

ANÁLISE SISTEMÁTICA APLICADA A PROCESSOS DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA DO AMIDO EM ETANOL, UTILIZANDO MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

APPLICATION OF SYSTEM ANALYSIS TO THE PROCESS OF SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF STARCH TO ETHANOL UTILIZING GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISMS

Maicon Charles de Araujo Tait, Aparecido Nivaldo Módenes e Alexander Dimitrov Kroumov

Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Campus de Toledo
Núcleo de Biotecnologia e Desenvolvimento de Processos Químicos
Rua da Faculdade, 645, Jardim La Salle
85903-000-Toledo – PR – Brasil
E-mail: adkroumov@unioeste.br

ABSTRACT

The instability of the market of the petroleum raises the importance of research of alternative production processes of renewable liquid fuels. The production of ethanol by fermentation, using starch as substrate, has been studied intensively in the last years, resulting in a simultaneous process of saccharification and fermentation of the starch to ethanol using modified microorganisms. The objective of this work was to develop a mathematical model for the direct bioconversion of starch to ethanol being used *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G strain that secreted a bifunctional protein with enzymatic activity of the *B. subtilis* alpha-amylase and the *A. awamori* glucoamylase. The modeling strategy consisted of dividing the process in two hierarchic levels of knowledge that would be studied separately, and later unified through the glucose balance, and enzymes synthesis balance. The model was validated with the experimental data and was compared with cybernetic modeling results for the same system.

Keywords: Ethanol, Simultaneous saccharification and fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G, System analysis.

RESUMO

A instabilidade do mercado do petróleo releva a importância de pesquisa de processos alternativos de produção de combustíveis líquidos renováveis. A produção de etanol por via fermentativa, utilizando amido como matéria prima, tem sido estudado intensivamente nos últimos anos, resultando em um processo simultâneo de sacarificação e fermentação do amido em etanol utilizando microorganismos modificados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo matemático da bioconversão direta do amido em etanol utilizando a cepa *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G, que secreta uma proteína bifuncional com atividade enzimática do *B. subtilis* alfa-amilase e do *A. awamori* glucoamilase. A estratégia de modelagem consistiu em dividir o processo em dois níveis hierárquicos do conhecimento, que seriam modelados separadamente, e posteriormente unificados através do balanço de glicose e balanço e síntese de enzimas. O modelo foi validado com os dados experimentais e foi comparado com resultados do modelo cibernético para o mesmo sistema.

Palavras-chave: Etanol, Sacarificação e fermentação simultânea, *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G, Análise sistemática

1 - INTRODUÇÃO

O potencial agrícola brasileiro é indiscutível, entretanto os recursos naturais renováveis, especialmente os materiais amiláceos, não são utilizados em grande escala na produção de etanol como fonte de energia (MIELENZ, 2001). A dificuldade deste processo é a necessidade de se realizar a hidrólise da matéria prima, incluindo o amido, para a transformação em produtos fermentescíveis. Uma alternativa para a produção de etanol a partir do amido é a utilização do processo de sacarificação e fermentação simultânea (SFS) em etanol, o qual se tornou possível, devido aos avanços da engenharia genética, modificar os microorganismos tornando-os capazes de secretar as enzimas necessárias à sacarificação e, capazes também, de fermentar a glicose em etanol (ALTINTAS *et.al.*, 2002a;

BIROL *et.al.*, 1998a). O grande desafio atual é modelar e otimizar este processo para que se torne economicamente viável e possível industrialmente. A modelagem cibernética, que é sofisticada e eficiente quando se utiliza múltiplos substratos, foi aplicada ao processo de sacarificação e fermentação (ALTINTAS *et.al.*, 2002b; KOMPALA *et.al.*, 1984; KOMPALA *et.al.*, 1986), entretanto, algumas hipóteses requerem avaliação. O objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo matemático não estrutural do processo de SFS do amido em etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G, o qual secreta uma proteína bifuncional, que tem em sua base a atividade enzimática do *B. subtilis* alfa-amilase e do *A. awamori* glucoamilase. Será utilizado a análise sistemática que é eficiente em sistemas complexos, onde

aplicando princípios de decomposição pode-se analisar o sistema em subníveis do conhecimento.

