuziją. Taip pat tariame, kad nėra jokio specialaus skirtuko tarp sričių 1 ir 2, todėl, visos medžiagos (išskyrus reakcijos produktą P) tolygiai pasiskirsčiusios ir srityje 2.
- ii. Darome prielaidą, jog medžiagos srityje 1 yra pasiskirsčiusios netolygiai ir modeliuojant reikia atsižvelgti į medžiagų difuziją. Taip pat tariame, kad yra

speciali r_1 storio membrana dengianti elektrodo paviršių ir praleidžianti tik reakcijos produktą P. Tad srityje 2 vyksta tik reakcijos produkto P difuzija.

Abiem atvejais galima teigti, kad už srities 1 ($x > r_2$) yra didžiulė sritis, su tomis pačiomis medžiagomis ir vykstančiomis reakcijomis. Visos šios medžiagos ir reakcijos produktas per ribą $x = r_2$ difunduoja į sritį 1. Pirmasis modelis gali būti aprašomas netiesinių diferencialinių lygčių sistema vienam srities 1 erdvės taškui, panaši sistema nagrinėta straipsnyje [Verger72]. Tačiau pritaikius tokią diferencialinių lygčių sistemą tiesiogiai buvo pastebėta, kad [Verger72] daryta prielaida apie pastovią substrato koncentraciją micelės paviršiuje, nėra tinkama kai biojutiklio veikimas modeliuojamas ilgesniam laiko tarpui nei kelios minutės. Todėl [Verger72] lygčių sistema buvo papildyta kinetine substrato lygtimi:

$$\frac{dE}{dt} = -k_p \frac{I}{V} E + k_d \frac{I}{V} E^* \quad (3.3)$$

$$\frac{dE^* S}{dt} = k_1 E^* \times S - (k_{cat} + k_{-1}) E^* S \quad (3.4)$$

$$\frac{dE^*}{dt} = k_p E + (k_{cat} + k_{-1}) E^* S - (k_d + k_1 S) E^* \quad (3.5)$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1} E^* S - k_1 E^* \times S \quad (3.6)$$

čia E , E^* , $E^* S$, S – atitinkamų medžiagų koncentracijos; I – micelės paviršiaus plotas; V – bendras tūris, k_p , k_d , k_1 , k_{cat} , k_{-1} – reakcijos lygčių (3.1) ir (3.2) kinetinės konstantos; t – laikas. Pradinės sąlygos ($t = 0$):

$$\begin{aligned} E(0) &= E_0, \\ E^*(0) &= 0, E^* S(0) = 0, \\ S(0) &= S_0 \end{aligned} \quad (3.7)$$

Papildoma lygtis būtų užrašoma sričiai 2 (įskaitant reakcijos produkto difuziją bei gamybą šioje srityje):

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + k_{cat} \frac{I}{V} E^* S, \quad x \in (0, r_1), \quad (3.8)$$

čia P – reakcijos produkto koncentracija; D_p – reakcijos produkto P difuzijos koeficientas; x – atstumas, o $E^* S$ apskaičiuojamas iš šios lygčių sistemos: (3.3)-(3.6).

Pradinės sąlygos ($t = 0$) antrajai skaičiavimų daliai:

$$P(0, x) = 0, \quad x \in [0, r_1], \quad (3.9)$$

kraštinės sąlygos:

$$P(t,0)=0, \quad t > 0 \quad (3.10)$$

ir

$$\frac{\partial P}{\partial t} = k_{cat} \frac{I}{V} E^* S, \quad x = r_1, t > 0, \quad (3.11)$$

kuris apskaičiuojamas iš šios lygčių sistemos (3.3)-(3.6).

Antrasis modelis gali būti aprašomas netiesinių diferencialinių lygčių sistema su dalinėmis išvestinėmis [Verger72]:

$$\frac{\partial E}{\partial t} = -k_p \frac{I}{V} E + k_d \frac{I}{V} E^* + D_E \frac{\partial^2 E}{\partial x^2} \quad (3.12)$$

$$\frac{\partial E^* S}{\partial t} = k_1 E^* \times S - (k_{cat} + k_{-1}) E^* S + D_{E^* S} \frac{\partial^2 E^* S}{\partial x^2} \quad (3.13)$$

$$\frac{\partial E^*}{\partial t} = k_p E + (k_{cat} + k_{-1}) E^* S - (k_d + k_1 S) + D_{E^*} \frac{\partial^2 E^*}{\partial x^2} \quad (3.14)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = k_{-1} E^* S - k_1 E^* \times S + D_S \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \quad (3.15)$$

kai $x \in (r_1, r_2)$. Žymėjimai naudojami tokie pat kaip aprašant pirmąjį modelį, papildomai pažymint: D_E , $D_{E^* S}$, D_{E^*} , D_S – atitinkamai laisvo fermento, fermento-substrato komplekso, $\dot{\text{I}}$ micelę prasiskverbuisio substrato ($D_{E^* S} = D_{E^*}$), substrato difuzijos koeficientai. Reakcijos produkto gamybą ir difuziją aprašanti lygtis:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + q k_{cat} \frac{I}{V} E^* S, \quad x \in (0, r_2), \quad (3.16)$$

$$q = \begin{cases} 0, & x \in (0, r_1]; \\ 1, & x \in (r_1, r_2). \end{cases}$$

Pradinės sąlygos: ($t = 0$):

$$E^*(0, x) = 0, E^* S(0, x) = 0, \quad (3.17)$$

$$E(0, x) = E_0, S(0, x) = S_0, x \in [r_1, r_2];$$

$$P(0, x) = 0, x \in [0, r_2].$$

Kraštinės sąlygos:

$$P(t,0)=0, \quad t > 0; \quad (3.18)$$

nepratekėjimo sąlyga ant sričių ribos $x = r_1, t > 0$:

$$\left. \frac{\partial E}{\partial x} \right|_{x=r_1}(t) = 0, \quad \left. \frac{\partial S}{\partial x} \right|_{x=r_1}(t) = 0, \quad \left. \frac{\partial E^* S}{\partial x} \right|_{x=r_1}(t) = 0, \quad \left. \frac{\partial E^*}{\partial x} \right|_{x=r_1}(t) = 0 \quad (3.19)$$

bei kraštinė sąlyga taškui $x = r_2, t > 0$:

$$\begin{aligned} P|_{x=r_2}(t) &= Pr_2(t), & E|_{x=r_2}(t) &= Er_2(t), \\ S|_{x=r_2}(t) &= Sr_2(t), & E^* S|_{x=r_2}(t) &= E^* Sr_2(t), \end{aligned} \quad (3.20)$$

$$E^*|_{x=r_2}(t) = E^* r_2(t).$$

P_{r_2} , E_{r_2} , $E^*_{r_2}$, $E^*_{Sr_2}$ apskaičiuojami iš lygčių sistemos (3.3)-(3.6).

3.4 Kompiuterinis modeliavimas ir jo rezultatai

Siekiant ištirti kaip skirtingi biojutiklio parodymai, jei bioelektroanalitinė sistema veikta pagal pirmąjį ar antrąjį modelį, buvo sukurta programinė įranga skaitiniam šios sistemos modeliavimui ir naudojantis šia programine įranga atlikta skaitmeninių eksperimentų serija. Programinė įranga kurta pasinaudojant plačių galimybių Matlab programine aplinka. Remiantis pirmuoju matematiniu modeliu buvo numatyta pirmoji skaitmeninių eksperimentų serija. Skaičiavimai sudalinti į du etapus: pirmąjį – skaičiavimai atliekami pagal lygtis (3.3)-(3.6), ir antrąjį – reakcijos produkto P difuzijos srityje 2 apskaičiavimą pagal lygtį (3.8). Skaičiavimuose panaudotos šios konstantos (visos, išskyrus kinetines, paimtos iš [Ignat05]): $D_p = 5.49 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $r_1 = 4 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$, $I = 7.5 \cdot 10^5 \text{ cm}^2$, $V = 10 \text{ cm}^3$, $E_0 = 2.35 \cdot 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$, $k_{cat} = 75 \text{ s}^{-1}$, $k_1 = 1.12 \cdot 10^9 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_p = 100 \text{ cm s}^{-1}$, $k_d = 0.025 \text{ s}^{-1}$, $S_0 = 6.7 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. Pirmasis skaičiavimų etapas atliktas pasinaudojant Matlab paprastųjų diferencialinių lygčių sprendikliu standiems uždaviniams (šis sprendiklis davė stabiliausius ir reikiamai tikslius rezultatus), o antrasis skaičiavimų etapas atliktas diferencialinę lygtį su dalinėmis išvestinėmis diskretizavus Crank-Nicolson (simetrine)[Samar01] baigtinių skirtumų schema:

$$\frac{P_i^{j+1} - P_i^j}{h_t} = D_p \frac{(P_{i+1}^{j+1} - 2P_i^{j+1} + P_{i-1}^{j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2} + k_{cat} \frac{I}{V} E^* S, \quad (3.21)$$

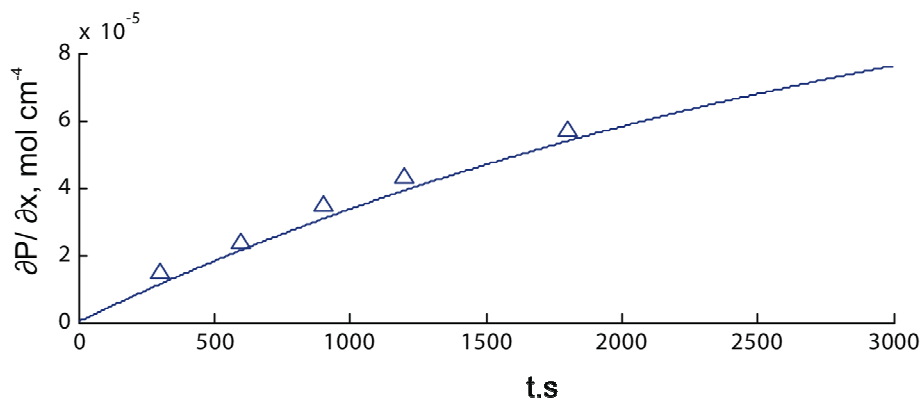
$$i = 1, \dots, N - 1, \quad j = 0, \dots, M - 1.$$

Čia $E^* S$ išskaičiuojamas vienam taškui iš (3.3)-(3.6) ir laikomas konstanta vienam laiko sluoksniui visoje srityje 2. Ši programinės įrangos dalis realizuota suformuojant lygčių sistemą atitinkančią matricinę lygtį $A * X^{n+1} = B * X^n + C^n$, čia A – tridiagonalė matrica, X^{n+1} – sekančio (n+1-ojo) laiko sluoksnio ieškomų reikšmių vektorius stulpelis, B – kita tridiagonalė matrica, X^n – esamo (n-ojo) laiko sluoksnio reikšmių vektorius stulpelis, C^n – vektorius stulpelis. Matricinė lygtis spęsta Matlab priemonėmis, kurios optimizuotos lygčių sistemoms su tridiagonalėmis matricėmis.

Kraštinės sąlygos:

$$P_0^{j+1} = 0, \quad P_N^{j+1} = h_t k_{cat} \frac{I}{V} E^* S + P_N^j. \quad (3.22)$$

Naudotas integravimo žingsnis erdvėje ir laike atitinkamai: $h_x = 5 \cdot 10^{-6}$ cm, $h_t = 1$ s. Integravimo intervalas $T = [0..3000]$ s. Rezultatai pateikiami 3.2 pav.



3.2 pav. Δ – perskaičiuoti [Ignat05] eksperimentiniai duomenys ($\left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0}$ (mol cm⁻⁴) priklausomybė nuo laiko); ištisinė

linija – pagal pirmąjį modelį apskaičiuota $\left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0}$ (mol cm⁻⁴) priklausomybė nuo laiko (sekundėmis).

3.2. pav. taip pat pateikiami perskaičiuoti [Ignat05] eksperimentiniai duomenys. Besisukančiam elektrodui, panaudotam [Ignat05], galioja $\left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0} = I/(nFA_{dP})$ [Bard01], kur I eksperimentiškai išmatuota srovė, $n = 2$ – elektronų, dalyvaujančių P oksidacijoje, skaičius, F – Faradėjaus konstanta, $A = 0.07$ cm² – elektrodo paviršiaus plotas. Kaip matome iš 3.2, taikant pirmąjį matematinį modelį ir parinkus kinetinių konstantų rinkinį pasiekėme gerą praktinio ir skaitmeninio eksperimentų rezultatų sutapimą. Tikėtina, kad nuoseklus kiek aukštesnis praktinio eksperimento srovės lygis yra netobulo foninės srovės eliminavimo proceso rezultatas. Deja dėl sudėtingos lipazės sąveikos (žr. (3.1) ir (3.2)) konkrečios kinetinės konstantos šiam fermentui literatūroje nėra pateikiamos. Tai neleido papildomai patikrinti kinetines konstantas panaudotas skaičiavimuose.

Antrasis eksperimentas parengtas pagal antrąjį matematinį modelį. Skaičiavimuose panaudotos tokios pat konstantų reikšmės kaip ir pirmajame eksperimente, tik papildomai aprašytas difuzijos sluoksnis: $r_2 = 8 \cdot 10^{-3}$ cm; $D_{E^*S} = 10^{-7}$ cm² s⁻¹, $D_{E^*} = 10^{-7}$ cm² s⁻¹, $D_E = 10^{-6}$ cm² s⁻¹, $D_S = 10^{-6}$ cm² s⁻¹, kai $r_1 \leq x \leq r_2$, nulis kitu atveju.

Diferencialinių lygčių su dalinėmis išvestinėmis sistema pakeista baigtinių skirtumų schema, o netiesinių lygčių sistema, užrašyta šiai schemai, sprendžiama paprastųjų iteracijų metodu [Samar01]:

$$\begin{aligned} \frac{E_i^{j+1} - E_i^j}{h_t} = & -k_p \frac{I}{2V} (E_i^{j+1} + E_i^j) + k_d \frac{I}{2V} (E_{i-1}^{*j+1} + E_{i-1}^{*j}) + \\ & + D_E \frac{(E_{i+1}^{j+1} - 2E_i^{j+1} + E_{i-1}^{j+1}) + (E_{i+1}^j - 2E_i^j + E_{i-1}^j)}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.23)$$

$$\begin{aligned} \frac{E^* S_i^{j+1} - E^* S_i^j}{h_t} = & k_1 \frac{I}{2V} S_i^{k,j+1} (E_{i-1}^{*j+1} + E_{i-1}^{*j}) - (k_{cat} + k_{-1}) \frac{(E^* S_i^{j+1} + E^* S_i^j)}{2} + \\ & + D_{E^* S} \frac{(E^* S_{i+1}^{j+1} - 2E^* S_i^{j+1} + E^* S_{i-1}^{j+1}) + (E^* S_{i+1}^j - 2E^* S_i^j + E^* S_{i-1}^j)}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.24)$$

$$\begin{aligned} \frac{E_i^{*j+1} - E_i^{*j}}{h_t} = & k_p \frac{(E_i^{j+1} + E_i^j)}{2} + (k_{cat} + k_{-1}) \frac{(E^* S_i^{j+1} + E^* S_i^j)}{2} - \\ & - (k_d + k_1 S_i^{k,j+1}) \frac{(E_{i-1}^{*j+1} + E_{i-1}^{*j})}{2} + D_{E^*} \frac{(E_{i+1}^{*j+1} - 2E_i^{*j+1} + E_{i-1}^{*j+1}) + (E_{i+1}^{*j} - 2E_i^{*j} + E_{i-1}^{*j})}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.25)$$

$$\begin{aligned} \frac{S_i^{k+1,j+1} - S_i^j}{h_t} = & k_{-1} \frac{(E^* S_i^{j+1} + E^* S_i^j)}{2} - k_1 S_i^{k,j+1} \frac{(E_{i-1}^{*j+1} + E_{i-1}^{*j})}{2} + \\ & + D_S \frac{(S_{i+1}^{k+1,j+1} - 2S_i^{k+1,j+1} + S_{i-1}^{k+1,j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.26)$$

Lygtys (3.23)- (3.26) sprendžiamos tik srityje $i = r_1 + 1, \dots, N - 1$

$$\begin{aligned} \frac{P_i^{j+1} - P_i^j}{h_t} = & D_P \frac{(P_{i+1}^{j+1} - 2P_i^{j+1} + P_{i-1}^{j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2} + \\ & + q_i k_{cat} \frac{I}{2V} (E^* S_i^{j+1} + E^* S_i^j) \end{aligned} \quad (3.27)$$

o lygtis (3.27) sprendžiama visoje srityje $i = 1, \dots, N - 1$, q_i reikšmės parenkamos pagal (3.16) formulę, visoms lygtims bendrai laiko ir iteracijų indeksai: $j = 1, \dots, M$ $k = 0, \dots$

Kraštinių sąlygų aproksimacija:

$$P_0^{j+1} = 0, \quad P_N^{j+1} = Pr_2^{j+1}, \quad (3.28)$$

$$E_{r_1}^{j+1} - E_{r_1+1}^{j+1} = 0, \quad E_N^{j+1} = Er_2^{j+1}, \quad (3.29)$$

$$E^* S_{r_1}^{j+1} - E^* S_{r_1+1}^{j+1} = 0, \quad E^* S_N^{j+1} = E^* Sr_2^{j+1}, \quad (3.30)$$

$$E_{r1}^{*j+1} - E_{r1+1}^{*j+1} = 0, \quad E_N^{*j+1} = E_{r2}^{*j+1}, \quad (3.31)$$

$$S_{r1}^{j+1} - S_{r1+1}^{j+1} = 0, \quad S_N^{j+1} = S_{r2}^{j+1}. \quad (3.32)$$

Paprastųjų iteracijų metodas buvo taikomas substrato koncentracijos atžvilgiu, vienam laiko sluoksniui, pradinė substrato koncentracija buvo imama lygi ankstesnio laiko sluoksniu substrato koncentracijai: $S_i^{0,j+1} = S_i^j$, iteracijos (jos numeris žymimas raide k) vykdomos tol, kol tenkinama sąlyga:

$$\left| S_N^{k+1,j+1} - S_N^{k,j+1} \right| > \left| S_N^{k+1,j+1} \right| \cdot \varepsilon, \quad (3.33)$$

