

BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК 577.15+66.097.8:543.554:004.942

РОЗРОБКА МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРУ НА ОСНОВІ ЗВОРОТНОГО ІНГІБУВАННЯ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1

К. В. Степурська^{1,2,3}, С. В. Дзядевич^{1,2}

¹ Інститут високих технологій КНУ ім. Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01003,
Україна,

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, Київ, 03143,
Україна,

³ Інститут аналітичних наук Університету Ліону ім. Клода Бернара, вул. Ля Дуа, 5,
Віллербанн, 69100, Франція

e-mail авторів: stepurskaya@gmail.com, dzyad@yahoo.com

РОЗРОБКА МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРУ НА ОСНОВІ ЗВОРОТНОГО ІНГІБУВАННЯ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1

К. В. Степурська, С. В. Дзядевич

Анотація. В даній роботі розроблено математичну модель потенціометричного біосенсору на основі зворотного інгібування ацетилхолінестерази для визначення афлатоксину В1. Для валідації моделі та порівняння використано існуючий потенціометричний біосенсор на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази. Математична модель представлена системою диференційних рівнянь, які описують динаміку біохімічних реакцій, на яких ґрунтується робота біосенсору. Кожне рівняння описує концентрації ферменту, субстрату, інгібітору, продукту або концентрації фермент-субстратного, фермент-інгібіторного, фермент-субстрат-інгібіторного комплексів в залежності від часу. Система розв'язана чисельно за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica. Вхідними параметрами системи є початкові концентрації ферменту, субстрату та інгібітору (2×10^{-5} М ацетилхолінестерази, 4×10^{-3} М ацетилхолін хлориду та 0,2 мкг/мл афлатоксину В1 відповідно), які є експериментально розрахованими. Константи

швидкостей ферментативних реакцій підібрані так, щоб моделювання відгуку біосенсору відповідало експерименту. Показано, що розроблена кінетична модель дозволяє адекватно описати роботу реального потенціометричного біосенсору.

Ключові слова: математична модель, біосенсор, ацетилхолінестераза, інгібіторний аналіз, ферментативна кінетика, афлатоксин В1

DEVELOPMENT OF MATHEMATICAL MODEL OF POTENTIOMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE REVERSIBLE ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION FOR AFLATOXIN B1 DETERMINATION

K. Stepurska, S. Dzyadevych

Abstract. This work presents a mathematical model of a potentiometric biosensor based on the reversible acetylcholinesterase inhibition for aflatoxin B1 determination. An actual potentiometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase was used in this work for comparison with a mathematical model and validation. The mathematical model is described by a system of rate equations, presenting the dynamics of biochemical reactions in the biosensor. Each equation describes concentrations of the enzyme, substrate, inhibitor, product, or concentrations of enzyme-substrate, enzyme-inhibitor, enzyme-substrate-inhibitor complexes as a function of time. The system is solved numerically using Wolfram Mathematica software. Initial concentration of the enzyme, substrate and inhibitor act as boundary conditions for the system of rate equations. The concentrations have been calculated from the experimental conditions: 2×10^{-5} M acetylcholinesterase, 4×10^{-3} M acetylcholine chloride, and 0.2 mg / ml of aflatoxin B1 for the enzyme, substrate, and inhibitor respectively). The rate constants have been chosen to fit the experimental response. It is shown that the kinetic model developed allows to reproduce the performance of a real potentiometric biosensor.

Keywords: mathematical model, biosensor, inhibitory analysis, enzyme kinetics, aflatoxin B1

РАЗРАБОТКА МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ОБРАТИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНА В1

Е. В. Степурская, С. В. Дзядевич

Аннотация. В данной работе разработана математическая модель потенциометрического биосенсора на основе обратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы для определения афлатоксина В1. Для валидации модели и сравнения использовано существующий биосенсор на основе иммобилизованной ацетилхолинэстеразы. Математическая модель представлена системой дифференциальных уравнений, которые описывают динамику биохимических реакций, на которых основывается работа биосенсора. Каждое уравнение описывает концентрации фермента, субстрата, ингибитора, продукта или концентрации фермент-субстратного, фермент-ингибиторного, фермент-субстрат-ингибиторного комплексов в зависимости от времени. Система решена численно при помощи программного обеспечения Wolfram Mathematica.

