

УДК 579.2+579.6

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОДЕСТРУКЦИИ НЕПРИГОДНЫХ К МЕДИЦИНСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЛА

И.Б. Ившина<sup>a,b</sup>, М.И. Рычкова<sup>b</sup>, Е.В. Вихарева<sup>c</sup>, Т.А. Нечеухина<sup>a</sup>, А.А. Селянинов<sup>d</sup><sup>a</sup> Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15<sup>b</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13<sup>c</sup> Пермская государственная фармацевтическая академия, 614990, Пермь, ул. Ленина, 48<sup>d</sup> Пермский государственный технический университет, 614990, Пермь, Комсомольский проспект, 29

На примере парацетамола подтверждена возможность использования актинобактерий рода *Rhodococcus* для биodeградации лекарственных средств, содержащих в своей структуре фенольную гидроксильную группу. Исследовано влияние вспомогательных веществ (крахмала, талька, стеариновой кислоты, поливинилпирролидона), входящих в состав таблеток парацетамола, на процесс его биоконверсии клетками родококков. Установлено, что поливинилпирролидон и стеариновая кислота используются бактериальными клетками в качестве дополнительных источников углерода и энергии. Показана возможность применения родококков, иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта, для интенсификации процесса биodeградации парацетамола. Выявлена зависимость константы скорости реакции биокаталитического окисления парацетамола от технологических параметров процесса - температуры инкубации родококков и скорости движения орбитального шейкера. Достигнуто соответствие результатов, полученных по теоретическому кинетическому уравнению, с экспериментальными данными. Полученное решение задачи оптимизации процесса биodeструкции парацетамола позволяет перейти к оценке характерных параметров процесса (температура и окружная скорость движения жидкости в лабораторной установке) и организации управления технологическим процессом в полупромышленных условиях.

В последние годы в России четко обозначилась проблема утилизации непригодных к медицинскому использованию лекарственных средств – фальсифицированных, бракованных, с истекшим сроком годности и утративших потребительские качества из-за неправильного хранения или транспортировки. Все непригодные к медицинскому использованию лекарственные средства относятся к опасным отходам и подлежат обязательному уничтожению (Приказ МЗ РФ N. 382 от 15.12.2002). Однако рекомендуемые методы их уничтожения (слив в промышленную канализацию, сжигание и захоронение на свалках) не являются экологически безопасными. Сегодня приоритет по показателям эффективности, безопасности и экономичности признается за биотехнологическими способами утилизации опасных отходов.

Основу многих лекарств составляют органические соединения, содержащие в молекуле фенольную гидроксильную группу. Для прямого окисления данных органических субстратов перспективно использование микроорганизмов, обладающих активностью оксигеназ, в частности актинобактерий рода *Rhodococcus*. В Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН создана наиболее полная в России и за рубежом коллекция чистых идентифицированных непатогенных культур родококков (Ivshina, 2001). В ранних работах авторов (Ившина и др., 1995, 2006) показана возможность использования актинобактерий рода *Rhodococcus* для биodeградации лекарственных средств, содержащих фенольную гидроксильную группу, на примере парацетамола.

Цель настоящего исследования – оптимизация и теоретическая оценка

основных параметров процесса биодegradации парацетамола с использованием актинобактерий рода *Rhodococcus*.

### Материалы и методы

В работе использовали парацетамол в виде фармацевтической субстанции производства Ирбитского ХФЗ и таблеток (ЗАО «Медисорб», г. Пермь), содержащих 0,2 г парацетамола и 10% вспомогательных веществ (крахмал, тальк, поливинилпирролидон и стеариновая кислота). В качестве биодеструктора использовали штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 767 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, [www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html](http://www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html)).

Посевным материалом служила 3-суточная культура в концентрации  $10^7$  клеток/мл, предварительно выращенная в присутствии фенола с целью индукции оксигеназ. Имобилизацию осуществляли путем внесения бактериальной взвеси в раствор поливинилового спирта в соотношении 1:2. Биодegradацию парацетамола проводили в минеральной среде «*Rhodococcus surfactant*» (Ившина и др., 2006) при 28 и 35<sup>0</sup> С с использованием орбитального шейкера (160 и 200 об/мин).

