

**MODELAGEM DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL EM DYNETICA UTILIZANDO
ROTA METABÓLICA SIMPLIFICADA****Matheus Yuri Gritzenco De Giovanni^a, Renam Luis Acorsi^b, Cid Marcos Gonçalves
Andrade^c and José Eduardo Olivo^d**

^aMatheus Yuri Gritzenco De Giovanni, M.Sc, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 - Vila Esperanca, Maringá - Paraná, Brasil, e-mail: matheusdegiovanni@gmail.com, ^bRenam Luis Acorsi, Ph.D, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 - Vila Esperanca, Maringá - Paraná, Brasil, e-mail: rnmacorsi@gmail.com, ^cCid Marcos Gonçalves Andrade, Ph.D, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 - Vila Esperanca, Maringá - Paraná, Brasil, e-mail: cid@deq.uem.br, ^dJosé Eduardo Olivo, Ph.D, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 - Vila Esperanca, Maringá - Paraná, Brasil, e-mail: olivo@gmail.com

Resumo

Fontes alternativas de energia renovável para substituir o uso de combustível fóssil vêm sendo estudadas. Entre elas, a produção de etanol a partir de processos fermentativos de matérias-primas renováveis baseadas em carbono é atrativa por ser uma opção mais limpa e viável. Estes processos fermentativos podem e devem ser aperfeiçoados de maneira contínua e existem diversas formas de modelá-los. Uma das maneiras mais úteis de analisar processos é o desenvolvimento de modelos matemáticos do processo. Visto isso, este trabalho o desenvolvimento e simulação do processo de fermentação da produção do etanol do caldo da cana-de-açúcar a partir as rotas metabólicas, sendo implementado usando-se o software livre Dynetica.

Palavra-chave: DYNETICA, software livre, energia renovável, bioetanol, rota metabólica

1 INTRODUÇÃO

Problemas causados pelo uso de combustíveis de fonte fósseis induzem ao desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis [1]. O uso de combustíveis derivados do petróleo resulta em uma grande emissão de CO₂, o que representa uma grande contribuição para a emissão total de gases do efeito estufa (GEE) [2]. Atualmente, o bioetanol é o biocombustível dominante, com sua maioria sendo produzida nos Estados Unidos e no Brasil, utilizando milho e cana-de-açúcar como matéria-prima, respectivamente [2,3]. Os custos de matéria-prima, especialmente do milho, a produção e a redução de emissão de gases GEE leva a um debate contínuo sobre a utilização de biocombustíveis [4]. No Brasil, não há dúvida de que a dependência de combustíveis derivados de petróleo tem diminuído devido ao contínuo desenvolvimento e aperfeiçoamento da indústria de álcool e açúcar, que além do etanol produz bioeletricidade, polímeros e até mesmo alimentos para consumo humano e animal [5,6].

Uma maneira de aperfeiçoar o bioprocessos é estudar o agente de transformação utilizado,

como os micro-organismos utilizados na fermentação [1]. Micro-organismos podem ser considerados como pequenas indústrias, controladas pelo seu metabolismo através de uma rede de reações bem reguladas, que quase nunca produz uma substância a mais do que o necessário [7]. Então, a melhoria do desempenho de um micro-organismo pode ser alcançada através da otimização e maior entendimento de sua rede metabólica ou a introdução de uma nova rota metabólica através de modificações genéticas, um método que precisa de grande conhecimento de genética e metabolismo [1,2]

A cinética de fermentação pode ser analisada de duas maneiras: pelo consumo de substrato ao longo do tempo ou pela formação de produto ao longo do tempo. Assim:

$$\left. \frac{dS}{dt} \right|_t = \text{velocidade de consumo de substrato} \quad (1)$$

$$\left. \frac{dP}{dt} \right|_t = \text{velocidade de produção de produto} \quad (2)$$

Em um gráfico de Substrato (S) ou Produto (P) pelo tempo, tais velocidades são dadas pela inclinação da reta tangente a curva no instante t, como mostra a Figura 1.

