



Darius
BARONAS

DAUGIASLUOKSNIŲ
BIOJUTIKLIŲ KOMPIUTERINIS
MODELIAVIMAS IR OPTIMIZAVIMO
METODAIS GRĮSTA
MATAVIMŲ METODIKA

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

FIZINIAI MOKSLAI, INFORMATIKA (09 P)

VILNIUS 2014

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Darius Baronas

DAUGIASLUOKSNIŲ BIOJUTIKLIŲ KOMPIUTERINIS MODELIAVIMAS IR
OPTIMIZAVIMO METODAIS GRĮSTA MATAVIMŲ METODIKA

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, informatika (09 P)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2009 - 2013 metais Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos institute.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Antanas Žilinskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P).

Mokslinis konsultantas:

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

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Informatikos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Gintautas Dzemyda (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P).

Nariai:

prof. habil. dr. Juozas Augutis (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P),

prof. dr. Kęstutis Dučinskas (Klaipėdos universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P),

prof. habil. dr. Mifodijus Sapagovas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, matematika - 01 P),

prof. dr. Rimantas Vaicekauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P).

Oponentai:

prof. habil. dr. Rimantas Barauskas (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P),

dr. Audronė Jakaitienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09 P).

Disertacija bus ginama Vilniaus universiteto viešame Informatikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 m. rugsėjo 30 d. 13 val. Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos instituto 203 auditorijoje.

Adresas: Akademijos g. 4, LT-08663 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. rugpjūčio 29 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

VILNIUS UNIVERSITY

Darius Baronas

COMPUTER AIDED MODELLING OF MULTILAYER BIOSENSORS AND
OPTIMIZATION BASED PROCESSING OF AMPEROMETRIC MEASUREMENTS

Summary of Doctoral Dissertation
Physical Sciences, Informatics (09 P)

Vilnius, 2014

Doctoral dissertation was prepared in 2009 - 2013 at the Institute of Mathematics and Informatics of Vilnius University

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Habil. Antanas Žilinskas (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics - 09 P).

Scientific Consultant:

Prof. Dr. Habil. Feliksas Ivanauskas (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics - 09 P).

The dissertation will be defended at the Council of the Scientific Field of Informatics of Vilnius University:

Chairman:

Prof. Dr. Habil. Gintautas Dzemyda (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics - 09 P).

Members:

Prof. Dr. Habil. Juozas Augutis (Vytautas Magnus University, Physical Sciences, Informatics – 09 P),

Prof. Dr. Kęstutis Dučinskas (Klaipėda University, Physical Sciences, Informatics – 09 P),

Prof. Dr. Habil. Mifodijus Sapagovas (Vilnius University, Physical Sciences, Mathematics – 01 P),

Prof. Dr. Rimantas Vaicekuskas (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics – 09 P).

Opponents:

Prof. Dr. Habil. Rimantas Barauskas (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Informatics – 09 P),

Dr. Audronė Jakaitienė (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics – 09 P).

The dissertation will be defended at the open meeting of the Council of Scientific Field of Informatics at the Institute of Mathematics and Informatics of Vilnius University on September 30, 2014 at 1 p.m. Address: Akademijos st. 4, LT-08663 Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 29 August 2014.

A copy of the doctoral dissertation is available for review at the Library of Vilnius University.

Įvadas

Biojutiklis – tai įrenginys, kurį sudaro biologiškai aktyvi medžiaga, dažniausiai fermentas ir elektroninis signalo keitiklis [1, 2]. Šie įrenginiai naudojami įvairių medžiagų nustatymui (pvz.: teršalų) analizuojamoje medžiagoje.

Pirmąjį biojutiklį 1956m. pristatė prof. Leland C. Clark Jr., vėliau 1975 m. pagamintas pirmasis komercinis biojutiklis, tai buvo gliukozės nustatymui skirtas amperometrinis biojutiklis. Pastaruosius 40 metų buvo tyrinėjami ir kuriami įvairūs biojutikliai, pritaikant kuo platesniam naudojimui, visgi sėkmingai komerciškai naudojamų yra palyginti nedaug. Nuolat atliekami biojutiklių tyrinėjimai, tobulėjančios technologijos leidžia tikėtis vis platesnio šių įrenginių panaudojamumo. Pagal "Global Biosensors Market" pateiktus duomenis 2007m. rinka sudarė 10 mlrd.\$, o iki 2015 m. prognozuojamas padidėjimas iki 12 mlrd.\$. Dabartinė vis didėjanti biojutiklių paklausa yra dėl žmonių populiacijos ir sergamumo ligomis didėjimo [3].

Biojutikliai naudojami medicinoje, pvz. pamatuoti cukraus kiekį kraujyje [4, 5], atlikti genetinę analizę ir pan. [6–8]. Įrenginiai plačiai naudojami maisto pramonėje [6, 7].

Biojutikliai turi privalumų, kadangi tai - nebrangūs, stabilūs ir labai patikimi įrenginiai, suteikiantys galimybę nustatyti svarbius biokomponentus: hormonus, vaistus ir kt. [9, 10]. Lyginant su įprastomis biologinėmis analizavimo technikomis, biojutikliai turi nemažai privalumų: mažas dydis, paprastumas naudojant, atsparumas radioaktyvumui ir pan., kurie daro juos dar patrauklesniais naudoti [11]. Biojutiklių modeliavimui dažniausiai yra naudojamos netiesinės diferencialinės lygtys, kurios analiziškai nėra sprendžiamos, dėl to čia naudojami skaitiniai metodai, dažniausiai - baigtinių skirtumų metodas. Gilinimasis į biojutiklio kinetiką – būdas nagrinėti aparatą, tam yra kuriami kompiuteriniai modeliai, kurie naudojami kaip įrankis nagrinėti ir gerinti amperometrinio biojutiklio savybes [12].

Tikslas ir tyrimo objektas

Disertacijos tyrimų tikslas buvo plėtoti daugiasluoksnių amperometrinių biojutiklių skaitinius modelius, sukurti programinės įrangos įrankį kompiuterinių modelių skaičiavimui ir sukurti algoritmą biojutiklio pradinei medžiagų kiekybinei analizei tirti, kurio reakcija vyksta reaguojant kelių substratų medžiagoms.

Tikslui pasiekti buvo sprendžiami uždaviniai:

- Sukurti praktinių daugiasluoksnių amperometrinių biojutiklių matematinius ir skaitinius modelius.
- Skaitiniams modeliams spręsti sukurti kompiuterinį įrankį.
- Ištirti biojutiklių modelių gaunamus rezultatus ir identifikuoti sąlygas, turinčias įtakos gerinant biojutiklio savybes.

-
- Sukurti algoritmą, kuriuo iš biojutiklio reakcijos rezultato būtų galima įvertinti pradines reakcijos substrato kiekybines koncentracijas.

Metodologija

Biojutiklių schemas yra modeliuojamos remiantis nestacionariomis reakcijos-difuzijos lygtimis su netiesiniu parametru, kuriomis aprašoma biojutiklio fermento reakcijos su analizuojamu tirpalu kinetika [13, 14]. Darbe buvo nagrinėjamos pasirinktos skirtingos biojutiklių schemas, susidedančios iš skirtingų fizinių parametrų. Disertacijos tikslui, uždaviniams ir rezultatams pasiekti, esant įvairioms modelių sąlygoms, buvo vykdomi kompiuteriniai skaičiavimai. Kompiuteriniai modeliai buvo sukurti ANSI C programavimo kalba [15].

Mokslinis naujumas ir rezultatai

- Pateiktas apibendrintas amperometrinio biojutiklio su išoriniu difuzijos sluoksniu matematinis modelis, veikiantis įpurškimo režime.
- Sukurtas amperometrinio biojutiklio su mediatoriumi ir dviem išorinėmis poringomis membranomis modelis, kurio rezultatai buvo pagrįsti pagal turimus eksperimentinius duomenis.
- Nagrinėtiems biojutiklių modeliams buvo nustatytos pusės maksimalios efektyvios koncentracijos reikšmės, parodančios analizuotų biojutiklių efektyvumą.
- Buvo suformuluotas biojutiklio reakcijos, kuriame dalyvauja kelių koncentracijų substratai, pradinių medžiagų koncentracijos įvertinimo uždavinys. Sprendimas pateiktas remiantis optimizavimo metodais paremtais skaičiavimais.

Praktinė rezultatų reikšmė

Buvo aprašyti matematiniai ir kompiuteriniai modeliai, kurie leidžia tyrinėti pasirinktų amperometrinių biojutiklių savybes bei optimizuoti jų cheminę sudėtį, neatliekant brangių cheminių eksperimentų laboratorijoje. Sprendimai buvo padaryti remiantis bedimensiniais modeliais, pateiktos apibendrintos išvados. Šiame darbe pateikti rezultatai buvo panaudoti vykdant projektus:

- “Bioelektrokatalizė sintezėje ir analizėje(BIOSA)” finansuotą Lietuvos mokslo tarybos pagal dotaciją Nr. PBT-04/2010 (2008-2010).