2 – DESENVOLVIMENTO DO MODELO

Neste trabalho utilizou-se os dados experimentais do processo de bioconversão direta do amido em etanol por *S. cerevisiae* YPB-G, apresentados na literatura (ALTINTAS *et.al*, 2002b), no desenvolvimento de um modelo matemático não estrutural, avaliado através de dois níveis hierárquicos do conhecimento. O modelo proposto descreve as seguintes propriedades fisiológicas da levedura modificada geneticamente: dinâmica da degradação enzimática do amido, acúmulo e utilização da glicose, características do crescimento da biomassa e produção do etanol no processo SFS. A dinâmica de secreção das enzimas e a estabilidade dos plasmídios não são consideradas.

A estratégia de modelagem consistiu em dividir o modelo em dois níveis hierárquicos do conhecimento, ver Figura 1. Os processos de hidrólise do amido e fermentação da glicose são conhecidos e foram modelados, inicialmente, estes dois processos em separado. Estes níveis hierárquicos do conhecimento foram unificados posteriormente, através do balanço de glicose e balanço e síntese de enzimas.

A avaliação das hipóteses deste modelo foram feitas através dos dados experimentais, além da comparação deste novo modelo com os resultados da modelagem cibernética para este mesmo sistema.

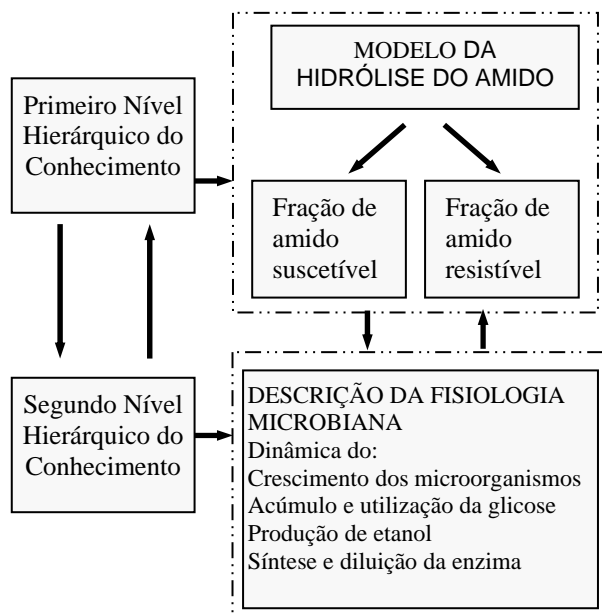


Figura 1 - Representação da estratégia de modelagem em dois níveis do conhecimento

2.1. Primeiro nível hierárquico do conhecimento

O primeiro nível hierárquico do conhecimento consiste na hidrólise enzimática do amido, que no processo convencional acontece pela adição de enzimas, tais como alfa-amilase e glucoamilase, no início do processo. Já na SFS as enzimas são secretadas pelo *Saccharomyces*

cerevisiae YPB-G durante a fermentação, portanto a concentração de enzimas é função do tempo.

A maioria das representações razoáveis da estrutura do amido considera-o como duas frações: suscetíveis e resistentes à sacarificação, que corresponderão na reação em dois períodos com taxas diferentes de degradação, observado nos dados experimentais. Outros fenômenos incorporados ao modelo são inibição pelo produto e pelo substrato. Uma descrição matemática do processo de hidrólise do amido como duas frações foi desenvolvido e apresentado em detalhes em Polakovic e Bryjak (2003). Adaptamos este conhecimento para a hidrólise do amido através da proteína bifuncional secretada por *S. cerevisiae* YPB-G, considerando uma enzima chave que tem sua concentração variável no tempo.

