

УДК 531/534: [57+61]

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОДЕСТРУКЦИИ ПАРАЦЕТАМОЛА АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCLUS*

Е.В. Вихарева*, А.А. Селянинов**, И.Б. Ившина**, Ю.И. Няшин**

*Кафедра фармацевтической технологии Пермской государственной фармацевтической академии, Россия, 614990, Пермь, ул. Ленина, 48, e-mail: perm@pfa.ru

**Кафедра теоретической механики Пермского государственного технического университета, Россия, Пермь, 614990, Комсомольский проспект, 29, e-mail: irn@theormech.pstu.ac.ru

***Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: ivshina@iegm.ru

Аннотация. Определена зависимость константы скорости реакции биокаталитического окисления парацетамола от технологических параметров процесса – температуры инкубации (поддержания контролируемых параметров окружающей среды) родококков и скорости движения орбитального шейкера (прибора с движущейся платформой). Достигнуто соответствие результатов, полученных по теоретическому кинетическому уравнению, с экспериментальными данными. Показана возможность использования разработанного кинетического уравнения для интенсификации процесса биодеструкции парацетамола. Полученное решение задачи оптимизации процесса биодеструкции парацетамола позволяет перейти к характерным параметрам процесса (температура и окружная скорость движения жидкости в лабораторной установке) и к реальным управляющим технологическим параметрам для проведения процесса в промышленных и полупромышленных условиях.

Ключевые слова: парацетамол, биологическая деструкция, родококки, кинетическое уравнение, константа скорости реакции, технологические параметры процесса.

Введение

В предыдущих работах [1, 2] на примере парацетамола показана возможность биологической деструкции непригодных к медицинскому использованию лекарственных средств, содержащих в своей структуре фенольную гидроксильную группу. Определены кинетические параметры и разработаны условия интенсификации процесса биоконверсии парацетамола, предусматривающие использование иммобилизованных (лишенных подвижности для повышения их ферментативной активности) в криогеле (геле, полученном путем последовательного нагревания и охлаждения) поливинилового спирта клеток алканотрофных (способных питаться углеводородами, в частности входящими в состав нефти) родококков.

Разработана кинетическая схема реакции биокаталитического окисления парацетамола. В результате предложено два кинетических уравнения, описывающих процесс биодеструкции парацетамола: одно – с учетом концентрации собственно парацетамола, другое – с учетом содержания парацетамола и его метаболитов

(*n*-аминофенола и других) [2]. Первое кинетическое уравнение позволяет описать сравнительно медленные процессы биодеструкции. Второе кинетическое уравнение позволяет описать интенсивный процесс биодеструкции с использованием иммобилизованных клеток родококков, протекающий до полного разложения вещества за более короткий промежуток времени. Второе кинетическое уравнение имеет более сложное решение, его можно использовать при решении краевых задач о движении раствора и в зависимости от скорости перемешивания и температуры получить изменение концентрации первичного продукта разложения.

Первое кинетическое уравнение вида

$$\frac{dx}{dt} = -kx \quad (1)$$

оказалось удобным для применения в лабораторной практике. Методика определения константы скорости реакции биокаталитического окисления парацетамола k позволяет получить устойчивые результаты, совпадающие с данными экспериментальных исследований [2]. В связи с этим с целью интенсификации процесса биодеструкции парацетамола использовалось именно это кинетическое уравнение.

По данным авторов, наибольшее влияние на скорость и полноту процесса биодеструкции парацетамола в лабораторных условиях оказывают температура инкубации родококков (T , °C) и угловая скорость орбитального вращения жидкости в шейкере (n , об/мин). Для изучения зависимости k от указанных технологических параметров была поставлена серия экспериментов при различных значениях орбитальной скорости и температуры.

