

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MATEMATIKOS IR INFORMATIKOS FAKULTETAS
PROGRAMŲ SISTEMŲ KATEDRA

**Amperometrinio biojutiklio su chemiškai modifikuotu
elektrodu vykstančių reakcijos-difuzijos procesų
kompiuterinis modeliavimas ir tyrimas**

**Modeling and exploration of reaction-diffusion processes in
amperometric biosensor with chemically modified electrode**

Magistro baigiamasis darbas

Atliko:

Sergej Poltorak

(parašas)

Darbo vadovas:

prof. dr. Romas Baronas

(parašas)

Recenzentas:

Vytautas Ašeris

(parašas)

Vilnius – 2011

SANTRAUKA

Magistrinio darbo tikslas yra sukurti kompiuterinį amperometrinių biojutiklio su chemiškai modifikuotu elektrodu modelį ir ištirti jo savybes. Modelis papildo egzistuojančius modelius mediatoriaus sluoksniu. Mediatoriaus koncentracija sluoksnyje nėra konstanta, tirpsta biojutiklio veikimo eigoje.

Darbe apžvelgiama medžiaga apie amperometrinius biojutiklius, biojutiklio modeliavimo aspektus, mediatoriaus tirpimo priežastis ir veikimo principus. Vėliau suformuluojamas pasirinkto biojutiklio matematinis modelis. Matematiniam modelyje pateikiamos diferencialinės lygtys su dalinėmis išvestinėmis, aprašančios biojutiklyje vykstančias reakcijas ir difuzijas. Pagal matematinį modelį yra sudaromas skaitinis modelis. Pagal žinomus analizinius sprendimus modelis yra ratifikuojamas.

Remiantis skaitiniu modeliu buvo sukurta programinė įranga įgyvendinanti diferencialinių lygčių su dalinėmis išvestinėmis sprendimo metodą (išreikštinę baigtinių skirtumų schemą) ir simuliuojanti biojutiklio veikimą. Programinė įranga yra karkasas, leidžiantis nagrinėti sumodeliuoto biojutiklio savybes bei charakteristikas. Buvo ištirtos substrato ir mediatoriaus koncentracijų, mediatoriaus, fermento, difuzijos sluoksnių, bei mediatoriaus sluoksniu difuzijos koeficiento įtakos biojutiklio generuojamos srovės tankiui. Be to gauti dviejų modelių palyginimo rezultatai parodė sumodeliuoto biojutiklio modelio skirtumus ir panaudojimo prasmingumą.

Raktiniai žodžiai: biojutikliai, amperometriniai biojutikliai, chemiškai modifikuotas elektrodas, skaitinis modelis, matematinis modelis, mediatorius, mediatoriaus tirpimas, išreikštinė baigtinių skirtumų schema, bedimensis modelis, fermentai, kinetika, biojutiklio savybės.

SUMMARY

The aim of master thesis is to model amperometric biosensor with chemically modified electrode, introducing into existing model one more additional mediator layer. Mediator concentration inside the layer is changing during the biosensor action.

Master thesis content consists of: enzyme kinetics introduction, biosensor modeling peculiarities exploration, chemically modified electrode information, biosensor action aspects description. Following chapter concentrates on mathematical modeling of particular biosensor type. Mathematical model represents differential equations with partial derivatives describing the reactions and diffusion inside biosensor. Next, numerical model is formulated. The explicit method technique was used.

Based on numerical model software was made and validated. Using software the biosensor action was simulated in order to investigate biosensor properties and characteristics. In this work several properties were analyzed: impact of substrate and mediator concentrations, size of mediator, enzyme and diffusion layers, mediator layer diffusion coefficient on biosensor response. This model was compared with previous introduced model and it was shown that there is some difference between them and there is a reason to use new model.

Keywords: biosensor, mathematical model, numerical model, explicit method, amperometric biosensor, chemically modified electrode, mediator, solution, diffusion, leaching, dimensionless model, enzyme, kinetics, biosensor properties.

TURINYS

ĮVADAS	5
1. BIOJUTIKLIO MODELIAVIMAS.....	8
1.1. Biojutiklio struktūra	8
1.2. Fermentų kinetika.....	8
1.2.1. Fermento-katalizuota reakcija	10
1.3. Amperometriniai biojutikliai	12
1.3.1. Chemiškai modifikuotas elektrodas.....	13
1.4. Biojutiklio veikimas	16
1.5. Matematinis modeliavimas	17
1.5.1. Diferencialinės lygtys dalinėmis išvestinėmis	17
1.5.2. Analizinis sprendinys.....	19
1.5.3. Skaitiniai metodai	19
1.5.4. Sprendinio patvirtinimas.....	21
2. AMPEROMETRINIS BIOJUTIKLIS SU CHEMIŠKAI MODIFIKUOTU ELEKTRODU ..	24
2.1. Matematinis modelis	26
2.1.1. Pagrindinės reakcijos-difuzijos lygtys	26
2.1.2. Pradinės sąlygos	28
2.1.3. Kraštinės sąlygos	29
2.1.4. Biojutiklio atsakas	30
2.2. Bedimensinis modelis.....	31
2.3. Skaitinis modelis	33
2.3.1. Kraštinių sąlygų aproksimavimas.....	33
2.3.2. Pradinių sąlygų aproksimavimas	34
2.3.3. Pagrindinių lygčių aproksimavimas	34
2.3.4. Biojutiklio atsako laikas.....	35
2.3.5. Sprendinio stabilumas.....	36
2.3.6. Sprendinio patvirtinimas.....	36
3. AMPEROMETRINIO BIOJUTIKLIO SAVYBIŲ TYRIMAS.....	41
3.1. Medžiagų koncentracijų įtaka	41
3.1.1. Mediatoriaus koncentracijos įtaka	42
3.1.2. Substrato koncentracijos įtaka.....	43
3.2. Biojutiklio sluoksnių storių įtaka	44
3.2.1. Mediatoriaus sluoksnio storio įtaka.....	45
3.2.2. Fermento sluoksnio storio įtaka	47
3.2.3. Difuzijos sluoksnio storio įtaka	49
3.3. Mediatoriaus sluoksnio mediatoriaus difuzijos koeficiento įtaka	50
3.4. Modelių palyginimas	51
REZULTATAI IR IŠVADOS.....	55
ŠALTINIAI.....	57
PRIEDAI.....	59
1 priedas. Modelių palyginimas pagal generuojamų srovių tankius	59

ĮVADAS

Bioelektronika – sparčiai besivystanti sritis, vienijanti chemiją, biochemiją ir fiziką. Tai yra elektronikos ir biochemijos sričių žinių apjungimas. Pasiekimai biochemijos ir enzimologijos srityse davė pradžią naujos analitinės chemijos krypties vystymuisi – nereagentinių metodų analizei. Analizė paremta įvairių biocheminių jutiklių naudojimu. Biojutiklis, apjungiantis biologinę atranką su šiuolaikinės mikroelektronikos skaičiavimo jėga, tampa galingu analitiniu įrankiu su plačiu pritaikymu medicinoje, aplinkos diagnostikoje, maisto ir apdorojimo pramonėse [Lyo06, 1765].

Šiuo metu žinomos trys biojutiklių kūrimo kartos [CB04]. Šiais laikais paplito biojutikliai su elektrocheminiu keitikliu, kuris generuoja elektros srovę elektrodo paviršiuje. Srovė atsiranda nustatomos medžiagos pavertimo į produktą reakcijos pagalba [Буд97, 27]. Darbe nagrinėjamas antros kartos konstrukcijos biojutiklis, kuriame naudojamas elektronų pernešimo tarpininkas, mediatorius, siekiant pagerinti biojutiklio atsaką.

Cheminės reakcijos stebėjimui dažnai naudojami katalizatoriai. Biojutikliuose kaip reakcijos katalizatoriai dažniausiai naudojami fermentai. Fermentai gali katalizuoti daugybę cheminių reakcijų. Fermentai yra efektyvesni katalizatoriai, negu cheminiai katalizatoriai, todėl jie plačiau naudojami [CB04].

Biojutiklių veikimo principas: tiriamą medžiagą vadinama substratu pataiko į ploną biokatalizatoriaus sluoksnį, kuriame įvyksta fermentinė reakcija. Fermento-katalizinės reakcijos metu substratas S pavirsta produktu P, panaudojant fermentą E [BIK10, 147]:



Fermentinės reakcijos produkto kiekis nustatomas elektrodo pagalba. Biojutikliuose su chemiškai modifikuotu elektrodu fermentinės reakcijos metu naudojamas elektronų pernešimo pagalbininkas, vadinamas mediatoriumi. Jis padengia elektrodo paviršiu.

Kinetinių biojutiklių dėsningumą supratimas turi didžiulę įtaką jų kūrimui. Dėsningumus gali paaiškinti matematinis modelis. Matematinis modeliavimas plačiai naudojamas tobulinant biojutiklių kūrimą ir optimizuojant jų konfigūraciją. Matematinio modelio pagrindą sudaro nestacionarinės difuzijos lygtis su netiesiniu nariu, aprašančiu fermentinę reakciją. Šio darbo matematinį modelį sudaro trys sritys:

- 1) mediatoriaus sluoksnis, kuriame vyksta mediatoriaus difuzija;
- 2) fermento sluoksnis, kuriame vyksta fermento reakcija ir difuzija;
- 3) difuzijos sluoksnis, kuriame vyksta medžiagų difuzija.

Kiekvienam sluoksniui sudaromos lygčių sistemos, aprašomos pradinės, kraštinės ir atitikimo sąlygos [Num92, 829]. Aprašant pagrindines lygtis laikomasi prielaidos, jog elektrodas turi simetrišką geometriją, fermentas yra tolygiai pasiskirstęs sluoksnyje ir išsidėstęs ant elektrodo paviršiaus. Po fermento sluoksnio seka difuzijos sluoksnis. Pradinės sąlygos aprašo būseną, kai biojutiklis dar nepradeda veikti. Pvz., substrato kiekis difuzijos sluoksnyje lygus nuliui. Kraštinės sąlygos aprašo medžiagų koncentracijų sąlygas sluoksnių kraštuose.

Panaudojant matematinį modelį sudaromas skaitinis modelis. Vėliau, panaudojant diskretizuotas lygtis kuriama programinė įranga, leidžianti modeliuoti biojutiklio veikimą. Bet iš pradžių kompiuterinis biojutiklio modelis turi būti patvirtintas, įrodant, kad jis yra tinkamai suprogramuotas. Patvirtinimas atliekamas sulyginant egzistuojančius analitinius sprendimus su gautais skaitiniais sprendimais. Pradiniai duomenis, reakcijų konstantų reikšmės, reikalingos modeliuoti biojutiklyje vykstančią reakciją galima paimami iš akademinių šaltinių.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Magistro baigiamojo darbo tema yra amperometrinių biojutiklio su tirpstančiu mediatoriumi kompiuterinis modeliavimas ir savybių tyrimas. Darbo tikslas – sukurti biojutiklio su tirpstančiu mediatoriumi kompiuterinį modelį ir taikant jį iširti biojutiklio savybes. Tikslas suskaidomas į darbo uždavinius:

- 1) suformuluoti matematinį modelį;
- 2) diskretizuoti matematinį modelį – sudaryti skaitinį modelį;
- 3) sukurti kompiuterinio modelio pagalba sumodeliuoti biojutiklio veikimą;
- 4) iširti gauto biojutiklio savybes: medžiagų koncentracijų įtaka, biojutiklio sluoksnių storio įtaka, difuzijos koeficiento įtaką;
- 5) išsiaiškinti sąlygas, kai sukurtas modelis yra tikslingesnis, negu egzistuojantis.

Darbo naujumas ir aktualumas

Darbo naujumas – kituose moksliniuose straipsniuose [BK08, LR10] aprašytuose amperometrinių biojutiklių su chemiškai modifikuotu elektrodu matematinuose modeliuose laikomasi prielaidos, jog mediatoriaus koncentracija fermento sluoksnio pakraštyje vykstant reakcijai nekinta. Be to, mediatoriaus sluoksnis nėra modeliuojamas, kadangi jo storis palyginus su fermento sluoksnio storiu yra mažas. Tai reiškia, kad mediatoriaus sluoksnio įtaka reakcijai yra nepilnai išnagrinėta. Šiame darbe kuriamas biojutiklio modelis su mediatoriaus sluoksniu ir kintančia mediatoriaus koncentracija jame.

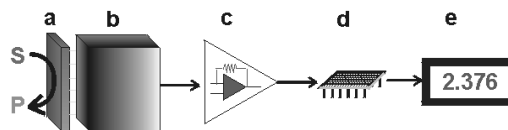
Darbo aktualumas – biojutiklio kūrimo idėja, kurią vieni pirmųjų išsakė Klarkas ir Lionsas (Klark, Lions), egzistuoja maždaug nuo 1967m. Biojutikliai atstovauja greitai augančiai sričiai,

kiekvienais metais vis labiau plinta jų panaudojimas. Didelę paklausą biojutikliai turi sveikatos apsaugos, maisto pramonėse ir aplinkosaugoje. Vienas populiariausių panaudojimų medicinoje – insulino kraujyje nustatymas [CB04].

1. Biojutiklio modeliavimas

1.1. Biojutiklio struktūra

Biojutikliai – analitiniai įrenginiai, išreiškiantys biochemines reakcijas pamatuojamu vienetu - elektros signalu. Biojutikliuose su signalo keitikliu vyksta susijungimas tarp nejudančio biologiškai aktyvaus mišinio ir elektroninio stiprintuvo. Įrenginys skleidžia signalą, kuris yra proporcingas matuojamo substrato arba substratų grupės kiekiui.



1 pav. Biojutiklio schema [CB04]

Biojutiklio schema (žr. 1 pav. Biojutiklio schema [CB04]) vaizduoja pagrindinius biojutiklio komponentus. Biokatalizatoriuje (a) vyksta reakcija - substratas virsta produktu. Reakciją sąlygoja keitiklis (b), paverčiantis reakciją elektroniniu signalu. Keitiklio išėjimo signalas sustiprinamas stiprintuvu (c), apskaičiuojamas (d) ir pateikiamas ekrane (e) [CB04].

Pagrindinė biojutiklių dalis yra keitiklis. Biojutikliai klasifikuojami pagal keitiklio tipą: kalorimetriniai, potenciometriniai, amperometriniai, optiniai ir pjezoelektriniai. Dažniausiai naudojami amperometriniai ir potenciometriniai biojutikliai [CB04]. Biojutiklio keitiklio paskirtis yra paversti biocheminį atpažinimą į elektroninį signalą. Keitiklis apima amperometrinius ir jonų-atrankos elektrodus, optines sistemas ir kitus fizinius įrenginius, įgyvendinančius įvairius fizikinius fenomenus. Biokatalitinė membrana išdėstoma labai arti prie keitiklio. Keitiklio su amperometriniu elektrodu veikimas pagrįstas indukcinė srove, kuri indukuojasi kai elektronai yra perduodami tarp substrato, produkto arba fermento aktyvaus centro ir elektrodo. Skirtumas tarp keitiklio tipo sąlygoja skirtingas pradines sąlygas modeliuojant biojutiklius - sudarant biojutiklio matematinį modelį, kuris aprašomas paprastų arba dalinių diferencialinių lygčių pagalba.

1.2. Fermentų kinetika

Prieš biojutiklio veikimo nagrinėjimą yra tikslinga apžvelgti svarbias fermentų savybes ir fermentų kinetiką, nes jie įtakoja biojutiklių funkcionavimą. Supaprastinant biojutiklio struktūrą, jis susideda iš dviejų komponentų: biocheminio atpažinimo sistemos ir keitiklio sistemos. Biocheminėje atpažinimo sistemoje panaudojamas biokatalizatorius. Svarbu, kad biojutiklyje būtų galimybė pakartotinai panaudoti biokatalizatorių.

Katalizatorius – tai substancija, kuri padidina reakcijos spartą be paties suvartojimo reakcijos metu. Reakcija, kurioje naudojamas katalizatorius vadinama katalizuota reakcija, o procesas vadinamas katalize [Cha05, 363].

Katalizatorius sumažina Gibso aktyvavimo energiją, kadangi pateikia kitą reakcijos mechanizmą [Cha05, 363]. Jis įtakoja reakcijos spartą, taikomas pradinei ir atgalinei reakcijai. Katalizatorius formuoja tarpinį junginį su reagentu pradiniam reakcijos žingsnyje ir atleidžia reagentą produkto-formavimo žingsnyje. Katalizatorius nedalyvauja visame reakcijos cikle. Nepriklausomai nuo mechanizmo ir reakcijos energetikos, katalizatorius negali įtakoti reagentų arba produktų Gibso energijos ir entalpijos [Cha05, 364]. Katalizatorius padidina pusiausvyros pasiekimo spartą, tačiau negali įtakoti termodinaminių tirpalo konstantų.

Fermentai – biologiniai katalizatoriai, pasižymintys savybe katalizuoti daugelį cheminių reakcijų tiek gyvoje ląstelėje, tiek už organizmo ribų. Dauguma procesų biologinėje ląstelėje jų stebėjimui didesniu mastu reikalauja fermento panaudojimo [Cha05, 364]. Fermentą sudaro amino rūgštys. Fermentinėse reakcijose dalyvauja molekulės, priklausančios medžiagai proceso pradžioje vadinamai substratu. Cheminės reakcijos metu jos paverčiamos į kitas molekules, sudarant kitą medžiagą vadinamą produktu. Fermentas turi vieną arba daugiau aktyvių vietų, kur vyksta surišimas su substratu. Yra fermentų, kurie katalizuoja tik vieno substrato pavertimą.

Fermentų kinetika – fermentais katalizuotų cheminių reakcijų tyrinėjimas: reakcijos spartos matavimas, kintamų reakcijos sąlygų efektų nagrinėjimas. Reakcijos spartą apibrėžiantis žingsnis gali būti cheminė reakcija, fermento struktūros arba substrato pakitimas. Fermentų kinetiką teikia informaciją apie fermento katalitinį mechanizmą, vaidmenį metabolizme, fermento veiklos kontrolę ir valdymą - kaip vaistai arba nuodai gali slopinti fermento veiklą. Fermentų katalitinis mechanizmas – molekulių jungimasis prie fermento ir transformavimas į produktą per kelių žingsnių seką. Fermentų katalizės fenomenas yra labai didelis reakcijos spartos padidėjimas nuo 10^6 iki 10^{18} ir aukštas tikslumas - molekulės sugeba pasirinktinai katalizuoti tam tikrus reagentus vadinamais substratais, ignoruojant kitas molekules [BIK10, 3].

1890m. vokiečių chemikas Emilis Fišeris pasiūlė „rakto ir spynos“ koncepciją fermento atpažinimo teorijai. Pagal ją, aktyvią pusę galima traktuoti kaip griežtą struktūrą panašią į spyną. O substrato molekulę kaip papildomą struktūrą funkcionuojančią kaip raktas [Cha05, 365]. Fermentų kinetikos tyrinėjimai svarbūs dėl šių priežasčių:

- 1) padeda paaiškinti kaip veikia fermentai;
- 2) padeda prognozuoti kaip fermentai elgiasi gyvuose organizmuose.

Puikios fermentų savybės seniai atkreipė tyrinėtojų dėmesį, tačiau praktiniam jų taikymui trukdė sunkiai prieinami švarūs fermentai ir kitos priežastys. Kadangi fermentas yra baltymo

prigimties, jis nėra patvarus saugojimo metu, jautrus šiluminiam ir cheminiam poveikiui. Be to, fermentus buvo sunku panaudoti kelis kartus dėl sudėtingo atskyrimo nuo reagentų bei produktų, didelės išvalytų preparatų kainos. Išspręsti šias problemas padėjo fermentų imobilizavimas [Буд97, 28].

Šis metodas gimė 1916m., kai D.Nelsonas ir E.Grifinas adsorbavo invertazę ant anglies ir parodė, kad medžiaga tokia pavidale išsaugo katalitinį aktyvumą. Pats terminas „imobilizuotas fermentas“ buvo įteisintas 1971m. ir reiškia bet kurį baltymo judėjimo laisvės apribojimą erdvėje [Ky309]. Imobilizavimo metodas gali būti laikomas tinkamu, jeigu po prijungimo prie nešėjo fermento biologiniai komponentai išsaugo savo aktyvumą ir stabilumą.

1.2.1. Fermento-katalizuota reakcija

Panagrinėkime paprastą fermento-katalizuotą reakciją, kurioje substratas (S) virsta produktu (P). Reakcijos pavidalas:



Pagal šią schemą fermentas ir substratas tirpale iš pradžių turi susidurti vienas su kitu, kad suformuotų fermento-substrato tarpininką ES. Kai substratas pririštas prie fermento, jėgos esančios aktyviose vietose gali rikiuoti substrato ir fermento reaguojančią grupę tinkama linkme. Reakcijos žingsnių parametrai (kinetinės konstantos):

k_2 – fermento apyvartos skaičius, dar žymimas k_{cat} . Tai skaičius substrato molekulių arba molių skaičius, kuris paverčiamas į produktą per laiko vienetą kai fermentas yra pilnai prisotintas substratu. Daugumai fermentų apyvartos skaičius varijuoja tarp 1 ir 10^5 s^{-1} priklausomai nuo fiziologinių sąlygų [Cha05, 371].

k_1 – reakciją apibrėžianti konstanta, nurodo koku greičiu fermentas susijungęs su substratu virsta į tarpininką ES. Tačiau, k_1 negali būti didesnis negu susidūrimo tarp fermento ir substrato molekulių dažnis, kuris tirpale yra valdomas ir kontroliuojamas difuzijos spartos. Reakciją apibrėžiančios konstantos difuzijos valdomoje reakcijoje reikšmė yra $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eilės [Cha05, 372].

k_{-1} – nurodo koku greičiu suformuotas tarpininkas ES išsiskaido į atskirą fermentą ir substratą, kai substratas nepavirto į produktą. Santykis $\frac{k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$ vadinamas disociacijos konstanta [Cha05, 367].