ε pasirinktas lygus 10^{-6} . Tačiau skaičiavimai parodė, kad reikiamas tikslumas pasiekiamas jau su pirmąja iteracija, tad skirtuminė schema (3.23)- (3.27) buvo pakeista kiek paprastesne ($S_i^{k+1,j+1}$ pakeičiant S_i^{j+1} , o $S_i^{k,j+1}$ pakeičiant S_i^j):

$$\begin{aligned} \frac{E_i^{j+1} - E_i^j}{h_t} &= -k_p \frac{I}{2V} (E_i^{j+1} + E_i^j) + k_d \frac{I}{2V} (E_i^{*j+1} + E_i^{*j}) + \\ &+ D_E \frac{(E_{i+1}^{j+1} - 2E_i^{j+1} + E_{i-1}^{j+1}) + (E_{i+1}^j - 2E_i^j + E_{i-1}^j)}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.34)$$

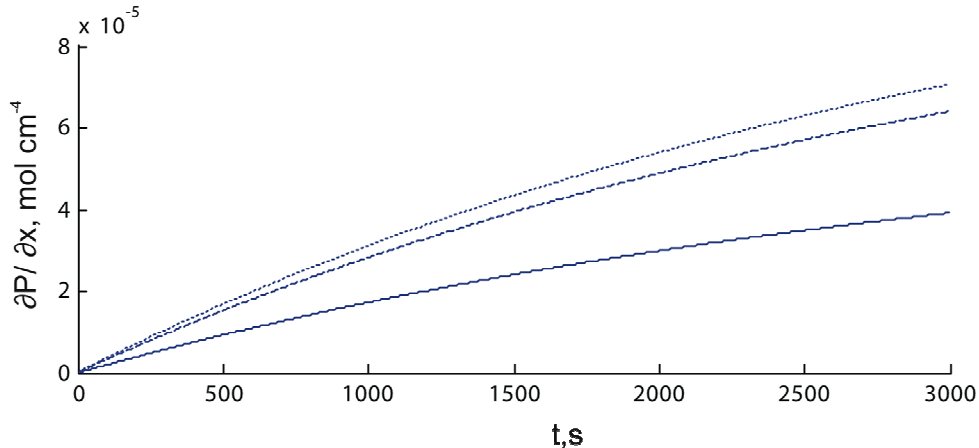
$$\begin{aligned} \frac{E_i^* S_i^{j+1} - E_i^* S_i^j}{h_t} &= k_1 \frac{I}{2V} S_i^j (E_i^{*j+1} + E_i^{*j}) - (k_{cat} + k_{-1}) \frac{(E_i^* S_i^{j+1} + E_i^* S_i^j)}{2} + \\ &+ D_{E^*S} \frac{(E_{i+1}^* S_{i+1}^{j+1} - 2E_i^* S_i^{j+1} + E_{i-1}^* S_{i-1}^{j+1}) + (E_{i+1}^* S_{i+1}^j - 2E_i^* S_i^j + E_{i-1}^* S_{i-1}^j)}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.35)$$

$$\begin{aligned} \frac{E_i^{*j+1} - E_i^{*j}}{h_t} &= k_p \frac{(E_i^{j+1} + E_i^j)}{2} + (k_{cat} + k_{-1}) \frac{(E_i^* S_i^{j+1} + E_i^* S_i^j)}{2} - \\ &- (k_d + k_1 S_i^j) \frac{(E_i^{*j+1} + E_i^{*j})}{2} + D_{E^*} \frac{(E_{i+1}^{*j+1} - 2E_i^{*j+1} + E_{i-1}^{*j+1}) + (E_{i+1}^{*j} - 2E_i^{*j} + E_{i-1}^{*j})}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.36)$$

$$\begin{aligned} \frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t} &= k_{-1} \frac{(E_i^* S_i^{j+1} + E_i^* S_i^j)}{2} - k_1 S_i^j \frac{(E_i^{*j+1} + E_i^{*j})}{2} + \\ &+ D_S \frac{(S_{i+1}^{j+1} - 2S_i^{j+1} + S_{i-1}^{j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2} \end{aligned} \quad (3.37)$$

$$\begin{aligned} \frac{P_i^{j+1} - P_i^j}{h_t} &= D_p \frac{(P_{i+1}^{j+1} - 2P_i^{j+1} + P_{i-1}^{j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2} + \\ &+ q_i k_{cat} \frac{I}{2V} (E_i^* S_i^{j+1} + E_i^* S_i^j) \end{aligned} \quad (3.38)$$

Skaičiavimo rezultatai pateikiami 3.3 (ištisinė linija). Skaitmeninis eksperimentas pakartotas kelis kartus su šiomis kraštinėmis sąlygomis: a) $r_1=8 \cdot 10^{-4}$, $r_2=4.8 \cdot 10^{-3}$; b) $r_1=4 \cdot 10^{-4}$, $r_2=4.4 \cdot 10^{-3}$ (visos dimensijos cm).



3.3 pav. Ištisinė linija- $\left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0}$ (mol cm⁻⁴) priklausomybė nuo laiko (sekundėmis) taikant antrąjį modelį ir tariant, kad $r_1=4 \cdot 10^{-3}$ cm ir $r_2=8 \cdot 10^{-3}$ cm; brūkšniuota linija- $r_1=8 \cdot 10^{-4}$ cm ir $r_2=4.8 \cdot 10^{-3}$ cm; taškuotalinija- $r_1=4 \cdot 10^{-4}$ cm ir $r_2=4.4 \cdot 10^{-3}$ cm.

3.5 Išvados

Pagal skaitinių eksperimentų rezultatus galima daryti šias išvadas:

1. Taikant paprastą vieno difuzijos sluoksnio modelį [Verger72] galima gauti gerą bioelektroanalitinės sistemos, skirtos *Thermomyces lanuginosus* lipazės aktyvumo nustatymui, modeliavimo ir eksperimento rezultatų sutapimą, tik modelį papildžius kinetine substrato lygtimi.
2. Skaitinio modeliavimo būdu nustatyta kinetinė konstanta (konstantų rinkinys), aprašanti *Thermomyces lanuginosus* lipazės sąveiką su sintetiniu substratu O-palmitoil-2,3-dicianohidrochinonu.
3. Papildomo difuzijos sluoksnio įvedimas (taikant besisukančio elektrodo metodą) sumažino pradinį sistemos atsaką (t.y. srovės stiprumą, kai fermentas įleidžiamas į sistemą). Skaitmeniniai eksperimentai taip pat rodo, kad išorinio difuzijos sluoksnio susiaurinimas (jei kitų sluoksnių storis ir savybės nesikeičia), leistų gauti stipresnį sistemos atsaką.

4 Kompiuterinio modeliavimo pritaikymas tiriant lipazės aktyvumo matavimo sistemą, kurioje elektrodas padengiamas substratu

4.1 Įvadas

Kaip jau minėta ankstesniame skyriuje, triacilglicerolacilhidrolazė (EC. 3.1.1.3), hidrolizuojanti triacilglicerolius ant alyvos-vandens ribos, yra svarbi tokioms pramonės šakoms kaip maisto, popieriaus, tirpiklių ir pan. [Schmi98, Born99, Houde04]. Lipazių atliekama hidrolizė, skirtingai nei kitų fermentų (pvz. protazių), vyksta heterogeninėse multifazėse sistemose. Daugeliu atveju substrato-skysčio ribos aplinka turi labai didelę įtaką paties fermento aktyvumui [Schmi98, Born99, Houde04, Beiss00]. Todėl labai svarbu stebėti lipazės aktyvumą šiomis sąlygomis.

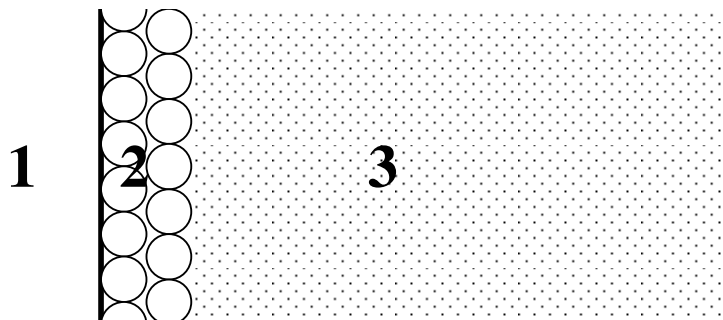
Neseniai buvo pasiūlytas naujas lipazės aktyvumo įvertimo metodas [Valin05]. Šis metodas išsiskiria tuo, kad elektrodas yra padengiamas substratu. Šis padengimas suformuojamas užlašinant mažą kiekį 9-(5'-ferocenilpentanoiloksi)nonil disulfido (FPONDS; $[\text{Fc}-(\text{CH}_2)_4\text{COO}(\text{CH}_2)_9\text{S}]_2$) etanolio tirpalo ant auksinio elektrodo paviršiaus padengto heksanetiolio savaimė susidarančiu monosluoksniu. Redoksoaktyvios FPONDS feroceno grupės generuoja amperometrinių signalą, kurio intensyvumas proporcingas FPONDS molekulių skaičiui ant elektrodo paviršiaus. Elektrocheminiai bei infraraudonųjų spindulių absorbcijos spektriniai duomenys parodė, kad aktyvios lipazės, tokios kaip *Thermomyces lanuginosus* (TLL), gali suskaldyti FPONDS molekulių esterinius ryšius. Paviršiuje vykstantis fermentinis procesas pašalina feroceno grupes nuo elektrodo paviršiaus, tuo pačiu mažindamas elektrodo generuojamą signalą. Elektrocheminio signalo gesimo greitis proporcingas lipazės aktyvumui.

Tačiau [Valin05] darbe nebuvo sudarytas ir išnagrinėtas šios bioelektroanalitinės sistemos kinetinis modelis, kitaip tariant neišnagrinėtas srovės kritimo laike dėsningumas priklausomai nuo fermento aktyvumo. Šio darbo vienas iš tikslų ir yra sudaryti modelį ir jį iširti.

4.2 Fizinis modelis

Šiame skyriuje nagrinėjama bioelektroanalitinė sistema gana žymiai skiriasi, nuo ankstesniame skyriuje nagrinėtos sistemos, kurioje fermentas veikia substratą ant visame

tirpalo tūryje pasklidusių micelių paviršiaus. Modeliuojama sistema schematiškai pateikiama 4.1.



4.1 pav. Biojutiklio pjūvio schema: 1 – auksinis elektrodas, 2 – FPONDS substrato sluoksnis, 3 – fermento tirpalas.

Procesai vykstantys zonose 2 ir 3 schematiškai gali būti aprašyti šiomis klasikinėmis lipazės aktyvavimo lygtimis [Verger72]:



čia: E – fermentas tirpale, E* - fermentas prisijungęs prie substrato paviršiaus (2 ir 3 zonų sandūroje 4.1), S – ant auksinio elektrodo paviršiaus nusodintas feroceno grupių turintis FPONDS substratas, E*S – fermento-substrato kompleksas, P – reakcijos produktas. Skaitinio modeliavimo tikslas – S koncentracijos kitimas laike, šis dydis yra tiesiogiai proporcingas elektrodo registruojamam signalui (žr. pav. 1 straipsnyje [Valin05]).

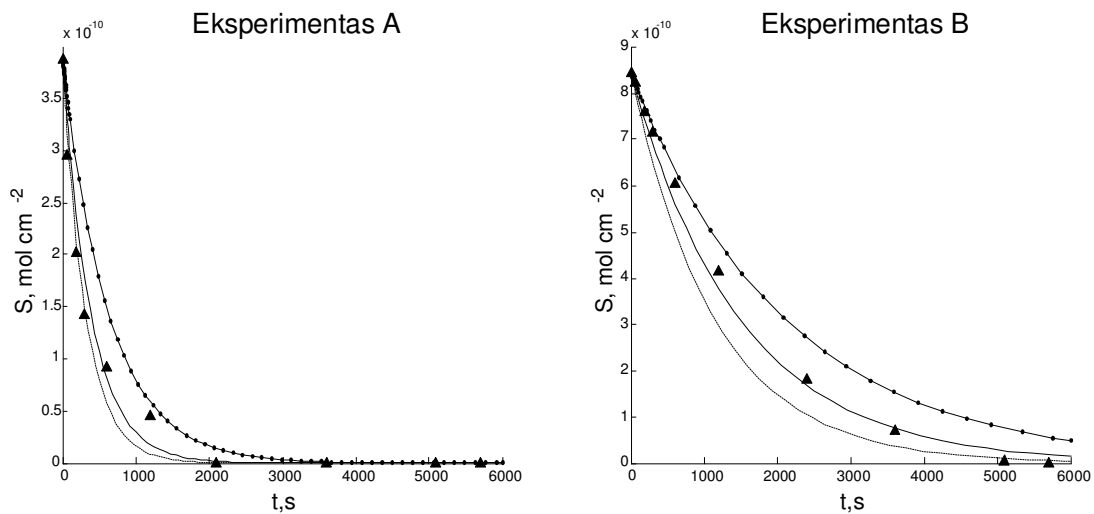
4.3 Matematinis modelis

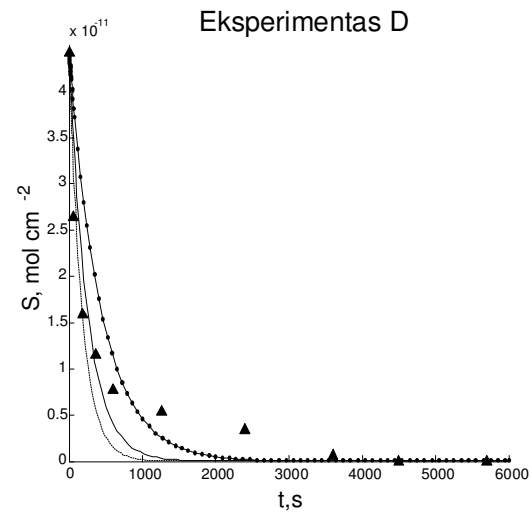
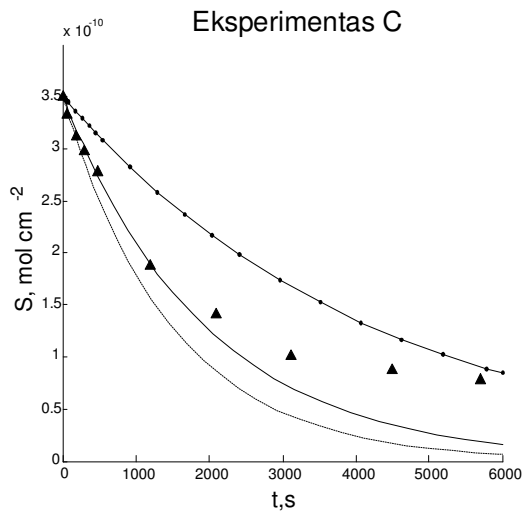
Darome prielaidą, kad fermentas yra tolygiai pasiskirstęs tirpale ir jo difuzijos galime nepaisyti. Taip pat darome prielaidą, kad reakcijos produktas gana greitai pasišalina nuo jutiklio paviršiaus ir jo difuzija gali būti vertinama kaip momentinė. Nagrinėjama sistema gali būti aprašoma klasikiniu reakcijų kinetikos matematiniu modeliu:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dE^*}{dt} = k_{-1}E^*S + k_2E^*S - k_1E^* \times S + k_pE - k_D E^* \\ \frac{dE^*S}{dt} = k_1E^* \times S - k_{-1}E^*S - k_2E^*S \\ \frac{dS}{dt} = k_{-1}E^*S - k_1E^* \times S \\ \frac{dP}{dt} = k_2E^*S \\ \frac{dE}{dt} = \left(\frac{I}{V}\right)k_D E^* - \left(\frac{I}{V}\right)k_p E \end{array} \right. \quad (4.3)$$

čia kursyvu žymime atitinkamų medžiagų koncentracijas: E , E^* , E^*S , P , S ; kiti žymenys: I – elektrodo paviršiaus plotas; V – tirpalo tūris; k_p – fermento adsorbcijos ant elektrodo paviršiaus greičio konstanta, k_D – fermento desorbcijos greičio konstanta; k_1 – fermento-substrato komplekso (E^*S) formavimosi greičio konstanta, k_{-1} – E^*S disociacijos greičio konstanta, k_2 – fermentinės reakcijos katalitinė greičio konstanta, t – laikas.

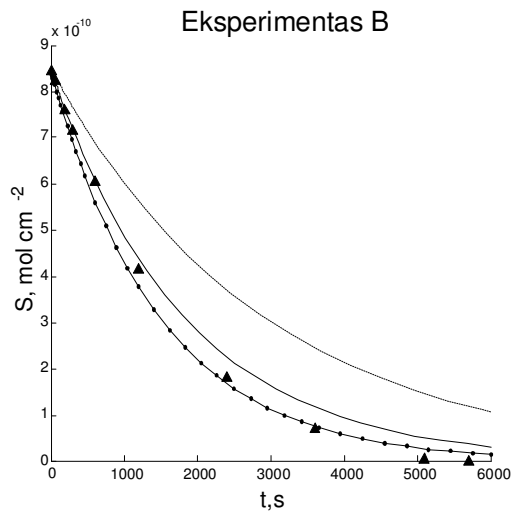
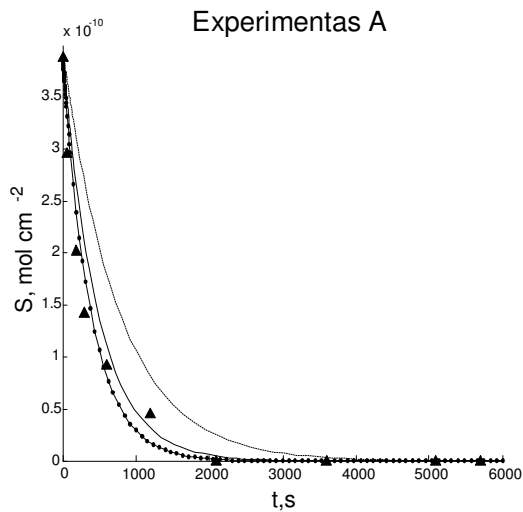
Šis modelis davė gerą sutapimą tik daliai eksperimentinių duomenų. Varijuojant kinetinės konstantos k_1 reikšmę, gautų kreivių, tipai gana panašūs į eksperimento B kreivę, tačiau visai nepanašūs į eksperimentų C ir D kreivių tipus (4.2 pav.).