-
- "Paslaugų interneto technologijų kūrimo ir panaudojimo našių skaičiavimų platformose teoriniai ir inžineriniai aspektai" (Nr. VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-010) finansuojamą Europos socialinio fondo pagal priemonę VP1-3.1-ŠMM-08-K „Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros veiklų vykdymas pagal nacionalinių kompleksinių programų tematikas“ (2012-2015).
 - "Tyrėjų gebėjimų stiprinimas" finansuojamą Europos socialinio fondo pagal priemonę Nr. VP1-3.1-ŠMM-07-K „Parama mokslininkų ir kitų tyrėjų mokslinei veiklai (visuotinė dotacija)“ (2007-2013).

Ginami teiginiai

- Biojutiklio matematinis modelis aprašytas bedimensine modelio forma gali būti naudojamas kaip būdas skaitiniam modelio nagrinėjimui ir parametru įtakai tirti.
- Amperometrinio biojutiklio su mediatoriumi skaičiuojamasis modelis, kurį sudaro fermento sluoksnis ir du sluoksniai su poringomis membranomis, gali būti sėkmingai naudojamas biojutiklio kinetinėms savybėms tirti.
- Didinant išorinio sluoksnio storį arba mažinant jame substrato difuzijos koeficientą biojutiklio kalibravimo kreivę galima pratęsti keliomis eilėmis.
- Biojutiklio modelio, nagrinėjamo įpurškimo režime, kalibravimo kreivė gali būti prailginta keliomis eilėmis vien tik sumažinant įpurškimo laiką.
- Optimizavimo metodais grįsta matavimų metodika gali būti naudojama kiekybiniam pradinių analizuojamų medžiagų kiekiui nustatyti.

Darbo rezultatų aprobavimas

Darbo rezultatai buvo publikuoti moksliniuose recenzuojamuose žurnaluose, iš jų trys su ISI citavimo indeksu. Autoriaus indėlis rengiant rezultatus yra skaitinių modelių sukūrimas, programinės įrangos paruošimas, modelių sprendimas, rezultatų teisingumo užtikrinimas ir analizė. Taip pat autorius dalyvavo aprašant mokslinius tyrimus ir rengiant tekstą publikavimui.

1. Baronas, Darius; Ivanauskas, Feliksas; Baronas, Romas. Mechanisms Controlling the Sensitivity of Amperometric Biosensors in Flow Injection Analysis Systems, Journal of Mathematical Chemistry. Dordrecht : Springer Netherlands. ISSN 0259-9791. 2011, vol. 49, no. 8, p. 1521-1534. [ISI]

2. Žilinskas, Antanas; Baronas, Darius. Optimization-Based Evaluation of Concentrations in Modeling the Biosensor-Aided Measurement, Informatica, Vilnius University Institute of Mathematics and Informatics. Vilnius. ISSN 0868-4952. 2011, vol. 22, no. 4, p. 589-600. [ISI]
3. Baronas, Romas; Kulys, Juozas; Žilinskas, Antanas; Lancinskas, Algirdas; Baronas, Darius. Optimization of The Multianalyte Determination With Biased Biosensor Response, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. Amsterdam : Elsevier BV. ISSN 0169-7439. 2013, vol. 126, p. 108-116. [ISI]

Publikacijos recenzuojamuose konferencijų leidiniuose

Disertacijos rengimo metu buvo paruošti ir perskaityti du pranešimai tarptautinėse konferencijose:

1. Baronas, Darius; Žilinskas, Antanas; Ivanauskas, Feliksas. Computational modelling and validation of a multilayer amperometric biosensor, XVIII tarptautinė konferencija, skirta magistro ir doktorantūros studijų studentams "Information Society and University Studies" (IVUS 2013), balandžio 25, 2013, Kaunas, Lietuva.
2. Baronas, Romas; Baronas, Darius. Modeling and simulation of amperometric biosensors acting in flow injection analysis. Europos modeliavimo ir simuliacijų simpoziumas, rugsėjo 25-27, 2013, Atėnai, Graikija

Papildomai, pranešimų straipsniai buvo išspausdinti konferencijų leidiniuose:

1. Baronas, Darius; Žilinskas, Antanas; Ivanauskas, Feliksas. Computational modelling and validation of a multilayer amperometric biosensor. Proceedings of the XVIII international master and phd students conference "Information Society and University Studies" (IVUS 2013): Kaunas, Lietuva, 25 Balandis 2013. Spausdinta: 2013, p. 22-26. ISSN 2029-4824
2. Baronas, Romas; Baronas, Darius. Modeling and simulation of amperometric biosensors acting in flow injection analysis. Proceedings of the European Modeling and Simulation Symposium, rugsėjo 25-27, 2013, Atėnai, Graikija. Red.: A.G. Bruzzone, E. Jimenez, F. Longo, Y. Merkurjev. Spausdinta: Render (CS), Italija, Rugsėjis 2013, p. 107-114. ISBN 978-88-97999-16-4

Padėka

Dėkoju savo moksliniam vadovui prof. habil. dr. Antanui Žilinskui ir moksliniam konsultantui prof. habil. dr. Feliksui Ivanauskui už skirtą laiką ir postūmius rašant šį darbą.

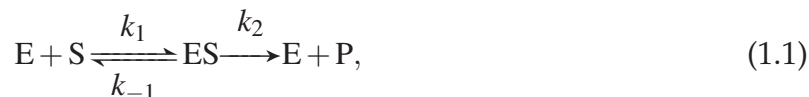
1. Biojutiklių modeliavimas

1.1 Biojutikliai

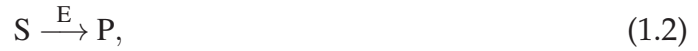
Biojutiklis tai įrenginys, kuris geba paversti cheminės reakcijos rezultata į analitiškai suprantamą informaciją. Analizės rezultatai priklauso nuo to koks kiekis produkto susiformavo cheminės reakcijos metu. Paprastai biojutiklis susideda iš dviejų dalių: chemiškai aktyvios medžiagos ir signalo keitiklio [16, 17]. Biojutikliai yra klasifikuojami pagal naudojamą cheminę medžiagą ir signalo keitiklį: elektrocheminius, optinius [17, 18] ir kt. Elektrocheminiai biojutikliai yra skirstomi į amperometrinius ir potenciometrinius. Vieni plačiausiai naudojamų yra amperometriniai biojutikliai [19–21]. Disertacijoje nagrinėjami amperometriniai biojutikliai, kurių reakcijos metu yra matuojama susidariusios srovės kiekis [22, 23].

1.2 Matematinis biojutiklio modelis

Biojutiklyje substratas(S), reaguodamas su fermentu (E), sudaro tarpinį junginį (ES), kuris reakcijos metu skyla į produktą (P) ir fermentą (E) [24, 25]:



kur k_1, k_{-1}, k_2 yra atitinkamos reakcijos greičio konstantos. Fermentai pasiekia savo efektyvumą dėl laikino susirišimo su substratu, kas sumažina efektyvinimo energiją, kurios reikia sudaryti produktą. Bendru atveju, galima takyti supaprastintą reakcijos modelį, tariant, kad fermento ir substrato sąveikos rezultatas yra produktas [16, 25, 26]:



kur substratas (S), veikiamas fermento (E), virsta produktu (P).

1.2.1 Pagrindinės lygtys

Laikant, kad elektrodas yra simetriškas ir fermentas tolygiai paskirstytas fermento sluoksnyje, matematinis biojutiklio modelis gali būti aprašomas vienmatėje erdvėje [13, 14, 27]. Apjungiant fermento katalizuojamą reakciją su difuzijos nariais, aprašomais Fick dėsniais, gaunamos tokios reakcijos lygtys:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} - \frac{V_{\max} S}{K_M + S}, \quad (1.3a)$$

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{V_{\max} S}{K_M + S}, \quad x \in (0, d), \quad t > 0, \quad (1.3b)$$

kur x ir t yra erdvės koordinatė ir laikas, $S(x, t)$ ir $P(x, t)$ yra substratas (S) ir produktas (P) fermento sluoksnyje, D_S ir D_P yra difuzijos koeficientai, o V_{\max} yra maksimalus reakcijos virsmo greitis kai fermentas yra pilnai prisisotinęs substrato, K_M yra Michaelis konstanta, o d yra fermento sluoksnio storis [13, 28, 29].

1.2.2 Pradinės sąlygos ir bedimensinis modelis

Pradinės sąlygos nurodo biojutiklio būseną pradiniam reakcijos taške [30–32]. Laikoma, kad $x = 0$ yra elektrodo paviršius, o $x = d$ yra kraštinė biojutiklio modelio riba, vieta kur susilieja analizuojama medžiaga su fermento sluoksniu. Reakcija yra stebima tada kai substratas atsiranda ant fermento membranos ($t = 0$).