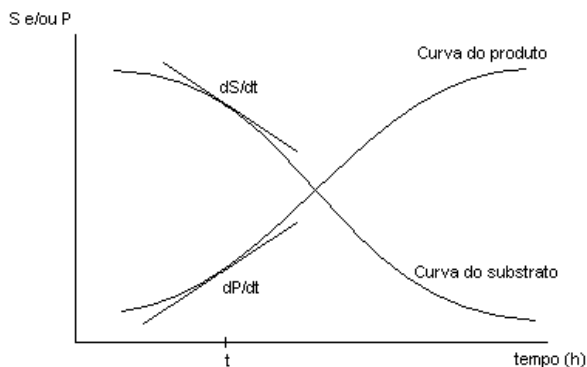


Figura 1 – Comportamento das concentrações de substrato e produto em função do tempo.

Como a concentração de microorganismos não é constante com o tempo e baseando-se na hipótese da existência de uma proporcionalidade entre a concentração de complexo enzimático que realiza a transformação e a concentração de microorganismo que contem este complexo, surge o conceito de velocidade específica, que pode ser aplicado tanto ao substrato quanto ao produto ou microorganismo.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (4)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (5)$$

Da mesma forma, pode-se fazer um gráfico da velocidade específica contra o tempo e determinar os períodos de tempo em que a velocidade é máxima, seja para crescimento de célula, seja para produção de produto.

Uma das formas de se aumentar a produção do etanol é aumentar a eficiência do processo de fermentação. Para tal, faz-se

necessário ter-se o modelo do processo. A modelagem pode ser empírica (caixa preta) ou fenomenológica. Em processos bioquímicos, normalmente temos a mistura das duas abordagens, a chamada modelagem mista. Uma vez que geralmente temos a forma das equações, derivadas de conhecimentos teóricos, e constantes a determinar, que podem ser obtidas a partir de dados experimentais. Pode-se chamar de “macro” a forma de se modelar os processos bioquímicos com equações diferenciais que envolvem o produto (P), o substrato (S) e o microorganismo (X), estes modelos servem e serviram para avanços nestes estudos.

Modelos matemáticos podem simular o comportamento dinâmico e complexo do metabolismo celular. Modelos de rotas metabólicas consistem em reações enzimáticas descritas através de sua estequiometria, fluxo de reação e constantes cinéticas (algumas constantes cinéticas precisam de um modelo adquirido em literaturas, mas normalmente elas estão incompletas, incompatíveis ou simplesmente inexistentes) [14]. Sendo assim, a maioria dos modelos matemáticos de rotas bioquímicas foi desenvolvida baseada em dados coletados de diferentes fontes [10,14].

Hoje, com o avanço do conhecimento das rotas metabólicas e no processamento dos computadores um tipo de modelagem “micro” tem sido largamente investigado, aquele que usa o equacionamento das rotas metabólicas. Neste trabalho estabeleceu-se a condição de modelar o processo de produção do etanol usando rotas metabólicas e para auxiliar esse controle fez-se o uso do software Dynetica, que é um software livre.

2 PARTE EXPERIMENTAL

Uma rota metabólica é uma rede complexa de reações ocorrendo simultaneamente. Para exemplificar, um esquema de modelo ramificado da glicólise que será utilizado consiste de três reações, conforme figura 2. O software utilizado para esta etapa foi o Dynetica e as etapas seguem de acordo com as descrições abaixo.