O modelo cinético da hidrólise enzimática é descrito a seguir:

Taxa de degradação da fração de amido suscetível

$$R_{sus} = \frac{K_{sus} * Enz(t) * S_{sus}(t)}{K_m * \left(I + \frac{Glu(t)}{K_{glu}} \right) + \frac{S_{sus}(t)^2}{K_{starch}} + S_{sus}(t) + S_{res}(t)} \quad (1)$$

Taxa de degradação da fração de amido resistível

$$R_{res} = \frac{K_{res} * Enz(t) * S_{res}(t)}{K_m * \left(I + \frac{Glu(t)}{K_{glu}} \right) + \frac{S_{res}(t)^2}{K_{starch}} + S_{sus}(t) + S_{res}(t)} \quad (2)$$

Balanço de massa das frações de amido suscetível e resistível

$$\frac{dS_{sus}(t)}{dt} = -R_{sus} \quad (3)$$

$$\frac{dS_{res}(t)}{dt} = -R_{res} \quad (4)$$

Balanço da degradação do amido total

$$\frac{dS_{total}(t)}{dt} = \frac{dS_{sus}(t)}{dt} + \frac{dS_{res}(t)}{dt} \quad (5)$$

Balanço da glicose produzida durante a degradação do amido

$$\frac{dGlu(t)}{dt} = 1.111 * (R_{sus} + R_{res}) \quad (6)$$

Considerações do modelo quanto a sacarificação do amido por uma enzima chave aditiva:

1. O modelo considera a atividade enzimática como uma ação aditiva no processo de sacarificação do amido (soma das atividades da glucoamilase e alfa-amilase durante o processo de secreção por *S. cerevisiae* YPB-G). Considerou-se que a ação de várias enzimas (neste

caso, a ação de duas enzimas) pode ser representada como a ação aditiva de apenas uma enzima.

2. A estrutura do amido pode ser considerada com uma composição de duas frações (resistível e suscetível) com diferentes taxas de degradação.
3. A taxa de hidrólise da fração do amido suscetível depende da concentração das duas frações do amido e esta taxa é inibida pela ação da glicose e concentração da fração do amido suscetível.
4. A taxa de hidrólise da fração do amido resistível depende da concentração das duas frações do amido e esta taxa é inibida pela ação da glicose e a concentração da fração do amido resistível.
5. Limitações de transferência de massa e mudanças conformacionais da estrutura da enzima não são consideradas.

2.2. Segundo nível hierárquico do conhecimento

O segundo nível hierárquico do conhecimento consiste na cinética da população microbiana. Será descrito alguns fenômenos fisiológicos da levedura *S. cerevisiae* YPB-G com formas matemáticas não estruturais simples, apresentadas na literatura (BIROL *et.al.*, 1998b; MONOD, 1949; ANDREWS, 1968). Assumi-se que a taxa de crescimento específico da levedura modificada é influenciada pela glicose e concentração do amido, que pode ser interpretado como um fator de inibição por produtos do amido. Muitos modelos cinéticos foram testados e a análise de sensibilidade mostrou que estes modelos usados ajustam-se melhor aos dados experimentais. A taxa de produção de etanol foi descrita como uma função das concentrações da glicose e etanol. Por outro lado, esta taxa pode ser interpretada como uma função não linear da taxa de crescimento da biomassa, onde dois tipos de inibição por produto estão envolvidos. O modelo da cinética utilizando os balanços de biomassa e etanol é descrito pelas equações (7) a (10).

Taxa de crescimento da biomassa

$$\mu(Glu, S_{total}, S_0) = \frac{\mu_{max} \cdot Glu(t) \cdot \left(\frac{S_{total}(t)}{S_0} \right)}{K_s + Glu(t)} \quad (7)$$

Taxa de produção de etanol

$$q_p(Glu, Et, S_0) = \frac{q_{pmax} \cdot Glu(t) \cdot Et(t) \cdot \left(1 - \frac{Et(t)}{Et_{max}} \right)}{\left(K_{s1} + Glu(t) \right) \left(K_{ps} + Et(t) + \frac{Et(t)^2}{K_{pi}} \right)} \quad (8)$$

Balanço da biomassa

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(Glu, S_{total}, S_0) \cdot X(t) \quad (9)$$