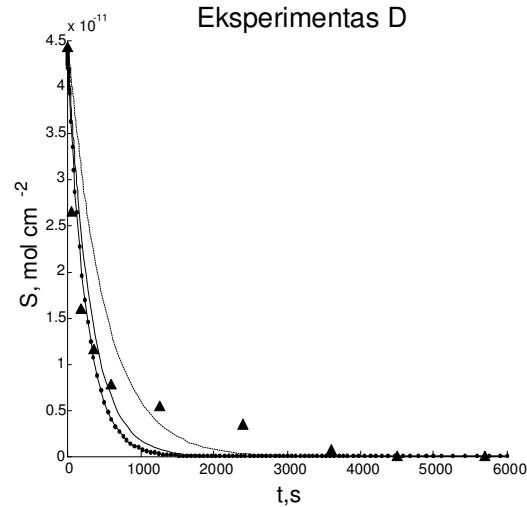
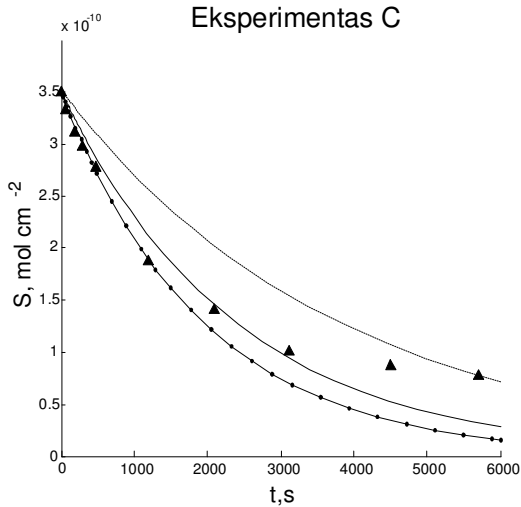




- 4.2 pav. Kinetinės konstantos k_1 variacijos įtaka substato koncentracijos priklausomybei nuo laiko:
- A) Δ - eksperimento „A“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_1 = 0.65 \cdot 10^6$, taškuota linija – $k_1 = 0.4 \cdot 10^6$, štrichuota linija - $k_1 = 0.8 \cdot 10^6$;
 - B) Δ - eksperimento „B“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_1 = 1.7 \cdot 10^6$, taškuota linija – $k_1 = 1.2 \cdot 10^6$, štrichuota linija - $k_1 = 2.2 \cdot 10^6$;
 - C) Δ - eksperimento „C“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_1 = 13.0 \cdot 10^6$, taškuota linija – $k_1 = 6.0 \cdot 10^6$, štrichuota linija - $k_1 = 17.0 \cdot 10^6$;
 - D) Δ - eksperimento „D“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_1 = 7.0 \cdot 10^6$, taškuota linija – $k_1 = 4.0 \cdot 10^6$, štrichuota linija - $k_1 = 10.0 \cdot 10^6$;

Varijuojant kinetinės konstantos k_p reikšmę, gautų kreivių, tipai gana panašūs į eksperimento B kreivę, tačiau visai nepašūs į eksperimentų C ir D kreivių tipus (4.2 pav.).





- 4.3 pav. Kinetinės konstantos k_p variacijos įtaka substrato koncentracijos priklausomybei nuo laiko:
- A) Δ - eksperimento „A“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=8$, taškuota linija – $k_p=100$, štrichuota linija – $k_p=2$;
 - B) Δ - eksperimento „B“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=8$, taškuota linija – $k_p=100$, štrichuota linija – $k_p=2$;
 - C) Δ - eksperimento „C“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=8$, taškuota linija – $k_p=100$, štrichuota linija – $k_p=2$;
 - D) Δ - eksperimento „D“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=8$, taškuota linija – $k_p=100$, štrichuota linija – $k_p=2$;

Siekiant pagerinti modeliavimo ir eksperimentinio duomenų sutapimą (4.1) - (4.2) reakcijų lygtys buvo papildytos tarpiniu žingsniu. Toks sprendimas pagrįstas tuo, kad paprastai fermentinės reakcijos realybėje vyksta per daugelį tarpinių žingsnių, o lygtys (4.1) - (4.2) tik supaprastintai aprašo sistemą. Įterpta tarpinė fermento būseną E_A , iš kurios gali pereiti tiek į E^* , tiek į E :

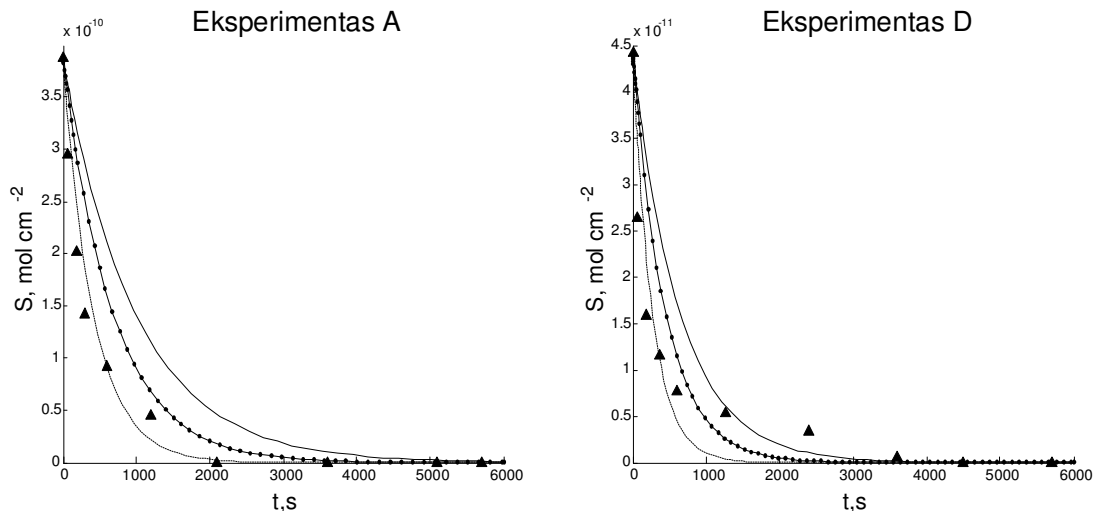


Šią reakcijų schemą atitinkantis matematinis modelis yra:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial E^*}{\partial t} = k_{-1}E^*S + k_2E^*S - k_1E^* \times S + k_aE_a - k_EE^* \\ \frac{\partial E^*S}{\partial t} = k_1E^* \times S - k_{-1}E^*S - k_2E^*S \\ \frac{\partial S}{\partial t} = k_{-1}E^*S - k_1E^* \times S \\ \frac{\partial P}{\partial t} = k_2E^*S \\ \frac{\partial E}{\partial t} = -\left(\frac{I}{V}\right)k_pE + \left(\frac{I}{V}\right)k_D E_a + \left(\frac{I}{V}\right)k_EE^* \\ \frac{\partial E_a}{\partial t} = k_pE - k_DE_a - k_aE_a \end{array} \right. \quad (4.6)$$

Lyginant su ankstesniu, šis modelis papildytas papildoma lygtimi aprašančia tarpinės būsenos E_A kinetiką, bei kitos lygtys pakeistos taip, kad atspindėtų šį sudėtingesnę procesą. Nauji pažymėjimai: E_A –fermento esančio tarpinėje būsenoje koncentracija, k_a – fermento virtimo iš būsenos E_A į būseną E^* kinetinė konstanta, k_E – fermento virtimo iš būsenos E^* į būseną E kinetinė konstanta.

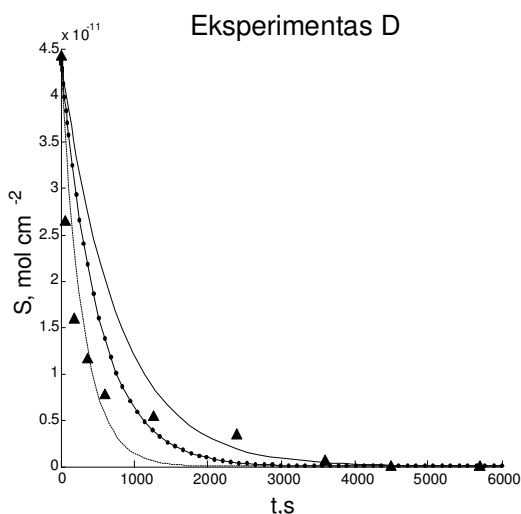
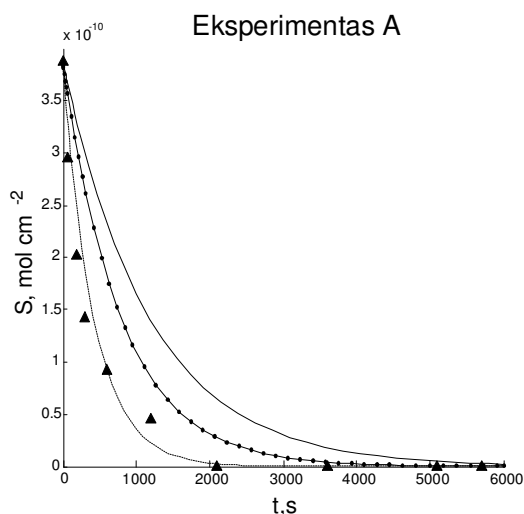
Atlikta skaitmeninių eksperimentų serija varijuojant kinetines konstantas k_p , k_a , k_D , k_I , k_E . Konstantos k_p variavimo rezultatai pateikiami 4.4.



4.4 pav. Konstantos k_p variavimo rezultatai.

- A) Δ - eksperimento „A“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=500$, taškuota linija – $k_p=1000$, štrichuota linija – $k_p=10000$, $k_D = 0.025$;
D) Δ - eksperimento „D“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=500$, taškuota linija – $k_p=1000$, štrichuota linija – $k_p=10000$, $k_D = 0.025$;

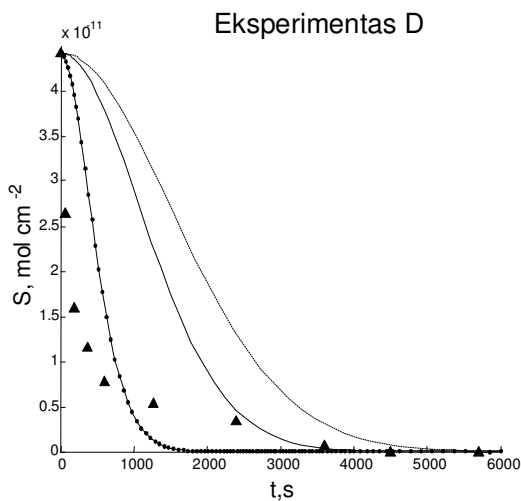
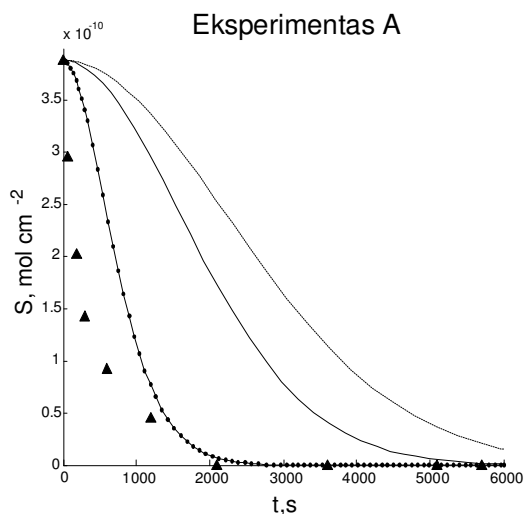
Konstantos k_p variavimo rezultatai pateikiami 4.5 pav.



4.5 pav. Konstantos k_a variavimo rezultatai.

- A) Δ - eksperimento „A“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_a=5$, taškuota linija – $k_a=10$, štrichuota linija – $k_a=500$;
 D) Δ - eksperimento „D“ eksperimentiniai duomenys, ištisinė linija modeliavo rezultatai, kai $k_a=5$, taškuota linija – $k_a=10$, štrichuota linija – $k_a=100$;

Praktiškai k_a ir k_p įtaka galutinėms kreivėms labai panaši. Konstantos k_p variavimo rezultatai, kai padidinama k_D konstanta, pateikiami 4.6 pav.



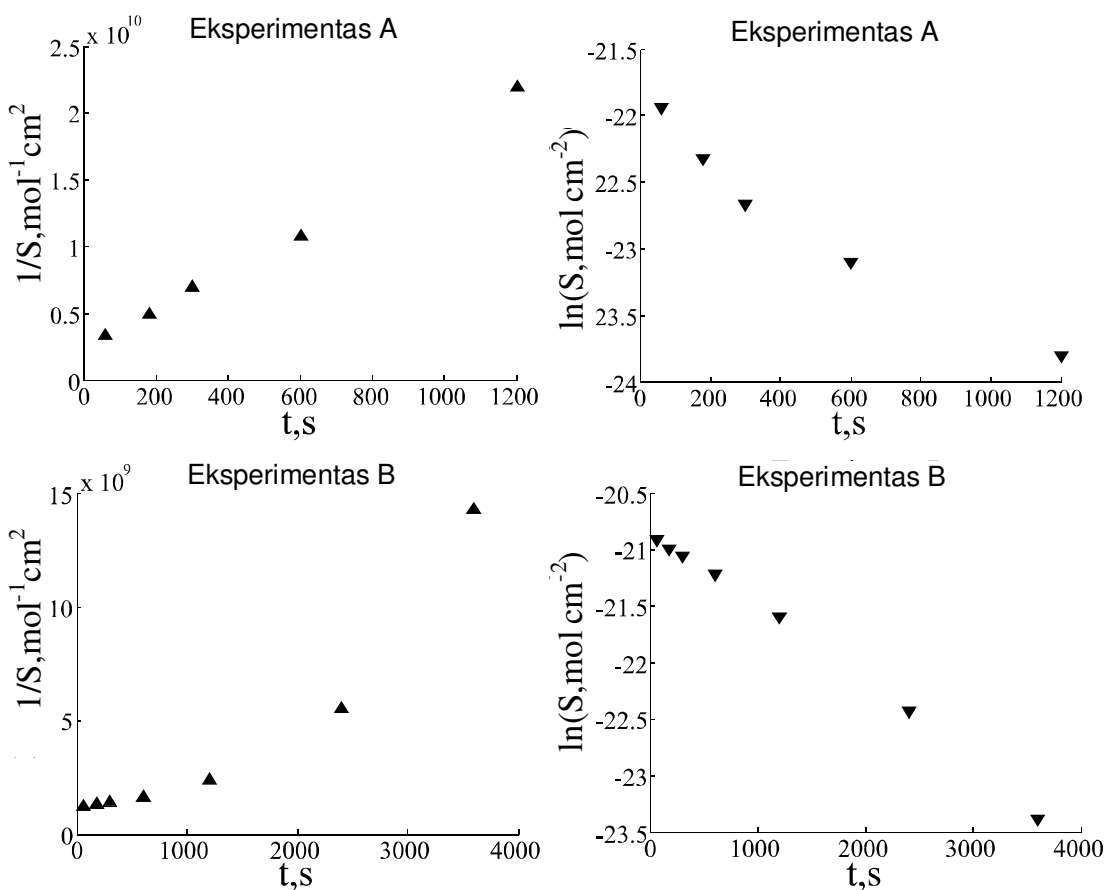
4.6 pav. Konstantos k_p variavimo rezultatai, kai padidinama k_D .

- A) Δ - eksperimento „A“ eksperimentiniai duomenys, taškuota linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=500$, ištisinė linija – $k_p=1000$, štrichuota linija – $k_p=10000$, $k_D=500$;
 D) Δ - eksperimento „D“ eksperimentiniai duomenys, taškuota linija modeliavo rezultatai, kai $k_p=500$, ištisinė linija – $k_p=1000$, štrichuota linija – $k_p=10000$, $k_D=400$;

Atlikus kitas variacijų kombinacijas nustatyta, kad keičiant vien k_I , k_a , k_p gaunami grafikų tipai panašūs į 4.5 pav., o didinant k_D ir tuo pačiu mažinant k_E galima gauti grafikų tipus panašius į 4.6 pav. Tai galima paaiškinti tuo, kad simuliacijos pradžioje prasiskverbusio fermento (E^*) koncentracija yra maža ir didėja labai lėtai (tą užtikrina sąlyginai aukšta k_D konstantos reikšmė), tačiau fermentui perėjus į šią būseną jis beveik

nebegrižta į laisvo fermento būseną kai k_E reikšmė santykinai maža, tad prasiskverbisio fermento kiekis po truputį kaupiasi ir reakcijos (4.5) sparta vis didėja. Toks reakcijos spartos kitimas ir matomas substrato priklausomybės nuo laiko grafike. Tačiau šis naujas grafiko tipas nėra panašus į nei iš vieno eksperimentų duomenis.

Analizuojant 4.3 galima pastebėti, kad geriausias sutapimas gautas tiems eksperimentams, kurių substrato koncentracijos kritimas buvo stipriai išreikšta eksponentė (4.7, eksperimentas B), tuo tikslu atlikta papildoma eksperimentinių duomenų analizė, juos atvaizduojant netiesinėse koordinatinių sistemose.



4.7 pav. Eksperimentinių duomenų A ir B analizė: \blacktriangle – $1/S$ priklausomybė nuo laiko; \blacktriangledown – $\ln(S)$ priklausomybė nuo laiko.

Kaip matyti iš grafinių vaizdų, kitai eksperimentinių duomenų daliai būdinga tai, kad substrato koncentracija S , mažėja proporcingai t^{-1} (4.7 pav., eksperimentas A). Remiantis tuo (4.3) lygčių sistema buvo papildyta netiesiniu substrato nusiplovimo nariu. Šis papildymas davė geresnį eksperimento ir modeliavimo rezultatų sutapimą. Taip pat paminėtina, kad substrato nusiplovimas paminėtas publikacijoje [Valin05], kur jis stebėtas eksperimentiškai net ir tuo atveju, kai tirpale nebuvo fermento (žr. 1 pav.

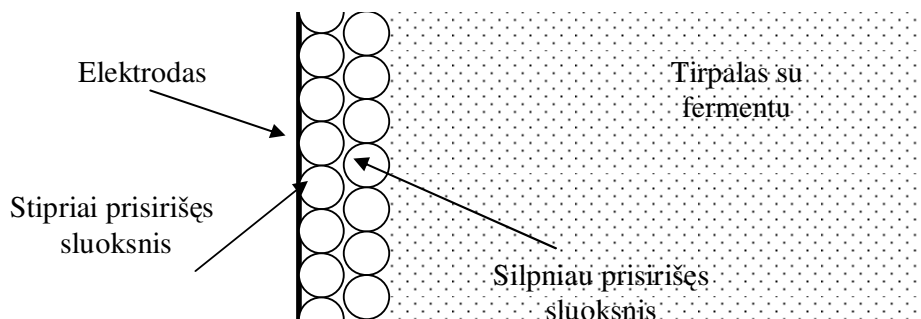
straipsnyje [Valin05]). Tad argumentuotai galime teigti, kad tas pats procesas vyksta ir tuomet, kai tirpale yra fermento.

