

Amperometrinių biojutiklių su sinerginių substratų stiprinimu kompiuterinis modeliavimas*

Dainius Šimelevičius

Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos fakulteto doktorantas
Vilnius University Faculty of Mathematics and Informatics, PhD student
Naugarduko g. 24, LT-03225 Vilnius
Tel. +370 5 219 30 64, faks. +370 5 215 15 85
El. paštas: dainius.simelevicius@mif.vu.lt

Romas Baronas

Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos fakulteto Programų sistemų katedros profesorius, daktaras
Vilnius University, Faculty of Mathematics and Informatics, Professor, PhD
Naugarduko g. 24, LT-03225 Vilnius
Tel. +370 5 219 30 69, faks. +370 5 215 15 85
El. paštas: romas.baronas@mif.vu.lt

Šiame straipsnyje yra tiriamas amperometrinis biojutiklis, kuriame biojutiklio atsakas yra stiprinamas chemiškai – sinerginiais substratais. Tokiuose biojutikliuose, be substrato, kurio koncentracija matuojama, naudojamas ir pagalbinis substratas, reikalingas substratų sinergetikai. Biojutiklis yra modeliuojamas naudojant nestacionarias netiesines reakcijos-difuzijos lygtis. Modeliuojami keturi biojutiklio sluoksniai: fermento sluoksnis, kuriame vyksta visos biocheminės reakcijos ir difuzija, dializės membrana ir difuzijos sluoksnis, kuriuose vyksta tik difuzija ir reakcijos, kuriose nedalyvauja fermentas, o ketvirtasis sluoksnis yra tirpalo dalis, kurioje palaikoma vienoda medžiagų koncentracija. Lygčių sistema sprendžiama skaitiškai, naudojant baigtinių skirtumų metodą. Tiriama biojutiklio atsako bei jautrio priklausomybė nuo substratų koncentracijų ir nuo difuzijos sluoksnio storio.

Įvadas

Biojutiklis yra matavimo prietaisas, skirtas matuoti tam tikros specifinės medžiagos koncentracijai tirpale. Biojutiklio specifiskumas tik vienai konkrečiai medžiagai pasiekiamas jo konstrukcijoje naudojant tik jai būdingą biologinę medžiagą, dažniausiai fermentą (Gutfreund, 1995; Scheller, Schubert, 1992; Turner ir kt., 1987). Amperometrinis biojutiklis nustato medžiagos koncentraciją, matuodamas darbinio elektrodo srovę. Biojutikliai yra plačiai naudojami tose srityse, kur reikalinga greita kiekybinė analizė (aplinkos užterštumo stebėjimas, maisto kokybės analizė, medicininė diagnostika) (Liang

ir kt., 2000; Rogers, 1995; Scheller ir kt., 1997; Yu ir kt., 2005).

Biojutikliuose dažnai naudojami fermentai – oksidazės. Tuomet fermento molekulės yra redukuojamos į laikiną formą ir oksiduojamos elektronų akceptoriais. Paprastai redukcijos reakcija esti specifinis procesas, o redukuoto fermento oksidacijai tinka daug elektronų akceptorių (Kulys, Tetianec, 2005). Kinetinė analizė su mažai ir smarkiai reaktyvių elektronų akceptorių mišiniu rodo, kad mažai reaktyvaus elektronų akceptoriaus redukcija gali labai pagreitėti, jeigu „regeneruojamoji“ reakcija tarp šių dviejų medžiagų yra greita (Kulys, Tetianec, 2005). Šis reiškinys yra naudojamas labai jautriuose bio-

* Straipsnis parengtas įgyvendinant projektą „Kompiuterinių metodų, algoritmų ir įrankių efektyviam sudėtingos geometrijos biojutiklių modeliavimui ir optimizavimui sukūrimas“, finansuojamą iš ES Socialinio fondo pagal VP1-3.1-ŠMM-07-K priemonę „Parama mokslininkų ir kitų tyrėjų mokslinei veiklai (Visuotinė dotacija)“ lėšų.

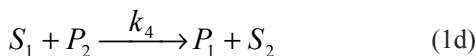
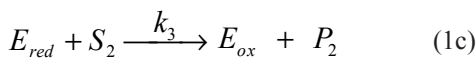
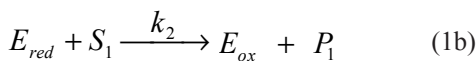
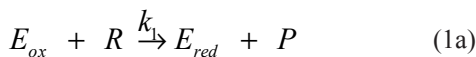
jutikliuose sinerginių substratų koncentracijoms matuoti.

