



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

MARINA BAIOSCHI RIBOLDI DELALANA

**Metabolismo de aminoácidos de
Clostridium histolyticum T248 durante a produção de
colagenases e avaliação de bateladas sequenciais
para aumento de produtividade**

CAMPINAS

2017

MARINA BAIOSCHI RIBOLDI DELALANA

**Metabolismo de aminoácidos de
Clostridium histolyticum T248 durante a produção de
colagenases e avaliação de bateladas sequenciais
para aumento de produtividade**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos à obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador (a): Dra. Maria Helena Andrade Santana

Co-Orientador: Dr. Sérgio Luiz Moreira Neto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR MARINA BAIOSCHI RIBOLDI DELALANA, E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Delalana, Marina Baiocchi Riboldi, 1984-
D373m Metabolismo de aminoácidos de *Clostridium histolyticum* T248 durante a produção de collagenases e avaliação de bateladas sequenciais para aumento de produtividade / Marina Baiocchi Riboldi Delalana. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Coorientador: Sérgio Luiz Moreira Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Colágeno. 2. Biocatálise. 3. Proteólise. 4. Biotecnologia. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. II. Moreira Neto, Sérgio Luiz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Amino acid metabolism of *Clostridium histolyticum* T248 during collagenase production and sequential batch evaluation for increased productivity

Palavras-chave em inglês:

Collagen

Biocatalysis

Proteolysis

Biotechnology

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Helena Andrade Santana [Orientador]

Reinaldo Gaspar Bastos

Ney Ribeiro Leite

Data de defesa: 13-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

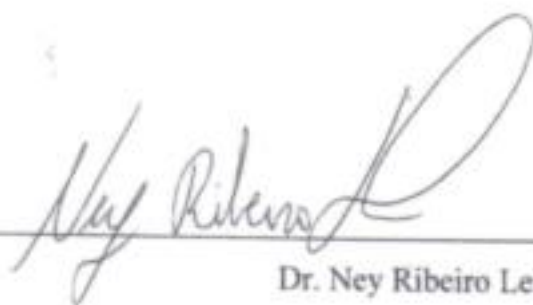
Dissertação de mestrado defendida por Marina Baiochi Riboldi Delalana e aprovada em
13 de março de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª. Drª. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos



Dr. Ney Ribeiro Leite

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, Santo Expedito e Nossa Senhora Aparecida por me ajudarem a chegar até aqui.

Aos meus pais Júlio Riboldi e Maria da Penha B. Riboldi, irmãos Lucas Riboldi, Victor Riboldi e Rafael Riboldi pela paciência, incentivo e colaboração em todos os momentos difíceis e de alegria.

Ao meu marido, Hélio Delalana Filho pela paciência, incentivo, companheirismo e colaboração em todos os momentos difíceis e de alegria; e principalmente por ter acreditado em mim.

Aos meus amigos do departamento de Biotecnologia do laboratório Cristália, Adriana Yokomizo, Alan da Silva, André Barros, Caroline Didier, Celso Santi Jr., Cintia Suemassu, Dr. Josef Ernest Thiemann (*in memoriam*), Fernando Barbosa, German Wassermann, Guilherme del Padre, Juliana Barbosa, Márcio Paris, Ricardo Yassaka, Silvia de Oliveira, a equipe de fermentação de microrganismos e a equipe do controle em processo pela paciência, companheirismo e indispensável ajuda.

Ao Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. pela oportunidade e incentivo, ao Diretor Marcos Castanheira Alegria, à Gerente Milena de Oliveira e ao Coordenador Industrial Ney Ribeiro Leite.

À orientadora Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana pela amizade, apoio, aprendizagem e confiança.

Ao co-orientador Dr. Sérgio Luiz Moreira Neto, pelos preciosos ensinamentos, incentivo, colaboração, paciência e por acreditar no nosso trabalho.

RESUMO

Colagenases são enzimas proteolíticas, com atividade sobre colágeno intacto e são usadas em formulações de medicamentos. Uma pomada à base de colagenases tem sido comercializada pelo Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda desde 1979, abrangendo mais de 60% do mercado brasileiro. A sua composição contém um complexo enzimático de colagenases, gerado a partir de um processo fermentativo utilizando a bactéria *Clostridium histolyticum*. Este complexo atua como um agente de debridamento do tecido necrótico, em feridas, úlceras e queimaduras, o que facilita o processo de cicatrização. Nesse produto, a cepa produtora de colagenases, *C. histolyticum* T248 foi isolada da biodiversidade brasileira e selecionada para produção de colagenases. Apesar da produção industrial e de estudos anteriores sobre modos operacionais da fermentação, a maior compreensão de aspectos fisiológicos desta cepa torna-se fundamental para a evolução e otimização do processo de produção das colagenases. Neste contexto, esta dissertação de mestrado teve como objetivo caracterizar e analisar o metabolismo de aminoácidos do *C. histolyticum* T248, bem como os subprodutos gerados durante a produção das enzimas, visando a proposição de uma estratégia de processo para aumento de sua produtividade e rendimento e aplicação em escala industrial. O trabalho foi delineado em duas etapas: na primeira etapa a identificação dos aminoácidos catabolisados e os subprodutos gerados, como ácidos orgânicos e amônio durante a produção das colagenases; na segunda etapa, a definição e caracterização experimental de estratégia de processo para aumento do rendimento e /ou produtividade. Com base nos resultados, foi sugerido um modelo de mapa metabólico para *C. histolyticum* T248. A partir do conhecimento dos aspectos da fisiologia microbiana de *C. histolyticum* T248, uma estratégia de processo fermentativo foi avaliada e os resultados evidenciaram aumento significativo de produtividade e rendimento de colagenases, com perspectivas para o escalonamento do processo.

Palavras chave: colágeno; biofármaco; biocatálise; hidrólise de colágeno; proteólise; biotecnologia.

ABSTRACT

Collagenases are a proteolytic enzyme that shows enzymatic activity on intact collagen and are used in medicine formulations. Since 1979, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda commercializes an ointment based on collagenases, and detents over 60% of the Brazilian market of this product. An enzymatic complex of collagenases is part of the ointment composition; such complex is obtained from a fermentation process of the bacteria *Clostridium histolyticum*. This complex acts as a debridement agent in necrotic tissue, wounds, ulcers and burns, helping the natural healing process. *C. histolyticum* T248 strain was first isolated from Brazilian biodiversity and selected to be the collagenases-producer strain used in the industrial process of collagenases. Following the previous studies on operational modes of fermentation that made viable the industrial production of this enzyme, it becomes clear the need of a deeper understanding regarding the physiological aspects of the strain, aiming the evolution and optimization of collagenase's production. In this context, this dissertation to obtain a Master Degree aims to characterize and analyze the metabolism of aminoacids of the *C. histolyticum* T248 strain, as soon as their subproducts during the production of the enzymes in order to propose a process strategy that leads to a higher productivity and yield, feasible to be used in the industrial scale of production. This work was performed in two steps: first, catabolized aminoacidos and their subproducts – like organic acids, alcohols and ammonium – were identified; the second step involved the definition ad experimental characterization of the proposed process strategy aiming the increase of yield and/or productivity. The knowledge of the microbial physiological aspects of *C. histolyticum* T248 strain was used to develop a fermentative process strategy, and its results showed a significantly increase in productivity and yield of collagenases, encouraging the scaling up of the proposed process.

Key words: collagen; biopharmaceutical; biocatalysis; collagen hydrolysis; proteolysis; biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. A. Ciclo de Krebs incompleto em bactérias anaeróbias e a relação com aminoácidos. B. Visão geral das principais vias metabólicas em *Clostridium* sp. para produção de butanol (verde), etanol (vermelho) e hidrogênio (azul). Abreviaturas: 1,3 BPG, 1,3 bisfosfoglicerato; Acetil-P, acetil fosfato; Butiril-P, butiril fosfato; Fd, ferredoxina; Ack, acetato quinase; Adc, acetoacetate descarboxilase; AdhE, aldeído/álcool desidrogenase; Atk, acetate tiotransferase; Bcd, complexo butiril-CoA desidrogenase; Buk, butirato quinase; Crt, crotonase; CtfAB, acetoacetil-CoA:acil-CoA transferase; Fnor, ferredoxina:NAD(P)⁺ oxidorreductase; H2ase, hidrogenase; Hbd, 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase; Ldh, lactato desidrogenase; Pfor, piruvato:ferredoxina oxidorreductase; Pdc, piruvato descarboxilase; Pta, fosfotransacetilase; Ptb, fosfotransbutirilase; Thl, tiolase (MAZZOLI, 2012). 32
- Figura 2. Reação de *Stickland*, exemplificando o catabolismo de glicina e alanina (MADIGAN *et al.*, 2010). 35
- Figura 3. Mapa metabólico central de *C. sticklandii*, com as vias metabólicas relevantes, utilização de aminoácidos e as vias envolvidas na conservação de energia..... 35
- Figura 4. Análise comparativa dos domínios das collagenases de *C. histolyticum* (ColG e ColH), *C. perfringens* (ColA), *C. limosum* (ColL), *C. botulinum* (ColB), *C. sporogenes* (ColSp), *C. tetani* (ColT), *C. septicum* (ColE), *C. sordellii* (ColSo), *C. bif fermentans* (ColF), *C. novyi* (ColN) e de *Bacillus anthracis* (ColC) – 1: Domínio catalítico de clivagem do colágeno. A presença de resíduos que formam um motivo de ligação à Zn²⁺ é determinante para a atividade catalítica da enzima; 2, 2a e 2b: Região caracterizada como *linker* entre os domínios 1 e 3; 3, 3a, 3b e 3c: Domínios de ligação ao colágeno. Variantes que não apresentam o domínio 3 degradam apenas formas desnaturadas do colágeno (gelatina). 39
- Figura 5. Representação esquemática da formação, organização e estrutura da fibra de colágeno, constituída por um grupo de moléculas formando uma configuração de tripla hélice (tropocolágeno), cadeias enroladas de procólágeno, com a sequência de aminoácidos glicina (GLY), prolina (PRO) e hidroxiprolina (HYP) (SILVA & PENNA, 2012). 44
- Figura 6. Representação dos grupos, constituintes e domínios presentes nas collagenases (G e H) identificadas nos sobrenadantes de fermentados de *C. histolyticum*. São mostrados os domínios S1 (catalítico, em verde), S2 (estrutural, em azul) e S3 (ligação ao colágeno, em vermelho). A região em amarelo são regiões sem alinhamento (adaptado de VITACYTE LLC, 2009). 46
- Figura 7. Representação da collagenase (ColG) e ligação com uma microfibrila de colágeno. a) Representação da molécula de collagenase em fita; b) Collagenase ligada a uma microfibrila de colágeno (cinza), com dois domínios de ligação ao colágeno (laranja) e domínio catalítico (azul) (Adaptado de ECKHARD *et al.*, 2011). 47
- Figura 8. Collagenases de *C. histolyticum* e catálise do colágeno: classe I clivam em *loci* próximos aos domínios N e C terminais do colágeno, classe II clivam dentro do domínio central do colágeno. 48

Figura 9. Evolução do tratamento de queimadura através de debridamento enzimático utilizando a pomada collagenase. a) Antes do tratamento; b) após oito semanas do tratamento com pomada collagenase (BANEVER, <i>et al.</i> , 2003).....	52
Figura 10. Doença de Dupuytren evidenciando a contratura articular no quarto e quinto dedo, resultantes da formação de nódulos e filamentos de colágeno na palma da mão (BIOSPECIFICS, 2016).	53
Figura 11. Planta Industrial do Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. para produção de collagenase.	56
Figura 12. A – Tanque de criogenia contendo banco de células de <i>C. histolyticum</i> T248. B – Criotubo do Banco de Células de Trabalho.	57
Figura 13. Estufa de incubação do cultivo do pré-inóculo e inóculo de <i>C. histolyticum</i> T248.	60
Figura 14. Fermentador BioFlo 115 NBS utilizado para o cultivo em batelada das células de <i>C. histolyticum</i> T248.	61
Figura 15. <i>Set point</i> dos parâmetros de operação do fermentador de bancada de 7,5L (NBS) usado para os ensaios de produção de collagenases.	64
Figura 16. Sistema de Filtração Tangencial de fibra oca para clarificação com membrana de 750 kDa (seta vermelha) com recirculação em bomba peristáltica (seta azul).	66
Figura 17. Sistema de Filtração Tangencial de fibra oca para a concentração das collagenases com membrana de 5 kDa.	67
Figura 18. Representação esquemática da reação do kit EnzChek® mostrando substrato sendo clivado pelas enzimas collagenases e produzindo os fragmentos fluorescentes (A). Microplaca para montagem e incubação da reação enzimática (B). Espectrofluorímetro de bancada para leitura da fluorescência (C).....	73
Figura 19. (A) Crescimento de <i>C. histolyticum</i> T248 (X, linha e símbolos laranjas) e produção de collagenases (linha e símbolos azuis). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann. (B) Velocidades instantâneas de crescimento, r_X (g/L.h) (linha laranja), e produção de collagenases, r_P (mU/mL.h) (linha azul), durante processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> T248 para produção de collagenases. O crescimento foi determinado a partir da conversão de densidade ótica (OD), absorbância à 600 nm, em biomassa seca (1 OD à 600 nm = 0,34 g/L de biomassa).	88
Figura 20. Análise morfológica do processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> para produção de collagenases (16ª hora de cultivo), realizada por microscopia ótica (aumento de 1.000 X).89	
Figura 21. Perfil protéico das amostras do processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> T248 para produção de collagenases (destacadas em círculos vermelhos), analisados por SDS-Page, revelado por prata e por zimografia. A – Gel de prata; B – Gel de zimografia (Colunas: 1 - Padrão de peso molecular, 2 - Log 6, 3 - Log 8, 4 - Log 10, 5 - Log 12, 6 - Log 14, 7 - Log 16 e 8 - Padrão interno de collagenase).	90

Figura 22. Perfil de redução (A) e aumento (B) das concentrações dos aminoácidos determinados no processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. Asn: Asparagina, Ser: Serina, Gly: Glicina, Thr: Treonina, Cys: Cisteína, Arg: Arginina, Glu: Glutamato, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Lys: Lisina, Val: Valina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Phe: Fenilalanina, His: Histidina, Tyr: Tirosina, Met: Metionina. .92

Figura 23. Curvas de concentração de aminoácidos (linhas coloridas), atividade de collagenases (linha azul pontilhada, Atv Col) e velocidade instantânea de produção de collagenases (linha azul, dP/dt) no processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. His: Histidina, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Lys: Lisina, Tyr: Tirosina, Met: Metionina, Val: Valina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Phe: Fenilalanina.93

Figura 24. Curvas de concentração de aminoácidos (linhas coloridas) e de células (linha laranja pontilhada, X), e velocidade instantânea de crescimento de *C. histolyticum* T248 (linha laranja, dX/dt) no processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. His: Histidina, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Lys: Lisina, Tyr: Tirosina, Met: Metionina, Val: Valina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Phe: Fenilalanina.93

Figura 25. Formação de amônio (linha e símbolos azuis claros) durante crescimento de *C. histolyticum* T248 (linha laranja) para produção de collagenases (linha azul escura). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann.94

Figura 26. Cromatogramas sobrepostos das análises de ácidos orgânicos do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. Condições cromatográficas: Coluna analítica Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column, Plataforma HPLC Alliance (Waters), Detector UV (monitoramento em 210 nm), Fase Móvel com 5mM de ácido sulfúrico, Fluxo de 0,6 mL/min, Temperatura da Coluna de 50 °C e Temperatura da Amostra de 4 °C.96

Figura 27. (A) Curva de formação de ácido acético. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido acético – rosa, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido acético (linha rosa), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.97

Figura 28. (A) Curva de formação de ácido fórmico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido fórmico – cinza, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido fórmico (linha cinza), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.....98

Figura 29. (A) Curva de formação de ácido oxálico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido oxálico – roxo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido oxálico (linha roxa), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.....99

Figura 30. (A) Curva de consumo de ácido pirúvico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido pirúvico –verde claro, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido pirúvico (linha verde claro), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *Clostridium histolyticum* T248 para produção de collagenases. . 100

Figura 31. (A) Curva de consumo de ácido succínico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido succínico –vermelho, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido succínico (linha vermelha), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 101

Figura 32. (A) Curva de consumo de ácido cítrico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido cítrico –amarelo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido cítrico (linha amarela), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 102

Figura 33. Curva de formação (até 4h de fermentação) e consumo (a partir de 4h de fermentação) de ácido málico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. 103

Figura 34. Curva de formação de ácido orgânico 1 não identificado, representado em unidade arbitrária mensurada no HPLC (AU). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido orgânico 1 não identificado – verde limão, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. 103

Figura 35. Curva de formação de ácido orgânico 2 não identificado representado em unidade arbitrária mensurada no HPLC (AU) Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido orgânico 2 não identificado – verde escuro, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. 104

Figura 36. Crescimento de *C. histolyticum* T248 (linha laranja), produção de collagenases (linha azul escura), consumo de glicose (linha e símbolos verdes) e formação de lactato (linha e símbolos amarelos). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann..... 105

Figura 37. Via de conversão de ácido pirúvico à ácido láctico catalisada por lactato desidrogenase (LDH)..... 105

Figura 38. (A) Curva de consumo de asparagina (Asn). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo

modelo de Boltzmann (Asn – vermelho, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Asn (linha vermelha), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 107

Figura 39. (A) Curva de consumo de serina (Ser). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ser – verde claro, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Ser (linha verde claro), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 109

Figura 40. (A) Curva de consumo de cisteína (Cys). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Cys – marrom, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Cys (linha marrom), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 110

Figura 41. Vias de catabolismo de serina e cisteína propostas para *C. histolyticum* T248.... 111

Figura 42. (A) Curva de consumo de arginina (Arg). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Arg – amarelo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Arg (linha amarela), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 112

Figura 43. Etapas da via arginina diidrolase (CUNIN *et al.*, 1986). 113

Figura 44. (A) Curva de consumo de Glicina (Gly). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Gly – preto, crescimento - laranja e atividade de collagenases - azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Gly (linha preta), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 114

Figura 45. Redução da glicina à amônio e acetilfosfato (versão reduzida do que foi descrito no texto)..... 115

Figura 46. (A) Curva de consumo de glutamato (Glu). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Glu – verde escuro, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Glu (linha verde escuro), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 116

Figura 47. Reações catalisadas pela enzima glutamato desidrogenase. 117

Figura 48. (A) Curva de consumo de treonina (Thr). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo

modelo de Boltzmann (Thr – roxo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Thr (linha roxa), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases..... 118

Figura 49. Via de catabolismo de treonina proposta para *C. histolyticum* T248..... 119

Figura 50. (A) Velocidades instantâneas de consumo de Asn, Ser, Gly, Thr, Cys e crescimento microbiano (linha laranja); e (B) Velocidades instantâneas de consumo de Arg, Glu e crescimento microbiano (linha laranja) durante fermentação com *Clostridium histolyticum* T248 para produção de collagenases. 120

Figura 51. (A) Velocidades instantâneas de consumo de Asn, Ser, Gly, Thr, Cys e produção de collagenases (linha azul); e (B) Velocidades instantâneas de consumo de Arg, Glu e produção de collagenases (linha azul) durante fermentação com *Clostridium histolyticum* T248 para produção de collagenases. 121

Figura 52. (A) Consumo acumulado de aminoácidos ($\sum S$) durante crescimento de *C. histolyticum* T248, X (g/L). (B) Produção de collagenases, P (mU/mL) e (C) formação dos subprodutos acetato e amônio (g/L). 122

Figura 53. Curva do fator instantâneo de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$, em g/mol ou g/g) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 Para produção de collagenases. 123

Figura 54. Mapa metabólico central de utilização dos aminoácidos, glicose e formação de produtos intermediários por *C. histolyticum* T248. 125

Figura 55. Sequências de peptídeos autorreguladores no sistema QS. A – Sequências de autoindutores peptídicos de: *Staphylococcus aureus* (YSTCDFIM), *Staphylococcus pseudintermedius* (RIPTSTGFF), *Enterococcus faecalis* (QNSPNIFGQWM) e *Clostridium perfringens* (CLWFT linear e cíclico e TSACLWFT) (MA *et al.*, 2015); B – Estrutura de compostos orgânicos que atuam como AIs de: *Listeria*, *Vibrio*, *Xantomona*, *Strentophomonas*, *Burkholderia*, *Xylella*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Chomobacteruim*, *Agrobacteruim*, *Aeromonas*, *Ervinia*, *Rhizobuim*, *Serratia*, *Yersinia*, *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas* e *Silicibacter* (LADE *et.al*, 2014). 128