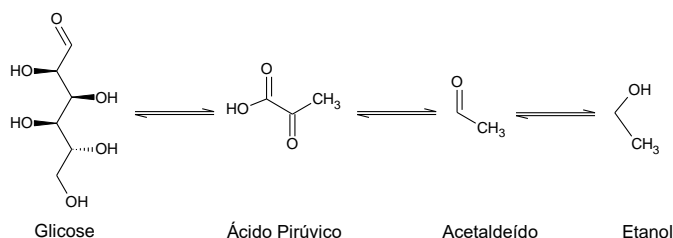


Figura 2 – Rota metabólica de fermentação alcoólica

De início, criou-se um modelo de reação, no menu New e foi definido um nome para o sistema. Um sistema em branco apareceu, nesta janela o painel esquerdo mostrava a exibição de árvore-estrutura da rede e no painel da direita exibia-se uma representação gráfica. Havia uma lista de parâmetros no painel à esquerda; o parâmetro “Time” já vem com o programa e este parâmetro não deve ser modificado ou excluído, pois isso pode corromper o arquivo de entrada.

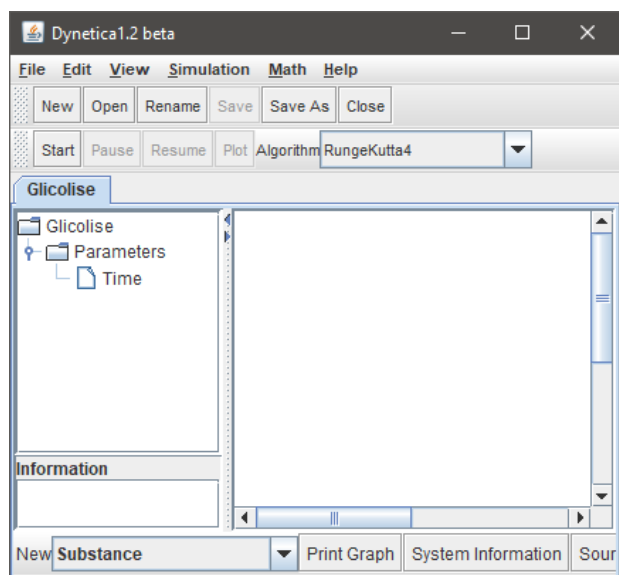


Figura 3 – Imagem inicial do Dynetica

Na linguagem do programa, cada substância representa um componente da reação: reagente, produto, catalisador, etc. Para criar uma substância, clicou-se na flecha para baixo ao lado do “New” inferior, em “Substance” e adicionou-se um nome, por exemplo A. Depois disso um nó azul, correspondente a este “A” criado, apareceu no console principal. Aprendeu-se a fechar a janela do editor clicando no canto superior direito da caixa e reabrindo com um duplo clique no nó correspondente.