Kuriant biojutiklius, labai svarbu perprasti juose vykstančius reiškinius. Kad pavyktų sukurti efektyvų ir patikimą biojutiklį, reikia sukurti biojutiklio modelį (Corcuera ir kt., 2004; Ferreira ir kt., 2003). Nuo 1970 metų, kai buvo pradėti biojutiklių tyrimai, sukurta nemažai matematinių biojutiklių modelių, modeliuojančių konkrečių biojutiklių veikimą (Mell, Maloy, 1975; Kernevez, 1980; Kulys, 1981; Bartlett, Whitaker, 1987). Išsami biojutiklių modelių apžvalga pateikta T. Schulmeisterio straipsnyje (1990), taip pat neseniai pasirodžiusioje R. Barono ir kt. knygoje (2010). Substratų sinergetika grįstų biojutiklių statiniai modeliai aprašyti keliuose straipsniuose (Kulys, Tetianec, 2005; Kulys, Dapkūnas, 2007; Kulys, 2005).

Šio tyrimo tikslas yra sukurti dinaminį biojutiklio modelį, kuris užtikrintų sinerginiais substratais grįsto biojutiklio veikimo efektyvų kompiuterinį modeliavimą ir kurį būtų galima taikyti biojutiklio parametrų įtakai iširti. Sukurtojo matematinio modelio pagrindas yra nestacionariosios reakcijos-difuzijos lygtys (Aris, 1975; Britz, 2005). Matematinis modelis susideda iš trijų dalių, atitinkančių tris biojutiklio fizinius sluoksnius.

Matematinis modelis

Mateminiame modelyje remiamasi šia cheminių reakcijų schema (Kulys, Tetianec, 2005):



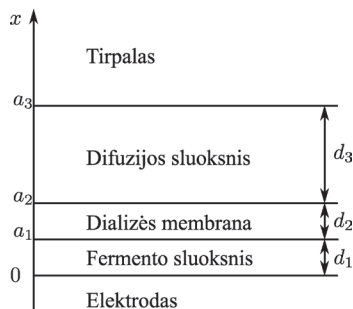
čia E_{ox} ir E_{red} yra atitinkamai oksiduota ir redukuota fermento formos, R – fermento reduktori-

us, S_1 ir S_2 – substratai, P , P_1 ir P_2 – reakcijų produktai. k_1 , k_2 , k_3 , k_4 yra reakcijų greičio konstantos.

Reakcijoje (1a) fermentas yra redukuojamas reduktoriumi R ir susidaro tarpinė fermento forma E_{red} . Reakcijoje (1b) elektronų akceptorius S_1 oksiduoja E_{red} molekulę. Susidaro produktas P_1 , o fermento molekulė atgauna savo pirmykštę formą E_{ox} . Reakcija (1c) yra redukuotos fermento formos E_{red} oksidavimo smarkiai reaktyviu elektronų akceptoriumi S_2 reakcija, o (1d) vadinama „regeneruojamąja“ reakcija. Šios reakcijos metu substratas S_1 oksiduoja produktą P_2 ir gamina substratą S_2 . Reakcija taip pat gamina P_1 molekules. Reakcija (1e) aprašo elektrocheminę reakciją, vykstančią ant elektrodo (Kulys, Tetianec, 2005).

Biojutiklio struktūra

Mateminiame modelyje laikome, kad biojutiklis yra elektrodas, kurio paviršius yra padengtas plonu fermento sluoksniu, prilaikomu dializės membranos. Modeliuojami keturi biojutiklio sluoksniai: fermento sluoksnis, kuriame vyksta visos biocheminės reakcijos ir medžiagų difuzija, dializės membrana ir difuzijos sluoksnis, kuriuose vyksta tik difuzija ir reakcijos, kuriose nedalyvauja fermentas, o ketvirtasis sluoksnis yra tirpalo dalis, kurioje palaikoma vienoda medžiagų koncentracija (1 pav.). Laikant, kad elektrodas yra simetriškas, o fermentas yra pasiskirstęs homogeniškai, galima sukonstruoti vienmatį biojutiklio modelį (Schulmeister, 1990).



1 pav. Biojutiklio struktūra

Apibrėžkime, kad d_1, d_2 ir d_3 yra atitinkamai fermento sluoksniu, dializės membranos ir difuzijos sluoksniu storiai. Taip pat apibrėžkime atstumus nuo elektrodo paviršiaus iki ribos tarp dviejų gretimų sluoksnių. Pažymėkime šiuos atstumus a_1, a_2 ir a_3 , kaip parodyta 1 paveiksle.

Difuzijos sluoksni ($a_2 < x < a_3$) galima laikyti Nernsto sluoksniu (Britz, 2005). Remiantis Nernsto supaprastinimu, šio sluoksniu storis d_3 ilgainiui nekinta. Taip pat laikoma, kad už šio sluoksniu ribos medžiagų koncentracija yra vienoda kiekviename taške ir laikui bėgant nekinta.