Figura 56. Modelo da regulação da expressão gênica pelo sistema de transdução de sinal de dois componentes VirSR. Regulação positiva: seta verde e símbolos +; Regulação negativa: linhas vermelhas e símbolos -. Após a detecção de um sinal externo (potencialmente um AIP), o VirS- sensor histidina quinase (mostrado em laranja) autofosforila e, em seguida, torna-se o doador de fosfato para o seu correspondente regulador resposta, VirR (mostrado em azul). O VirR fosforilado regula diretamente a expressão de pfoA, ccp, netB, vrr, virT, virU, CPF_1074, CPF_0461 e CPR_0761 por ligação à VirR localizado nas regiões promotoras destes genes. VirR regula indiretamente a toxina indicada, ou os genes do fator de virulência, através das moléculas de RNA VR-RNA, VirU ou VirT. O sistema CPE1446 / CPE1447 controlado por VR-RNA regula positivamente a expressão de genes de hialuronidase, mas regula negativamente a transcrição de ccp, plc, pfoA e nanl. O VirSR-independente, VirX sRNA, regula positivamente a expressão de pfoA, plc e colA, e controla negativamente a transcrição de cpe e a esporulação Sigma, sigE, sigG e sigK (CARTER *et al.*, 2014). 130

Figura 57. Produção de collagenases e cinética de crescimento de *C. histolyticum* T248 em quatro bateladas sequenciais. As linhas e pontos azuis representam a atividade de collagenases (mU/mL). As linhas e pontos laranjas representam o crescimento microbiano, em biomassa (g/L). 137

Figura 58. Perfil protéico dos líófilos obtidos em bateladas sequenciais, analisados por SDS-Page, revelado por zimografia (A) e prata (B). Linhas: 1 - Padrão de peso molecular, 2 – primeira batelada, 3 –segunda batelada, 4 –terceira batelada, 5 –quarta batelada, 6 – Líófilo da batelada simples, 7 – Padrão interno de Collagenases. 139

Figura 59. Perfil protéico das collagenases, pela análise de SDS capilar, dos líófilos gerados das bateladas sequenciais comparado ao líófilo de uma fermentação padrão, utilizada como referência. 140

Figura 60. Cromatograma de Mono Q sobrepostos mostrando o perfil protéico das amostras liofilizadas do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248. Condições cromatográficas: Coluna analítica MonoQ 5/50 GL (GE), Plataforma HPLC Alliance (Waters), Detector DAD (monitoramento em 280 nm). A – Perfil das amostras liofilizadas das bateladas sequenciais 1, 2, 3 e 4, comparadas com o perfil de uma fermentação referência (batelada simples) destacando os picos das collagenases I e II. AU: unidade arbitrária. 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características bioquímicas de <i>C. histolyticum</i>	31
Tabela 2. Pares de aminoácidos participantes da reação de <i>Stickland</i> (MADIGAN <i>et al.</i> , 2010).....	34
Tabela 3. Crescimento das diferentes cepas de <i>Clostridium</i> que metabolizam aminoácidos no meio de cultura VL (extrato de levedura, triptona, extrato de carne, glicose e cisteína, pH 7,2-7,4) e meio de cultura contendo glicose ou hidrolisado de caseína como fonte de energia. Crescimento expresso como leitura nefelométrica arbitrária (MEAD, 1971).....	37
Tabela 4. Propriedades das collagenases de <i>C. histolyticum</i> Classe I e Classe II.	46
Tabela 5. Aplicações terapêuticas das collagenases, aprovadas pelo FDA, incluindo Debridamento celular, queimaduras, cicatrização de feridas, doença de Dupuytren e Peyronie, e estudos clínicos ou experimentais, incluindo tratamento para glaucoma, hérnia de disco intervertebral, reparo de cartilagem, celulite, quelóide, degradação de placenta retida, dor nos mamilos de mulheres lactantes, oclusões totais crônicas, vitrectomia, fibroma uterino, isolamento celular e de ilhotas pancreáticas, lipoma e capsulite adesiva (ALIPOUR <i>et al.</i> , 2016).....	50
Tabela 6. Composição do meio de cultura de <i>C. histolyticum</i> T248 para produção de collagenase.....	58
Tabela 7. Composição de aminoácidos da Peptona de soja e Extrato de Levedura.	59
Tabela 8. Componentes do fermentador BioFlo 115, Eppendorf, New Brunswick Scientific.	62
Tabela 9. Parâmetros de liofilização das collagenases.	67
Tabela 10. Reagentes utilizados para preparação do gel concentrador de 5%.	70
Tabela 11. Reagentes utilizados para preparação do gel fracionador de 7,5%.	70
Tabela 12. Reagentes utilizados para preparação do tampão de amostra.....	71
Tabela 13. Procedimento de coloração do gel de SDS-PAGE com nitrato de prata.	71
Tabela 14. Procedimento de coloração do gel de SDS-PAGE pelo método de zimografia.	72
Tabela 15. Preparo da curva padrão para análise de atividade enzimática de collagenase.	74
Tabela 16. Condições cromatográficas para análise dos aminoácidos por UPLC (Waters). ..	76
Tabela 17. Gradiente da fase móvel utilizada na análise de aminoácidos por UPLC.	76
Tabela 18. Curva de calibração para análise de aminoácidos em UPLC.	77
Tabela 19. Condições cromatográficas para análise dos aminoácidos por HPLC (Waters). ...	78
Tabela 20. Curva de calibração para análise de ácidos orgânicos em HPLC.....	78

Tabela 21. Condições analíticas para análise de collagenases por cSDS.	83
Tabela 22. Condições analíticas para análise da pureza através de cromatografia líquida MonoQ.	84
Tabela 23. Gradiente da fase móvel utilizada na análise de pureza por MonoQ.	84
Tabela 19. Parâmetros cinéticos do processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> T248 durante a produção de collagenases.	89
Tabela 25. Parâmetros cinéticos da formação de ácidos orgânicos durante processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> T248 para produção de collagenases: velocidades instantâneas máxima (rSP_{max}), tempo de máximo de formação ($t_{SP_{max}}$) e variação da formação em $t_{SP_{max}}$ ($\Delta SP_{t_{max}}$) dos ácidos orgânicos gerados como subprodutos, acético, fórmico, oxálico e lático. *Entre parênteses o tempo no qual foram determinadas rSP_{max} , em horas.	95
Tabela 26. Parâmetros cinéticos do consumo de ácidos orgânicos durante processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> T248 para produção de collagenases: velocidades instantâneas máxima (rSP_{max}), tempo de máximo de consumo ($t_{SP_{max}}$) e variação do consumo em $t_{SP_{max}}$ ($\Delta SP_{t_{max}}$) dos ácidos orgânicos consumidos, pirúvico, succínico e cítrico. Entre parênteses o tempo no qual foram determinadas rSP_{max} , em horas.	95
Tabela 27. Atividade de Lactato Desidrogenase, LDH (U/L), durante crescimento de <i>C. histolyticum</i> T248 para produção de collagenases.	105
Tabela 28. Parâmetros cinéticos de consumo de aminoácidos durante processo fermentativo com <i>C. histolyticum</i> T248. Entre parênteses estão os tempos nos quais os parâmetros foram determinados (em horas).	106
Tabela 29. Compostos naturais como inibidores de <i>Quorum Sensing</i> (modificada de Lade <i>et al.</i> , 2014).	132
Tabela 30. Parâmetros de processo durante as etapas de produção de collagenases por <i>C. histolyticum</i> T248 em quatro bateladas sequenciais.	138
Tabela 31. Parâmetros cinéticos obtidos nas bateladas sequenciais: velocidades instantâneas máximas de formação de biomassa ($r_{X_{max}}$) e de formação de produto ($r_{P_{max}}$), e velocidades específicas máximas de formação de biomassa ($\mu_{X_{max}}$) e de formação de produto ($\mu_{P_{max}}$).	Erro! Indicador não definido.
Tabela 32. Resultados das análises dos eletroferogramas, de Eletroforese Capilar, obtidas dos líofilos das bateladas sequenciais e batelada simples para produção de collagenases por <i>C. histolyticum</i> T248.	140
Tabela 33. Resultados das análises cromatográficas em Mono Q, obtidas dos líofilos das bateladas sequenciais e batelada simples.	141
Tabela 34. Análise comparativa dos parâmetros obtidos experimentalmente em batelada simples e quatro bateladas sequenciais e comparação com uma simulação considerando duas bateladas simples e seis bateladas sequenciais.	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AAP – 4- Aminoantipirina

ACS – Acetil-CoA sintetase

ADP – Adenosina Difosfato

Ala – Alanina

AMP – Adenosina monofosfato

AQC – 6- aminoquinolil-succimidilcarbamato

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

ATP – Adenosina trifosfato

Atv Col – Atividade da Colagenase

Batch – Batelada

CoA – Coenzima A

Col A – Colagenase A, proveniente de *Clostridium perfringens*

Col B – Colagenase B, proveniente de *Clostridium botulinum*

Col C – Colagenase C, proveniente de *Bacillus anthracis*

Col E – Colagenase E, proveniente de *Clostridium septicum*

Col F – Colagenase F, proveniente de *Clostridium bifermentans*

Col G – Colagenase G, proveniente de *Clostridium histolyticum*

Col H – Colagenase H, proveniente de *Clostridium histolyticum*

Col L – Colagenase L, proveniente de *Clostridium limosum*

Col N – Colagenase N, proveniente de *Clostridium novyi*

Col So – Colagenase So, proveniente de *Clostridium sordellii*

Col Sp – Colagenase Sp, proveniente de *Clostridium sporogenes*

Col T – Colagenase T, proveniente de *Clostridium tetani*

CPB – Toxina B de *Clostridium perfringens*

CS – Citrato sintetase

cSDS – Eletroforese capilar com dodecil sulfato de sódio

Cys – Cisteína

dP – Derivada do produto

dS – Derivada do substrato

dt – Derivada do tempo

dX – Derivada da biomassa

EC – *Enzyme Commission*/ Classificação da enzima

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético

FLR – Detector de fluorescência

FT – Filtração Tangencial

G-6-P – Glicose-6-fosfato

G-6-PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GLDH – Glutamato Desidrogenase

Glu – Glutamato

Gly – Glicina.

HEPA - *High Efficiency Particulate Arrestance* / Filtro de ar com alta eficiência na separação de partículas

His – Histidina

HK – Hexoquinase

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

Ile – Isoleucina

kDa – Quilodáton: unidade de massa molecular de aminoácidos, proteínas e moléculas biológicas em geral.

Leu – Leucina

LOD/LDH – Lactato Desidrogenase

Lys – Lisina

MDH – L- malato desidrogenase

Met – Metionina

NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADH – Forma reduzida da dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADP⁺ - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NADPH – Forma reduzida do Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

OD_{600nm} – Densidade ótica medida à absorbância de 600 nanômetros

P – Produto

PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis / Gel de poliacrilamida

PDA – *Photodiode Array Detector* / Detector de Arranjo de Fotodiodo

Phe – Fenilalanina

Pi – Fosfato inorgânico

POD - Peroxidase

Pro – Prolina

Pv – Produtividade volumétrica

QS – *Quorum Sensing*

AIs – Autoindutores

RFU – Unidade Relativa de Fluorescência (*Relative Fluorescence Units*)

rP – Velocidade instantânea de formação de produto

RPM – Rotações por minuto

rS – Velocidade instantânea de consumo de substrato

rX – Velocidade instantânea de crescimento microbiano

SBR – Reator em batelada sequencial

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* / Dodecil sulfato de sódio

Ser – Serina

t – Tempo

TEMED – Tetramethylethylenediamine / Tetrametiletilenodiamina

Thr – Treonina

TMP – *Transmembrane pressure* / Pressão Transmembrana

TRIS – abreviação do composto químico trisaminometano

Tyr – Tirosina

U/g – Unidades/grama

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography* / Cromatografia Líquida de Ultra Performance

UV – Ultravioleta

Val – Valina

***V*_{máx}** – Velocidade máxima

***Y*_{x/s}** – Fator de conversão de substrato em células

ΔS – Variação da concentração dos aminoácidos

ΔX – Variação do crescimento microbiano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1. <i>Clostridium histolyticum</i>	30
3.1.1. Fermentação de aminoácidos por espécies de <i>Clostridium</i>	31
3.1.2. Reação de Stickland por espécies de <i>Clostridium</i>	34
3.1.3. Metabolismo individual de aminoácidos por espécies de <i>Clostridium</i>	36
3.1.4. Metabolismo de aminoácidos por <i>C. histolyticum</i>	36
3.2. Produção de collagenases por <i>C. histolyticum</i>	38
3.3. Colágeno	43
3.4. Collagenases	45
3.5. Tratamentos terapêuticos com collagenases	48
3.5.1. Debridamento celular, queimaduras e cicatrização de feridas	49
3.5.2. Doença de Dupuytren	52
3.5.3. Celulite	53
3.6. Produção industrial de collagenases por cepa de <i>C. histolyticum</i> selecionada e isolada da biodiversidade brasileira	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1. Linhagem de <i>Clostridium histolyticum</i> T248	57
4.2. Meio de Cultura	58
4.3. Condições de cultivo.....	59
4.3.1. Pré-inóculo e Inóculo.....	59
4.3.2. Fermentação.....	60

4.3.2.1. Fermentador de bancada	60
4.3.2.2. Acondicionamento e operação do Fermentador	63
4.3.3. Fermentação em bateladas sequenciais	64
4.4. Recuperação do complexo enzimático contendo collagenases.....	65
4.4.1. Clarificação do caldo fermentado.....	65
4.4.2. Concentração do clarificado por filtração tangencial	66
4.4.3. Liofilização das collagenases	67
4.4.4. Moagem e homogeneização do líófilo.....	68
4.5. Métodos analíticos.....	68
4.5.1. Determinação da concentração de biomassa microbiana	68
4.5.2. Análise morfológica da cepa	69
4.5.3. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	69
4.5.3.1. Preparo dos géis de poliacrilamida	69
4.5.3.2. Preparo das amostras	70
4.5.3.3. Preparo do tampão de amostra.....	70
4.5.3.4. Coloração com Nitrato de Prata.....	71
4.5.3.5. Zimografia	72
4.5.3.6. Quantificação das proteínas dos géis de SDS-PAGE	73
4.5.4. Determinação da atividade de collagenases	73
4.5.5. Identificação e quantificação dos aminoácidos	75
4.5.6. Determinação dos ácidos orgânicos	77
4.5.7. Quantificação de amônio	79
4.5.8. Quantificação de ácido láctico	80
4.5.9. Quantificação de ácido acético	81
4.5.10. Quantificação de glicose	82
4.5.11. Eletroforese Capilar com dodecil sulfato de sódio	82

4.5.12. Determinação da pureza e perfil protéico por cromatografia líquida de troca iônica MonoQ.....	84
4.6. Determinação dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo	85
4.6.1. Modelagem dos dados experimentais.....	85
4.6.2. Determinação dos parâmetros cinéticos e de fermentação	86
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1. Cultivo de <i>C. histolyticum</i> T248 em batelada simples para produção de collagenases. 87	
5.2. Metabolismo de aminoácidos por <i>C. histolyticum</i> T248 durante produção de collagenases.....	91
5.2.1. Formação de subprodutos, consumo de glicose e ácidos orgânicos.....	94
5.2.1.1. Amônio	94
5.2.1.2. Ácidos orgânicos.....	94
5.2.1.3. Ácido lático e glicose.....	104
5.2.2. Parâmetros cinéticos do consumo de aminoácidos.....	106
5.2.2.1. Asparagina	107
5.2.2.2. Serina e Cisteína	108
5.2.2.3. Arginina	111
5.2.2.4. Glicina.....	113
5.2.2.5. Glutamato.....	116
5.2.2.6. Treonina	118
5.2.2.7. Consumo sequencial de aminoácidos por <i>C. histolyticum</i> T248 e proposta de um mapa metabólico central.....	119
5.2.3. Indução e/ou estímulo da produção de collagenases por <i>C. histolyticum</i> T248	126
5.3. Bateladas sequenciais como estratégia para aumento da produtividade volumétrica de collagenases por <i>C. histolyticum</i> T248.....	133
6. CONCLUSÕES	144

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
ANEXOS.....	162
ANEXO I.....	162
ANEXO II	163
ANEXO III	164

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico, tornando possível ampliar a capacidade e velocidade de prospecção (*high throughput screening*), incremento de metodologias de identificação de microrganismos baseadas em marcadores moleculares, o uso de enzimas microbianas para fins industriais e farmacêuticos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, também em consonância com sua viabilidade econômica e eficiente aplicação em tratamentos terapêuticos específicos. Dentre a gama de potenciais usos, a classe de enzimas terapêuticas se destaca por apresentar elevada afinidade, especificidade com seus alvos e alta eficiência catalítica. Também são necessárias para muitas conversões químicas que aceleram os processos metabólicos e se diferenciam de outros tipos de drogas, que não apresentam a mesma especificidade e eficiência, além da possibilidade de indesejáveis efeitos colaterais ao paciente. Dessa maneira, as enzimas terapêuticas podem ser utilizadas separadamente ou em combinação com outras terapias, para o tratamento de várias doenças como: leucemia, úlceras de pele, doenças cardiovasculares, doença celíaca, inflamação, distúrbios digestivos e pancreáticos, no diagnóstico clínico, investigação bioquímica e no monitoramento de muitas doenças.

A exemplo dessas enzimas, temos as collagenases microbianas, enzimas proteolíticas colágeno-específicas, utilizadas há décadas para fins terapêuticos, que também exibem uma expansão em seu vasto número de utilizações, estendendo e ampliando seus usos não somente à indústria farmacêutica (tópica, injetável), além de reagente laboratorial, no isolamento de células na promissora terapia celular e até no processo e/ou geração de suplementos alimentícios.

As propriedades bioquímicas das collagenases contribuem para ampla utilização em tratamentos terapêuticos, como: atividade enzimática em amplo intervalo de pH (6,3 a 8,5); degradação específica do colágeno presente no tecido conjuntivo; atividade enzimática adequada à temperatura corporal (37 °C); fácil armazenamento e estabilidade, pelo fato de poderem ser liofilizadas.

Assim, diversos estudos clínicos têm demonstrado que tratamentos de lesões e queimaduras com collagenases são mais efetivos e apresentam melhor desempenho terapêutico frente a outros tratamentos enzimáticos e mecânicos, além de não danificar o tecido saudável, evitar sangramentos e ser indolor. Recentes avanços na descoberta de novos usos terapêuticos

das collagenases, bem como nos mecanismos de atuação, como isolamento de células, tumores, etc, tem despertado o interesse para novas aplicações. Collagenases também têm sido descritas como ferramentas importantes para o transplante de alguns órgãos específicos, como por exemplo, para o isolamento de células de Langerhans das ilhotas pancreáticas, células endoteliais microvasculares, hepatócitos e condrócitos (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION, 1997). A solução injetável de collagenase também tem sido utilizada no tratamento da contratura de Dupuytren (THOMAS & BAYAT, 2010).

Na indústria alimentícia, as collagenases são aplicadas, alternativamente, no amaciamento da carne, na extração de colágeno a partir da pele de salmão, na preparação de hidrolisado de colágeno a partir de animais e frutos do mar, sendo este muito utilizado como alimentos funcionais e bebidas, como suco de frutas.

Assim como nas indústrias de alimentos e farmacêutica, na indústria cosmética o produto resultante da ação das collagenases, o hidrolisado de colágeno, é largamente utilizado em função de sua capacidade de gelificação e texturização, espessamento e ligação à água, propriedades de dilatação e solubilidade, emulsão, formação de espuma e estabilização, adesão e coesão, função colóide protetora e capacidade para a formação de filme (BILEK & BAYRAM, 2015; DANEULT, *et al.*, 2015). Além disso, as collagenases também são amplamente utilizadas como reagente de laboratório para várias pesquisas bioquímicas.

No Brasil, o Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. desenvolveu o processo de produção destas enzimas, a partir de uma linhagem de *Clostridium histolyticum* isolada da biodiversidade brasileira, *C. histolyticum* T248. A linhagem selecionada foi extensamente caracterizada e uma planta industrial encontra-se em funcionamento para produção de collagenase desde maio de 2014. O processo produtivo no Cristália inicia-se por fermentação em batelada simples e as enzimas obtidas são concentradas por filtração tangencial e liofilizadas, constituindo o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA).