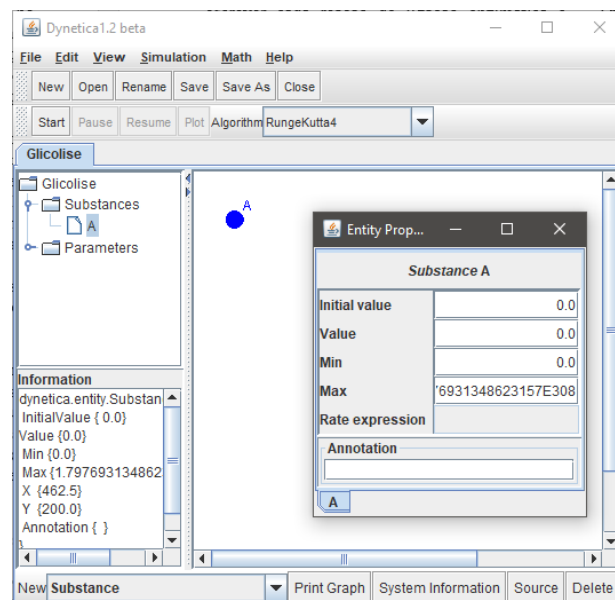


Figura 4 – Nodo da Substância

Estudo e aprendizado da opção Progressive Reaction do programa Dynetica, que serve para modelar uma reação simples que converta uma substância em outra; em seguida, clicou-se no mesmo botão de combinação usado para criar a substância, mas selecionou-se a opção Progressive Reaction. Inseriu-se o parâmetro k, que representa a velocidade específica da reação ou constante de velocidade. Há uma lista de parâmetros no lado esquerdo da janela principal. A reação na interface gráfica aparece como uma seta encaixotada. A linha verde indica que a produção da substância, a linha vermelha representa o consumo da substância, e uma linha tracejada indica que a substância cinza afeta a cinética da reação. Os parâmetros podem ser definidos antes do tempo desde que eles são gerados automaticamente quando a reação é formada. As substâncias também podem ser omitidas antes de criar a reação, e o programa irá adicioná-los automaticamente. No entanto, reconheceu-se que o layout gráfico de nós e reações em algumas plataformas fica de forma mais confusa, portanto o recomendado é que as substâncias sejam criadas antes das reações que participam.

Verificou-se que as reações são classificadas em dois tipos nesse programa: reações progressivas ou reações equilibradas e algumas opções são fornecidas, como Progressive Reaction, Mass Action, Decay e Michaelis-Menten, cada uma delas requisitando os parâmetros respectivos. Também há possibilidade de formular as expressões cinéticas. Para criar uma nova expressão, utilizou-se o botão de combinação na

parte inferior da página e selecionar Expression Variable. A seção Expressões do apêndice fornece uma lista das operações e funções compreendidas pelo Dynetica dentro dessa estrutura. Para executar o modelo, clicou-se no botão Iniciar na barra de Simulação na parte superior da tela e, em seguida, no botão Plot ao lado dele. Estas opções, juntamente com a maioria dos outros mencionados abaixo estão disponíveis no Menu Simulação da barra de menus. Uma janela de simulação contendo o comportamento dependente do tempo de substâncias no sistema aparece na tela. Por padrão, o Dynetica usa uma variável de tempo etapa 4ª ordem algoritmo de Runge-Kutta (identificado como "RungeKuttaFehlberg"), que é implementado com base na descrição de numéricos. Para acessá-lo, clicou-se no botão de cima na barra de Simulação ao lado do rótulo "Algoritmo" e selecione a opção RungeKutta4.

Na parte de simulação, o Dynetica pode também modelar a dinâmica do sistema, considerando-se cada reação como uma etapa individual que tem uma certa probabilidade de que ocorra durante um intervalo de tempo amostrados. Este tipo de análise é relevante para os sistemas que envolvem um baixo número de moléculas de reagentes e produtos. Matematicamente se manifesta através do algoritmo denominado Gillespie e estocástica, porque a presença de uma probabilidade igual qualquer reação disparando em qualquer momento no tempo introduz uma aleatoriedade para a simulação não é possível dentro de simulações deterministas. Três métodos particulares de realização do algoritmo de Gillespie estão disponíveis em Dynetica para modelagem estocástica. No mesmo botão de combinação, onde as opções de modelagem determinísticos foram localizados, tendo-se as seguintes opções: Direct Method, Optimized Direct Method ou First Reaction Method. O Direct Method, o método mais comum para implementar o algoritmo Gillespie, opera com base em uma escolha aleatória de reações com probabilidades de reação que redefinem a cada iteração da etapa de tempo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Fez-se então a inserção das substâncias que participam do processo de fermentação no Dynetica, gerando um nodo para cada substância. Por conveniência, os nodos foram nomeados da

seguinte forma: glicose = S; ácido pirúvico = Pir; acetaldeído = A; etanol = EtOH. Para os valores iniciais de tais substâncias, tem-se que apenas o valor inicial da glicose difere de 0, pois apenas ela se encontra presente inicialmente no meio. Para fins deste trabalho, considerou-se uma fermentação cuja concentração inicial de substrato é 30 g/L de glicose, ou 0,1665 mol/L de glicose.