Входные параметры системы являются начальными концентрации фермента, субстрата и ингибитора. Они рассчитаны экспериментально и составляют 2×10^{-5} М ацетилхолинэстеразы, 4×10^{-3} М ацетилхолин хлорида и 0,2 мкг/мл афлатоксину В1 соответственно. Константы скоростей ферментативных реакций подобраны таким образом, чтобы моделирование отклика биосенсора соответствовало эксперименту. Показано, что разработанная кинетическая модель позволяет адекватно описать работу реального потенциометрического биосенсора.

Ключевые слова: математическая модель, биосенсор, ацетилхолинэстераза, ингибиторный анализ, ферментативная кинетика, афлатоксин В1

1. Вступ

Використання математичного моделювання може бути корисним інструментом для кращого розуміння біохімічних процесів та широко використовується для оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів. Починаючи з сімдесятих років та до сьогодні, різні математичні моделі були розроблені та успішно застосовані для оптимізації роботи біосенсорів [1-3]. Так, наприклад, за останні п'ять років S. Loghambal, L. Rajendran та ін. запропонували декілька математичних моделей для амперметричного електрода з іммобілізованим ферментом на основі нелінійних диференціальних рівнянь, які описують кінетику Міхаеліса-Ментена та дифузію [4-5], а також математичну модель амперметричного та потенціометричного біосенсорів [6]. В цих моделях використовують метод гомотопічних збурень для вирішення системи рівнянь в умовах стаціонарності. Ашеріс і співавтори описали математичні моделі амперметричних біосенсорів [7-8], в яких змінюючи вхідні параметри (такі як концентрація реагентів, кінетичні константи та товщина мембрани), їм вдалось поліпшити чутливість розроблених біосенсорів. В цих моделях для вирішення системи рівнянь використовували метод кінцевих різниць при стаціонарних та нестаціонарних умовах. Переважна більшість розроблених математичних моделей описують ферментні біосенсори для прямого визначення субстрату. На ряду з цим, останні роки спостерігається тенденція росту розробок біосенсорів на основі інгібіторного аналізу [9-10]. Більшою мірою такі біосенсори використовуються в екологічному моніторингу для детектування токсичних речовин, таких як пестициди, іони важких металів, афлатоксини тощо [11-12]. На сьогодні розроблено зовсім

незначну кількість математичних моделей роботи біосенсорів такого типу. З них можна виділити математичну модель роботи глюкозооксидазного біосенсора для визначення іонів ртуті [13]. В цій моделі система рівнянь, що описує дифузію та ферментативні нелінійні реакції зв'язані з кінетикою Міхаеліса-Ментена, модифікована з урахуванням незворотного інгібування.

Дана робота присвячена розробці математичної моделі розробленого раніше ацетилхолінестеразного біосенсору на основі іон-селективних польових транзисторах (ІСПТ) для інгібіторного визначення афлатоксину В1 (АФВ1) [14]. Питання є вкрай актуальним, з огляду на те що АФВ1 є високотоксичною та канцерогенною для людини та тварини сполукою, яку продукують деякі плісняві гриби роду *Aspergillus*. Такі гриби інфікують широкий спектр продуктів харчування та кормів при невідповідних умовах їх зберігання (висока температура, підвищена вологість тощо). Застосування математичного моделювання для оптимізації аналітичних характеристик біосенсору в подальшому дасть змогу звести до мінімуму проведення лабораторних експериментів із токсичними речовинами для підбору оптимальних концентрацій компонентів.

2. Матеріали і методи

2.1. Потенціометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази

Для валідації математичної моделі у роботі використовували розроблений раніше біосенсор [14]. В якості біоселективного елементу біосенсору використовували фермент ацетилхолінестеразу (АцХЕ) із *Electrophorus electricus* (ЕС 3.1.1.7) актив-

ністю 518 од. акт./мг, іммобілізований на поверхню потенціометричного перетворювача поперечною зшивкою у насичених парах глутарового альдегіду. В якості потенціометричних перетворювачів використовували пару ідентичних іон-селективних польових транзисторів р-типу з чутливістю 35-40 мкА / рН розміщених на одному кристалі.