O aumento da produção de collagenases é sem dúvida um dos aspectos de interesse em muitas áreas. Contudo, aspectos básicos da fisiologia de *C. histolyticum* T248 necessitam ser identificados, a fim de tornar compreensível o seu metabolismo durante a produção das collagenases e subsidiar e/ou permitir a avaliação de uma estratégia de processo que possa promover aumento de rendimento e/ou produtividade.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar e analisar o metabolismo de *C. histolyticum* T248 durante o processo de produção de collagenases, visando propor e avaliar uma estratégia de processo que conduza ao aumento de produtividade para aplicação industrial.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar, quantificar e estabelecer o perfil de consumo de aminoácidos, e os principais subprodutos formados, por *C. histolyticum* T248 durante a produção de collagenases;
- Avaliar a correlação entre consumo de aminoácidos, crescimento microbiano e produção de collagenases por *C. histolyticum* T248;
- Propor e avaliar uma estratégia de processo para aumento do rendimento e da produtividade volumétrica de collagenases, visando aplicação em escala industrial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Clostridium histolyticum*

Mais de cem espécies de *Clostridium* já foram descritas e sua distribuição no ambiente não é sempre uniforme, dependendo essencialmente de condições do micro-habitat, localização geográfica, condições climáticas e da presença de outros microrganismos (SMITH & WILLIAMS, 1984).

Os primeiros relatos sobre *Clostridium* vieram da Ilha de Kos, pelo físico grego Hippocrates, aproximadamente 460-370 d. C., a partir de uma doença diagnosticada, posteriormente, como gangrena gasosa (GOLDMAN & GREEN, 2015).

Algumas espécies de bactérias anaeróbias obtêm sua energia pela fermentação de aminoácidos. Elas são bactérias proteolíticas, que degradam proteínas, catabolizando seus aminoácidos. Dentre os gêneros em destaque no metabolismo proteolítico estão espécies de *Clostridium* (MEAD, 1971). Em 1896, Mall evidenciou a atividade proteolítica em espécies de *Clostridium* sp. e mostrou que organismos anaeróbios do solo foram capazes de digerir tendão de Aquiles bovino e, posteriormente, em 1931, Weinberg e Randin demonstraram que cepas de *C. histolyticum* digeriam completamente tendão de Aquiles equino.

C. histolyticum é uma bactéria bacilar anaeróbia facultativa, gram-positiva, formadora de esporos, proteolítica e não sacarolítica, não flagelada e móvel. As características bioquímicas são apresentadas na Tabela 1. Esta espécie é encontrada no solo, no trato intestinal de animais, compostos orgânicos em putrefação e nas fezes; é patogênica para ratos, coelhos e humanos, causando gangrena gasosa quando associada a outras espécies de bactérias (DEL MAR GAMBOA *et al.*, 2005; BORNEMAN & TRIPLETT, 1997; NISHIDA & IMAIZUMI, 1966). A espécie, quando cultivada em condições convencionais, produz as collagenases, além de outras proteases como gelatinases, clostripaínas (KEMBHAVI *et al.*, 1991), tripsinas, elastases, aminopeptidases, peptídeos, endotoxinas, carboidratos, pigmentos e compostos fenólicos (ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, 1974).

C. histolyticum demonstra certa resistência a muitos antibióticos e antifúngicos, como: Amicacina, Amoxicilina, Bacitracina, Cefalotina, Novobiocina, Oxitetraciclina, Vancomicina, Amoxiclav, Cefalexina, Ciprofloxacino, Clindamicina, Cloxacilina, Co-Trimoxazol, Tetraciclina e Enoxacina e sensibilidade à Eritromicina (ROHINI & JAYALAKSHMI, 2015).

Tabela 1. Características bioquímicas de *C. histolyticum*.

Características Bioquímicas	Resultados
Coloração de gram	Positivo
Esporo	Positivo
Pigmento	Negativo
Vancomicina	Sensível
Kanamicina	Sensível
Co-trimoxazol	Sensível
Produção de H ₂ S	Positivo
Redução Nitrato	Negativo
Teste Indol	Negativo
Produção Urease	Negativo
Lecitinase	Negativo
Lipase	Negativo

Cepas de *C. histolyticum* têm sido identificadas a partir de diferentes amostras provenientes de várias partes do mundo. Nishida e Imaizumi (1966) isolaram 21 cepas de *C. histolyticum* a partir de solos no Japão; Loesche *et al.* (1974) e Alfano *et al.* (1974) isolaram *C. histolyticum* de placa gengival humana; Brazier *et al.* (2004) identificaram infecções em usuários de drogas injetáveis no Reino Unido causadas por esta espécie e Del Mar Gamboa *et al.* (2005) determinaram a presença dessas bactérias em solos da Costa Rica. Rosa *et al.* (1983) relataram sobre o isolamento e identificação de *C. histolyticum* em lesões de um paciente brasileiro vítima de acidente com ofídios. No Brasil, Ferreira *et al.* (2004) encontraram diferentes cepas do gênero *Clostridium* em fezes de crianças com diarreia, incluindo espécies do mesmo grupo do *C. histolyticum*.

3.1.1. Fermentação de aminoácidos por espécies de *Clostridium*

A degradação de aminoácidos a partir de um substrato protéico é feita por microrganismos proteolíticos, os quais fermentam aminoácidos individualmente ou utilizam diversos aminoácidos, como oxidantes ou redutores, ou podem combinar o catabolismo de aminoácidos preferencialmente (JACKSON *et al.*, 2006, NEUMANN-SCHAAL *et al.*, 2015). As reações de oxidação são semelhantes às catalisadas por microrganismos aeróbios, enquanto que as reações de redução são diferenciadas, pois cada microrganismo deve gerar

um ou mais receptores de elétrons, de potencial redox adequado para cada aminoácido que pode ser metabolizado (BARKER, 1981, MATTHEW *et al.*, 2009).

A maioria dos anaeróbios não possuem α -cetoglutarato desidrogenase, portanto, não apresentam o ciclo do ácido cítrico completo (Figura 1 A); α -cetoglutarato e succinil-CoA servem como precursores para várias vias de biossíntese e a obtenção de energia é fundamentalmente obtida através da fosforilação em nível de substrato (NELSON & COX, 2004). Um exemplo é a formação de ATP durante a redução da glicina à acetato e amônia; estes dois últimos compostos, juntamente com H_2S , H_2 , CO_2 , etanol, butirato e butanol são sub-produtos comumente encontrados em fermentações com espécies *Clostridium*, conforme Figura 1B, que apresenta uma visão geral das principais vias metabólicas em *Clostridium* sp. para produção de butanol (verde), etanol (vermelho) e hidrogênio (azul), com reações redox envolvendo NAD(P), Fd e geração de ATP, através da catálise de glicose (MAZZOLI, 2012).

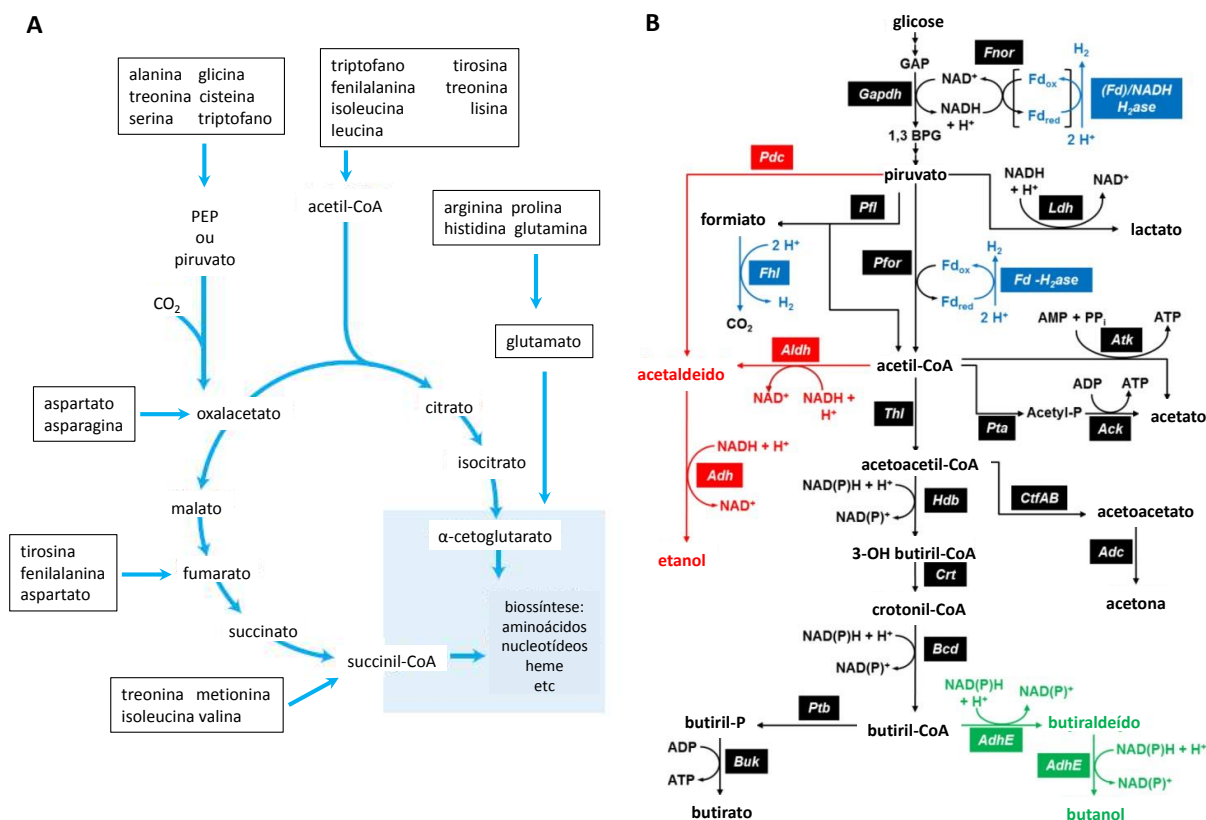


Figura 1. A. Ciclo de Krebs incompleto em bactérias anaeróbias e a relação com aminoácidos. B. Visão geral das principais vias metabólicas em *Clostridium* sp. para produção de butanol (verde), etanol (vermelho) e hidrogênio (azul). Abreviaturas: 1,3 BPG, 1,3 bisfosfoglicerato; Acetil-P, acetil fosfato; Butiril-P, butiril fosfato; Fd, ferredoxina; Ack, acetato quinase; Adc, acetoacetate descarboxilase; AdhE, aldeído/álcool desidrogenase; Atk, acetate tiotransferase; Bcd, complexo butiril-CoA desidrogenase; Buk, butirato quinase; Crt, crotonase; CtfAB, acetoacetyl-CoA:acil-CoA transferase; Fnor, ferredoxina:NAD(P)⁺ oxidorreductase; H2ase, hidrogenase; Hbd, 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase; Ldh, lactato desidrogenase; Pfor, piruvato:ferredoxina oxidorreductase; Pdc, piruvato descarboxilase; Pta, fosfotransacetilase; Ptb, fosfotransbutirilase; Thl, tiolase (MAZZOLI, 2012).

Para o metabolismo de aminoácidos por microrganismos anaeróbios, uma estreita faixa redox é necessária. Geralmente meios de cultura para *C. histolyticum* contêm agentes redutores, como tioglicolato de sódio; glicose, aminoácidos e os subprodutos destes durante o metabolismo anaeróbio, como hidrogênio e sulfeto de hidrogênio, contribuem para um potencial redox adequado ao processo anaeróbio (TAKAHASHI & SEIFTE, 1972).

Segundo Gale (1941), a quebra dos aminoácidos por enzimas microbianas, considerando a degradação imediata, pode ocorrer a partir de quatro reações diferentes: 1) Desaminação ou remoção do grupo amino na posição α do aminoácido; 2) Descarboxilação ou remoção do grupo carbonila; 3) Desaminação acompanhada por descarboxilação; 4) Catálise do aminoácido em moléculas menores por descarboxilação ou desaminação.

Em geral, para cada microrganismo, pode ser observada particularidade no metabolismo, como por exemplo, no trabalho de Buckel & Barker (1974), os quais observaram que *Clostridium tetanomorphum* e *Peptococcus aerogenes* fermentam glutamato a produtos idênticos, mas usavam vias metabólicas completamente distintas. Essa evidência alertou novamente para possíveis equívocos de supor que os dois microrganismos convertem o mesmo substrato, aos mesmos produtos, e que possuiriam o mesmo sistema enzimático.

Muitos dos produtos da fermentação de aminoácidos por *Clostridium* sp. são substâncias de odor desagradável, produzido pela putrefação resultante de sua atividade proteolítica. Além dos ácidos graxos, produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S), metilmercaptano (a partir de aminoácidos sulfurados), cadaverina (a partir da lisina), putrescina (a partir da ornitina) e amônia. As purina e pirimidinas, liberadas na degradação de ácidos nucleicos, originam vários dos mesmos produtos de fermentação e geram ATP a partir dos derivados de ácido graxo-CoA produzidas em suas respectivas vias fermentativas (MADIGAN *et al.*, 2010). Além disso, dióxido de carbono, monóxido de carbono, formiato, metanol, metalaminas, compostos S-metilados e Se-metilados podem ser formados como sub-produtos do metabolismo de *Clostridium* sp. Adicionalmente, *C. histolyticum* pode produzir compostos metilados voláteis, como metano, metenotiol e dimetildissulfeto (RIMBAULT *et al.*, 1988).

Baseado na informação do DEL MAR GAMBOA e colaboradores (2005), apesar das diversas linhagens de *C. histolyticum* serem consideradas não-sacarolíticas, conseguem degradar açúcares, mas são más fermentadoras de carboidratos simples, como glicose, maltose, entre outros, pois a adição de glicose (e outros açúcares) no meio de cultura pode causar a redução do crescimento bacteriano (CRISTÁLIA, 2013).

Em condições anaeróbias, os aminoácidos são oxidativamente desaminados e descarboxilados, produzindo ácidos graxos voláteis. Durante o processo, ocorre a geração de elétrons, necessários para a degradação dos aminoácidos. A degradação oxidativa também é possível pelo uso do aminoácido como receptor de elétrons através da chamada reação de *Stickland*, na qual a oxidação de um aminoácido é simultânea à redução de outros. Além disso, o acetato pode servir como aceptor de elétrons para a oxidação de aminoácidos, os quais podem ser reduzidos a butirato via β -oxidação invertida (ATO *et al.*, 2014).

3.1.2. Reação de Stickland por espécies de *Clostridium*

Em 1935, Stickland, utilizando suspensões de *Clostridium sporogenes*, descobriu que este microrganismo utilizava em menor proporção aminoácidos individuais, porém degradava eficientemente certos aminoácidos aos pares, em reações de oxidorredução (STICKLAND, 1935a, 1935b e 1935c). Posteriormente, a reação foi batizada como *Stickland*, e foi descrita em muitas espécies de *Clostridium* (BARKER, 1981).

Nessa reação, um aminoácido atua como doador de elétrons, sendo oxidado, enquanto o outro aminoácido é o receptor de elétrons, sendo reduzido (Tabela 2). *Clostridium sporogenes*, por exemplo, cataboliza uma mistura de glicina e alanina; nessa reação, a alanina é o doador de elétrons e a glicina, o receptor (Figura 2). Um mapa metabólico central de *C. sticklandii*, com as vias metabólicas relevantes, utilização de aminoácidos e as vias envolvidas na conservação de energia é apresentado na Figura 3. Os produtos da reação de *Stickland* são NH_4^+ , CO_2 e um ácido carboxílico com um carbono a menos que o aminoácido oxidado (MADIGAN *et al.*, 2010), conforme Equação 1:

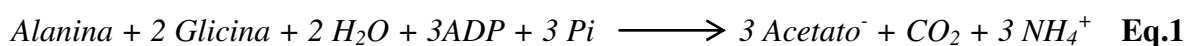


Tabela 2. Pares de aminoácidos participantes da reação de *Stickland* (MADIGAN *et al.*, 2010).

Aminoácidos oxidados	Aminoácidos reduzidos
Alanina	Glicina
Leucina	Prolina
Isoleucina	Hidroxiprolina
Valina	Triptofano
Histidina	Arginina

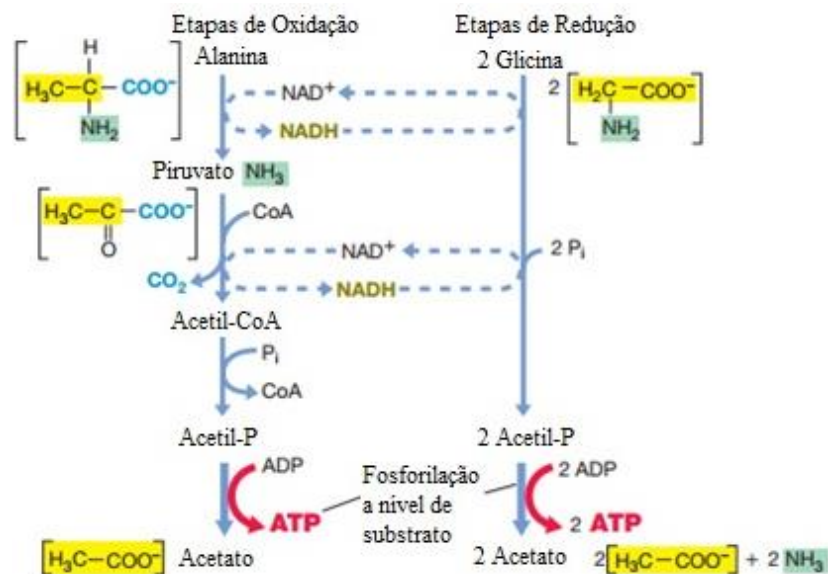


Figura 2. Reação de *Stickland*, exemplificando o catabolismo de glicina e alanina (MADIGAN *et al.*, 2010).

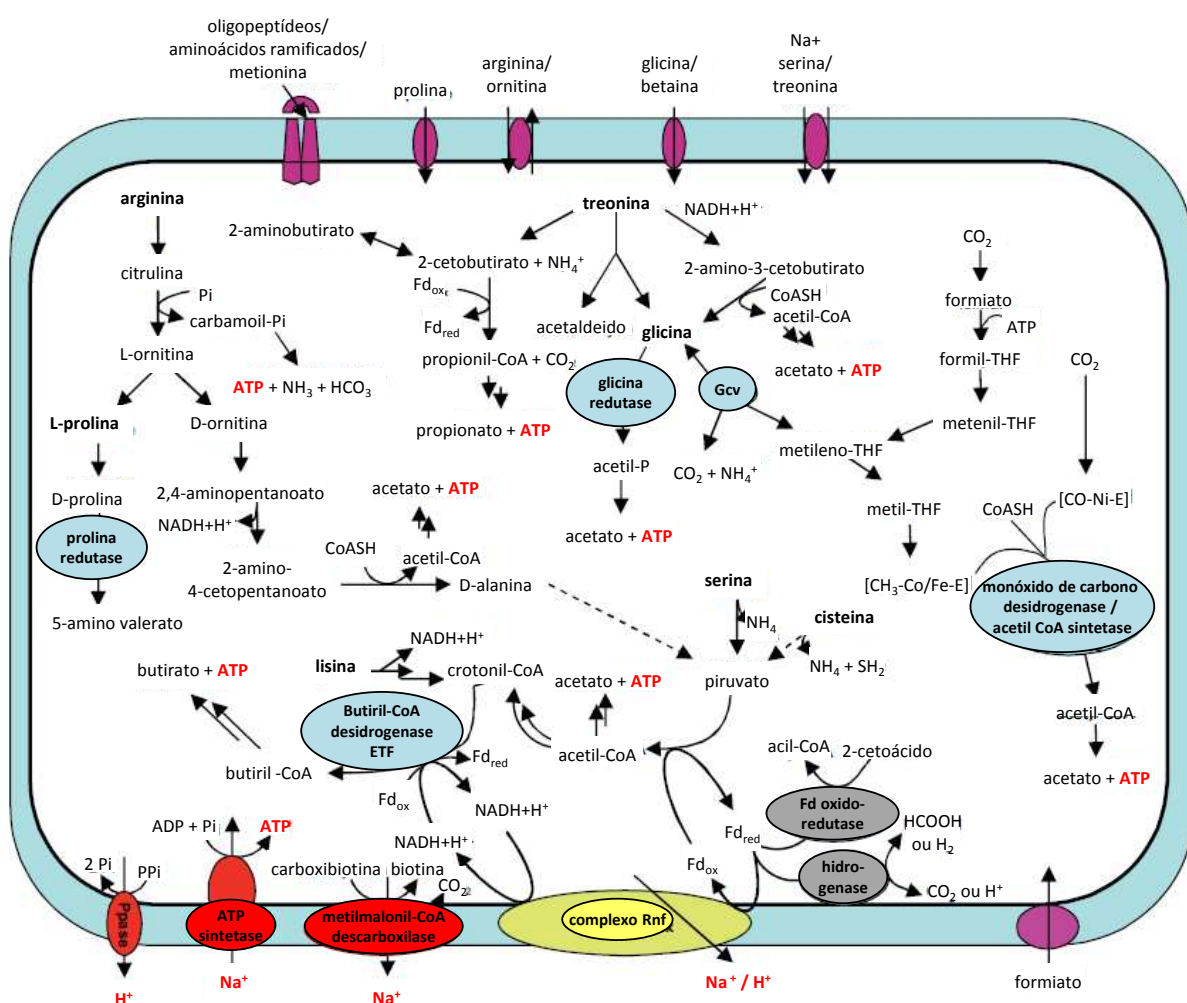


Figura 3. Mapa metabólico central de *C. sticklandii*, com as vias metabólicas relevantes, utilização de aminoácidos e as vias envolvidas na conservação de energia.