Pagrindinės lygtys

Medžiagų koncentracijų pokyčius vykstant biocheminėms reakcijoms galima aprašyti lygtimis, naudojantis masių dėsniumi (Gutfreund, 1995; Bartlett, Whitaker, 1987). Koncentracijų pokyčius dėl difuzijos galima aprašyti remiantis Fiko dėsniumi. Gauname tokias reakcijos-difuzijos lygtis fermento sluoksniui ($0 < x < a_1, t > 0$):

$$\frac{\partial e_{ox}}{\partial t} = -k_1 e_{ox} r_1 + k_2 e_{red} s_{11} + k_3 e_{red} s_{21}, \quad (2b)$$

$$\frac{\partial e_{red}}{\partial t} = k_1 e_{ox} r_1 - k_2 e_{red} s_{11} - k_3 e_{red} s_{21}, \quad (2b)$$

$$\frac{\partial r_1}{\partial t} = D_{R1} \frac{\partial^2 r_1}{\partial x^2} - k_1 e_{ox} r_1, \quad (2c)$$

$$\frac{\partial s_{11}}{\partial t} = D_{S1} \frac{\partial^2 s_{11}}{\partial x^2} - k_2 e_{red} s_{11} - k_4 s_{11} p_{21}, \quad (2d)$$

$$\frac{\partial s_{21}}{\partial t} = D_{S2} \frac{\partial^2 s_{21}}{\partial x^2} - k_3 e_{red} s_{21} + k_4 s_{11} p_{21}, \quad (2e)$$

$$\frac{\partial p_{11}}{\partial t} = D_{P1} \frac{\partial^2 p_{11}}{\partial x^2} + k_2 e_{red} s_{11} + k_4 s_{11} p_{21}, \quad (2f)$$

$$\frac{\partial p_{21}}{\partial t} = D_{P2} \frac{\partial^2 p_{21}}{\partial x^2} + k_3 e_{red} s_{21} - k_4 s_{11} p_{21}, \quad (2g)$$

čia x yra atstumas nuo elektrodo, t – laikas, $e_{ox}(x, t)$ ir $e_{red}(x, t)$ – oksiduoto ir redukuoto fermento koncentracijos; $s_{11}(x, t)$ ir $s_{21}(x, t)$ ($p_{11}(x, t)$ ir $p_{21}(x, t)$) – substratų (produktų) koncentracijos fermento sluoksnyje; $r_1(x, t)$ – reduktoriaus

koncentracija fermento sluoksnyje, o $D_{R1}, D_{S1}, D_{S2}, D_{P1}, D_{P2}$ – indeksu nurodytų atitinkamų medžiagų difuzijos koeficientai. Čia ir toliau straipsnyje, žymint koncentracijas ir difuzijos koeficientus, antrasis indeksas reiškia modelio sluoksniu numerį, šiuo atveju 1 reiškia fermento sluoksni. Laikoma, kad fermento molekulės E_{ox} ir E_{red} yra nejudrios, todėl atitinkamose lygtyse nėra difuzijos nario. Kadangi produktas P nereaguoja cheminėse reakcijose, jo koncentracijos nėra lygčių sistemoje (2).

Dializės membranoje ir difuzijos sluoksnyje nėra fermento molekulių, todėl šiuose sluoksniuose vyksta tik reakcija (1d), taip pat reduktoriaus, substratų ir produktų difuzija. Pagrindines lygtis šiems dviem sluoksniams galime išreikšti taip ($a_{k-1} < x < a_k, t > 0, k = 2, 3$):

$$\frac{\partial r_k}{\partial t} = D_{Rk} \frac{\partial^2 r_k}{\partial x^2}, \quad (3a)$$

$$\frac{\partial s_{1k}}{\partial t} = D_{S1k} \frac{\partial^2 s_{1k}}{\partial x^2} - k_4 s_{1k} p_{2k}, \quad (3b)$$

$$\frac{\partial s_{2k}}{\partial t} = D_{S2k} \frac{\partial^2 s_{2k}}{\partial x^2} + k_4 s_{1k} p_{2k}, \quad (3c)$$

$$\frac{\partial p_{1k}}{\partial t} = D_{P1k} \frac{\partial^2 p_{1k}}{\partial x^2} + k_4 s_{1k} p_{2k}, \quad (3d)$$

$$\frac{\partial p_{2k}}{\partial t} = D_{P2k} \frac{\partial^2 p_{2k}}{\partial x^2} - k_4 s_{1k} p_{2k}, \quad (3e)$$

čia $k = 2$ atitinka dializės membraną, o $k = 3$ – difuzijos sluoksni.

Pradinės sąlygos

Biojutiklis pradeda veikti, kai tirpale atsiranda reduktoriaus ir substrato molekulių. Pradinės sąlygas formuluojame taip ($t = 0$):

$$r_1(x, 0) = s_{k1}(x, 0) = p_{k1}(x, 0) = 0, \\ 0 \leq x \leq a_1, \quad k = 1, 2, \quad (4a)$$

$$e_{red}(x, 0) = 0, \quad e_{ox}(x, 0) = e_0, \quad 0 < x < a_1, \quad (4b)$$

$$r_2(x, 0) = s_{k2}(x, 0) = p_{k2}(x, 0) = 0, \\ a_1 \leq x \leq a_2, \quad k = 1, 2, \quad (4c)$$

$$p_{k3}(x,0) = 0, \quad a_2 \leq x \leq a_3, \quad k=1,2, \quad (4d)$$

$$r_3(x,0) = s_{k3}(x,0) = 0, \quad a_2 \leq x \leq a_3, \quad k=1,2, \quad (4e)$$

$$r_3(a_3,0) = r_0, \quad s_{13}(a_3,0) = s_{10}, \quad (4f)$$

$$s_{23}(a_3,0) = \begin{cases} 0, & T_{S_2} > 0, \\ s_{20}, & T_{S_2} = 0, \end{cases} \quad (4g)$$