Содержание парацетамола определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа модели HP-1090 (США) с использованием колонки ZORBAX Extend-C18 (4,6x250 мм). Качественный состав продуктов

биотрансформации анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Силуфол» (Sigma-Aldrich, США). Содержание первичного метаболита *p*-аминофенола определяли с помощью спектрофотометра типа Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 450 нм. Учет бактериальных клеток проводили методом точечных высевов на чашки Петри (Веслополова, 1995). Исследования проводили в 3-8-кратных повторностях. Обработку полученных данных осуществляли с помощью компьютерных программ Excel, Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждения

Как видно из рис. 1, полная биодegradация парацетамола в виде фармацевтической субстанции составляет 72 ч, в виде целых таблеток – 24 ч. Разница в продолжительности процесса биодеструкции парацетамола в зависимости от используемых лекарственных форм, вероятно, объясняется присутствием в составе таблеток парацетамола вспомогательных веществ: поливинилпирролидона (ПВП), талька, стеариновой кислоты и крахмала. Ростовые эксперименты по использованию вспомогательных веществ в качестве единственного источника углерода показали, что наиболее активно используются родококками ПВП и стеариновая кислота (таблица).

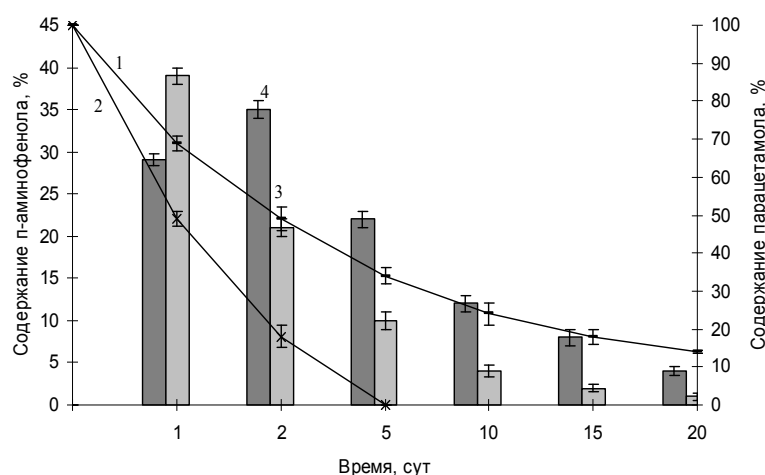


Рис. 1. Динамика убывания парацетамола (1, 2) и *p*-аминофенола (3, 4) в виде фармацевтической субстанции (1, 3) и таблеток (2, 4) в процессе биодegradации

Таблица 1

**Динамика численности клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 767 в присутствии вспомогательных веществ, входящих в состав таблеток парацетамола**

Время, сут	Вспомогательное вещество	Количество клеток/мл
0	Стеариновая кислота	$(2,70 \pm 0,17) \times 10^7$
	Крахмал	$(4,37 \pm 0,20) \times 10^7$
	Тальк	$(2,54 \pm 0,19) \times 10^7$
	ПВП	$(3,61 \pm 0,32) \times 10^7$
5	Стеариновая кислота	$(3,86 \pm 0,19) \times 10^9$
	Крахмал	$(1,38 \pm 0,11) \times 10^8$
	Тальк	$(2,49 \pm 0,08) \times 10^8$
	ПВП	$(2,23 \pm 0,15) \times 10^9$
7	Стеариновая кислота	$(4,27 \pm 0,02) \times 10^{10}$
	Крахмал	$(1,20 \pm 0,11) \times 10^8$
	Тальк	$(1,45 \pm 0,12) \times 10^8$
	ПВП	$(2,46 \pm 0,16) \times 10^{10}$

По нашим данным, содержание *p*-аминофенола достигает максимального значения на 12-14-й ч эксперимента, а затем количество его снижается. Другие метаболиты (пирокатехин, гидрохинон, бензохинон) регистрируются на 1-3-и сут эксперимента.