Fonknechten e col. (2010) observaram que *C. sticklandii* degrada aminoácidos de um modo preferencial e sequencial, dentre eles, treonina, arginina, serina, cisteína, prolina, glicina, ao passo que glutamato, aspartato e alanina são excretados, e a conservação de energia é obtida por fosforilação em nível de substrato no processo fermentativo.

3.1.3. Metabolismo individual de aminoácidos por espécies de *Clostridium*

Algumas espécies de *Clostridium* fermentam aminoácidos individualmente (e não aos pares), geralmente glutamato, glicina, alanina, cisteína, histidina, serina ou treonina. Na maioria desses casos, os aminoácidos são metabolizados a subprodutos derivados de ácido graxo-CoA, normalmente acetil, butiril ou caproil, produzindo ATP através de fosforilação em nível de substrato, gerando NH₃ e CO₂ (MATTHEW *et al.*, 2009, MADIGAN *et al.*, 2010).

A assimilação dos aminoácidos individuais por algumas espécies de *Clostridium* pode ser por simples difusão ou através da força próton-motriz. A força próton-motriz gerada por oxidação de monóxido de carbono (CO) em vesículas da membrana de *Clostridium thermoautotrophicum* direcionam o transporte ativo de L-alanina, glicina e L-serina ao interior celular (HUGENHOLTZ & LJUNGDAHL, 1990).

Boyd *et al* (1948) demonstraram que os aminoácidos arginina, leucina, histidina, isoleucina, metionina, treonina, fenilalanina, triptofano, valina, ácido glutâmico, serina, cistina e tirosina são essenciais para o crescimento de *Clostridium perfringens* BPGK e que a omissão de qualquer um destes aminoácidos resultou em muito pouco ou nenhum crescimento microbiano. Clifton (1942) estudou o metabolismo de *C. tetani* em diversos meios de cultura e verificou que dióxido de carbono, amônia, ácido acético e ácido butírico foram os principais produtos do metabolismo de, ácido glutâmico e ácido aspártico; a catálise do ácido aspártico produziu ácido láctico e etanol. O autor do estudo concluiu que o metabolismo de aminoácidos por *C. tetani* não era através da reação de *Stickland*, que o microrganismo não catabolizava glicose e os mesmos produtos são produzidos durante a dissimilação de ácido pirúvico, ácido fumárico e ácido málico, diferentemente para a utilização de fumarato.

3.1.4. Metabolismo de aminoácidos por *C. histolyticum*

Em 1971, Mead avaliou o crescimento de trinta espécies proteolíticas de *Clostridium* em dois meios de cultura diferentes, contendo ou glicose (1% m/v) ou caseína

hidrolisada com ácido (3% m/v) como fonte de energia. Destas espécies, quinze foram selecionadas e, após o crescimento, foi avaliada a utilização de determinados aminoácidos e os microrganismos foram então divididos em quatro grupos principais: Grupo I - utilizam prolina com a produção de ácido δ -amino-valérico; Grupo II - utilizam principalmente arginina e/ou glicina; Grupo III - utilizam glutamato, serina e histidina; Grupo IV - utilizam serina e treonina (Tabela 3) (MEAD, 1971).

Tabela 3. Crescimento das diferentes cepas de *Clostridium* que metabolizam aminoácidos no meio de cultura VL (extrato de levedura, triptona, extrato de carne, glicose e cisteína, pH 7,2-7,4) e meio de cultura contendo glicose ou hidrolisado de caseína como fonte de energia. Crescimento expresso como leitura nefelométrica arbitrária (MEAD, 1971).

Grupos	Espécies de <i>Clostridium</i>	Cepa (código)	Meio de cultura		
			VL	Glicose	Hidrolisado de Caseína
I	<i>C. bifermentans</i>	2912	47	62	40
	<i>C. sordellii</i>	6927	65	49	22
	<i>C. botulinum</i> , tipo A	887	62	62	58
	<i>C. botulinum</i> , tipo B	751	64	80	70
	<i>C. caloritolerans</i>	9360	48	52	55
	<i>C. sporogenes</i>	532	70	36	47
	<i>C. cochlearium</i>	4721	20	13	46
	<i>C. difficile</i>	871	86	61	54
	<i>C. putrificum</i>	4718	16	12	45**
II	<i>C. botulinum</i> , tipo C	C9	54	49*	19* (32I)
	<i>C. histolyticum</i>	503	29	10	18 (54I)
	<i>C. cochlearium</i>	6797	26	11	32**
	<i>C. subterminale</i>	9384	43	36	40
III	<i>C. cochlearium</i>	17787	51	56	41
	<i>C. tetani</i>	279	34	18	43
	<i>C. tetanomorphum</i>	500	64	62	43
	<i>C. microsporum</i>	25	69	48	42
IV	<i>C. putrefaciens</i>	9836	35	36	44

* 0-1% de Extrato de levedura adicionado.

I Crescido em meio tripticase.

** Meio 6% de caseína hidrolisada por ácido.

Neste trabalho de Mead (1971), *C. histolyticum* foi classificado como integrante do Grupo II, no qual as espécies não produzem δ -amino valerato e metabolizam arginina e/ou glicina. Dentro deste grupo, ele foi inserido na subdivisão IIA, juntamente com o *C. botulinum* tipo C. Nesta classe, a arginina foi metabolizada por todas as cepas (incluindo as seis cepas de *C. histolyticum*) e geralmente metabolizavam glicina (exceto por uma cepa de *C. botulinum*); não ocorreu a utilização de tirosina e a maioria das cepas de *C. histolyticum* também metabolizaram serina (MEAD, 1971).

Assim como Mead (1971), Elsdén e Hilton (1979) identificaram que *C. histolyticum* catabolizava glicina e arginina, e que algumas cepas utilizavam serina, produzindo ornitina, ácidos graxos voláteis e ácido acético, sendo este último proveniente do metabolismo de glicina.

Conforme destacado por Elsdén *et al.* (1976), uma característica dos resultados obtidos no trabalho de Mead (1971) foi que, tanto *C. histolyticum*, como *C. aminovalericum* e *C. sporosferoides*, não apresentaram capacidade de metabolizar aminoácidos aromáticos.

O complexo proteolítico de *C. histolyticum* pode promover a desaminação de aminoácidos, em condições alcalinas, tais como: glicina, alanina, leucina, ácido glutâmico e triptofano; adicionalmente, este complexo proteolítico pode ser ativado pela presença de manganês; o pH ótimo para desaminação enzimática destes aminoácidos em meio alcalino é 7,6, com formação de ácido succínico como sub-produto (KOCHOLATY *et al.*, 1938). Lebertz e Andreesen (1988) mostraram que *C. histolyticum* desenvolveu-se em meio de cultura contendo glicina, arginina, ou treonina como único substrato, podendo cada aminoácido ser catabolizado individualmente, não pela reação de *Stickland*. Na presença de dois aminoácidos, ocorreu a degradação de arginina precedida de glicina e parcialmente inibida pela treonina.

3.2. Produção de collagenases por *C. histolyticum*

A produção de proteases extracelulares em microrganismos é fortemente influenciada por componentes do meio de cultura, especialmente pelas fontes de carbono e nitrogênio, e fatores físicos como, por exemplo, pH, temperatura, carga de inóculo, velocidade da agitação e tempo de incubação. Não há um meio de cultura geral para a produção de proteases por diferentes linhagens microbianas (CRISTÁLIA, 2013).

As collagenases podem ser produzidas por diversos tipos de microrganismos, dentre eles estão bactérias e fungos (RIPPON & LORINCZ, 1964; FUKUSHIMA & OKUDA, 2004). Das bactérias do gênero *Clostridium* produtoras de collagenases destacam-se: *C. perfringens*, *C. limosum*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. bifermentans* e *C. novyi*, além de *Bacillus anthracis* (Figura 4), as quais apresentam similaridade entre si e são de grande interesse comercial. Dentre os fungos, o grupo dos dermatófitos, incluindo espécies do gênero *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (RIPPON & HOO, 1971, LÓPEZ- MARTÍNEZ *et al.*, 1994; LACAZ *et al.*, 2002) também são produtores de collagenases.

Dentre os microrganismos produtores de collagenases, o mais utilizado comercialmente é o *C. histolyticum*, bactéria a qual se apresenta estrategicamente vantajosa, pois pode ser cultivada em grandes quantidades de meios de cultura líquidos, com formulação relativamente simples, em processo fermentativo relativamente simples, obtendo-se elevada produção e secreção de enzimas proteolíticas no meio de cultura (ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, 1974; BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP, 2012).

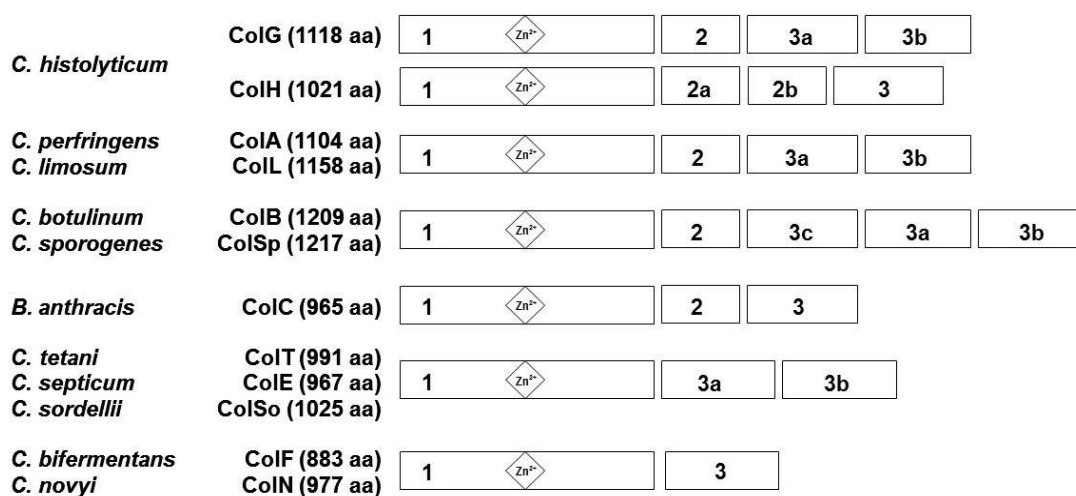


Figura 4. Análise comparativa dos domínios das collagenases de *C. histolyticum* (ColG e ColH), *C. perfringens* (ColA), *C. limosum* (ColL), *C. botulinum* (ColB), *C. sporogenes* (ColSp), *C. tetani* (ColT), *C. septicum* (ColE), *C. sordellii* (ColSo), *C. bifermentans* (ColF), *C. novyi* (ColN) e de *Bacillus anthracis* (ColC) – 1: Domínio catalítico de clivagem do colágeno. A presença de resíduos que formam um motivo de ligação à Zn^{2+} é determinante para a atividade catalítica da enzima; 2, 2a e 2b: Região caracterizada como *linker* entre os domínios 1 e 3; 3, 3a, 3b e 3c: Domínios de ligação ao colágeno. Variantes que não apresentam o domínio 3 degradam apenas formas desnaturadas do colágeno (gelatina).

O processo produtivo para obtenção de collagenases consiste basicamente em processo fermentativo, o qual produz as collagenases de classes I e II, além de outras proteases e pigmentos, seguido por uma etapa de recuperação, purificação, liofilização e formulação. O processo fermentativo comumente utilizado para a produção de collagenases é a batelada simples, a base de meios nutritivos contendo fonte de carbono, nitrogênio, vitaminas, sais, aminoácidos, entre outros (BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP, 2012, AUXILIUM US HOLDINGS, LLC, 2010).

Peptonas e extratos de levedura são os componentes comumente utilizados na formulação dos meios de cultura para a produção de collagenases por *C. histolyticum* em escala comercial, sendo a peptona principal fonte de nitrogênio, proveniente de uma mistura de vários compostos solúveis em água, formados durante a hidrólise de proteínas à aminoácidos e peptídeos, obtida por digestão enzimática ou hidrólise ácida de produtos naturais, tais como tecidos animais, leite, plantas ou mesmo culturas microbianas. Outros exemplos de meio de cultura usados na produção são o caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI), que é um meio de cultura altamente nutritivo, rico em colágeno e comumente usado para processos fermentativos com espécies de *Clostridium* (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 2009) e caseína obtida a partir de leite (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION, 1997).

A escolha dos ingredientes para composição do meio de cultura deve considerar aspectos fisiológicos e bioquímicos da linhagem e da enzima produzida, incluindo a presença ou ausência de indutores e/ou inibidores em substratos complexos, como peptonas, caseína ou extrato de levedura. Licona-Cassani *et al.* (2016) analisaram a produção de toxina por *C. tetani* em meio de cultura contendo mistura complexa de peptídeos (hidrolisados de caseína ou peptona) e observaram que um subconjunto de aminoácidos livres é consumido, enquanto os peptídeos são degradados. Os autores argumentam que um sistema de transporte de peptídeos possa estar relacionado com a mudança na taxa de crescimento da Fase I para a Fase II. Cinco peptídeos derivados de caseína foram preferencialmente consumidos, os quais contêm, similarmente, um domínio Pro-Phe-Pro, que foi referido como inibidor de zinco-protease. Considerando que a toxina do tétano é uma metaloprotease de zinco, assim, é possível que *C. tetani* consumiu esses peptídeos para bloquear a degradação da toxina ou a atividade de outras metaloproteases de zinco.

Entretanto, assim como o BHI e caseínas, os meios de cultura contendo tecido de origem animal introduzem o risco de contaminação por príons, causadores de encefalopatias espongiformes transmissíveis (também conhecido como o mal da vaca louca), característica indesejável para a formulação de proteínas com fins terapêuticos e de atenção regulatória crescente, que vem sendo gradualmente substituídos nos processos de manufatura (MOOKHTIAR *et al.*, 1992; CRISTÁLIA, 2013).

Alternativamente, meios de cultura contendo componentes vegetais, ou de origem não-animal, têm sido utilizados, como: peptonas de soja, peptona de ervilha, peptona de algodão, peptona de trigo, peptona de feijão e gelatina de peixe (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 2009). Estes meios de cultura são utilizados e podem apresentar os mesmos rendimentos no processo produtivo (ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, 1974).

Sequencialmente, o fermentado obtido é processado para remoção de células microbianas, geralmente por ultrafiltração. Posteriormente, o clarificado pode ser concentrado por precipitação salina (sulfato de amônio) ou por filtração tangencial em membranas de fibra oca. As etapas de filtração permitem a remoção parcial de pigmentos, endotoxinas, detritos celulares, atividades enzimáticas indesejáveis e redução da carga biológica (ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, 1974, BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP, 2012, ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 2009, CRISTÁLIA, 2013). Dependendo do produto que se deseja obter, o preparado de collagenases é purificado por cromatografia de troca iônica. Preparados comerciais de collagenases com alto grau de pureza, destinados ao isolamento celular, ou em outras aplicações que exijam a apresentação de fármacos injetáveis, por exemplo, são obtidos em processo utilizando meios de cultura sintéticos e processos cromatográficos específicos, garantindo níveis mínimos de endotoxinas e baixa carga microbiana (VITACYTE, 2016, ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, 1974, BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP, 2012, ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 2009, ALIPOUR *et al.*, 2016).

Para aplicação na dissociação de tecidos, as collagenases passam por um processo de purificação para reduzir as atividades de proteases inespecíficas, presentes nos extratos, que podem causar proteólise das collagenases. Além disso, essas proteases também ativam as células dissociadas, promovendo a secreção de citocinas e direcionando à mecanismos bioquímicos para apoptose, como observado durante exposição de ilhotas pancreáticas

transplantadas, presentes em formulações de collagenases parcialmente purificadas, conduzindo à perda celular (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION, 1997).

Desta forma, para obtenção de um alto grau de pureza, um controle em processo envolvendo monitoramento por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é essencial, permitindo a distinção entre as collagenases, no qual os cromatogramas devem identificar os picos isolados de collagenases e monitorar a ocorrência de sobreposição de picos no perfil por HPLC ou a perda de domínios catalíticos, indicativo de um produto em que as formas de collagenases individuais são indistinguíveis (VITACYTE, 2016).

A remoção de pigmentos, provenientes da composição de meios de cultura complexos, é essencial para obtenção de collagenases puras, a qual é realizada através de processos cromatográficos, utilizando uma resina de afinidade. Contudo, atenção deve ser dada à aplicação de extratos brutos à coluna, devido a possibilidade de ocorrer danos irreparáveis à resina, uma vez que os pigmentos frequentemente precipitam e se ligam irreversivelmente à coluna (VITACYTE, 2016).

Vários fornecedores (Sigma, Worthington, Advance Biofactures, Roche, Serva, entre outros) comercializam preparações brutas ou parcialmente purificadas de collagenases, que variam muito na sua composição. As preparações brutas podem conter, além de collagenases da classe I e II, pigmentos, gelatinases, clostripaínas, protease neutra, tripsinas, elastases, amilase, celulase, pectinase, quitinase, sialidase, hialuronidase, lipases, fosfolipases e nucleases. Por outro lado, estes preparados brutos podem ser purificados, resultando em preparados com elevado grau de pureza contendo as collagenases isoladas das classes I e II (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION, 1997, ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, 1974, BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP, 2012, ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 2009, ALIPOUR *et al.*, 2016).

A contribuição de cada classe de enzima dependerá da finalidade de aplicação. As collagenases juntamente com hialuronidase e sialidase, por exemplo, estão muito envolvidas no processo de degradação dos componentes da matriz extracelular, utilizadas para o debridamento enzimático de lesões dérmicas e no isolamento de ilhotas pancreáticas (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 2009, CRISTÁLIA, 2013). A Liberase® (Roche), utilizada no isolamento celular, contém uma mistura de collagenase I, collagenase II, clostripaína e protease neutra, a qual apresenta uma interação sinérgica, promovendo maior recuperação da massa de ilhotas.

3.3. Colágeno

O colágeno, principal substrato das collagenases, é encontrado em todos os animais multicelulares e representa cerca de 25% das proteínas do corpo humano. Suas fibras insolúveis e com grande força de tensão tornam o colágeno o componente com a maior capacidade de suportar o estresse dos tecidos conjuntivos como: ossos, dentes, cartilagens, tendões, ligamentos, matrizes fibrosas da pele e vasos sanguíneos (JUNG & WINTER, 1998).

A estrutura do colágeno é formada por uma tripla hélice constituída de trincas de aminoácidos com a sequência Gly-X-Y, repetida, aproximadamente, 338 vezes ao longo das cadeias polipeptídicas, onde 15-30% dos resíduos nas posições X e Y são Prolina e 4-Hidroxiprolina, cadeias denominadas de procolágeno, que enroladas em tripla hélice formam unidades de tropocolágeno, que orientadas lado a lado, formam fibrilas, as quais são estabilizadas por ligações cruzadas de Aldol entre as cadeias e as unidades de tropocolágeno (Figura 5). As fibrilas de colágeno são compostas de agregados de moléculas de colágeno ao longo de um eixo paralelo, mas cujas extremidades são igualmente sobrepostas para produzir bandas de 70 nm. O conjunto de fibrilas formam as fibras de colágeno, que se organizam em feixes (MATSUSHITA & OKABE, 2001, SILVA & PENNA, 2012, BEELEY *et al.*, 2000, RAMUNDO & GRAY, 2000).