Материалы и методы

Эксперименты по биодеструкции парацетамола проводили в условиях периодического культивирования родококков в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на лабораторных шейкерах при температуре 18, 28, 35°C и орбитальной угловой скорости вращения жидкости 160 и 200 об/мин. Пределы изменения орбитальной угловой скорости связаны с возможностями лабораторного шейкера и недостаточным перемешиванием культуральной жидкости при скорости вращения менее 160 об/мин. Температура инкубации ниже 18°C не позволяет провести полную биодеструкцию парацетамола из-за низкой активности бактерий. При $T > 40^\circ\text{C}$ наступает предел выживаемости микроорганизмов. В виду практической направленности работы верхний предел температуры был снижен до 35°C с целью будущего технологического запаса при проведении процесса в промышленных условиях. В связи с этим технологические ограничения имеют вид:

$$n \geq 160 \text{ об/мин}, \quad 18^\circ\text{C} \leq T \leq 35^\circ\text{C}. \quad (2)$$

Продолжительность экспериментов составляла 8 суток. В работе использовали наиболее активный штамм (семейство) *R. ruber* ИЭГМ – Институт экологии и генетики микроорганизмов – 77, предварительно отобранный путем скрининга (отбора наиболее активных штаммов микроорганизмов) из 79 штаммов актинобактерий, поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (ИЭГМ, <http://www.iegm.ru/iegmcol>).

С целью активизации оксигеназ (ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные процессы) бактериальные клетки до начала процесса биодеструкции выращивали в минеральной среде [3] в присутствии 0,1% фенола. О

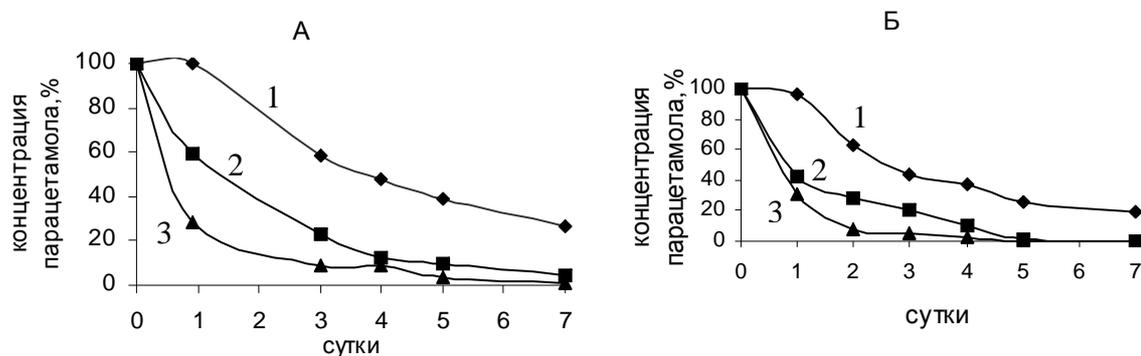


Рис. 1. Изменение содержания парацетамола в процессе биодеструкции клетками *R. ruber* ИЭГМ 77 при температуре 18°C (1), 28°C (2), 35°C (3) и орбитальной угловой скорости вращения шейкера 160 об/мин (А) и 200 об/мин (Б)

скорости процесса биодegradации парацетамола судили по степени убыли парацетамола из среды культивирования актинобактерий, регистрируемой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [1].

Для перехода к полупромышленной (а далее к промышленной) установке (ферментеру) возникла необходимость поставить в соответствие орбитальную скорость вращения жидкости платформы шейкера и угловую скорость мешалки в ферментере. С этой целью экспериментально была определена окружная скорость вращения жидкости.

Орбитальную угловую скорость вращения жидкости в колбе определяли с помощью видеосъемки верхнего слоя жидкости в разных точках. Угловую скорость вращения мешалки в ферментере определяли по величине «размазывания» при съемке посторонней частицы цифровой камерой с известной выдержкой. Значения окружной скорости рассчитывали по формуле $\frac{\Delta l}{\Delta t} = v$. Об интенсивности перемешивания жидкости в колбе и ферментере судили по времени достижения однородного окрашивания жидкости после введения в колбу и ферментер определенного объема раствора метиленового голубого, содержащего соответствующее количество красителя. Интенсивность перемешивания определяли величиной, обратной времени перемешивания:

$$I_{\text{пер}} = 1/t_{\text{пер}} [\text{с}^{-1}]. \quad (3)$$

Константу скорости реакции рассчитывали по методике, описанной в работе [2] (k , 1/сут), а также получали путем обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов ($k_{\text{ср}}$, 1/сут).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований показали, что скорость процесса биодеструкции парацетамола увеличивается с увеличением орбитальной скорости вращения шейкера и температуры среды инкубации родококков (рис. 1). При $n = 160$ об/мин и $T = 35^\circ\text{C}$ парацетамол полностью исчезает из среды инкубации за 7 суток (рис. 1А), в то время как при $n = 200$ об/мин и $T = 35^\circ\text{C}$ – за 5 суток испытаний (рис. 1Б).

Предложенное кинетическое уравнение адекватно описывает процесс биодеструкции парацетамола, проведенный в указанных условиях (рис. 2).

Расчетные значения k хорошо коррелируют с экспериментальными данными ($k_{\text{ср}}$), обработанными по методу наименьших квадратов (табл. 1).

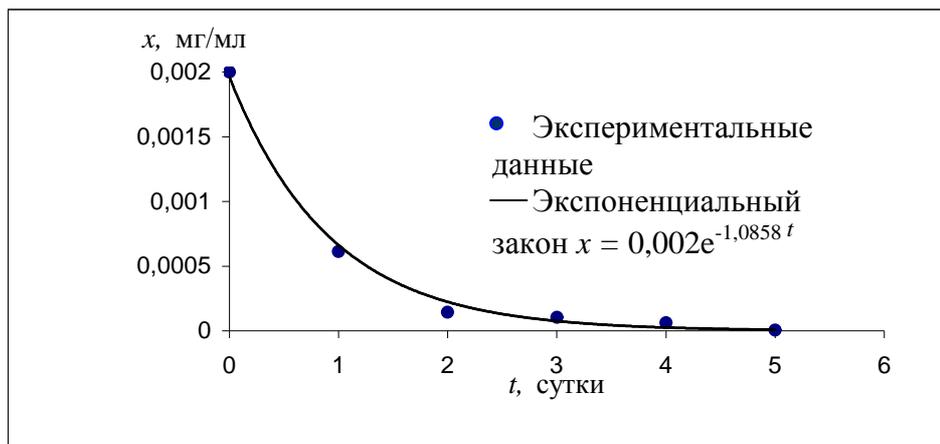


Рис. 2. Зависимость концентрации парацетамола от времени в процессе биодеструкции клетками *R. ruber* ИЭГМ 77 при $n=200$ об/мин и $T=35^{\circ}\text{C}$.

Таблица 1

Расчетные и экспериментальные (средние) значения k						
$T, ^{\circ}\text{C}$	18		28		35	
$n, \text{об/мин}$	160	200	160	200	160	200
$\omega, \text{рад/с}$	16,75	20,93	16,75	20,93	16,75	20,93
$x, [\text{г/мл}]$	0,0005352	0,0005224	0,0000826	0,0000232	0,0000142	0,0000042
x_0/x	3,74	3,83	24,21	86,21	140,85	476,19
$\ln x_0/x$	1,32	1,34	3,19	4,46	4,94	6,17
$k, 1/\text{сут}$	0,187	0,269	0,455	0,891	0,707	1,233
$k_{\text{ср}}, 1/\text{сут}$	0,201	0,255	0,458	0,765	0,649	1,086

Ранее было показано, что с увеличением коэффициента k уменьшается продолжительность процесса биодеструкции парацетамола [2]. Следовательно, в качестве целевой функции можно выбрать зависимость k от технологических параметров

$$k = f(n, T). \tag{4}$$

Задача оптимизации примет вид: найти $\max k(n, T)$ при ограничениях типа неравенств на технологические параметры

$$160 \text{ об/мин} \leq n \leq 200 \text{ об/мин}; 18^{\circ}\text{C} \leq T \leq 35^{\circ}\text{C}. \tag{5}$$

В виду того, что параметров оптимизации всего два, целесообразно найти оптимальное решение графически (рис. 3).