2.2. Математичне моделювання

Система диференціальних рівнянь, яка описує математичну модель роботи розробленого біосенсора, розв'язувалась чисельно за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica 10. Також у цій програмі були побудовані модельні відгуки біосенсора, які порівняно із експериментальними даними.

3. Результати та обговорення

При інгібіторному визначенні афлатоксину В1 за допомогою АцХЕ-біосенсора на основі іон-селективних польових транзисторів функціонування біосенсора умовно можна поділити на наступні етапи (рис. 1): отримання базової лінії (0), відгук на робочу концентрацію ацетилхолін хлориду (АцХХ) як субстрату (I), та відгук на афлатоксин В1 як інгібітора (II).

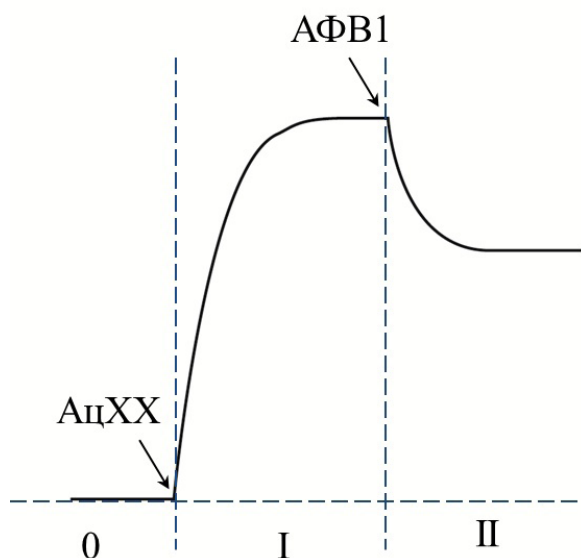
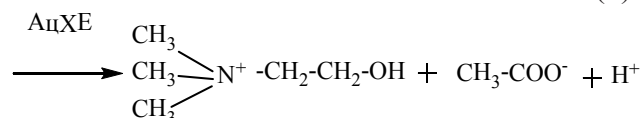
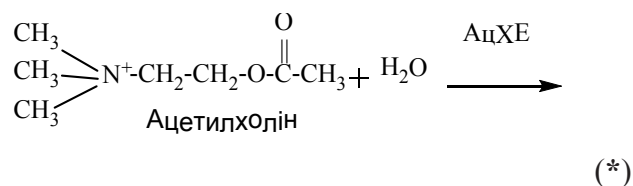


Рис. 1. Схематичне зображення роботи АцХЕ-біосенсора на основі ІСПТ при інгібіторному визначенні АФВ1.

Робота АцХЕ-біосенсора перш за все ґрунтується на наступній ферментативній реакції, яка протікає у біоселективній мембрані:



На нульовому етапі, коли біоселективна мембрана знаходиться в контакті тільки з робочим буфером, в мембрані не відбувається ніяких реакцій, а сигнал біосенсора відображає «базову лінію» (рис.1, етап 0). На першому етапі відбувається ферментативна реакція (*) за участю субстрату, який додають у робочу комірку. В результаті цієї реакції утворюється продукт (протон), в результаті чого змінюється локальна концентрація іонів в приелектродній області, що реєструється потенціометричним перетворювачем. Ця зміна візуалізується у вигляді відгуку на субстрат (рис.1, етап I). На другому етапі роботи біосенсора, при додаванні у вимірювальну комірку афлатоксину В1, який є зворотнім інгібітором АцХЕ, відбувається реакція інгібування ферменту. За літературними даними [15] механізм інгібування АцХЕ афлатоксином В1 відносять до змішаного типу інгібування, який можна схематично зобразити на Рис. 2:

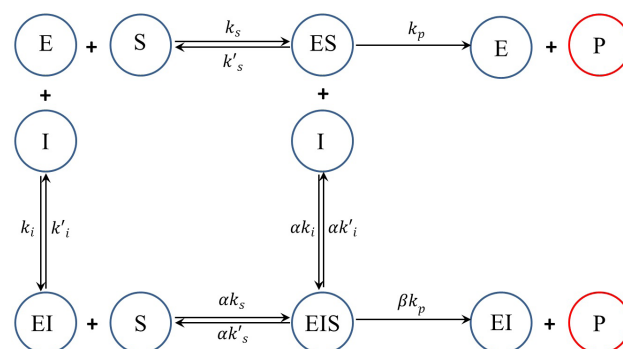


Рис. 2. Схематичне представлення проходження ферментативної реакції за участю ферменту (E), субстрату (S) та зворотного інгібітору (I) змішаного типу, яка використовується у потенціометричному біосенсорі на основі АцХЕ при інгібіторному визначенні АФВ1.