O colágeno apresenta estrutura molecular relativamente simples e é insolúvel em água, devido aos aminoácidos hidrofóbicos. As ligações peptídicas estão presentes nas formações das ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias, resultado da interação entre os grupos aldeídos e grupos aminos livres. Essas ligações cruzadas fornecem a estabilidade e a força tensora necessária à estrutura supramolecular. Existem quatro resíduos-chave envolvidos no início das ligações das cadeias do tropocolágeno: dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o N-terminal; e dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o C-terminal. O arranjo cabeça cauda-torso das moléculas de tropocolágeno permite a interação entre os peptídeos contendo o N-terminal com os peptídeos adjacentes contendo o C-terminal (SILVA & PENNA, 2012, RAMUNDO & GRAY, 2000).

O percurso helicoidal dessa superestrutura é dextrogiro, sentido oposto ao enrolamento das hélices polipeptídicas individuais, que é levogira. Essas duas conformações permitem um enrolamento mais apertado possível das múltiplas cadeias polipeptídicas. O enrolamento da tripla hélice fornece uma grande resistência às forças de tensão, sem nenhuma capacidade para o estriamento. Assim, o colágeno apresenta uma resistência mecânica que é

aumentada pelo enrolamento helicoidal de múltiplos seguimentos em uma super-hélice, de uma forma muito parecida a cordões enrolados entre si e sobre si mesmo, para formar uma corda mais resistente. A molécula de colágeno tem 280 nm de comprimento, com massa molecular de 300.000 Da (SILVA & PENNA, 2012).

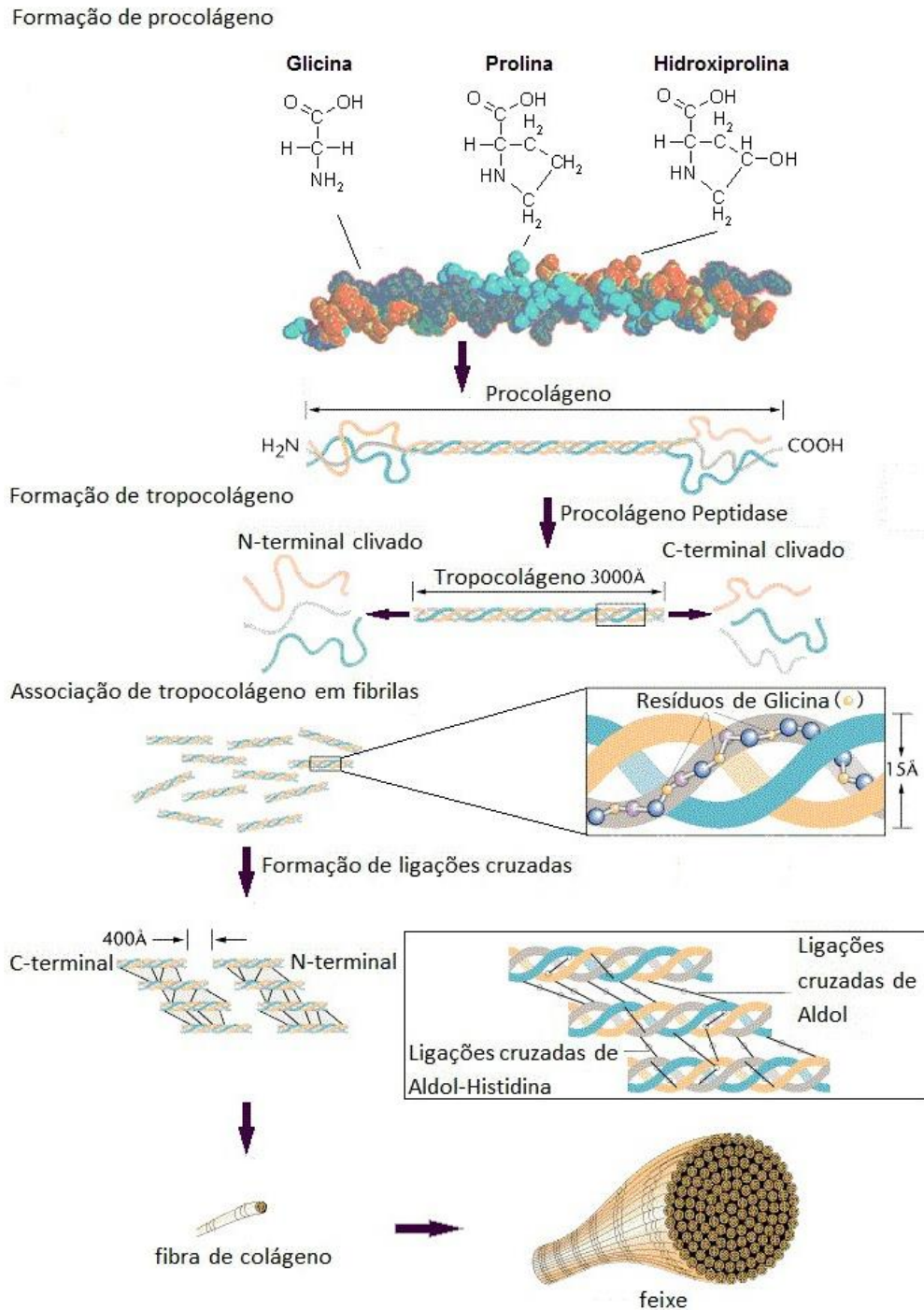


Figura 5. Representação esquemática da formação, organização e estrutura da fibra de colágeno, constituída por um grupo de moléculas formando uma configuração de tripla hélice (tropocolágeno), cadeias enroladas de procolágeno, com a sequência de aminoácidos glicina (GLY), prolina (PRO) e hidroxiprolina (HYP) (SILVA & PENNA, 2012).

O processo de cicatrização após lesão dérmica envolve a formação de fibras de colágeno nativo onde os tecidos necrosados permanecem presos à superfície da ferida, através das fibras de colágeno, não permitindo a correta cicatrização. Para a isso, é necessário remover o tecido necrosado e os detritos contendo proteínas, através de debridamento (seja mecânico ou enzimático). Em particular o debridamento enzimático, em que as collagenases são empregadas, as fibras de colágeno são digeridas, separando estruturalmente a tripla hélice em pontos específicos, originando fragmentos menores, degradados por outras proteases ou desnaturados pela temperatura corporal (McCALLON *et al.*, 2014).

O colágeno tem contribuído para algumas patologias, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e periodontal, propagação de células tumorais, artrite e ulceração de tecidos. Além disso, o requerimento de colágeno para pele, cabelo e tecido ósseo aumenta com o envelhecimento, devido a diminuição da síntese do colágeno. Com isso, o crescimento de produtos derivados de colágeno para aplicação em medicamentos, cosméticos, cuidados com a saúde, além de bebidas e alimentos aumentou consideravelmente nos últimos anos (PAL & SURESH, 2016).

3.4. Collagenases

Em 1959, a primeira collagenase comercialmente disponível, isolada a partir de *C. histolyticum*, foi oferecida por Worthington, constituindo apenas um preparado bruto de enzima (WORTHINGTON, 1959, HOLMBECK & BIRKEDAL-HANSEN, 2013). Contudo, relatos de ação collagenolítica datam de 460-370 d. C. (GOLDMAN & GREEN, 2015).

As collagenases (EC 3.4.24.7, de origem animal e EC 3.4.24.3, de origem microbiana) são endopeptidases e metaloproteases, cuja única especificidade é a hidrólise de moléculas de colágeno, através da ligação peptídica entre Gly-Pro e o resíduo X da unidade de repetição de tripeptídeo, em sítio característico, na região de tripla hélice (BIRKEDAL-HANSEN, 1987, WATANABE, 2004). O zinco e o cálcio possuem papel fundamental na estrutura e atividade da enzima. O zinco encontra-se no sítio ativo, sendo utilizado para a catálise (domínio catalítico), enquanto o cálcio aumenta a ligação ao colágeno, no domínio de ligação, além de aumentar a estabilidade da enzima. O conteúdo destes metais, geralmente, é de um mol de zinco e dois a sete mols de cálcio por mol de enzima (MATSUSHITA & OKABE, 2001, BOND & VAN WART, 1984b, OHBAYASHI *et al.*, 2012; ECKHARD *et al.*, 2012).

As preparações comerciais de collagenases geralmente contêm isoenzimas e isoformas, com massas moleculares de 68,0 – 130,0 kDa e pontos isoelétricos entre 5,35 e 6,20. Os tipos de collagenases são nomeados como collagenases α , β , γ , δ , ϵ , ζ ou η , divididas em classes I (Col G) e II (Col H), e as principais características são apresentadas na Tabela 4 (BOND & VAN WART, 1984b; MOOKHTIAR & VAN WART, 1992, MANDL *et al.*, 1953, MANDL *et al.*, 1958, SEIFTER *et al.*, 1959, HARPER *et al.*, 1965).

Tabela 4. Propriedades das collagenases de *C. histolyticum* Classe I e Classe II.

Classe	Gene de origem	Interação com colágeno	Substratos preferenciais	Sub-tipos	Massa Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico (pI)
I	Col G	Alta (sítios preferencias N e C terminais)	Colágeno de tripla hélice (intacto)	α	68.0	5,85; 5,90
				β	115.0	5,55; 5,60; 5,75
				γ	79.0	6,10; 6,20
				η	130.0	-
II	Col H	Baixa (sítios preferenciais em sequências peptídicas intenas)	Pequenos peptídeos >	δ	100.0	5,80
			Colágeno desnaturado (gelatina) > Colágeno	ϵ	110.0	5,90; 5,95
			de tripla hélice (intacto)	ζ	125.0	5,35

Estruturalmente, as collagenases são compostas pelos domínios S1, S2 e S3. Enquanto o domínio S1 contém a região catalítica e o S2 tem função estrutural, o domínio S3 é responsável pela ligação ao colágeno nativo. A Figura 6 mostra a representação esquemática da estrutura dos segmentos das collagenases G e H de *C. histolyticum*, após alinhamento da sequência de aminoácidos e estrutura dos domínios (VITACYTE LLC, 2009).

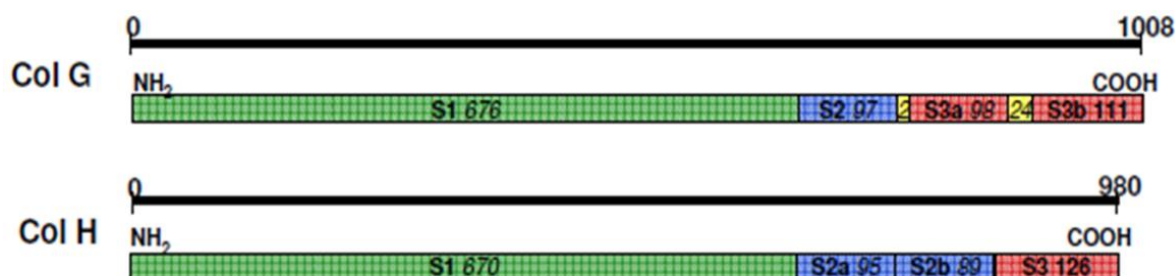


Figura 6. Representação dos grupos, constituintes e domínios presentes nas collagenases (G e H) identificadas nos sobrenadantes de fermentados de *C. histolyticum*. São mostrados os domínios S1 (catalítico, em verde), S2 (estrutural, em azul) e S3 (ligação ao colágeno, em vermelho). A região em amarelo são regiões sem alinhamento (adaptado de VITACYTE LLC, 2009).

Desta forma, apenas as proteínas que apresentam o domínio S3 completo (colagenases G e H) são capazes de degradar a complexa estrutura do colágeno como apresentado na Figura 7. As demais, com domínios S3 parciais ou ausentes, são incapazes de ligar-se e degradar o colágeno nativo, mas mantêm a propriedade de degradar colágenos parcialmente enovelados ou desnaturados, as chamadas gelatinases. Devido a este fato, por definição, essas variantes são chamadas de gelatinases (MATSUSHITA *et al.*, 1998).

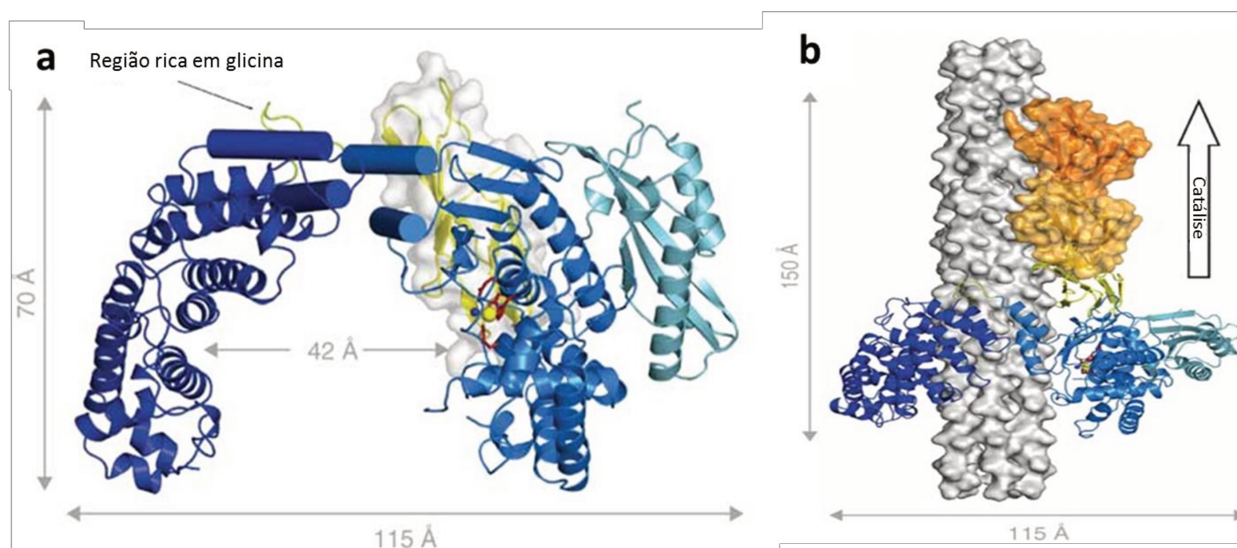


Figura 7. Representação da colagenase (ColG) e ligação com uma microfibrila de colágeno. a) Representação da molécula de colagenase em fita; b) Colagenase ligada a uma microfibrila de colágeno (cinza), com dois domínios de ligação ao colágeno (laranja) e domínio catalítico (azul) (Adaptado de ECKHARD *et al.*, 2011).

A divisão das colagenases em classes I e II foi baseada na origem do gene bacteriano, ColG e ColH, respectivamente, e no ponto de ataque hidrolítico da molécula de colágeno – enzimas de classe I atuam no *loci* próximo do final do domínio tripla hélice do colágeno, enquanto as enzimas de classe II realizam clivagens internas como mostra a Figura 8 (THOMAS, A., BAYAT, 2010, MOOKHTIAR & VAN WART, 1992, MALLYA *et al.*, 1992, FRENCH *et al.*, 1987). Contudo, as isoformas das colagenases podem estar ligadas a duplicação gênica; apesar de colagenases de classe I e II apresentarem 72% de identidade entre os genes e 43% de identidade das proteínas, semelhança na estrutura e mecanismos de ação, elas diferem em suas sequências, indicando a existência de uma relação evolucionária entre elas, ou seja, uma classe se originou da outra por duplicação gênica (WORTHINGTON, 1959, BOND & VAN WART, 1984b).

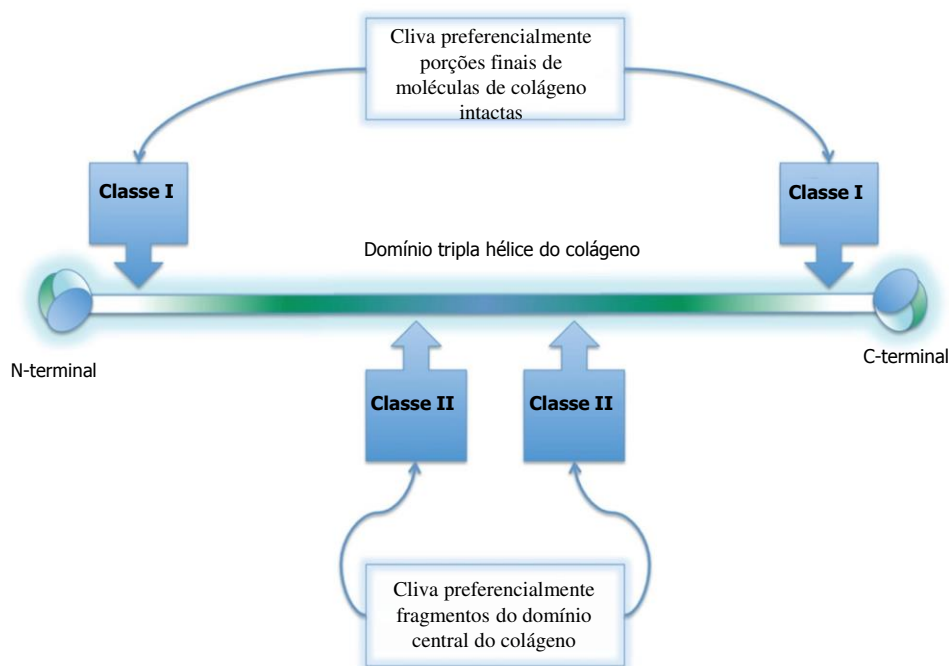


Figura 8. Colagenases de *C. histolyticum* e catálise do colágeno: classe I clivam em *loci* próximos aos domínios N e C terminais do colágeno, classe II clivam dentro do domínio central do colágeno.

As atividades enzimáticas das colagenases I e II são complementares, e a ação combinada dessas duas classes, em muitos locais ao longo da cadeia peptídica, resulta em clivagem sequencial de pequenos segmentos, pois ambas as classes têm domínios de ligação específicos que lhes permitem reconhecer e se ligar a tripla hélice do colágeno (MATSUSHITA & OKABE, 2001, TOYOSHIMA *et al.*, 2001).

3.5. Tratamentos terapêuticos com colagenases

Métodos terapêuticos não invasivos têm sido recentemente utilizados nos procedimentos médicos. Nesse sentido, destaca-se o uso das colagenases, em diversas aplicações, como seu uso tópico e até injetável (XIAFLEX, 2016, ALIPOUR *et al.*, 2016).

O colágeno, presente em todos os animais multicelulares, pode ser produzido em excesso pelo organismo, depositado em locais inadequados ou não ser degradado no tempo correto. Nesses casos, as colagenases possuem aplicação clínica efetiva, nos tratamentos de debridamento celular, queimaduras, cicatrização de feridas e lesões, e aplicação potencial no tratamento de doença de Peyronie, doença de Dupuytren, glaucoma, hernia de disco intervertebral, reparo de cartilagem, celulite, quelóide, degradação da placenta retida, dor nos

mamilos, oclusões totais crônicas, vitrectomia, fibroma uterino, lipoma e capsulite adesiva, como sumariza a Tabela 5 (XIAFLEX, 2016, ALIPOUR *et al.*, 2016).

3.5.1. Debridamento celular, queimaduras e cicatrização de feridas

O conhecimento de cicatrização de feridas avançou a partir do século XIX, quando já se compreendia a importância do controle da infecção, hemostasia e tecido necrótico. A partir das descobertas de citocinas e fatores de crescimento (década de 1950), estabeleceram-se novas abordagens no tratamento, buscando alternativas fisiologicamente implicadas com o processo de cicatrização (EMING *et al.*, 2007).

O debridamento desempenha um papel crucial no preparo do leito cicatricial em feridas crônicas, eliminando tecidos desvitalizados/necróticos. Trata-se de prática preconizada universalmente, e considerada parte essencial para o controle da ferida e sua cicatrização (RAMUNDO & GRAY, 2009, ALIPOUR *et al.*, 2016).

O uso de collagenases em debridamento enzimático iniciou-se por volta dos anos 50, nos Estados Unidos, como tratamento de queimaduras de terceiro grau, quando os primeiros trabalhos demonstraram que o tecido necrótico repousava em fibras de colágeno não desnaturado, tornando clara a compreensão de que a limpeza do leito da ferida só poderia ser efetuada a partir do rompimento destas fibras. Com a ruptura das fibras e a liberação do tecido necrótico, a granulação pode ser iniciada, estimulando os queratinócitos e suportando a fase posterior de epitelização, podendo aumentar a proliferação, angiogênese e migração das células da derme, como mostra a Figura 9. Atualmente o debridamento enzimático com collagenases, endossado pelo FDA, encontra-se referenciado como uma alternativa comprovada em inúmeras publicações e através da prática médica rotineira para o tratamento de queimaduras, feridas e ulcerações cutâneas, substituindo o debridamento cirúrgico, com redução de riscos, sangramento e custos (RILEY & HERMAN, 2005, RAMUNDO & GRAY, 2008; FDA, 2016).