На рис. 3 параметры T и n образуют горизонтальную плоскость, а ось k – перпендикулярна плоскости. Штриховкой на горизонтальной плоскости показаны технологические ограничения на орбитальную угловую скорость и температуру среды инкубации родококков. Коэффициент k имеет явную тенденцию к увеличению с повышением температуры и скорости перемешивания. Максимальное значение k находится на границе допустимой области по температуре и имеет тенденцию роста при этой температуре в сторону увеличения скорости перемешивания. В условиях эксперимента $k_{\text{max}} = 1,233 \text{ сут}^{-1}$ при $T = 35^{\circ}\text{C}$ и $n = 200 \text{ об/мин}$.

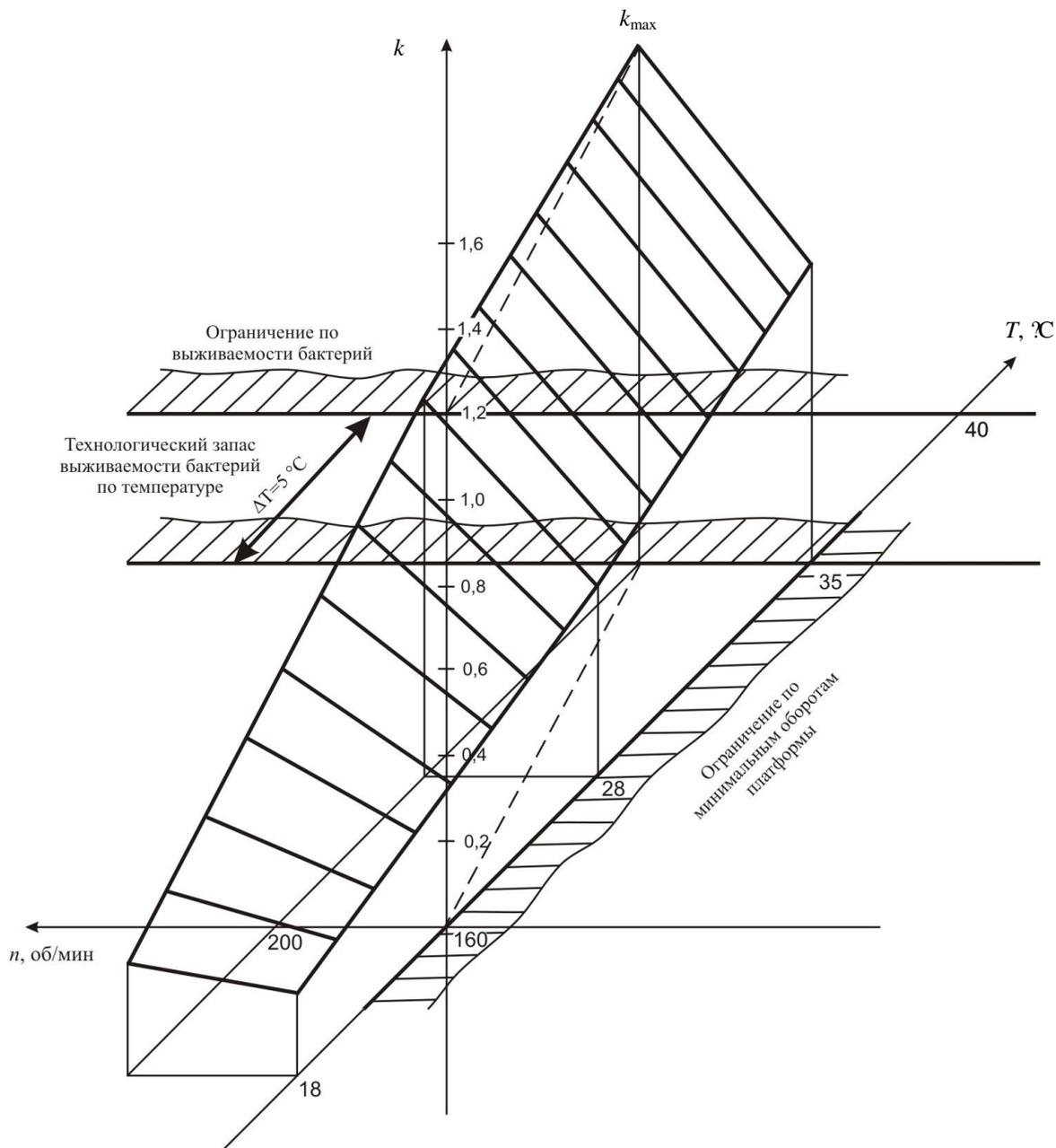


Рис. 3. Зависимость константы скорости реакции k биокаталитического окисления парацетамола клетками *R. ruber* ИЭГМ 77 от орбитальной угловой скорости вращения шейкера и температуры среды инкубации родококков

Полученное решение задачи оптимизации процесса биодеструкции парацетамола было использовано для перехода к универсальным характеристикам параметров процесса: температуре и скорости перемешивания культуральной жидкости. После определения этих характеристик возможен переход к реальным управляющим технологическими параметрами для проведения процесса в полупромышленных и промышленных условиях. Это обусловлено тем, что температуру в полупромышленной установке (ферментере) (рис. 4) можно привести в соответствие с температурой в лабораторной установке – шейкере (рис. 5), а переход от орбитальной угловой скорости в шейкере к эквивалентной угловой скорости вращения мешалки в ферментере представляется возможным либо через скорость, либо через время перемешивания культуральной жидкости.



Рис. 4. Автоматизированная система «Фермакс - 3» (ферментер)



Рис. 5. Инкубационный шейкер CERTOMAT IS