На Рис. 2 k_s та k'_s – константи швидкостей прямої та зворотної реакції утворення комплексу (ES), k_p – константа швидкості (V_p) утворення продукту (P), а k_i та k'_i – константи швидкостей прямої та зворотної реакції утворення комплексу (EI).

Цю систему можна описати наступною системою диференціальних рівнянь:

$$\frac{dn_e(t)}{dt} = -k_s n_e(t) n_s(t) - k_i n_e(t) n_i(t) + k'_s n_{es}(t) + k'_i n_{ei}(t) + k_p n_{es} \quad (1.1)$$

$$\frac{dn_{es}(t)}{dt} = k_s n_e(t) n_s(t) - k'_s n_{es}(t) - \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) + \alpha k'_i n_{esi}(t) - k_p n_{es}(t) \quad (1.2)$$

$$\frac{dn_{ei}(t)}{dt} = k_i n_e(t) n_i(t) - k'_i n_{ei}(t) - \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) + \alpha k'_s n_{esi}(t) + \beta k_p n_{eis}(t) \quad (1.3)$$

$$\frac{dn_{esi}(t)}{dt} = \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) - \alpha k'_i n_{esi}(t) + \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) - \alpha k'_s n_{esi}(t) - \beta k_p n_{eis}(t) \quad (1.4)$$

$$\frac{dn_s(t)}{dt} = -k_s n_e(t) n_s(t) - \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) + k'_s n_{es}(t) + \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (1.5)$$

$$\frac{dn_i(t)}{dt} = -k_i n_e(t) n_i(t) - \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) + k'_i n_{ei}(t) + \alpha k'_i n_{esi}(t) \quad (1.6)$$

$$\frac{dn_p(t)}{dt} = k_p n_{es}(t) + \beta k_p n_{esi}(t), \quad (1.7)$$

де k_s , k'_s , k_i , k'_i та k_p – відповідні константи швидкості реакцій утворення комплексів, α и β – константи, чисельне значення яких визначає інгібування або активування ферменту;

n_e , n_s , n_i , n_p , n_{es} , n_{ei} , n_{esi} – концентрації ферменту, субстрату, інгібітору, продукту, а також фермент-субстратного, фермент-інгібіторного та фермент-субстрат-інгібіторного комплексів відповідно, які змінюються з часом. Зміна в часі концентрації продукту n_p прямо пропорційна відгуку біосенсору.

Враховується також, що в системі зберігається постійна загальна концентрація ферменту E_0 , таким чином в будь-який момент часу сума концентрацій вільного (E) та зв'язаного (ES), (EI), (ESI) ферменту дорівнює $(E) + (ES) + (EI) + (ESI) = E_0$

На нульовому етапі моделювання задаються наступні початкові умови $n_s(0) = n_i(0) = n_p(0) = n_{es}(0) = n_{ei}(0) = n_{esi}(0) = 0$, тобто коли в системі немає субстрату та інгібітору, а лише вводиться початкова концентрація ферменту у робочій мембрані біосенсора. При заданих початкових

умовах та заданих параметрах знаходяться розв'язки системи, та будується похідна $n_p(t)$, що відповідатиме базовій лінії.

На першому етапі система розв'язується при початкових умовах, які задаються розв'язками системи нульового етапу, а також задається початкова концентрація субстрату, що додається у робочу комірку. Похідна розв'язку $n_p(t)$ при таких умовах буде відповідати відгуку на субстрат.

Нарешті, на другому етапі моделюється відгук на інгібітор, при підстановці попередніх розв'язків та початкової концентрації інгібітору $n_i(t)$, яка відома за умовами експерименту.