čia e_0 žymi suminę fermento koncentraciją fermento sluoksnyje ($e_0 = e_{ox}(x, t) + e_{red}(x, t)$, $\forall x: x \in [0, a_1]$, $\forall t: t > 0$), r_0 – reduktoriaus koncentracija tirpale, s_{10} ir s_{20} – substratų koncentracijos tirpale, T_{S_2} – laiko momentas, kai substratas S_2 įpilamas į tirpalą.

Derinimo sąlygos

Skirtingi biojutiklio sluoksniai turi skirtingus difuzijos koeficientus, todėl šių sluoksnių sandūroms aprašyti reikalingos derinimo sąlygos ($t > 0$, $k = 1, 2$, $m = 1, 2$),

$$D_{Rm} \left. \frac{\partial r_m}{\partial x} \right|_{x=a_m} = D_{R,m+1} \left. \frac{\partial r_{m+1}}{\partial x} \right|_{x=a_m},$$

$$r_m(a_m, t) = r_{m+1}(a_m, t), \quad (5a)$$

$$D_{S_{km}} \left. \frac{\partial s_{km}}{\partial x} \right|_{x=a_m} = D_{S_{k,m+1}} \left. \frac{\partial s_{k,m+1}}{\partial x} \right|_{x=a_m},$$

$$s_{km}(a_m, t) = s_{k,m+1}(a_m, t), \quad (5b)$$

$$D_{P_{km}} \left. \frac{\partial p_{km}}{\partial x} \right|_{x=a_m} = D_{P_{k,m+1}} \left. \frac{\partial p_{k,m+1}}{\partial x} \right|_{x=a_m},$$

$$p_{km}(a_m, t) = p_{k,m+1}(a_m, t), \quad (5c)$$

čia $m = 1$ atitinka fermento sluoksnio ir dializės membranos sandūrą, $m = 2$ – dializės membranos ir difuzijos sluoksnio sandūrą.

Šios sąlygos reiškia, kad reduktoriaus, substratų ir produktų koncentracijų srautai viename sluoksnyje ties sandūra yra lygūs atitinkamiems srautams kitame sluoksnyje, o medžiagų koncentracijos sandūroje yra vienodos abiejuose sandūrą sudarančiuose sluoksniuose.

Kraštinės sąlygos

Reduktoriaus, substratų ir produktų koncentracijos tirpale nekinta ($t > 0$):

$$r_3(a_3, t) = r_0, \quad (6a)$$

$$s_{13}(a_3, t) = s_{10}, \quad (6b)$$

$$s_{23}(a_3, t) = \begin{cases} 0, & t < T_{S_2}, \\ s_{20}, & t \geq T_{S_2}, \end{cases} \quad (6c)$$

$$p_{k3}(a_3, t) = 0, \quad k=1,2. \quad (6d)$$

Reakcijos produktas P_1 dalyvauja elektrocheminėje reakcijoje (1e) ant elektrodo paviršiaus ($x = 0$). Jo koncentracija ant elektrodo paviršiaus visada yra lygi 0. Kadangi reakcija (1e) pagamina tiek S_1 , kiek sunaudoja P_1 , vadinasi, S_1 koncentracijos srautas yra lygus P_1 koncentracijos srautui, tik su priešingu ženklu. Visos kitos medžiagos nedalyvauja elektrocheminėse reakcijose ant elektrodo paviršiaus, todėl jų koncentracijų srautai ant elektrodo paviršiaus yra lygūs 0. Šios savybės apibrėžiamos tokiomis kraštinėmis sąlygomis ($t > 0$):

$$p_{11}(0, t) = 0, \quad (7a)$$

$$D_{S_{11}} \left. \frac{\partial s_{11}}{\partial x} \right|_{x=0} = - D_{P_{11}} \left. \frac{\partial p_{11}}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (7b)$$

$$\begin{aligned} D_{R1} \left. \frac{\partial r_1}{\partial x} \right|_{x=0} &= D_{S_{21}} \left. \frac{\partial s_{21}}{\partial x} \right|_{x=0} = \\ &= D_{P_{21}} \left. \frac{\partial p_{21}}{\partial x} \right|_{x=0} = 0. \end{aligned} \quad (7c)$$

Biojutiklio atsakas

Amperometrinio biojutiklio atsakas yra elektros srovės stipris, kuris yra tiesiogiai proporcingas produkto P_1 koncentracijos srautui elektrodo paviršiuje (Scheller, Schubert, 1992; Turner ir kt., 1987). Srovė taip pat yra tiesiogiai proporcinga elektrodo paviršiaus plotui. Elektrodo paviršiaus plotas nėra svarbus biojutiklio parametras, todėl jį neatsižvelgsime ir vietoje srovės naudosime srovės tankį. Biojutiklio

srovės tankį galime apskaičiuoti remdamiesi Faradėjaus ir Fiko dėsniais:

$$j(t) = n_e F D_{P_1} \left. \frac{\partial p_{II}}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (8)$$

čia n_e yra krūvio mainuose ant elektrodo paviršiaus dalyvaujančių elektronų skaičius, F yra Faradėjaus konstanta $F = 96486 \text{C/mol}$.