Tabela 5. Aplicações terapêuticas das collagenases, aprovadas pelo FDA, incluindo Debridamento celular, queimaduras, cicatrização de feridas, doença de Dupuytren e Peyrone, e estudos clínicos ou experimentais, incluindo tratamento para glaucoma, hérnia de disco intervertebral, reparo de cartilagem, celulite, quelóide, degradação de placenta retida, dor nos mamilos de mulheres lactantes, oclusões totais crônicas, vitrectomia, fibroma uterino, isolamento celular e de ilhotas pancreáticas, lipoma e capsulite adesiva (ALIPOUR *et al.*, 2016).

Tratamento	Ação
Debridamento celular, queimaduras e cicatrização de feridas	Remove os tecidos necrosados agregados ao colágeno da área da ferida e estimula os queratinócitos, podendo aumentar a proliferação, angiogênese e migração das células da derme (macrófagos, queratinócitos)
Doença de Peyrone	Degrada as placas de colágeno denso e imaturo tipo III, com fibras elásticas reduzidas e fragmentadas que está em excesso na túnica albugínea.
Doença de Dupuytren	Atua nas cordas e nódulos de deposição anormal de colágeno localizado nas palmas das mãos.
Glaucoma	Auxilia no tratamento de cicatrizes intraoculares e fibroses pós-cirurgia de glaucoma.
Hérnia de disco intervertebral	Degradação de tecidos de colágeno agregados nos discos vertebrais da espinha vertebral. As collagenases clivam especificamente o colágeno, conduzindo a diminuição ou desaparecimento de hérnia.
Reparo de cartilagem	O tratamento consiste no implante de condrócitos isolados a partir de almofada de gordura infrapatelar juntamente com líquido sinovial obtido por centrifugação das células.
Celulite	Atua no septo que armazena a gordura subcutânea do tecido conjuntivo fibroso, dissolvendo o colágeno não estruturado que cobre os micronódulos e ativando a drenagem linfática.
Quelóides (lesões elásticas estáveis ou nódulos fibrosos)	Atua na deposição excessiva de colágeno tipo III após lesões traumáticas ou cirúrgicas na derme e tecidos subcutâneos secundários.
Degradação da placenta retida (humana, bovina e equina)	Digere o colágeno da placenta fetal, uma vez que pode atacar quase todos os tipos de colágeno e separar a placenta na junção fetal-materna.
Dor nos mamilos de mulheres lactantes	Atua no tecido fibroso do papiloma intradutal, tumor de mama benigno, que se forma no ducto lactífero.
Oclusões totais crônicas	Decomposição de colágeno das placas arteroscleróticas e, por conseguinte, um melhoramento no procedimento.
Vitrectomia	Eliminação de tecido fibroproliferativo e s específicos de vitrectomia.

Fibroma uterino	Cliva múltiplas ligações dos colágenos tipos I e III, os quais são abundantemente encontrados em fibróides, degradando completamente as moléculas de colágeno.
Isolamento de ilhotas pancreáticas	Atua na digestão de tecidos conjuntivos, os quais se ligam a outras ilhotas do tecido pancreático.
Isolamento celular	Altera o metabolismo do tecido conjuntivo devido à hidrólise do colágeno nas células hospedeiras.
Lipoma (uso humano e veterinário)	Atua na degradação do depósito de gordura benigna encapsulada.
Capsulite adesiva (ombro congelado)	Degrada as adesões de colágeno na cápsula do ombro e trata o distúrbio.

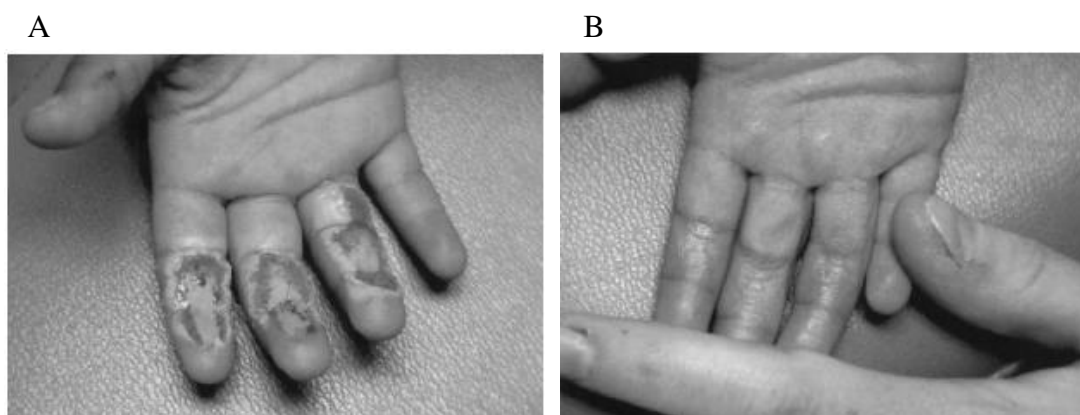


Figura 9. Evolução do tratamento de queimadura através de debridamento enzimático utilizando a pomada collagenase. a) Antes do tratamento; b) após oito semanas do tratamento com pomada collagenase (BANEVER, *et al.*, 2003).

3.5.2. Doença de Dupuytren

Dentre as aplicações terapêuticas, a doença de Dupuytren, causada pela deposição anormal de colágeno, forma nódulos e filamentos nas palmas das mãos, resultando na contração articular, flexionando os dedos para o centro da palma da mão. É uma doença não completamente compreendida, possivelmente ocasionada por fatores genéticos, isquemia de tecidos provenientes de fumantes e diabéticos, além de possíveis trabalhos manuais, epilepsia e alcoolismo; comum em pessoas do sexo masculino, de fase adulta, com elevada incidência em população com ancestrais europeus e mais comuns em população caucasiana. Dentre os tratamentos disponíveis, recomenda-se o uso de collagenases injetáveis, a qual irá atuar na deposição de colágeno, dissolvendo os nódulos e filamentos, consequentemente diminuindo a contratura dos dedos, como mostra a Figura 10 (XIAFLEX, 2016, FDA, 2016, MARTÍN-FERRERO *et al.*, 2016).



Figura 10. Doença de Dupuytren evidenciando a contratura articular no quarto e quinto dedo, resultantes da formação de nódulos e filamentos de colágeno na palma da mão (BIOSPECIFICS, 2016).

3.5.3. Celulite

Um tratamento muito promissor é para a celulite, ou lipodistrofia ginóide, que se trata de uma alteração causada pelo acúmulo de gordura, água e toxinas nas células, fazendo com que as mesmas fiquem encorpadas e endurecidas, deixando o local com ondulações e nódulos, manifestando externamente através do aspecto de "casca de laranja". É causada por alterações no tecido gorduroso sob a pele, além de alterações vasculares e consequente aumento do tecido fibroso.

A celulite pode ser classificada como: celulite fibrosa, que ocorre a degeneração de fibras de colágeno em torno de células de gordura, resultando na perda de elasticidade e compressão de vasos; celulite adiposa, a qual causa a degeneração de adipócitos, resultando no acúmulo excessivo de lipídios; e a celulite edemática, causando a degeneração de glicosaminoglicanos, resultando em polimerização excessiva (BIOSPECIFICS, 2016).

O tratamento para a celulite pode ser feito através do uso das colagenases injetáveis, em emulsão e microemulsão, atuando na dissolução do colágeno amorfo que cobre o nódulo da celulite, relaxando o septo e ativando a drenagem linfática (BIOSPECIFICS, 2016).

3.6. Produção industrial de collagenases por cepa de *C. histolyticum* selecionada e isolada da biodiversidade brasileira

O presente estudo está inserido dentro da linha de pesquisa institucional para produção de collagenases por *Clostridium histolyticum* T248 isolado da biodiversidade brasileira, do Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, o qual forneceu suporte necessário para o desenvolvimento das pesquisas.

O Cristália é um complexo industrial Farmoquímico, Farmacêutico e de Biotecnologia 100% brasileiro. Referência em inovação e tecnologia, o laboratório conquistou 89 patentes e é pioneiro em realizar a cadeia completa de um medicamento, desde a concepção da molécula até o produto final. Focado em pesquisa e inovação, produz 50% dos insumos utilizados em seus medicamentos. Exporta regularmente princípios ativos e produtos acabados para mais de 30 países. Em anestesia, é líder de mercado na América Latina.

Atualmente o Cristália fabrica o preparado comercial Kollagenase (0,6 U/g, e 0,6 U/g com 0,01 g/g cloranfenicol), o qual contém como agente debridante as enzimas collagenases. A enzima é obtida através de processos fermentativos da cepa *C. histolyticum* T248, utilizando um meio de cultura livre de componentes animais. A linhagem de *C. histolyticum* foi isolada e identificada a partir de amostras da biodiversidade brasileira, selecionada por metodologias fenotípicas e genotípicas segundo parâmetros moleculares, microbiológicos e filogenéticos, de acordo com normas estabelecidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), endossado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN).

O Cristália obteve junto ao CNPq a autorização de acesso e de remessa do patrimônio genético (CNPq nº 010007/2012-1) e, após análise de centenas de amostras de solos, isolou e caracterizou o microrganismo *C. histolyticum* cepa Cristália T248, produtor de collagenases, proveniente da biodiversidade brasileira, o qual apresenta características fenotípicas e genotípicas altamente similares à cepa *C. histolyticum* ATCC®21000™, cepa referência utilizada como comparativo nos ensaios de pesquisa e desenvolvimento. Desde então, a cepa Cristália T248 foi submetida à adaptação ao meio de cultura livre de componentes animais, fermentada em escala de até 5 L, seguida de concentração e lavagem das collagenases e culminando na sua caracterização. Os resultados dos estudos mostraram

que a cepa Cristália T248 apresentou produtividade superior à ATCC®21000™, além de maior atividade do princípio ativo (em U/mg), menor nível de impurezas, assim como a ausência de relatos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

O processo de desenvolvimento do meio de cultura livre de componentes animais (contendo peptonas vegetais, extrato de levedura e aminoácidos) e a definição de um novo processo fermentativo, desenvolvidos pelos pesquisadores da Divisão de Biotecnologia do Cristália, tiveram seu pedido de patente depositado em 31/05/2012 sob n°. BR1020120131102, atual PCT/BR2013000192.

Com o objetivo de avaliar e caracterizar o perfil protéico e enzimático das collagenases produzidas por *C. histolyticum* T248 foram implementados e otimizados, métodos analíticos que incluem, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), corados com *Comassie blue* ou a técnica de zimografia, bem como a determinação do perfil protéico dos IFA pelo método quantitativo de Eletroforese Capilar. Esta técnica apresenta maior sensibilidade e reprodutibilidade, além de empregar uma quantidade menor de amostra.

Além das enzimas ColG e ColH, responsáveis pela degradação do colágeno nativo em pH fisiológico, o IFA collagenase T248 também é constituído por proteases neutras e outras, formando um complexo enzimático, tal qual a maioria das collagenases disponíveis no mercado.

Atualmente, a Planta Industrial do Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. para produção de collagenases (Figura 11) está em funcionamento, com Registro do produto e Certificação de Boas Práticas de Fabricação concedidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



Figura 11. Planta Industrial do Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. para produção de collagenase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos na Divisão de Biotecnologia, no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento, da empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. O presente estudo está inserido em projeto institucional para produção de Colagenases. Os ensaios com células microbianas de *Clostridium histolyticum* T248 foram conduzidos em laboratório com Nível de Biossegurança 2 (NB2), seguindo os procedimentos recomendados pelo Ministério da Saúde, com supervisão e anuência da Comissão Interna de Biossegurança da Cristália.

4.1. Linhagem de *Clostridium histolyticum* T248

A linhagem utilizada foi *C. histolyticum* T248, isolada da biodiversidade brasileira, com autorização do CNPq para acesso e remessa do patrimônio genético, com finalidade de pesquisa científica (CNPq nº 010007/2012-1). A cepa está preservada em Bancos de Células (Banco de Células Máster, Banco de Células de Trabalho e Banco de Pesquisa) em Criogenia sob vapor de nitrogênio, em criotubos de 2 mL contendo glicerol 20%, em condições inspecionadas e certificadas pela ANVISA (Figura 12).

A



B



Figura 12. A – Tanque de criogenia contendo banco de células de *C. histolyticum* T248. B – Criotubo do Banco de Células de Trabalho.

4.2. Meio de Cultura

O meio de cultura foi preparado através da dissolução dos componentes em água purificada e posteriormente, após completa dissolução dos reagentes, o pH do meio de cultura foi corrigido para 7,0, através da adição de NaOH 0,5M e o meio de cultura foi esterilizado por calor em autoclave vertical Phoenix (35 minutos, 121 °C para os meios do pré-inóculo e inóculo e 60 minutos, 121 °C para o fermentador). Após a esterilização dos meios de cultura, as soluções dos aminoácidos foram preparadas separadamente, esterilizadas por filtração em membrana 0,2 µm (modelo Millex GP Filter, Millipore) e então adicionadas assepticamente aos meios de cultura. A composição do meio de cultura, livre de componentes animais, encontra-se descrita na Tabela 6, conforme CRISTÁLIA (2013) e a composição de aminoácidos presentes na Peptona de soja e no Extrato de Levedura estão descritos na Tabela 7.

Tabela 6. Composição do meio de cultura de *C. histolyticum* T248 para produção de collagenase.

Componente	Concentração
Extrato de Levedura	30 g/L
Peptona de soja	30 g/L
Monocloridrato de L- arginina	3,75 g/L
Monocloridrato de L- cisteína monohidratada	0,625 g/L

Tabela 7. Composição de aminoácidos da Peptona de soja e Extrato de Levedura.

Aminoácido	Peptona de soja (mg/g)	Extrato de Levedura (mg/g)
Alanina	34	28,4
Arginina	57	12,16
Ácido aspártico	94	18,48
Cistina	17	0,1
Ácido glutâmico	153	54,52
Glicina	33	7,48
Histidina	19	6,42
Isoleucina	29	20,77
Leucina	58	32,24
Lisina	51	14,64
Metionina	9	8,06
Fenilalanina	38	20,49
Prolina	50	3,58
Serina	40	21,69
Treonina	30	17,89
Tirosina	24	4,78
Valina	30	24,53
Triptofano	-	5,93
Asparagina	-	14,09
Cisteína	-	0,13
Glutamina	-	2,49
Hidroxiprolina	-	0,58

:- valores não informados.

** Valores expressos em 100 g de proteína bruta.

4.3. Condições de cultivo

A propagação de *C. histolyticum* T248 foi realizada em três etapas para produção de collagenases: Pré-inóculo, Inóculo e Fermentação em batelada, as quais possuíam a mesma composição do meio de cultura.

4.3.1. Pré-inóculo e Inóculo

O pré-inóculo foi obtido após inoculação de 200 µL da cultura da cepa *C. histolyticum* T248, obtida através de um criotubo depositado na Criogenia, em um tubo de ensaio de 25 mL com tampa de rosca (em triplicata e um controle negativo, sem inoculação).

O inóculo foi obtido pela inoculação de 1,5 mL do crescimento da cultura em tubo de ensaio, em frascos tipo Schott de 250 mL, em triplicata, contendo 150 mL de meio de cultura. Toda a manipulação foi realizada em Cabine de Segurança Biológica (B2, VECO), anualmente certificada.

Os frascos de cultivo foram incubados à 37 °C (em estufa de incubação 410/DE – Ethik technology), em condição estática, por até 12 horas (Figura 13).

Após o período de incubação foi avaliado o crescimento das culturas e o perfil morfológico da cepa, para então proceder à inoculação da cultura em fermentadores de bancada.



Figura 13. Estufa de incubação do cultivo do pré-inóculo e inóculo de *C. histolyticum* T248.

4.3.2. Fermentação

O processo fermentativo foi realizado em batelada, em fermentador agitado mecanicamente de 7,5 L de volume útil (BioFlo 115, Eppendorf, New Brunswick Scientific).

4.3.2.1. Fermentador de bancada

O fermentador utilizado é equipado com uma camisa para controle de temperatura, um motor de agitação e um controlador para aeração. Inclui sensores para monitoramento *on line* da concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e detecção de espuma (Figura 14).



Figura 14. Fermentador BioFlo 115 NBS utilizado para o cultivo em batelada das células de *C. histolyticum* T248.

O fermentador de bancada (BioFlo 115 NBS) encontra-se ligado a uma unidade de controle digital, onde os parâmetros podem ser monitorados e controlados. Cada parâmetro tem o seu próprio ciclo de controle, os quais podem ser alterados diretamente pelo operador ou através de comunicação remota. Acopladas à unidade controladora estão bombas peristálticas, usadas para a adição de ácido ou base, para controle do pH, adição de nutrientes ou adição de antiespumante. A unidade controladora dispõe também de um sistema de controle de aquecimento da camisa, para controle da temperatura, a qual é controlada por microprocessador, com base de cálculos com algoritmos, integral e proporcional. A temperatura média é detectada pelo sensor de temperatura, submerso no interior do fermentador, em poço térmico específico. A unidade controladora também dispõe de controle da velocidade de agitação e vazão de aspersão de gases (ar, nitrogênio ou CO₂) para controle da concentração de oxigênio dissolvido.

Na tampa do fermentador estão destinadas portas para o acoplamento de partes durante a montagem, destinadas à inoculação, adição de base ou ácido, sensor de temperatura, condensador, tubo *sparger*, amostrador, sensor de oxigênio dissolvido, eletrodo

de pH. A caixa de rolamento, castelo, também está localizada na tampa do fermentador. A descrição sumária dos componentes do fermentador está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Componentes do fermentador BioFlo 115, Eppendorf, New Brunswick Scientific.

Componente	Descrição
Vaso de fermentação	Confeccionado em vidro de boro silicato, com camisa externa para controle da temperatura. A tampa do fermentador é confeccionada em aço inox 316L, flangeada, com anel de vedação, para vedação da tampa ao vaso. A tampa do fermentador possui portas específicas para os componentes necessários ao processo.
Sistema de aquecimento	Placa de aquecimento, posicionada na base do vaso de fermentação, com alimentação elétrica.
Agitador	Movimentado por um motor de 55 WDC diretamente acoplado na tampa do fermentador.
Sensor de temperatura	Termômetro de platina (Pt-100).
Eletrodo de pH	Eletrodo de vidro esterilizável com medição potenciométrica (Mettler Toledo).
Sensor de oxigênio dissolvido	Medição polarográfica (Mettler Toledo).
Sistema de alimentação de gases	Ar comprimido, CO ₂ e N ₂ . Controlador mássico. Filtros absolutos.
Controle de pH	Bombas peristálticas para adição de ácido ou base.

O fermentador é alimentado por linhas de gases: ar comprimido, dióxido de carbono e nitrogênio, a partir da central de utilidades do Centro de Desenvolvimento. As linhas de gases são conectadas à unidade controladora, onde está instalado um controlador mássico para gases (*mass flow*), o qual realiza a modulação dos gases e conectam a linha, com filtros absolutos (0,22 µm, Merck-Millipore), às portas específicas na tampa do fermentador, onde está instalado o difusor de gases. Um condensador está acoplado à tampa do fermentador para exaustão dos gases. O fornecimento de água gelada (7/12 °C) é realizado por linha específica, proveniente de um *Chiller* (Mecalor), alocado na Central de Utilidades.

Assim como a unidade controladora, e o fermentador propriamente dito, ambos estão instalados dentro de uma capela de exaustão, que possui filtros HEPA, periodicamente monitorados e certificados, em conformidade às exigências para operação em Nível de Biossegurança 2.