Fermentų kinetikoje svarbus dydis yra pradinė reakcijos sparta v_0 . Reakcijos sparta auga greitai ir tiesiškai esant mažoms substrato koncentracijoms $[S]$ ir artėja prie savo ribinės reikšmės, kai koncentracija $[S]$ yra didelė. Fermento-katalizuotos reakcijos parodo prisotinimo

kinetiką. Viena svarbiausių kinetinių fermento savybių yra jo prisotinimo greitis tam tikru substratu ir maksimali reakcijos sparta, kurią gali pasiekti. Pradinė reakcijos sparta skaičiuojama pagal formulę:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

V_{\max} apibrėžta reikšmė yra konstanta parodanti maksimalią prieinamą reakcijos spartą, kai bendra fermentų koncentracija yra pateikta kaip fermento-substrato kompleksas. Iš biojutiklyje vykstančių reakcijų parametrų svarbią reikšmę turi kinetiniai parametrai k_{cat} ir K_M . Paprastai biojutiklio pakrovimas fermentu santykinai nedidelis. Didelė k_{cat} reikšmė parodo, kad iš tikrųjų reikia mažų fermento kiekių (miligramai). Membraninių biojutiklių atveju, esant dideliame k_{cat} įrenginio darbo metu reakciją limituojančiu faktoriumi tampa masės pernešimas per membraną. Tai reiškia, kad biojutiklis sąlyginai nejautrus fermento kiekiui arba jo aktyvumo praradimui [TKW87, 100]. Kitas fermento kinetikos parametras – Michaelio konstanta K_M apibrėžiama pagal formulę [Cha05, 369]:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (4)$$

Michaelio konstanta K_M varijuoja priklausomai nuo konkretaus pasirinkto fermento ir skirtingų substratų tam pačiam fermentui. K_M reprezentuoja substrato koncentraciją, kuriai esant pusė fermento aktyvių vietų yra užpildyti substrato molekulėmis. Kuo didesnis K_M , tuo silpnesnis surišimas. Daugumai fermentų K_M reikšmė yra tarp 10^{-1}M ir $10^{-1}\mu\text{M}$ [Cha05, 371]. Biochemijoje koncentracija išreiškiama $\text{mol}/\text{dm}^3 \equiv \text{M}$, tuo tarpu komponentų koncentracija modeliuose yra išreiškiama mol/cm^3 [BIK10, 3].

Michaelio konstanta įtakoja signalo diapazono tiesiškumą. Idealiausiu atveju tarp išėities ir nustatymo medžiagos koncentracijos sąryšis turi būti tiesinis. Bendroju pavidalu K_M dydis atsispindi fermento surišimą su substratu. Michaelio-Menten lygčių analizė parodo, jog tiesumas išlieka iki koncentracijos nedidesnės kaip $0,2 K_M$. Tačiau didelę įtaką turi ir kiti faktoriai: fermento imobilizacija, arba membranos buvimas [TKW87, 100].

Dviejų dydžių santykis k_{cat}/K_M tai specifiskumo konstanta. Geriausia, kai ji daug aukštesnė nustatomi medžiagai negu kitiems potencialiems substratams. Kaip ir kiekvienai kitai cheminiai reakcijai, fermentinės reakcijos greitis auga didinant temperatūrą. Tokiu būdu biojutiklių atsakas taip pat gali priklausyti nuo temperatūros ir šio efekto dydį lemia limituojančio faktoriaus aktyvacijos energija [TKW87, 100].

Yra du reakcijos mechanizmai: nuoseklus ir nenuoseklus. Nenuosekliame „ping-pong“ vadinamame mechanizme vienas substratas surišamas, vienas produktas išleidžiamas. Toliau

antras substratas surišamas, antras produktas išleidžiamas ir t.t. Be to, reakcijoje gali dalyvauti inhibitoriai – junginiai, kurie sumažina fermento-katalizės reakcijos spartą. Inhibitorius gali kontroliuoti produkto kiekio gaminimą.

Dvi pagrindinės prielaidos taikant Michaelis-Menten lygybes [Cha05, 368]:

- 1) Tariamai pastovi būseną – fermentų sujungtų su substratų ir nesujungtų fermentų koncentracija keičiasi daug lėčiau negu produktų arba substratų koncentracijos ir jų pakeitimas per laiką gali būti prilygintas nuliui: $\frac{d[ES]}{dt} = 0$.
- 2) Bendra fermentų koncentracija nesikeičia per laiką: $[E]_{tot} = [E] + [ES] = \text{konst.}$.

1.3. Amperometriniai biojutikliai

Amperometriniai biojutikliai – labiausiai paplitę ir komerciniu atžvilgiu sėkmingiausi tokios klasės biomolekulinės elektronikos įrenginiai. Jie yra patikimi, kompaktiški, santykinai nebrangūs, turintys trumpą atsako laiką. Įrenginiai naudojami aplinkos, sveikatos apsaugos ir maisto pramonėje. Šiomis dienomis vienas populiariausių [Дзя01, 13] yra amperometrinis biojutiklis paremtas imobilizuotos gliukozoksidazės panaudojimu. Jo paskirtis yra nustatyti cukraus kiekį kraujyje.

Amperometrinis metodas grindžiamas srovės tankio matavimu. Srovė teka elektrocheminėje ląstelėje esant pastoviam taikomam potencialui. Srovės tankis – tai elektrochemiškai aktyvių dalelių, kurių oksidavimas ir redukovimas vyksta ant dirbančio elektrodo paviršiaus, srautas. Srovės stipris priklauso nuo biocheminės produkto oksidacijos arba redukcijos reakcijos intensyvumo. Amperometriniai fermentiniai biojutikliai apjungia fermento nustatomų molekulių-taikinių atpažinimo sugebėjimus ir reakcijos greičio tiesioginį elektromechaninį pertvarkymą į elektros srovę galimybes.

Amperometrinis detekcijos metodas yra labai paplitęs analitinėje praktikoje, nes optimalioms sąlygoms nustatomo substrato koncentracija gali būti nuo $10^{-2} \mu\text{M}$ iki $10^{-3} \mu\text{M}$ (mol/dm^3). Amperometrinius biojutiklius galima suskirstyti į tris pagrindines klases [Дзя01, 13]:

- 1) Įrenginiai, kurių darbo pagrindas yra natūralių substratų ir fermentinės reakcijos produktų koncentracijos matavimas - nemediatoriniai amperometriniai biojutikliai.
- 2) Biojutikliai, naudojantys mediatorių kaip elektronų nešėją nuo fermento aktyvaus centro prie elektrodo, - mediatoriniai amperometriniai biojutikliai.
- 3) Biojutikliai paremti tiesioginiu elektronų pernešimu tarp fermento ir elektrodo.

Dažnai amperometriniai biojutikliai apsaugomi specialia membrana, kuri pasirinktinai praleidžiančia reikalingas, dominančias daleles. Membrana tarnauja elektrodo izoliacijai nuo

biologinio skysčio, reagentų ir fermentų reikalingų detekcijos sistemai sulaikymui ploname sluoksnyje.

1.3.1. Chemiškai modifikuotas elektrodas

Pakankamai dažnai amperometrinių biojutiklių elektrodai yra užteršiami baltymais arba ant jų paviršiaus atsiranda plėvelė sudaryta iš reakcijos su elektronu pernešimu pagaminto produkto. Didelį susidomėjimą kelia redukuoto NADH oksidavimas, kuris tarnauja kaip substratas arba kofaktorius daugelyje fermentinių reakcijų. Elektrocheminis NADH oksidavimas sunkiai vyksta, be to produktas adsorbuojasi ant elektrodo. Tokioms sistemoms buvo daromi elektrodo modifikavimo šiluminiu apdorojimu bandymai: arba įterpiant į paviršutinį sluoksnį metalą, arba adsorbuojant ant paviršiaus, arba tvirtinant prie jo cheminių modifikatorių [TKW87].

Nagrinėjant fermentus, kyla neaiškumų dėl jų elektroaktyvumo. Paprastose sąlygose daugelyje fermentų nepasireiškia elektroaktyvumas, netgi jeigu žinoma, jog fermento molekulėje yra elektrono pernešimo centras. Egzistuoja trys skirtingi tokio fakto paaiškinimai[TKW87]:

- 1) Baltymas gali negrįžtamai adsorbuotis ant elektrodo, užkertant kelią tolimesniam elektrono pernešimui.
- 2) Priėjimas prie elektroaktyvaus centro gali būti stipriai apsunkintas, o tai daro neįmanomu kontaktą su elektrodo paviršiumi.
- 3) Mažas srovės tankis gali būti sąlygojamas mažu makromolekulių difuzijos koeficientu.

Yra parodyta [TKW87], jog baltymo adsorbavimas ant elektrodo turi įvykti anksčiau negu elektrono pernešimas. Tokiu atveju adsorbicija vyksta greitai ir grįžtamai, jeigu elektrodas yra modifikuotas citochromu. Šis baltymas adsorbuojasi ant gryno elektrodo, modifikuojant jį taip, kad elektronų pernešimas tampa greitas ir grįžtamas. Pavyzdžių su tiesioginių elektronų pernešimų žinoma nedaug, todėl mediatorių panaudojimas yra perspektyvus metodas tol, kol nėra tinkamų stabiliai modifikuotų elektrodų.

1.3.1.1. Mediatoriaus veikimas

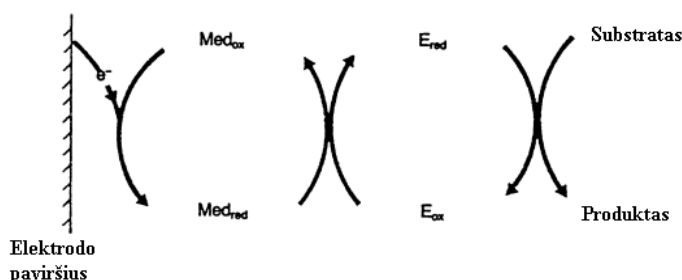
Dažnas atvejis, kai reikalinga redoks (redukavimo-oksidavimo) reakcija ant pliko elektrodo pasižymi lėta elektronų perdavimo kinetika, todėl pasireiškia apčiuopiama sparta tik esant potencialui žymiai aukštesniam negu jo termodinaminis redoks potencialas. Tokios reakcijos gali būti katalizuotos pridant prie elektrodo paviršiaus tinkamą elektronų perdavimo mediatorių. Bendru atveju mediatorius – tai maža molekulinė dalelė pernešanti elektroną tarp fermento redoks centro ir dirbančio elektrodo. Mediatorių galima pridėti į matuojama tirpalą arba

imobilizuoti ant elektrodo paviršiaus. Mediatoriaus funkcija yra palengvinti termodinamiškai naudingą, tačiau kinetiškai sunkiai vykdomą kinetinį elektrono pernešimą. Mediatoriaus veikimą iliustruoja ši schema [Wan00, 121]:



kur M – tai mediatorius, o A – substratas arba biologinė medžiaga. Elektronų perdavimas vyksta tarp elektrodo ir mediatoriaus, o ne tiesiogiai tarp elektrodo ir substrato. Aktyvi katalizės forma yra elektrochemiškai atstatoma. Iš esmės tokio elektrono judėjimo rezultatas yra pernelyg aukštos įtampos sumažinimas į mediatoriaus potencialą ir srovės tankio padidėjimas. Elektrokatalizės proceso efektyvumas priklauso nuo esamų atstumų tarp surištos redoks vietos ir paviršiaus.

Antros kartos sistema, kuriose vykstančių reakcijų chemija yra tokia: fermentas dalyvauja oksidavimo-redukavimo reakcijoje su substratu, tačiau vėl oksiduojasi su mediatoriumi (bet ne deguonimi, kaip buvo pirmos kartos sistemose), o mediatorius savo ruožtu oksiduojasi prie elektrodo paviršiaus:

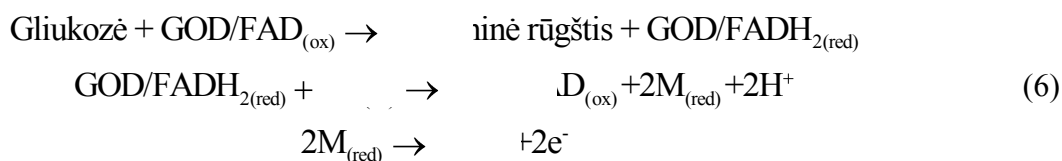


2 pav. Amperometrinio biojutiklio su mediatoriumi darbo principas [Wan00, 178]

Dirbtinio elektronų nešėjo, mediatoriaus, panaudojimo rezultate matavimai tampa neįjautūs deguonies svyravimui ir gali būti atliekami esant mažesnei įtampai nekeliant interferencijos reakcijos iš kitų dalyvaujančių reakcijoje elektroaktyvių elementų [Wan00]. Daug organinių arba organinių-metalinių redoks junginių gali būti nagrinėjami mediatoriaus vaidmenyje.

1.3.1.2. Mediatorių pavyzdžiai

Visus mediatorius galima suskirstyti į „natūralius“ ir „dirbtinius“ [Дзя01, 19]. Darbuose parodyta, jog efektyviais mediatoriais gali būti dirbtiniai mediatoriai ferroceno/ferrocinjais poros arba jų išvestiniai elementai, veikiantys pagal tokią schemą [Wan00, 177]:



kur $M_{(ox)}$ – oksiduotas mediatorius, $M_{(red)}$ – redukuotas mediatorius. Ferroceno taikomas redoks potencialas yra 0,17V [Дзя01, 19]. Šių cheminių savybių panaudojimas lėmė pieštuko dydžio asmeniniam naudojimui gliukozės stebėjimui viename kraujo laše matuoklio kūrimą. Taip pat naudojamos tokios medžiagos kaip $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ir katijonas N-metilfinazijaus (NMP^+). Žinomas ir paprastesnis bei tiesioginis būdas, nereikalaujantis mediatoriaus, bet tokiam atvejui reikalinga tokia elektrodo medžiaga, kurioje tiesiogiai galėtų oksiduotis redukuotas fermentas. Tai trečios karto įrenginiai.

Ferric hexacyanoferrate, žinomas pavadinimu „Prūsijos mėlynas“, vienas dažniausių naudojamų redoks mediatorių elektrocheminiams biojutikliams [Дзя01]. Juo gali būti padengti daugelis elektrodų paviršių. Su „Prūsijos mėlyno“ mediatoriaus ar jo analogo pagalba galima nustatyti daugelį substratų: gliukozę, cholesterolį, askorbino rūgštį.

1.3.1.3. Mediatoriaus panaudojimo būdai

Žinomi keli mediatoriaus panaudojimo būdai. Pirmas, mediatorius yra imobilizuotas ant elektrodo paviršiaus. Antras, mediatorius yra ištirpdytas fermento membranoje. Be to, mediatorius gali būti kovalentiškai prijungtas prie chemiškai pakeisto redoks baltymo. Ir paskutinis būdas, mediatorius yra difuzijos sluoksnyje: 1) oksiduotas-molekulinė deguonis; 2) redukuotas - ferrocene carboxylic [Lyo06, 1774]. Mediatoriaus išdėstymas priklauso nuo naudojamo biojutiklio tipo.

Pats paprasčiausias mediatoriaus panaudojimo atvejis – pridėjimas į tirpalą dažniausiai netinka dėl kelių priežasčių. Organiniai dažikliai (pvz., ftalocianinas) yra toksiški, nestabilūs redukavime, pH-priklausomi ir dažnai savaime oksiduojasi. Optimaliausiais variantais yra imobilizuotų mediatorių panaudojimas [Дзя01, 19]. Vienas iš šių biojutiklių plėtimą stabdančių trūkumų yra jų mažas stabilumas. Šios problemos sprendimui buvo taikomi skirtingi metodai. Paprasčiausiu atveju mediatoriaus miltelius maišė kartu su anglies pasta, tokiu būdu gaunant karboninį (anglinį) elektrodą, ant kurio paviršiaus vėliau buvo adsorbuojamas fermentas. Kai kuriais atvejais mediatorių tiesiog adsorbavo ant elektrodo paviršiaus.

Viename iš tokių atvejų dimetil-ferroceno tirpalo toluole lašeliu padengdavo elektrodo paviršių ir po toluolo išgaravimo imobilizavo gliukozoksidazę (fermentą). Tačiau tokiam variantui esant biojutiklio charakteristikas pradeda įtakoti mediatoriaus tirpumas. Kai biojutiklį patalpina į vandens tirpalą, netirpstantis mediatorius lieka paviršiuje. Bet pridėjant potencialą atsiranda ferriciniumo jonai, kurie labai lengvai tirpsta vandenyje ir iškart išsiplauna. Tokiu būdu mediatoriaus kiekis ant elektrodo mažėja. Dėl šios priežasties keičiasi ir biojutiklio atsakas.

Šiam trūkumui išvengti yra sukurti ir ištirti praleidžiantys polimerai modifikuoti mediatoriaus. Gautas elektrodas buvo stabilus esant gliukozės tirpalui 5 dienas. Dar viena mediatoriaus išplovimo problemos sprendimo galimybė yra mediatoriaus ir fermento įvedimas į koloidinę grafitinę emulsiją, kurios viršuje fiksuojama katijoninė membrana. Tokį elektrodą yra paprasta gaminti, jis turi greitą atsako laiką ir pakankamą gliukozės nustatymo diapazoną. Saugant sausame pavidale 6 mėnesius fermento aktyvumas siekė iki 70%.

Renkantis mediatorių yra svarbu turėti omenyje tokius faktorius [Дзя01, 20]:

- 1) pridedamas potencialas turėtų būti mažesnis negu deguonies redukavimo potencialas;
- 2) redukuotas mediatorius neturi reaguoti su deguonimi;
- 3) elektroninis pernešimas tarp redukuoto mediatoriaus ir fermento turi būti labai greitas;
- 4) mediatorius turi nepriklausyti nuo pH;
- 5) mediatorius neturi būti toksiškas.

Jeigu visos charakteristikos yra tenkinamos, galima gauti amperometrinių biojutiklių su analitinėmis charakteristikomis leidžiančiomis dirbti ilgesnį laiką.

1.4. Biojutiklio veikimas

Nustatoma medžiaga difunduoja per pusiau pralaidžią membraną į ploną biokatalizatoriaus sluoksnį, kuriame vykdoma fermentinė reakcija pagal schemą. Kadangi šiuo atveju fermentinės reakcijos produktas nustatomas su elektrodu, kurio paviršiuje yra imobilizuotas fermentas, pagalba tai toks įrenginys vadinamas fermentiniu elektrodu. Reikia pažymėti, jog fermentinės reakcijos pobūdis priklauso nuo fermento prigimties, katalitinio veikimo principo. Svarbu prisiminti, jog konstruojant biojutiklį jo veikimo trukmės didinimas yra vienas pagrindinių uždavinių.

Specialių reagentų pagalba fermento imobilizacijos eigoje fermentas užtvirtinamas arba ant adsorbentų paviršiaus (pvz., silikagelio, anglies arba celiuliozės) arba tiesiog įvedamas į poringo polimero plėvelę, arba kovalentiškai (t.y. cheminių ryšių pagalba) pririšamas prie kokio nors priedo. Tokiu būdu fermentas imobilizuojamas, tampa nejudrus ir neišsiplauna iš biosluoksnio, o jo katalitinės savybės išlieka [Дзя01, 19].

Stacionarus atpažinimo procesas susideda iš tokių žingsnių [СТН06, 1314]:

- 1) substrato prasiskverbimo iš difuzijos sluoksnio prie mediatoriaus ant elektrodo;
- 2) substrato molekulių ir fermento aktyvių pusių sujungimas mediatoriaus paviršiuje (adsorbcijos procesas);

- 3) paviršiaus substrato katalizė;
- 4) produkto difuzija atgal į difuzijos sluoksnį.

Tokia žingsnių seka sąlygoja, jog amperometrinio biojutiklio atsakas priklauso ne tik nuo katalizės ant elektrodo paviršiaus, bet ir nuo substrato difuzijos. Difuzijos sluoksnis - ta dalis tirpalo, kur molekulės įtakojamos tik kitų tirpalo molekulių, o ne kietųjų kūnų arba dujų molekulių, kurios yra konteineryje arba virš tirpalo paviršiaus.

Šiame darbe dėmesis yra skirtas amperometriniais biojutikliams, kurie naudoja redoks fermentus. Tokio fermento pavyzdys - flavoprotein glucose oxidase. Mediatoriaus vaidmenyje dažnai panaudojamas ferrocene/ferricinium. Jo paskirtis yra elektronų perdavimas tarp fermento redoks vietos ir elektrodo detektoriaus.

1.5. Matematinis modeliavimas

Kinetinių biojutiklių dėsningumą supratimas turi didžiulę įtaką jų kūrimui. Dėsningumus gali paaiškinti matematinis modelis. Matematinis modeliavimas plačiai naudojamas gerinant biojutiklių projektavimo efektyvumą ir optimizuojant jų konfigūraciją.

Šiame darbe remiantis išnagrinėtais darbais[BK08, LR10, WDW+04] sukuriamas matematinis modelis. Modelio paskirtis yra apibrėžti biojutiklio su chemiškai modifikuotu elektrodu vidinį masės pernešimo mechanizmą ir fermentų reakcijos kinetiką keliuose biojutiklio sluoksniuose. Biojutiklio atsako laikas aprašytas matematinio modelio [WDW+04, 204]. Sudarytos diferencialinės lygtys su dalinėmis išvestinėmis sprendžiamos skaitiniais metodais.

Biojutiklio veikimo simuliacija suteikia informacijos kaip parinkti parametrus įtakojančius atpažinimo reakcijos procesų našumą. Šios informacijos pagrindu gali būti kuriamos skirtingos biojutiklio modifikacijos ir testuojamos tikrinant teorines prielaidas. Optimizuotas variantas gali būti sukurtas ir pritaikytas. Biojutiklio modeliavimas padeda geriau suprasti svarbius veiksnius, įtakojančius biojutiklio optimizavimą – atsako laiką, konstrukciją ir kitus parametrus [WDW+04, 204].

1.5.1. Diferencialinės lygtys dalinėmis išvestinėmis

Diferencialinės lygtys dalinėmis išvestinėmis arba dalinės diferencialinės lygtys (DDL) yra pagrindinis elementas daugelio, jeigu ne daugumos kompiuterinių analizės arba fizinių sistemų simuliacijos dalis tokių kaip srautai, elektromagnetiniai laukai, žmogaus kūnas ir panašiai. Matematinėje literatūroje DDL skirstomos į tris kategorijas: hiperbolinės, parabolinės ir elipsinės [Num92, 827].