Как видно из рис. 2, использование иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта клеток родококков, предварительно адаптированных к фенолу, позволяет существенно сократить продолжительность процесса биодеструкции парацетамола до 14 и 24 ч в случае использования его в виде субстанции и таблеток соответственно. Следует отметить, что процесс биодеструкции парацетамола в виде таблеток при

использовании иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта клеток родококков происходит значительно медленнее (24 ч) по сравнению с процессом биодеструкции парацетамола в виде субстанции (14 ч). Данный факт можно объяснить взаимодействием поливинилового спирта с ПВП. Химическое взаимодействие носителя и вспомогательного вещества таблеток замедляет процесс. При этом максимальное содержание *p*-аминофенола при биодеструкции парацетамола в виде субстанции иммобилизованными клетками регистрируется через 12 ч, а при использовании парацетамола в виде таблеток через 22 ч.

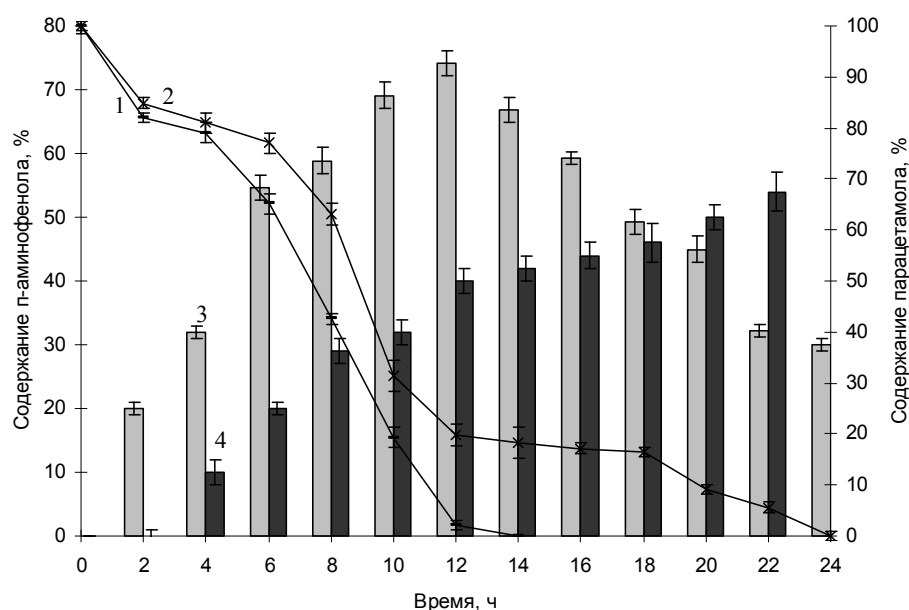


Рис. 2. Динамика убыви парацетамола (1, 2) и *p*-аминофенола (3, 4) в процессе биодеструкции в виде фармацевтической субстанции (1, 3) и таблеток (2, 4) клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 767, иммобилизованными в криогеле поливинилового спирта.

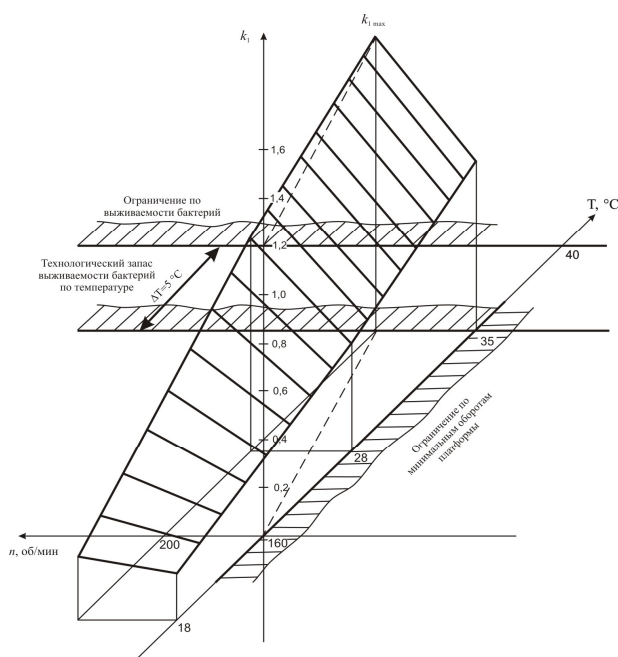


Рис. 3. Зависимость константы скорости реакции  $k_1$  биокаталитического окисления парацетамола клетками родококков от орбитальной скорости вращения шейкера и температуры среды инкубации родококков

На основании полученных данных по изменению содержания парацетамола во времени разработана кинетическая схема процесса биодеструкции парацетамола. Предложены кинетические уравнения

$$\frac{dx}{dt} = -k_1 x, \quad (1)$$

$$\frac{dx}{dt} = -k_2 \frac{x}{y} = -k_2 \frac{x}{x_0 - x}, \quad (2)$$

где  $x_0$ ,  $x$  – начальная и текущая концентрации парацетамола;  $y = x_0 - x$  – концентрация  $n$ -аминофенола;  $k_1$ ,  $k_2$  – константы скорости реакции (определены экспериментально).