4.3.2.2. Acondicionamento e operação do Fermentador

Para preparo do fermentador e subsequente operação, foi seguido protocolo padrão, conforme descrito abaixo em síntese:

- 1 – Montagem do fermentador, acoplando peças e componentes, amostrador, sensores, eletrodo, filtros, segundo procedimento padrão;
- 2 – Realização do teste de estanqueidade com ar comprimido (manutenção de pressão de 5 psi por 30 minutos);
- 3 - Calibração do eletrodo de pH utilizando padrões de pH 4 e pH 7;
- 4 – Adição do meio de cultura (5,0 L);
- 5 – Esterilização do fermentador em autoclave (121 °C por 60 minutos);
- 6 – Aguardar resfriamento do fermentador e posterior conexão com linhas de água gelada e gases;
- 7 – Conectar cabos dos eletrodos e sensores à unidade controladora;
- 8 – Ajustar e iniciar o set point dos parâmetros de monitoramento, controle e operação do fermentador, na unidade controladora, conforme Figura 15;
- 9 – Ajustar o pH do meio de cultura com adição de NaOH 0,5M, através do sistema automático de controle de pH, que regula atuação da bomba peristáltica em função do pH mensurado até atingir o set point ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$);
- 10 – Calibração do sensor de oxigênio dissolvido: 0% de oxigênio dissolvido calibrado através da aspersão de nitrogênio no meio de cultura, de acordo com o procedimento padrão; 100% de oxigênio dissolvido através da introdução, asséptica, de ar comprimido, nas condições operacionais estabelecidas anteriormente;
- 11 – Iniciar o registro eletrônico através do software Biocommand Batch Control;
- 12 – Manter o fermentador nas condições operacionais até a inoculação;
- 13 – Monitorar o processo e realizar amostragens periódicas.

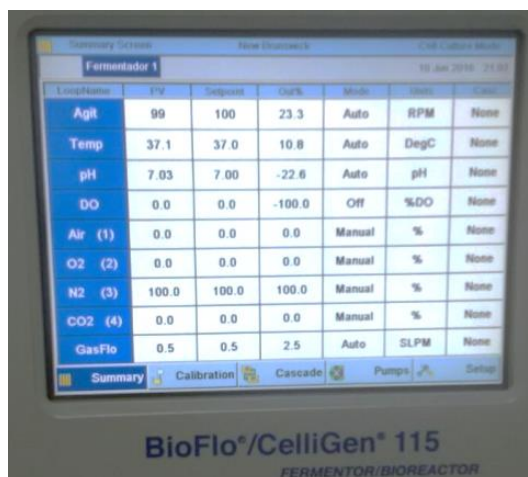


Figura 15. Set point dos parâmetros de operação do fermentador de bancada de 7,5L (NBS) usado para os ensaios de produção de collagenases.

A fermentação foi realizada em 5,0 L de meio de cultura inoculado com 1% da cultura proveniente do inóculo selecionado (50 mL) e conduzida em modo batelada. Os parâmetros de operação foram mantidos e monitorados durante todo processo: 37 °C, 100 rpm, pH 7,0 e 0,5 L/min de aspersão de nitrogênio, por 16 horas.

As amostragens periódicas foram utilizadas para análise do crescimento microbiano, perfil morfológico da cepa, perfil protéico em SDS-Page, atividade de collagenases, análises de aminoácidos, ácidos orgânicos e amônio.

4.3.3. Fermentação em bateladas sequenciais

Na segunda etapa experimental, uma estratégia de processo foi adotada para avaliar o aumento da produtividade volumétrica de collagenases por *C. histolyticum* T248. O processo consistiu na condução de processos fermentativos em bateladas sequenciais.

O sistema de bateladas sequenciais consiste em modo de fermentação semi-contínua, um sistema baseado em “encher e esvaziar”, onde parte do caldo fermentado proveniente de um cultivo em batelada é utilizado como inóculo de outro cultivo subsequente (CRUZ *et al.*, 2012). O processo foi realizado nas mesmas condições operacionais descritas para o processo de batelada simples, contudo, ao final da primeira batelada, 90% do fermentado foi drenado do fermentador ($V_f = 4,50$ L), e adicionado igual volume de novo meio de cultura, recém-preparado, ao fermentador através de cápsula filtrante 0,5/0,2 μm (OPTICAP XL 05 SHC, Millipore). As células remanescentes no meio mantido no fermentador (500 mL) serviram de inóculo para o início da segunda batelada. As

bateladas foram sequencialmente conduzidas, por até 16 horas, por até quatro bateladas sequenciais. Periodicamente foram retiradas amostras para análises de biomassa, microscopia, perfil protéico e atividade de collagenase.

4.4. Recuperação do complexo enzimático contendo collagenases

A recuperação do complexo enzimático com collagenases após o processo fermentativo foi realizada a partir das seguintes etapas: clarificação, concentração por filtração tangencial, liofilização, moagem e homogeneização.

4.4.1. Clarificação do caldo fermentado

Essa etapa consiste na remoção das células microbianas por filtração de fluxo tangencial, com velocidade controlada de 100 rpm na bomba peristáltica, onde as células são retidas pela membrana e retornam para o fermentador, enquanto que o filtrado clarificado contendo as collagenases, é recolhido em recipiente para posterior etapa de concentração.

A clarificação do caldo fermentado foi realizada por sistema de filtração tangencial, em membrana de fibra oca de polissulfona (*hollow fiber*, GE) de 750 kDa com 0,36 m² de área (Figura 16). O fluxo de material clarificado foi controlado para ser mantido entre 10 a 30 L/m².h e a pressão 0,5 a 1,2 bar (10 psi). A pressão transmembrana (TMP) foi monitorada durante o processo.



Figura 16. Sistema de Filtração Tangencial de fibra oca para clarificação com membrana de 750 kDa (seta vermelha) com recirculação em bomba peristáltica (seta azul).

4.4.2. Concentração do clarificado por filtração tangencial

A concentração do caldo fermentado foi realizada em membrana *hollow fiber* de 5,0 kDa com área de 0,065 m² de área (GE) (Figura 17), em banho de gelo. Essa etapa consiste na concentração do caldo clarificado contendo as collagenases, de aproximadamente setenta a oitenta vezes, por filtração em fluxo tangencial, com os seguintes parâmetros: velocidade de 100 rpm, pressão de entrada 8 psi, pressão de saída 10 psi e fluxo de 8 a 15 L/m².h. A concentração permite que moléculas maiores que 5 kDa fiquem retidas e retornem para o frasco, enquanto que o permeado contendo moléculas menores, passem pela membrana e sejam descartadas.



Figura 17. Sistema de Filtração Tangencial de fibra oca para a concentração das collagenases com membrana de 5 kDa.

Com as collagenases concentradas, três lavagens com tampão fosfato de sódio 2 mM pH 7,2 foram realizadas para a remoção de pigmentos e demais impurezas provenientes do meio de cultura, seguida de nova concentração para a obtenção do produto final. Ao final da concentração, foi adicionado tampão de cloreto de cálcio 600 mM. Em seguida a solução foi congelada à -80 °C, em frascos para liofilização.

4.4.3. Liofilização das collagenases

A solução concentrada obtida foi liofilizada no liofilizador modelo ModulyoD (Thermo). O processo de liofilização consiste em três etapas: congelamento e secagem. Os parâmetros do ciclo estão demonstrados na Tabela 9. O tempo de processo nessa etapa foi de aproximadamente 72-80 horas.

Tabela 9. Parâmetros de liofilização das collagenases.

Etapa do ciclo	Temperatura	Pressão	Tempo
Congelamento	-80 °C	N/A*	1:30 hora
Tempo de secagem	-10 °C	150 µbar a 250 mbar	72 - 80 horas

*N/A: Dados não aplicáveis.

Ao final do ciclo de liofilização as amostras são retiradas do liofilizador e levadas para Cabine de Segurança Biológica, para moagem e homogeneização.

4.4.4. Moagem e homogeneização do líofilo

O processo produtivo do insumo farmacêutico ativo collagenase termina com a separação do material liofilizado em partículas da ordem de micrômetros. A classificação de materiais de acordo com o tamanho de suas partículas é chamada de granulometria, que pode ser realizada por diferentes processos, entre eles, o peneiramento.

Após a liofilização, o material liofilizado foi homogeneizado em almofariz e pistilo (previamente esterilizados em autoclave), em seguida foi peneirado em peneira Granutest utilizando uma malha 325, com abertura de 45 microns.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Determinação da concentração de biomassa microbiana

A concentração celular foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro modelo Ultrospec 10 (Amersham Biosciences) à absorbância de 600 nm e os resultados expressos em OD_{600nm}/mL. As leituras das amostras no espectrofotômetro foram realizadas dentro de uma faixa linear de trabalho variando de 0,2 a 0,8 e para isso, a diluição das amostras foi necessária. Amostras retiradas ao longo do processo fermentativo foram analisadas, utilizando para a leitura uma diluição de dez vezes, diretamente na cubeta, contendo 100 µL de amostra e 900 µL de água purificada.

O valor final de absorbância obtido, em cada amostra, foi correlacionado com a massa seca, calculando-se a concentração de biomassa (g/L) através de uma curva de calibração de densidade ótica *versus* massa seca. Como branco foi usado água destilada. Durante o processo fermentativo, com os resultados das leituras de concentração de biomassa, foi construída uma cinética de crescimento microbiano da cepa de *C. histolyticum* T248.

4.5.2. Análise morfológica da cepa

A morfologia das células durante o cultivo foi analisada em Microscópio Ótico Binocular (modelo Eclipse E200, NIKON) utilizando a objetiva com aumento de cem vezes. Para a análise, transferiu-se uma alíquota de 10 µL da cultura do microrganismo em uma lâmina, cobriu a cultura com uma lamínula e adicionou óleo de imersão (Laborclin). As imagens foram detectadas por uma câmera Nikkon DS-Fi 2, acoplada à ocular do microscópio, e registradas através do software Nikkon NIS-Elements F 4.00.00 versão 4.0.

4.5.3. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A análise das amostras de collagenases por eletroforese foi realizada em condição desnaturante em gel de poliacrilamida copolimerizado com dodecil sulfato de sódio (SDS), que por ser um detergente aniônico permite que as proteínas desnaturadas fiquem carregadas negativamente e impedem que a forma influencie na migração ao longo do gel. Em seguida foi aplicada uma corrente elétrica, possibilitando a migração das proteínas no gel e sua separação pela diferença do tamanho molecular. Essa técnica tem como finalidade avaliar o perfil protéico das amostras.

A corrida dos géis foi realizada em cuba de eletroforese vertical miniVE (Amersham Biosciences) com a fonte de Eletroforese (modelo PowerPac Basic, Bio-Rad) com o tampão de corrida (3,03 g/L de tris-base; 18,77 g/L de glicina (Merck); 1,0 g/L de dodecil sulfato de sódio), corrente de 20 mA, potência de 5 W para cada gel e voltagem de 125 V.

Ao término da corrida os géis foram retirados da cuba de eletroforese vertical e revelados separadamente pelos métodos de coloração com nitrato de prata e zimografia.

4.5.3.1. Preparo dos géis de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir da copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida (AMRESCO) na presença de persulfato de amônio (Sigma-Aldrich) e tetrametiletenodiamina (TEMED) (JT Baker), conforme descrito nas Tabelas 10

e 11 e montados em placas de vidro (10 x 10 cm) com 1 mm de espessura. Uma régua, tipo pente, foi colocada na extremidade do gel concentrador para a formação de poços.

Tabela 10. Reagentes utilizados para preparação do gel concentrador de 5%.

Soluções	Volume
Acrilamida 29% : Bis-acrilamida 1%	10 mL
Tris 1,0 M pH 6,80	0,76 mL
SDS 10% (m/v)	0,30 mL
Água ultrapura	8,82 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	60 µL
TEMED	12 µL

Tabela 11. Reagentes utilizados para preparação do gel fracionador de 7,5%.

Soluções	Volume
Acrilamida 29% : Bis-acrilamida 1%	3,50 mL
Tris 1,5 M pH 8,80	3,50 mL
SDS 10% (m/v)	1,40 mL
Água ultrapura	5,60 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	140 µL
TEMED	16 µL

4.5.3.2. Preparo das amostras

A preparação das amostras, realizadas em tubos tipo eppendorf de 0,5 mL, consistiu na utilização de 80 µL de cada amostra do sobrenadante da cultura do fermentado de *C. histolyticum* T248 e 20 µL de tampão de amostra. No sobrenadante das amostras, após a coleta e separação das células do microrganismo, foi adicionado 15 mM de EDTA. As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente e 10 µL foram aplicadas nos poços do gel concentrador.

4.5.3.3. Preparo do tampão de amostra

O tampão de amostra foi preparado conforme descrito na Tabela 12. Um padrão de peso molecular com massa de 10 a 200 kDa (PageRuler Unstained Protein Ladder, #26614, Thermo Scientific) foi adicionado juntamente com as amostras para a quantificação das bandas e análise do peso molecular das amostras.

Tabela 12. Reagentes utilizados para preparação do tampão de amostra.

Reagentes	Quantidade
Azul de Bromofenol	15 mg
SDS	2,40 g
Tris 1,0 M pH 6,80	6 mL
Glicerol anidro	12 mL
Água ultrapura	q.s.p. 36 mL

4.5.3.4. Coloração com Nitrato de Prata

Após a corrida dos géis no sistema de eletroforese, um deles foi revelado com nitrato de prata, onde as bandas contendo proteínas com pesos moleculares diferentes presentes na amostra, foram coradas.

Para a coloração com nitrato de prata, o gel foi retirado das placas de vidro e revelado conforme descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Procedimento de coloração do gel de SDS-PAGE com nitrato de prata.

Solução	Tempo
Álcool etílico 30% (Etanol 96% EMPROVE, Merck) e ácido acético 10% (Merck)	1 hora
Álcool etílico 30%	20 minutos (2x)
Tiosulfato de sódio pentahidratado 0,2 g/L (Merck)	1 minuto
Água ultrapura	10 segundos (2x)
Nitrato de prata 2 g/L (Sigma-Aldrich) e formaldeído 0,75 mL/L (Merck)	20 minutos
Água ultrapura	10 segundos (2x)
Carbonato de sódio anidro 60 g/L (Merck) e 0,5 mL/L de formaldeído solução 36,5 a 38%	Até contraste desejado
Ácido acético 10% foi utilizada	5 minutos
Água ultrapura	10 minutos

4.5.3.5. Zimografia

O método de revelação dos géis por zimografia tem a função de detectar as bandas com atividade gelatinolítica e collagenolítica. No método de zimografia, o gel é incubado com uma solução tampão contendo gelatina onde o gel fica totalmente impregnado com gelatina. Após a incubação com gelatina, o gel também é revelado com corante *Comassie blue*, resultando em um gel azul, com exceção dos locais onde estão presentes as proteínas com atividade gelatinolítica e collagenolítica.

Para a coloração utilizando a técnica de zimografia, o gel foi revelado conforme descrito na Tabela 14.

Tabela 14. Procedimento de coloração do gel de SDS-PAGE pelo método de zimografia.

Solução	Tempo
Triton 2,5% (v/v) (Merck)	30 minutos
Triton 2,5% e Tris 50,0 mM pH 7,4 (Merck)	30 minutos
Tris 50mM, Cloreto de Cálcio 50 mM (Sigma-Aldrich) e Cloreto de Zinco 1 mM pH 7,4 (Sigma-Aldrich)	30 minutos
Tris 50mM, Cloreto de Cálcio 50 mM, Cloreto de Zinco 1 mM e Gelatina 10 mg/mL pH 7,4 (Merck)	2 horas
Água ultrapura	10 segundos (3x)
Metanol 30% (Merck) e ácido acético 10% (v/v)	30 minutos
Comassie blue G-250 2,5 g/L (Merck), 500mL/L de Metanol e 100mL/L de Ácido acético	1 hora
Álcool etílico 96% (p/p) 208,5 mL/L e ácido acético glacial 100 mL/L (Merck)	Até contraste desejado

Após o gel ter sido descorado, ele foi mantido em água ultrapura por 5 minutos para reidratá-lo e, em seguida, foi realizada a fotodocumentação.

Todas as etapas da coloração, tanto para nitrato de prata quanto para zimografia, os géis foram mantidos em agitação tipo gangorra, na velocidade 25 a 30 (modelo 106, Ethik technology) para garantir homogeneidade.

4.5.3.6. Quantificação das proteínas dos géis de SDS-PAGE

A quantificação das bandas das proteínas coradas, tanto por nitrato de prata quanto por zimografia, foram realizadas no Sistema de Fotodocumentação GelDoc EZ Imager – Bio-Rad, software *Image Lab*, com placa White, específica para captar imagens de géis de proteínas corados com *Comassie Blue*, Prata, Zinco e Cobre. Para esse tipo de análise, quantificação absoluta, foram atribuídos valores de massa ou concentração às bandas do padrão. Todas as outras bandas selecionadas nas outras colunas do gel foram quantificadas através da comparação com esta referência.

4.5.4. Determinação da atividade de collagenases

A metodologia utilizada para quantificar a atividade de collagenases foi realizada através do kit EnzChek Gelatinase/Collagenase da Life Technologies™, para análise por fluorescência em microplacas. Este kit contém a gelatina DQ™, que se trata de uma gelatina conjugada a fluoresceína, substrato eficientemente digerido por gelatinases e collagenases. O método baseia-se na quantificação da emissão de fluorescência proveniente da atividade proteolítica das collagenases a gelatina conjugada com fluoresceína, esse ao ser degradado aumenta a emissão de fluorescência, que é proporcional à atividade proteolítica (Figura 18).

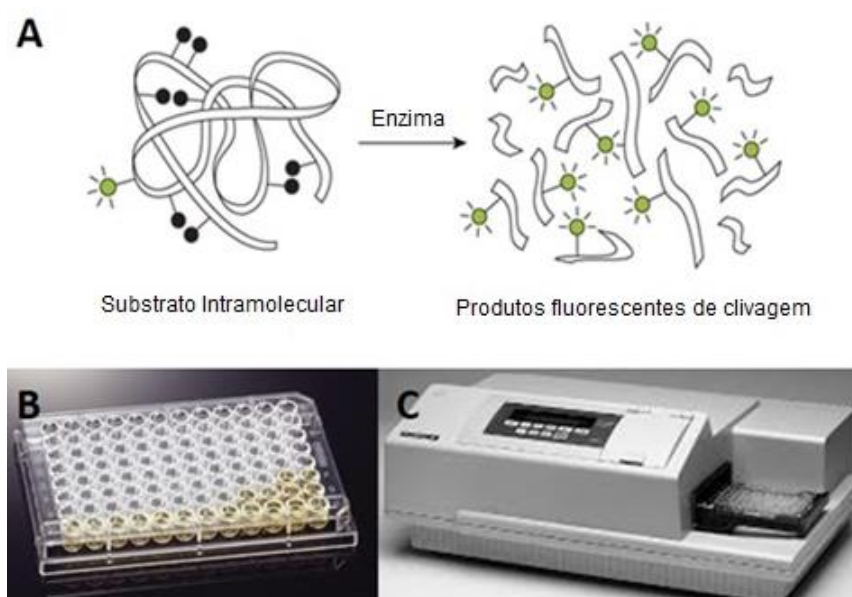


Figura 18. Representação esquemática da reação do kit EnzChek® mostrando substrato sendo clivado pelas enzimas collagenases e produzindo os fragmentos fluorescentes (A). Microplaca para montagem e incubação da reação enzimática (B). Espectrofluorímetro de bancada para leitura da fluorescência (C).

Os reagentes utilizados para essa análise foram preparados de acordo com o manual do kit para obter o tampão na concentração de uso (1:1), uma solução de gelatina 50 µg/mL e uma solução padrão de collagenase 20 mg/mL.

Fazer o preparo da solução de collagenase final para construir a curva padrão, conforme itens abaixo:

- Diluir a solução estoque de padrão de collagenase, utilizando 16 µL da solução de padrão de collagenase 20 mg/mL e 984 µL de tampão (1:1) para obter solução de collagenase 0,32 mg/mL;
- Diluir a solução de collagenase 0,32 mg/mL utilizando 10 µL da solução 0,32 mg/mL e 390 µL de Tampão (1:1), obtendo a solução de collagenase final;

Após o preparo dos reagentes, foi construída uma curva padrão, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Preparo da curva padrão para análise de atividade enzimática de collagenase.

Volume de solução de collagenase final (µL)	Tampão 1x (µL)	Volume Final (µL)	Atividade de collagenases Prevista (mU/mL)
20	80	100	4,558
30	70	100	6,838
40	60	100	9,117
50	50	100	11,396
60	40	100	13,675
70	30	100	15,954
80	20	100	18,234
0	100	100	0

Para quantificação das amostras do processo fermentativo foi necessário diluí-las trezentas vezes para que a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$), em Unidades Relativas de Fluorescência por minuto (RFU/minutos), que ocorre a maior liberação de fluoresceína por intervalo de tempo e é diretamente proporcional à atividade enzimática, ficasse entre 1,0 e 2,5 RFU, intervalo de confiança analítico onde a curva padrão é linear.