Для валідації розробленої моделі у систему рівнянь (1) були підставлені реальні параметри: робоча концентрація субстрату та концентрація інгібітору, а також концентрація ферменту в біоселективній мембрані. В реальному експерименті в якості робочої концентрації субстрату використовували 4×10^{-3} М АцХХ. Модельні концентрації інгібітору – АФВ1 складали 0,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,6 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 10 мкг/мл, 40 мкг/мл. Для нормалізації вхідних параметрів та приведенню до однакових одиниць вимірювання, ці концентрації були перераховані та складали $0,64 \times 10^{-6}$ М, $1,28 \times 10^{-6}$ М, $1,92 \times 10^{-6}$ М, $6,4 \times 10^{-6}$ М, $12,8 \times 10^{-6}$ М, $32,02 \times 10^{-6}$ М, $128,09 \times 10^{-6}$ М. Також була оцінена концентрація ферменту у біоселективній мембрані біосенсору. Об'єм однієї мембрани біосенсору становить приблизно 0,03 мкл, що відповідає 0,03 мг. Беручи до уваги той факт, що мембрана містить 1% АцХЕ, можна розрахувати масу ферменту у мембрані, яка становила $0,3 \times 10^{-6}$ г. Молярна маса АцХЕ відома та становить 280 кДа, або 280×10^3 г/моль (т.я. 1 Да = 1 г/моль). Знаючи масу та молярну масу ферменту, можна розрахувати кількість речовини ферменту, яка становить $1,0 \times 10^{-12}$ моль. Якщо поділити цю величину на відомий об'єм мембрани, матимемо молярну концентрацію, яку можна використовувати для моделювання. Таким чином, молярна концентрація ферменту в мембрані становить близько 2×10^{-5} М.

Біохімічні константи швидкості реакцій к важко отримати прямо з експерименту. В даному дослідженні ці константи були підібрані таким чином, щоб модельний відгук

співпадав із експериментальними відгуками (Рис. 3). Встановлено, що стабільна робота біосенсору (при даних концентрація ферменту, субстрату та інгібітора) досягається при обмеженому балансі між параметрами k . В нашому випадку $k_i = 100 k_s$, тобто інгібітор у сто разів активніше взаємодіє з ферментом, ніж субстрат. $k_i = 10^{-4} k_p$, $k_s = 0.01 k_s$ що означає незначні швидкості розпаду комплексів (EI) та (ES) відносно швидкості їх створення.

Інтенсивність, ум од

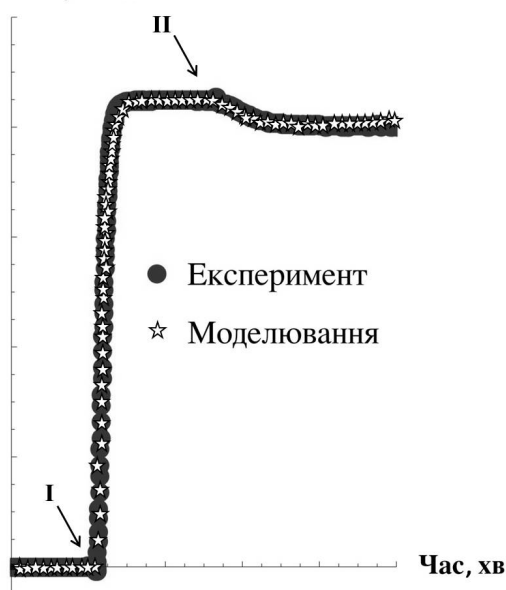


Рис. 3. Симуляція роботи потенціометричного біосенсору на основі АцХЕ методом кінетичних рівнянь з використанням системи диференціальних рівнянь (1); I – додавання 4×10^{-3} М АцХХ, II – додавання 0,2 мкг/мл ($0,64 \times 10^{-6}$ М) АФВ1.

З Рис. 3 видно, що вибрані нами параметри для кінетичної моделі роботи біосенсору дозволяють отримати симуляцію відгуків на субстрат й інгібітор (рис. 3, сині точки) таким чином, щоб вона відповідала результатам реального експерименту (рис. 3, червоні точки).

4. Висновки та перспективи

В даному дослідженні розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсору на основі зворотного інгібування ферменту АцХЕ, яка базується на принципах

кінетики ферментативних реакцій, які відбуваються в мембрані біосенсору.