Tendo as substâncias em mãos, adicionaram-se as reações. Todas as reações serão consideradas como progressivas. No caso de reações metabólicas, tal como no caso da cinética enzimática, consideraremos que as reações são de primeira ordem. Assim, para a primeira reação, R1, que transforma um mol de glicose em dois mols de ácido pirúvico, para uma cinética tipo $k_1 * [S]$, consideremos uma constante cinética baixa, visto que uma elevada constante dessa reação, causaria uma conversão imediata de toda glicose no meio, o que não se verifica experimentalmente. Partindo dos dados de Acorsi (2012), temos que essa quantidade de glicose deve ser consumida em aproximadamente 75 minutos. Isso levou ao uso de $k_1 = 0.07$. A reação do ácido pirúvico em acetaldeído e a reação do acetaldeído em etanol não devem ser lentas, pois, nesse caso haveria acúmulo dessas substâncias no interior da célula. Para as reações R2 e R3 então, propôs-se $k_2 = k_3 = 1.0$.

Entende-se por resultados a informação pertinente aos dados coletados e analisados, abrangendo estudos de caso.

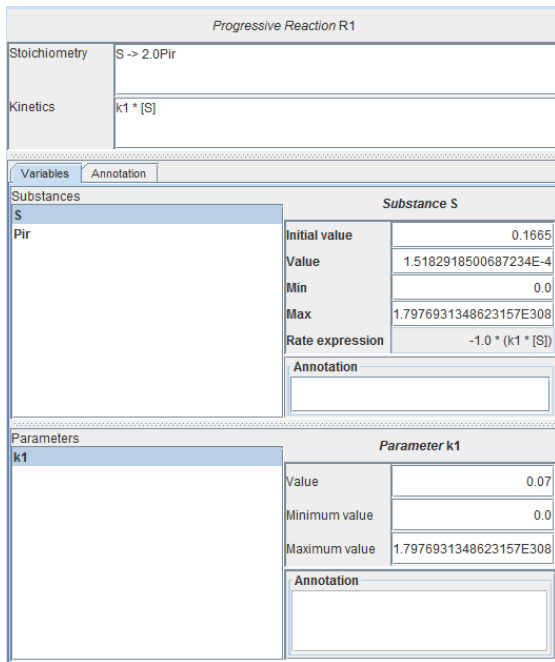


Figura 5 - Configuração da reação 1.

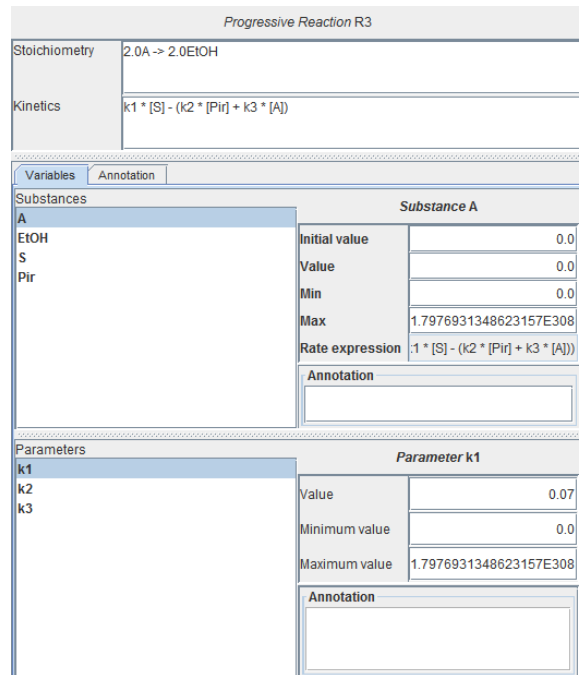


Figura 7 - Configuração da reação 3.