Masės pernešimas pasireiškia keliuose skirtinguose būduose: difuzijoje, konvekcijoje ir migravime. Jeigu sinchroniškai pasireiškia visi trys būdai, tai situacijos modeliavimas tampa komplikuotas dėl sudėtingai suderinamų tarpusavyje lygčių. Esant tokiai komplikacijai pasidaro sunkiai išreiškiami srovės tankio priklausomybė nuo substrato koncentracijos. Situacija gali būti žymiai supaprastinta slopinant elektromigraciją arba konvekciją pridedant papildomos inertinės druskos arba panaudojant ramų tirpalą. Esant tokioms sąlygoms elektroaktyvių dalelių judėjimas ribojamas tik difuzijos [Wan00].

Difuzija – tai procesas, kurio metu medžiaga pernešama iš vienos sistemos dalies į kitą kaip atsitiktinio molekulių judėjimo rezultatas [Cra75, 1]. Paprastai medžiaga yra pernešama iš dalies su didele koncentracija į dalį su maža koncentracija. Difuzijos lygties pavidalas yra parabolinis [Num92, 827]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (7)$$

Skaičiavimo požiūriu toks kategorijų skirstymas neturi didelės reikšmės. Difuzijos lygtims turi būti apibrėžtos pradinės reikšmės, kitaip dar vadinama Kauči uždavinys. Jeigu yra duota informacija apie $u(x,t)$ (pvz., įtraukiant informaciją apie laiko išvestinę) kažkokiam pradiniam laikui t_0 visiems x , tada duota diferencialinė lygtis apibrėžia kaip $u(x,t)$ skleidžiama toliau laike. Kitais žodžiais, difuzijos lygtis apibrėžia evoliuciją laike. Skaitinio kodo tikslas yra sekti evoliuciją su apibrėžtu tikslumu [Num92].

Pagal Fiko pirmą dėsnį difuzijos sparta yra tiesiogiai proporcinga difunduojančios medžiagos koncentracijos gradiento nuolydžiui [TKW87, 139]:

$$J = -D_0 \frac{\partial C}{\partial x} \quad (8)$$

kur D_0 – difuzijos koeficientas, x – erdvė, t – laikas, $C_0(x, t)$ – medžiagos koncentracijos funkcija.

Kadangi difuzijos koeficientas įeina į srovės tankio išraišką, yra akivaizdu, jog rezultate gautas tankis, sąlygotas elektroaktyvių biologinių molekulių, bus priklausomas nuo D_0 reikšmės. Bendra srovės tankio formulė užrašoma tokiu pavidalu [TKW87]:

$$i_A(t) = n F A D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (9)$$

kur n – elektronų skaičius, F – Faradėjaus konstanta, A – elektrodo ilgis, D – difuzijos koeficientas, x – erdvė, t – laikas, $C(x, t)$ – medžiagos koncentracijos funkcija. Dėl tiesioginio proporcingumo, srovės tankis gali būti normalizuojamas pagal paviršiaus plotą [BIK10, 47].

1.5.2. Analizinis sprendinys

Paprastos diferencialinės lygtys gali būti išspręstos analiziniu būdu. Tačiau analizinis sprendinys netiesinėms diferencialinėms lygtims bendrai neegzistuoja net esant paprastoms pradinėms sąlygoms. Daugelis reakcijos-difuzijos uždavinių naudoja netiesines išraiškas [TW08]. Michaelio-Menten fermentų kinetikoje netiesinis narys yra pradinis reakcijos greitis – hiperbolinė priklausomybė nuo Michaelio konstantos K_M ir substrato koncentracijos $[S]$. Mūsų modeliuojamo biojutiklio atveju netiesinė išraiška taip pat yra reakcijos greitis.

Analizinis diferencialinių lygčių sprendinys turi tam tikrų galimybių ir ribojimų. Didžiausias apytikrio analizinio sprendinio pliusas yra galimybė gauti analizinį dalinių diferencialinių lygčių sprendinį kai kuriais ribiniais atvejais [BIK10, Sch90]. Metodo svarbiausi trūkumai:

- 1) apribotas reaktyvių komponentų koncentracijos intervalas;
- 2) netinkamumas biojutikliams su sudėtingomis biokatalitinėmis schemomis;
- 3) nestacionarios būsenos sprendinys yra sudėtingas;
- 4) praktiškai neįmanoma gauti sprendinio sudėtingoms pradinėms ir kraštinėms sąlygoms.

Norint surasti nebendrą analizinį sprendinį - biojutiklio veikimas padalinamas į paprasčiausius atvejus, kuriems analizinis sprendinys gali egzistuoti. Toks metodas buvo plačiai naudojamas biojutiklių kūrimo pradžioje, kad būtų galima suprasti ir suvokti pagrindinius biojutiklio veikimo principus. Tokie aproksimuoti analiziniai sprendiniai suteikia informacijos apie ribinius atvejus [BIK10]. Analiziniai sprendiniai yra naudingi tikrinant skaitinio metodo teisingumą esant pradinėms arba kraštinėms sąlygoms.

Tačiau praktikoje biojutikliai turi sudėtingą geometriją, substratas paverčiamas pagal kompleksines schemas. Šiuolaikinis biojutiklių modeliavimas turi padengti visų koncentracijų intervalus ir būsenų perėjimus. Šios problemos gali būti išspręstos taikant skaitinį biojutiklio modeliavimą.

1.5.3. Skaitiniai metodai

Apibrėžtą matematinio modelio uždavinį galima išspręsti skaitiniais metodais. Dažniausiai naudojamas baigtinių skirtumų metodas reakcijos-difuzijos uždavinių sprendimui [Num92]. Prieš pateikiant nagrinėjamo matematinio modelio aproksimuotą skaitinį sprendinį, parodysime dviejų baigtinių skirtumų būdų schemų pavyzdžius. Nagrinėjamas biojutiklio sluoksnis modeliuojamas tokiomis lygtimis ($t > 0$) [BIK10, 147]:

$$\frac{\partial S}{\partial t} + D_S \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} = -k_1 S + k_2 P \quad (10)$$

kur t – laikas, x – erdvė, $S(x, t)$, $P(x, t)$ – substrato ir produkto koncentracijos, D_S , D_P – difuzijos substrato ir produkto koeficientai, K_M – Michaelio-Menten konstanta, V_{max} – maksimali fermentinė sparta pasiekama, kai fermentas pilnai prisotintas substratu; d – fermentinės membranos storis. Tegu $x=0$ reprezentuoja elektrodo paviršių, $x=d$ fermentinio sluoksnio riba.

Pradinės sąlygos ($t=0$):

$$\begin{cases} S(x, 0) = S_0 \\ P(x, 0) = 0 \end{cases} \quad (11)$$

Kraštinės sąlygos ($t>0$):

$$\begin{cases} \frac{\partial S}{\partial x} = 0 \\ S(d, t) = S_0 \\ P(0, t) = 0 \end{cases} \quad (12)$$

Generuojamos srovės tankis priklauso nuo reakcijos produkto srauto elektrodo paviršiuje ($x=0$). Srovės tankis gali būti paskaičiuotas pagal Faradėjaus ir antro Fiko dėsnį:

$$I(t) = n_e F \frac{\partial P}{\partial x} \quad (13)$$

kur n_e – elektronų skaičius, dalyvaujančių elektrodo paviršiuje krūvio perdavime, F – Faradėjaus konstanta.

Skaitiniam uždavinio sprendiniui surasti $[0, d] \times [0, T]$ dimensijose įvedamas diskretinis tinklelis. Paprasčiausias būdas yra naudoti pastovų diskretinį tinklelį $\omega_h \times \omega_\tau$ tam, kad galima būtų simuliuoti biojutiklių panaudojant baigtinių skirtumų metodą [BIK10, 251].

$$\begin{cases} \omega_h = \frac{d}{N} \\ \omega_\tau = \frac{T}{M} \end{cases} \quad (14)$$

kur T – analizės proceso trukmė. ω_h ir ω_τ tai pastovūs laiko ir erdvės diskretiniai tinkleliai. Diferencialinės lygtis diskretizuojamos domene taikant tokius apibrėžimus:

$$S_i^j = S(x_i, t_j) \quad (15)$$

Egzistuoja keli baigtinių skirtumų schemų tipai. Pagrindinis skiriamasis tarp jų požymis – tikslumo laipsnis. Išreikštinė ir neišreikštinė yra vienos dažniausiai praktikoje naudojamų schemų [BIK10]. Kitos naudojamos schemas – Kranko-Nikolsono ir Chopskotčo.

Naudojant išreikštinę baigtinę skirtumų schemą substrato ir produkto koncentracijoms išreikšti, dalinės diferencialinės lygtys išreiškiamos tokiomis [GB07, 363]:

$$\begin{aligned} \frac{S_i^{j+} - S_i^j}{\tau} &= n^+ \left(\frac{S_i^j}{K_M + S_i^j} - \frac{P_i^j}{K_M + P_i^j} \right) \\ \frac{P_i^{j+} - P_i^j}{\tau} &= n^- \left(\frac{S_i^j}{K_M + S_i^j} - \frac{P_i^j}{K_M + P_i^j} \right) \end{aligned} \quad (16)$$

Aproksimuojant reakcijos-difuzijos lygtis su neišreikštine schema, gaunamos kitos baigtinių skirtumų lygtys [GB07, 364]:

$$\begin{aligned} \frac{S_i^{j+} - S_i^j}{\tau} &= n^+ \left(\frac{S_i^j}{K_M + S_i^j} - \frac{P_i^j}{K_M + P_i^j} \right) \\ \frac{P_i^{j+} - P_i^j}{\tau} &= n^- \left(\frac{S_i^j}{K_M + S_i^j} - \frac{P_i^j}{K_M + P_i^j} \right) \end{aligned} \quad (17)$$

Pradinės ir kraštinės sąlygos irgi yra aproksimuojamos. Pradinė sąlyga substratui ir produktui išreikštinės schemos atveju [GB07, 363]:

$$\begin{aligned} S_i^0 &= S_i^0 \\ S_N^0 &= S_N^0 \\ P_i^0 &= P_i^0 \end{aligned} \quad (18)$$

Kraštinės sąlygos substratui ir produktui [GB07, 363]:

$$\begin{aligned} S_0^j &= S_0^j \\ S_N^j &= S_N^j \\ P_0^j &= P_0^j \end{aligned} \quad (19)$$

Ir srovės tankio skaičiavimo formulė tampa [GB07, 363]:

$$i(t_j) \approx \frac{n^+ S_i^j - n^- P_i^j}{n} \quad (20)$$

Skaitinio metodo skaičiavimas prasideda, kai $t=t_0=0$ taikant pradines sąlygas. Išreikštinės schemos paprastumas yra tame, kad paskaičiavus t_j ($j = 0, 1, \dots, M - 1$), galima paskaičiuoti sprendinį kitame sluoksnyje $t=t_{j+1}$ naudojant (16).

1.5.4. Sprendinio patvirtinimas

Iki skaitinio sprendinio taikymo norint atlikti modeliuojamo proceso tyrimą arba iširti gauto biojutiklio modelio charakteristikas, sprendinys turi būti patvirtintas. Tam naudojami kai kurie ypatingi ribojimai modelio įeities parametruose, kuriems yra analizinis sprendinys. Taikant

ši metodą, skaitinis sprendinys gali būti patikrintas pagal analizinį sprendinį. Skaitinio modelio gautus skaičiavimo rezultatus galima palyginti su moksliniuose šaltiniuose pateikiamais rezultatais. Viename šaltinyje [LR10] pateikiamos reikšmių lentelės su mediatoriaus ir fermento koncentracijos kiekiais ir gautais skaičiavimo rezultatais.

Tikslus analizinis sprendinys reakcijos-difuzijos problemoms egzistuoja tik tiesiniuose reakcijos išraiškų atvejuose [Sch90]. Literatūroje didelis dėmesys skiriamas tiek analizinių, tiek ir skaitinių reakcijos-difuzijos uždavinių sprendimo metodų kūrimui. Netiesinė išraiška reakcijos-difuzijos lygčių sistemoje yra Michaelio-Menten funkcija. Kai kuriose atvejuose Michaelio-Menten funkcija pritaikoma kaip tiesinė funkcija [GB07, 361]. Išnagrinėkime analizinio sprendinio atvejį biojutiklio modeliui aprašytam dalinėmis diferencialinėmis lygtimis (10), pradine sąlyga (11) ir kraštine (12).

Kai S_0 koncentracija yra pamatuota kaip labai maža palyginus su Michaelio konstanta K_M :

$$\forall \epsilon \in (0, 1) \quad \exists \delta < \epsilon \quad \square \quad (21)$$

netiesinė Michaelio-Menten funkcija $V(S)$ supaprastinama iki pirmos eilės,

$$V(S) = \frac{V_{\max} S}{K_M + S} \sim \frac{V_{\max}}{K_M} S \quad (22)$$

kur k – tiesinis fermentų kinetikos koeficientas. Fermento reakciją galima nagrinėti kaip pirmos eilės, kai substrato koncentracija yra mažesnė negu $0.2K_M$ [BIK10]. Taikant pateiktą aproksimaciją reakcijos difuzijos lygtis ir pradinių ribinių reikšmių problema gali būti išspręsta analitiškai. Biojutiklio pusiausvyrosios srovės tankis gali būti paskaičiuotas pagal formulę [Kul81]:

$$I_S = \frac{1}{a} - \frac{1}{\cos \sigma} \quad (23)$$

$$\sigma = \frac{V_{\max} S^2}{D_S K_M}$$

kur σ^2 – bedimensis difuzijos modulis.

Esant labai didelei substrato koncentracijai,

$$\forall \epsilon \in (0, 1) \quad \exists \delta > \epsilon \quad \square \quad (24)$$

netiesinė Michaelio-Menten funkcija $V(S)$ susimažina iki nulinės eilės:

$$V(S) = \frac{V_{\max} S}{K_M + S} \sim \frac{V_{\max}}{K_M} S \quad (25)$$

Substrato koncentracija gali būti didelė, jeigu pakrauta mažai fermento arba per didelė substrato koncentracija. Esant tokiam atvejui, irgi galima gauti analizinį sprendinį [CB80]:

$$I_S = \frac{EV}{L} \frac{d}{\dots} \quad (26)$$

Matematinio modelio adekvatumas gali būti patikrintas panaudojant žinoma analizinį sprendinį [BIK10].

2. Amperometrinis biojutiklis su chemiškai modifikuotu elektrodu

Chemiškai modifikuotas elektrodas (CME) yra gaminamas modifikuojant anglinį elektrodą su redoks aktyviu komponentu (mediatoriumi), kuris reaguoja su fermentu. Elektrodo modifikacijai naudojama elektrodo adsorbcija arba kovalentinis mediatoriaus imobilizavimas. Biojutiklių su CME modeliavimo savitumą lemia ant elektrodo paviršiaus esantis mediatorius, kuris sukuria ypatingas kraštines sąlygas aprašant matematinį modelį. CME yra nagrinėjamas kaip elektrodas turintis sąlyginai ploną tirpų mediatoriaus sluoksnį ir padengtas fermento membrana. Toliau darbe panaudotas žodis biojutiklis reikš amperometrinį biojutiklį su CME.

Priklausomai nuo pasirinkto biojutiklio ir vykstančių jame kinetinių reakcijų parenkamas kinetinis modelis. Modeliuojamo biojutiklio kinetinis modelis aprašomas panaudojant Michaelis-Menten kinetinį mechanizmą [BK08, 4802]:



kur E_{ox} - oksiduotas fermentas, E_{red} – redukuotas fermentas ir ES – fermento substratas. P ir P_1 yra reakcijos produktai. Modelio reakcijos vyksta pagal „ping-pong“ reakcijos mechanizmo schemą. Kitame šaltinyje [LR10, 328] modelio aprašyme aptinkamas dar vieno žingsnio aprašymas:



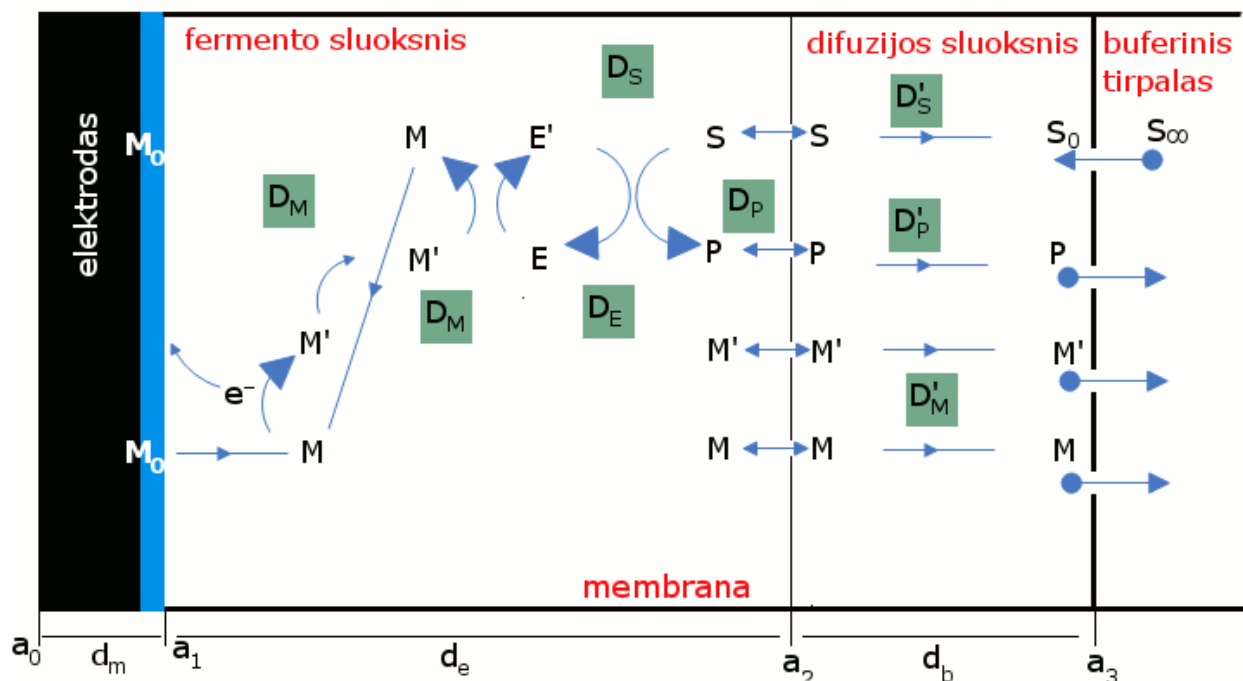
Reakcija (29) vyksta ant elektrodo paviršiaus, kur elektrodas oksiduoja mediatorių. Oksiduotas mediatorius dalyvauja reakcijoje su redukuotu fermentu. Laikoma, kad fermentas E yra imobilizuotas polimerinėje matricoje taip, kad jo koncentracija yra vienoda per visą polimero sluoksnį. Substratas S gali laisvai difunduoti per plėvelę į tirpalą su difuzijos koeficientu D_s . Reikia turėti omenyje, kad substrato difuzijos koeficiento dydis tirpale gali skirtis [Lyo06].

Redoks mediatorius abiejose būsenose - redukuotas arba oksiduotas gali patekti į tirpalą. Biojutiklio veikimo pradžioje, fermento membranoje nėra substrato ir mediatorius greitai difunduoja nuo elektrodo paviršiaus palei membraną ir netgi į difuzijos sluoksnį [BIK10]. Todėl galima mediatorius išplovimas iš fermento membranos, be atsistatymo. Mediatorius gali atsistatyti (regeneruoti) tik ant elektrodo paviršiaus sudarydamas didesnę srovės tankio dydį [Lyo06]. Srovės tankis naudojamas stebėti katalitinės reakcijos seką. Reakcijos kinetiką gali būti ribojama keliais aspektais [Lyo06]:

- 1) reakcijos tarp redukuoto fermento ir oksiduoto mediatoriaus. Tokia situacija reiškia, kad membranoje yra didelis kiekis redukuotų fermentų;

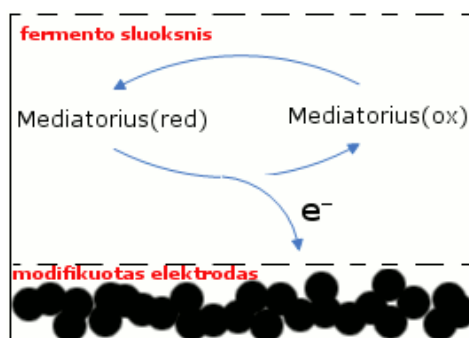
2) jeigu oksiduotų fermentų yra daug, kinetika ribuojama reakcijos tarp oksiduoto fermento ir substrato.

Taip pat gali būti įvertintas santykis tarp mediatoriaus ir fermento reakcijos su mediatoriaus difuzija membranoje. Mediatoriaus koncentracija elektrodo detektoriaus paviršiuje ($x=0$) yra fiksuota taikomojo potencialo reikšme.



3 pav. Biojutiklyje vykstančių reakcijų modelis[Lyo06, BIK10]

3 pav. Biojutiklyje vykstančių reakcijų modelis[Lyo06, BIK10] pateikiamas d_m – mediatoriaus sluoksnio storis, d_e – fermento sluoksnio storis, d_b – difuzijos sluoksnio storis. Grafikas vaizduoja masės pernešimo ir reakcijų procesų, vykstančių keliose biojutiklio sluoksniuose (mediatoriaus, fermento ir difuzijos sluoksniuose) schemą. Mediatorius yra išsklaidytas inertiniuose pralaidžiuose anglies dalelėse (pvz., grafitas)



4 pav. Chemiškai modifikuotas elektrodas su anglies dalelėmis[WDW+04]

Kuriant modelį buvo laikomasi šių prielaidų[WDW+04, 206]:

1) pasipriešinimas išoriniam masės pernešimui nepaisomas: medžiagų dalelės tirpale yra ganėtinai mažos ir gerai išmaišytos. Be to, apsauginės membranos angelių

dydžiai yra palygintinai dideli. Membranos paskirtis yra apsauga ir ji neįtakoja masės pernešimo;

- 2) substrato pernešimas membranos viduje laikosi Fiko dėsnio;
- 3) fermentas homogeniškai pasiskirstęs viduje membranos;
- 4) iki reakcijos pradžios mediatorius yra tik ant elektrodo paviršiaus, membranoje jo nėra;
- 5) elektronas gautas iš fermento ir substrato reakcijos perleidžiamas mediatoriui (pvz., ferrocene) ir toliau pernešamas prie elektrodo, generuojant elektros srovę;
- 6) atstumas, kurį tenka nukeliauti redukuotam mediatoriui prie elektrodo paviršiaus (chemiškai pakeisto elektrodo atveju – pralaidžios anglies dalelės), nepaisomas;
- 7) fermentų reakcijos atitinka Michaelis-Menten kinetiką;

Amperometrinio biojutiklio su chemiškai modifikuotų elektrodų modelis susideda iš trijų sluoksnių (žr. 3 pav. Biojutiklyje vykstančių reakcijų modelis[Lyo06, BIK10]):

- 1) fermento sluoksnis: vyksta fermentinės reakcijos (su mediatoriumi ir substratu). Taip pat sluoksnyje vyksta masės pernešimas;
- 2) difuzijos sluoksnis: vyksta tik substrato, mediatoriaus, produkto, masės pernešimas;
- 3) mediatoriaus sluoksnis: chemiškai modifikuotas elektrodas, vyksta tik mediatoriaus masės pernešimas.