Обчислені початкові параметри (концентрації ферменту, субстрату та інгібітора), та проведена оцінка та підбір констант швидкості ферментативних реакцій. Розробка цієї моделі дає змогу краще зрозуміти ферментативні процеси, що лежать в основі роботи ферментного біосенсору. Розвитком даної роботи може бути врахування дифузійних процесів в біоселективній мембрані.

Подяка

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

Автори також вдячні Сергію Гридіну (Університет Уейк Форест, Вінстон-Салем, Північна Кароліна, США) за ідейне натхнення та підтримку.

Список використаної літератури

- [1] L. D. Mell and J. T. Maloy, A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system // *Anal. Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 299–307, 1975.
- [2] N. Gajovic, A. Warsinke, T. Huang, T. Schulmeister, and F. W. Scheller, Characterization and Mathematical Modeling of a Bienzyme Electrode for l-Malate with Cofactor Recycling // *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 20, pp. 4657–4662, 1999.
- [3] M. R. Romero, A. M. Baruzzi, and F. Garray, Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor // *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 162, no. 1, pp. 284–291, 2012.
- [4] S. Loghambal and L. Rajendran, Mathematical modeling of diffusion and kinetics in amperometric immobilized enzyme electrodes // *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 18, pp. 5230–5238, 2010.
- [5] S. Loghambal and L. Rajendran, Mathematical modeling in amperometric oxidase enzyme-membrane electrodes // *J. Memb. Sci.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 20–28, 2011.
- [6] A. Meena and L. Rajendran, Mathemati-

cal modeling of amperometric and potentiometric biosensors and system of non-linear equations - Homotopy perturbation approach // *J. Electroanal. Chem.*, vol. 644, no. 1, pp. 50–59, 2010.

[7] V. Ašeris, E. Gaidamauskaitė, J. Kulys, and R. Baronas, Modelling glucose dehydrogenase-based amperometric biosensor utilizing synergistic substrates conversion // *Electrochim. Acta*, vol. 146, pp. 752–758, 2014.

[8] V. Ašeris, R. Baronas, and J. Kulys, Modelling the biosensor utilising parallel substrates conversion // *J. Electroanal. Chem.*, vol. 685, pp. 63–71, 2012.

[9] F. Arduini and A. Amine, Biosensors Based on Enzyme Inhibition // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 140, pp. 299–326, 2014.

[10] L. S. B. Upadhyay and N. Verma, Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review // *Anal. Lett.*, vol. 46, no. June 2014, pp. 225–241, 2012.

[11] K. V. Stepurska, O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko, V. M. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, and A. P. Soldatkin, Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic com-

pounds of different nature // *Anal. Chim. Acta*, vol. 854, pp. 161–168, 2015.

[12] V. Dhull, A. Gahlaut, N. Dilbaghi, and V. Hooda, Acetylcholinesterase biosensors for electrochemical detection of organophosphorus compounds: A review // *Biochem. Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–18, 2013.

[13] F. Achi, S. Bourouina-Bacha, M. Bourouina, and a. Amine, Mathematical model and numerical simulation of inhibition based biosensor for the detection of Hg(II) // *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 207, pp. 413–423, 2015.

[14] K. V. Stepurska, O. O. Soldatkin, V. M. Arkhypova, a. P. Soldatkin, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, and S. V. Dzyadevych, Development of novel enzyme potentiometric biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples // *Talanta*, vol. 144, pp. 1079–1084, 2015.

[15] M. Pohanka, Spectrophotometric Assay of Aflatoxin B1 Using Acetylcholinesterase Immobilized on Standard Microplates // *Anal. Lett.*, vol. 46, no. 8, pp. 1306–1315, 2013.

Стаття надійшла до редакції 17.12.2015 р.

UDC 577.15:66.097.8:543.554:004.942

DEVELOPMENT OF MATHEMATICAL MODEL OF POTENTIOMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE REVERSIBLE ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION FOR AFLATOXIN B1 DETERMINATION

K. Stepurska^{1,2,3}, S. Dzyadevych^{1,2}

¹ Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64 Volodymyrska str., 01003, Kyiv, Ukraine

² Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., 03680,
Kyiv, Ukraine

³ Institute of Analytical Sciences, UMR5280 CNRS/UCBL/ENS, 5 rue de la Doua, 69100,
Villeurbanne, France

Summary

Mathematical modeling is widely used for optimization of the analytical characteristics of biosensors. Usage of the biosensors based on enzyme inhibition effect for environmental monitoring is the recent trend that makes their studies a very topical task. Aflatoxin B1 is a highly toxic and carcinogenic secondary metabolite of a fungus *Aspergillus*. It contaminates a wide range of foodstuff and poses a threat to human and animal health. Method of rate equations can be a powerful tool in this research.