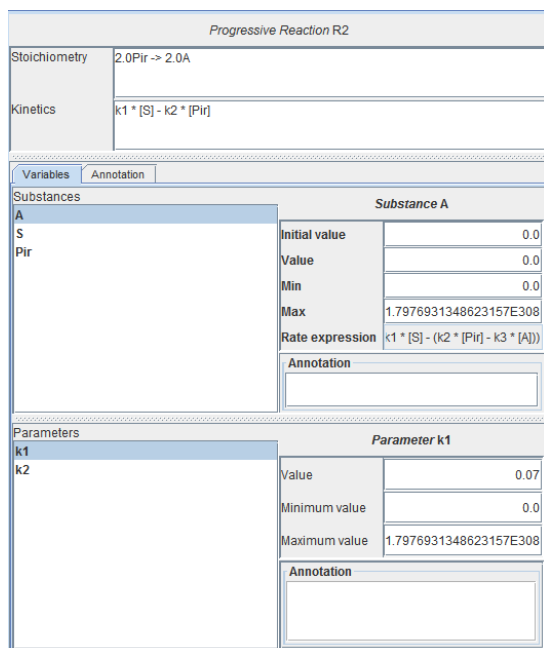


Figura 6 - Configuração da reação 2.

Após definidas as substâncias e reações, o seguinte nodo aparece na área de trabalho do Dynetica:



Figura 7 - Nodos reacionais.

Ao clicar em “Plot” e definir os parâmetros gráficos de acordo com o preferido, o programa simula a reação e, neste caso, forneceu o seguinte resultado:

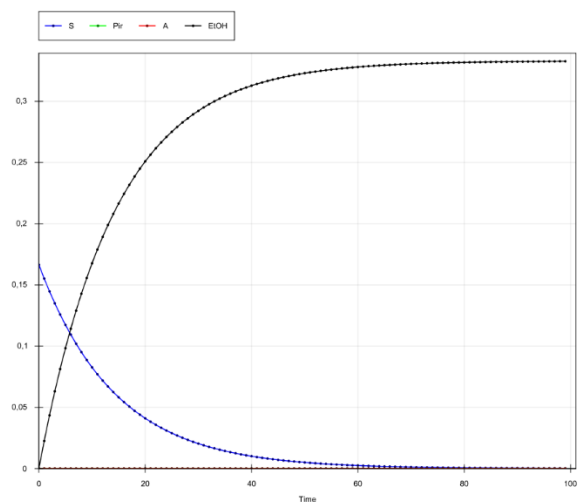


Figura 8 - Produção de etanol por via metabólica.

4 CONCLUSÃO

O processo pôde ser modelado e simulado com o uso do software Dynetica. Dentro da proposta de auxiliar na modelagem de uma rota metabólica para o processo de fermentação, o programa correspondeu às expectativas e o rendimento atingido foi o esperado para casos de fermentação sem inibição.

5 REFERÊNCIAS

- [1] Dai, Z. and Nielsen, J. (2015) Advancing metabolic engineering through systems biology of industrial microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 36, 8-15.
- [2] Nielsen, J., Larsson, C., Van Maris, A. and Pronk, J. (2013) Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 24, 398-404.
- [3] Chen, B. and Saghsian, S. (2015) The relationship among ethanol, sugar and oil prices in Brazil: cointegration analysis with structural breaks. *Selected Paper prepared for presentation at the Southern Agricultural Economics Association's 2015*.
- [4] Caspeta, L., Buijs, N.A.A., Nielsen, J. (2013) The role of biofuels in the future energy supply. *Energy & Environmental Science*. 6, 1077-1082.
- [5] Filoso, S., do Carmo, J.B., Mardegan, S.F., Lins, S.R.M., Gomes, T.F. and Martinelli, L.A. (2015) Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 52, 1847-1856.
- [6] Lapola, D.M., Schaldach, R., Alcamo, J., Bondeau, A., Koch, J., Koelking, C., et al. (2010) Indirect land-use changes can overcome carbon savings from biofuels in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 3388–3393.
- [7] Demain, A.L. (2000) Microbial technology. *Trends in Biotechnology*. 18, 26-31.
- [8] Nielsen, J., Jewett, M.C. (2008) Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 8, 122-131.