Balanço do etanol

$$\frac{dEt(t)}{dt} = q_p(Glu, Et, S_0) \cdot X(t) + \beta_{Et} \cdot X(t) \quad (10)$$

O modelo da cinética microbiana é flexível e as equações (11) a (13), balanço da glicose, balanço e síntese de enzima, unificam o primeiro e o segundo nível do conhecimento, mostrando a dinâmica de formação e utilização da glicose e o processo de formação das enzimas para a hidrólise do amido. Estas equações são escritas a seguir:

Balanço da glicose

$$\frac{dGlu(t)}{dt} = 1.111 \cdot (R_{sus} + R_{res}) - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX(t)}{dt} - \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{dEt(t)}{dt} \quad (11)$$

Taxa de síntese de enzima

$$R_{enz} = \frac{(\mu_{max} + \beta) \cdot Enz_{max} \cdot S_{total}(t)}{K_{enz} + S_{total}(t)} \quad (12)$$

Balanço de enzima

$$\frac{dEnz(t)}{dt} = R_{enz} - \frac{\left(\frac{dX(t)}{dt} \right) \cdot Enz(t)}{X(t)} - \beta \cdot Enz(t) \quad (13)$$

O sistema de equações diferenciais não lineares foi resolvido utilizando o software Maple e diferentes métodos numéricos foram aplicados, como RKF45, "Rosenbrock e lode". O sistema não manifesta um perfil "stiffness" e o método numérico Rosenbrock foi mais utilizado nas simulações computacionais.

2.3. Procedimento de identificação dos parâmetros

A estimativa dos valores dos parâmetros cinéticos e estequiométricos foram obtidos usando os dados experimentais do trabalho dos autores ALTINTAS *et.al.*, (2002b). Todas as concentrações iniciais e os parâmetros estimados estão apresentados abaixo, ver Tabela 1. Inicialmente utilizaram-se valores apresentados na literatura como aproximação inicial para as constantes do modelo, onde determinou-se o intervalo de possibilidades dos valores destes parâmetros. Foi utilizado o método dos mínimos quadrados, com ponderação, como critério estatístico. Diferentes rotinas de estimação foram testadas, incluindo o dialogo gráfico usando o software Maple. Este

procedimento é muito usado de forma educacional para análise de sensibilidade dos parâmetros e avaliação da resposta do sistema. Os dados experimentais (ALTINTAS *et.al*, 2002b) foram plotados juntamente com as simulações do modelo para as mesmas condições iniciais. As estimativas dos valores dos parâmetros foram realizadas com 10% ou menos de variação, dependendo da sensibilidade do sistema através de cada parâmetro.

Tabela 1- Condições iniciais e estimativas das constantes cinéticas

Condições iniciais	SG50	Unidades
Glu_0	3.5	g/L
S_0	42.5	g/L
X_0	0.1	g/L
Et_0	1.5	g/L
Enz_0	0.001	U/L
Constantes cinéticas	SG50	Unidades
K_{sus}	0.057	h^{-1}
K_{res}	0.00618	h^{-1}
K_{starch}	62.7	g/L
K_{glu}	1.22	g/L
K_m	0.406	g/L
per	0.617	[-]
μ_{max}	0.15	h^{-1}
$Y_{x/s}$	0.14	g/g
K_s	1.08	[-]
Et_{max}	15	g/L
$q_{p,max}$	0.129	h^{-1}
$Y_{p/s}$	0.376	g/g
K_{s1}	0.154	g/L
K_{ps}	4.67	g/L
K_{pi}	3.65	g/L
β	0.05	h^{-1}
K_{enz}	1	g/L
enz_{max}	6.05	U/L
β_{Et}	0.022	h^{-1}

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo matemático desenvolvido foi aplicado a diferentes condições iniciais, entretanto será mostrado neste trabalho apenas um caso. O interesse deste trabalho não é apenas modelar o processo em particular, mas mostrar que a utilização de análise sistemática para sistemas complexos é eficiente e pode auxiliar em outros processos de SFS utilizando outros microorganismos (KOBAYASHI e NAKAMURA, 2004a; KOBAYASHI e NAKAMURA, 2004b; ÜLGEN *et.al*, 2002). Para tanto, o segundo nível hierárquico requer maior atenção, podendo-se utilizar outros modelos cinéticos para representar os efeitos de inibição e limitação por substrato e produto.

