

Amperometrinių mikrobiojutiklių masyvo modeliavimas

Feliksas IVANAUSKAS (VU, MII), Romas BARONAS (VU),
Juozas KULYS (VGTU), Mifodijus SAPAGOVAS (MII)*

el. paštas: feliksas.ivanauskasmaf.vu.lt

Reziumė. Straipsnyje pateikiamas amperometrinių biojutiklių, sudarytų fermento mikroreaktorių masyvo pagrindu, matematinis modelis dvimatėje erdvėje. Modelio pagrindas – difuzijos lygtys su netiesiniu nariu, aprašančiu fermento reakcijos Michaelio–Menteno kinetiką. Suformuluotas uždavinys sprendžiamas baigtinių skirtumų metodu. Kompiuterinis modeliavimas panaudotas fermento mikroreaktorių geometrijos įtakai biojutiklio atsakui iširti.

Raktiniai žodžiai: reakcija-difuzija, matematinis modeliavimas, biojutiklis, mikroreaktorius.

1. Įvadas

Biojutikliai – tai įrenginiai, kuriuos sudaro biologiškai aktyvi medžiaga, dažniausiai fermentas, ir elektroninis signalo keitiklis [1]. Fermentui reaguojant su analizuojamuoju tirpalu, fizikiniai-cheminiai pasikeitimai yra paverčiami elektros signalu, kurio stiprumas priklauso nuo tirpalo koncentracijos. Amperometriniais biojutikliais matuojama srovė, kuri atsiranda dėl biocheminės reakcijos produkto oksidacijos, išlaikant elektrodo potencialą pastoviu. Amperometriniai biojutikliai išsiskiria iš kitų savo patikimumu, pigumu ir dideliu jautriu. Jie plačiai naudojami įvairiausiose analitinėse sistemose [2].

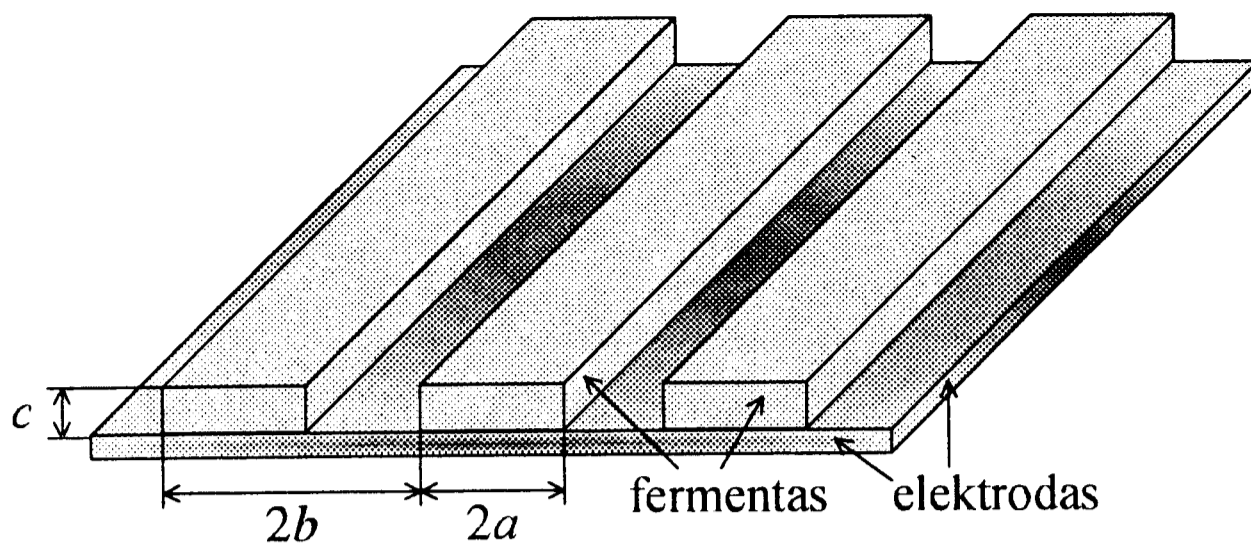
Daugelyje taikymų (narkotikams aptikti, astrobiologijoje ir kitur) biojutikliuose naudojamų fermentų praktiškai neįmanoma gaminti dideliais kiekiais ir jie yra labai brangūs, todėl biojutiklių miniatiūrizacija yra svarbi tyrimų kryptis biotechnologijoje. Tam plačiai taikomi mikroreaktorių masyvai.