Išskirti pagrindinius lygties parametrus, turinčius įtakos reakcijai, bei tuo pačiu biojutiklio tyrimų metu sumažinti reakcijos kintamųjų kiekį, yra aprašomi bedimensiniai biojutiklio modeliai. Išskirti pagrindiniai parametrai yra pažymimi kintamuoju α^2 , vadinamu difuzijos moduli, kuris dar žinomas kaip Damköhler skaičius [27, 28].

1.3 Biojutiklio atsakas

Susidariusi elektros srovė yra pagrindis parametras, kuris yra matuojamas reakcijos metu. Srovė matuojama ant biojutiklio elektrodo paviršiaus [27, 33]:

$$i_A(t) = n_e F A D_P \left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (1.4)$$

kur n_e yra elektronų skaičius, A yra elektrodo paviršiaus plotas, F yra Faraday konstanta, $F = 96.485 \text{C/mol}$.

Srovės tankis $i(t)$ laiko momentu t :

$$i(A) = \frac{i_A}{A} = n_e F D_P \left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (1.5)$$

Sistema artėja prie stacionarios būsenos kai $t \rightarrow \infty$:

$$I = \lim_{t \rightarrow \infty} i(t). \quad (1.6)$$

1.3.1 Modelio reakcijos laikas

Laikas nuo reakcijos pradžios iki reakcijos modeliavimo pabaigos yra vadinamas reakcijos laiku. Eksperimentų reakcijų reikšmės buvo stebimos fiksuotą (pasirinktą) laiko tarpą arba kol laiko momentu t santykinis srovės pokytis tampa mažesniu už pasirinktą mažą dydį - koeficientą ε :

$$T = \min_{i(t) > 0} \left\{ t : \frac{t}{i(t)} \left| \frac{di(t)}{dt} \right| < \varepsilon \right\}. \quad (1.7)$$

kur T yra reakcijos laikas, $T \rightarrow \infty$, $\varepsilon \rightarrow \infty$

1.3.2 FIA

Biojutiklių modeliai yra nagrinėjami ne tik vonios režime, kai biojutiklio išorinis sluoksnis turi sąlytį su substratu visą eksperimento laiką [34], bet ir įpurškimo režime (FIA). Tokiu būdu biojutiklio išorinis sluoksnis liečiasi su substratu tik dalį reakcijos laiko (pvz. kelias sekundes ar sekundės dalis) [35]. Įpurškimo režime substratas gali būti įpurškiamas vieną ar kelis kartus [36, 37]. Šiuo būdu vykdomų reakcijų metu gali būti stebimi ir gerinami tokie patys biojutiklio parametrai kaip ir vonios režimo atveju, tačiau šiose reakcijose, lyginant su vonios režimu, stebimas trumpesnis reakcijos laikas, galimybė naudoti mažesnę kiekį substrato [38]. Literatūroje dažniausiai sutinkama, kad biojutiklių modeliavimas FIA režime

dažniausiai vykdomas be išorinio sluoksnio [39], tačiau yra bandymų atlikti modeliavimus ir su išoriniu sluoksniu [40]. Žvelgiant iš praktinės pusės, modeliavimo rezultatai yra vertingesni su išoriniu sluoksniu, kuriame vyksta medžiagos difuzija [41].

1.3.3 Biojutiklio jautrumas

Nagrinėjant biojutiklio savybes buvo atsižvelgiama į pagrindinius parametrus didinančius išorinio difuzijos sluoksnio pralaidumą, fermento sluoksnio storį, parametrus, kurie įtakoja didesnę biojutiklio jautrumą, o keičiant (substrato) įpurškimo laiką buvo prailginama biojutiklio kalibravimo kreivė. Kalibravimo kreivė nusako kaip priklausomai nuo substrato koncentracijos keičiasi biojutiklio atsakas. Pusė maksimalios efektyvios koncentracijos ir kalibravimo kreivė buvo naudojami kaip vieni pagrindinių jautrumo sąlygas išreiškiančių parametru [42, 43]. Skaitiniai modelio skaičiavimai atlikti naudojant baigtinių skirtumų techniką [27, 44].

1.3.3.1 Pusė maksimalios efektyvios koncentracijos konstanta

Pusė maksimalios efektyvios koncentracijos C_{50} yra substato koncentracija, kuriai esant yra gaunama pusė maksimalios, biojutiklio gerenuojamos srovės:

$$C_{50} = \left\{ S_0^* : I_{\max}(S_0^*) = 0.5 \lim_{S_0 \rightarrow \infty} I_{\max}(S_0) \right\}, \quad (1.8)$$

kur $I_{\max}(S_0)$ yra maksimali biojutiklio generuojama srovė, esant substato koncentracijai S_0 .

Šiame darbe pusė maksimalios efektyvios koncentracijos buvo pasirinkta kaip pagrindinis parametras biojutiklio jautrumui nusakyti. Didesnė C_{50} reikšmė reiškia, kad kalibravimo kreivės tiesiškai kintanti kreivės dalis yra ilgesnė [45].

1.3.3.2 Biot skaičius

Biot skaičius yra bedimensinio modelio parametras, kuris dažnai naudojamas nurodyti vidaus medžiagos pernešimo atsparumą išorinei [46, 47]:

$$Bi = \frac{d/D_{S_1}}{\delta/D_{S_2}} = \frac{D_{S_2}d}{D_{S_1}\delta} = \hat{D}_{21} \frac{d}{\delta}, \quad (1.9)$$

kur D_{S_1} ir D_{S_2} yra difuzijos koeficientai, d ir δ yra atitinkamai fermento ir difuzijos sluoksnių storiai.

2. Daugiasluoksnių biojutiklių modeliavimasis

2.1 Biojutiklio modeliavimas įpurškimo režime

Šiame skyriuje yra pateiktas amperometrinių biojutiklio jautrio tyrimas, atliktas substrato įpurškimo režime. Analitinė sistema yra modeliuota ne stacionariomis reakcijos difuzijos lygtimis su netiesiniu nariu pagal Michaelis-Menten fermento reakcijos kinetiką [27, 44]. Matematinis modelis apima tris sritis: fermento sluoksnį, kur stebima fermento reakcija ir difuzija, difuzijos sluoksnį ir šių sluoksnių sandūrą. Šiame tyrime atliekamas biojutiklio jautrumo didinimo tyrimas atsižvelgiant į biojutiklio kalibravimo kreivės ilginimą keičiant įpurškimo laiką, išorinio difuzijos sluoksnio laidumą, fermento sluoksnio storį ir reakcijos greitį. Pusė maksimalios efektyvios koncentracijos yra naudojama kaip pagrindis skaičiuojamas parametras jautrumo didinimui [42, 43].

2.1.1 Matematinis modelis

Biojutiklio modelis apima tris sritis: fermento sluoksnį, kur stebima fermento reakcija ir difuzija, difuzijos sluoksnis ir šių sluoksnių sandūrą (1.1) [24]. Substratas, reaguodamas su fermentu, reakcijos metu sukuria produktą ir fermentą (1.2) [16, 25].

2.1.2 Pagrindinės lygtys

Tariant, kad elektrodas yra simetriškas ir fermentas fermento sluoksnyje yra pasiskirstęs tolygiai, matematinis modelis gali būti aprašomas vienmatėje erdvėje [13, 27]. Sujungiant fermentu katalizuojamas reakcijas su difuzijos nariais, aprašomais Fick lygtimis, gaunamos

tokios pagrindinės reakcijos-difuzijos tipo lygtys:

$$\frac{\partial S_1}{\partial t} = D_{S_1} \frac{\partial^2 S_1}{\partial x^2} - \frac{V_{\max} S_1}{K_M + S_1}, \quad (2.1a)$$

$$\frac{\partial P_1}{\partial t} = D_{P_1} \frac{\partial^2 P_1}{\partial x^2} + \frac{V_{\max} S_1}{K_M + S_1}, \quad x \in (0, d), \quad t > 0, \quad (2.1b)$$

kur x ir t yra atitinkamai erdvės koordinatė ir laikas, S_1 ir P_1 yra atitinkamai substrato (S) ir produkto (P) kiekis fermento sluoksnyje, D_{S_1} ir D_{P_1} yra difuzijos koeficientai, V_{\max} yra maksimalus reakcijos virsmo greitis kai fermentas yra pilnai prisisotinęs substrato, K_M yra Michaelis konstanta, d yra fermentinio sluoksnio storis [13, 28].

Išoriniame sluoksnyje vyksta tik medžiagos difuzija:

$$\frac{\partial S_2}{\partial t} = D_{S_2} \frac{\partial^2 S_2}{\partial x^2}, \quad (2.2a)$$

$$\frac{\partial P_2}{\partial t} = D_{P_2} \frac{\partial^2 P_2}{\partial x^2}, \quad x \in (d, d + \delta), \quad t > 0, \quad (2.2b)$$

kur S_2 ir P_2 yra substrato ir produkto koncentracijos išoriniame sluoksnyje, D_{S_2} ir D_{P_2} yra difuzijos koeficientai, o δ yra difuzijos sluoksnio storis.