Pode-se observar, ver Figura 2, que o modelo ajusta com eficiência os dados experimentais da degradação do amido no primeiro nível hierárquico, validando as considerações quanto a estrutura do amido e concentração da enzima chave como função do tempo.

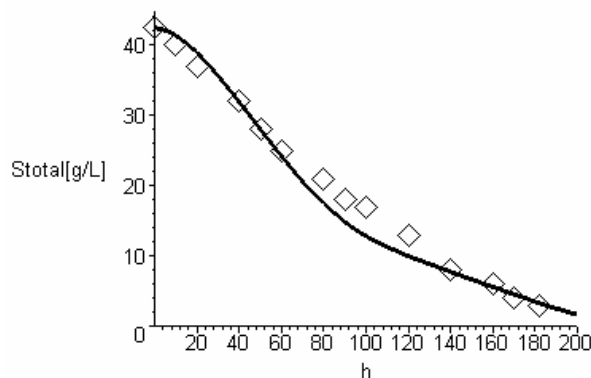


Figura 2 - Comparação entre o perfil de concentração de amido do modelo desenvolvido com dados experimentais (ALTINTAS *et.al*, 2002b)

Analisando os perfis de concentrações de amido total, suscetível e resistível, ver Figura 3, observa-se que o perfil do amido total é influenciado, até o tempo de 100 horas, principalmente pela fração de amido suscetível, enquanto após este instante, o perfil é totalmente influenciado pelo amido resistível à sacarificação. Por outro lado, a fração de amido suscetível determinará o ponto de mudança acentuada da taxa de degradação, ou seja, o ponto de mudança de inclinação da curva do amido total.

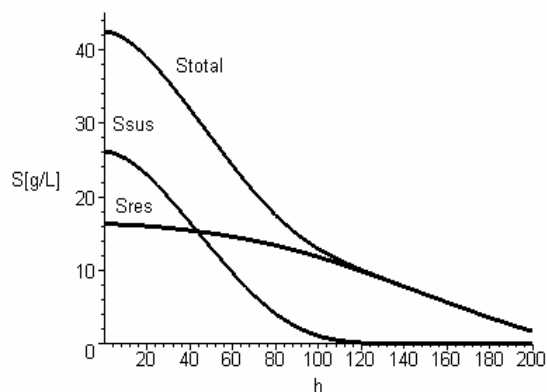


Figura 3 - Relação entre o amido total e as frações de amido suscetível e resistível

O modelo desenvolvido também descreve a concentração de enzimas com relação ao tempo, ver Figura 4, durante o processo SFS.

No segundo nível hierárquico, o modelo se mostrou eficiente e flexível, simulando os perfis experimentais da biomassa, etanol e glicose, ver Figuras 5 a 7. Os perfis da biomassa e do etanol são sempre crescentes, não apresentando o perfil “diauxic growth” nos dados experimentais do microorganismo modificado, considerado na modelagem cibernética (ALTINTAS *et.al*, 2002b), entretanto, o modelo desenvolvido neste trabalho não considera este fenômeno, apresentando bons resultados, ver Figura 5.

Um dos pontos importantes do modelo de crescimento da biomassa é a caracterização dos efeitos de inibição dos produtos do amido sobre a biomassa, representado pela fração de amido total sobre amido inicial. Uma análise

mais precisa de algumas constantes não é possível devido a dispersão dos dados experimentais da concentração da biomassa.