Šio darbo tikslas yra sudaryti amperometrinių biojutiklių, pagamintų fermento mikroreaktorių masyvo pagrindu, matematinį modelį. Modeliuojant biojutiklių veiksmą kompiuteriu, buvo iširta fermento mikroreaktorių ir difuzijos srities geometrijos įtaka biojutiklių atsakui. Skaitmeninis modeliavimas atliktas naudojant baigtinių skirtumų metodą [3].

2. Matematinis modelis

Šiuolaikinės biojutiklių gamybos technologijos leidžia fermentą išdėstyti ant elektrodo paviršiaus pakankamai plonomis, siauromis juostelėmis – mikroreaktoriais. Kad būtų paprasčiau, fermento sritį modeliuojame tolygiai pasiskirsčiusiais stačiakampiais gretasieniais (1 pav.).

*Darbą parėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas, projektas Nr. C-03048.



1 pav. Biojutiklio sandara.

Tarus, kad biojutiklis yra simetriškas ir medžiagų difuzija vyksta baigtinėje srityje, pakanka nagrinėti vieną dedamąją dvimatę erdvę. Visą analizuojamą stačiakampę sritį pažymėkime Ω , o jos dalį, atitinkančią fermentą, – Ω_0 . Fermento ir analizuojamojo tirpalo sąlyčio kontūrą pažymėkime Γ

$$\begin{aligned}\Omega &= \{(x, z): 0 < x < b, 0 < z < d\}, \\ \Omega_0 &= \{(x, z): 0 < x < a, 0 < z < c\}, \\ \Gamma &= \{(a, z): 0 \leq z \leq c\} \cup \{(x, c): 0 \leq x \leq a\}.\end{aligned}\quad (2.1)$$

Srities Ω uždarinys $\bar{\Omega}$ atitinka biojutiklio dedamosios skersinį pjūvį, $\bar{\Omega}_0$ – mikroreaktoriaus skersinį pjūvį, $z = 0$ – elektrodo paviršių ir Γ – fermento išorinį paviršių.

Atsižvelgdami į medžiagų difuziją ir fermentinę reakciją, sudarome reakcijos – difuzijos lygčių sistemą ($t > 0$)

$$\begin{aligned}\frac{\partial S_e}{\partial t} &= D_{S_e} \frac{\partial^2 S_e}{\partial x^2} + D_{S_e} \frac{\partial^2 S_e}{\partial z^2} - \frac{V_{max} S_e}{K_M + S_e}, \\ \frac{\partial P_e}{\partial t} &= D_{P_e} \frac{\partial^2 P_e}{\partial x^2} + D_{P_e} \frac{\partial^2 P_e}{\partial z^2} + \frac{V_{max} S_e}{K_M + S_e}, \quad (x, z) \in \Omega_0, \\ \frac{\partial S_b}{\partial t} &= D_{S_b} \frac{\partial^2 S_b}{\partial x^2} + D_{S_b} \frac{\partial^2 S_b}{\partial z^2}, \\ \frac{\partial P_b}{\partial t} &= D_{P_b} \frac{\partial^2 P_b}{\partial x^2} + D_{P_b} \frac{\partial^2 P_b}{\partial z^2}, \quad (x, z) \in \Omega \setminus \bar{\Omega}_0,\end{aligned}\quad (2.2)$$

čia $S_e(x, z, t)$, $S_b(x, z, t)$ ($P_e(x, z, t)$, $P_b(x, z, t)$) yra substrato (reakcijos produkto) koncentracijos fermente ir jo išorėje, D_{S_e} , D_{S_b} , D_{P_e} ir D_{P_b} yra difuzijos koeficientai, V_{max} – maksimalusis fermentinės reakcijos greitis, K_M yra Michaelio konstanta [4].

Biojutiklis pradeda veikti panardinus jį į substratą – analizuojamąjį tirpalą. Tai atspindi pradinėse sąlygose ($t = 0$)

$$\begin{aligned}S_e(x, z, 0) &= 0, \quad P_e(x, z, 0) = 0, \quad (x, z) \in \bar{\Omega}_0 \setminus \Gamma, \\ S_e(x, z, 0) &= S_0, \quad P_e(x, z, 0) = 0, \quad (x, z) \in \Gamma,\end{aligned}\quad (2.4)$$

$$S_b(x, z, 0) = S_0, \quad P_b(x, z, 0) = 0, \quad (x, z) \in \overline{\Omega} \setminus \Omega_0,$$

čia S_0 yra substrato koncentracija.