Papildomai yra buferinio tirpalo sritis, kurioje yra skystis su nuolatine substrato koncentracija. Sritis nėra modeliuojama, bet jos substrato koncentracija atsispindi DDL kraštinėje sąlygoje.

2.1. Matematinis modelis

2.1.1. Pagrindinės reakcijos-difuzijos lygtys

Šiame skyriuje yra pateiktos modeliuojamo biojutiklio reakcijos-difuzijos lygtys, pradinės ir kraštinės sąlygos, biojutiklio atsako apskaičiavimo formulė.

2.1.1.1. Mediatoriaus sluoksnis

Mediatoriaus sluoksnis yra plonesnis ($d_m < d_e$, $d_m < d_b$) už kitus biojutiklio modeliuojamus sluoksnius [BK08, LR10]. Sluoksnį sudaro chemiškai modifikuotas elektrodas su anglies dalelėmis, kuriose yra pasiskirstęs mediatorius. Prasidedant biojutiklio veikimui, vyksta mediatorius difundavimas į fermento sluoksnį. Fermento sluoksnyje mediatorius dalyvauja reakcijose:

- 1) oksiduojant fermentą – fermentas atiduoda elektroną, vyksta mediatoriaus redukavimas;
- 2) atiduoda elektroną prie elektrodo paviršiaus – oksiduojamas, sukuriant srovę.

Autoriaus žinioms iki šiol [BK08, LR10] mediatoriaus sluoksnis nebuvo atskirai modeliuojamas. Mediatoriaus koncentracija M_0 buvo laikoma konstanta, užduodant atitinkamas su laiku nesikeičiančias kraštinės sąlygos reikšmes. Šiame darbe nagrinėjamas atvejis, kai mediatorius vykstant reakcijai išsiplauna iš mediatoriaus sluoksnio (chemiškai modifikuoto elektrodo sluoksnio). Mediatoriaus pakeitimą galima nagrinėti dviem būdais: 1) dviejų sluoksnių modelyje pakeičiant fermento sluoksnio kraštinės sąlygos reikšmę (pvz., $M(0,t) = F(t)$); 2) modeliuojant atskirą sluoksnį. Bendras mediatoriaus kiekis sluoksnyje mažėja dėl dviejų priežasčių:

- 1) difundavimo į fermento sluoksnį;
- 2) mediatorius išsiplauna iš biojutiklio ir nedalyvauja atsistatyme, neoksiduojamas.

Kitų medžiagų mediatoriaus sluoksnyje nėra, produktas ir substratas į sluoksnį nepatenka. Tokiu būdu, mediatoriaus sluoksnis modeliuojamas viena masės pernešimo difuzijos lygtimi:

$$\frac{\partial}{\partial t} - D_M \frac{\partial^2}{\partial x^2} M_m(x,t) = 0 \quad (30)$$

kur x reiškia erdvę, t – laiką, $M_m(x,t)$ – mediatoriaus koncentracija mediatoriaus sluoksnyje, D_M - mediatoriaus difuzijos koeficientas. Pradinis $x = 0$ tai chemiškai modifikuoto elektrodo pagrindas, $x = a_1 = d_m$ – riba tarp mediatoriaus sluoksnio ir fermento.

2.1.1.2. Fermento sluoksnis

Turint omenyje tariamą pastovios būsenos aproksimaciją, tarpinio ES komplekso koncentracija nekinta ir paprastai jos nepaisoma modeliuojant biocheminį biojutiklio elgesį. Papildomai daroma prielaida, jog elektrodas yra simetriškas, imobilizuotas fermentas skirstomas fermento sluoksnio terpėje homogeniškai. Masės pernešimas ir kinetika fermento sluoksnyje išreiškiama reakcijos-difuzijos lygčių sistema ($t > 0$) [BK08, 4802]:

$$\frac{\partial}{\partial t} - D_m \frac{\partial^2}{\partial x^2} M_f(x,t) = 0 \quad (31)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} - D_m \frac{\partial^2}{\partial x^2} M_f(x,t) = 0 \quad (32)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} - D_m \frac{\partial^2}{\partial x^2} M_f(x,t) = 0 \quad (33)$$

kur x reiškia erdvę, t – laiką, $S_e(x, t)$, $M_e(x, t)$, $P_e(x, t)$ – tai substrato, mediatoriaus ir reakcijos produkto koncentracijos, a_1 yra mediatoriaus sluoksnio pabaiga, $a_2 = d_m + d_e$ yra fermento sluoksnio išorinė riba, D_{S_e} , D_{M_e} , D_{P_e} – substrato, mediatoriaus ir produkto reakcijos difuzijos koeficientai ir $V(M_e, S_e)$ – tariamai pastovios būsenos fermento reakcijos sparta tvarkingos ping-pong schemos. Pagal schemą [BK08, 4802]:

$$\frac{E_t}{V} = \frac{1}{K_{cat}} + \frac{1}{K_{red}S_e} + \frac{1}{K_{ox}M_e} \quad (34)$$

kur E_t – suminė fermento koncentracija, $k_{cat} = k_2$ – ES junginio vartimo katalitinė konstanta, $k_{ox} = k_3$ fermento sąveikos su mediatoriumi konstanta, k_{red} – bimolekulinė fermento ir substrato sąveikos konstanta, $k_{red} = k_2/K_M = k_1k_2/(k_{-1} + k_2)$. Bendras E_t dydis yra suma visų fermentinių formų ir laikomas pastoviu vienetu fermento sluoksnyje, $E_t = E_{ox} + E_{red} + E_s$. Iš (34) gaunama tokia netiesinės lygties reakcijos spartos išraiška [BK08, 4802]:

$$V(M_e, S_e) = \frac{E_t k_{cat} k_{red} k_{ox} M_e S_e}{K_{red} K_{ox} M_e S_e + \dots} \quad (35)$$

2.1.1.3. Difuzijos sluoksnis

Už fermento sluoksnio vyksta tik masės pernešimo difuzija. Išorinis masės pernešimas paklūsta baigtinės difuzijos režimui ($t > 0$) [BK08, 4802]:

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} \quad (36)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} \quad (37)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} \quad (38)$$

kur $S_b(x, t)$, $M_b(x, t)$ ir $P_b(x, t)$ – substrato, mediatoriaus ir produkto koncentracija difuzijos sluoksnyje, a_2 – fermento sluoksnio išorinė riba, $a_3 = d_m + d_e + d_b$ – difuzijos sluoksnio išorinė riba, D_{S_b} , D_{M_b} , D_{P_b} – difuzijos koeficientai. Pagal Nernsto principą sluoksnio storis ($a_2 < a_3$) išlieka pastovus laikui bėgant. Difuzijos sluoksnis dar vadinamas Nernsto sluoksniu. Tirpalas juda ir yra vienodos koncentracijos.

2.1.2. Pradinės sąlygos

Reakcija biojutiklyje prasideda patenkant substratui į difuzijos sluoksnį. Pradinės lygčių sąlygos apibrėžiamos lygtimis ($t=0$).

- 1) Mediatoriaus sluoksnis. Tariame, kad mediatoriaus koncentracija paskirstyta tolygiai visame elektrode:

$$M_m(x, 0) = \dots \leq \dots \quad (39)$$

kur M_0 – pradinė mediatoriaus koncentracija.

- 2) Fermento sluoksnis. Iki biojutiklio veikimo pradžios fermento sluoksnyje mediatoriaus, substrato ir produkto koncentracijos yra nulinės:

$$S_e(x, 0) = \dots \quad (40)$$

$$M_e(x, 0) = \dots \quad (41)$$

$$P_e(x, 0) = \dots \leq \dots \quad (42)$$

- 3) Difuzijos sluoksnyje. Nuliniam laiko momentui substrato koncentracija difuzijos sluoksnyje yra nulinė. Tik sluoksnio pakraštyje koncentracija lygi konstantiniam dydžiui S_0 – substrato koncentracija buferiniame tirpale. Mediatoriaus ir produkto koncentracijos yra nulinės:

$$S_b(x, 0) = \begin{cases} < \end{cases} \quad (43)$$

$$M_b(x, 0) = \dots \quad (44)$$

$$P_b(x, 0) = \dots \leq \dots \quad (45)$$

2.1.3. Kraštinės sąlygos

Riboje tarp dviejų sričių su skirtingomis difuzijomis, yra apibrėžiamos atitikimo sąlygos, galiojančios kai $t > 0$. Surašykime atitikimo ir kraštines sąlygas:

- 1) Ant elektrodo pagrindo mediatoriaus srautas nepatenka už sluoksnio ribų. Gauname nepratekėjimo sąlygą:

$$D_{M_m} \frac{\partial}{\partial} \dots - \dots \quad (46)$$

- 2) Mediatoriaus sluoksnio ir fermento riboje produkto koncentracija fermento sluoksnyje dėl elektrodo poliarizacijos nuolatos sumažinama iki nulio. Substratas yra elektriškai neaktyvi substancija. Mediatoriaus sluoksnio riboje mediatoriaus srautas yra lygus atitinkamam fermento sluoksnio mediatoriaus srautui:

$$D_{M_m} \frac{\partial}{\partial} \dots - \dots = \dots \quad (47)$$

$$D_{S_e} \frac{\partial}{\partial} \dots - \dots \quad (48)$$

$$P_e(a_1, t) = \quad (49)$$

- 3) Fermento ir difuzijos sluoksnių riboje substrato, mediatoriaus ir produkto srautai per nejudantį išorinį sluoksnį yra lygūs atitinkamiems srautams ateinantiems per fermento membranos paviršių. Padalijimas tarp substrato, mediatoriaus, produkto membranoje ir difuzijos sluoksnyje laikomas lygiu [BK08, 4803]:

$$D_{S_e} \frac{\partial}{\partial} \quad - \quad \hat{\quad} \quad = \quad (50)$$

$$D_{M_e} \frac{\partial}{\partial} \quad - \quad \hat{\quad} \quad = \quad (51)$$

$$D_{P_e} \frac{\partial}{\partial} \quad - \quad \hat{\quad} \quad = \quad (52)$$

- 4) Difuzijos sluoksnio ir buferinio tirpalo riboje produkto ir mediatoriaus koncentracijos yra nulinės, substrato koncentracija lygi substrato koncentracijai buferiniame tirpale. Koncentracijos yra konstantos ir nesikeičia su laiku:

$$S_b(a_3, t) = \quad (53)$$

$$M_b(a_3, t) = \quad (54)$$

$$P_b(a_3, t) = \quad (55)$$

2.1.4. Biojutiklio atsakas

Fiziniame eksperimente amperometrinio biojutiklio atsakas yra išmatuotas srovės tankis. Anodo srovės tankis yra tiesiogiai proporcingas reakcijos produkto srautui elektrodo paviršiuje [TKW87]. Kadangi tankis tiesiogiai proporcingas elektrodo paviršiaus sričiai, tankis yra normalizuotas pagal paviršiaus plotą. Biojutiklio srovės tankis $I(t)$ esant laikui t gali būti apskaičiuotas pagal Faradėjaus ir Fiko dėsnius [BK08, 4804]:

$$I(t) = \quad \frac{\partial}{\partial} \quad (56)$$

kur n_e – tai skaičius elektronų įtrauktų į krūvio perdavimą ant elektrodo paviršiaus. Ir F – Faradėjaus konstanta, $F=96485,339$ K/mol. Pusiausvyrosios srovės tankis gaunamas laiko momentu $t \rightarrow \infty$ [GB07, 361]:

$$I_s = \quad_{t \rightarrow \infty} \quad (57)$$

kur I_s – pusiausvyrosios srovės tankis.

2.2. Bedimensis modelis

Bedimensis modelis sudarytas iš bedimensių kintamųjų. Tai tokie kintamieji, kurie nepriklauso nuo matavimo vienetu (laiko, erdvės). Bedimensiai kintamieji gaunami perskirstant kintamųjų matavimo vienetų mastelį pagal dydžius, kurie yra tiriamos problemos, šiuo atveju modeliuojamo biojutiklio, charakteristikos[Sal08]. Prieš bedimensio modelio parametrų aprašymą, įvesime tokius substrato, mediatoriaus, produkto koncentracijų funkcijų apibrėžimus:

$$S(x,t) = \begin{cases} t_1 \leq x < l_1 \\ t_2 \leq x \leq l_2 \end{cases} \quad (58)$$

$$M(x,t) = \begin{cases} 0 \leq x < l_1 \\ x \leq l_2 < l_1 \\ a_2 < x \leq l_2 \end{cases} \quad (59)$$

$$P(x,t) = \begin{cases} t_1 \leq x < l_1 \\ t_2 < x \leq l_2 \end{cases} \quad (60)$$

Bedimensiai modelio parametrai:

$$\begin{aligned} x' &= \frac{L}{a_m} = \frac{L}{K_{cat}} = \frac{L}{K_{cat}} = \frac{L}{K_{cat}} = \frac{L}{a_m} \\ S_0 &= \frac{L}{K_{cat}} = \frac{L}{K_{cat}} = \frac{L}{a_m} = \frac{L}{a_m} \end{aligned} \quad (61)$$

Pagrindinės reakcijos-difuzijos lygtys perrašomos:

1) Mediatoriaus sluoksnis:

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} = 0 \quad (62)$$

2) Fermento sluoksnis:

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} = \dots + \dots \quad (63)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} = \dots + \dots \quad (64)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} - \frac{\partial^2}{\partial x^2} = \dots + \dots \quad (65)$$

$$\sigma = \frac{\Gamma L}{\nu_{M_m}} = \frac{\Gamma L}{\nu_{M_m}} < < + > \quad (66)$$

3) Difuzijos sluoksnis:

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (67)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (68)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (69)$$

Pradinės sąlygos perrašomos ($t=0$):

$$M' \dots = \left\{ \dots \leq \dots \right. \quad (70)$$

$$S'(x') \dots = \left\{ \dots + \dots \right. \quad (71)$$

$$P' \dots = \dots \leq \dots \quad (72)$$

Kraštinės ir atitikimo sąlygos perrašomos ($t>0$):

1) Ant elektrodo pagrindo:

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (73)$$

2) Mediatoriaus ir fermento sluoksnių riboje:

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (74)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (75)$$

$$P' \dots = \dots \quad (76)$$

3) Fermento ir difuzijos sluoksnių riboje:

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (77)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (78)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (79)$$

4) Difuzijos sluoksnio ir buferio tirpalo riboje:

$$\frac{\partial}{\partial x} \dots \quad (80)$$

5) Bedimensis srovės tankis $I'(t)$ paskaičiuojamas kaip:

$$I' = \frac{\partial}{\partial t} \left(\sum_{i=1}^n D_{P_e} K_{cat} \right) = \dots \quad (81)$$

2.3. Skaitinis modelis

Modeliuojamo biojutiklio modelio sudarymas prasideda nuo erdvės ir laiko tinklelių sudarymo:

$$\omega = \dots = \tau = \dots \quad (82)$$

kur T – analizės proceso trukmė, ω_h ir ω_τ – pastovus erdvės ir laiko diskretiniai tinkleliai.

Diferencialinės lygtis diskretizuojamos domene taikant tokius apibrėžimus:

$$S_i^j = \dots \quad (83)$$

2.3.1. Kraštinių sąlygų aproksimavimas

Kraštinės sąlygos pakeičiamos:

1) Elektrodo pagrindo riboje:

$$D_{M_m} \frac{M_1^{j+} - M_0^{j+}}{h} = \dots \quad (84)$$

2) Mediatoriaus ir fermento sluoksnių riboje:

$$D_{M_m} \frac{M_{N_1}^{j+} - M_{N_1+}^{j+}}{h} = \dots$$

gauname $M_{N_1}^{j+} = \dots \times \dots + \dots \times \dots + \dots$

$$D_{S_e} \frac{S_{N_1+}^{j+} - S_{N_1}^{j+}}{h} = \dots$$

gauname $S_{N_1}^{j+} = \dots \quad (85)$

$$D_{P_e} \frac{P_{N_1+}^{j+} - P_{N_1}^{j+}}{h} = \dots$$

gauname $P_{N_1}^{j+} = \dots$

$j = \dots$

3) Tarp fermento ir difuzijos sluoksnių:

$$\begin{aligned}
D_{S_e} \frac{S_{N_2}^{j+}}{h} &= \dots \frac{-}{h}, \\
\text{gauname } S_{N_2}^{j+} &= \dots + \dots + \dots \\
D_{P_e} \frac{P_{N_2}^{j+}}{h} &= \dots \frac{-}{h}, \\
\text{gauname } P_{N_2}^{j+} &= \dots + \dots + \dots \\
D_{M_e} \frac{M_{N_2}^{j+}}{h} &= \dots \frac{M_{N_2}^{j+}}{h}, \\
\text{gauname } M_{N_2}^{j+} &= \dots + \dots + \dots \\
j &= \dots - \dots
\end{aligned} \tag{86}$$

4) Tarp difuzijos sluoksnio ir buferinio tirpalo tampa:

$$\begin{aligned}
S_{N_3}^{j+} &= \dots = \dots = \dots \\
j &= \dots - \dots
\end{aligned} \tag{87}$$

2.3.2. Pradinių sąlygų aproksimavimas

Pradinės sąlygos aproksimuojamos:

1) Mediatoriaus sluoksnyje:

$$M_i^0 = \dots = \dots \tag{88}$$

2) Fermento sluoksnyje ir difuzijos sluoksniuose:

$$\begin{aligned}
S_i^0 &= \left\{ \dots \right. \\
P_i^0 &= \dots = \dots \\
M_i^0 &= \dots = \dots
\end{aligned} \tag{89}$$

2.3.3. Pagrindinių lygčių aproksimavimas

Dalinės diferencialinės lygtys panaudojant išreikštine baigtinių skirtumų schemą užrašomos:

1) Mediatoriaus sluoksnio:

$$\begin{aligned}
\frac{M_i^{j+} - M_i^j}{\tau} &= \dots - \frac{M_i^{j+} - M_i^j}{h^2} + \dots, \\
\text{gauname } M_i^{j+} &= \dots + \frac{M_i^j - M_i^{j-1}}{h^2} + \dots, \\
j &= \dots - \dots = \dots - \dots
\end{aligned} \tag{90}$$

2) Fermento sluoksnio:

$$\begin{aligned}
\frac{S_i^{j+} -}{\tau} &= \dots \\
\text{gauname } S_i^{j+} &= + \left(\dots \right) \\
\frac{P_i^{j+} -}{\tau} &= \dots \\
\text{gauname } P_i^{j+} &= + \left(\dots \right) \\
\frac{M_i^{j+} -}{\tau} &= \dots \\
\text{gauname } M_i^{j+} &= + \left(\dots \right) \\
j &= \dots
\end{aligned} \tag{91}$$

kur

$$V(M_i^j, S_i^j) = \frac{E_i k_{cat} k_{red} k_{ox} M_j^i S_j^i}{\kappa_{red} \kappa_{ox} M_j^i S_j^i + \dots} \tag{92}$$

3) Difuzijos sluoksniu:

$$\begin{aligned}
\frac{S_i^{j+} -}{\tau} &= \dots \\
\text{gauname } S_i^{j+} &= + \dots \\
\frac{P_i^{j+} -}{\tau} &= \dots \\
\text{gauname } P_i^{j+} &= + \dots \\
\frac{M_i^{j+} -}{\tau} &= \dots \\
\text{gauname } M_i^{j+} &= + D_{M_b} \frac{M_{i+}^j -}{h^2} + \dots \\
j &= \dots
\end{aligned} \tag{93}$$

Biojutiklio srovės tankis:

$$I_j = \dots \tag{94}$$

2.3.4. Biojutiklio atsako laikas

Moksliniuose šaltiniuose galima aptikti biojutiklio atsako laiko apskaičiavimo galimybes. Juose [GB07, BK08] atsako laikas yra apibrėžiamas kaip laikas, kai absoliutus srovės tankio

pakitimas, normalizuotas pagal esamą srovės tankį, nukrenta žemiau negu tam tikra maža bematė reikšmė ε [GB07, 363]:

$$T_R = \left\{ \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\} \quad (95)$$

kur T_R – atsako laikas, $I(t)$ – srovės tankis pasiektas esant laikui t , I_S – pusiausvyros srovės tankis. Siūlomos ε reikšmės yra nuo 10^{-3} - 10^{-6} , tačiau ε artėjant prie 0, atsako laikas $T_R \rightarrow \infty$. Vienas iš galimų optimizavimo variantų pasiūlytų šaltiniuose [BIK10] yra naudoti nepastovų diskretinį laiko tinklėlį. Diskretizuojant atsako laiką (95), gauname [BK08, 4805]:

$$T_R = \left\{ \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\} \approx \quad (96)$$

2.3.5. Sprendinio stabilumas

DDL skaitinio sprendinio stabilumas priklauso nuo dviejų parametru parinkimo [BIK10]: laiko tinklelio ir erdvės tinklelio žingsnių. Jų tarpusavyje santykis turi būti [GB07, 363]:

$$\tau \leq \left\{ \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\} \quad (97)$$

kur D_S, D_P, D_M – substrato, produkto, mediatoriaus difuzijos koeficientai: $D_{M_M}, D_{S_e}, D_{M_e}, D_{P_e}, D_{S_b}, D_{M_b}, D_{P_b}$ skirtinguose sluoksniuose. Parametras τ lyginamas su mažiausia trupmena. Norint ją surasti iš difuzijos koeficientų pasirenkamas didžiausias, kadangi koeficiento reikšmė yra vardiklyje. Trupmenos reikšmė bus mažiausia esant didžiausiai vardiklio reikšmei, jeigu skaitiklis yra vienodas. Dažniausiai, difuzijos sluoksnio koeficientai yra didesni negu kitų sluoksnių.

