

С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ, член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН

## ФУНКЦИИ НАДЕЖНОСТИ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

Развитие исследований в области биологического катализа в настоящее время создает основу использования результатов фундаментальных исследований ферментов как катализаторов химических реакций для решения ряда практических задач. Разработка вопросов практического использования ферментов входит в задачи новой отрасли знания, которая получила название инженерной энзимологии. При использовании методов инженерной энзимологии в настоящее время в стадии развития находится решение таких важных проблем, как преобразование солнечной энергии с помощью фотосинтетических систем <sup>(1-3)</sup>, получение сахаров путем гидролиза полисахаридов (крахмала, целлюлозы), синтез аминокислот <sup>(4)</sup> и некоторые другие проблемы. Для биополимерных катализаторов характерно явление «старения», вызванное физико-химическими процессами денатурации белков. Развитие методов иммобилизации ферментов на различного рода полимерных носителях в ряде случаев позволяет существенно увеличить время работы катализатора.

Нам представляется, что для количественной и объективной оценки времени работы катализатора или полиферментной системы, полезным является привлечение элементов теории надежности, развитой для описания «старения» различного рода физических систем <sup>(5)</sup>.

В рамках теории надежности стабильность системы во времени описывает функция надежности  $P(t)$ , которая дает вероятность безотказной работы системы до времени  $t$  как функцию времени:

$$P(t) = \exp - \int_0^t \lambda(t) dt, \quad (1)$$

где  $\lambda(t)$  — опасность (или интенсивность) отказов. Построение эмпирических функций надежности основано на определении числа элементов, сохранивших свою работоспособность к данному моменту времени. В применении к энзимологии функция надежности имеет вид

$$P(t) = A(t)/A_0, \quad (2)$$

где  $A(t)$  — активность катализатора (или системы катализаторов) в момент времени  $t$ ,  $A_0$  — начальная активность.

Важным количественным параметром надежности системы является среднее время безотказной работы, которое дается уравнением

$$T_0 = \int_0^{\infty} P(t) dt. \quad (3)$$

**Экспоненциальный закон надежности.** Если опасность отказа в данном промежутке времени постоянна и не является функцией времени, согласно (1), функция надежности имеет вид

$$P(t) = e^{-\lambda t}.$$

В энзимологии экспоненциальный закон инактивации ферментов наиболее распространен <sup>(6)</sup>. В качестве иллюстрации на рис. 1 приведены данные

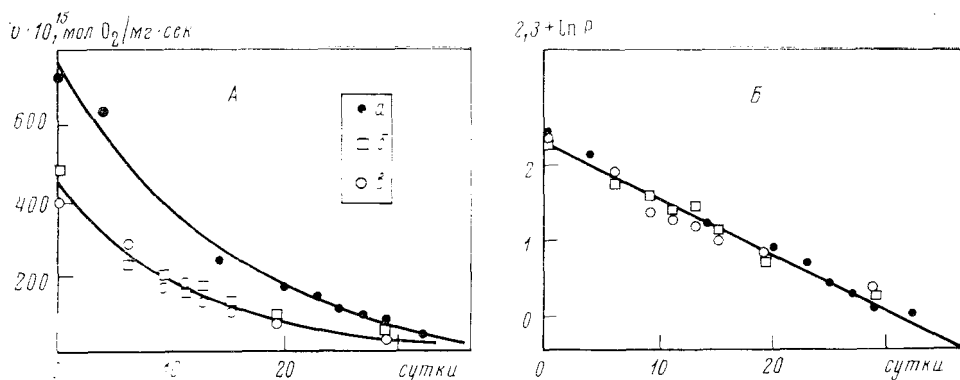


Рис. 1. Экспоненциальный закон надежности для инактивации глюкозооксидазы, иммобилизованной на никель-алюмосиликатных носителях (<sup>7</sup>). А — кинетика инактивации: а — 0% никеля, б — 2% никеля, в — 8% никеля; Б — спрямление данных рис. 1А в полулогарифмических координатах