The **aim of this study** is to develop a mathematical model of a potentiometric biosensor based on the reversible acetylcholinesterase inhibition for aflatoxin B1 determination.

Methods. Wolfram Mathematica software was used for a mathematical modeling. An actual potentiometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase was used in this work for a mathematical model validation.

Results. The mathematical model is described by a system of rate equations, presenting the dynamics of biochemical reactions in the biosensor. Each equation describes concentrations of the enzyme, substrate, inhibitor, product, or concentrations of enzyme-substrate, enzyme-inhibitor, enzyme-substrate-inhibitor complexes as a function of time. Initial concentration of the enzyme, substrate and inhibitor acts as boundary conditions for the system of rate equations. The concentrations have been calculated from the experimental conditions: 2×10^{-5} M acetylcholinesterase, 4×10^{-3} M acetylcholine chloride, and 0.2 mg/ml of aflatoxin B1 for the enzyme, substrate, and inhibitor respectively. The rate constants have been chosen to fit the experimental response.

Conclusions. It is shown that the results of modeling are in good correlation with the experimental data and the developed kinetic model allows to adequately describe the work of real potentiometric biosensor. For the future development of this work the diffusion processes in the bioselective membrane may be considered.

Keywords: mathematical model, biosensor, inhibitory analysis, enzyme kinetics, aflatoxin B1

РОЗРОБКА МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРУ НА ОСНОВІ ЗВОРОТНОГО ІНГІБУВАННЯ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1

К. В. Степурська^{1,2,3}, С. В. Дзядевич^{1,2}

¹Інститут високих технологій КНУ ім. Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01003, Україна,

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна,

³Інститут аналітичних наук Університету Ліону ім. Клода Бернара, вул. Ля Дуа, 5, Віллербанн, 69100, Франція

Реферат

Математичне моделювання широко використовується для оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів. Останні тенденції у розробці ферментних біосенсорів на основі інгібіторного аналізу для моніторингу навколишнього середовища роблять це дослідження дуже актуальним. Афлатоксин В1 є високотоксичним та канцерогенним вторинним метаболітом пліснявого гриба роду *Aspergillus*. Він забруднює широкий спектр харчових продуктів та становить суттєву загрозу для здоров'я людини та тварини. Метод кінетичних рівнянь може бути потужним інструментом у цьому дослідженні.

Метою даного дослідження є розробка математичної моделі потенціометричного біосенсора на основі зворотного інгібування ацетилхолінестерази для визначення афлатоксину В1.

Методи дослідження. Для математичного моделювання використано програмне забезпечення Wolfram Mathematica. Для валідації моделі використано існуючий потенціометричний біосенсор на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази.

Результати дослідження. Математична модель представлена системою диференціальних рівнянь, які описують динаміку біохімічних реакцій, на яких ґрунтується робота біосенсору. Кожне рівняння описує концентрації ферменту, субстрату, інгібітору, продукту або концентрації фермент-субстратного, фермент-інгібіторного, фермент-субстрат-інгібіторного комплексів в залежності від часу. Вхідними параметрами системи є початкові концентрації ферменту, субстрату та інгібітору (2×10^{-5} М ацетилхолінестерази, 4×10^{-3} М ацетилхолін хлориду та 0,2 мкг/мл афлатоксину В1 відповідно), які є експериментально розрахованими. Константи швидкостей ферментативних реакцій підібрані так, щоб моделювання відгуку біосенсору відповідало експерименту.

Узагальнення та висновки. Показано, що результати моделювання знаходяться у хорошій кореляції з експериментальними даними, а розроблена кінетична модель дозволяє адекватно описати роботу реального потенціометричного біосенсору. Розвитком даної роботи може бути врахування дифузійних процесів в біоселективній мембрані.

Ключові слова: математична модель, біосенсор, ацетилхолінестераза, інгібіторний аналіз, ферментативна кінетика, афлатоксин В1