Tad truputį modifikuota netiesinių diferencialinių lygčių sistema gali būti užrašyta taip [Puida08]:

$$\begin{cases} \frac{dE^*}{dt} = k_{-1}E^*S + k_2E^*S - k_1E^* \times S + k_pE - k_D E^* \\ \frac{dE^*S}{dt} = k_1E^* \times S - k_{-1}E^*S - k_2E^*S \\ \frac{dS}{dt} = k_{-1}E^*S - k_1E^* \times S - k_S \left(\frac{S}{S_0} \right)^2 \\ \frac{dP}{dt} = k_2E^*S \\ \frac{dE}{dt} = \left(\frac{I}{V} \right) k_D E^* - \left(\frac{I}{V} \right) k_p E \end{cases} \quad (4.7)$$

čia vartojami tie patys pažymėjimai kaip ir (4.3) lygčių sistemoje, papildant šiais: k_S – substrato nusiplovimo greičio konstanta, S_0 – pradinė substrato koncentracija ant elektrodo paviršiaus.

Netiesinis nusiplovimo narys yra gana netipiškas, bet supaprastintai jis gali būti paaiškintas kaip dviejų tiesinių nusiplovimo procesų (su skirtingomis nusiplovimo greičio konstantomis) sudėtinis veikimas: pirmas – ant elektrodo-substrato ribos, kur ryšys stipresnis ir nusiplovimo greitis mažesnis ir antras – substrato-substrato sluoksnių nusiplovimas, kur ryšys yra silpnesnis ir nusiplovimo greitis didesnis. Labai tikėtina, kad taikant užlašavimo ir džiovavimo techniką, gautas substrato sluoksniu yra vos kelių molekulių storio, tad gauta struktūra yra pseudo daugiasluoksnė ir tokių sluoksnių, kur būtų susiformavę ryšiai substratas-substratas yra vos keli. Tad nusiplovimo greitis būtų stebimas kaip tiesiškai mažėjantis, nuo aukštos pradinės reikšmės (kai nusiplauna substratas-substratas sluoksniai) iki mažos galutinės reikšmės (kai nusiplauna substratas-elektrodas sluoksniu). Pavyzdžiui, tarkime, kad nusiplovimo greitis (k) tiesiškai priklausomas nuo santykinės substrato koncentracijos: $k=a \cdot S/S_0+b$, kur a ir b yra konstantos. Tuomet narys, panašus į mūsų naudotąjį netiesinį nusiplovimo narį, būtų gaunamas įstačius šią tiesiškai kintančią nusiplovimo greičio išraišką į klasikinį tiesinį nusiplovimo modelį: $dS/dt = -kS$.



4.8 pav. Keliasluoksniu elektrodo padengimo substratu schema.

4.4 Kompiuterinis modeliavimas ir jo rezultatai

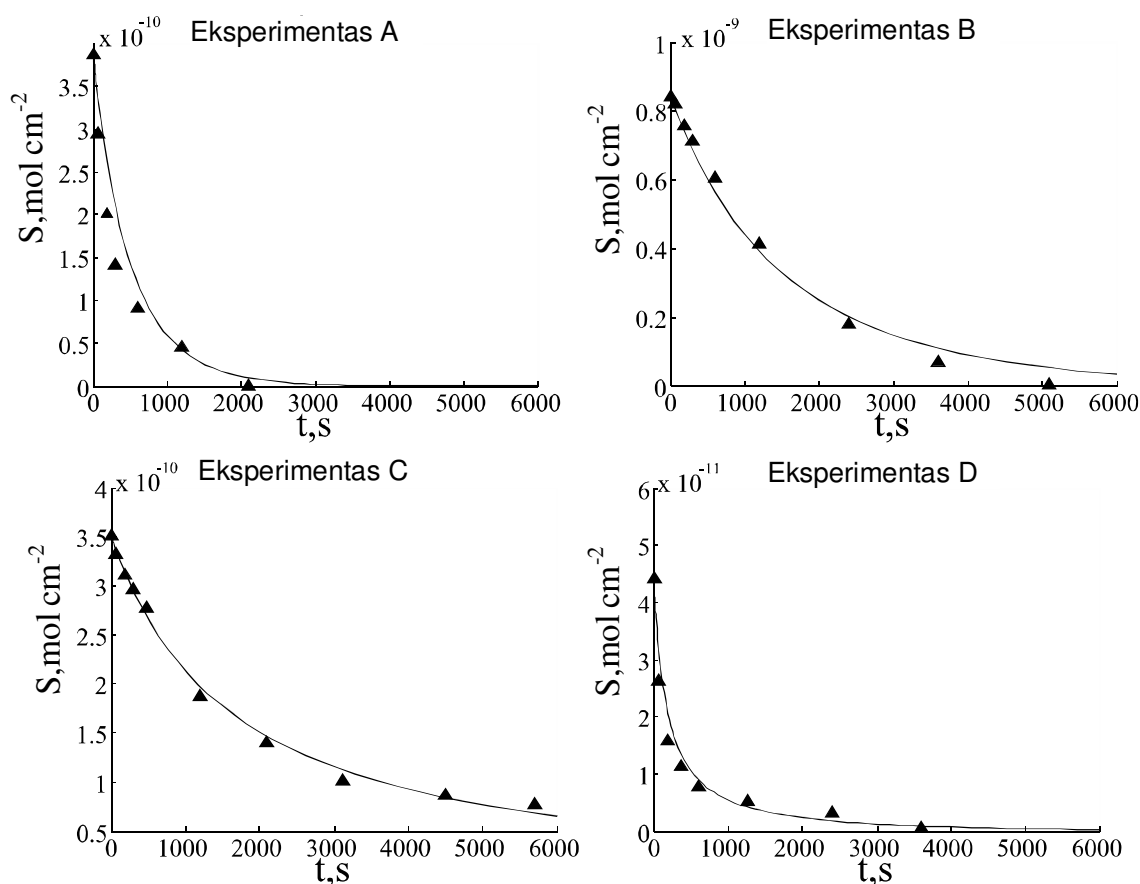
Siekiant nustatyti kaip keistųsi biojutiklio parodymai, jei jis veiktų pagal aukščiau aprašytą modelį ir kaip jo parodymai sutaptų su fizinio eksperimento būdų gautais duomenimis, buvo panaudota patobulinta ankstesniam skyriuje aprašyta programinė įranga. Siekiant sėkmingai šią programinę įrangą panaudoti, ji buvo išplėsta galimybėmis varijuoti kelis pasirinktus parametrus (kinetines konstantas), galimybė dirbti su keliais eksperimentinių duomenų rinkiniais, taip pat papildyta dviejų naujų kinetinių modelių realizacija. Pasitelkiant sukurtą įrangą atlikta skaitmeninio modeliavimo eksperimentų serija. Fizinio eksperimento duomenys gauti tuo pačiu būdu kaip aprašyta straipsnyje [Valin05], kitaip tariant paverčiant elektrodo pikinį srovės stiprį į ferocene grupių paviršinę koncentraciją. Skaičiavimuose naudotos šios reikšmės: $V = 4 \text{ cm}^3$, $k_2 = 75 \text{ s}^{-1}$, $k_I = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_p = 100 \text{ cm s}^{-1}$, $k_D = 0.025 \text{ s}^{-1}$, $I_A = 5.07 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$, $I_B = 5.19 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$, $I_C = 5.23 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$, $I_D = 5.23 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Kaip pradiniai modeliavimo duomenys, keturios kinetinės konstantos parinktos tos pačios kaip ir publikacijoje [Puida07]. Taip pat parinktos šios pradinės sąlygos: $E(0) = E_0$, $E^*(0) = E^*S(0) = P(0) = 0$, $S(0) = S_0$. Konkrečios E_0 ir S_0 reikšmės keitėsi tarp eksperimentų. Modeliavimo tikslas buvo keičiant k_I ir k_S pasiekti kuo geresnį skaitmeninio ir fizinio eksperimentų rezultatų sutapimą (sutapimo įvertinimui naudotas kvadratų metodas su svoriais). Netiesinė paprastųjų diferencialinių lygčių sistema (4.4) spęsta naudojant Matlab (Matlab Release 14, The MathWorks Inc., Natick, USA) ODE priemones standiems uždaviniams.

Integravimo intervalas 0..6000 sek. Pradinės sąlygos ir konstantos davusios geriausia eksperimento ir modeliavimo rezultato sutapimą pateikiamos 1 lentelėje:

1 lentelė. Pradiniai duomenys bei geriausia eksperimento ir modeliavimo sutapimą davusios konstantos.

Exp.	$S_0 \times 10^{10}, \text{mol cm}^{-2}$	$E_0 \times 10^{12}, \text{mol cm}^{-3}$	$k_1 \times 10^{-6}, \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$	$k_s \times 10^{13}, \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
A	3.88	58.0	0.41	2.26
B	8.43	5.80	1.20	2.13
C	3.51	0.58	1.17	2.06
D	0.44	8.30	0.75	2.34

Fizinio ir skaitmeninio eksperimentų duomenys pateikiami 4.9 pav.:



4.9 pav. Substrato koncentracijos priklausomybė nuo laiko: ištisinė linija – skaitmeninis eksperimentas, trikampėliai – fizinis eksperimentas.

Fizinio eksperimento duomenys buvo išnagrinėti kaip logaritminiai ir t^{-1} grafikai. Ši analizė atskleidė, kad eksperimentiniai duomenys A, C ir D turi stipriai išreikštą atvirkščią priklausomybę nuo laiko. Tuo tarpu eksperimentas B – tipiška eksponentė. Tokie grafikų tipų skirtumai gali būti paaiškinti kaip dviejų konkuruojančių dS/dt diferencialinės lygties narių sąveika. Duomenys rodo, kad substrato koncentracijos

atžvilgiu tai turėtų būti pirmos ir antros eilės nariai. Pirmos eilės narys dominuoja eksperimente B, o antros eilės narys dominuoja eksperimentuose A, C ir D. Šie pastebėjimai padėjo patobulinti modelį ir gauti žymiai geresnį sutapimą tarp skaitmeninio ir fizinio eksperimento duomenų.

Pastebėtina, kad apskaičiuota kinetinės konstantos k_1 reikšmė yra trimis eilėmis mažesnė, už straipsnyje [Puida07] pateiktas reikšmes. Šis skirtumas gali būti paaiškintas tuo, kad šiame uždavinyje nagrinėto substrato cheminė struktūra (feroceno grupė) gana stipriai skiriasi nuo anksčiau nagrinėto substrato struktūros (dicianohidrochinono grupė), o kaip žinoma k_1 atspindi substrato prisijungimą prie fermento aktyviojo centro.

4.5 Išvados

Remiantis skaitmeninio modeliavimo rezultatais galima daryti tokias išvadas:

1. Klasikinis *Thermomyces lanuginosus* fermento aktyvumo nustatymo kinetinis modelis davė gerą sutapimą tik daliai eksperimentinių duomenų, o pasiūlytas originalus kinetinis modelis davė gerą sutapimą tarp visų modeliavimo ir eksperimentinių duomenų.
2. Pagal fizinio eksperimento analizės rezultatus, matoma, kad substrato (FPONDS) koncentracijos mažėjimas pasireiškia dviem skirtingomis priklausomybėmis nuo laiko: pirma – eksponentinė, antra – t^{-1} tipo. Tas rodo, kad (4.7) lygčių sistemos dS/dt lygtyje konkuruoja du nariai: pirmos ir antros eilės (substrato koncentracijos atžvilgiu).
3. Skaitmeninio modeliavimo rezultatai parodė, kad geras eksperimento ir modeliavimo duomenų sutapimas galimas tik tuomet, kai atsižvelgiama į netiesinį nusiplovimo procesą. Šis procesas gali būti paaiškintas, kaip dviejų skirtingo greičio tiesinio nusiplovimo procesų (greitas substratas-substratas sluoksnių nusiplovimas ir lėtas substratas-elektrodas sluoksnio nusiplovimas) bendras veikimas. Šis modelis remiasi tuo, kad substratas formuoja vos kelių molekulių storio sluoksnį ant elektrodo paviršiaus, tad nusiplovimo greičio konstanta keičiasi (tiesiškai) proporcingai substrato koncentracijai nuo didelės, kai nusiplauna silpnai sukibę substratas-substratas sluoksniai iki mažos, kai

nusiplauna substratas-elektrodas sluoksnis. Ir visas šis procesas bendrai matomas kaip substrato koncentracijos atžvilgiu antros eilės narys.

5 Biojutiklio su valdoma membrana ir jį veikiančių išorės veiksmų kompiuterinis modeliavimas

5.1 Įvadas

Kaip minėta antrame skyriuje, biojutikliuose kaip toks jautrusis elementas paprastai yra naudojami fermentai, antikūniai ar net visos ląstelės. O kaip signalo vertimo elementas dažniausiai naudojamos elektrocheminės sistemos. Biojutiklio veikimas yra nulemtas kelių veiksmų bei su jais siejamų parametrų: (i) biologinės sistemos: fermento katalitinio pajėgumo, substrato patekimo greičio, substrato konversijos greičio; (ii) konversijos sistemos: fermentinės reakcijos produkto konversijos greitis, elektrocheminės sistemos regeneracijos greitis; (iii) difuzijos: substrato difuzijos į aktyvų centrą greitis, elektrocheminės konversijos produktų difuzijos greitis [Turner87]. Paprastai visi šie parametrai yra pastovūs biojutiklio darbo metu. Lėčiausias proceso žingsnis nulemia viso biojutiklio spartą. Elektrocheminės reakcijos paprastai yra labai greitos palyginus su fermentinėmis reakcijomis ir difuzija. Tad yra dvi parametrų, lemiančių biojutiklio veikimą, grupės: biokatalitinė – nulemta fermentinės konversijos greitis, ir difuzinė – nulemta jutiklio konstrukcijos. Remiantis šiomis grupėmis įvardijami du biojutiklio veikimo režimai. Pirmasis režimas – kinetinis, pasireiškiantis tuomet, kai fermentinės konversijos greitis yra mažas lyginant su difuzijos greičiu. Šiuo atveju jutiklio parametrai yra nulemti katalitinio proceso. Tai reiškia, kad, pavyzdžiui, biojutiklio jautrumas aplinkos pH bus nulemtas fermento jautrumo pH pokyčiams, o temperatūrinė jutiklio atsako priklausomybė bus nulemta katalitinio proceso aktyvacijos energijos (paprastai 10%/laipsniui) ir pan. Biojutiklio atsako tiesinio atsako diapazonas yra nulemtas K_M (Michaelis konstanta) ir yra labai siauras. Jutiklio jautrumas šiame režime yra aukštas.

Kitas jutiklio darbo režimas – difuzinis, jis realizuojasi tuomet biojutiklio katalitinis aktyvumas yra labai aukštas ir lėčiausias žingsnis yra substrato difuzija link fermento aktyvaus centro. Šiame režime jutiklio parametrai yra nulemti difuzijos proceso. Jei pH nekeičia difuzijos greičio, tuomet biojutiklio atsakas nėra jautrus aplinkos pH svyravimams. Temperatūros įtaka difuzijai yra daug mažesnė (2-3 % / laipsniui). Tokio biojutiklio jautrumas yra žemas. Kai biojutiklis dirba difuziniame režime tuomet galima

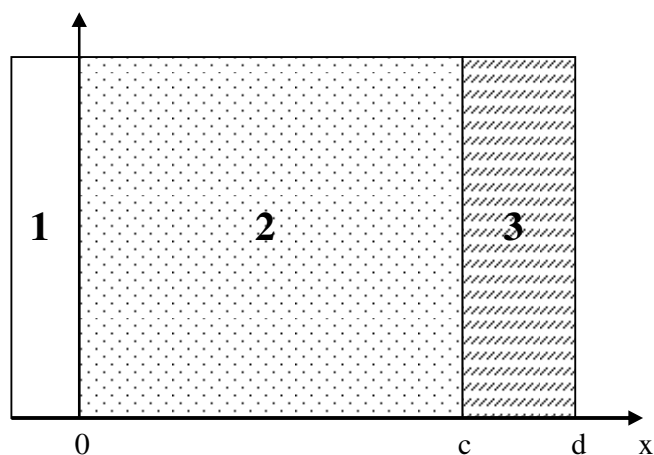
tikėtis kalibracinės kreivės. Tai yra gera savybė, nes jutiklis gali dirbti esant didelėms substrato koncentracijoms. Pavyzdžiui gliukozės biojutiklio, sukonstruoto panaudojant gliukozės oksidazę [Laurin89] arba PQQ gliukozės dehidrogenazę [Laurin04], tiesinio atsako diapazonas paprastai siekia vos kelis mM. Tik tam tikrais atvejais diapazonas gali būti išplėstas iki 15 mM [Laurin04, Kanap92]. Tai gali būti pasiekta perjungiant jutiklį į gilų difuzinį režimą arba dirbtinai sumažinant substrato koncentraciją ant išorinės membranos paviršiaus. Šie biojutiklio veikimo režimai aprašyti daugelyje straipsnių [Mell75, Kulys86, Schul97, Baron02, Baron03, Baron04].

Galimybė junginėti jutiklio režimus atveria puikius kelius valdyti biojutiklio analitinius parametrus. Kartais tai yra naudinga, kai jutiklis veikia sistemose, kur substrato koncentracija kinta labai plačioje skalėje.

Šios darbo dalies tikslas matematiškai sumodeliuoti biojutiklio veikimą, kai jis dirba kintančio pH sąlygomis ir difuzinė membrana gali būti reguliuojama. Taip pat išanalizuoti kaip keičiasi jutiklio tiesinio atsako diapazonas bei pats atsako laikas.

5.2 Fizinis modelis

Šiame skyriuje nagrinėjamas plokščias biojutiklis, kuris sudarytas plokščią elektrodą padengiant fermentiniu sluoksniu ir pastarasis padengtas plokščia membrana. Tokia biojutiklio konstrukcija labai paplitusi praktikoje. Net ir tuo atveju, kai išorinė membrana pašalinama, fermento sluoksnis ant elektrodo paviršiaus bei tirpiklio nesimaišantis sluoksniai veikia taip lyg membrana būtų. Daroma prielaida, kad visuose eksperimentuose biojutiklio fermentinis sluoksnis išlieka stabilus ir jo storis išlieka toks pat – c . Fermentinis sluoksnis padengiamas porėta kintamo storio bei laidumo membrana, kurios storis $\delta = d - c$. Membranos laidumas charakterizuojamas substrato bei reakcijos produkto difuzijos koeficientais joje: $D_{SM} = D_{PM} = D_{membr.}$. Membranos pralaidumas bei fermento aktyvumas priklauso nuo pH. Modeliuojama sistema schematiškai pavaizduota 5.1 pav.