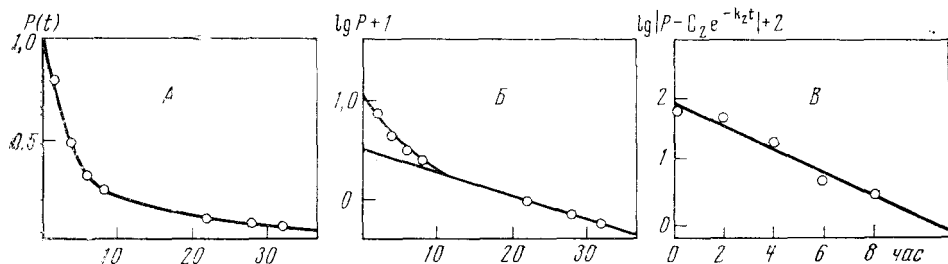


Рис. 2. А — кинетика инактивации на воздухе гидрогеназы из *Chloropseudomonas ethilica*, 30° С, рН 8.0; 0.03 мол.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Б — определение параметров  $a_2/A_0$  и  $k_2$  в полулогарифмических координатах; В — определение параметров  $a_1/A_0$  и  $k_1$  в полулогарифмических координатах

по инактивации фермента глюкозооксидазы, иммобилизованной на никель-алюмосиликатных носителях с различным содержанием никеля (<sup>7</sup>). Наблюдаемые закономерности достаточно строго описываются уравнением (4). Опасность отказа в этом случае имеет физический смысл константы скорости инактивации фермента  $k$  и связана с определенным физико-химическим процессом, приводящим к потере каталитической активности. Среднее время безотказной работы фермента, в соответствии с (3), равно

$$T_0 = 1/k. \quad (5)$$

Для данных, представленных на рис. 1, среднее время безотказной работы равно 14 суткам.

Системы ферментов, инактивирующихся по экспоненциальному закону. а) Полиферментные системы с последовательно работающими катализаторами. Для системы ферментов, инактивация каждого из ферментов которой ведет к потере каталитической функции всей системы, при условии, что ферменты инактивируются независимо, функция надежности будет иметь вид

$$P(t) = P_1(t) P_2(t) \dots P_i(t) \dots P_n(t), \quad (6)$$

где  $P_i(t)$  — функция надежности каждого фермента. В соответствии с уравнениями (1) — (3) среднее время безотказной работы равно

$$T_0 = 1 / \sum_i^n k_i. \quad (7)$$

В сумму, представляющую знаменатель уравнения 7, будут вносить наиболее быстрые процессы. Таким образом, среднее время безотказной работы определяется устойчивостью наиболее быстрых белков.

б) Параллельно работающие ферменты. Если несколько ферментов катализируют одну и ту же реакцию, а инактивируются с различными скоростями, среднее время безотказной работы дается уравнением

$$T_0 = \frac{1}{A_0} \sum_{i=1}^n \frac{a_i}{k_i}, \quad 8$$

где  $A_0$  — начальная ферментативная активность,  $a_i$  — парциальная активность каждого из  $n$  ферментов,  $k_i$  — константа скорости инактивации (или интенсивность отказа) каждого фермента.

Случай параллельно работающих ферментов часто встречается на практике, поскольку он соответствует системе, состоящей из нескольких фракций одного катализатора, различающихся парциальным вкладом в общую активность и чувствительностью по отношению к инактивирующим воздействиям. Важно отметить, что среднее время безотказной работы системы параллельно работающих ферментов определяется наиболее активной (наибольшее  $a_i$ ) или наиболее стабильной (наименьшее  $k_i$ ) фракцией фермента.

На рис. 2 приведены данные по инактивации на воздухе гидрогеназы из фототрофных бактерий *Chloropseudomonas ethylica*, катализирующей образование молекулярного водорода из восстановленных органических соединений. Из экспериментальных данных рис. 2 найдено  $a_1/A_0=0,68$ ,  $k_1=0,41$  час<sup>-1</sup>,  $a_2/A_0=0,32$ ,  $k_2=0,05$  час<sup>-1</sup>. В соответствии с уравнением (8) среднее время безотказной работы этого фермента на воздухе равно 8 час.

Нормальный закон надежности. Применимость экспоненциального закона надежности в энзимологии зависит от характера отказов элементов. Отказы, приводящие к полной потере биокаталитической функции по принципу «все или ничего», довольно хорошо описываются экспоненциальным законом. В теории надежности отказы, возникающие в результате необратимых физико-химических изменений структуры, которые не приводят сразу к потере активности, носят характер «скрытых ошибок», называют постепенными отказами. Процесс «старения» биологических структур, включающих ферменты, белки и биомембраны, может быть описан в терминах теории надежности с использованием нормального закона. Функция надежности для нормального закона определяется средним временем безотказной работы  $T_0$  и дисперсией среднего времени  $\sigma$  в соответствии с уравнением (при  $\sigma \ll T_0$ ):

$$P(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{(t-T_0)/\sigma}^{\infty} e^{-x^2/2} dx. \quad (9)$$

Параметр  $T_0$  определяет период времени, в течение которого вероятность безотказной работы системы уменьшается в два раза, параметр  $\sigma$  связан с дисперсией времени жизни элементов. На рис. 3 приведены кривые, рассчитанные по уравнению (9) при различных значениях  $T_0$  и  $\sigma$ .