2.3.6. Sprendinio patvirtinimas

Parengtas skaitinis modelis taikomas aprašytoms matematinio modelio DDL spręsti. Modelis padeda paskaičiuoti srovės tankį, ištirti biojutiklio savybes. DDL bendras analizinis sprendinys dėl netiesinės reakcijos spartos išraiškos neegzistuoja. Tuo tarpu skaitinis modelis gali paskaičiuoti sprendinį toms parametru reikšmėms, kurioms analizinis sprendinys neegzistuoja. Prieš skaitinio modelio panaudojimą, jo adekvatumas turi būti patikrintas pagal žinomus dalinius analizinius sprendinius. Tai padeda išsiaiškinti modelio tikslumą. Žinomas [Sch90, BIK10] amperometrinių biojutiklio dviejų sluoksnių analizinis sprendinys.

Pagal reakcijos spartą $V(M_e, S_e)$ (35) daroma išvada, jog biocheminės reakcijos kinetika žymiai priklauso nuo substrato ir mediatoriaus koncentracijų santykių:

$$\Sigma = \frac{v_{max}}{M_0 K_{ox}}, \quad (98)$$

kur Σ – bedimensis substrato ir mediatoriaus koncentracijų sujungtų su atitinkamomis reakcijų spartomis santykis. Žinomas analizinis sprendinys remiasi reakcijos spartos supaprastinimu iki tiesinio nario.

Santykiškai mažam substrato kiekiui $\Sigma \ll 1$ reakcijos sparta (35) sumažinama pagal [BK08, 4806]:

$$V(M_e, S_e) = \frac{v_{max} S_e}{K_{red} S_e + v_{max}} \quad (99)$$

Kadangi mediatoriaus koncentracija neįeina į spartos išraišką, ji neįtakoja produkto koncentracijos. Vadinas imituojant biojutiklio atsaką pagrindinės lygties (32) galima nepaisyti. Esant labai mažoms substrato koncentracijoms $S_0 \ll d$, $V(M_e, S_e) \approx$ reakcijos sparta supaprastinama iki $V(M_e, S_e) =$. Kadangi, reakcijos spartos išraiška tampa tiesine, pusiausvyrosios srovės tankis I_S gali būti paskaičiuotas pagal formulę [Sch90, BIK10]:

$$I_S = \frac{1}{a_e + \left(\frac{1}{\sigma} + \frac{1}{\sigma} + \frac{1}{\sigma} + \dots \right)} \times \left(\frac{1}{\sigma} + \frac{1}{\sigma} + \frac{1}{\sigma} + \dots \right) \quad (100)$$

$$\sigma = \frac{v_{max} d^2}{D_{S_e}} \quad (101)$$

kur σ - bedimensis faktorius žinomas kaip difuzijos modulis arba Damkiochlerio, d_b – difuzijos sluoksnio storis, d_e – fermento sluoksnio storis. Difuzijos modulis palygina fermentinės reakcijos spartą $E v_{red}$ su difuzijos sparta D_{S_e} / d_e^2 .

Santykiškai mažai mediatoriaus koncentracijai kai $\Sigma \ll 1$, reakcijos greitis supaprastinamas iki [BK08, 4807]:

$$V(M_e, S_e) = \frac{v_{max} M_e}{K_{ox} M + v_{max}} \quad (102)$$

Tokiu atveju substrato koncentraciją modeliuojančios DDL gali būti praleistos. Esant mažoms mediatoriaus koncentracijoms, kai $M_0 \ll$, ir nuliniam difuzijos sluoksnio storiui $d_b =$, pusiausvyrosios srovės I_S tankis gali būti paskaičiuotas pagal formulę [Kul81]:

$$I_S = \frac{I_R}{a_e \sigma} \quad (103)$$

kur σ yra difuzijos modulis palyginantis fermento-mediatoriaus reakcijos spartą su difuzijos sparta, d_e – fermento sluoksnio storis.

Aprašytas patikrinimas pagal žinomus analizinius sprendinius buvo taikomas dviejų sluoksnių modeliui pirmuoju atveju, kai mediatoriaus koncentracijos nepaisoma; ir vieno sluoksnio modeliui antruoju atveju, kai substrato koncentracijos nepaisoma. Vieno sluoksnio modelis susideda tik iš fermento sluoksnio, difuzijos sluoksnis prilyginamas nuliui. Kadangi autoriaus darbe modeliuojamas biojutiklis turi vienu sluoksniu daugiau - mediatoriaus sluoksnį, tai norint patikrinti suprogramuotą skaitmeninį modelį pagal pateiktą analizinį sprendinį, mediatoriaus sluoksnio storis turi artėti prie nulio, $d_m \rightarrow 0$. Suprogramuoto skaitinio metodo paklaida paskaičiuojama pagal formulę:

$$E = \frac{I_R}{I_S} \times 100 \quad (104)$$

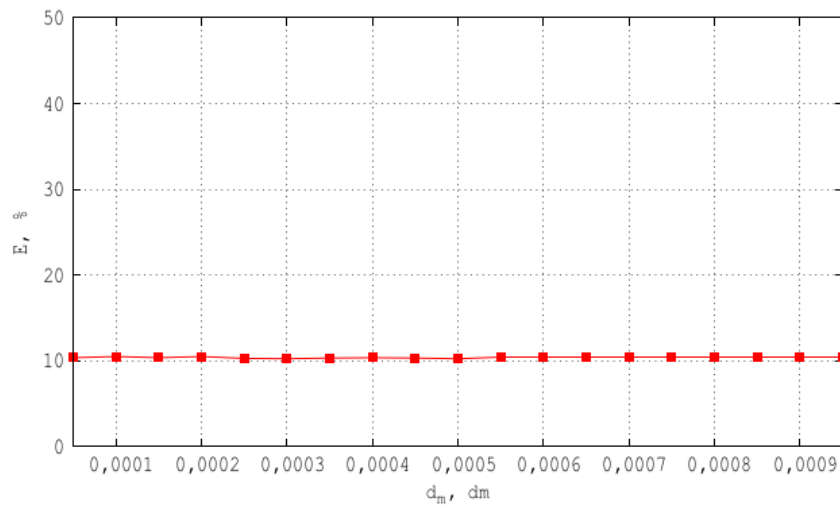
kur I_S – yra srovės tankis gautas pagal analizinį sprendinį, o I_R – pusiausvyrosios srovės tankio reikšmė gauta pagal skaitinį sprendinį. Patikrinimas atliekamas su tokiais fiksuotomis parametru reikšmėmis[BK08, 4806]:

$$\begin{aligned} D_{S_e} &= 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s} \\ D_{S_b} &= 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s} \\ k_{cat} &= 10^3 \text{ s}^{-1} \end{aligned} \quad (105)$$

Pirmam kraštiniam atvejui $\Sigma = 0$ imamos tokios reikšmės:

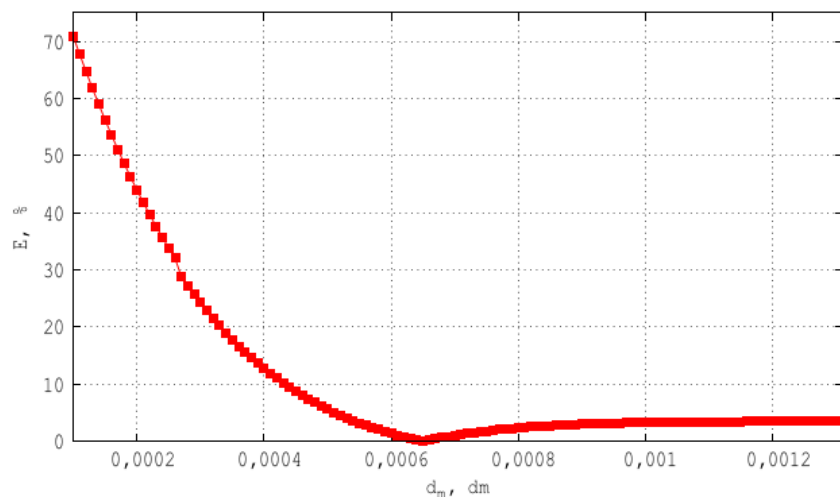
$$\begin{aligned} k_{red} &= 10^3 \text{ s}^{-1} \\ S_0 &= 10^{-2} \text{ mol/dm}^3 \end{aligned} \quad (106)$$

Paskaičiuoto analizinio sprendinio rezultatas yra $0,01024 \text{ A/dm}^2$. Modeliuojant mediatoriaus sluoksnį be mediatoriaus tirpimo pagal skaitinį metodą gautas srovės tankis – $0,0113 \text{ A/dm}^2$. Paskaičiuota paklaida lygi $\approx 10,35\%$. Skaitinio sprendimo paklaidų grafikas pavaizduotas 5 pav. Paklaidos E priklausomybė nuo mediatoriaus sluoksnio storio. Mediatoriaus sluoksnio pakeitimas nuo $5 \mu\text{m}$ iki $100 \mu\text{m}$ neturi įtakos paklaidos reikšmei ($\Sigma = 0$).



5 pav. Paklaidos E priklausomybė nuo mediatoriaus sluoksnio storio d_m be tirpimo modeliavimo

Modeliuojant tirpimą mediatoriaus sluoksnyje, paklaidų dinamiką keičiasi. Esant substrato $S_0 =$, mediatoriaus $M_0 =$ koncentracijoms, mažiausia gauta paklaida $\approx 0.5\%$ ($d_m = 63\mu\text{m}$).



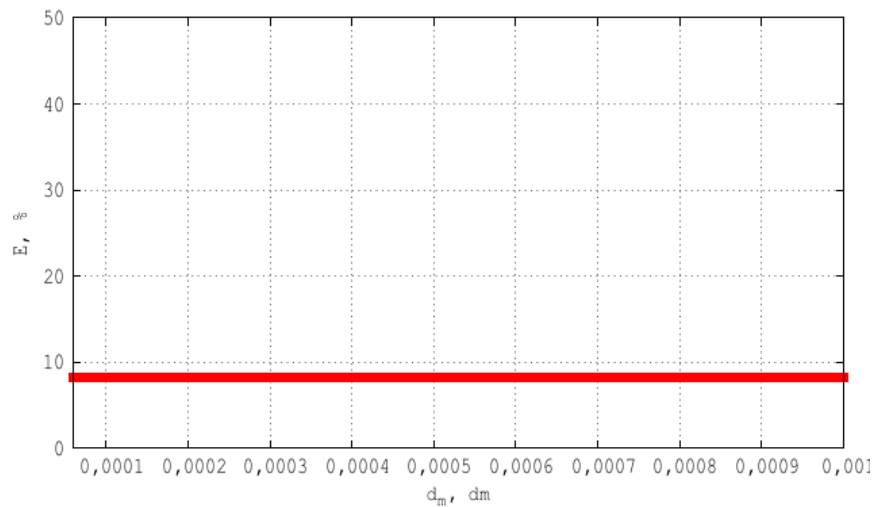
6 pav. Paklaidos E priklausomybė nuo mediatoriaus sluoksnio storio d_m su tirpimo modeliavimu

Antro kraštinio atvejo Σ parametrų reikšmės:

$$\begin{aligned}
 k_{red} &= & = & = & = & = \\
 S_0 &= & = & & &
 \end{aligned}
 \tag{107}$$

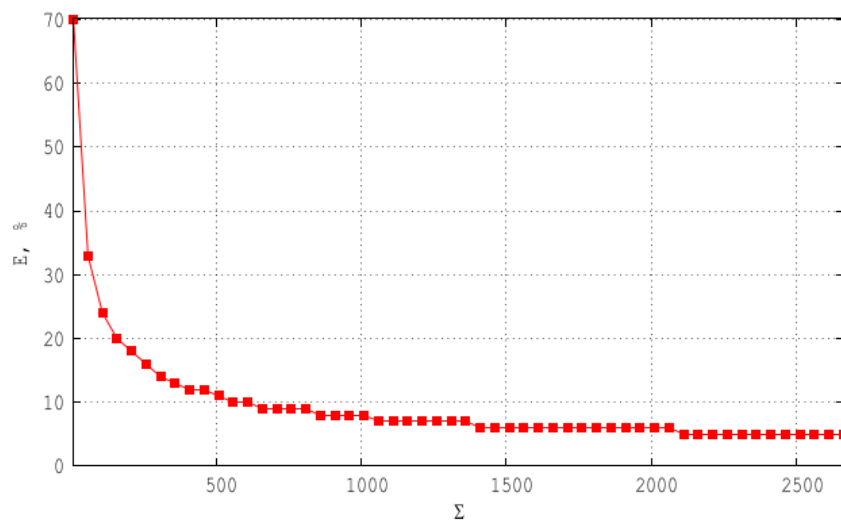
Šiuo kraštiniu atveju neprasminga modeliuoti mediatoriaus tirpimą norint patikrinti kompiuterinį modelį pagal pateiktą analizinę išraišką (žr. (103)), kadangi ploname mediatoriaus sluoksnyje esant mažai mediatoriaus koncentracijai biojutiklio generuota srovė bus maža (žr. 3.4 Modelių palyginimas) ir gauta paklaida bus didesnė negu 90%. Tuo tarpu, jeigu mediatorius netirpsta, paklaida priklauso nuo Σ reikšmės. Keičiant mediatoriaus sluoksnio storį paklaida nesikeičia (žr. 6 pav. , 7 pav.). Paskaičiuoto analizinio sprendinio rezultatas yra $\approx 86395 \text{ A/dm}^2$.

Pagal skatinį modelį apskaičiuotas srovės tankis lygus $\approx 14202 \text{ A/dm}^2$. Skaičiavimo paklaida lygi \approx .



7 pav. Paklaidos E priklausomybė nuo mediatoriaus sluoksnio storio d_m

Pateiktas grafikas (žr. 7 pav.) vaizduoja skaitinio modelio rezultatus priklausomai nuo Σ parametro, kai $\Sigma=10$ paklaida yra didelė (\approx), tačiau kai $\Sigma \square$ paklaida mažėja ir pasiekia \approx ribą ($\Sigma \approx$).



8 pav. Paklaidos E priklausomybė nuo Σ parametro, keičiant substrato koncentraciją

Patikrinus kompiuterinį modelį, galima jo pasinaudoti gauti sprendinius toms substrato ir mediatoriaus koncentracijų reikšmėms, kurioms analizinis sprendinys neegzistuoja.

3. Amperometrinio biojutiklio savybių tyrimas

Pagal amperometrinio biojutiklio su chemiškai modifikuotu elektrodu suformuluotą matematinį modelį (žr. 2.1 Matematinis modelis) buvo sudarytas skaitinis modelis (žr. 2.3 Skaitinis modelis), pateikiantis aproksimuotą duotų DDL sprendimą. Skaitinio modelio pagrindu buvo parašyta programa, simuliuojanti biojutiklio veikimą. Suprogramuotas modelis buvo patvirtintas (žr. 2.3.6 Sprendinio patvirtinimas). Turėdami programą galime tirti biojutiklio savybes (parametrus) įtakojančias biojutiklio veikimą. Šiame skyriuje tiriamos modeliuojamo biojutiklio srovės tankio priklausomybės nuo:

- 1) Σ (35) - mediatoriaus ir substrato koncentracijų;
- 2) d_m, d_e, d_b – mediatoriaus, fermento, difuzijos sluoksnių storį;
- 3) D_{M_M} - mediatoriaus difuzijos koeficiento mediatoriaus sluoksnyje.

Po savybių tyrimo, turimas modelis palyginamas su moksliniame straipsnyje [BK08] pateiktu modeliu, parodant jų skirtumą ir papildomo sluoksnio projektavimo įtaką. Biojutiklio savybių tyrimui tinka bedimensis modelis (žr. 2.2 Bedimensis modelis). Bedimensis modelis sumažina biojutiklio veikimą įtakojančių parametru skaičių ir palengvina savybių tyrimą. Fiksuojant vieną parametru dydžius, galima tirti kitų parametru įtaką. Tyrimas buvo atliekamas su tokiomis kintamųjų reikšmėmis:

$$\begin{aligned}
 D_{S_e} &= \dots = \dots = \dots ; \\
 D_{S_b} &= \dots = \dots = \dots = \\
 k_{cat} &= \dots = \dots = \dots = \\
 k_{red} &= \dots = \dots = \dots =
 \end{aligned}
 \tag{108}$$

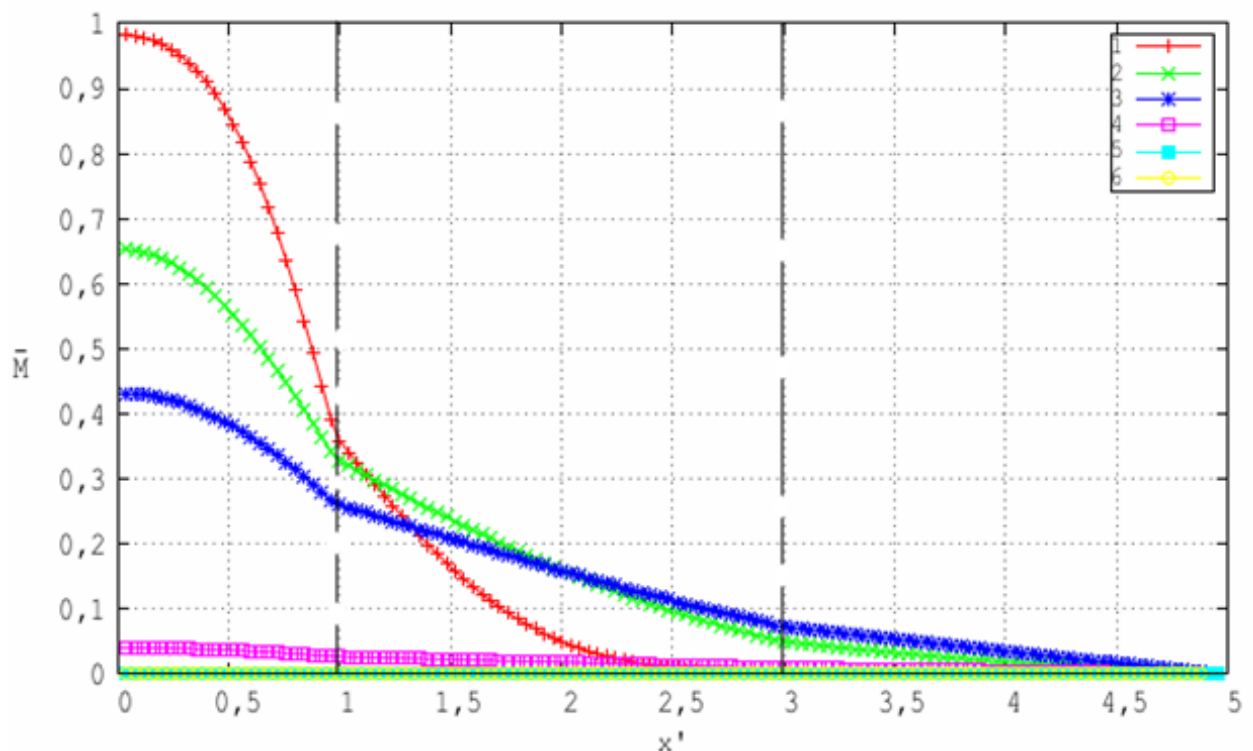
Kai kurios reikšmės buvo keičiamos priklausomai nuo tiriamos savybės. Pakeistos reikšmės išreikštinais nurodytos atitinkamuose skyriuose.

Svarbu pažymėti, jog sukurto modelio pusiausvyrosios srovės tankis pagal formulę (57) laikui $t \rightarrow \infty$ bus $I_S = \dots$, kadangi mediatorius išsiplaus iš biojutiklio. Tačiau taikant apibrėžimą (95) galima apskaičiuoti pseudo-pusiausvyrosios srovės tankį, kuris bus artimas maksimalios biojutiklio sugeneruotos srovės tankiui. Toliau skyriuose darbe aprašomo modelio pseudo-pusiausvyroji srovė bus vadinama sutrumpintai pusiausvyraja srove.

3.1. Medžiagų koncentracijų įtaka

Šiame poskyryje tiriamos dviejų biojutiklyje panaudojamų medžiagų mediatoriaus ir substrato įtaka biojutiklio srovės tankiui. Biojutiklio atsako laikas T_R – tai momentas, kai buvo gautas pusiausvyrosios srovės tankis. Apibrėžtas pagal formulę (95). Grafiniame tyrimo

vaizdavime (žr. 9 pav.) pateiktas mediatoriaus koncentracijos profilis gautas biojutiklio su substrato (1M) ir mediatoriaus 0,1M koncentracijomis skirtingais veikimo laikais su: 1) laiku dešimt kartų mažesniu už pusiausvyrosios srovės tankio paskaičiavimo momentą; 2) laiku, du kartus mažesniu už laiką kai buvo gautas pusiausvyrosios srovės tankis; 3) pusiausvyrosios srovės momentu; 4) penkis kartus didesniu ir t.t. Paryškintomis linijomis parodytos sluoksnių ribos: 1) tarp mediatoriaus sluoksnio ir fermento ($x' = 0, x = 1$); 2) tarp fermento ir difuzijos sluoksnio ($x' = 1, x = 3$). Laiko momentais $10xT_R$ ir $20xT_R$ kreivės sutampa – mediatorius išplautas iš biojutiklio. Bedimensis \bar{M} apskaičiuojamas $\bar{M} = \frac{M}{M_0} = \dots$.