Laikome, kad sistema pasiekia pusiausvyrą, kai $t \rightarrow \infty$,

$$j_{st} = \lim_{t \rightarrow \infty} j(t), \quad (9)$$

čia j_{st} žymi pusiausvriosios biojutiklio srovės tankį.

Biojutiklio jautris yra kita ne mažiau svarbi biojutiklio charakteristika. Paprastai biojutiklio jautris yra apibrėžiamas kaip biojutiklio srovės išvestinė nuo substrato koncentracijos tirpale. Srovės stipris bei substrato koncentracija gali kisti net per kelias eiles, todėl patogiau naudoti nedimensinę jautrio išraišką (Scheller, Schubert, 1992).

Šiame straipsnyje nagrinėjamas biojutiklis yra skirtas matuoti substrato S_2 koncentracijai, todėl nagrinėsime biojutiklio jautrį šio substrato koncentracijai:

$$B(s_{20}) = \frac{dj_{st}(s_{20})}{ds_{20}} \times \frac{s_{20}}{j_{st}(s_{20})}, \quad (10)$$

čia $B(s_{20})$ yra biojutiklio jautris substratui S_2 esant jo koncentracijai s_{20} , $j_{st}(s_{20})$ yra biojutiklio pusiausvriosios srovės tankis esant koncentracijai s_{20} .

Skaitinis modeliavimas

Analitiniai sprendiniai dažniausiai negalimi sprendžiant netiesines diferencialines lygtis dalinėmis išvestinėmis (Kernevez, 1980; Schulmeister, 1990; Britz, 2005). Biojutiklio modeliavimo uždavinys buvo išspręstas skaitiniu baigtinių skirtumų metodu (Britz, 2005; Samarskii, 2001). Buvo sudaryta išreikštinė baigtinių skirtumų schema naudojanti tolygųjį diskretųjį tinklą su 200 tinklo mazgų kiekviename biojutiklio sluoksnyje. Kompiuterinį modelį programavo autoriai C programavimo kalba (Press ir kt., 1992).

Simuliacijos laiku buvo pasirinktas momentas, kai biojutiklio srovės pokytis pasidaro nyksta- mai mažas per santykinai ilgą laiko tarpą,

$$t_r = \min_{j(t) > 0} \left\{ t : \frac{t}{j(t)} \left| \frac{dj(t)}{dt} \right| < \varepsilon \right\},$$

$$j(t_r) \approx j_{st}, \quad (11)$$

čia t_r yra biojutiklio atsako laikas, ε – gesimo konstanta. Visuose skaičiavimuose buvo naudojama ta pati ε vertė, $\varepsilon = 10^{-3}$.

Šios modelio parametrų vertės nekito visuose skaitiniuose eksperimentuose:

$$k_1 = 1,25 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}, k_2 = 1,2 \cdot 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1},$$

$$k_3 = 1,4 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}, k_4 = 1,4 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1},$$

$$D_{R1} = D_{S_{k1}} = D_{P_{k1}} = 3,15 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 / \text{s},$$

$$k = 1,2,$$

$$D_{R2} = D_{S_{k2}} = D_{P_{k2}} = 4,2 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 / \text{s},$$

$$k = 1,2,$$

$$D_{R3} = D_{S_{k3}} = D_{P_{k3}} = 6,3 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 / \text{s},$$

$$k = 1,2,$$

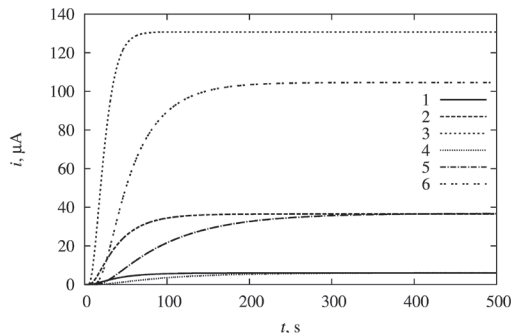
$$e_0 = 4 \cdot 10^{-5} \text{M}, r_0 = 4 \cdot 10^{-2} \text{M}, n_e = 1,$$

$$d_1 = 23,3 \mu\text{m}, d_2 = 18,6 \mu\text{m}, T_{S_2} = 0 \text{s}.$$

Skaitinis modelio (2)–(7) sprendinys buvo palygintas su eksperimentiniais duomenimis (Kulys, Tetianec, 2005). Santykinė paklaida tarp modeliavimo rezultatų ir eksperimento rezultatų prieš įpilant substratą S_2 yra apie 14 $\pi\rho\chi\epsilon\upsilon\tau$. Įpylus substratą S_2 , modeliavimo rezultatų tikslumas sumažėja. Tačiau abiem atvejais matematinis modelis pakankamai gerai aprašo fizinių eksperimentų dėsningumus ir jį galima taikyti biojutiklio savybėms tirti (Kulys, Tetianec, 2005; Baronas ir kt., 2010).