5.1 pav. Modeliuojamos sistemos schematinis vaizdas: 1 – elektrodas, 2 – fermentinis sluoksnis, 3 – membrana.

5.3 Matematinis modelis

Nagrinėjama klasikinė biojutiklio veikimo schema, kai fermentas (E) verčia substratą (S) į reakcijos produktą (P):



Toks biojutiklis gali būti modeliuojamas dviem dimensijomis reakcijos-difuzijos lygtimis su netiesiniu nariu, aprašančiu Michaelis-Menten kinetiką, kai įskaitoma ir reakcijos produkto inhibicija. Nagrinėjamos sistemos difuzijos koeficientai yra temperatūros ir terpės pH funkcijos. Srityje 2 (5.1) vykstančius procesus aprašo šios diferencialinės lygtys [Frey07]:

$$\begin{cases} \frac{\partial S}{\partial t} = D_{SE}(T) \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} - \frac{V_{Max}(pH, T) \cdot S}{K_M \cdot (1 + P/K_P) + S} \\ \frac{\partial P}{\partial t} = D_{PE}(T) \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{V_{Max}(pH, T) \cdot S}{K_M \cdot (1 + P/K_P) + S} \end{cases}, x \in (0, c), \quad (5.2)$$

Procesus vykstančius zonoje 3 aprašo šios lygtys:

$$\begin{cases} \frac{\partial S}{\partial t} = D_{SM}(pH, T) \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \\ \frac{\partial P}{\partial t} = D_{PM}(pH, T) \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} \end{cases}, x \in (c, d), \quad (5.3)$$

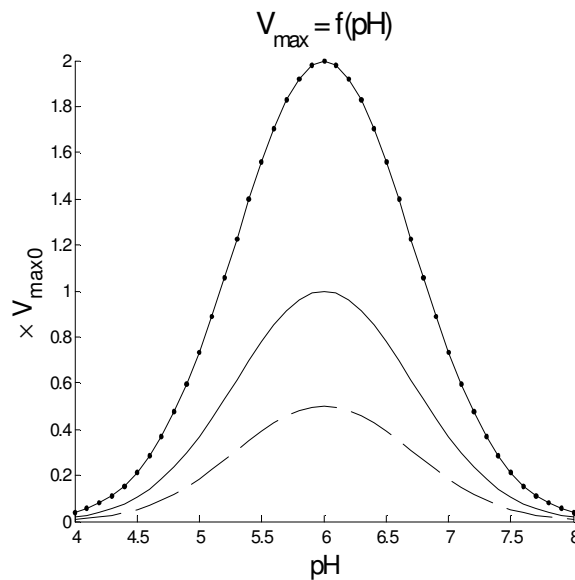
čia: S – substrato koncentracija, D_{SE} , D_{PE} – substrato ir reakcijos produkto difuzijos koeficientai antroje srityje, D_{SM} , D_{PM} – substrato ir reakcijos produkto difuzijos

koeficientai membranoje (sritis 3), V_{Max} – fermentacijos greitis, K_M – Michaelis konstanta, K_P – reakcijos produkto inhibicijos konstanta, T – temperatūra, pH – pH membranoje.

Fermentacijos greičio priklausomybės nuo pH modeliavimui pasirinkta Gausso funkcija su centru $pH_V=6$. Priklausomybė nuo temperatūros modeliuojama tiesine funkcija su 10%/laipsniui daugikliu ir paslinkta taip, kad būtų vienetui prie 20°C temperatūros:

$$V_{Max}(pH, T) = V_{Max0} \cdot \frac{T-10}{10} \cdot e^{-(pH-6)^2} \quad (5.4)$$

čia V_{Max0} – tipiškas fermentacijos greitis prie 20°C ir $pH = 6$.



5.2 pav. Maksimalaus fermentacijos greičio priklausomybė nuo pH esant skirtingoms temperatūroms. Ištinė linija, kai $T = 20^\circ\text{C}$, taškuota linija – $T=30^\circ\text{C}$, strichuota linija – $T=10^\circ\text{C}$.

Difuzijos koeficientai fermentacijos sluoksnyje (sritis 2) modeliuojami tiesine funkcija su daugikliu 3%/laipsniui ir centru ties 20°C:

$$\begin{cases} D_{SE}(pH) = D_{SE0} \cdot \frac{T+13}{33} \\ D_{PE}(pH) = D_{PE0} \cdot \frac{T+13}{33} \end{cases} \quad (5.5)$$

čia D_{SE0} ir D_{PE0} – substrato ir reakcijos produkto difuzijos koeficientai fermentiniame sluoksnyje (sritis 2) prie 20°C temperatūros. Difuzijos koeficientai membranoje modeliuojami pagal tris skirtingus modelius – Gausso, tiesinį bei konstantinį:

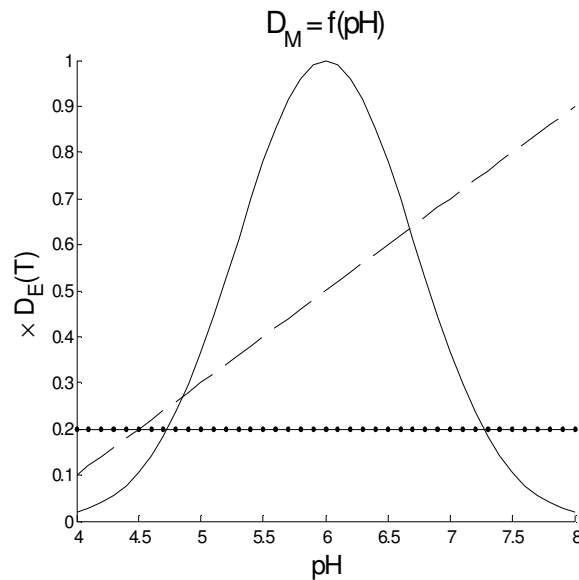
$$\begin{cases} D_{SM}(pH, T) = D_{SE}(T) \cdot e^{-(pH-pH_M)^2} \\ D_{PM}(pH, T) = D_{PE}(T) \cdot e^{-(pH-pH_M)^2} \end{cases}, \quad (5.6)$$

arba

$$\begin{cases} D_{SM}(pH, T) = D_{SE}(T) \cdot (0.2 \cdot pH - 0.7) \\ D_{PM}(pH, T) = D_{PE}(T) \cdot (0.2 \cdot pH - 0.7) \end{cases}, \quad (5.7)$$

arba

$$\begin{cases} D_{SM}(pH, T) = D_{SE}(T) \cdot 0.2 \\ D_{PM}(pH, T) = D_{PE}(T) \cdot 0.2 \end{cases}. \quad (5.8)$$



5.3 pav. Skirtingi membranos laidumo modeliai esant pastoviai temperatūrai. Ištinė linija – Gausso tipo laidumo priklausomybė nuo pH, taškuota linija – membranos laidumas nepriklauso nuo pH, brūkšniuota linija – membranos laidumas tiesiškai priklauso nuo pH.

Pradinės sąlygos:

$$S(0, x) = 0, \text{ kai } x < d; S(0, d) = S_0; P(0, x) = 0. \quad (5.9)$$

Kraštinės sąlygos:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial S}{\partial x}(t,0) &= 0, S(t,d) = S_0, P(t,0) = 0, P(t,d) = 0, \\
D_{SE}(T) \frac{\partial S}{\partial x}(t,c-0) &= D_{SM}(pH,T) \frac{\partial S}{\partial x}(t,c+0), \\
D_{PE}(T) \frac{\partial P}{\partial x}(t,c-0) &= D_{PM}(pH,T) \frac{\partial P}{\partial x}(t,c+0), \\
S(t,c-0) &= S(t,c+0), P(t,c-0) = P(t,c+0).
\end{aligned} \tag{5.10}$$

Tiriamos biojutiklio savybės:

Reakcijos produkto gradientas (biojutiklio srovės stipris yra

$$\text{proporcingas šiam parametru) } i: i(pH,T,S_0,t) = \left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0} \tag{5.11}$$

$$\text{Nusistovėjęs sensoriaus atsakas: } i_{fin}(pH,T,S_0). \tag{5.12}$$

Biojutiklio atsako nusitovėjimo laikas t_{fin} :

$$t_{fin}(pH,T,S_0) = \max\{t : i(pH,T,S_0,t) < 0.95 \cdot i_{fin}(pH,T,S_0)\} \tag{5.13}$$

Biojutiklio tiesinio atsako diapazonas S_{linear_range} :

$$S_{linear_range} = \max\left\{S_0 : 0.95 < \frac{i_{fin}(pH,T,S_0)S_{0_initial}}{i_{fin}(pH,T,S_{0_initial})S_0} < 1.05\right\} \tag{5.14}$$

Biojutiklio jautris B :

$$\begin{aligned}
B &= \frac{i(pH,T,S_0,t_2) - i(pH,T,S_0,t_1)}{S_0 \cdot (t_2 - t_1)}, \\
t_2 &= \max\{t : i(pH,T,S_0,t) < 0.5 \cdot i_{fin}(pH,T,S_0)\}, \\
t_1 &= \max\{t : i(pH,T,S_0,t) < 0.3 \cdot i_{fin}(pH,T,S_0)\}
\end{aligned} \tag{5.15}$$

Aukščiau aprašytas matematinis modelis remiasi prielaida, kad katalitinės reakcijos greitis yra daug mažesnis už elektrodinės reakcijos greitį. Tas yra tiesa tomis sąlygomis kuriomis veikia aukščiau aprašytas modelis, kai tarpės pH nekeičiamas eksperimento metu, o elektrodas būna įjungtas nuo pat eksperimento pradžios. Jeigu elektrodas būtų įjungiamas ne eksperimento pradžioje, o jam jau išibėgėjus, tuomet reakcijos produkto būtų susikaupęs didelis kiekis ir vos įjungus elektrodą, momentinė srovė būtų fiksuojama daug kartų stipresnė nei aukščiau aprašytų atveju. Toks elektrodo panaudojimo metodas taikomas elektrochemijoje ir vadinamas elektrocheminiu stripingu. Šią techniką galima

būtų patobulinti naudojant valdomą membraną, t.y. membraną įjungiant/išjungiant tam tikru laiko momentu. Siekiant sumodeliuoti tokiu būdu veikiančią jutiklį, reikia (5.1) reakcijos lygtį papildyti elektrodine reakcijos lygtimi:



čia: P^* - konvertuotas reakcijos produktas, kuris gaunamas, reakcijos produktui P oksidavusis/redukavusis ant elektrodo paviršiaus.

Tačiau lygtis (5.17) vyksta tik viename erdvės taške, t.y. ant elektrodo paviršiaus, tad ji nėra sprendžiama atskirai, bet įtraukiama kaip kraštinė sąlyga, pakeičianti kraštinę sąlygą $P(t,0) = 0$ iš (5.10). Kraštinės sąlygos šiam modeliui yra tokios:

$$\begin{aligned} \frac{\partial S}{\partial x}(t,0) &= 0, S(t,d) = S_0, D_{PE}(T) \frac{\partial P}{\partial x}(t,0) = c_k k_e(t) P(t,0), P(t,d) = 0, \\ D_{SE}(T) \frac{\partial S}{\partial x}(t,c-0) &= D_{SM}(pH,T) \frac{\partial S}{\partial x}(t,c+0), \\ D_{PE}(T) \frac{\partial P}{\partial x}(t,c-0) &= D_{PM}(pH,T) \frac{\partial P}{\partial x}(t,c+0), \\ S(t,c-0) &= S(t,c+0), P(t,c-0) = P(t,c+0). \end{aligned} \quad (5.18)$$

čia $k_e(t)$ – elektrodinės reakcijos greičio koeficientas, kai elektrodas išjungtas, tai lygus nuliui, c_k – dimensijų išlyginimo konstanta. Tiriamos šio biojutiklio savybės:

Reakcijos produkto konversijos greitis ant elektrodo paviršiaus,
proporcingas biojutiklio generuojamai srovei i :

$$i(pH,T,S_0,t) = k_e(t) P(t,0). \quad (5.19)$$

Maksimalus sensoriaus atsakas:

$$i_{\max}(pH,T,S_0) = \max\{i(pH,T,S_0,t)\}. \quad (5.20)$$

5.4 Kompiuterinis modeliavimas ir jo rezultatai

Šio biojutiklio skaitiniam modeliavimo automatizavimui sukurta programinė įranga. Ši programinė įranga geba modeliuoti tiek klasikinį, tiek elektrocheminio stripingo režime dirbantį biojutiklius, atsižvelgiant į fermentinės reakcijos inhibiciją reakcijos

produktu, terpės pH, temperatūrą, ribotą elektrodinės reakcijos greitį, taip pat į difuzijos membranoje, fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo pH bei temperatūros. Šio programos darbo rezultatas – biojutiklio atsako nusistovėjusios reikšmės, jutiklio jautrio, tiesinio atsako diapazono priklausomybės nuo terpės pH, temperatūros, membranos difuzijos koeficiento, fermento aktyvumo. Papildžius sukurtąją programinę įrangą patogiai vartotojo sąsaja bei šiek tiek patobulinius ji galėtų tapti universaliu įrankiu šios klasės (aprašomų Michaelis-Menten kinetika su inhibicija) uždavinių modeliavimui. Realizuojant šią programinę įrangą netiesinių diferencialinių lygčių su dalinėmis išvestinėmis sistema (5.2)-(5.3) spęsta kombinuojant Crank-Nicholson baigtinių skirtumų schemą (tiesinei daliai) kartu su paprastųjų iteracijų metodu (netiesiniam nariui) [Samar01]:

$$\frac{S_i^{k+1,j+1} - S_i^j}{h_t} = D_{SE} \frac{(S_{i+1}^{k+1,j+1} - 2S_i^{k+1,j+1} + S_{i-1}^{k+1,j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2} - \frac{V_{\max} (S_i^{k+1,j+1} + S_i^j)}{2(K_m (1 + P_i^{k,j+1} / K_p) + S_i^{k,j+1})}, \quad (5.21)$$

$$\frac{P_i^{k+1,j+1} - P_i^j}{h_t} = D_{PE} \frac{(P_{i+1}^{k+1,j+1} - 2P_i^{k+1,j+1} + P_{i-1}^{k+1,j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2} + \frac{V_{\max} (S_i^{k+1,j+1} + S_i^j)}{2(K_m (1 + P_i^{k,j+1} / K_p) + S_i^{k,j+1})}. \quad (5.22)$$

aukščiau aprašytos lygtys taikomos srityje 2, t.y. $i = 1, \dots, N_c - 1$.

$$\frac{S_i^{k+1,j+1} - S_i^j}{h_t} = D_{SM} \frac{(S_{i+1}^{k+1,j+1} - 2S_i^{k+1,j+1} + S_{i-1}^{k+1,j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2}, \quad (5.23)$$

$$\frac{P_i^{k+1,j+1} - P_i^j}{h_t} = D_{PM} \frac{(P_{i+1}^{k+1,j+1} - 2P_i^{k+1,j+1} + P_{i-1}^{k+1,j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2}, \quad (5.24)$$

pastarosios lygtys taikomos srityje 3, t.y. $i = N_c, \dots, N - 1$. Kraštinės sąlygos:

$$\begin{aligned} S_0^{k+1,j+1} &= S_1^{k+1,j+1}, \quad P_0^{k+1,j+1} = 0, \\ S_N^{k+1,j+1} &= S_0, \quad P_N^{k+1,j+1} = 0, \\ D_{SE} (S_{Nc-1}^{k+1,j+1} - S_{Nc}^{k+1,j+1}) &= D_{SM} (S_{Nc}^{k+1,j+1} - S_{Nc+1}^{k+1,j+1}), \\ D_{PE} (P_{Nc-1}^{k+1,j+1} - P_{Nc}^{k+1,j+1}) &= D_{PM} (P_{Nc}^{k+1,j+1} - P_{Nc+1}^{k+1,j+1}) \end{aligned} \quad (5.25)$$

Paprastųjų iteracijų metodas buvo taikomas substrato ir produkto koncentracijos atžvilgiu, vienam laiko sluoksniui, pradinė substrato bei produkto koncentracija buvo imama lygi ankstesnio laiko sluoksniu koncentracijai: $S_i^{0,j+1} = S_i^j$, $P_i^{0,j+1} = P_i^j$, iteracijos (jos numeris žymimas raide k) vykdomos tol, kol tenkinamos sąlygos:

$$\left| S_{N_c-1}^{k+1,j+1} - S_{N_c-1}^{k,j+1} \right| > \left| S_{N_c-1}^{k+1,j+1} \right| \cdot \varepsilon, \quad (5.26)$$

$$\left| P_{N_c-1}^{k+1,j+1} - P_{N_c-1}^{k,j+1} \right| > \left| P_{N_c-1}^{k+1,j+1} \right| \cdot \varepsilon \quad (5.27)$$

ε pasirinktas lygus 10^{-6} . Tačiau skaičiavimai parodė, kad reikiamas tikslumas pasiekiamas jau su pirmąja iteracija, tad skirtuminė schema (5.21)- (5.24) buvo pakeista kiek paprastesne ($S_i^{k+1,j+1}$ pakeičiant S_i^{j+1} , o $S_i^{k,j+1}$ pakeičiant S_i^j , $P_i^{k+1,j+1} \rightarrow P_i^{j+1}$, $P_i^{k,j+1} \rightarrow P_i^{j+1}$):

$$\frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t} = D_{SE} \frac{(S_{i+1}^{j+1} - 2S_i^{j+1} + S_{i-1}^{j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2} - \frac{V_{\max}(S_i^{j+1} + S_i^j)}{2(K_m(1 + P_i^j / K_p) + S_i^j)}, \quad (5.28)$$

$$\frac{P_i^{j+1} - P_i^j}{h_t} = D_{PE} \frac{(P_{i+1}^{j+1} - 2P_i^{j+1} + P_{i-1}^{j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2} + \frac{V_{\max}(S_i^{j+1} + S_i^j)}{2(K_m(1 + P_i^j / K_p) + S_i^j)}. \quad (5.29)$$

aukščiau aprašytos lygtys taikomos srityje 2, t.y. $i = 1, \dots, N_c - 1$.

$$\frac{S_i^{j+1} - S_i^j}{h_t} = D_{SM} \frac{(S_{i+1}^{j+1} - 2S_i^{j+1} + S_{i-1}^{j+1}) + (S_{i+1}^j - 2S_i^j + S_{i-1}^j)}{2h_x^2}, \quad (5.30)$$

$$\frac{P_i^{j+1} - P_i^j}{h_t} = D_{PM} \frac{(P_{i+1}^{j+1} - 2P_i^{j+1} + P_{i-1}^{j+1}) + (P_{i+1}^j - 2P_i^j + P_{i-1}^j)}{2h_x^2}, \quad (5.31)$$

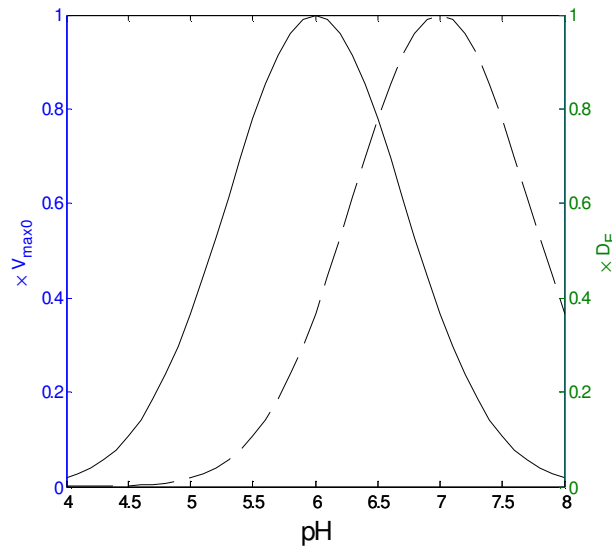
pastarosios lygtys taikomos srityje 3, t.y. $i = N_c, \dots, N - 1$.