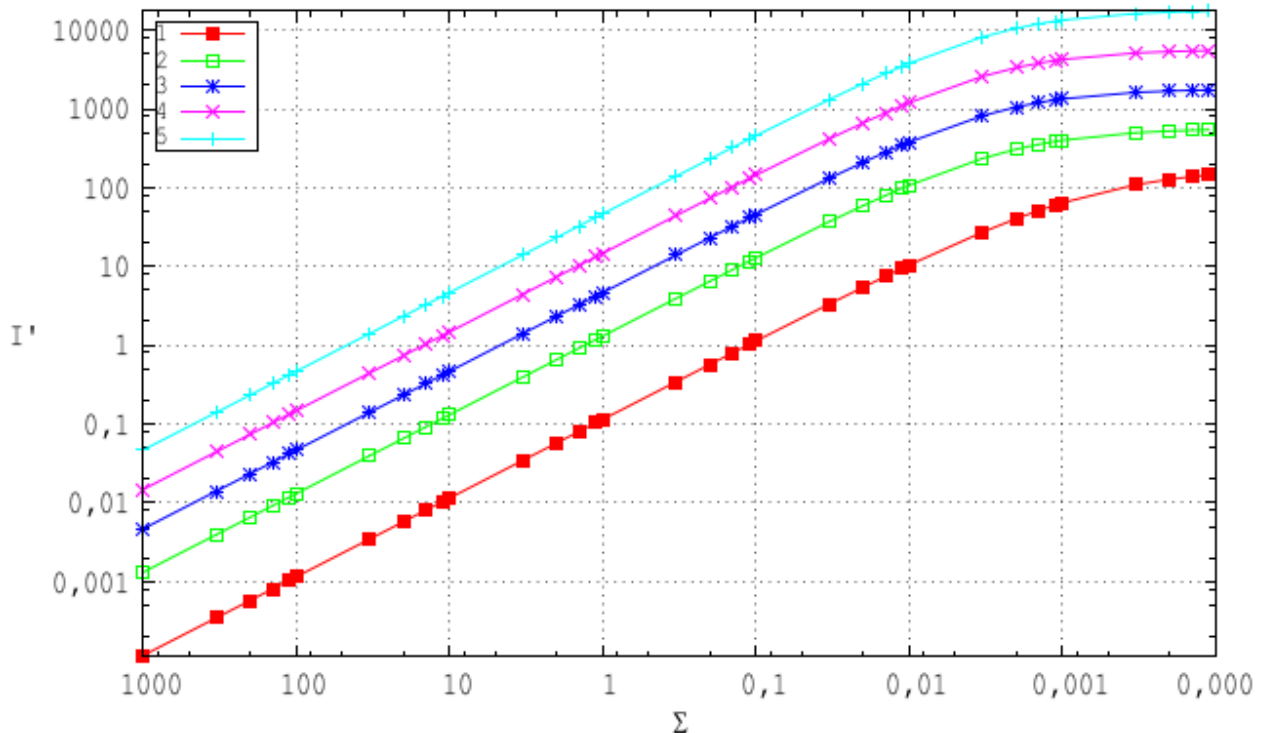
9 pav. Mediatoriaus koncentracijos profilis veikimo laiko momentais ($T_R = 19.2552s$): 1) $0,1xT_R$; 2) $0,5xT_R$; 3) $1x T_R$; 4) $5x T_R$; 5) $10 x T_R$; 6) $20 x T_R$. Substratas-1M, mediatorius-0,1M

3.1.1. Mediatoriaus koncentracijos įtaka

Bedimensis parametras Σ (98) parodo santykį tarp mediatoriaus ir substrato koncentracijų, sujungtų su atitinkamais reakcijų greičiais. Parametro išraiškoje keičiant tik mediatoriaus koncentraciją, galima gauti mediatoriaus įtakos biojutiklio atsako srovės tankiui duomenis. Priklausomybė nuo bedimensies pusiausvyros srovės tankio pavaizduota 10 pav. Substrato koncentracija laikoma konstanta $S_0 = 1M$. Mediatoriaus koncentracija buvo keičiama nuo $10\mu M$ iki $10M$. Taip pat buvo keičiama difuzijos modulio reikšmė σ nuo 10^2 iki 10^6 . Difuzijos modulis palygina fermentinės reakcijos greitį ($E_t k_{ox}$) ir difuzijos greitį mediatoriaus sluoksnyje

(D_{M_m} / d_m^2) . Difuzijos modulio reikšmė buvo keičiama varijuojant mediatoriaus sluoksnio dydį. Modulio reikšmės didinimas įtakoja bedimensės srovės tankio padidėjimą.

Pagal grafiką galima pastebėti, kad maždaug iki $\Sigma \approx$ keičiant mediatoriaus koncentraciją, bedimensės srovės tankio augimas yra tiesinė funkcija. Vėliau, po $\Sigma \approx$ fermento sluoksnis tampa prisotintas mediatoriaus, jo kiekis yra pakankamas (arba perteklinis) elektronų pernešimui. Dėl to tolimesnis jo koncentracijos augimas neįtakoja srovės tankio pakitimų.

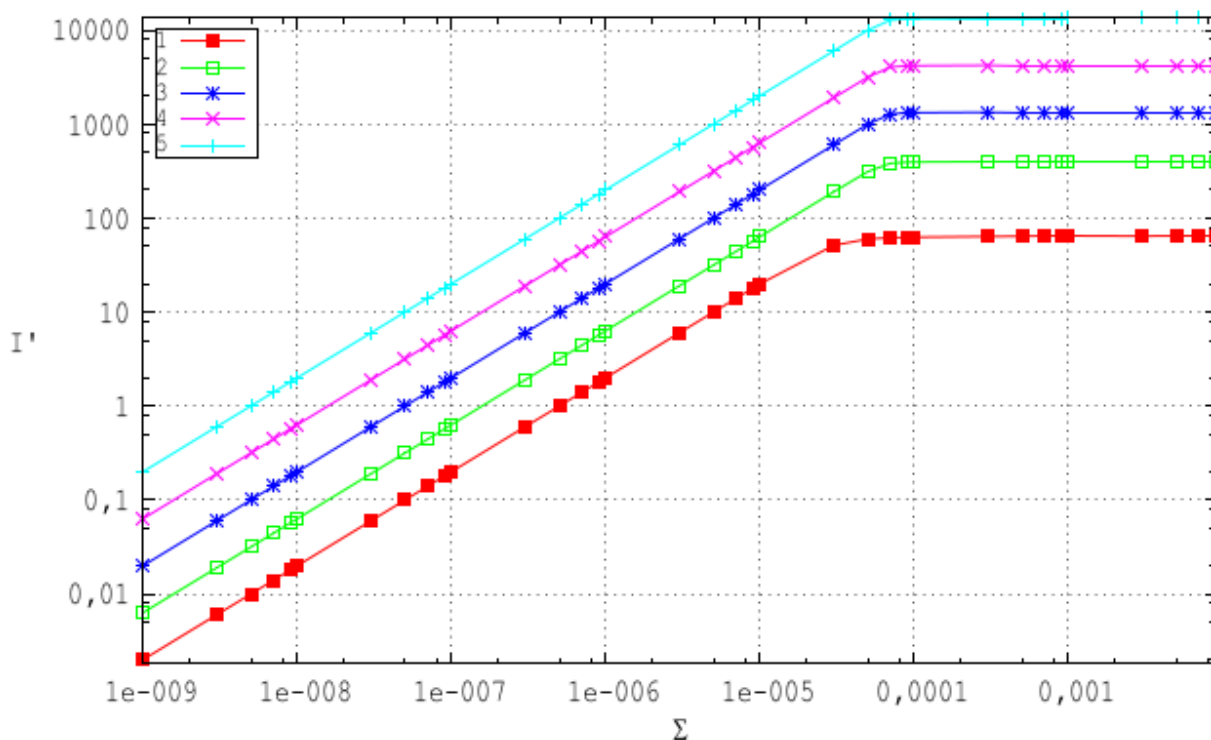


10 pav. Bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio I' priklausomybė nuo Σ , keičiant mediatoriaus koncentraciją. Difuzijos modulio σ reikšmės: 1) 10^2 , 2) 10^3 , 3) 10^4 , 4) 10^5 , 5) 10^6

3.1.2. Substrato koncentracijos įtaka

Bedimensio parametro Σ pagalba, laikant kitus parametrus konstanta ir keičiant tik substrato koncentraciją, galima nagrinėti parametro įtaka biojutiklio veikimui. Grafike 11 pav. pavaizduota bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio priklausomybė nuo substrato koncentracijos, laikant mediatoriaus koncentraciją $M_0=1M$. Substrato koncentracija buvo keičiama nuo $10\mu M$ iki $10M$. Kaip ir mediatoriaus koncentracijos įtakos tyrime buvo keičiamos difuzijos modulio reikšmės: 1) 10^2 , 2) 10^3 , 3) 10^4 , 4) 10^5 , 5) 10^6 . Difuzijos modulio reikšmė buvo keičiama varijuojant mediatoriaus sluoksnio storį.

Iki $\Sigma \approx 10^{-6}$ srovės tankio augimas priklausomai nuo substrato koncentracijos yra tiesinis. Kai $\Sigma \approx 10^{-5}$, tirpalas tampa prisotintas substratu ir jo koncentracijos pakeitimas neįtakoja srovės tankio, t.y. srovės tankis daugiau nebeprisotina nuo substrato.



11 pav. Bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio I' priklausomybė nuo Σ , keičiant substrato koncentraciją. Difuzijos modulio σ reikšmės: 1) 10^{-5} 2) 10^{-4} 3) 10^{-3} 4) 10^{-2} 5) 10^{-1} 6) 1

3.2. Biojutiklio sluoksnių storių įtaka

Biojutiklio modelis susideda iš kelių sluoksnių, kurie modeliuojami skirtingomis DDL, todėl galima nagrinėti jų įtaką pusiausvyrosios srovės tankiui. Svarbus yra mediatoriaus sluoksnio storio įtakos nagrinėjimas, kadangi šio sluoksnio biojutiklio modelyje įvedimas yra darbo naujumas.

Be pačio sluoksnio storio keitimo dar nagrinėjamas kitų parametų poveikis: substrato ir mediatoriaus koncentracijos. Biojutiklio simuliacijos metų naudojamos kombinacijos sudarytos iš substrato ir mediatoriaus koncentracijų pateiktų 1 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijų lentelė. Esant kai kurioms kombinacijoms, gaunami vienodi bandymų rezultatai (srovės tankio kitimas). Iš viso skirtingų medžiagų kombinacijų yra 12.

1 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijų lentelė

	Medžiagų koncentracijos			
substratas	10mM	100mM	1M	
mediatoriu	10μM	100μM	1mM	100mM

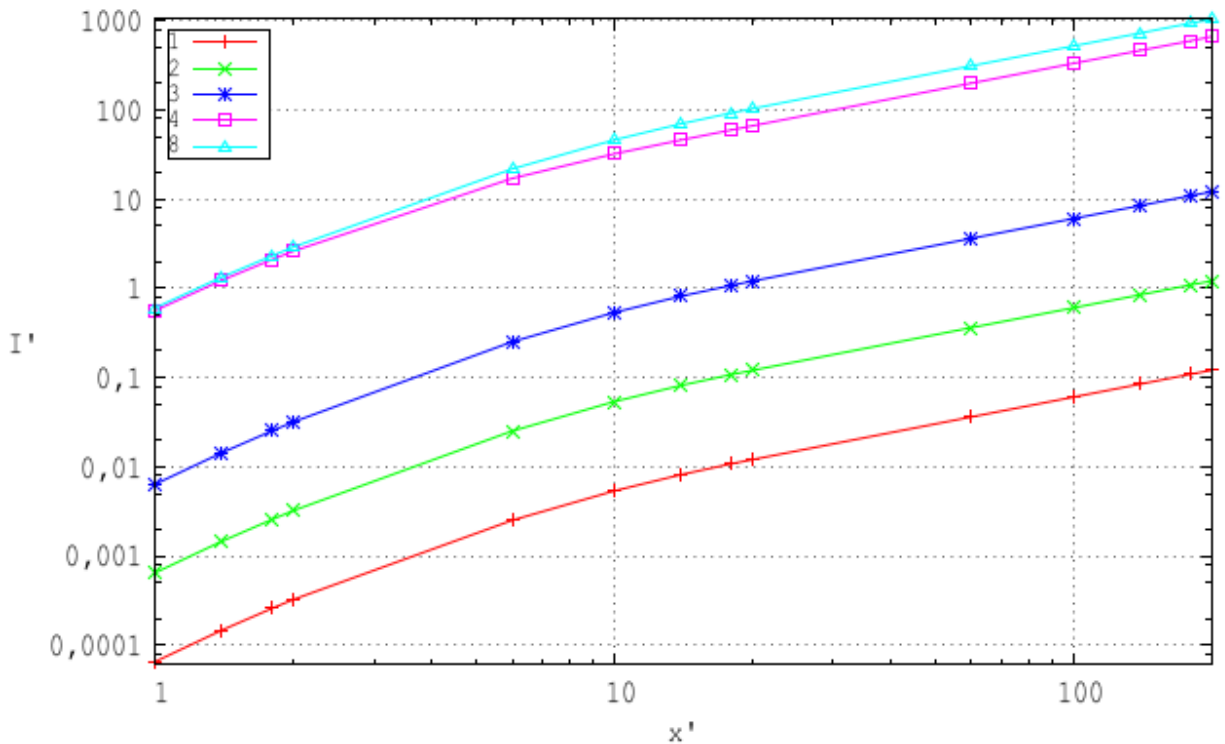
s				
---	--	--	--	--

3.2.1. Mediatoriaus sluoksnio storio įtaka

Kadangi mediatoriaus sluoksnio storis įeina į bedimensės srovės tankio išraišką, todėl šiuo atveju tikslinga nagrinėti dimensinį modelį. Iš tikrųjų 12 pav. po $x' \approx$ parodo tiesinę priklausomybę bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio nuo mediatoriaus sluoksnio storio. 2 lentelėje pateikti simuliacijos metu panaudoti substrato ir mediatoriaus koncentracijų kombinacijų variantai. Kombinacijos sudarytos iš 1 lentelės pateiktų reikšmių. Mediatoriaus sluoksnio storis buvo keičiamas nuo $5\mu\text{m}$ iki $100\mu\text{m}$. Tačiau mediatoriaus sluoksnis yra plonesnis už kitus sluoksnius, todėl praktiniame pritaikyme mediatoriaus sluoksnio dydis nesiekia $100\mu\text{m}$.

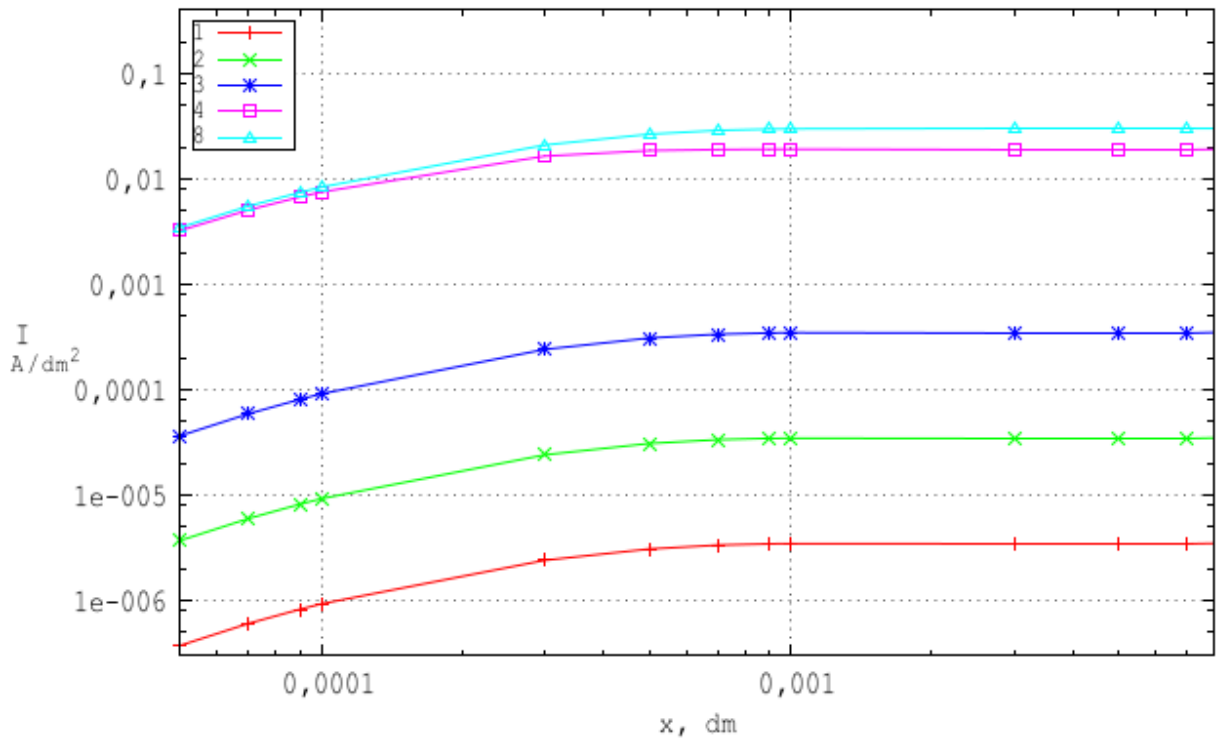
2 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijos pagal kreivių numerius atitinkančius vienodus bedimensės pusiausvyrosios srovės tankius

Kreivės numeris	Medžiagų koncentracijos					
	1		2		3	
	substratas	mediatorius	substratas	mediatorius	substratas	mediatorius
1	10 mM	$10\mu\text{M}$	100 mM	$10\mu\text{M}$	1M	$10\mu\text{M}$
2	10 mM	$100\mu\text{M}$	100 mM	$100\mu\text{M}$	1M	$100\mu\text{M}$
3	10 mM	1mM	100 mM	1mM	1M	1mM
4	10 mM	100mM	-	-	-	-
8	-	-	100 mM	100mM	1M	100mM



12 pav. Bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio I' priklausomybė nuo mediatoriaus sluoksnio storio x' . Substrato ir mediatoriaus koncentracijų reikšmės pateiktos 2 lentelėje pagal kreivių numerius atitinkančius vienodą tankį

Dimensinis grafikas (žr. 13 pav.) rodo, kad iki $x \approx$ mediatoriaus sluoksnio storis įtakoja pusiausvyrosios srovės tankį. Augant mediatoriaus storiui, iš jo difunduoja daugiau mediatoriaus medžiagos ir rezultate atsiranda didesnė pusiausvyroji srovė. Tačiau, kai mediatoriaus koncentracija pasiekia prisotinimo lygį, ji neįtakoja pusiausvyrosios srovės tankio augimo. Taip pat iš gautų duomenų galima spręsti, jog esant tai pačiai substrato reikšmei mediatoriaus koncentracijos padidėjimas didina generuojamos pusiausvyrosios srovės tankio reikšmę.



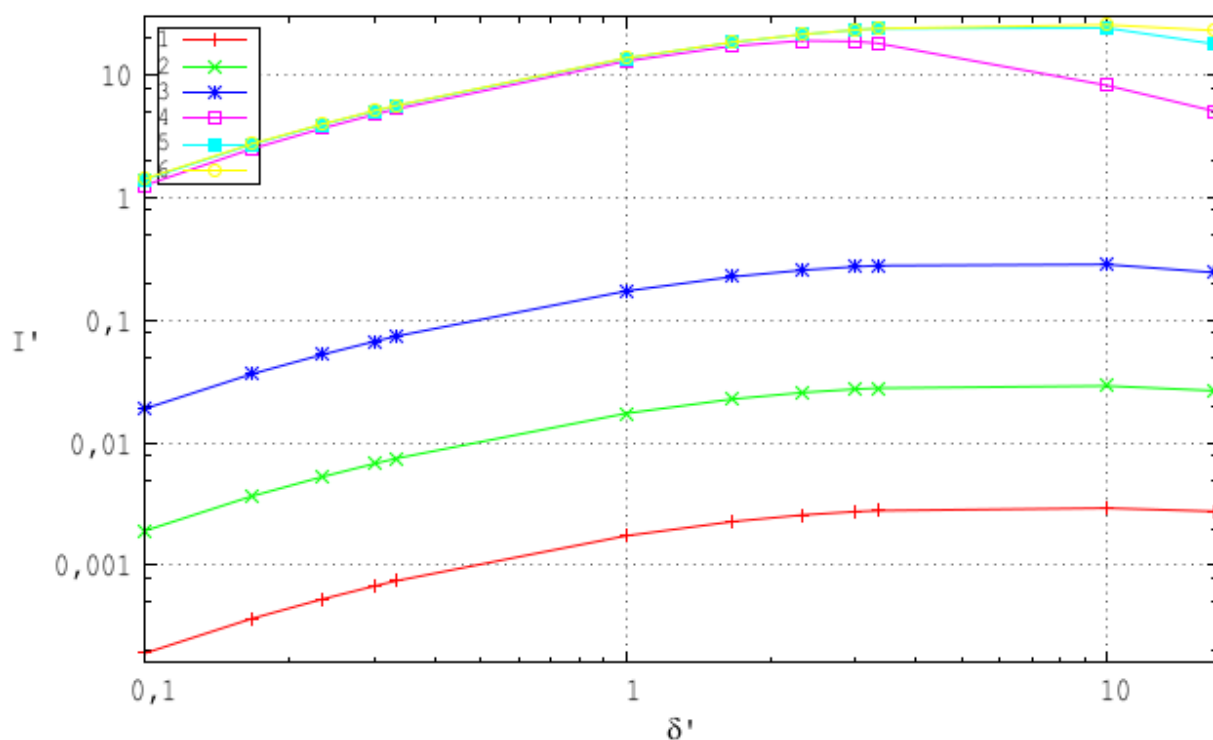
13 pav. Pusiausvyrosios srovės tankio I priklausomybė nuo mediatoriaus sluoksnio storio x . Substrato ir mediatoriaus koncentracijų reikšmės pateiktos 2 lentelėje pagal kreivių numerius atitinkančius vienodą tankį

3.2.2. Fermento sluoksnio storio įtaka

Fermento sluoksnio storis buvo keičiamas nuo $3\mu\text{m}$ iki $600\mu\text{m}$. Grafikas 14 pav. parodo bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio priklausomybę nuo fermento sluoksnio storio. Simuliacija buvo atlikta su skirtingomis mediatoriaus ir substrato koncentracijomis (žr. 3 lentelę). 1-3 kreivės atspindi vienodas bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio reikšmes, gautas skirtingoms medžiagų kombinacijoms (1-3).