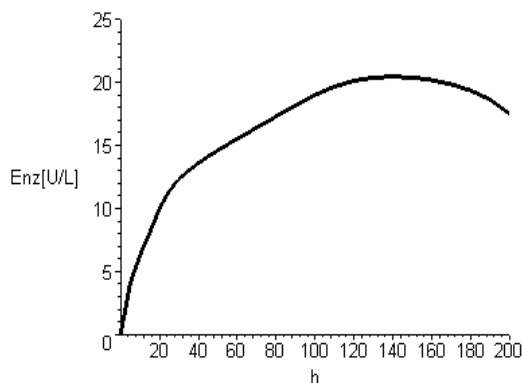


Figura 4 - Simulação da Concentração da enzima durante o processo SFS

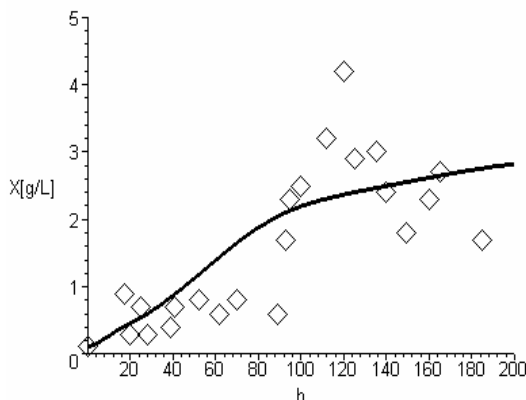


Figura 5 - Comparação entre o perfil de concentração de biomassa do modelo desenvolvido com dados experimentais (ALTINTAS *et.al*, 2002b)

A unificação do modelo através do balanço de glicose é validada, visto que o modelo simula com eficiência os dados experimentais da glicose, com uma redução drástica da concentração até o tempo de 20 horas, mantendo-se praticamente constante no decorrer da reação, ver Figura 6.

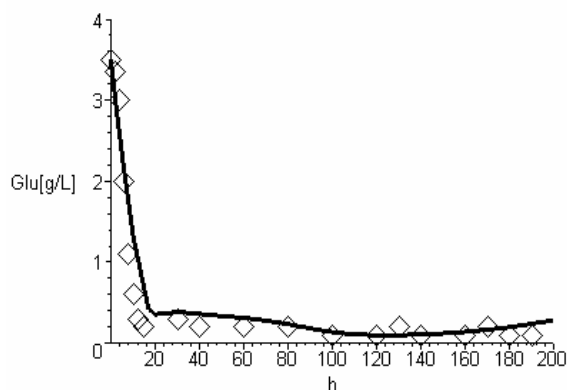


Figura 6 - Comparação entre o perfil de concentração de glicose do modelo desenvolvido com dados experimentais (ALTINTAS *et.al*, 2002b)

O modelo desenvolvido também se mostrou eficiente, quando utilizado para descrever o perfil de concentração de etanol, ver Figura 7.

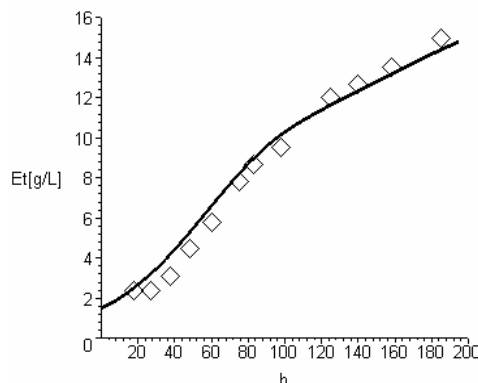


Figura 7 - Comparação entre o perfil de concentração de etanol do modelo desenvolvido com dados experimentais (ALTINTAS *et.al*, 2002b)

4 - CONCLUSÃO

As simulações do modelo provaram que as considerações para o primeiro nível hierárquico do conhecimento, sobre a representação da estrutura do amido em duas frações e a atividade da enzima na forma aditiva eram corretos. A simulação do modelo para a degradação do amido mostrou-se eficiente quando comparado com os dados experimentais. O primeiro nível hierárquico do conhecimento, a cinética de hidrólise do amido, foi unido ao segundo nível, modelo de degradação enzimática, através do modelo de liberação da glicose e simultânea metabolização em etanol. Para o segundo nível, a fisiologia microbiana foi modelada e ao modelo da taxa específica de crescimento da biomassa foi incluído efeitos de limitação e inibição por substrato. O modelo desenvolvido foi comparado com um modelo cibernético que foi aplicado para o mesmo sistema. Esta comparação mostrou que utilizando diferentes métodos de modelagem pode se obter excelentes resultados. Entretanto, analisando os dados experimentais não foi observado grande manifestação de “diauxic growth” para esta cepa modificada, considerado pelo modelo cibernético. O modelo proposto mostrou excelente flexibilidade para as diferentes condições operacionais do processo SFS e pode ser utilizado com sucesso para descrever a fisiologia microbiana dos microorganismos modificados geneticamente.