Biojutikliui dirbant pagal antrąjį modelį, skiriasi tik kaip skaičiuojama kraštinė sąlyga reakcijos produktui taške $x=0$:

$$S_0^{j+1} = S_1^{j+1}, \quad P_0^{j+1} = \frac{P_1^{j+1}}{1 + \frac{k_e c_k h_x}{D_{SE}}}, \quad (5.32)$$

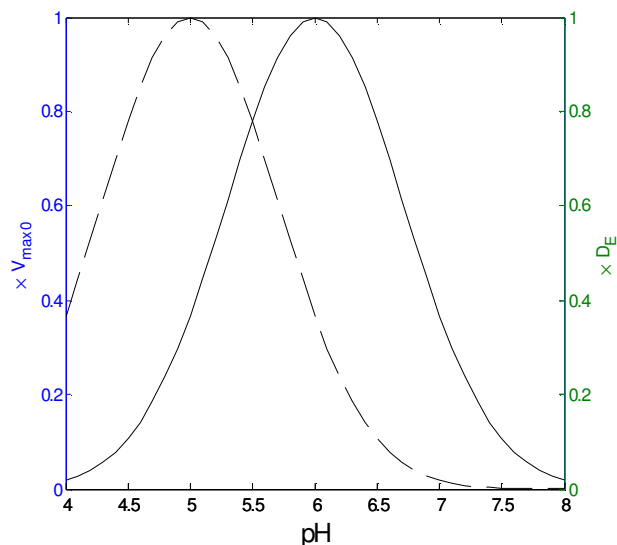
$$\begin{aligned}
S_N^{j+1} &= S_0, \quad P_N^{j+1} = 0, \\
D_{SE}(S_{Nc-1}^{j+1} - S_{Nc}^{j+1}) &= D_{SM}(S_{Nc}^{j+1} - S_{Nc+1}^{j+1}), \\
D_{PE}(P_{Nc-1}^{j+1} - P_{Nc}^{j+1}) &= D_{PM}(P_{Nc}^{j+1} - P_{Nc+1}^{j+1}).
\end{aligned}$$

Siekiant iširti kaip pagal sudarytąjį pirmąjį modelį veikia biojutiklis esant įvairioms aplinkos sąlygoms, buvo atlikta tokia skaitmeninių eksperimentų serija: I) pH, temperatūra ir membranos difuzijos koeficientai yra pastovūs, o fermentacijos greitis V_{max} monotoniškai didėja, modeliavimo tikslas yra biojutiklio jautris B (5.15) ir tiesinio atsako diapazonas S_{linear_range} (5.14); II) pH, temperatūra ir fermentacijos greitis V_{max} yra pastovūs, o membranos difuzijos koeficientai monotoniškai didėja iki susilygina su difuzijos koeficientais fermentacijos sluoksnyje (sritis 2), modeliavimo tikslai tokie patys kaip ir eksperimentui I); III) pH ir temperatūra tiesiškai didinami, V_{max} apskaičiuojamas pagal formulę (5.4), difuzijos koeficientai srityje 2 apskaičiuojami pagal formulę (5.5), o difuzijos koeficientai membranoje apskaičiuojami pagal formulę (5.6), $pH_M > 6$, modeliavimo tikslai yra biojutiklio tiesinio atsako diapazonas S_{linear_range} (5.14) ir biojutiklio atsako nusistovėjimo laikas t_{fin} (5.13);



5.4 pav. Maksimalaus fermentinio aktyvumo ir membranos laidumo priklausomybės nuo pH III) eksperimento metu. Ištinė linija – maksimalaus fermentinio aktyvumo priklausomybė nuo pH (santykiniais vienetais), brūkšninė linija – membranos laidumo (difuzijos koeficiento) priklausomybė nuo pH (santykiniais vienetais).

IV) viskas taip pat kaip III), išskyrus $pH_M < 6$;



5.5 pav. Maksimalaus fermentinio aktyvumo ir membranos laidumo priklausomybės nuo pH IV) eksperimento metu. Ištisinė linija – maksimalaus fermentinio aktyvumo priklausomybė nuo pH (santykiniais vienetais), brūkšninė linija – membranos laidumo (difuzijos koeficiento) priklausomybė nuo pH (santykiniais vienetais).

V) viskas taip kaip III), išskyrus $pH_M = 6$; VI) viskas taip pat kaip ir III, bet difuzijos koeficientai yra pastovūs pH atžvilgiu, formulė (5.8); VII) taip pat kaip ir III, tik membranos difuzijos koeficientai apskaičiuojami pagal tiesinę lygtį (5.7).

Siekiant ištirti kaip biojutiklis veikia pagal antrąjį modelį, sudaryta ir įvykdyta ši skaitmeninių eksperimentų serija: IA) eksperimento pradžioje elektrodas išjungiamas ir vėliau įjungiamas laiko momentu t_e , membrana išjungta (visiškai pralaidi) viso eksperimento metu; IIA) eksperimento pradžioje elektrodas išjungiamas ir vėliau įjungiamas laiko momentu t_e , membrana įjungiamas (apribojamas pralaidumas) nuo pat eksperimento pradžios; IIIA) eksperimento pradžioje elektrodas išjungiamas ir vėliau įjungiamas laiko momentu t_e , membrana įjungiamas (apribojamas pralaidumas) laiko momentu t_m , eksperimentas kartojamas su keliomis skirtingomis t_m reikšmėmis.

Skaitinės reikšmės naudotos skaitmeniniame eksperimente I): $S_0 = 1.46 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3}$ (biojutiklio tiesinio diapazono nustatymo eksperimente ši reikšmė buvo didinama 10% su kiekviena algoritmo iteracija, kol buvo tenkinama (5.14) sąlyga), $S_{0_initial} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3}$, $D_{SE} = D_{PE} = D_{SM} = D_{PM} = 0.9 \times 10^{-10} \text{ mol m}^{-3}$, $V_{Max} = [10^{-9}..10] \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$, $Km = 10^{-1} \text{ mol m}^{-3}$, $K_P = 10^{19} \text{ mol m}^{-3}$ (tiesiog pakankamai didelis skaičius, kad šiam eksperimentui minimizuoti reakcijos produkto inhibicija), $T = 20^\circ\text{C}$, $pH = 6$, biojutiklio storis (su membrana) $d = 2 \times 10^{-4} \text{ m}$, fermentinio sluoksnio storis $c = 1.6 \times 10^{-4} \text{ m}$, skaitinio integravimo intervalas $t_{int} = 15000 \text{ sec}$. Eksperimente II) panaudotos tos pačios reikšmės,

išskyrus: $V_{Max} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$, $D_{SM} = D_{PM} = [8.79 \times 10^{-9} \dots 0.9 \times 10^{-10}] \text{ mol m}^{-3}$. Eksperimente III) naudotos reikšmės tokios pat kaip ir I) eksperimente, išskyrus šias: $S_0 = 2.62 \times 10^{-1} \text{ mol m}^{-3}$ (nusistovėjimo laikui nustatyti), D_{SM}, D_{PM} apskaičiuota pagal (5.6) formulę, $pH_M = 7$, $V_{Max} = 1 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$, $T = [15 \dots 25]^\circ\text{C}$, $pH = [4 \dots 8]$, $K_P = 1 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$. Reikšmės naudotos eksperimente IV) tokios pat kaip ir eksperimente III), išskyrus $pH_M = 5$. Reikšmės naudotos eksperimente V) tokios pat kaip ir eksperimente III), išskyrus $pH_M = 6$. Reikšmės naudotos eksperimente VI) tokios pat kaip ir III), išskyrus tai, kad substrato ir reakcijos produkto difuzijos koeficientai membranoje apskaičiuoti pagal formulę (5.8). Eksperimento VII) reikšmės tokios pat kaip ir III), išskyrus tai, kad substrato ir reakcijos produkto difuzijos koeficientai membranoje paskaičiuoti pagal tiesinę formulę (5.7).

2 lentelė. Eksperimentuose naudotų parametrų reikšmės.

	S_0	$S_{0_initial}$ $\times 10^6$	$D_{SE} =$ D_{PE} $\times 10^{10}$	$D_{SM} =$ D_{PM} $\times 10^{10}$	V_{Max}	K_M	K_P	T $^\circ\text{C}$	pH	d $\times 10^{-4}$	c $\times 10^{-4}$	t_{int} $\times 10^{-3}$	pH_M
I	1.46×10^{-6}	1.00	0.90	0.90	$10^{-9} \dots 10$	10^{-1}	10^{19}	20	6	2.0	1.6	15	-
II	1.46×10^{-6}	1.00	87.9 ..0.9	87.9 ..0.9	1×10^{-6}	10^{-1}	10^{19}	20	6	2.0	1.6	15	-
III	2.62×10^{-1}	1.00	0.90	(5.6)	1×10^{-4}	10^{-1}	10^{-4}	15 .. 20	4.8	2.0	1.6	15	7
IV	2.62×10^{-1}	1.00	0.90	(5.6)	1×10^{-4}	10^{-1}	10^{-4}	15 .. 20	4.8	2.0	1.6	15	5
V	2.62×10^{-1}	1.00	0.90	(5.6)	1×10^{-4}	10^{-1}	10^{-4}	15 .. 20	4.8	2.0	1.6	15	6
VI	2.62×10^{-1}	1.00	0.90	(5.8)	1×10^{-4}	10^{-1}	10^{-4}	15 .. 20	4.8	2.0	1.6	15	-
VII	2.62×10^{-1}	1.00	0.90	(5.7)	1×10^{-4}	10^{-1}	10^{-4}	15 .. 20	4.8	2.0	1.6	15	-

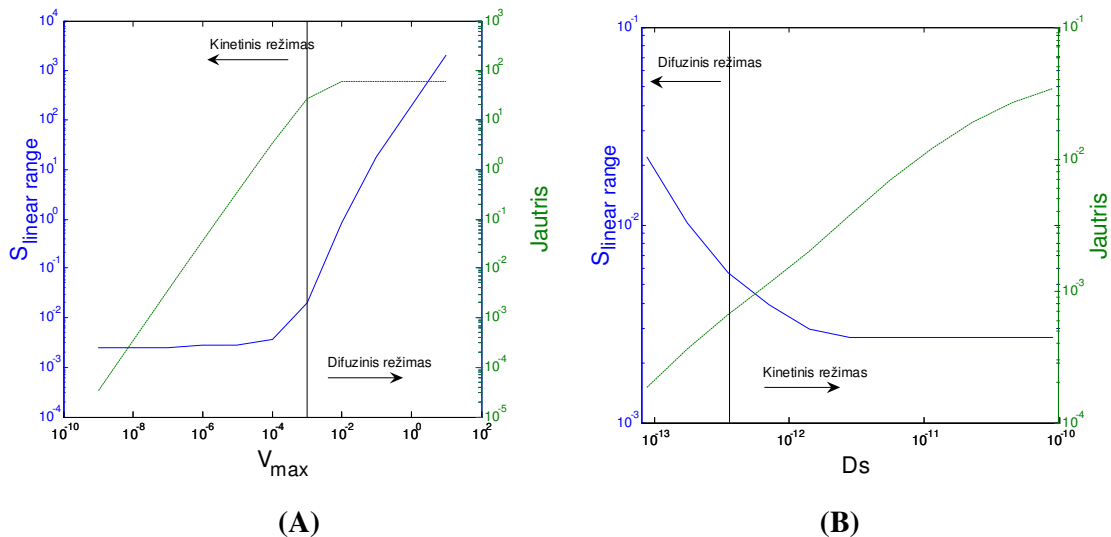
Skaitinės reikšmės naudotos skaitmeniniame eksperimentuose, vykdytuose pagal antrąjį modelį: $S_0 = 2.62 \times 10^{-1} \text{ mol m}^{-3}$, $D_{SM} = D_{PM} = 0.9 \times 10^{-10} \text{ mol m}^{-3}$, $D_{SM} = D_{PM} = 0.09 \times 10^{-10} \text{ mol m}^{-3}$, $V_{Max} = 10^{-4} \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 10^{-1} \text{ mol m}^{-3}$, $K_P = 10^{19} \text{ mol m}^{-3}$ (tiesiog pakankamai didelis skaičius, kad šiam eksperimentui minimizuoti reakcijos produkto

inhibicija), $T = 20^{\circ}\text{C}$, $pH = 6$, biojutiklio storis (su membrana) $d = 2 \times 10^{-4}$ m, fermentinio sluoksnio storis $c = 1.6 \times 10^{-4}$ m, skaitinio integravimo intervalas $t_{int} = 600$ sek, membranos įjungimo laikai: $t_m = [0, 62, 125, 250, 500]$ sek, elektrodo įjungimo laiko momentas $t_e = 500$ sek., elektrodinės reakcijos greičio konstanta $k_e = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $c_k = 2 \times 10^{-6}$ m.

Skaitiniu būdu modeliuojant biojutiklį, veikiančią pagal pirmąjį modelį, įvairūs jo parametrai buvo keičiami taip, kad biojutiklis persijunginėtų tarp kinetinio ir difuzinio režimų. Siekiant įvertinti modeliuojamo biojutiklio veikimą, vienas iš stebimų biojutiklio parametrų pasirinktas jutiklio atsako tiesiškumas. Jutiklio tiesiškumo kriterijum pasirinktas biojutiklio atsakas į substrato koncentracija ir kol tas atsakas nenukrypsta daugiau kaip per 5% nuo hipotetinės atsako tiesės, tol biojutiklis vertinamas kaip veikiantis tiesiniame režime. Kitas svarbus parametras, pasirinktas kaip biojutiklio kokybės įvertis, - tai jutiklio atsako nusistovėjimo laikas. Šis laikas įvertinamas kaip laikas, kuomet biojutiklio atsakas pasiekia 95% nuo nusistovėjusios maksimalios atsako reikšmės.

5.6 pav. pateikiamas tipiško biojutiklio veikimas kinetiniame ir difuziniame režimuose. Kai difuzijos koeficientai yra pastovūs (5.6 A pav.) ir biokatalitinio sluoksnio aktyvumas yra žemas, tuomet proceso greitį limituojantis veiksnys yra substrato fermentinė konversija. Šiuo atveju substrato koncentracija fermento aktyvaus centro aplinkoje yra tokia pati kaip išoriniame tirpale. Įvertinant tai, kad fermento K_M yra stabilus ir mes stebime tik fermento inaktyvavimą, tada biojutiklio tiesiškumas yra stabilus ir apytiksliai lygus K_M reikšmės trečdaliui. Biojutiklio jautris (atsako tiesinė dalis) didėja kartu su fermento aktyvumu.

Kai fermento aktyvumas yra didelis, tuomet proceso spartą limituojančiu veiksmu tampa substrato difuzija per biojutiklio membraną. Šiuo atveju biojutiklio jautrumas priklauso tik nuo substrato padavimo greičio. Esant stabiliai substrato koncentracijai ir biojutiklis yra stabilus. Šiuo atveju substrato koncentracija fermento aktyvumo centro aplinkoje yra žymiai mažesnė, nei išorėje esančiame tirpale. Substrato koncentracijų skirtumas didės didinant fermento aktyvumą, tad tuo pačiu didės ir jutiklio tiesinis diapazonas.



5.6 pav. A) Biojutiklio tiesinio diapazono (kairė ašis) ir jautrio (dešinė ašis) priklausomybė nuo fermento aktyvumo. Išorinės membranos difuzijos koeficientai $D_{SM} = D_{PM} = 0.9 \times 10^{-10} \text{ mol m}^{-3}$. Substrato koncentracija $S_0 = 1.46 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3}$ (kuriai skaičiuotas jautris).

B) Biojutiklio tiesinio diapazono (kairė ašis) ir jautrio (dešinė ašis) priklausomybė nuo išorinės membranos difuzijos koeficientų (laidumo). $V_{Max} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Pažymėjimai: mėlyna (ištinė) linija – tiesinio atsako diapazonas, žalia (brūkšniuota) – jautris.

Panašūs reiškiniai stebimi kuomet biojutiklis veikia su keičiamo laidumo išorine membrana (5.6 B pav.). Esant aukštai difuzijos koeficiento D_s reikšmei membranos laidumas yra didelis, tad proceso spartą limituojantis veiksnys yra fermento aktyvumas. Esant stabilioms V_{max} ir K_M reikšmėms, tiek jutiklio tiesinis diapazonas, tiek jautris yra stabilūs. Esant mažam difuzijos koeficientui sensorius persijungia į difuzinį režimą. Šiame režime jautris mažėja, nes substrato koncentracija sensoriuje bus mažesnė nei išorėje. Tad mažinant difuzijos koeficientą mažėja substrato galimybės pasiekti fermento aktyvųjį centrą, tad mažėja jautris, bet tuo pačiu didėja tiesinis diapazonas, kas ir matoma 5.6 B pav.

Šie duomenys rodo, kad pasirinkti biojutiklio parametrai yra korektiški ir gali būti naudojami tolimesniuose skaičiavimuose. Skaitinio modeliavimo būdu gautos kreivės artimos eksperimentiniams duomenims, kurie buvo gauti tiriant elektrocheminius biojutiklius su skirtingo laidumo membranomis [Laurin89]. Skirtingo laidumo membranos gautos acitilinant celiuliozės membranas.