3 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijos pagal kreivių numerius atitinkančius vienodas bedimensės pusiausvyrosios srovės tankius

Kreivės numeris	Medžiagų koncentracijos					
	1		2		3	
	substratas	mediatorius	substratas	mediatorius	substratas	mediatorius
1	10 mM	10 μ M	100 mM	10 μ M	1M	10 μ M
2	10 mM	100 μ M	100 mM	100 μ M	1M	100 μ M
3	10 mM	10M	100 mM	10M	1M	10M
4	10 mM	100mM	-	-	-	-
5	-	-	100 mM	100mM	-	-
6	-	-	-	-	1M	100mM



14 pav. Bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio I' priklausomybė nuo bedimensio fermento sluoksnio storio δ' . Substrato ir mediatoriaus koncentracijos pateiktos 3 lentelėje pagal kreivių numerius atitinkančius vienodą tankį

Iki $\delta \approx$ fermento sluoksnio didinimas tiesiškai įtakoja bedimensės srovės tankio I' kitimą. Tokio fakto paaiškinimas yra fermento tolyginis pasiskirstymas sluoksnyje. Vadinasi, biojutiklyje padaugėja fermento kiekis. Didesniam negu $\delta \approx$ fermento storio pakeitimo įtaka

sumažėja iki nuolatinės I' reikšmės. Tačiau žymiai didėjant sluoksnio storii (po $\delta \approx \delta_0$), substratui difunduojančiam iš difuzijos sluoksnio tampa sunkiau pasiekti mediatorių. Savo ruožtu per tą laiką didesnis mediatoriaus kiekis išsiplauna iš mediatoriaus sluoksnio, patenka į fermento sluoksnį, o vėliau į difuzijos. Dėl šių priežasčių pusiausvyrosios srovės tankis krinta. Ypač išsiskiria atvejis su 0,01M substrato ir 0,1M mediatoriaus koncentracijomis – pusiausvyrosios srovės tankis pradeda mažėti po $\delta \approx \delta_0$.

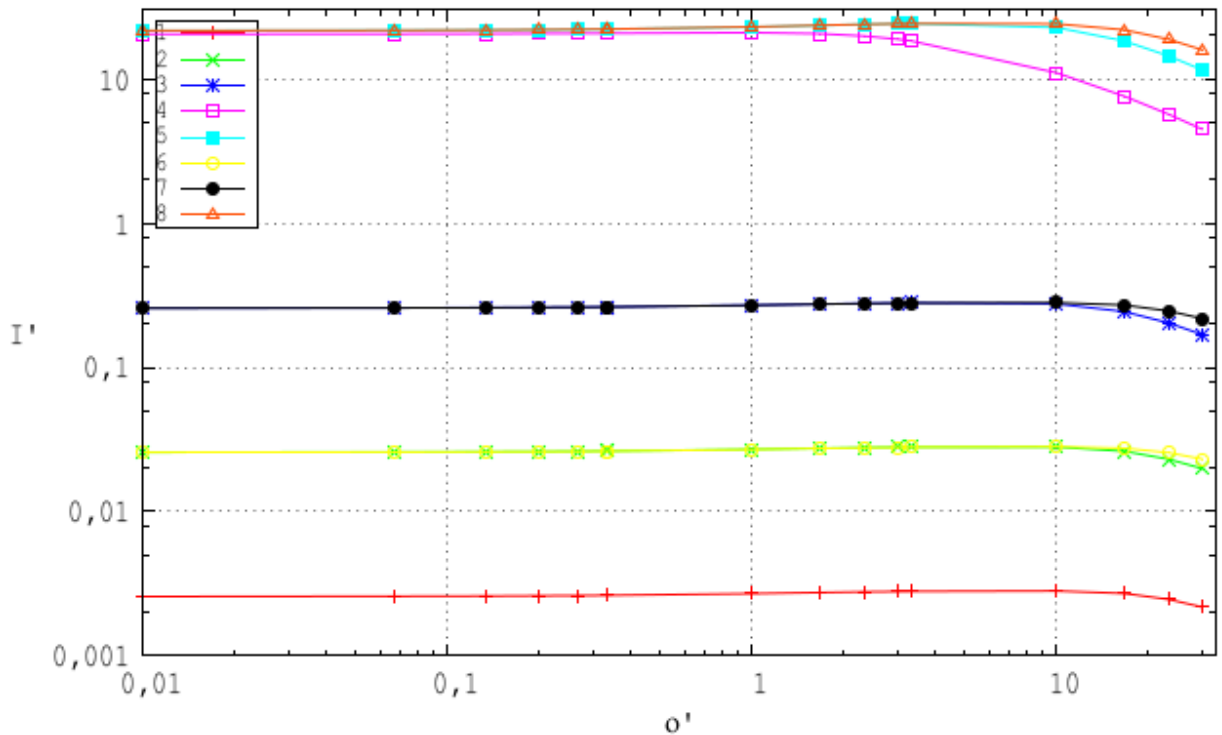
3.2.3. Difuzijos sluoksnio storio įtaka

Grafikas 15 pav. parodo bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio priklausomybę nuo difuzijos sluoksnio storio. Simuliacija buvo atlikta keičiant substrato ir mediatoriaus reikšmes (žr. 4 lentelę). 4 lentelėje 1-3 kreivės atspindi tas pačias bedimensės pusiausvyrosios srovės reikšmes, esant skirtingoms mediatoriaus ir substrato koncentracijoms.

4 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijos pagal kreivių numerius atitinkančius vienodus bedimensės pusiausvyrosios srovės tankius

	Medžiagų koncentracijos					
	1		2		3	
Kreivės numeris	substratas	mediatorius	substratas	mediatorius	substratas	mediatorius
1	10 mM	10 μ M	100 mM	10 μ M	1M	10 μ M
2	10 mM	100 μ M	100 mM	100 μ M	-	-
3	10 mM	1mM	100 mM	1mM	-	-
4	10 mM	100mM	-	-	-	-
5	-	-	100 mM	100mM	-	-
6	-	-	-	-	1M	100 μ M
7	-	-	-	-	1M	1mM
8	-	-	-	-	1M	100mM

Sluoksnio storis varijuojamas nuo 0 μ m iki 1000 μ m. Kaip matoma iš grafiko iki $\delta \approx \delta_0$ generuojamos pusiausvyrosios srovės tankis nekinta nepaisant difuzijos storio pakeitimų. Iki $\delta \approx \delta_0$ pastebimas nežymus kritimas. Srovės tankis esant dideliame difuzijos storii (po $\delta \approx \delta_0$) staigiai mažėja ir galu gale tampa artimu nuliui. Tai paaiškinama tuo, kad sluoksnio storis pasiekia tokį dydį, kai mediatorius visiškai spėja difunduoti į difuzijos sluoksnį iki to momento, kai substratas patenka į fermento sluoksnį. Todėl reakcija neįvyksta, srovė neatsiranda. Esant didesnei (žr. 4-ą kreivę) mediatoriaus koncentracijai kritimas pastebimas anksčiau, po $\delta \approx \delta_0$.



15 pav. Bedimensės pusiausvyrosios srovės tankio I' priklausomybė nuo bedimensio difuzijos storio o' naudojant substrato ir mediatoriaus koncentracijos pateiktos 4 lentelėje pagal kreivių numerius atitinkančius vienodą tankį

3.3. Mediatoriaus sluoksnio mediatoriaus difuzijos koeficiento įtaka

Kadangi mediatoriaus sluoksnis ankstesniuose moksliniuose darbuose nebuvo modeliuojamas, jo difuzijos koeficientas nėra sutinkamas šaltiniuose. Tuo tarpu tai yra svarbi charakteristika, apibūdinanti mediatoriaus difuziją mediatoriaus sluoksnio viduje. Duomenis buvo gauti naudojant 2 lentelę. Bedimensis difuzijos koeficientas apskaičiuojamas

$D_{M_m}' = \frac{D_{M_m}}{D_{M_{M_0}}}$ – os reikšmė. Difuzijos koeficientas buvo keičiamas nuo

$10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ iki $10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Difuzijos koeficiento įtaka bedimensės pusiausvyrosios srovės tankiui

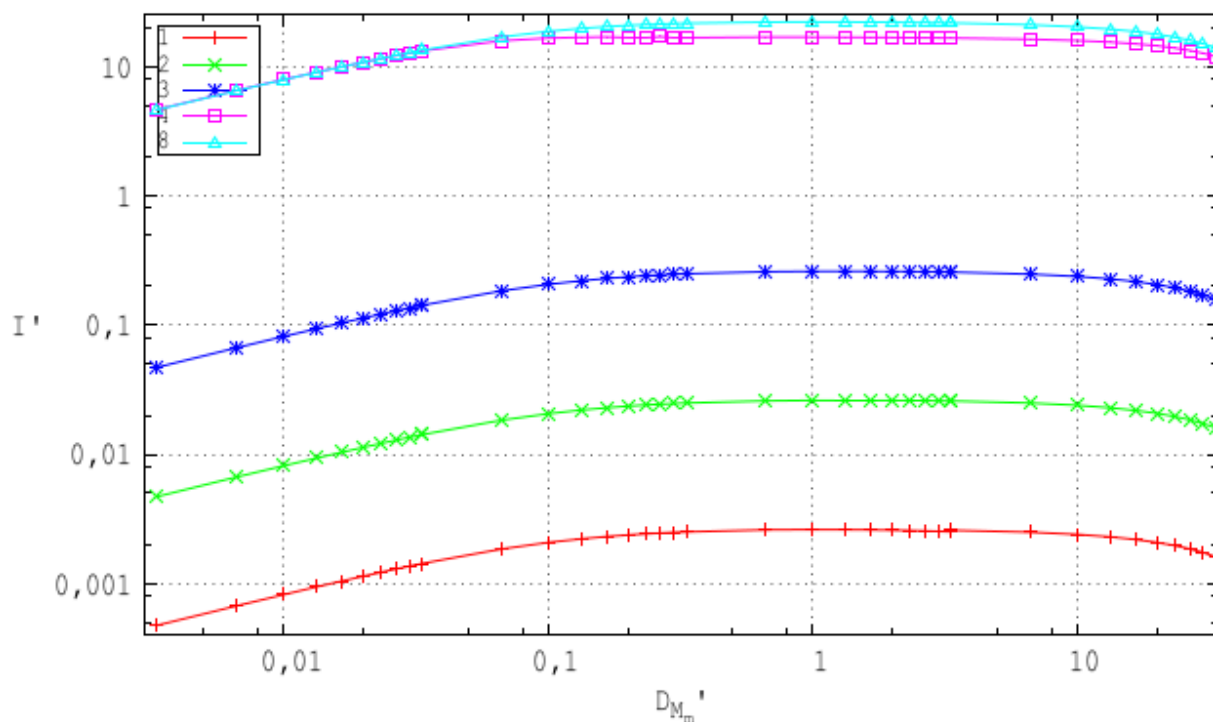
pavaizduota 13 pav. Mažoms difuzijos koeficiento reikšmėms (iki $D_{M_m}' \approx 10^{-4}$) matomas tiesinis

srovės tankio augimas, tuo tarpu didelis difuzijos reikšmių tarpas nuo

$D_{M_m}' \approx 10^{-4}$ iki 10^{-2} difuzijos koeficiento reikšmės generuojamos srovės tankio neįtakoja.

Esant dideliai difuzijos koeficiento reikšmei ($D_{M_m}' \approx 10^{-2}$) mediatorius greitai išsiplauna iš

elektrodo sluoksnio, tačiau fermento sluoksnyje buvimo laiko užtenka sugeneruoti pusiausvyrą srovę.



16 pav. Bedimensio difuzijos koeficiento D_{M_m}' įtaka bedimensei pusiausvyrosios srovės tankiui I' . Substrato ir mediatoriaus koncentracijos pateiktos 2 lentelėje pagal kreivių numerius atitinkančius vienodą tankį

3.4. Modelių palyginimas

Iki šiol darbe buvo tiriamos modeliuojamo biojutiklio generuojamos pusiausvyrosios srovės tankio priklausomybės nuo įvairių biojutiklio parametrų. Šiame skyriuje palyginami moksliniame šaltinyje [BK08] suformuluotas modelis ir šio darbo pateiktas modelis, papildantis šaltinyje aprašytą modelį dar vienu sluoksniu. Be to, esantis sluoksnyje mediatorius tirpsta. Toks biojutiklio modeliavimas yra tikslesnis fizikine prasme. Paveikslėliuose (17-21 pav.) pateikiami generuojamų pusiausvyrų srovių tankių palyginimai skirtingais laiko momentais: $0.1 \times T_R$, $0.5 \times T_R$, $1 \times T_R$, $2 \times T_R$, $2.5 \times T_R$, $3 \times T_R$, $6 \times T_R$. Taip pat buvo keičiamos substrato ir mediatoriaus koncentracijos (žr. 5 lentelę).

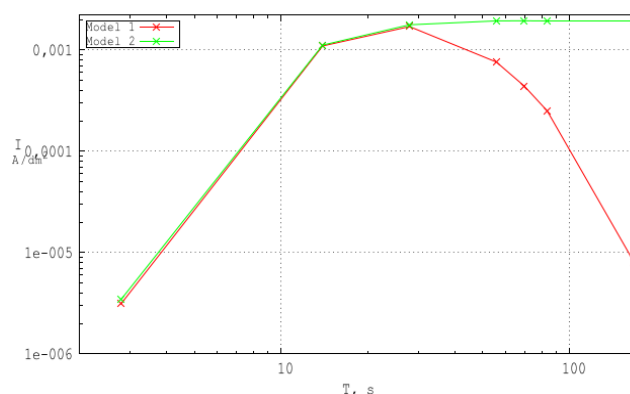
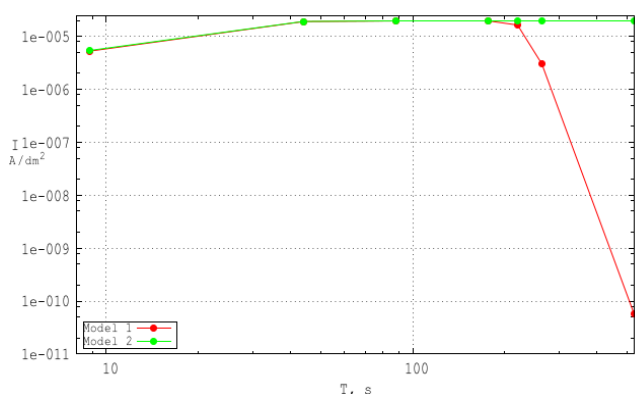
5 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijos

	Medžiagų koncentracijos		
mediatorius	10mM	1M	10M
substratas	10 μ M	1mM	1M

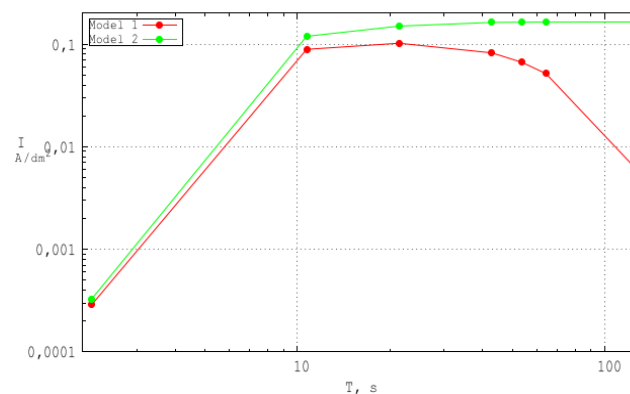
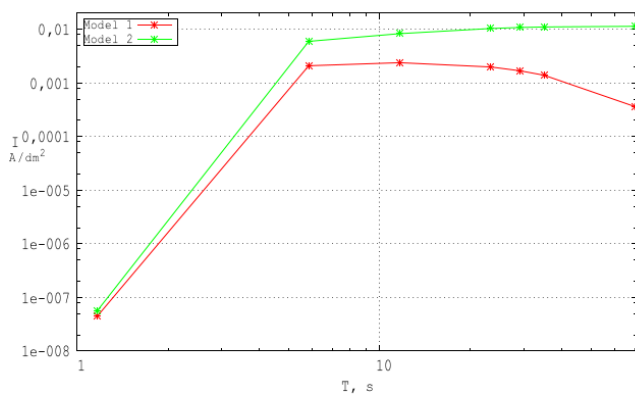
Pagal gautus rezultatus, po tam tikro laiko mediatorius (pvz., 17a pav. tai $2 \times \approx$) išsiplauna iš fermento sluoksnio ir srovė nėra generuojama, kadangi nevyksta cheminė reakcija. Pusiausvyrosios srovės tankio mažėjimas ženkliai pasireiškia tarp $2 \times$ ir $3 \times$.

Buvo pastebėta, jog esant didelei substrato koncentracijai (1M) modelis su tirpstančiu mediatoriumi generuoja pusiausvyrą srovę su mažesniu tankiu (18 pav., 21 pav.), o šaltinio [BK08] modeliuojamas biojutiklis pasiekia didesnę pusiausvyrosios srovės tankį. Kadangi visais atvejais, ištirpus mediatoriumi, srovė biojutiklyje negeneruojama, pusiausvyros srove laikoma tokia srovė, kurios pakitimas yra mažesnis už paimtą paklaidą (žr. formulę (95)). Be to, šios srovės reikšmė yra maksimali arba artima maksimaliai srovei.

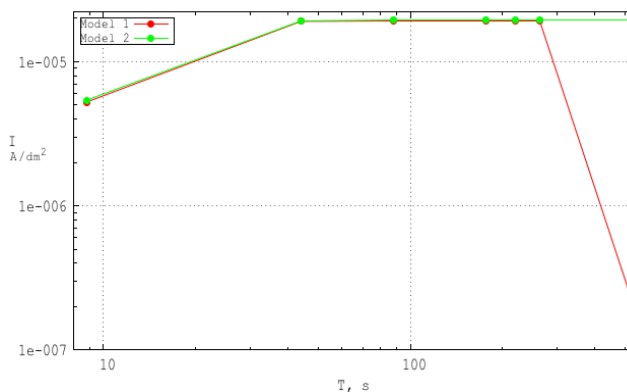
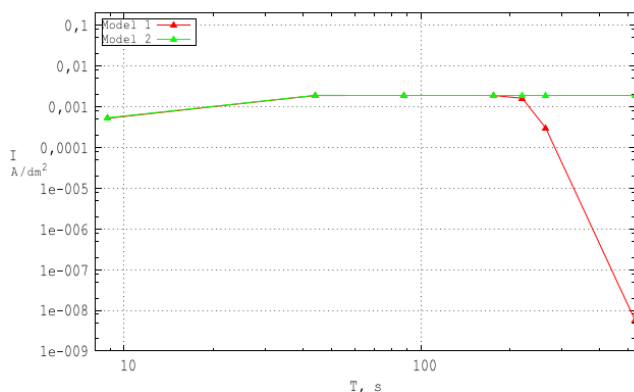
Kituose grafikuose (17 pav., 19 pav., 20 pav.) iki mediatoriaus išsiplovimo iš fermento sluoksnio laiko momento generuojamos srovės sutampa. Dideliai mediatoriaus koncentracijai ir daug mažesniai substrato koncentracijai išsiplovimo momentas yra vėlesnis (17a pav., 19 pav., 120 pav.). Be to, srovės mažėjimo laiko momentą įtakoja ir mediatoriaus koncentracija. Kuo koncentracija didesnė, tuo tirpimo momentas vėlesnis. Tai matoma iš grafikų su vienodomis substrato koncentracijomis, bet skirtingomis mediatoriaus koncentracijomis (18 pav. ir 21 pav.).



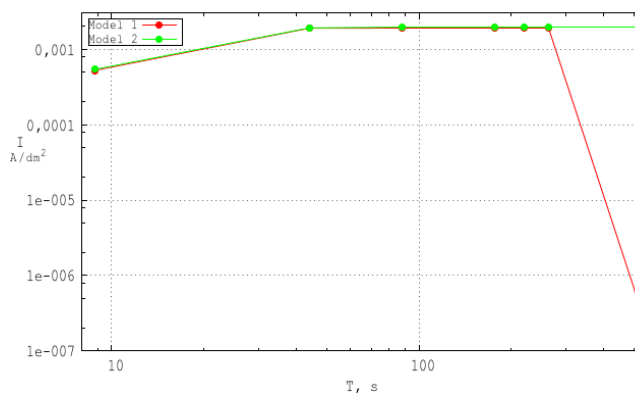
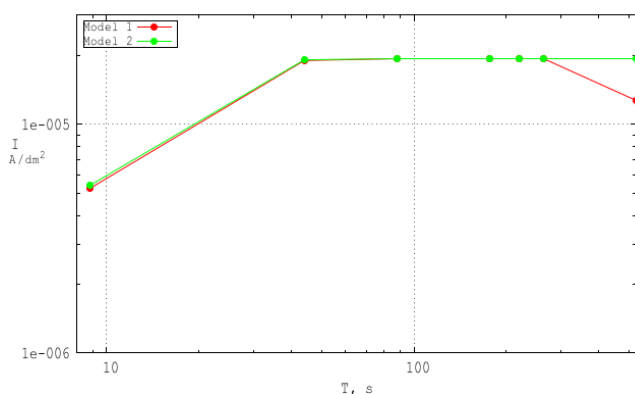
17 pav. Modelių generuojamų srovių tankių I per laiką T palyginimas: 1 - šio darbo modeliuojamo biojutiklio, 2 - [BK08] sumodeliuotas biojutiklis: a) mediatoriaus koncentracija – 1mM, substrato koncentracija - 10µM; b) mediatoriaus koncentracija – 1mM, substrato koncentracija – 1M



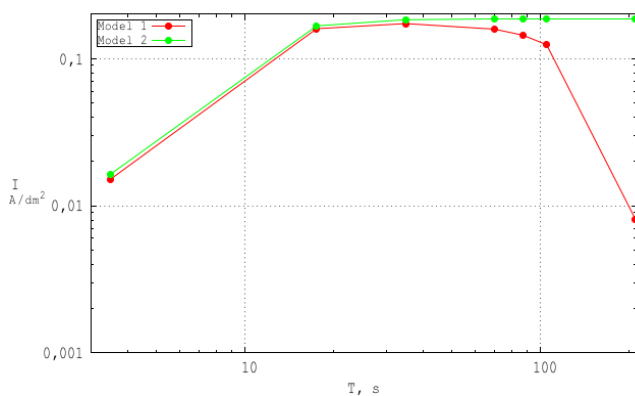
18 pav. Modelių generuojamų srovių tankių I per laiką T palyginimas: 1 - šio darbo modeliuojamo biojutiklio, 2 - [BK08] sumodeliuotas biojutiklis: a) mediatoriaus koncentracija – 1mM, substrato koncentracija – 1M; b) mediatoriaus koncentracija – 1M, substrato koncentracija – 1M



19 pav. Modelių generuojamų srovių tankių I per laiką T palyginimas: 1 - šio darbo modeliuojamo biojutiklio, 2 – [BK08] sumodeliuotas biojutiklis: a) mediatoriaus koncentracija – 1M, substrato koncentracija – 1mM; b) mediatoriaus koncentracija – 1M, substrato koncentracija - 10 μ M



20 pav. Modelių generuojamų srovių tankių I per laiką T palyginimas: 1 - šio darbo modeliuojamo biojutiklio, 2 – [BK08] sumodeliuotas biojutiklis: a) mediatoriaus koncentracija – 10M, substrato koncentracija – 10 μ M; b) mediatoriaus koncentracija – 10M, substrato koncentracija – 1mM



21 pav. Modelių generuojamų srovių tankių I per laiką T palyginimas: 1 - šio darbo modeliuojamo biojutiklio, 2 – [BK08] sumodeliuotas biojutiklis: a) mediatoriaus koncentracija – 10M, substrato koncentracija – 1M

Darbo prieduose (žr. 1 priedas. Modelių palyginimas pagal generuojamų srovių tankius) lentelėse yra pateikti dviejų modelių palyginimo rezultatai. Modeliai buvo lyginami naudojantis skirtingomis medžiagų koncentracijomis, kurių kombinacijos pateiktos 6 ir 7 lentelėse. 6

lentelėje yra mažos mediatoriaus koncentracijos reikšmės ir didelė substrato koncentracija (iki 10M). 7 lentelėje pateiktos mažos substrato reikšmės ir didelės mediatoriaus reikšmės, kai kurie rezultatai yra pavaizduoti grafiškai (žr. 17 - 21 pav.)