При анализе стабильности биологических структур достаточно часто встречаются системы, инактивирующиеся по нормальному закону. Это относится прежде всего к целым клеткам, клеточным органеллам или полиферментным системам, локализованным в биологических мембранах. В качестве иллюстрации на рис. 4 приведены данные по инактивации полиферментной системы дыхательной цепи митохондрий, осуществляющей окисление НАДН кислородом (комплексы I+II+III+IV) (8). Кривая имеет

теоретический характер и рассчитана по уравнению (4) при использовании параметров  $T_0=12$  и 2 мин. Важно подчеркнуть, что весьма сложный характер «старения» полиферментной системы может быть объяснен простыми физическими представлениями о случайном характере появления ошибок и постепенном характере отказов в биологических системах.

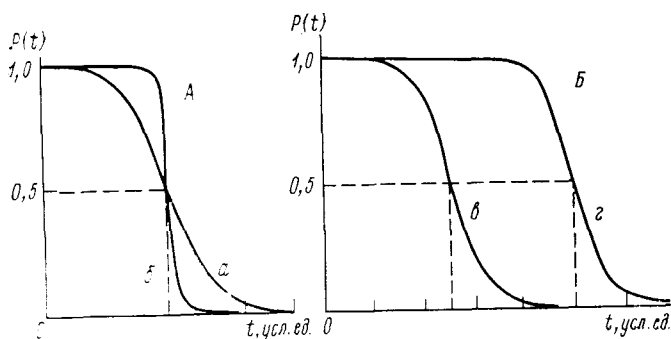


Рис. 3

Рис. 3. Зависимости функций надежности в случае нормального закона от параметров  $\sigma$  (А) и  $T_0$  (Б). а —  $\sigma=1$ , б —  $\sigma=0,25$ , в —  $\sigma=1$ , г —  $\sigma=1$ ,  $T_0=10$  усл. ед. Для а, б, в —  $T_0=5$  усл. ед.

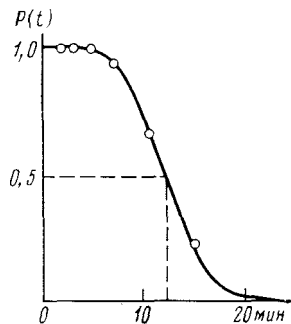


Рис. 4

Рис. 4. Нормальный закон надежности для полиферментной системы окисления НАДН (комплексы I+II+III+IV) дыхательной цепи митохондрий (экспериментальные данные работы (8))

Физико-химические процессы, обуславливающие инактивацию ферментов и полиферментных систем, многообразны и требуют тщательного изучения. Применение теории надежности в энзимологии дает единый количественный аппарат для описания «старения» такого рода систем. Ряд строгих параметров, таких как среднее время безотказной работы, позволяет количественно охарактеризовать надежность элементов и систем. Применение теории надежности позволяет предсказывать среднее время работы достаточно сложных полиферментных систем на основании данных по надежности отдельных ферментов.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
23 V 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Proc. of the Workshop on Biological Energy Conversion, Gatlinburg, Tennessee, 1972. <sup>2</sup> Proc. of the Workshop on Bio-Solar Conversion, Bathesda, Maryland, 1973.
- <sup>3</sup> С. Д. Варфоломеев, М. В. Гусев и др., Симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов, Таллин, 1974. <sup>4</sup> Biotechnology and Bioengineering, Symp. 3, Intersci. Publ., N. Y., 1972. <sup>5</sup> Б. В. Гнеденко, Ю. К. Беляев, А. Д. Соловьев, Математические методы в теории надежности, М., 1965. <sup>6</sup> Т. Жоли, Физическая химия денатурации белков, М., «Мир», 1968. <sup>7</sup> W. M. Herring, R. L. Laurence, J. R. Kittrell, Biotechn. and Bioengineering, v. 14, 975 (1972). <sup>8</sup> В. Н. Лузиков, Докт. дисс., Ин-т химии природных соединений АН СССР, 1973.