Для определения технологических параметров, необходимых для перехода к процессу биодеструкции парацетамола в полупромышленных условиях, использовали кинетическое уравнение (1), поскольку оно оказалось более удобным для применения в лабораторной практике. По нашим данным, наибольшее влияние на скорость и полноту биодеструкции парацетамола оказывают температура инкубации родококков и скорость орбитального вращения в шейкере. Ввиду того, что параметров оптимизации всего два, целесообразно было найти оптимальное решение графически (рис. 3). Коэффициент  $k_1$  имеет явную тенденцию к увеличению по мере повышения температуры и скорости перемешивания. Максимальное значение  $k_1$  ( $k_{1 \max} = 1,233 \text{ сут}^{-1}$ ) находится на границе допустимой области по температуре ( $T = 35^\circ\text{C}$ ) и имеет тенденцию роста при этой температуре в сторону увеличения скорости перемешивания ( $n = 200 \text{ об/мин}$ ). Теоретические данные полностью

совпадают с данными, полученными экспериментальным путем. Достигнутое решение задачи оптимизации процесса биодеструкции парацетамола позволяет перейти к оценке характерных параметров процесса (температура и окружная скорость движения жидкости в лабораторной установке) и организации управления технологическим процессом в полупромышленных условиях.

### Заключение

Установлено, что присутствие стеариновой кислоты и поливинилпирролидона, входящих в состав таблеток парацетамола в качестве вспомогательных веществ, ускоряет процесс биодegradации парацетамола свободными клетками родококков. Выявлена 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.

Исследования поддержаны грантами Президента РФ "Ведущие научные школы" № НШ-4112.2008.4, Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и РФФИ № 07-04-96038-р\_Урал\_a.

**Библиографический список**

- Веслополова Е.М. Микрометод определения численности колонеобразующих единиц микроорганизмов / Е.М. Веслополова // Микробиология. 1995. Т. 64, вып. 2. С. 279-284.
- Ившина И.Б. Деградация 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.
- Ившина И.Б. Алканотрофные родококки как катализаторы процесса биодеструкции непригодных к использованию лекарственных средств / И.Б. Ившина и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42, № 4. С. 443-447.
- Ivshina I.B. Operation and establishment of a Russian biological resource centre / I.B. Ivshina // *WFCC Newsletter*. 2001. № 33. P. 8-14.

Поступила в редакцию 21.05.2009

**Optimization of biodestruction of unsound phenol-derived drugs**

I.B. Ivshina, M.I. Richkova, E.V. Vikhareva, T.A. Necheukhina, A.A. Selyaninov

Possible use of the genus *Rhodococcus* actinobacteria for biodegradation of phenol hydroxyl-based drugs was confirmed as exemplified by paracetamol biodegradation studies. The additives (starch, talc, stearic acid, polyvinyl pyrrolidone) in a paracetamol formulation were studied with regard to their effects on paracetamol bioconversion by *Rhodococcus* cells. It was observed that rhodococci utilized polyvinyl pyrrolidone and stearic acid as additional carbon and energy sources. Rhodococci cells immobilized in polyvinyl alcohol cryogel proved to be useful for intensification of paracetamol biodegradation process. Relationship between the reaction rate constant of biocatalytic paracetamol oxidation and the process characteristics (incubation temperature of *Rhodococcus* cells and speed of the orbital shaker) were determined. The experimental data were consistent with the theoretical results obtained using a kinetic equation. The optimization of the paracetamol biodegradation process was achieved, and this allows studying specific process characteristics (temperature and the peripheral liquid speed in the laboratory setup) and the real regulating parameters to perform the commercial prototype process.