6 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijos

	Medžiagų koncentracijos		
mediatorius	100 μ M	1mM	1M
substratas	10mM	1M	10M

Pagal 6 lentelėje pateiktas koncentracijas gauti generuojamų srovių tankių palyginimai pateikti 8-16 lentelėse (žr. 1 priedas. Modelių palyginimas pagal generuojamų srovių tankius). 8 ir 9 lentelėse esant mažam substrato kiekiui ir nedideliam mediatoriaus, šio darbo modelio generuojamos srovės tankis yra žymiai mažesnis. Kai mediatoriaus koncentracija yra didelė, o substrato maža pusiausvyrosios srovės tankio reikšmės skiriasi nežymiai (10 lentelė). Esant dideliui kiekiui substrato ir mažam mediatoriaus, srovės tankiai irgi žymiai skiriasi. Iš 13 ir 16 lentelės matoma, kad skirtumas yra mažesnis, tačiau ženklus. Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, jog esant didesniai mediatoriaus koncentracijai pusiausvyrosios srovės tankiai bus lygūs.

7 lentelė. Substrato ir mediatoriaus koncentracijos

	Medžiagų koncentracijos		
mediatorius	10mM	1M	10M
substratas	100 μ M	1mM	1M

Pagal 7 lentelėje pateiktas koncentracijas gauti generuojamų srovių tankių palyginimai pateikti 17-25 lentelėse (žr. 1 priedas. Modelių palyginimas pagal generuojamų srovių tankius). Kai substrato kiekis yra nedidelis, pusiausvyrų srovių tankiai sutampa (17-19, 21-22 lentelės). Mažai mediatoriaus koncentracijai, pasireiškia tankių skirtumas (20, 23 lentelė). Dideliai substrato koncentracija ir dideliai mediatoriaus koncentracijai taip pat pasireiškia tankių skirtumas (25 lentelė).

REZULTATAI IR IŠVADOS

Darbo rezultatai

Magistro baigiamojo darbo eigoje buvo suprojektuotas amperometrinis biojutiklis su chemiškai modifikuotu sluoksniu, modeliuojantis papildomą mediatoriaus sluoksnį. Šis sluoksnis nebuvo iki šiol modeliuojamas kituose darbuose. Gautam biojutikliui suformuluotas matematinis modelis pateikiant atitinkamas sluoksniuose vykstančių reakcijų-difuzijų DDL (diferencialinės lygtis su dalinėmis išvestinėmis), jų kraštines ir pradines sąlygas. Kadangi suformuluotiems DDL sprendimas egzistuoja tik ribiniais atvejais dėl netiesinės reakcijos spartos išraiškos, DDL buvo aproksimuotos panaudojant skaitinių metodų sprendimo būdą – išreikštinę baigtinių skirtumų schemą. Taip buvo gautas biojutiklio skaitinis modelis.

Sukurtas pagal skaitinį modelį kompiuterinis biojutiklio modelis buvo patikrintas pagal žinomus analizinius sprendimus [Sch90] esant kraštinėms biojutiklio veikimo sąlygoms. Viena iš kraštinių sąlygų yra maža mediatoriaus koncentracija. Vadovaujantis skaitiniu modeliu JAVA programavimo kalba sukurta programinė įranga, modeliuojanti biojutiklio veikimą su tirpstančiu mediatoriumi. Gauta programa buvo panaudota tiriant biojutiklio savybes bei charakteristikas, keičiant pradinis duomenis ir parametrus:

- 1) mediatoriaus sluoksnio difuzijos koeficiento įtaką;
- 2) mediatoriaus sluoksnio ir kitų sluoksnių storių įtaką;
- 3) medžiagų koncentracijų įtaką.

Šiame darbe sukurtas modelis modifikuojant žinomą modelį [BK08] buvo palygintas su juo pagal generuojamos srovės tankį, keičiant biojutiklio veikimo laiką. Buvo pastebėtas (žr. 17-21 pav.) srovės tankio reikšmių skirtumas nuo kitame šaltinyje pateikto modelio gautos srovės tankio [BK08]. Palyginus šiuos du modelius nustatyta, kad juos labiausiai skiriantis veiksnys yra laikas po pusiausvyrosios srovės tankio nustatymo. Šiame darbe sumodeliuoto biojutiklio srovės tankis dažniausiai po laiko $\approx 10 \times T_R$ artėja prie nulio. T_R yra pusiausvyrosios srovės tankio gavimo laiko momentas. Tai yra paaiškinama tuo, kad mediatorius visiškai išsiplovęs iš mediatoriaus sluoksnio difundavo per fermento sluoksnį į difuzijos, kur reakcija tarp fermento ir substrato nevyksta ir mediatorius neatstatomas. Iš difuzijos sluoksnio mediatorius išsiplauna į buferinį tirpalą.

Išvados

Amperometrinio biojutiklio su chemiškai modifikuotu elektrodu kompiuterinis modelis gali būti sėkmingai panaudotas tiriant kinetinių parametrų įtaką biojutiklio atsakui. Bedimensis modelis gali būti naudojamas kaip skaitinių tyrimų karkasas nagrinėjant modelio parametrų

poveikį biojutiklio veikimui ir optimizuojant biojutiklio konfigūraciją. Šio darbo reikšmingumas yra sumodeliuotas mediatoriaus tirpimas, kurio tirpimo poveikis matomas 17-21 pav.

Substrato ir mediatoriaus koncentracijų kiekiai žymiai įtakoja gautą biojutiklio srovės tankį (10 ir 11 pav.) užtikrinant tiesinį srovės tankio augimą. Tačiau palaipsniui tirpalas yra prisotinamas šiomis medžiagomis ir srovės tankis nusistovi. Paaiškėjo, kad mediatoriaus sluoksnio mediatoriaus difuzijos koeficientas turi įtakos biojutiklio pusiausvyrosios srovės tankiui (16 pav.), esant didesnėms arba labai mažoms reikšmėms.

Mediatoriaus sluoksnio storio didinimas įtakoja palaipsnių srovės tankio augimą, kadangi didėja patenkančio į fermento sluoksnį mediatoriaus kiekiai (13 pav.). Esant labai dideliame mediatoriaus sluoksnio storiui tolimesnis storio pakeitimas nebeturi įtakos. Fermento sluoksnio storis turi įtakos iki $\delta \approx$, vėliau įtaka mažėja (14 pav.) ir esant dideliame $\delta \approx$ pradeda mažėti. Difuzijos sluoksnis iki $o \approx$ neįtakoja biojutiklio veikimą, tačiau vėliau (15 pav.) srovės tankis pradeda mažėti. Esant pernelyg dideliame difuzijos storiui srovės tankio reikšmė tampa lygi 0, kadangi mediatorius spėja išsiplauti iš biojutiklio greičiau negu įvyksta fermentinė reakcija.

Modelių palyginimas parodė (17-21 pav. ir 17-25 lentelės), kad tarp dviejų modelių atsiranda žymus skirtumas praėjus laikui kelis kartus didesniame, nei pusiausvyrosios srovės tankio gavimo laiko momentas. Be to žymus skirtumas yra naudojant mažas mediatoriaus koncentracijas (8-16 lentelės). Jeigu yra tiriamos biojutiklio savybės esant tokiam laikui ir panašioms koncentracijoms, gali būti tikslinga naudoti šiame darbe pateiktą modelį.

ŠALTINIAI

- [BK08] R.Baronas, J. Kulys. Modelling Amperometric Biosensors Based on Chemically Modified Electrodes, *Sensors*, 8(8), 2008, p. 4800-4820.
- [BIK10] R.Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys. Mathematical Modeling of Biosensors. An Introduction for Chemists and Mathematicians. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. Springer Science, 2010, p. 334. ISBN 978-90-481-3242-3.
- [CB04] M.Chaplin, C.Bucke. Cambridge University Press, 1990, p. 280. ISBN: 978-05-213-4884-3.
- [CB80] P.W. Carr, L.D. Bower, Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry: Fundamentals and Applications, John Wiley, New York, 1980.
- [Cha05] R. Chang. Enzyme Kinetics, in: Physical Chemistry for the Biosciences, University Science, 2005. Enzyme Kinetics, Chapter 10, p.363-400.
- [Cra75] J.Crank. The Mathematics of diffusion. Second edition. Clarendon Press, Oxford, 1975, p. 421. ISBN 0-19-853344-6.
- [CTH06] Lin-Chi Chen, Kuei-Sheng Tseng, Kuo-Chuan Ho. General Kinetic Model for Amperometric Sensors Base on Prussian Blue Mediator and Its Analogs: Application to Cysteine Detection. *Electroanalysis* 18, No 13-14, p. 1313-1321, 2006.
- [GB07] E.Gaidamauskaitė, R.Baronas. A Comparison of Finite Difference Schemes for Computational Modelling of Biosensors. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, Vol. 12, Nr. 3, p. 359-369. 2007.
- [Kul81] J.Kulys. Development of new analytical systems based on biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, pp. 344-352, 1981.
- [LR10] S.Loghambal, L.Rajendran. Analysis of Amperometric Enzyme Electrodes in the Homogeneous Mediated Mechanism using Variational Iteration Method. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 5, p. 327-343, 2010.
- [Lyo06] M.Lyons. Modelling the Transport and Kinetics of Electroenzymes at the Electrode/Solution Interface. *Sensors* 2006, 6, p.1765-1790. ISSN 1424-8220.
- [MMG+00] J.E.Moreira, S.P.Midkiff, M.Gupta, P.V.Artigas, M.Snir, R.D. Lawrence. Java Programming for High Performance Numerical Computing. IBM T.J.Watson Research Center. 319KB.
- [Num92] Numerical Recipes in C, Second Edition, Cambridge University Press, p. 1018, 1992. ISBN 0 521 43108 5.
- [Sal08] S.Salsa. Partial Differential Equations in Action. From Modelling to Theory. Springer-Verlag Milan, 2008, p. 568. ISBN 978-88-470-0752-9

- [Sch90] T.Schulmeister. Mathematical Modelling of the Dynamic Behaviour of Amperometric Enzyme Electrodes. Selective Electrode Rev. 12:203, Pergamon Press, 1990.
- [TKW87] A.Turner, I.Karube, G.Wilson. Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, 1987, p.614. ISBN 5-03-001186-02.
- [TW98] A.Tveito, R.Winther. Introduction to Partial Differential Equations. A Computational Approach. Springer-Verlag New York, 1998, p. 402. ISBN 0-387-98327-9.
- [Wan00] Joseph Wang. Analytical Electrochemistry. Second Edition, Wiley-Vch, 2000, p. 223. ISBN 0-471-28272-3.
- [WDW+04] X.Wu, C.J.Detzel, B.J. Van Wie, S.J.Haarsma, D. A.Kidwell. Model-Based Optimization of a Conductive Matrix Enzyme Electrode. Wiley InterScience, 2004.
- [Буд96] Г.К.Будников. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств. Казанский университет. Соросовский образовательный журнал, №12, 1996, p.26-32.
- [Куз09] Н.Кузьмина. Промышленная биология. Иммунизация ферментов, Общая характеристика иммобилизованных ферментов, 2009.
[Žiūrėta 2010-06-05]. Prieiga per Internetą:
<http://www.biotechnolog.ru/prombt/prombt10_1.htm>
- [Дзя01] С.В. Дзяевич. Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных генераций. Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Біополімери і клітина. 2002. Т. 18 №. 1. ISSN 0233-7657.

PRIEDAI

1 priedas. Modelių palyginimas pagal generuojamų srovių tankius

8 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 10 mM, mediatoriaus – 100 μ M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,024275000000030	0,000000006032104	0,000000007536025
5,121375000000180	0,000023823174245	0,000067481009763
10,242750000000300	0,000027062486857	0,000092735375343
20,485500000000700	0,000022090329715	0,000113964808944
25,606875000000800	0,000018326291754	0,000117806407348
30,728250000001000	0,000014805914952	0,000119720260773
61,456500000002100	0,000003449823113	0,000121467249074

9 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 10 mM, mediatoriaus – 1 mM

Laikas, s	Srovė tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,036650000000030	0,000000007535405	0,000000009379099
5,183250000000180	0,000235905196601	0,000653635912449
10,366500000000300	0,000270723128831	0,000921267853117
20,733000000000700	0,000219912842187	0,001133649367041
25,916250000000900	0,000181807476148	0,001171230543121
31,099500000001000	0,000146368272658	0,001189744275040
62,199000000002100	0,000033458451807	0,001206314767004

10 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 10 mM, mediatoriaus – 1M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
6,344324999985340	0,005266707281591	0,005442516136989
31,721624999926700	0,019015913151133	0,019160195177489
63,443249999853400	0,019295120787420	0,019424844234173
126,886499999706000	0,006190713775726	0,019426578248157
158,608124999633000	0,001372860641168	0,019426578321145
190,329749999560000	0,000292329252512	0,019426578321612
380,659499999120000	0,000000025665020	0,019426578321612

11 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1M, mediatoriaus – 100 μM

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,018050000000030	0,000000507871887	0,000000655288361
5,090250000000170	0,000023889653353	0,000068069742616
10,180500000000300	0,000027004117467	0,000092699028419
20,361000000000700	0,000022100774108	0,000113873649671
25,451250000000800	0,000018369981101	0,000117748084978
30,541500000001000	0,000014869024174	0,000119690042140
61,083000000002100	0,000003499541592	0,000121480759573

12 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1M, mediatoriaus – 1mM

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,021800000000030	0,000000574439049	0,000000721126694
5,109000000000170	0,000238355493179	0,000675319177080
10,218000000000300	0,000269880630413	0,000922187492553
20,436000000000700	0,000220620537064	0,001132763358596
25,545000000000800	0,000183214707239	0,001171083244197
30,654000000001000	0,000148162227699	0,001190230990582
61,308000000002100	0,000034686568955	0,001207791778345

13 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1M, mediatoriaus – 1M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,808700000000060	0,001075889564648	0,001213477349715
9,043500000000320	0,094622122988346	0,123700770103966
18,08700000000600	0,108938543526085	0,153291474660465
36,17400000001300	0,087918014090291	0,163565580131384
45,21750000001600	0,071741108700424	0,164137983774698
54,26100000001900	0,055879037282694	0,164287303545693
108,52200000003000	0,006267404092293	0,164339237452588

14 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 10M, mediatoriaus – 100 μM

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,016700000000030	0,000003360532782	0,000005193448772
5,083500000000170	0,000023897314002	0,000068162664265
10,16700000000300	0,000026987853528	0,000092684313303
20,33400000000700	0,000022100313237	0,000113850191316
25,41750000000800	0,000018377190915	0,000117732075648
30,50100000001000	0,000014880980302	0,000119680238627
61,00200000002100	0,000003510022304	0,000121480663672

15 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 10M, mediatoriaus – 1mM

Laikas, s	Srovė tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,019700000000030	0,000005209749888	0,000006723241012
5,098500000000170	0,000238534267654	0,000677030645094
10,19700000000300	0,000269649288068	0,000922014008982
20,39400000000700	0,000220625106622	0,001132419791159
25,49250000000800	0,000183335500211	0,001170851276790
30,59100000001000	0,000148354366631	0,001190093094180
61,18200000002100	0,000034849677543	0,001207801297770

16 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 10M, mediatoriaus – 1M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,795875000000060	0,009631474285458	0,011013717797575
8,979375000000320	0,095204403915832	0,124741517291227
17,958750000000600	0,109067660999792	0,153492856920038
35,917500000001300	0,088280102228770	0,163703081825041
44,896875000001600	0,072215945280180	0,164284335381321
53,876250000001900	0,056418155231522	0,164437715502908
107,752500000003000	0,006472874435823	0,164491862137345

17 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 100μM, mediatoriaus – 10mM

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
6,345824999985330	0,000052693696353	0,000054452243282
31,729124999926600	0,000190162436260	0,000191605120694
63,458249999853300	0,000192951280920	0,000194248483580
126,916499999706000	0,000062072272911	0,000194265782490
158,645624999633000	0,000013254132993	0,000194265783217
190,374749999560000	0,000002796042406	0,000194265783221
380,749499999120000	0,000000000244334	0,000194265783221

18 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 100μM, mediatoriaus – 1M

Laikas, s	Srovė tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
6,346049999985330	0,000052693696362	0,000054452243282
31,730249999926600	0,000190162766514	0,000191605437378
63,460499999853300	0,000192951290832	0,000194248489757
126,920999999706000	0,000192970677076	0,000194265782491
158,651249999633000	0,000192970677993	0,000194265783217
190,381499999560000	0,000192970677997	0,000194265783221
380,762999999120000	0,000000817433202	0,000194265783221

19 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 100 μ M, mediatoriaus – 10M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
6,346049999985330	0,000052693696362	0,000054452243282
31,730249999926600	0,000190162766514	0,000191605437378
63,460499999853300	0,000192951290832	0,000194248489757
126,920999999706000	0,000192970677076	0,000194265782491
158,651249999633000	0,000192970677994	0,000194265783217
190,381499999560000	0,000192970678000	0,000194265783221
380,762999999120000	0,000048252035395	0,000194265783221

20 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1mM, mediatoriaus – 10 mM

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
2,433300000000090	0,000011257813960	0,000012292616391
12,166500000000400	0,001329413029316	0,001352348799911
24,333000000000800	0,001809814208895	0,001856599305175
48,666000000001700	0,000773443981699	0,001940848305387
60,832500000002200	0,000433835470471	0,001942395425120
72,999000000002600	0,000240454863863	0,001942619776682
145,998000000005000	0,000006717693580	0,001942657828062

21 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1mM, mediatoriaus – 1M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
6,346049999985330	0,000526936963620	0,000544522432823
31,730249999926600	0,001901627665139	0,001916054373783
63,460499999853300	0,001929512908320	0,001942484897567
126,920999999706000	0,001929706770108	0,001942657824908
158,651249999633000	0,001929704856393	0,001942657832167
190,381499999560000	0,001447215453415	0,001942657832213
380,762999999120000	0,000000138344959	0,001942657832213

22 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1mM, mediatoriaus – 10M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
6,346049999985330	0,000526936963620	0,000544522432823
31,730249999926600	0,001901627665139	0,001916054373784
63,460499999853300	0,001929512908322	0,001942484897567
126,920999999706000	0,001929706770758	0,001942657824908
158,651249999633000	0,001929706779933	0,001942657832167
190,381499999560000	0,001929706779962	0,001942657832213
380,762999999120000	0,000008206427606	0,001942657832213

23 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1M, mediatoriaus – 10 mM

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,041975000000030	0,000000822458179	0,000001023289991
5,209875000000180	0,002343405099833	0,006375558552982
10,419750000000300	0,002663492347353	0,008757826456081
20,839500000000700	0,002167870203736	0,010739757884222
26,049375000000900	0,001793776851893	0,011091603695452
31,259250000001100	0,001445036116699	0,011264840989864
62,518500000002200	0,000329934025593	0,011419662846596

24 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1M, mediatoriaus – 1M

Laikas, s	Srovė tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
1,808700000000060	0,001075889564648	0,001213477349715
9,043500000000320	0,094622122988346	0,123700770103966
18,087000000000600	0,108938543526085	0,153291474660465
36,174000000001300	0,087918014090291	0,163565580131384
45,217500000001600	0,071741108700424	0,164137983774698
54,261000000001900	0,055879037282694	0,164287303545693
108,522000000003000	0,006267404092293	0,164339237452588

25 lentelė. Modelių palyginimas pagal generuojamos srovės tankį: substrato koncentracija – 1M, mediatoriaus – 10M

Laikas, s	Srovės tankis, A/dm ²	
	Modelis 1	Modelis 2 [BK08]
2,788275000000100	0,025691919161290	0,027728494075202
13,941375000000500	0,162516184721172	0,168739691677348
27,882750000001000	0,175555116976607	0,184428091748762
55,765500000002000	0,163473283496198	0,186397643801620
69,706875000002500	0,151547749826054	0,186420131659091
83,648250000003000	0,135234044625877	0,186422663327589
167,296500000006000	0,013485870458812	0,186422984128571