2.1.3 Modelio parametrai

Modeliavimui atlikti yra nustatomos modelio pradinės reikšmės, kai $t = 0$ bei modelio srityse: elektrodo paviršiuje $x = 0$, difuzijos sluoksnio krašte $x = d + \delta$ bei fermento ir difuzijos sluoksnių sandūroje, kai $x = d$ [13, 27].

Išorinis difuzijos sluoksnis $d < x < d + \delta$ yra aprašomas kaip Nernst difuzijos sluoksnis [44]. Tokiu būdu yra laikoma, kad difuzijos sluoksnio storis δ bėgant laikui išlieka pastovus ir medžiagų koncentracija yra pastovi.

Biojutiklio veikimo įpurškimo režime substratas yra įpurškiamas tik trumpam laikui ($T_F < T$, kur T_F yra įpurškimo laikas), vieną kartą visos reakcijos metu. Vėliau substratas sąlyčio su modeliu neturi:

$$P_2(d + \delta, t) = 0, \quad S_2(d + \delta, t) = \begin{cases} S_0, & t \leq T_F, \\ 0, & t > T_F. \end{cases} \quad (2.3)$$

2.1.4 Biojutiklio atsakas

Biojutiklio atsakas yra reakcijos metu matuojama srovė, kuri atsiranda ant elektrodo paviršiaus ir yra tiesiogiai proporcinga reakcijos produkto koncentracijos gradientui, kai $x = 0$. Biojutiklio srovės tankis $I(t)$ laiko momentu t yra aprašomas Faraday ir Fick dėsniais [13],

$$I(t) = n_e F D_{P_1} \left. \frac{\partial P_1}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (2.4)$$

Laikoma, kad sistema pasiekia pusiausvyrą kai $t \rightarrow \infty$.

Srovė yra pagrindinis skaičiuojamas biojutiklio modelio parametras visos reakcijos metu, vonios režime [24]. Kadangi įpurškimo režime substato koncentracija yra nulinė, kai $t > T_F$, tai nuolatinė nusistovėjusi srovė taip pat nukrenta iki nulio, $I(t) \rightarrow 0$, kai $t \rightarrow \infty$. Dėl šios priežasties, įpurškimo režime nusistovėjusios srovės skaičiavimas praktiškai nėra naudingas. Kadangi srovės tankis $I(t)$ yra ne monotonišė funkcija, skaičiuojama maksimali biojutiklio srovė

$$I_{\max} = \max_{t>0} \{I(t)\}, \quad (2.5)$$

kur I_{\max} yra maksimalus biojutiklio srovės tankis.

2.1.5 Bedimensinis modelis

Kad išskirti pagrindinius matematinio modelio veikimą lemiančius parametrus, bei supaprastinti modelį sumažinant reikšmingų parametrų kiekį, buvo sukurtas bedimensinis modelis [46, 48]. Visi modelio parametrai yra pakeičiami į bedimensinius. Fermento sluoksnyje reakcijos-difuzijos lygtys (2.1) gali būti perrašytos:

$$\frac{\partial \hat{S}}{\partial \hat{T}} = \frac{\partial^2 \hat{S}}{\partial \hat{X}^2} - \alpha^2 \frac{\hat{S}}{1 + \hat{S}}, \quad (2.6a)$$

$$\frac{\partial \hat{P}}{\partial \hat{T}} = \frac{D_{P_1}}{D_{S_1}} \frac{\partial^2 \hat{P}}{\partial \hat{X}^2} + \alpha^2 \frac{\hat{S}}{1 + \hat{S}}, \quad \hat{X} \in (0, 1), \quad \hat{T} > 0, \quad (2.6b)$$

kur α^2 yra difuzijos modulis, vadinamas Damköhler skaičiumi [27, 28],

$$\alpha^2 = \frac{d^2 V_{\max}}{D_{S_1} K_M}. \quad (2.7)$$

Difuzijos lygtys (2.2) yra transformuojamos atitinkamai:

$$\frac{\partial \hat{S}}{\partial \hat{T}} = \frac{D_{S_2}}{D_{S_1}} \frac{\partial^2 \hat{S}}{\partial \hat{X}^2}, \quad (2.8a)$$

$$\frac{\partial \hat{P}}{\partial \hat{T}} = \frac{D_{P_2}}{D_{S_1}} \frac{\partial^2 \hat{P}}{\partial \hat{X}^2}, \quad \hat{X} \in (1, 1 + \hat{\Delta}), \quad \hat{T} > 0. \quad (2.8b)$$

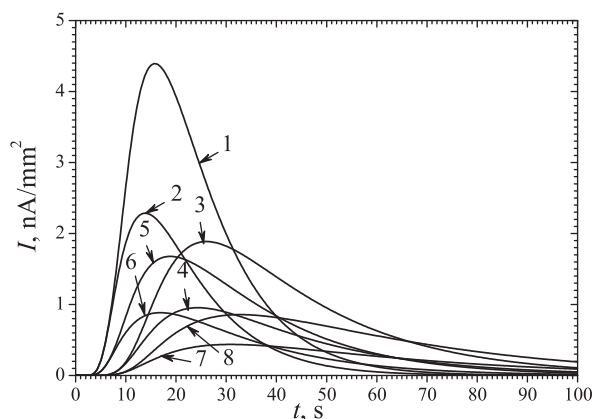
Taip pat atitinkamai į bedimensinę formą yra transformuojamos ir pradinės, tarpinės ir kraštinės sąlygos. Reakcijos metu skaičiuojama bedimensinė srovė \hat{I} :

$$\hat{I}(\hat{T}) = \left. \frac{\partial \hat{P}}{\partial \hat{X}} \right|_{\hat{X}=0} = \frac{I(t)d}{n_e F D_{P_1} K_M}. \quad (2.9)$$

2.1.6 Skaitinis modeliavimas

Analiziškai lygtys nesprensdžiamos dėl jų netiesiškumo (2.1)-(2.4) [13], todėl naudojami skaitiniai metodai. Buvo sudaryta baigtinių skirtumų schema, naudojant tolygų tinklą [27, 33].

Matematinis modelis ir skaitinio modelio rezultatai buvo pagrįsti pagal žinomus analitinius sprendinius [13]. Buvo atlikti kompiuteriniai bandymai, kitas kintamųjų reikšmes išlaikant pastovias [49], 2.1 pav. pateiktas srovės tankio $I(t)$ srovės kitimo kreivė. Biojutiklio reakcija buvo modeliuota esant substrato koncentracijai S_0 ($S_0 = K_M$) ir skirtingiems kitiems modelio parametrams, difuzijos moduliui α^2 (1 ir 2), įpurškimo laikui T_F (3 ir 6 s) ir bedimensiniui Biot skaičiui Bi (1 ir 2).



2.1 pav.: Biojutiklio atsako dinamika, kai difuzijos modulis α^2 : 1 (5-8), 2 (1-4), Biot skaičius Bi : 1 (3, 4, 7, 8), 2 (1, 2, 5, 6) ir įpurškimo laikas T_F : 3 (2, 4, 6, 8), 6 s (1, 3, 5, 7)

2.1 pav. matoma, kad biojutiklio srovės kinta ne monotoniškai. Visais atvejais, substrato įpurškimo režime srovė kyla ($t \leq T_F$). Taip pat srovė kurį laiką kyla ir po substrato įpurškimo nutraukimo ($t \geq T_F$). Laikas kada pasiekiami maksimali srovė ir maksimalios srovės dydis priklauso nuo visų trijų parametru: α^2 , Bi ir T_F .

2.1 pav. matyti, kad maksimalus srovės tankis I_{\max} padidėja iki 2 kartų, kai įpurškimo laikas T_F yra padvigubinamas, visgi padidinus T_F laiką du kartus, maksimalios srovės atsako padidėjimas nežymus. Palyginant kreives 1 ($T_F = 6$) ir 2 ($T_F = 3$ s), galima matyti, kad maksimalaus atsako gavimo laikas padidėjo nuo 13.9 tik iki 16 s, nors I_{\max} padidėja nuo 2.3 iki 4.4 nA/mm², kai $\alpha^2 = 2$, $Bi = 2$.

Tai pat 2.1 pav. yra matoma, kad biojutiklio reakcijos atsakas labai priklauso nuo Biot skaičiaus Bi . Mažinamas Bi prailgina atsaką. Maksimali srovė sumažėja kai yra padidinamas išorinio sluoksnio storis, t.y. mažinamas Bi .

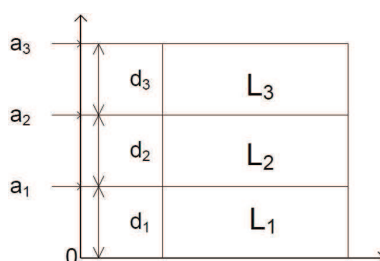
Modeliavimo bandymai buvo atlikti imant platų nagrinėjamų parametru: difuzijos modulio α^2 , Biot skaičiaus Bi ir įpurškimo laiko T_F reikšmių diapazoną.

2.2 Biojutiklio modeliavimas įpurškimo režime

Šio biojutiklio modelio tikslas buvo sukurti skaičiuojamąjį modelį efektyviam biojutiklio modelio skaičiavimui, kuriame būtų įvertintas dializės membranų ir įpurškimo režimo parametru poveikis reakcijai.