Biojutiklio simetrija yra išreiškiama kraštinėmis sąlygomis ($t > 0$)

$$\begin{aligned} \frac{\partial S_e}{\partial x} \Big|_{x=0} &= \frac{\partial P_e}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0, & z \in [0, c], \\ \frac{\partial S_b}{\partial x} \Big|_{x=0} &= \frac{\partial P_b}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0, & z \in [c, d], \\ \frac{\partial S_b}{\partial x} \Big|_{x=b} &= \frac{\partial P_b}{\partial x} \Big|_{x=b} = 0, & z \in [0, d]. \end{aligned} \quad (2.5)$$

Dėl elektrodo poliarizacijos, reakcijos produkto koncentracija elektrodo paviršiuje išlieka lygi nuliui. Substratas nereaguoja elektrodo paviršiuje. Tai atsispindi kraštinėse sąlygose ($t > 0$)

$$\begin{aligned} P_e(x, 0, t) &= 0, \quad \frac{\partial S_e}{\partial z} \Big|_{z=0} = 0, & x \in [0, a], \\ P_b(x, 0, t) &= 0, \quad \frac{\partial S_b}{\partial z} \Big|_{z=0} = 0, & x \in [a, b], \\ P_b(x, d, t) &= 0, \quad S_b(x, d, t) = S_0, & x \in [0, b]. \end{aligned} \quad (2.6)$$

Paviršiuje Γ apibrėžiame suderinamumo sąlygas ($t > 0$)

$$\begin{aligned} D_{S_e} \frac{\partial S_e}{\partial n} \Big|_{\Gamma} &= D_{S_b} \frac{\partial S_b}{\partial n} \Big|_{\Gamma}, & D_{P_e} \frac{\partial P_e}{\partial n} \Big|_{\Gamma} &= D_{P_b} \frac{\partial P_b}{\partial n} \Big|_{\Gamma}, \\ S_e|_{\Gamma} &= S_b|_{\Gamma}, & P_e|_{\Gamma} &= P_b|_{\Gamma}, \end{aligned} \quad (2.7)$$

čia n žymi normalės kryptį.

Ypatinguoju atveju, kai $a = b$, modelis (2.2)–(2.7) išreiškia visiškai plokščio biosensoriaus veiksmą [1,4].

Tariame, kad sistema (2.2)–(2.7) pasiekia pusiausvyrą. Matuojamosios biojutiklio srovės stiprumo tankį $i(t)$ ir pusiausvirąją srovę (biojutiklio atsaką) i_{∞} galima išreikšti taip

$$i(t) = \frac{n_e F}{b} \left(D_{P_e} \int_0^a \frac{\partial P_e}{\partial z} \Big|_{z=0} dx + D_{P_b} \int_a^b \frac{\partial P_b}{\partial z} \Big|_{z=0} dx \right), \quad i_{\infty} = \lim_{t \rightarrow \infty} i(t), \quad (2.8)$$

čia n_e – elektronų skaičius, F – Faradėjaus konstanta.

Lygtis (2.2)–(2.7) sprendėme baigtinių skirtumų metodu [3]. Analizuojamąją sritį $\overline{\Omega}$ suskaidėme tolygiai visomis trimis kryptimis: x , z ir t . Naudodami kintamų krypčių metodą, skaičiavimams atlikti sudarėme neišreikštinę skirtuminę schemą.

3. Skaičiavimų rezultatai

Panaudojant skaitinį modelį, ištyrėme fermento geometrijos įtaką biojutiklių atsakui. Skaičiavimuose buvo keičiamos visų trijų fermento geometrijos parametrų a , b ir c reikšmės. Tarus, kad analizuojamasis tirpalas yra aktyviai maišomas, difuzijos sluoksnio, esančio virš fermento, storį $\delta_N = d - c$ laikėme praktiškai minimaliu [1, 2]. Norėdami palyginti biojutiklių, sudarytų mikroreaktorių pagrindu ($a < b$), atsaką su analogiškų plokščiųjų biojutiklių ($a = b$) atsaku, pusiausvirąją srovę normavome

$$i_N(k) = \frac{i_\infty(k)}{i_\infty(1)}, \quad k = a/b, \quad 0 < k \leq 1, \quad (3.1)$$