Labai svarbu žinoti lėčiausią (limituojantį) biojutiklyje vykstantį procesą, nes jis lemia biojutiklio atsako dydį. Paanalizuokime, kada biojutiklis veikia kinetiniu režimu (limituojantis procesas yra reakcija (1c)), o kada difuzijos režimu (limituojantis procesas yra difuzija), nau-

dodami keletą biojutiklio parametrų rinkinių. Biojutiklio atsako dinamika pavaizduota 2 pav. Biojutiklio veikimas buvo modeliuojamas esant skirtingiems difuzijos sluoksnio storiams ir skirtingoms substrato S_2 koncentracijoms. Substrato S_1 koncentracija buvo laikoma $s_{10} = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.



2 pav. Biojutiklio atsakas esant skirtingiems difuzijos sluoksnio storiams: $d_3 = 150 \mu\text{m}$ (1, 2, 3) ir $d_3 = 300 \mu\text{m}$ (4, 5, 6), ir skirtingoms substrato koncentracijoms: $s_{20} = 10^{-6} \text{ M}$ (1, 4), $s_{20} = 10^{-5} \text{ M}$ (2, 5) ir $s_{20} = 10^{-4} \text{ M}$ (3, 6)

Esant mažai ir vidutinei substrato koncentracijai ($s_{20} = 10^{-6} \text{ M}$ ir $s_{20} = 10^{-5} \text{ M}$), pusiausvrosios biojutiklio srovės neveikia difuzijos sluoksnio storis. Tai reiškia, kad limituojantis procesas yra reakcija (1c), o biojutiklis veikia kinetiniu režimu. Tačiau, esant šiai substrato koncentracijai ir keičiant difuzijos sluoksnį, šiek tiek keičiasi grafiko $i(t)$ forma ir biojutiklis, kurio difuzijos sluoksnis plonesnis, pasiekia pusiausvyrą anksčiau. Ta pati savybė išlieka ir esant palyginti didelei substrato koncentracijai ($s_{20} = 10^{-4} \text{ M}$).

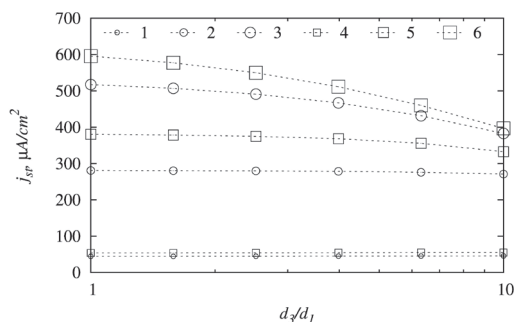
Iš 2 pav. matome labai svarbią šio biojutiklio savybę, kad pusiausviroji srovė yra tiesiogiai proporcinga substrato koncentracijai. Esant santykinai didelei substrato koncentracijai ($s_{20} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), pusiausviroji srovė yra atvirkščiai proporcinga difuzijos sluoksnio storiui. Tirpalo maišymo intensyvumas lemia biojutiklio rezultatus esant didesnėms substrato koncentracijoms. Biojutiklis veikia mišriu režimu, o tai nėra pageidaujamas biojutiklio veikimas.

Šiuos klausimus detaliau panagrinėsime kitame skyriuje.

Rezultatai

Biojutiklio atsako priklausomybė nuo difuzijos sluoksnio storio

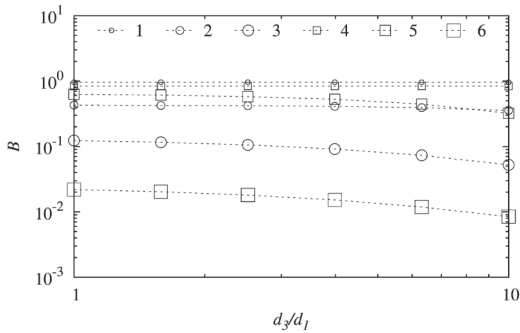
Biojutiklio atsako priklausomybė nuo difuzijos sluoksnio storio buvo tirta esant skirtingoms substratų S_1 ir S_2 koncentracijų reikšmėms. Rezultatai pateikiami 3 pav. Iš grafiko matome, kad biojutiklio atsakas yra tiesiogiai proporcingas tiek koncentracijai s_{10} , tiek s_{20} . Esant santykinai mažoms s_{20} reikšmėms, s_{10} koncentracija menkai veikia biojutiklio atsaką, o esant santykinai vidutinėms ir didelėms s_{20} koncentracijoms, ir s_{10} koncentracija gana smarkiai lemia biojutiklio atsaką.