2.2.1 Biojutiklio struktūra

Biojutiklio modelio struktūra susideda iš kelių sluoksnių [50]. 2.2 pav. schematiškai pavaizduota biojutiklio struktūra, kurią sudaro sluoksnis L_1 , kuriame vyksta reakcija ir difuzija bei sluoksniai L_1, L_2 , kuriuose vyksta tik difuzija.



2.2 pav.: Biojutiklio struktūros schema

Išorinis sluoksnis ($a_2 < x < a_3$) yra aprašomas kaip Nernst difuzijos sluoksnis [44].

2.2.2 Matematinis modelis

Tariant, kad elektrodas yra simetriškas ir dializės membrana yra simetriška bei fermentas fermento sluoksnyje yra pasiskirstęs tolygiai, matematinis modelis gali būti aprašomas vienmatėje erdvėje [13, 27]. Apjungiant fermento katalizuojamą reakciją 1.2 su difuzijos nariais, aprašomais Fick dėsniumi, aprašytos reakcijos-difuzijos lygtys:

$$\frac{\partial S_1}{\partial t} = D_{S_1} \frac{\partial^2 S_1}{\partial x^2} - \frac{V_{\max} S_1}{K_M + S_1}, \quad (2.10a)$$

$$\frac{\partial P_1}{\partial t} = D_{P_1} \frac{\partial^2 P_1}{\partial x^2} + \frac{V_{\max} S_1}{K_M + S_1}, \quad x \in (0, a_1), \quad (2.10b)$$

ne fermento sluoksnyje vyksta tik medžiagų difuzija ($t > 0$),

$$\frac{\partial S_i}{\partial t} = D_{S_i} \frac{\partial^2 S_i}{\partial x^2}, \quad (2.11a)$$

$$\frac{\partial P_i}{\partial t} = D_{P_i} \frac{\partial^2 P_i}{\partial x^2}, \quad x \in (a_{i-1}, a_i), \quad i = 2, 3, \quad (2.11b)$$

kur S_i ir P_i yra substrato ir produkto koncentracijos i -ame sluoksnyje, D_{S_i} ir D_{P_i} yra difuzijos koeficientai, o $d_i = a_i - a_{i-1}$ yra atitinkamų sluoksnių plotis, $i = 2, 3$.

Biojutikliui veikiant substratui persisunkus per difuzijos sluoksnį ir dializės membraną, substratas pasiekia fermento sluoksniu ribą ($x = a_1$). Substrato perėjimas tarp dviejų skirtingų difuzija pasižyminčių sluoksnių, aprašomas sąlygomis ($t > 0, i = 1, 2$):

$$D_{S_i} \frac{\partial S_i}{\partial x} \Big|_{x=a_i} = D_{S_{i+1}} \frac{\partial S_{i+1}}{\partial x} \Big|_{x=a_i}, \quad (2.12a)$$

$$S_i(a_i, t) = S_{i+1}(a_i, t), \quad (2.12b)$$

$$D_{P_i} \frac{\partial P_i}{\partial x} \Big|_{x=a_i} = D_{P_{i+1}} \frac{\partial P_{i+1}}{\partial x} \Big|_{x=a_i}, \quad (2.12c)$$

$$P_i(a_i, t) = P_{i+1}(a_i, t). \quad (2.12d)$$

Sudarant bedimensinį biojutiklio modelį reakcijos - difuzijos lygtys, kraštinės ir pradinės sąlygos perrašomos naudojant α^2 Damköhler skaičių [13],

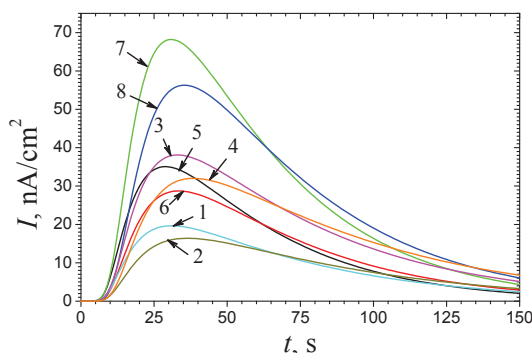
$$\alpha^2 = \frac{d_1^2 V_{\max}}{D_{S_1} K_M}. \quad (2.13)$$

2.2.3 Skaitinis modeliavimas

Matematinio ir skaitinio modelio gaunami rezultatai buvo pagrįsti pagal žinomus analitinius sprendinius [13]. Disertacijoje pateiktos pastovių parametrų reikšmės, naudotos atliekant eksperimentus. [49, 51].

Tam kad ištirti pusę maksimalios efektyvios koncentracijos C_{50} priklausomybę nuo modelio parametrų bandymai buvo atlikti pasirenkant plačius parametrų: dializės membranos storio d_2 , difuzijos modulio α^2 ir įpurškimo laiko T_F intervalus.

2.3 pav. pateikiama ne monotoninis biojutiklio srovės kitimas. Visais nagrinėtais atvejais, didėjant laikui t , didėja ir srovė, priklausomai nuo įpurškimo laiko T_F ($t \leq T_F$). Maksimali srovė I_{\max} ir tuo metu laikas T_{\max} priklauso nuo modelio parametrų V_{\max} , T_F ir d_2 . Visais bandymų atvejais, maksimalios srovės laiko momentas buvo didesnis nei T_F ($T_{\max} > T_F$). Pateiktame grafike yra matoma, kad skirtingoms modelio parametrų reikšmėms V_{\max} ir d_2 , maksimalios srovės tankis I_{\max} padidėja beveik du kartus kai padvigubėja įpurškimo laikas T_F . Palyginant grafiko kreives 1 ($T_F = 3$) ir 3 ($T_F = 6s$) matoma, kad maksimalaus atsako

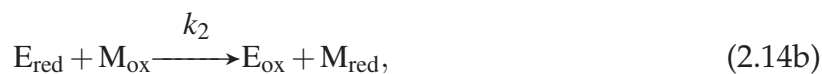


2.3 pav.: Biojutiklio atsako dinamika; V_{\max} : 0.75 (1-4), 1.5 μM (5-8), T_F : 3 (1, 2, 5, 6), 6 s (3, 4, 7, 8); d_2 : 10 (1, 3, 5, 7), 20 μm (2, 4, 6, 8)

laikas T_{\max} padidėja nuo 31 tik iki 33 s, nors I_{\max} padidėja nuo 19.7 iki 38 nA/cm^2 kai $V_{\max} = 0.75 \mu\text{M}$ ($\alpha^2 = 2$) ir $d_2 = 10 \mu\text{m}$ ($\hat{d}_2 = 0.1$).

2.3 Biojutiklio modeliavimas ir patvirtinimas eksperimentiniais duomenimis

Pasirinkto biojutiklio tikslas buvo sukurti matematinį amperometrinio biojutiklio modelį su mediatoriumi, kurį sudarytų fermento sluoksnis ir dvi poringos membranos. Matematinis modelis ir skaitiniai modelio rezultatai buvo pagrįsti naudojant eksperimentinius biojutiklio duomenis. Fermento sluoksnyje vyksta dviejų pakopų reakcija:



kur substratas (S) su mediatoriumi (M), reaguoja su fermentu (E) suformuodami produktą (P) [40]. Čia E_{ox} yra oksiduoto fermento, o E_{red} - redukuoto fermento formos. Atitinkamai, M_{ox} ir M_{red} yra oksiduotos ir redukuotos mediatoriaus formos.

Ant elektrodo paviršiaus biojutiklio su mediatoriumi elektrocheminės reakcijos schema:



2.3.1 Pagrindinės lygtys

Laikant, kad elektrodas yra simetriškas ir fermentas fermento sluoksnyje yra pasiskirstęs tolygiai, matematinis modelis gali būti aprašomas vienmatėje erdvėje [13, 27]. Apjungiant fermento katalizuojamą reakciją su difuzijos nariais, aprašomais Fick dėsniais, gaunamos tokios reakcijos-difuzijos lygtys:

$$\frac{\partial E_{ox}}{\partial t} = k_2 M_{ox,1} E_{red} - k_1 E_{ox} S_1, \quad (2.16a)$$

$$\frac{\partial E_{red}}{\partial t} = -k_2 M_{ox,1} E_{red} + k_1 E_{ox} S_1, \quad (2.16b)$$

$$\frac{\partial M_{ox,1}}{\partial t} = D_{M_{ox,1}} \Delta M_{ox,1} - k_2 M_{ox,1} E_{red,1}, \quad (2.16c)$$

$$\frac{\partial M_{red,1}}{\partial t} = D_{M_{red,1}} \Delta M_{red,1} + k_2 M_{ox,1} E_{red,1}, \quad (2.16d)$$

$$\frac{\partial S_1}{\partial t} = D_{S_1} \Delta S_1 - k_1 E_{ox,1} S_1, \quad x \in (0, a_1), t > 0, \quad (2.16e)$$

kur x ir t yra erdvės ir laiko koordinatės, Δ yra Laplaso operatorius, S_1 yra substrato (S) koncentracija fermento sluoksnyje, E_{ox} , E_{red} , $M_{ox,1}$ ir $M_{red,1}$ yra atitinkamai oksiduoto ir redukuoto fermento ir mediatoriaus koncentracijos, D_{S_1} , $D_{M_{ox,1}}$, $D_{M_{red,1}}$ yra difuzijos koeficientai, o $a_1 = d_1$ yra fermento sluoksnio storis [13, 28, 29].