5 - LISTAS DE SÍMBOLOS

Enz	concentração da enzima (U/L)
Et	concentração de etanol (g/L)
Glu	concentração da glicose (g/L)
K_m	constante de Michaelis Menten (g/L)
$K_s, K_{s1}, K_{ps}, K_{enz}$	constantes de saturação (g/L)
$K_{starch}, K_{glu}, K_{pi}$	constantes de inibição (g/L)
q_p	taxa de produção de etanol (h^{-1})
R	taxa de degradação ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
R_{enz}	taxa de síntese de enzimas ($U.L^{-1}.h^{-1}$)

S	concentração de amido (g/L)
t	tempo (h)
X	concentração da biomassa (g/L)
$Y_{x/s}, Y_{p/s}$	coeficientes de conversão (g/g)
μ	taxa de crescimento da biomassa (h^{-1})
β	taxa de diluição da enzima (h^{-1})

Subscritos

0	concentração inicial
max	máximo
res	amido resistível
sus	amido suscetível
total	amido total

Nota: Uma unidade de enzima (U) representa a quantidade de enzima necessária para produzir 1 g de glicose a partir do amido em uma hora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTINTAS M. M.; ÜLGEN K. Ö.; KIRDAR B.; ÖNSAN Z. I.; OLIVER S. G. "Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors". *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.640-647, 2002a.

ALTINTAS, M. M.; KIRDAR B.; ÖNSAN Z. I.; ULGEN K. Ö. "Cybernetic modelling of growth and ethanol production in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting a bifunctional fusion protein". *Process Biochemistry*, v.37, p.1439-1445, 2002b.

ANDREWS, J. F. "A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates". *Biotechnology Bioengineering*, v.10, p.707-723, 1968.

BIROL G.; ÖNSAN I.; KIRDAR B.; OLIVER S. G. "Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grown on starch". *Enzyme and Microbial Technology*. v.22, p.672-677, 1998a.

BIROL G.; DORUKER P.; KIRDAR B.; ÖNSAN Z. I.; ULGEN K. Ö. "Mathematical description of ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*", *Process Biochemistry*, v.33, p.763-771, 1998b.

KOBAYASHI F.; NAKAMURA Y. "Effect of repressor gene on stability of bioprocess with continuous conversion of starch into ethanol using recombinant yeast". *Biochemical Engineering Journal*, v.18, p.133-141, 2004.

KOBAYASHI F.; NAKAMURA Y. "Mathematical model of direct ethanol production from starch in immobilized recombinant yeast culture". *Biochemical Engineering Journal*, v.21, p.93-101, 2004.

KOMPALA D. S.; RAMKRISHNA D.; JANSEN N. B.; TSAO G.T. "Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models". *Biotechnology and Bioengineering*, v.28, p.1044-1055, 1986.

KOMPALA D. S.; RAMKRISHNA D.; TSAO G. T. "Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates", *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, p.1272-1281, 1984.

MIELLENZ, J.R., "Etanol production from biomass: technology and commercialization status". *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.324-329, 2001.

MONOD, J. "The growth of bacterial cultures". *Annual Reviews in Microbiolog*, v.3, p.371-394, 1949.

POLAKOVIC M.; BRYJAK J. "Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase", *Biochemical Engineering Journal*, v.18, p.57-63, 2004.

ÜLGEN K.; Ö., SAYGILI B.; ÖNSAN Z. I.; KIRDAR B. "Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB". *Process Biochemistry*, v.37, p.1157-1168, 2002.