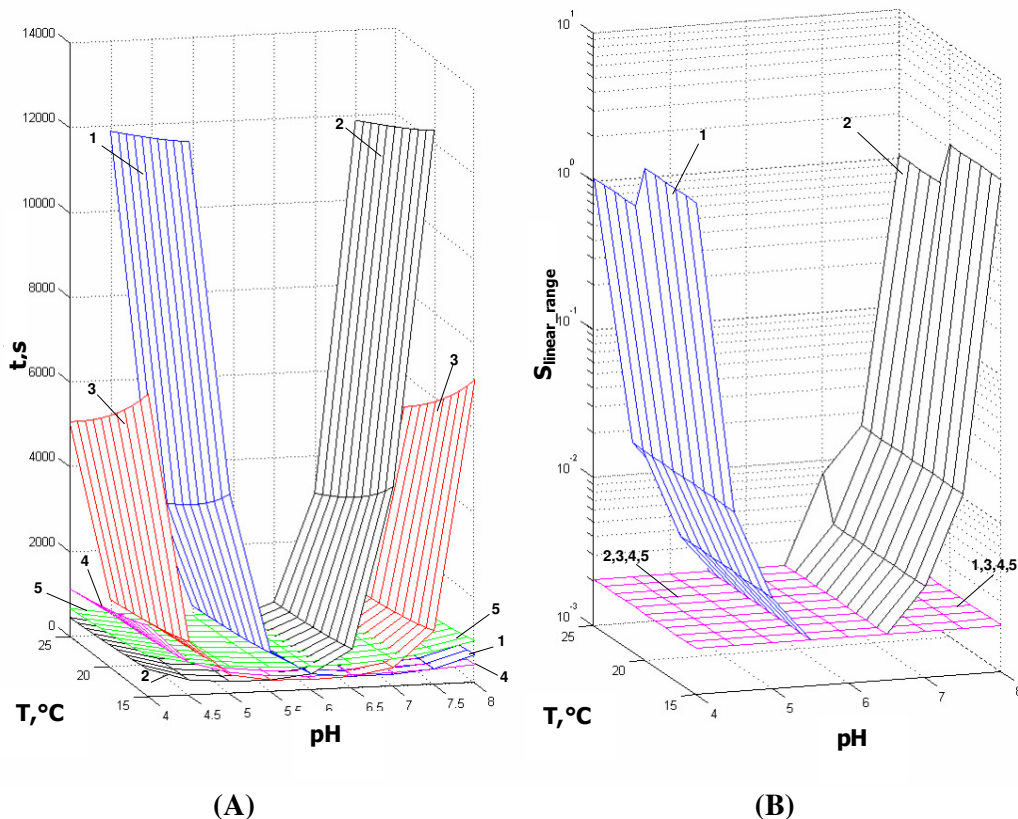
Įprasta, kad su laiku fermento aktyvumas krenta, o išorinės membranos užsikemša išorėje esančiais proteinais, lipidais, ląstelėmis ir pan. Paprastai tas nutinka ilgai eksploatuojant jutiklį. Tarkime, kad membranos laidumas ir fermento aktyvumas gali būti valdomi neišardant biojutiklio. Tokia savybė būtų labai naudinga siekiant valdyti

jutiklio aktyvumą arba norint panaudoti jutiklį kaip jungiklį. Tokiam biojutiklio valdymui labai tinka terpės pH faktorius. Dalies dirbtinių membranų laidumas substratui priklauso nuo terpės pH. Šį reiškinį galima paaiškinti keliais būdais. Kai kurios membranos (ypač baltyminės kilmės) turi jonogeninių grupių, kurios suteikia krūvį membranai. Krūvis gali paveikti membranos susitraukimą, tad keičiant pH gali keistis membranos laidumas bei storis. Iš kitos pusės, krūvį turinčio substrato difuzija per membraną taip pat gali būti reguliuojamas keičiant pH. Buvo atliktas kelių tokių procesų, taip pat atsižvelgiant į skirtingą temperatūrinį jautrumą esant difuziniam ir kinetiniam jutiklio veikimo režimams, skaitinis modeliavimas. Šio modeliavimo rezultatai pateikiami 5.7 pav. Biojutiklio parametrai parinkti taip, kad kai membranos laidumas nepriklauso nuo pH, tuomet biojutiklis veikia kinetiniame režime. Tačiau esant aukštomis arba žemoms pH reikšmėms, dėl kritusio fermento aktyvumo, biojutiklis persijungia į difuzinį režimą. Jutiklio atsako nusistovėjimo laikas labiausiai jautrus būtent šitam persijungimui ir 5.7 pav. kreivė 5 puikiai iliustruoja režimų ribas. Biojutiklio tiesinio atsako diapazonas pavaizduotas logaritminiu masteliu (5.7 B pav.) nėra toks geras parametras režimų riboms įvertinti, bet iš kitos pusės puikiai iliustruoja gilų difuzinį režimą.

Kitaip nei fermentams, membranoms paprastai nėra būdingas stipriai išreikštas laidumo pH optimumas ir jų laidumas kinta plačiame pH intervale. Tarkime, kad membranos laidumas tiesiškai priklauso nuo pH intervale pH 4-pH 8 ir padidėja 9 kartus. Tai yra gana tipiška, žinant, kad membranos gali susitraukinėti priklausomai nuo pH (5.7 pav., kreivė 4). Esant aukštam pH (pH 8) membranos laidumas yra didelis, tačiau fermento aktyvumas yra labai mažas (fermento aktyvumo optimumas ties pH 6), tad substrato difuzijos greitis yra lygus substrato suvartojimo greičiui, tad faktiškai jutikliai veikia kinetiniame arba ribiniame režime. Prie pH 6 fermento aktyvumas yra maksimalus ir jutiklis veikia giliai kinetiniame režime, atsakas yra greitas, o tiesinio atsako diapazonas yra siauras (5.7 B pav.). Esant žemesnėms pH reikšmėms tiek fermentinis aktyvumas, tiek membranos laidumas yra maži ir biojutiklis veikia ribiniame arba difuziniame režime.

Tarkime, kad membranos laidumas priklauso nuo pH taip pat kaip ir fermento aktyvumas. Tokia situacija gali susidaryti tuomet, kai substrato (ar reakcijos produkto) ir membranos krūvis priklauso nuo pH. Tegul abu procesai vyksta pagal tą patį dėsnį ir tuo

atveju kai fermento ir membranos optimumas yra ties tuo pačiu pH (pH 6). Tai reiškia, kad fermento ir membranos izoelektrinis taškas yra tas pats – pH 6. Tuo atveju stebimas aiškiai išreikštas difuzinis režimas (tą galima nustatyti pagal tai, kad padidėjęs atsako laikas (5.7 A pav., kreivė 3)) esant mažam ar dideliam pH, o gana plačiam intervale (ties pH 6) biojutiklis veikia kinetiniame režime.



5.7 pav. (A) Jutiklio atsako laiko priklausomybė nuo temperatūros (T) ir pH. (B) jutiklio tiesinio atsako diapazono (logaritinė skalė) priklausomybė nuo temperatūros ir pH.

Fermento optimumas $pH_v=6$.

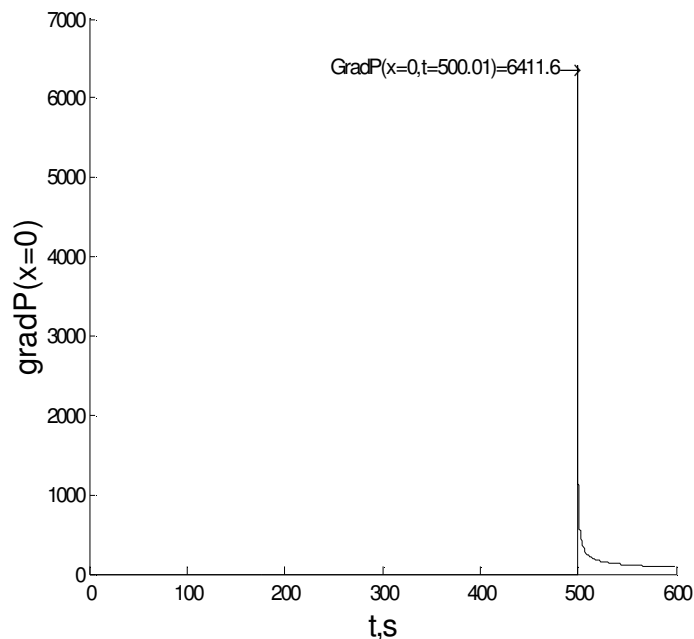
- 1 (mėlyna) – membranos laidumas priklauso nuo pH, optimumas ties pH 7 ($pH_M=7$, formulė (5.6)).
- 2 (juoda) – membranos laidumas priklauso nuo pH, optimumas ties pH 5 ($pH_M=5$, formulė (5.6)).
- 3 (raudona) – membranos laidumas priklauso nuo pH, optimumas ties pH 6 ($pH_M=6$, formulė (5.6)).
- 4 (violetinė) – membranos laidumas tiesiškai priklauso nuo pH (D_{SM}, D_{PM} padidėja 9 kartus intervale pH 4 – pH 8, formulė (5.7)).
- 5 (žalia) – membranos laidumas nepriklauso nuo pH (formulė (5.8)).

Tačiau difuzinis režimas nėra labai gilus, kas puikiai matoma iš santykinai mažo tiesinio atsako diapazono (5.7 B pav., kreivės 3-5).

Jei fermento aktyvumo ir membranos laidumo pH optimumai nesutampa, tuomet matome ryškia šio reiškinio įtaką jutiklio tiesinio atsako diapazonui. Kai membranos laidumo pH optimumas yra didesnis už fermento aktyvumo pH optimumą (5.7 pav.,

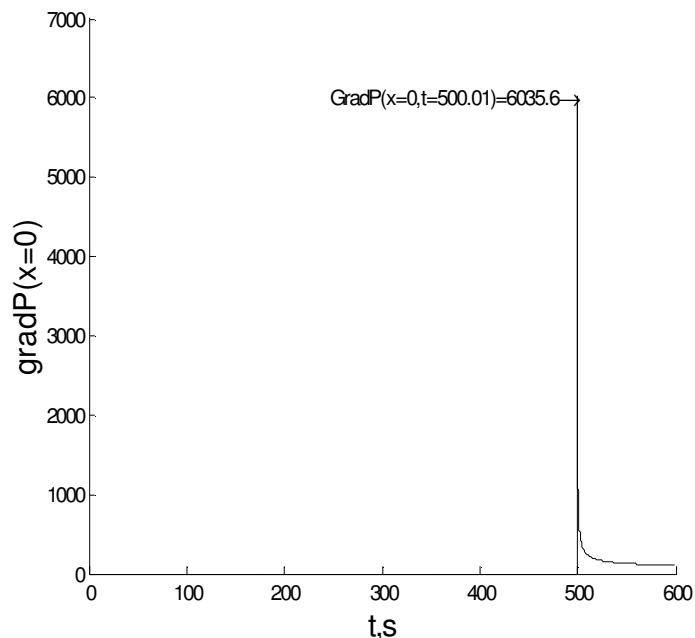
kreivė 1), tuomet membranos laidumo maksimumas yra pasislinkęs į didesnio pH zoną, tuo pačiu pasislenka ir kinetinio režimo zona. 5.7 pav. matomas tik kairysis kreivės sparnas. Jei membranos laidumo optimumo pH yra mažesnis už fermento aktyvumo maksimumą (5.7 pav., kreivė 2), tuomet matome tą patį vaizdą, tik kreivė yra pasislinkusi į mažesnio pH zoną, tad matomas tik dešinysis kreivės sparnas. Jutikliui pereinant į vis gilesnį difuzinį režimą atsako laikas padidėja keliais kartais, tačiau jutiklio tiesinio atsako diapazonas išsiplečia keliomis eilėmis.

Jutikliui veikiant elektrocheminio stripingo režimu momentinis srovės stiprumas keliomis eilėmis didesnis už tradicinio biojutiklio, nagrinėto aukščiau, atsaką. Tokio jutiklio atsako grafikas, kai elektrodas įjungiamas praėjus 500 sek. nuo eksperimento pradžios, o membrana neįjungiamą visai, pateikiamas 5.8 pav. Siekiant sukurti efektyvią programinę įrangą šio tipo uždavinio modeliavimui, buvo atlikta optimizacija, parenkant smulkų laiko integravimo žingsnį tik trumpam laiko momentui prieš įjungiant elektrodą/membraną ir grįžtant prie stambesnio laiko žingsnio po neilgo laiko tarpo. Ši optimizacija leido išlaikyti gerą balansą tarp uždavinio skaičiavimo tikslumo bei stabilumo ir skaičiavimo greičio.



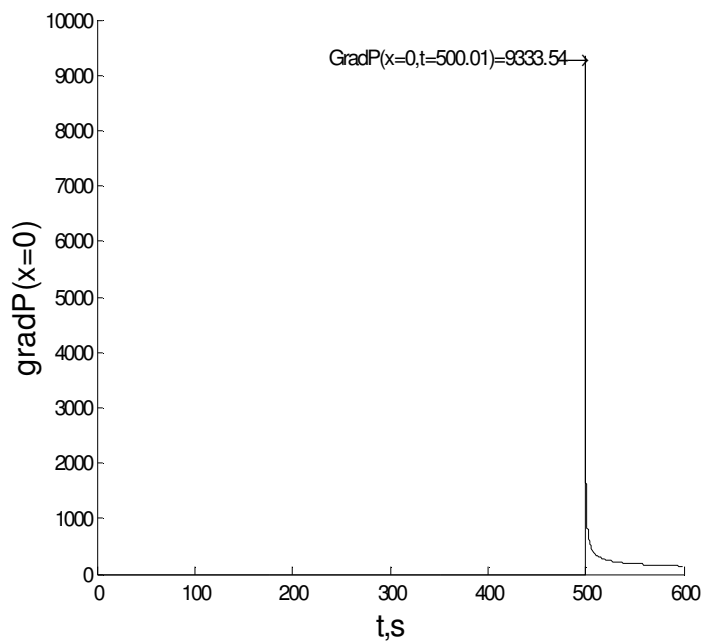
5.8 pav. Biojutiklio atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime, kai membrana išjungta viso skaitinio eksperimento metu.

Įjungus membraną nuo pat skaitinio eksperimento pradžios gaunamas jutiklio atsako maksimumas mažesnis nei eksperimente, kai membrana visai neįjungiamą (5.9 pav.).



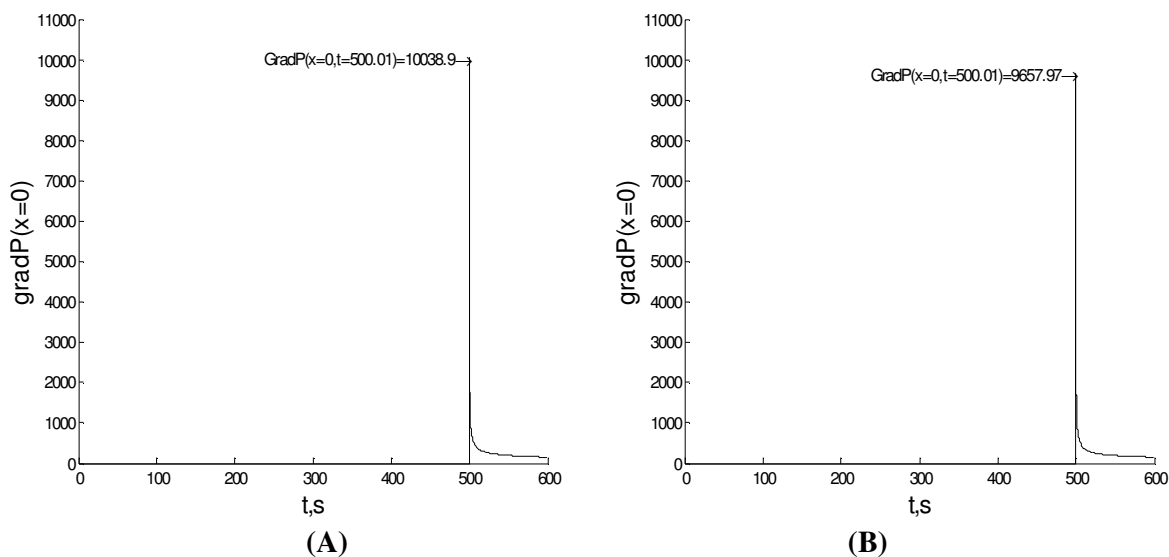
5.9 pav. Biojutiklio atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime, kai membrana įjungama skaitinio eksperimento pradžioje.

Tačiau truputį pavėlinus membranos įjungimo momentą ($t_m = 62$ sek.), gaunamas rezultatas pastebimai geresnis, maksimali jutiklio generuojama srovė sustiprėja daugiau kaip 40% (5.10 pav.).



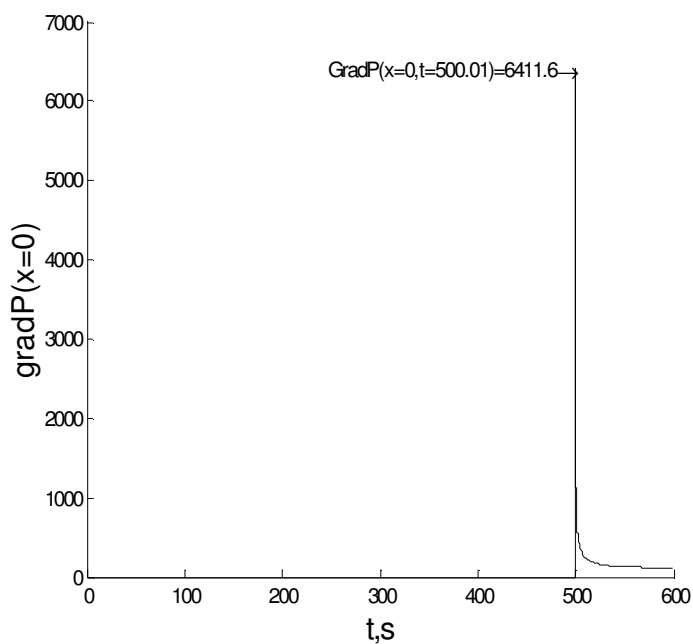
5.10 pav. Biojutiklio atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime, kai membrana įjungama nuo skaitinio eksperimento pradžios praėjus 62 sek.