3 pav. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo santykinio difuzijos sluoksnio storio esant skirtingoms substrato S_1 koncentracijoms: $s_{10} = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (1, 2, 3) ir $s_{10} = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (4, 5, 6), ir skirtingoms substrato S_2 koncentracijoms: $s_{20} = 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (1, 4), $s_{20} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (2, 5) ir $s_{20} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (3, 6)

Iš 3 pav. grafiko taip pat matome, kad esant santykinai mažoms s_{20} koncentracijoms difuzijos sluoksnio storis neturi įtakos biojutiklio atsako dydžiui, o esant vidutinėms ir didelėms s_{20} koncentracijoms, biojutiklio atsakas yra atvirkščiai proporcingas difuzijos sluoksnio storiui.

Galime daryti išvadą, kad esant mažoms s_{20} koncentracijoms, limituojantis procesas yra cheminių reakcijų greitis. Modeliuojamas biojutiklis veikia kinetiniu režimu. Toks veikimo režimas yra pageidaujamas, kad biojutiklio rodmenys būtų patikimi. Esant santykinai vidutinėms ir didelėms s_{20} koncentracijoms, biojutiklis veikia mišriu režimu, nes jo atsaką veikia tiek substrato S_2 koncentracija, tiek difuzijos sluoksnio storis. Biojutiklį galima naudoti ir esant šiam



4 pav. Biojutiklio jautrio priklausomybė nuo santykinio difuzijos sluoksnio storio esant skirtingoms substrato S_1 koncentracijoms:

$s_{10} = 8 \cdot 10^{-4} M$ (1, 2, 3) ir $s_{10} = 8 \cdot 10^{-3} M$ (4, 5, 6), ir skirtingoms substrato S_2 koncentracijoms: $s_{20} = 4 \cdot 10^{-6} M$ (1, 4), $s_{20} = 4 \cdot 10^{-5} M$ (2, 5) ir $s_{20} = 4 \cdot 10^{-4} M$ (3, 6)

veikimo režimui, tačiau turi būti užtikrinta, kad kiekvieno matavimo metu, taip pat visą matavimo laiką iki nusistovint pusiausvyrai bus užtikrintas vienodas tirpalo maišymo intensyvumas ir difuzijos sluoksnio storis.

Atkreiptinas dėmesys, kad maža substrato S_1 koncentracija yra pranašumas, nes tuomet ir esant santykinai vidutinei substrato S_2 koncentracijai biojutiklis išlieka veikti kinetiniu režimu.

Biojutiklio jautrio priklausomybė nuo difuzijos sluoksnio storio

Biojutiklio jautrio priklausomybė nuo difuzijos sluoksnio storio buvo tirta esant toms pačioms substratų S_1 ir S_2 koncentracijų reikšmėms, kaip ir ankstesniame skyrelyje. Rezultatai yra pateikiami 4 pav.

Kaip matome iš grafiko, esančio 4 pav., biojutiklis yra jautriausias esant santykinai mažoms s_{20} koncentracijoms (1 ir 4 kreivės). Taip pat iš šių dviejų kreivių matome, kad tokiomis sąlygomis biojutiklio jautris nepriklauso nuo difuzijos sluoksnio storio.

LITERATŪRA

ARIS, R. (1975). *The Mathematical Theory of Diffusion and Reaction in Permeable Catalysts: The Theory of the Steady State*. Oxford: Clarendon Press. 444 p.

BARONAS, R.; IVANAUSKAS, F.; KULYS, J. (2010). *Mathematical Modeling of Biosensors*. Dordrecht: Springer. 334 p.

Esant santykinai vidutinėms ir didesnėms s_{20} koncentracijoms, biojutiklio jautris yra mažesnis, o dar labiau biojutiklio jautris sumažėja, kai difuzijos sluoksnis storesnis.

Įdomu tai, kad esant santykinai vidutinei substrato S_2 koncentracijai biojutiklio jautris yra tiesiogiai proporcingas substrato S_1 koncentracijai, o esant santykinai didelei substrato S_2 koncentracijai biojutiklio jautris yra atvirkščiai proporcingas substrato S_1 koncentracijai.

Išvados

Matematinis modelis (2)–(7) gali būti sėkmingai taikomas biojutiklio su sinerginių substratų stiprinimu veiksena dėsnų tyrimams. Modelis gali būti naudojamas kaip biojutiklio optimizavimo įrankis dar prieš gaminant fizinį biojutiklį.