Išoriniame sluoksnyje vyksta tik medžiagos difuzija: ($t > 0$),

$$\frac{\partial M_{ox,i}}{\partial t} = D_{M_{ox,i}} \Delta M_{ox,i}, \quad (2.17a)$$

$$\frac{\partial M_{red,i}}{\partial t} = D_{M_{red,i}} \Delta M_{red,i}, \quad (2.17b)$$

$$\frac{\partial S_i}{\partial t} = D_{S_i} \Delta S_i, \quad x \in (a_{i-1}, a_i), \quad i = 2, 3, 4, \quad (2.17c)$$

kur S_i yra substrato koncentracija sluoksnyje (a_{i-1}, a_i) , $M_{ox,i}$ ir $M_{red,i}$ yra atitinkamai oksiduoto ir redukuoto mediatoriaus koncentracijos, D_{S_1} , $D_{M_{ox,1}}$ ir $D_{M_{red,1}}$ yra difuzijos koeficientai, $i = 2, 3, 4$.

2.3.2 Biojutiklio atsakas

Biojutiklio atsakas yra matuojama elektros srovė, kuri yra tiesiogiai proporcinga produkto koncentracijos gradientui ant elektrodo paviršiaus $x = 0$. Srovės dydis $I(t)$ laiko momentu t

yra aprašomas Faraday ir Fick dėsniais [13],

$$I(t) = n_e F A D_{M_{red,1}} \left. \frac{\partial M_{red,1}}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (2.18)$$

$$= -n_e F D_{M_{ox,1}} \left. \frac{\partial M_{ox,1}}{\partial x} \right|_{x=0}. \quad (2.19)$$

Laikoma, kad sistema (2.16)–(2.17) pasiekia pusiausvyrą kai $t \rightarrow \infty$ [16, 24]

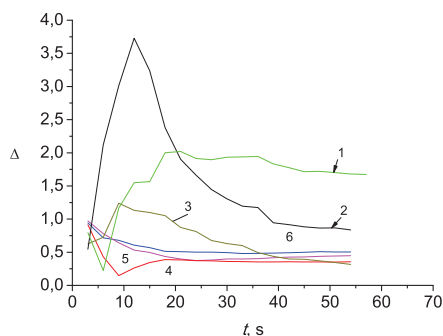
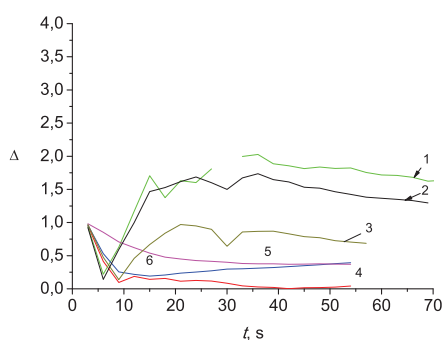
$$I_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} I(t). \quad (2.20)$$

2.3.3 Skaitinis modeliavimas

Skaitiniai modeliavimai buvo atlikti esant tokioms mediatoriaus reikšmėms: $M_0^{(1)} = 200 \mu\text{M}$, $M_0^{(2)} = 50 \mu\text{M}$, $M_0^{(3)} = 5 \mu\text{M}$, kai kiti modelio parametrai eksperimento metu buvo pastovūs. Kai kurių eksperimentinio modelio tikslių parametrų nebuvo įmanoma nustatyti [52], todėl tokie parametrai buvo nustatyti modeliuojant biojutiklį.

Kompiuterinio modelio gauti rezultatai išsiskyrė esant didesnėms modelio koncentracijoms, visgi prie mažesnių koncentracijų $M_0^{(3)}$ modelis grąžino rezultatus artimus eksperimentiniams. Iliustruoti skirtumus, buvo apskaičiuotos santykinės rezultatų paklaidos. 2.4 pav. yra pateikiamos santykinų paklaidų skaičiavimų rezultatai, kai $M_0^{(i)}$, $i = 1, 2, 3$. 2.4b pav. santykinės paklaidos mažėja nuo 0.3 kai $t = 10$ s iki 0 kai $t = 42$ s, o esant didesnėms t reikšmėms santykinė paklaida didėja. Kai $S_0 = 0.99$ mM santykinės paklaidos kreivės monotoniškai mažėja nuo 1, pradiniam reakcijos taške, iki 0.4, o kai $S_0 = 0.49$ mM. Santykinė paklaida didėja nuo 0.25 iki 0.4 kai ($t = 55$ s).

Nepaisant modeliavimo rezultatų netolygumo, modelis yra tinkamas tirti biojutiklio savybes

(a) $M_0^{(1)} = 200 \mu\text{M}$ (b) $M_0^{(2)} = 50 \mu\text{M}$

2.4 pav.: Kompiuterinio modelio santykinų paklaidų kitimas, lyginant su eksperimentiniais duomenimis, kai $M_0^{(i)}$, $i = 1, 2$ ir S_0 koncentracijos: 0.49 mM (6), 0.99 mM (5), 1.99 mM (4), 4.98 mM (3), 9.9 mM (2), 19.6 mM (1)

bei gerinti daugiasluoksnio biojutiklio konfigūraciją.

3. Kiekybinė substrato mišinio analizė

3.1 Pradinių substrato koncentracijų įvertinimas naudojantis optimizavimo metodais grįsta matavimų metodika

Atlikti kompiuteriniai modeliavimai, kurių metu buvo siekiama įvertinti pradinę substratų junginio (mišinio) struktūrą, dalyvavusią biojutiklio reakcijos metu. Toks uždavinys buvo

sprendžiamas ir kitų autorių, tačiau pasitelkiant neuroninius tinklus [53, 54].

Laikome, kad funkcija $z(t, x) = \sum_{j=1}^k y_j(t, x_j)$, $0 \leq t \leq t_{\max}$, $x = (x_1, \dots, x_k) \in X$, kur funkcijos $y_j(t, x_j)$ yra žinomos. Parametras x turi būti įvertintas pagal stebimas reikšmes $w_i = z(t_i, x)$, $0 \leq t_i \leq t_{\max}$, $i = 1, \dots, n$. Tyrimo pagrindinis uždavinys yra įvertinti k substratų (komponentų) koncentracijas mišinyje, naudojant gautus biojutiklio rezultatus w_i , $i = 1, \dots, n$, ir rezultatus biojutiklio $y_j(t, x_j)$, kurie gauti su vienu žinomu substratu.

3.1.1 Matematinis modelis

Mes nagrinėjame substratų mišinį, kuris dalyvauja biojutiklio biocheminėje reakcijoje:



kur substratas (S_j , jungiasi su fermentu (E_j), sudarydami produktą (P_j), $j = 1, \dots, k$) [24, 25]. Šiuose modeliavimo bandymuose nebuvo nagrinėjama substratų tarpusavio sąveika. Reakcijos aprašytos pagal Fick dėsnį, pagal kurį gauname šias reakcijos lygtis:

$$\begin{aligned} \frac{\partial s_j}{\partial t} &= D_{S_j} \frac{\partial^2 s_j}{\partial \tau^2} - \frac{V_j s_j}{K_j + s_j}, \\ \frac{\partial p_j}{\partial t} &= D_{P_j} \frac{\partial^2 p_j}{\partial \tau^2} + \frac{V_j s_j}{K_j + s_j}, \\ 0 < \tau < d, \quad 0 < t \leq t_{\max}, \quad j &= 1, \dots, k, \end{aligned} \quad (3.2)$$

kur $s_j(\tau, t)$ ir $p_j(\tau, t)$ yra substrato ir produkto koncentracijos fermento sluoksnyje, D_{S_j} , D_{P_j} yra atitinkamai substrato ir produkto difuzijos koeficientai, V_j yra maksimalus reakcijos virsmo greitis, kai fermentas yra pilnai prisisotinęs substrato, S_j , $j = 1, \dots, k$. K_j ($j = 1, \dots, k$) yra Michaelis konstanta, t yra laikas, t_{\max} yra laiko intervalas, kai stebima analizuojamo biojutiklio reakcija, d yra fermento sluoksnio storis. Biocheminė reakcija prasideda tada, kai substratas patenka ant fermento sluoksnio.

Modeliui buvo nustatytos pradinės sąlygos ($t=0$) ir kraštinės sąlygos ($0 < t \leq t_{\max}$) bei kraštinės sąlygos nagrinėjant modelį substrato įpurškimo režime.