Toliau vėlinant membranos įjungimo laiką rezultatas gerėja ($t_m = 125$ sek.), o vėliau ima mažėti ($t_m = 240$ sek.):



5.11 pav. Biojutiklio atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime, kai membrana įjungiamą nuo skaitinio eksperimento pradžios praėjus 125 sek. (A) bei 250 sek. (B).

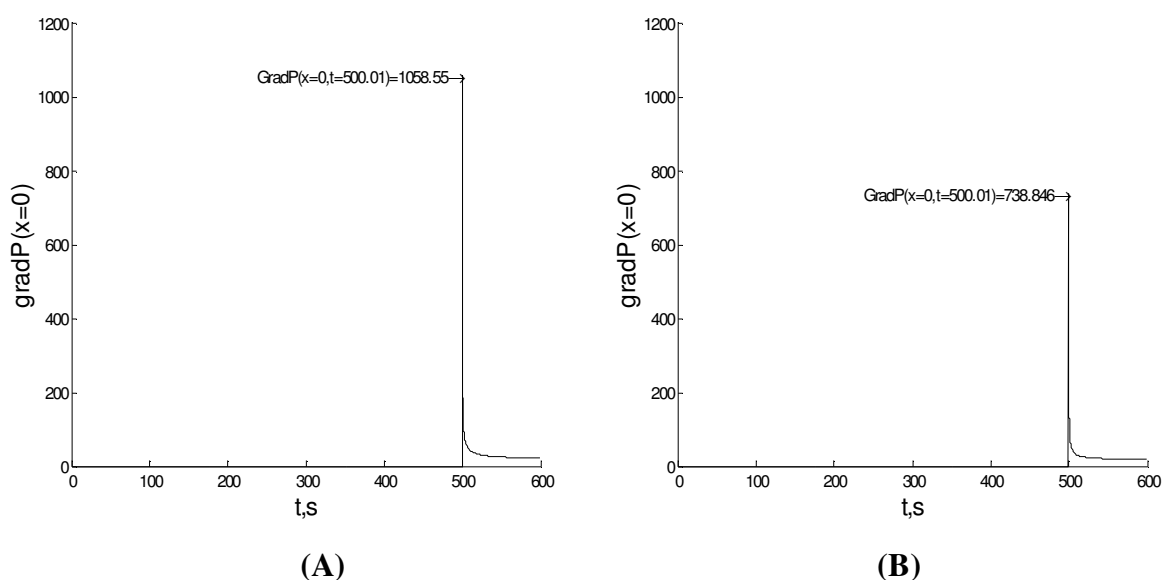
Membraną įjungiant tuo pačiu momentu kaip ir elektrodą biojutiklio atsakas būna labai panašus į tą, kai membrana išvis neįjungiamą:



5.12 pav. atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime, kai membrana įjungiamą tuo pačiu metu kaip ir elektrodas.

Biojutikliui veikiant elektrocheminio stripingo režime membranos įtaka jutiklio atsakui panaši į tą, kuri stebimą klasikinio biojutiklio atveju, kuris aprašytas pirmuoju matematiniu modeliu. T.y. membranos poveikis yra dvejopas: sulaiko reakcijos produkto nutekėjimą ir tuo pačiu sumažina substrato įtekėjimą į jutiklio veikliąją sritį. Reakcijos

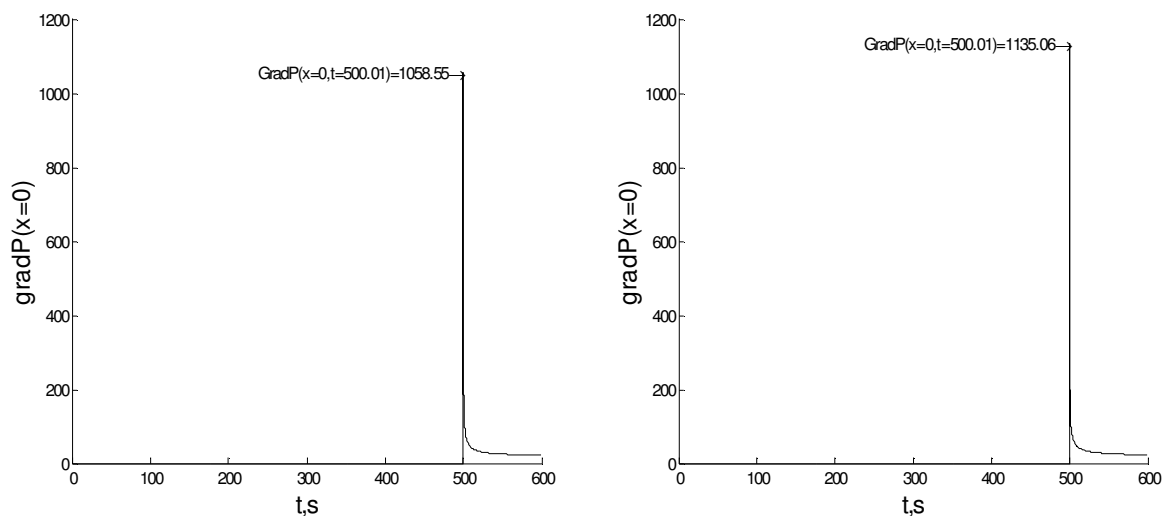
produkto nutekėjimo sulaikymas stiprina biojutiklio atsaką, nes reakcijos produkto oksidacijos/redukcijos kiekis per laiko vienetą tiesiogiai proporcingas produkto koncentracijai ant elektrodo paviršiaus. Antrasis membranos poveikis – substrato neįleidimas į aktyviąją zoną, reiškia, kad mažėja ir reakcijos produkto gamyba bei koncentracija ant elektrodo paviršiaus, nes būtent substratas, veikiant fermentui, yra verčiamas į produktą. Šiems poveikiams konkuruojant membrana gali daryti tiek teigiamą įtaką jutiklio generuojamo signalo stiprumui tiek neigiamą, tas ir matoma iš aukščiau aprašytų skaitinių eksperimentų rezultatų. Jei membrana įjungiamą laiku, t.y. jutiklio aktyvioje zonoje susikaupus pakankamai substrato ir dar nepagaminus (bei neištekėjus) didžiosios reakcijos produkto dalies, tuomet jutiklio atsakas būna iki 40% stipresnis nei atveju kai membrana nenaudojama. Tačiau nenutekant reakcijos produktui jo koncentracija gali tapti pakankamai didelė ir produktas gali pradėti inhibuoti fermentinę reakciją ir tuo pačiu stabdyti produkto tolimesnę gamybą. Šiam procesui patikrinti atlikta papildoma skaitinių eksperimentų serija, kuomet inhibicijos konstanta $K_p = 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ yra pakankamai maža (t.y. reakcijos inhibicija prasideda esant mažai produkto koncentracijai) ir palyginta kai membrana įjungiamą laiko momentu $t_m = 0$ sek. bei neįjungiamą išvis:



5.13 pav. Biojutiklio atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime esant fermentinės reakcijos inhibicijai produktu, kai membrana įjungiamą nuo pat skaitinio eksperimento pradžios (A) bei neįjungiamą visai (B).

Kaip ir tikėtasi įvedus fermentinės reakcijos inhibiciją reakcijos produktu biojutiklio generuojamo signalo stiprumas krito visa eile. Pastebėtina, kad šiuo atveju, palyginus

kaip veiktų jutiklis turintis membraną su jutikliu neturinčiu membranoms, matoma, kad membranos efektas yra žymiai ryškesnis, nei aukščiau išnagrinėtu atveju, kuomet neatsižvelgiama į inhibiciją, t.y signalas sustiprėja daugiau kaip 40%. Tačiau palyginus jutiklio, turinčio valdomą membraną ir turinčio statinę membraną, generuojamą signalą, matoma, kad valdomos membranos pranašumas yra minimalus:



5.14 pav. Biojutiklio atsakas jam veikiant elektrocheminio stripingo režime esant fermentinės reakcijos inhibicijai produktu, kai membrana statinė (A) bei įjungiamą nuo skaitinio eksperimento pradžios praėjus 62 sek. (B).

Tokiam biojutikliui fermentinės reakcijos inhibicija reakcijos produktu nėra palanki, todėl elektrocheminio stripingo režimu dirbantis biojutiklis su valdoma laike membrana praktikoje būtų itin tinkamas labai mažoms medžiagų koncentracijoms greitai išmatuoti.

5.5 Išvados

1. Pasiūlytas biojutiklio su išorine membrana matematinis modelis, atsižvelgiantis į terpės pH bei temperatūrą, leido identifikuoti kokius biojutiklio parametrus rodo kada biojutiklis pereina iš vieno režimo į kitą.
2. Išnagrinėti keli specialūs atvejai, kai fermento aktyvumas ir membranos laidumas priklauso nuo pH, parodė, kad jutiklio atsako laikas jautresniam jutiklio darbo režimui, ir ypač jautresniam ribinėje srityje.
3. Giliame difuziniame režime jutiklio tiesinio atsako diapazonas gali būti išplėstas keliomis eilėmis.

4. Jutiklis gali būti lengvai perjungtas į gilų difuzinį režimą tuomet, kai membranos laidumas netiesiškai priklauso nuo pH ir membranos maksimalaus laidumo taškas skiriasi nuo fermentinio aktyvumo maksimumo taško.
5. Pasiūlytas, sumodeliuotas ir išnagrinėtas biojutiklis turintis valdomą laiką membraną ir veikiantis elektrocheminio stripingo režime, parodė, kad valdomos laike membranos teigiamas efektas biojutiklio generuojamam signalui ryškiausias tuomet kai reakcijos produktas silpnai inhibuoja fermentinę reakciją.

6 Išvados

Remiantis trijų struktūriškai inovatyvių biojutiklių modeliavimo rezultatais galima išskirti tokias svarbiausias išvadas:

1. Taikant paprastą vieno difuzijos sluoksnio modelį [Verger72] galima gauti gerą bioelektroanalitinės sistemos, skirtos *Thermomyces lanuginosus* lipazės aktyvumo nustatymui, modeliavimo ir eksperimento rezultatų sutapimą, tik modelį papildžius kinetine substrato lygtimi. Tuo pačiu, kaip papildomas modeliavimo rezultatas, gaunamas fermentinės reakcijos greičio konstantos įvertis.
2. Pagal lipazės aktyvumo nustatymo biojutiklio su substratu padengtu elektrodu fizinio eksperimento analizės rezultatus, matoma, kad substrato koncentracijos mažėjimas pasireiškia dviem skirtingomis priklausomybėmis nuo laiko: pirma – eksponentinė, antra – t^{-1} tipo. Tas rodo, kad (6.7) lygčių sistemos dS/dt lygtyje konkuruoja du nariai: pirmos ir antros eilės (substrato koncentracijos atžvilgiu). Geras eksperimento ir modeliavimo duomenų sutapimas galimas atsižvelgiant į abu šiuos narius.
3. Jutiklis su valdomo laidumo membrana gali būti lengvai perjungtas į gilų difuzinį režimą tuomet, kai membranos laidumas netiesiškai priklauso nuo pH ir membranos maksimalaus laidumo taškas skiriasi nuo fermentinio aktyvumo maksimumo taško.
4. Biojutiklis turintis valdomą laike membraną ir veikiantis elektrocheminio stripingo režime, turėtų pranašumą prieš analogišku režimu veikiantį jutiklį su statine membrana, jei membranos įjungimo laikas būtų parinktas tinkamai ir reakcijos produktas silpnai inhibuotų fermentinę reakciją.

7 Literatūra

- [Bard01] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, second ed., Wiley, New York, 2001.
- [Baron02] R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys, Modelling dynamics of amperometric biosensors in batch and flow injection analysis. *J. Math. Chem.* 32, 225-237, 2002.
- [Baron03] R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys, and M. Sapagovas, Modelling of amperometric biosensors with rough surface of the enzyme membrane. *J. Math. Chem.*, 34, 227, 2003.
- [Baron04] R. Baronas, J. Kulys, F. Ivanauskas, Modelling amperometric enzyme electrode with substrate cyclic conversion. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 915, 2004.
- [Beiss00] F. Beisson, A. Tiss, C. Riviere, R. Verger, Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 133-153, 2000.
- [Bilit00] U. Bilitewski, A. P. F. Turner. *Biosensors for Environmental Monitoring*, Taylor & Francis, 2000.
- [Blum91] L. J. Blum, P. R. Coulet, *Biosensor Principles and Applications*, CRC Press, 1991.
- [Born99] U.T. Bornscheuerand, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- [Briggs25] G. E. Briggs, J. B. S. Haldane, A note on the kinetics of enzyme action, *Biochem. J.*, 19, 1925.
- [Buck90] R. P. Buck, *Biosensor Technology: Fundamentals and Applications*, CRC Press, 1990.

- [Buerk95] D. G. Buerk, *Biosensors: Theory and Applications*, CRC Press, 1995.
- [Clark62] L. C. Jr. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. NY Acad. Sci.*, 102:29.
- [Coop04] J. Cooper, A. E. G. Cass, *Biosensors: A Practical Approach*, Oxford University Press, 2004.
- [Crank47] J. Crank, E. Nicolson, *A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat-conduction type*, *Proc. Camb. Phil. Soc.*, 43, 1947.
- [Čiegis03] R. Čiegis, *Diferencialinių lygčių skaitiniai sprendimo metodai*, Technika, Vilnius, 2003.
- [deVries06] G. de Vries, T. Hillen, M. Lewis, B. Schonfisch, J. Muller, *A Course in Mathematical Biology: Quantitative Modeling with Mathematical and Computational Methods*, SIAM, 2006
- [Frey07] P. A. Frey, A. D. Hegeman, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, Oxford, 2007.
- [Guilb69] G. G. Guilbault, J. Montalvo, A Urea Specific Enzyme Electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 91, 2164. 1969.
- [Houde04] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, Lipases and their industrial applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118(1–3), pp. 155–170, 2004.
- [Ignat05] I. Ignatjev, G. Valinčius, I. Švedaitė, E. Gaidamauskas, M. Kažemėkaitė, V. Razumas, A. Svendsen, Direct amperometric determination of lipase activity, *Anal. Biochem.*, 344(2), pp. 275–277, 2005.
- [Kanap92] J.J. Kanapienene, A.A. Dedinaite and V. Laurinavicius, *Sens. & Actuators B*. 10, 37, 1992.
- [Keller88] F. Keller, C. Emde, A. Schwarz, *Exponential function for calculating saturable enzyme kinetics*, *Clinical Chemistry*, 34, 1998.
- [Kulys86] J. Kulys, V.V. Sorochinski and R.A. Vidziunaite, Transient response

- of bienzyme electrodes. *Biosensors*, 2, 135, 1986.
- [Laurin04] V. Laurinavicius, J. Razumiene, A. Ramanavicius, A.D. Ryabov, *Biosens. Bioelectron.* 20, 1217, 2004.
- [Laurin89] V.A. Laurinavicius, J.J. Kulys, V.V. Gureviciene and K.J. Simonavicius, *Biomed. Biochim. Acta.* 48, 905, 1989.
- [Mell75] L.D. Mell and J.T. Maloy, A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the glucose oxidase system. *Anal. Chem.*, 47, 299, 1975.
- [Mich13] L. Michaelis, M. Menten, Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem. Z.*, 49, 1913.
- [Olsen06] Olsen S., Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions, *Thermochim. Acta*, 448, 2006
- [Puida07] M. Puida, F. Ivanauskas, I. Ignatjev, G. Valinčius, V. Razumas, Computational modeling of the amperometric bioanalytical system for lipase activity assay: a time-dependent response. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 12 (3), 245–251, 2007.
- [Puida08] M. Puida, F. Ivanauskas, I. Ignatjev, G. Valincius, V. Razumas, Computational modeling of the electrochemical system of lipase activity detection. *Sensors*, 8 (6), 2008.
- [Samar01] A. A. Samarskii, *The Theory of Difference Schemes*, Marcel Dekker, New York-Basel, 2001.
- [Schell92] F. Scheller, F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier, 1992.
- [Schell97] F.W. Scheller, F. Schubert and J Fedrowitz, *Frontiers in Biosensorics*, Verlag, Basel, 1997.
- [Schmi98] R. D. Schmid, R. Verger, Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(12), pp. 1608–1633, 1998.
- [Schne97] S. Schnell, C. Mendoza, *Closed Form Solution for Time-dependent*

Enzyme Kinetics, Journal of Theoretical Biology, 187(2), 1997

- [Schul97] T. Schulmeister, J. Rose and F. Scheller, Mathematical modelling of exponential amplification in membrane-based enzyme sensors. *Biosens. Bioelectron.* 12, 1021, 1997.
- [Shimi88] T. Shimidzu, A. Ohtani, K. Honda, Charge-previous termcontrollablenext term poly pyrrole/poly electrolyte composite previous termmembranes.next term Part III. Electrochemical deionization system constructed by anion-exchangeable and cation-exchangeable polypyrrole electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 251, 1988.
- [Tran93] M. C. Tran, S. A. Jackson, *Biosensors*, Springer, 1993.
- [Turner87] A.P.F. Turner, I. Karube and G.S. Wilson, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1987.
- [Valin05] G. Valincius, I. Ignatjev, G. Niaura, M. Kažemėkaitė, Z. Talakaitė, V. Razumas, A. Svendsen, Electrochemical method for the detection of lipase activity. *Anal. Chem.* 2005, 77 (8), 2632-2636.
- [Verger72] R. Verger, M. C. E. Mieras, G. H. De Haas, Action of phospholipase A at interfaces, *J. Biol. Sci.*, 248(11), pp. 4023–4034, 1972.R. Verger, M. C. E. Mieras, G. H. De Haas, Action of phospholipase A at interfaces, *J. Biol. Sci.*, 248(11), pp. 4023–4034, 1972.
- [Yang06] G. Z. Yang, M. Yacoub, *Body Sensor Networks*, Birkhäuser, 2006
- [Yu06] B. Yu, N. Long, Y. Moussy, F. Moussy, A long-term flexible minimally-invasive implantable glucose biosensor based on an epoxy-enhanced polyurethane membrane, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (12), 2006.

Padėka

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui prof. habil. dr. Feliksui Ivanauskui už visokeriopą pagalbą ruošiant šią disertaciją.

Taip pat norėčiau padėkoti prof. habil. dr. Valdemarui Razumui už supažindinimą su biojutiklių sandaros subtilybėmis, suteiktus duomenis bei konsultacijas vykdant tyrimus.

Dėkoju prof. habil. dr. Valdui Laurinavičiui už mokslines diskusijas bei konsultacijas vykdant tyrimus.