Таблица 2

Результаты определения скорости движения, времени перемешивания и интенсивности перемешивания жидкости в колбе (1) и ферментере (2)

Скорость вращения шейкера и мешалки ферментера, об/мин	Скорость движения жидкости, м/с		Время перемешивания жидкости, с		Интенсивность перемешивания, с ⁻¹	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
160	0,64	0,17	3,0	1,0	0,33	1,00
200	0,85	0,23	2,5	0,7	0,40	1,43
240	1,10	0,33	2,0	0,5	0,50	2,00

Как видно из табл. 2, экспериментально полученные значения скорости движения жидкости в колбе и ферментере не изменяются строго пропорционально с изменением скорости вращения, однако сохраняют рост с ее увеличением. Этот факт объясняется различным характером движения жидкости в колбе и ферментере. В колбе происходит вращение слоев жидкости, то есть циркуляционное движение по окружности. В ферментере наряду с окружным движением слоев жидкости происходит их перемещение в вертикальном направлении, что улучшает перемешивание жидкости.

Таким образом, полученные данные по скорости движения жидкости в колбе и ферментере не отражают скорости перемешивания жидкости. В связи с этим предложено использовать вместо скорости перемешивания жидкости интенсивность перемешивания $I_{пер}$, которая определяется по времени перемешивания. Время перемешивания жидкости в колбе в 3–4 раза больше, чем в ферментере.

Результаты исследования показывают, что чем меньше время перемешивания, тем больше как скорость, так и интенсивность перемешивания жидкости. Следовательно, интенсивность перемешивания отражает скорость перемешивания жидкости. Отсюда появляется возможность связать технические характеристики шейкера и ферментера (орбитальную и угловую скорости) посредством интенсивности перемешивания жидкости.