3.1.2 Biojutiklio atsakas

Biojutiklio atsakas yra matuojama elektros srovė, kuri yra tiesiogiai proporcinga produkto koncentracijos gradientui ant elektrodo paviršiaus $x = 0$. Srovės dydis $y_j(t, x_j)$ laiko momentu t yra aprašomas Faraday ir Fick dėsniais [13]:

$$y_j(t, x_j) = n_e F D_{P_j} \left. \frac{\partial p_j}{\partial \tau} \right|_{\tau=0}, \quad j = 1, \dots, k, \quad (3.3)$$

kur n_e yra elektronų kiekis, F yra Faraday konstanta.

Laikoma, kad biojutiklio sistema pasiekia pusiausvyrą kai $t \rightarrow \infty$. Biojutiklio atsakas $z(t, x)$ yra atskirų biojutiklių srovių suma $y_j(t, x_j)$, $j = 1, \dots, k$.

3.1.3 Pateikti duomenys

Nagrinėtame modelyje buvo nustatyti pastovūs parametrai, o mišinių sudarė keturi substratai, kurių savybės buvo nurodomos pasirenkamais parametrais $V_j = 10^{-6-j}$, $j \in \{1, 2, 3, 4\}$. Kiekvieno substrato koncentracija buvo keičiama intervale $1 \leq x_j \leq 64$. Biojutiklio modeliavimas buvo atliktas vonios ir įpurškimo režimuose. Lentelėje 3.1 pateikti įpurškimo režime atliktų bandymų rezultatai, kur Δx_j yra skirtumas tarp tikrosios ir įvertintos x_j reikšmės, o f_{\min} yra santykinė aproksimavimo paklaida.

3.1 lentelė: Biojutiklio koncentracijų santykinės paklaidos įvertinimai įpurškimo režime, kai fermento sluoksnio storis $d = 0.02\text{cm}$

	f_{\min}	Δx_1	Δx_2	Δx_3	Δx_4
Vidutinė vertė	$2.8495 \cdot 10^{-5}$	0.0041	0.0108	0.0408	0.0464
Nuokrypis	$3.1573 \cdot 10^{-4}$	0.0388	0.1663	0.8404	0.9755

3.1.4 Modelio praplėtimas

Gavus pirminių bandymų kiekybinės substrato mišinių analizės modelio rezultatus, modelis buvo patikslintas, atsižvelgiant į substratų tarpusavio sąveiką reakcijos metu ($t > 0$):

$$\begin{aligned} \frac{\partial S_i}{\partial t} &= D_{S_i} \frac{\partial^2 S_i}{\partial x^2} - \frac{V_{max_i} S_i}{K_{M_i} \left(1 + \sum_{j=1}^k S_j / K_{M_j}\right)}, \\ \frac{\partial P_i}{\partial t} &= D_{P_i} \frac{\partial^2 P_i}{\partial x^2} + \frac{V_{max_i} S_i}{K_{M_i} \left(1 + \sum_{j=1}^k S_j / K_{M_j}\right)}, \quad i = 1, \dots, k, \quad 0 < x < d, \end{aligned} \quad (3.4)$$

kur x ir t atitinkamai erdvės ir laiko koordinatės, $S_i(x, t)$ ir $P_i(x, t)$ yra atitinkamai substrato S_i ir produkto P_i koncentracija, V_{max_i} yra maksimalus reakcijos virsmo greitis, kai fermentas yra pilnai prisisotinęs substrato S_i , K_{M_i} yra Michaelis konstanta, d yra fermento sluoksnio storis, D_{S_i} ir D_{P_i} yra difuzijos koeficientai, $V_{max_i} = k_2 E_0$, $K_{M_i} = (k_{-1_i} + k_2) / k_1$.

Pagal atliktus abiejų modelių eksperimentų rezultatus galime daryti išvadas, kad aprašytų metodų taikymas nagrinėtam uždaviniui yra tikslingas. Kompiuterinis modelis (3.2), (3.4)

gali būti naudojamas eksperimentiniams atsako rezultatams gauti, kurie gali būti naudojami kiekybinei substratų koncentracijos analizei atlikti.

Išvados

- Bedimensinis modelis gali būti naudojamas pasirinktų biojutiklių modelių schemoms spręsti - tirti modelių parametrų įtaką ir gerinti biojutiklio konfigūraciją.
- Amperometrinio biojutiklio modelis su mediatoriumi, kurį sudaro fermento sluoksnis ir dvi poringos membranos, gali būti naudojamas biojutiklio kinetinėms savybėms tirti. Eksperimentinių ir modelių gautų reikšmių palyginimas parodė, kad sukurtas modelis su pasirinktais parametrais yra pakankamai tikslus tik esant mažoms substrato koncentracijoms.
- Didesnis išorinio difuzijos sluoksnio storis arba mažesnė substrato difuzija šiame sluoksnyje (pvz. esant mažesniai Biot skaičiui Bi), gali pailginti biojutiklio kalibravimo kreivę keliomis eilėmis. Esant santykinai didelėms Biot skaičiaus reikšmėms, Bi kitimas praktiškai neturi įtakos pusės maksimalios efektyvios koncentracijos C_{50} kitimui.
- Mažėjant įpurškimo laikui T_F , pusė maksimalios efektyvios koncentracijos C_{50} eksponentiškai didėja. Biojutiklio, veikiančio įpurškimo režime, kalibravimo kreivė gali būti prailginta keliomis eilėmis tik mažinant įpurškimo laiką T_F .
- Amperometrinio biojutiklio signalui nagrinėti optimizavimo metodais grįsta matavimų metodika yra efektyvus būdas įvertinti pradines kelių substratų koncentracijas.

Trumpai apie autorių

Darius Baronas gimė 1983 m. rugpjūčio 7 d. Vilkaviškyje. 2005 metais įgijo informatikos bakalauro laipsnį Vilniaus universitete. 2007 metais Vilniaus universitete įgijo informatikos magistro laipsnį. Nuo 2009 iki 2013 m. buvo Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos instituto doktorantas.

Nuo 2004 m. dirbo programinės įrangos kūrimo įmonėse UAB "Sintagma" ir UAB "Asseco Lietuva" programuotoju, o nuo 2012 m. dirba UAB "Asseco Lietuva" projektų vadovu. Nuo 2007 m. dirba Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos fakulteto Informatikos katedroje asistentu.

Summary

A biosensor is an analytical device that inverts a biochemical reaction process into a measurable signal using transducer. Mainly these devices are used for detecting various substances like pollutants, metabolites, microbial load. The main domain of usage is medicine and food industries. Usually biosensors consist of a biological sensing element - enzyme and a transducer for detecting the analyte concentration. Unfortunately experiments in laboratory are expensive, for this reason creating computer-aided models of such systems is very attractive. The main purpose of such modelling is to study the peculiarities of biosensors, developing their attributes according to environmental settings. A sensitivity of biosensor expressed by linear range of the calibration curve was chosen as the main characteristics for developing.

The mathematical models of layered amperometric biosensors were analyzed. Solving a biosensor model numerical methods, a finite difference scheme is used.

A software tool for computational modelling for amperometric biosensors in flow injection systems, the multilayered biosensors as well as optimization-based evaluation of concentrations in modelling the biosensor-aided measurement was created. In thesis the solutions were found considering dimensionless models, and generalized results of the research are presented. The results can be used practically and for further development as well.

Literatūra

- [1] C. Fan, K. W. Plaxco, and A. J. Heeger, "Biosensors based on bindingmodulated donor-acceptor distances," *Trends Biotechnology*, vol. 23, no. 4, pp. 186–192, 2005.
- [2] C. Dhand, M. Das, M. Datta, and B. Malhotra, "Recent advances in polyaniline based biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, p. 2811–2821, 2011.
- [3] Global Industry Analysts Inc., *Biosensors in medical diagnosis - a global strategic*