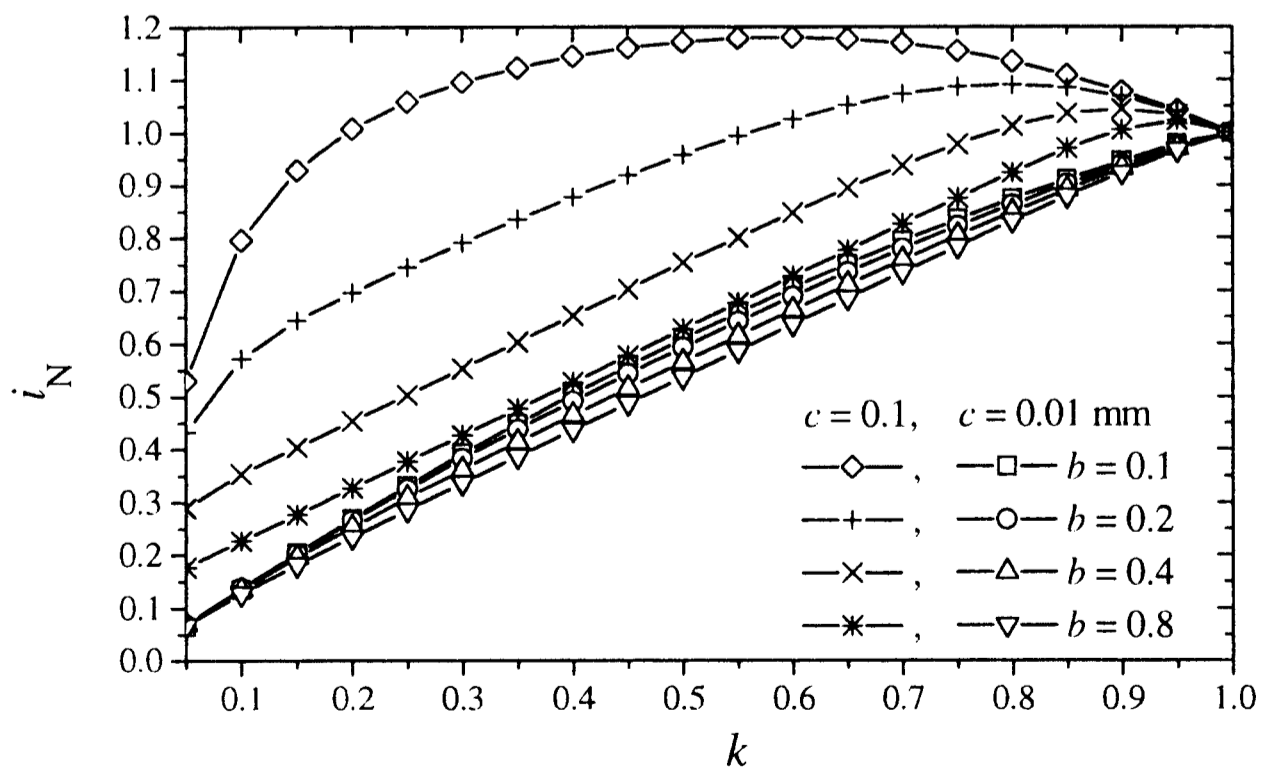
čia $i_\infty(k)$ yra pusiausviroji srovė, apskaičiuota kai a ir b santykis lygus k , i_N – normuotoji srovė, k – santykinis fermento juostelių plotis. Mikroreaktorių geometrijos įtaką tyrėme įvairioms V_{max} ir S_0 reikšmėms. Kitų parametrų reikšmės nekito:

$$D_{S_e} = D_{P_e} = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}, \quad D_{S_b} = 2D_{S_e}, \quad D_{P_b} = 2D_{P_e}, \quad (3.2)$$

$$K_M = 0,1 \text{ mol/m}^3 = 100 \mu\text{M}, \quad \delta_N = d - c = 0,02 \text{ mm}, \quad n_e = 2.$$

Skaičiavimų rezultatai pavaizduoti 2 pav., kai $V_{max} = 100 \mu\text{M/s}$, $S_0 = 20 \mu\text{M}$. Kadangi amperometrinių biojutiklių atsakas labai priklauso nuo fermento reakcijos ir difuzijos greičių santykio (difuzijos modulio σ) [4], tai skaičiavimus atlikome dviem c reikšmėms: 0,01 ir 0,1 mm. Kai $c = 0,1$ mm, tai biojutiklio atsaką lėmė difuzija ($\sigma > 1$), o kai $c = 0,01$ mm – fermentinė reakcija ($\sigma < 1$).