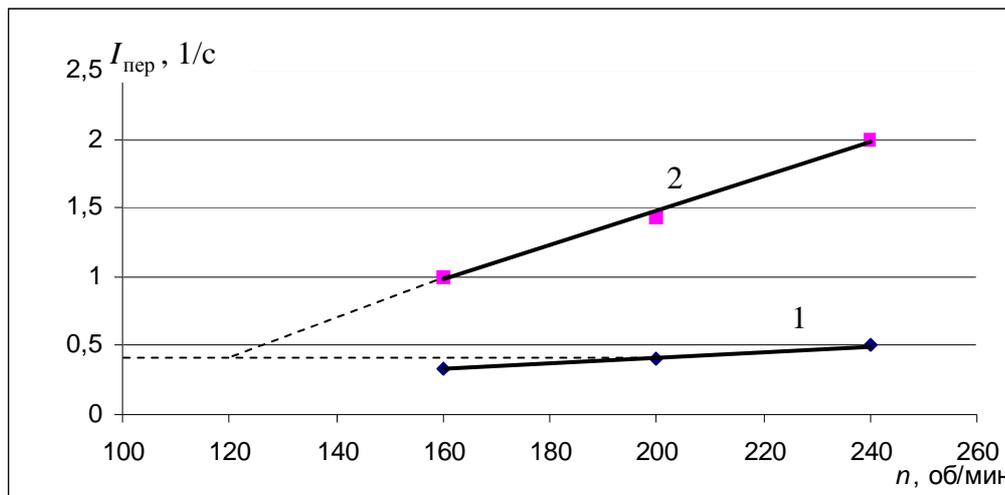


Рис. 6. Зависимость интенсивности перемешивания жидкости в колбе (1) и ферментере (2) от скорости вращения шейкера и мешалки ферментера.

Для реализации оптимального значения $k_{\max} = 1,233 \text{ сут}^{-1}$ при $T = 35^{\circ}\text{C}$ и $n = 200 \text{ об/мин}$ в лабораторных условиях необходима интенсивность перемешивания $I_{\text{пер}} = 0,5 \text{ с}^{-1}$ (рис. 6). Аппроксимируя кривую 2 на рис. 6 прямой, в силу линейности до оптимальной интенсивности перемешивания в колбе (шейкере), находим значение $n = 120 \text{ об/мин}$. Это значение можно считать начальной точкой угловой скорости вращения мешалки в ферментере при проведении процесса в полупромышленных условиях. Начальная температура при этом составляет $T = 28^{\circ}\text{C}$. Найденные технологические параметры являются начальным приближением для отработки технологии процесса биодеструкции парацетамола в полупромышленных условиях.

Заключение

Установлена зависимость константы скорости реакции биокаталитического окисления парацетамола от технологических параметров процесса: температуры инкубации родококков и орбитальной скорости движения шейкера. Получено решение задачи оптимизации процесса биодеструкции парацетамола в лабораторных условиях. Определены начальные значения технологических параметров (температуры и угловой скорости вращения мешалки ферментера) для проведения процесса в полупромышленных условиях.

Благодарности

Исследования поддержаны грантами РФФИ 04-04-96057, 07-04-96038.

Список литературы

1. *Ившина, И.Б.* Дegrаdация парацетамола с истекшим сроком годности свободными клетками актинобактерий / И.Б. Ившина, М.И. Рычкова, Е.В. Вихарева, Л.А. Чекрышкина, И.И. Мишенина // Катализ в промышленности. – 2006. – № 2. – С. 44–49.
2. *Вихарева, Е.В.* Кинетическая схема процесса биодеструкции парацетамола с истекшим сроком годности / Е.В. Вихарева, А.А. Селянинов, Ю.И. Няшин, И.Б. Ившина // Российский журнал биомеханики. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 72–79.
3. *Ivshina, I.B.* Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, J.C. Philp, N. Christofi // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 14. – P. 307–312.

MATHEMATICAL MODELLING OF PARACETAMOL BIODEGRADATION PROCESS BY THE GENUS RHODOCOCCLUS ACTINOBACTERIA

E.V. Vikhareva, A.A. Selyaninov, I.B. Ivshina, Y.I. Nyashin (Perm, Russia)

The reaction rate constant of paracetamol biocatalytic oxidation was found to be related to the process-dependent parameters, i.e. temperature of rhodococci incubation and movement rate of a rotary shaker. The correlation was achieved between the results obtained using a theoretical kinetic equation and the experimental data. The formulated kinetic equation proved to be useful for intensification of paracetamol biodegradation process. The obtained task solution allows attempting typical process-related parameters (temperature and peripheral fluid velocity in a laboratory set-up) and workable process-dependent parameters under pilot-plant conditions.

Key words: paracetamol, biological degradation, rhodococci, kinetic equation, reaction rate, constant, process-dependent parameters.

Получено 20 июня 2007