Skaitinio modeliavimo rezultatai parodė, kad biojutiklis veikia efektyviau, kai substrato S_2 koncentracijos yra palyginti mažos. Matuojant didesnes substrato S_2 koncentracijas, biojutiklis pereina į mišrų režimą, kuriame biojutiklio atsakui gali turėti įtakos ir difuzijos sluoksnio storis. Šiuo atveju naudojant biojutiklį papildomai reikia užtikrinti, kad kiekvieno matavimo metu tirpalo maišymo intensyvumas visą laiką būtų vienodas ir taip išlaikytas vienodas difuzijos sluoksnio storis. Modeliavimas parodė, kad verta biojutiklį pritaikyti darbui su mažesnių koncentracijų substratu S_1 , nes tuomet, netgi esant santykinai vidutinėms substrato S_2 koncentracijoms, biojutiklis išlieka veikti kinetiniu režimu.

Biojutiklio jautrio tyrimas parodė, kad didžiausias jautris pasiekiamas matuojant santykinai mažas substrato S_2 koncentracijas ir kad biojutiklio jautris yra didesnis esant plonesniam difuzijos sluoksniui.

BARTLETT, P. N.; WHITAKER, R. G. (1987). Electrochemical immobilisation of enzymes. Part I: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 224, no. 1–2, p. 27–35.

BRITZ, D. (2005). *Digital Simulation in Electrochemistry*. Berlin: Springer. 338 p.

CORCUERA, J. I. R. D.; CAVALIERI, R. P.; POWERS, J. R.; TANG, J. (2004). Amperometric enzyme biosensor optimization using mathematical modeling. In *Proceedings of the 2004 ASAE/Csae Annual International Meeting*.

FERREIRA, L. S.; SOUZA, M. B. D.; TRIERWEILER, J. O.; BROXTERMANN, O.; FOLLY, R. O. M.; HITZMANN, B. (2003). Aspects concerning the use of biosensors for process control: experimental and simulation investigations. *Computers and Chemical Engineering*, vol. 27, no. 8–9, p. 1165–1173.

GUTFREUND, H. (1995). *Kinetics for the Life Sciences*. Cambridge: Cambridge University Press. 346 p.

KERNEVEZ, J. P. (1980). *Enzyme Mathematics: Studies in Mathematics and its Applications*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.

KULYS, J. (1981). The development of new analytical systems based on biocatalysts. *Analytical Letters*, vol. 14, no. 6, p. 377–397.

KULYS, J. (2005). Kinetics of biocatalytical synergistic reactions. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, vol. 10, no. 3, p. 223–233.

KULYS, J.; DAPKŪNAS, Ž. (2007). The effectiveness of synergistic enzymatic reaction with limited mediator stability. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, vol. 12, no. 4, p. 495–501.

KULYS, J.; TETIANEC, L. (2005). Synergistic substrates determination with biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 1, p. 152–158.

LIANG, J. F.; LI, Y. T.; YANG, V. C. (2000). Biomedical application of immobilized enzymes.

Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 89, no. 8, p. 979–990.

MELL, L.D.; MALOY, J.T. (1975). A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system. *Analytical Chemistry*, vol. 47, no. 2, p. 299–307.

PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P. (1992). *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge: Cambridge University Press. 994 p.

ROGERS, K. R. (1995). Biosensors for environmental applications. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, no. 6–7, p. 533–541.

SAMARSKII, A. A. (2001). *The Theory of Difference Schemes*. New York: Marcel Dekker. 761 p.

SCHELLER, F. W.; SCHUBERT, F. (1992). *Biosensors*. Amsterdam: Elsevier Science. 360 p.

SCHELLER, F. W.; SCHUBERT, F.; FEDROWITZ, J. (1997). *Frontiers in Biosensorics: Practical Applications*. Basel: Birkhauser. 175 p.

SCHULMEISTER, T. (1990). Mathematical modelling of the dynamic behaviour of amperometric enzyme electrodes. *Selective Electrode Reviews*, vol. 12, p. 203–260.

TURNER, A. P. F.; KARUBE, I.; WILSON, G. S. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford: Oxford University Press. 770 p.

YU, D.; BLANKERT, B.; VIRE, J. C.; KAUFMANN, J. M. (2005). Biosensors in drug discovery and drug analysis. *Analytical Letters*, vol. 38, no. 11, p. 1687–1701.

MODELLING AMPEROMETRIC BIOSENSORS WITH SYNERGISTIC SUBSTRATE AMPLIFICATION

Dainius Šimelevičius, Romas Baronas

Summary

Computational modelling of a biosensor in which chemical amplification by synergistic substrates takes place was investigated in this study. In the biosensors of this type, in addition to the substrate (analyte), another auxiliary substrate is used. It is necessary to achieve the substrates synergy. The operation of the biosensor is modelled using non-stationary reaction-diffusion equations. The model involves four regions: the enzyme layer where the enzymatic reactions as well as the mass transport by diffusion take place, the

dialysis membrane and the diffusion limiting region where the mass transport by diffusion and non-enzymatic reactions take place, and the convective region in which the analyte concentration is maintained constant. The equation system is solved numerically using the finite difference technique. The biosensor response dependency on substrate concentrations and the diffusion layer thickness, as well as the biosensor sensitivity dependence on the same parameters have been studied.