Kaip matyti iš 2 pav., kai $c = 0,01$ mm, pusiausviroji srovė i_∞ yra monotoniškai didėjanti santykinio fermento juostelių pločio k funkcija. Kai $c = 0,1$ mm, srovės funkcija $i_\infty(k)$ yra nemonotoninė. Vadinasi, kai biojutiklio atsake dominuoja difuzija, pusiausviroji srovė gali būti didesnė už atitinkamo plokščiojo biojutiklio ($k = 1$) pusiausvirąją srovę.



2 pav. Pusiausvirošios srovės i_∞ priklausomybė nuo santykinio fermento juostelių pločio $k = a/b$.

Fermento kiekis, tenkantis elektrodo ploto vienetui, yra proporcingas kc . Esant pastoviam c , kai biojutiklio atsaką nulemia difuzija, pasinaudojant skaitiniais eksperimentais, galima parinkti tokią biojutiklio geometriją (k), kad pusiausviroji srovė būtų kiek galima didesnė, o fermento būtų sunaudojama kiek galima mažiau. Sunaudojant mažesnę kiekį fermento, galima gauti netgi didesnę biojutiklio atsaką. Kuo didesnę srovę generuoja biojutiklis, tuo jis yra jautresnis. Jautris yra viena iš svarbiausių biojutiklių charakteristikų. Ištisiniame fermento sluoksnyje, darant vis dažnesnias išilgines išpjovas (1 pav.), taip paliekant ant elektrodo vis mažesnę fermento kiekį, galima didinti biojutiklio jautrį.

Esant pastoviems k ir c , parametrų a ir b keitimas neįtakoja fermento sąnaudų, keičiasi tik fermento juostų plotis ir jų dažnis. Kaip matyti iš 2 pav., praktiškai visoms k reikšmėms ($0, 1 < k < 1$), mažėjant b , srovė i_{∞} didėja. Tai reiškia, kad biojutiklio atsakui įtaką daro ne tik iškilimų tūris, bet ir jų forma. Ši įtaka ypač ženkli, kai biojutiklio atsaką lemia difuzija.

Papildomais skaitiniais eksperimentais buvo nustatyta, kad biojutiklio elgsenos dėsniumai išlieka ir prie kitų, būdingų biojutikliams V_{max} , S_0 ir c , reikšmių.

Išvados

Matematinę modelį (2.2)–(2.7) galima taikyti amperometrinių biojutiklių, sudarytų fermento mikroreaktorių masyvo pagrindu, kinetikos dėsniumams tirti.

Modeliuojant biojutiklio veiksmą kompiuteriu, galima parinkti fermento srities geometriją ir jo išdėtymą elektrodo paviršiuje, užtikrinant pakankamai aukštą biojutiklio jautrį ir mažas fermento sąnaudas. Ypač efektyviai fermento sąnaudas galima mažinti, kai biojutiklio atsaką apsprendžia medžiagų difuzija.

Literatūra

1. F. Scheller, F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier, Amsterdam (1992).
2. U. Wollenberger, F. Lisdat, F.W. Scheller, *Frontiers in Biosensorics 2, Practical Applications*, Birkhauser Verlag, Basel (1997).
3. A.A. Samarskii, *Theory of Difference Schemes*, Nauka, Moscow (1988).
4. R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys, The influence of the enzyme membrane thickness on the response of amperometric biosensors, *Sensors*, **3**, 248–262 (2003).

SUMMARY

F. Ivanauskas, R. Baronas, J. Kulys, M. Sapagovas. Modeling of an array of amperometric microbiosensors

This paper presents a two-dimensional-in-space mathematical model of a sensor system based on an array of enzyme microreactors immobilised on a single electrode. The model is based on the diffusion equations containing a non-linear term related to the Michaelis–Menten kinetics of the enzymatic reaction. Using computer simulation the influence of the geometry of the enzyme microreactors on the biosensor response was investigated. The digital simulation was carried out using the finite difference technique.

Keywords: reaction-diffusion, mathematical modelling, biosensor, microreactor.