- business report*, 2012.
- [4] P. V. Climent, M. L. M. Serralheiro, and M. J. F. Rebelo, “Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane,” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 73, no. 12, pp. 1993–1999, 2001.
- [5] A. Heller and B. J. Feldman, “Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management,” *Chemical Reviews*, vol. 108, p. 2482–2505, 2008.
- [6] E. C. Alocilja and S. M. Radke, “Market analysis of biosensors for food safety,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, p. 841–846, 2003.
- [7] C. R. Taitt, G. P. Anderson, and F. S. Ligler, “Evanescent wave fluorescence biosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, no. 12, p. 2470–2487, 2005.
- [8] W. H. van der Schalia, R. R. James, and T. P. G. II, “Selection of a battery of rapid toxicity sensors for drinking water evaluation,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no. 1, pp. 18–27, 2005.
- [9] B. D. Malhotra and A. Chaubey, “Biosensors for clinical diagnostics industry,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 91, p. 117–127, 2003.
- [10] L. Campanella, A. Nuccilli, M. Tomassetti, and S. Vecchio, “Biosensor analysis for the kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil,” *Talanta*, vol. 74, p. 1287–1298, 2008.
- [11] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors,” *Biotechnology Advances*, vol. 30, p. 489–511, 2012.
- [12] I. Palchetti and M. Mascini, *Biosensor Technology: A Brief History*, vol. 54. Springer Netherlands, 2010.
- [13] T. Schulmeister, “Mathematical modeling of the dynamic behaviour of amperometric enzyme electrodes,” *Selective electrode reviews*, vol. 12, pp. 203–260, 1990.
- [14] J. Kernevez, *Enzyme Mathematics. Studies in Mathematics and its Applications*. Amsterdam: Elsevier Science, 1980.
- [15] W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling, and B. Flannery, *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge: Cambridge University Press, 2 ed., 1992.
- [16] A. Turner, I. Karube, and G. Wilson, *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- [17] R. Monošik, M. Stredansky, and E. Šturdik, “Biosensors — classification, characterization and new trends,” *Acta Chimica Slovaca*, vol. 5, pp. 109–120, 2012.
- [18] A. McNaught and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [19] A. Ghindilis, P. Atanasov, M. Wilkins, and E. Wilkins, “Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 13, pp. 113–131, 1998.
- [20] A. J. Bäumner and R. Schmid, “Development of a new immunosensor for pesticide detection: a disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 13, pp. 519–529, 1998.
- [21] M. F. Yulaev, R. A. Sitdikov, N. M. Dmitrieva, E. V. Yazynina, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev, “Development of a potentiometric immunosensor for herbicide simazine and its application for food testing,” *Sensors and Actuators B*, vol. 75, pp. 129–135, 2001.
- [22] K. Rogers, “Biosensors for environmental applications,” *Biosensors and Bioelectronics*,

- vol. 10, pp. 533–541, 1995.
- [23] S.-J. Park, T. A. Taton, and C. A. Mirkin, “Array-based electrical detection of dna with nanoparticle probes,” *Science*, vol. 295, pp. 1503–1506, 2002.
- [24] H. Gutfreund, *Kinetics for the Life Sciences*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [25] F. W. Scheller and F. Schubert, *Biosensors*. Amsterdam: Elsevier Science, 1992.
- [26] L. Segel and M. Slemrod, “The quasi-steady-state assumption: a case study in perturbation,” *SIAM Review*, vol. 31, pp. 446–477, 1989.
- [27] R. Baronas, F. Ivanauskas, and J. Kulys, *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, vol. 9. Dordrecht: Springer, 2010.
- [28] J. Kulys, “The development of new analytical systems based on biocatalysts,” *Analytical Letters*, vol. 14, pp. 377–397, 1981.
- [29] P. Bartlett and R. Whitaker, “Electrochemical immobilisation of enzymes. part i. theory,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 224, pp. 27–35, 1987.
- [30] J. Aaron, M. Valenzuela, M. Pena, F. Salinas, and M. Mahedero, “Quantitative analysis of sulfadiazine using photochemically induced fluorescence detection in bulk solution and in a flow injection system,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 314, p. 45–50, 1995.
- [31] P. Butler, W. Hamilton, L. Magid, T. Slaweki, Z. Han, and J. Hayter, “Effect of a solid/liquid interface on bulk solution structures under flow,” *Physica B: Condensed Matter*, vol. 241-243, p. 1074–1076, 1997.
- [32] R. Baronas, F. Ivanauskas, and J. Kulys, “Modelling dynamics of amperometric biosensors in batch and flow injection analysis,” *Journal of Mathematical Chemistry*, vol. 32, pp. 225–237, 2002.
- [33] D. Britz, R. Baronas, E. Gaidamauskaitė, and F. Ivanauskas, “Further comparisons of finite difference schemes for computational modelling of biosensors,” *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, vol. 14, pp. 419–433, 2009.
- [34] H. Lüdi, M. Garn, P. Bataillard, and H. Widmer, “Flow-injection analysis and biosensors - applications for biotechnology and environmental-control,” *Journal of Biotechnology*, vol. 14, pp. 71–79, 1990.
- [35] R. Nenkova, R. Atanasova, D. Ivanova, and T. Godjevargova, “Optimal inputs and sensitivities for parameter estimation in bioreactors,” *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 24, p. 1986, 2010.
- [36] F. Vianello, S. Ragusa, M. T. Cambria, and A. Rigo, “A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 11, p. 2155–2160, 2006.
- [37] F. Tasca, L. Gorton, J. B. Wagnerb, and G. Nöll, “Increasing amperometric biosensor sensitivity by length fractionated single-walled carbon nanotubes,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, p. 272–278, 2008.
- [38] P. Cervini and E. Cavalheiro, “Recent biosensing developments in environmental security,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 19, p. 836, 2008.
- [39] S. Zhan, H. Zhao, and R. John, “A theoretical model for immobilized enzyme inhibition biosensors,” *Electroanalysis*, vol. 13, pp. 1528–1534, 2001.
- [40] R. Baronas, J. Kulys, K. Petrauskas, and J. Razumienė, “Modelling carbon nanotube based biosensor,” *Journal of Mathematical Chemistry*, vol. 49, pp. 995–1010, 2011.
- [41] F. Ivanauskas, I. Kaunietis, V. Laurinavičius, J. Razumienė, and R. Šimkus, “Apparent

- michaelis constant of the enzyme modified porous electrode,” *Journal of Mathematical Chemistry*, vol. 43, pp. 1516–1526, 2008.
- [42] D. Olea, O. Viratelle, and C. Faure, “Polypyrrole-glucose oxidase biosensor - effect of enzyme encapsulation in multilamellar vesicles on analytical properties,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 788–794, 2008.
- [43] O. Štikonienė, F. Ivanauskas, and V. Laurinavičius, “The influence of external factors on the operational stability of the biosensor response,” *Talanta*, vol. 81, pp. 1245–1249, 2010.
- [44] D. Britz, *Digital Simulation in Electrochemistry, Lecture Notes in Physics*, vol. 666. Berlin: Springer, 2005.
- [45] E. Assibas, H. Bisswanger, A. Sotos-Lomas, M. Garcia-Moreno, F. Garcia-Canovas, J. Donoso-Pardo, F. Munoz-Izquierdo, and R. Varon, “A method, based on statistical moments, to evaluate the kinetic parameters involved in unstable enzyme systems,” *Journal of Mathematical Chemistry*, vol. 44, pp. 379–404, 2008.
- [46] M. Lyons, T. Bannon, G. Hinds, and S. Rebouillat, “Reaction/diffusion at conducting polymer ultramicroelectrodes,” *Analyst*, vol. 123, pp. 1961–1966, 1998.
- [47] S. A. Giner, R. M. T. Irigoyen, S. Cicuttin, and C. Fiorentini, “The variable nature of biot numbers in food drying,” *Journal of Food Engineering*, vol. 101, no. 2, p. 214–222, 2010.
- [48] C. Amatore, A. Oleinick, I. Svir, N. da Mota, and L. Thouin, “Theoretical modeling and optimization of the detection performance: a new concept for electrochemical detection of proteins in microfluidic channels,” *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, vol. 11, pp. 345–365, 2006.
- [49] D. Gough and J. Leyboldt, “Membrane-covered, rotated disk electrode,” *Analytical Chemistry*, vol. 51, pp. 439–444, 1979.
- [50] D. Šimelevičius, R. Baronas, and J. Kulys, “Modelling of amperometric biosensor used for synergistic substrates determination,” *Sensors*, vol. 12, pp. 4897–4917, 2012.
- [51] S. van Stroey-Bezen, F. M. Everaerts, L. J. J. Janssen, and R. A. Tacken, “Diffusion-coefficients of oxygen, hydrogen-peroxide and glucose in a hydrogel,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 273, pp. 553–560, 1993.
- [52] J. Razumienė, J. Gurevičienė, J. Barkauskas, V. Bukauskas, and A. Šetkus, “Novel combined template for amperometric biosensors with changeable selectivity,” in *Proceedings of the International Conference on Biomedical Electronics and Devices, Biodevices*, (Porto), pp. 448–452, 2009.
- [53] R. Baronas, F. Ivanauskas, R. Maslovskis, and P. Vaitkus, “An analysis of mixtures using amperometric biosensors and artificial neural networks,” *Journal of Mathematical Chemistry*, vol. 36(3), pp. 281–297, 2004.
- [54] R. Baronas, F. Ivanauskas, R. Maslovskis, M. Radavičius, and P. Vaitkus, “Locally weighted neural networks for an analysis of the biosensor response,” *Kybernetika*, vol. 43, no. 1, pp. 21–30, 2007.

Darius Baronas

DAUGIASLUOKSNIŲ BIOJUTIKLIŲ KOMPIUTERINIS MODELIAVIMAS IR
OPTIMIZAVIMO METODAIS GRĮSTA MATAVIMŲ METODIKA

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai (P 000)

Informatika (09 P)

Informatika, Sistemų teorija (P 175)

Darius Baronas

COMPUTER AIDED MODELLING OF MULTILAYER BIOSENSORS AND
OPTIMIZATION BASED PROCESSING OF AMPEROMETRIC MEASUREMENTS

Doctoral Dissertation

Physical Sciences (P 000)

Informatics (09 P)

Informatics, System Theory (P 175)