A preparação das soluções, amostras, construção de curva padrão, foram realizadas sob refrigeração, nesse caso em gelo, para evitar a degradação das collagenases.

Após a preparação foi transferido um volume de 25 µL de cada amostra para os poços da microplaca de noventa e seis cavidades preta *half area* (ref. 675076 – Greiner Bio-

One™ Brasil), seguida da adição de 25 µL da solução de gelatina 50 µg/mL. A leitura foi realizada no equipamento SpectraMax® M5 (Molecular Devices™), utilizando o software SpectraMax Pro® no módulo fluorescência cinético com a excitação em 495 nm e absorção em 515 nm, monitorando por 15 minutos a 30 °C.

Com os dados obtidos foram utilizados os valores de V_{max} dos padrões e construído um gráfico de dispersão onde X correspondeu às concentrações de enzima das diluições do padrão e Y correspondeu aos valores da leitura de V_{máx} desses padrões. Em seguida, foi inserida uma linha de regressão linear, exibindo o valor de R² e equação da reta.

Assim, com o valor de V_{máx} médio das amostras, foi calculada a atividade da enzima em mU/mL, através das Equações 2 e 3.

$$Y = a + bX \quad \text{Eq. 2}$$

$$X = \frac{V_{\text{max}} - a}{b} \times \text{diluição} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

X = Atividade de collagenase (mU/mL);

Y = V_{máx}: Velocidade máxima de emissão de fluorescência (RFU);

a = coeficiente linear;

b = coeficiente angular.

Os resultados de atividade de collagenases foram então expressos em mU/mL, calculados a partir da curva padrão previamente estabelecida utilizando a solução padrão de collagenase do kit.

4.5.5. Identificação e quantificação dos aminoácidos

A identificação e quantificação dos aminoácidos durante o processo fermentativo foram realizadas por análise de amostras do sobrenadante do cultivo em Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (modelo ULPC H Class Bio, Waters Acquity) de forma a investigar o metabolismo do *C. histolyticum* T248 e suas principais vias bioquímicas durante a produção de collagenases.

A cromatografia líquida de ultra eficiência é uma técnica utilizada para separar e quantificar os aminoácidos presentes nas amostras hidrolisadas, como as proteínas. O método baseia-se na derivatização com AQC (6-aminoquinolil-succimidilcarbamato) e a separação é feita por cromatografia líquida em fase reversa com detecção por UV/PDA (*Ultra Violet/Photodiode array detector*) ou por FLR (*Fluorescence detector*).

As condições analíticas utilizadas estão descritas na Tabela 16.

Tabela 16. Condições cromatográficas para análise dos aminoácidos por UPLC (Waters).

Parâmetros	Especificação
Coluna	AccQ-Tag Ultra C18 1,7 µm 2,1x100 mm (Waters)
Detector	Absorbância em 260 nm;
Fluxo	0,700 mL/min
Temperatura da coluna	43,0 °C
Temperatura da amostra	20,0 °C
Volume de injeção	1,0 µL
Tempo de análise	10,2 min

O gradiente da fase móvel utilizado para a análise está descrito na Tabela 17, onde A corresponde a 100% do eluente A concentrado (AccQ Tag Ultra eluent A-Waters), B corresponde a 90% de água: 10% do eluente B (AccQ Tag Ultra eluent B-Waters); C corresponde a 100% de água grau HPLC e D corresponde a 100% do eluente B (AccQ Tag Ultra eluent B- Waters).

Tabela 17. Gradiente da fase móvel utilizada na análise de aminoácidos por UPLC.

Tempo (min)	%A	%B	%C	%D	Curva de Gradiente
0,0	10,0	0,0	90,0	0,0	11
0,29	9,9	0,0	90,1	0,0	7
5,49	9,0	80,0	11	0,0	6
7,10	8,0	15,6	57,9	18,5	6
7,30	8,0	15,6	57,9	18,5	6
7,69	7,8	0,0	70,9	21,3	6
7,99	4,0	0,0	36,3	59,7	6
8,59	0,0	0,0	36,3	59,7	6
8,68	0,0	0,0	90,0	0,0	6
10,20	0,0	0,0	90,0	0,0	6

A curva de calibração, com os aminoácidos padrões, utilizada para a análise foi preparada conforme Tabela 18:

Tabela 18. Curva de calibração para análise de aminoácidos em UPLC.

Concentração dos padrões	Padrão de aminoácidos 0,25 mM (µL)	Volume água purificada (µL)
500 mM	200	800
250 mM	100	900
200 mM	80	920
100 mM	40	960
50 mM	20	980

Em seguida as amostras foram preparadas com o uso do kit AccQ Tag Ultra (Waters) e analisadas. Para essa análise, as amostras foram derivatizadas, ou seja, foram preparadas utilizando 20 µL do agente derivatizante (2 mL do AccQ-Tag Ultra Eluente B no AccQ-Tag Ultra Eluente A, 6-aminoquinolil-succimidilcarbamato, aquecido por 1 minuto a 55° C); 10 µL da amostra diluída cinquenta vezes; e 70 µL de tampão borato (Waters). O padrão utilizado foi o Padrão de Aminoácido Hidrolizado da Waters.

4.5.6. Determinação dos ácidos orgânicos

A identificação e quantificação dos ácidos orgânicos durante o processo fermentativo foram realizadas por análise de amostras do sobrenadante do cultivo em Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (modelo HPLC, Alliance, Waters) com coluna Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column, de forma a investigar os subprodutos gerados ou ácidos orgânicos consumidos, no metabolismo do *C. histolyticum* T248 durante a produção de collagenases.

Essa metodologia utiliza dois mecanismos de separação, exclusão de íons e fase reversa, devido a presença de grupos carboxílicos e cadeias alifáticas longas.

As condições analíticas utilizadas estão descritas na Tabela 19.

Tabela 19. Condições cromatográficas para análise dos aminoácidos por HPLC (Waters).

Parâmetros	Especificação
Coluna	Aminex HPX-87H
Detector	UV (monitoramento em 210 nm)
Fluxo	0,600 mL/min
Temperatura da coluna	50,0 °C
Temperatura da amostra	4,0 °C
Volume de injeção	20 µL
Tempo de análise	60 min

A fase móvel utilizada para a análise foi a solução de 5mM de ácido sulfúrico e as amostras para a obtenção da curva foram preparadas da seguinte maneira:

- O padrão de ácidos orgânicos da Biorad® foi ressuspensionado em 1 mL de água ultrapurificada, filtrado em 0,45 µm e injetado. Em 1 mL do padrão reconstituído contém 0,8 mM de oxalato de sódio, 4,0 mM de citrato de sódio, 8,0 mM de malato de sódio, 20,0 mM de succinato de sódio, 20,0 mM de formato de sódio e 40 mM de acetato de sódio.
- Ao padrão, foram adicionadas amostras de ácido butírico e piruvato de sódio preparadas na concentração de 40,0 mM.

A amostra com a mistura dos padrões foi preparada adicionando-se 200 µL de padrão Biorad®, 180 µL de ácido butírico, 20 µL de piruvato e as curvas de calibração foram obtidas através da injeção de diferentes volumes das amostras dos padrões, conforme descrito na Tabela 20:

Tabela 20. Curva de calibração para análise de ácidos orgânicos em HPLC.

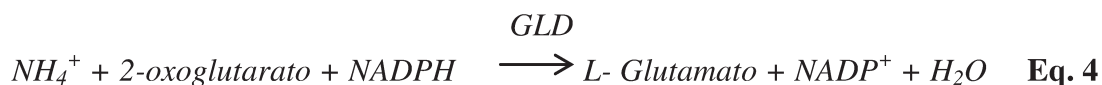
Amostras	Volume Injetado (µL)	Ácido Oxálico (mM)	Ácido Cítrico (mM)	Ácido Málico (mM)	Ácido Pirúvico (mM)	Ácido Succínico (mM)	Ácido Fórmico (mM)	Ácido Acético (mM)	Ácido Butírico (mM)
Padrão 1	20	0,40	2,00	4,00	2,00	10,00	10,00	20,00	18,00
Padrão 2	30	0,60	3,00	6,00	3,00	15,00	15,00	30,00	27,00
Padrão 3	40	0,80	4,00	8,00	4,00	20,00	20,00	40,00	36,00
Padrão 4	50	1,00	5,00	10,00	5,00	25,00	25,00	50,00	45,00
Padrão 5	60	1,20	6,00	12,00	6,00	30,00	30,00	60,00	55,00

Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro 0,22 µm, aplicadas no cromatógrafo, analisadas e quantificadas a partir da curva padrão.

4.5.7. Quantificação de amônio

A quantificação de amônio, comumente gerado em processos fermentativos, foi realizada através de reações bioquímicas, onde ocorre a precipitação do analito ou alteração da coloração da amostra. A coloração é mensurada através de leituras de absorbância. A partir dessa leitura foi possível determinar a concentração do metabólito presente nas amostras do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248.

A reação de identificação do amônio ocorre quando, o amônio dissolvido na presença de glutamato desidrogenase reage com 2-oxoglutarato e NADPH, por meio de uma aminação redutiva, formando como produto L-glutamato e NADP⁺. A redução de NADPH é diretamente proporcional à concentração de amônio e esse composto é medido espectrofotometricamente. A Equação 4 descreve a reação de identificação do amônio.



A análise de amônio foi realizada no equipamento analisador de metabólitos, Cedex Bio Analyzer (Roche), em procedimento padrão estabelecido e validado pelo fabricante, através do seguinte procedimento:

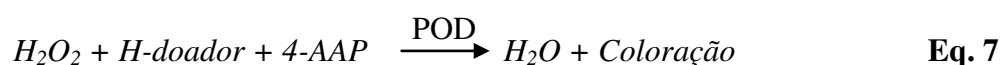
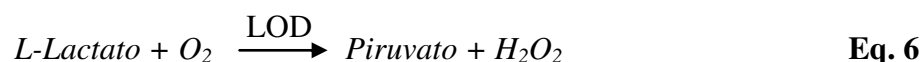
- Inserir no equipamento o reagente, calibrador e controle necessários (Roche) (Reagente: *NH₃ Bio*; Calibrador: *Calibrator B Bio*; e Controle: *Controls B LEVEL 1,2,3 Bio*);
- Calibrar o equipamento, selecionando o teste *NH3D*;
- Selecionar o teste a ser realizado *NH3B* e *NH3D*;
- Aliquotar 200 µL da amostra para tubo de 0,5 mL;
- Inserir as amostras no equipamento e iniciar a leitura de absorbância em 340 nm;
- Ao final do teste, os resultados de NH₃ são convertidos em NH₄⁺, através da Equação 5.

$$\text{Concentração de } NH_3 \text{ (mmol/L)} \times 17,03 \times 1,059 = NH_4^+ \text{ (mg/L)} \quad \text{Eq. 5}$$

4.5.8. Quantificação de ácido láctico

A quantificação de ácido láctico, consumido ou gerado em processos fermentativos, foi realizada através de reações bioquímicas, onde ocorre a precipitação do analito ou alteração da coloração da amostra. A coloração é mensurada através de leituras de absorbância. A partir dessa leitura, foi possível determinar a concentração do metabólito presente nas amostras do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248.

A reação de identificação do ácido láctico ocorre quando o L- lactato é oxidado pela lactato oxidase específica (LOD), formando os produtos piruvato e H_2O_2 , em que, na presença de peroxidase (POD) resulta em coloração. A absorbância dessa coloração é medida espectrofotometricamente, sendo diretamente proporcional à concentração de L- lactato. As equações 6 e 7 descrevem a reação de identificação de lactato.



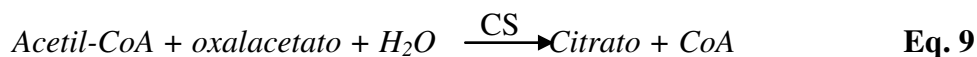
A análise do lactato foi realizada no equipamento analisador de metabólitos, Cedex Bio Analyzer (Roche), em procedimento padrão estabelecido e validado pelo fabricante, através do seguinte procedimento:

- Inserir no equipamento o reagente, calibrador e controle necessários (Roche) (Reagente: *Lactate Bio*; Calibrador: *Calibrator A Bio*; e Controle: *Controls A LEVEL 1,2,3 Bio*);
- Calibrar o equipamento, selecionado o teste *LAC2D*;
- Selecionar o teste a ser realizado *LAC2B* e *LAC2D*;
- Aliquotar 200 μL da amostra para tubo de 0,5 mL;
- Inserir as amostras no equipamento e iniciar a leitura de absorbância em 340 nm;

4.5.9. Quantificação de ácido acético

A quantificação de ácido acético ou acetato, gerado em processos fermentativos, foi realizada através de reações bioquímicas, onde ocorre a precipitação do analito ou alteração da coloração da amostra. A coloração é mensurada através de leituras de absorbância. A partir dessa leitura, foi possível determinar a concentração do metabólito presente nas amostras do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248.

A reação de identificação do acetato ocorre quando o ácido acético é convertido a acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase (ACS). Nessa reação, acetil-CoA reage com oxalacetato na presença de citrato sintetase (CS) e produz citrato. O oxalacetato utilizado é produzido da conversão de L-malato por L-malato desidrogenase (MDH) com a redução de NAD a NADH. A formação de NADH é medida como um aumento na absorbância, o qual é indiretamente proporcional à concentração de ácido acético. As equações 8-10 descrevem a reação de identificação do acetato.



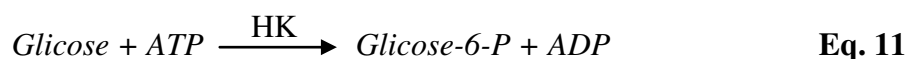
A análise do acetato foi realizada no equipamento analisador de metabólitos, Cedex Bio Analyzer (Roche), em procedimento padrão estabelecido e validado pelo fabricante, através do seguinte procedimento:

- Inserir no equipamento o reagente, calibrador e controle necessários (Roche) (Reagente: *Acetate Bio*; Calibrador: *Calibrator A Bio*; e Controle: *Controls A LEVEL 1,2,3 Bio*);
- Calibrar o equipamento, selecionado o teste *ACD*;
- Selecionar o teste a ser realizado *ACB* e *ACD*;
- Aliquotar 200 µL da amostra para tubo de 0,5 mL;
- Inserir as amostras no equipamento e iniciar a leitura de absorbância em 340 nm;

4.5.10. Quantificação de glicose

A quantificação de glicose, consumida em processos fermentativos, foi realizada através de reações bioquímicas, onde ocorre a precipitação do analito ou alteração da coloração da amostra. A coloração é mensurada através de leituras de absorbância. A partir dessa leitura, foi possível determinar a concentração do metabólito presente nas amostras do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248.

A reação de identificação de glicose ocorre quando, a glicose é fosforilada por ATP na presença de hexoquinase (HK), resultando em glicose-6-fosfato (G-6-P), o qual é oxidado por NADP^+ na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). A taxa de formação de NADPH é medida espectrofotometricamente em UV e é diretamente proporcional a concentração de glicose. As equações 11 e 12 descrevem as reações para a identificação de glicose.



A análise de glicose foi realizada no equipamento analisador de metabólitos, Cedex Bio Analyzer (Roche), em procedimento padrão estabelecido e validado pelo fabricante, através do seguinte procedimento:

- Inserir no equipamento o reagente, calibrador e controle necessários (Roche) (Reagente: *Glucose Bio*; Calibrador: *Calibrator A Bio*; e Controle: *Controls A LEVEL 1,2,3 Bio*);
- Calibrar o equipamento, selecionado o teste *GLC2D*;
- Selecionar o teste a ser realizado *GLC2B* e *GLC2D*;
- Aliquotar 200 μL da amostra para tubo de 0,5 mL;
- Inserir as amostras no equipamento e iniciar a leitura de absorbância em 340 nm;

4.5.11. Eletroforese Capilar com dodecil sulfato de sódio

Amostras de liofilizados obtidas do processo para produção de collagenases foram submetidas a análise por eletroforese capilar.

O sistema de eletroforese capilar utilizado foi o modelo PA800 plus (Beckman Coulter) e as condições analíticas para realização do método SDS capilar (cSDS) para análise de collagenases estão descritas na Tabela 21.

Tabela 21. Condições analíticas para análise de collagenases por cSDS.

Parâmetros	Especificações
Capilar de sílica não revestido	50 µm de diâmetro interno e 30,2 cm de comprimento total
Plugue	abertura de 100 x 200 µm
Detector	<i>Photodiode Array Detector</i> (PDA)
Monitoramento	220 nm
Temperatura do capilar	25 °C
Temperatura da amostra	25 °C
Injeção da amostra	5 kV em polaridade reversa por 20 s
Condicionamento do capilar	37 min
Tempo de análise	45 min

As amostras (5 a 15 mg de amostra liofilizada) foram solubilizadas com solução de EDTA 100 mM e água purificada, calculando os volumes a serem utilizados, de acordo com as Equações 13 e 14:

$$\text{Volume Sol. EDTA 100 mM} = \text{Massa da amostra} \times 1020/19 \quad \text{Eq. 13}$$

$$\text{Volume água purificada} = (100 \times \text{Massa da amostra}) - \text{VEDTA} \quad \text{Eq. 14}$$

Posteriormente, foi adicionado 76 µL de tampão para amostra SDS-MW (Beckman Coulter). Após solubilizada, utilizou-se 19 µL da amostra e adicionou-se 2 µL de padrão interno de 10 kDa (Internal Standard, 10 kDa protein- Beckman Coulter); em seguida, adicionou-se 5 µL de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) à amostra e transferiu todo o volume para o microvial de eletroforese capilar.

Após o preparo, as amostras foram aplicadas e analisadas, utilizando o método SDS MW Separation – PA 800 plus.met. Além do perfil protéico da corrida analisado num eletroferograma, os resultados analíticos expressaram as áreas e altura dos picos das collagenases.

4.5.12. Determinação da pureza e perfil protéico por cromatografia líquida de troca iônica MonoQ

Amostras de liofilizados obtidas do processo para produção de collagenases foram submetidas à análise de pureza e perfil protéico por cromatografia em troca iônica MonoQ, o qual contém resina de diamônio quaternário.

A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Appliance da Waters e as condições analíticas para realização do método MonoQ para análise de collagenases estão descritas na Tabela 22.

Tabela 22. Condições analíticas para análise da pureza através de cromatografia líquida MonoQ.

Parâmetros	Especificações
Detector	DAD, em 280 nm
Coluna	MonoQ 5/50 GL (GE)
Temperatura da coluna	25 °C
Temperatura da amostra	4 °C
Fluxo	1,5 mL/min
Tempo de integração	25 min
Limite de pressão	3000 psi

O gradiente da fase móvel utilizado para a análise está descrito na Tabela 23.

Tabela 23. Gradiente da fase móvel utilizada na análise de pureza por MonoQ.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0,01	100	0
2,00	100	0
22,00	85	15
32,00	0	100
34,00	100	0
40,00	100	0

As soluções utilizadas para essa análise foram preparadas com seguinte maneira:

- Solução A: 20 mM Tris e 1 mM Cloreto de cálcio pH 7,5, avolumado para 1000 mL.
- Solução B: 20 mM Tris, 1 mM Cloreto de cálcio e 1 M Cloreto de sódio pH 7,5, avolumado para 1000 mL.

- Tampão de armazenamento: 5 mM HEPES e 1 mM cloreto de cálcio pH 7,5, avolumado para 1000 mL.
- Solução de amostra: Amostras liofilizadas provenientes das bateladas sequenciais foram diluídas com tampão de armazenamento para obter a concentração de proteína de 40 mg/mL e filtradas em 0,22 µm.
- Branco: Tampão de armazenamento.

Após o preparo, as amostras foram aplicadas e analisadas, utilizando o método MonoQ 46 100. Essa metodologia avalia a pureza da amostra através da separação por carga elétrica resultando em cromatogramas, onde os resultados analíticos expressaram as áreas dos picos das collagenases.

Para avaliar os picos das collagenases, foram utilizados os perfis cromatográficos dos padrões Collagenase I (EC 3.4.24.3) e Collagenase II (EC 3.4.24.3).

4.6. Determinação dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo

4.6.1. Modelagem dos dados experimentais

Para a determinação das velocidades instantâneas de crescimento (rX), formação de produto (rP) e consumo de substrato (rS), curvas sigmoidais foram ajustadas aos dados experimentais de crescimento microbiano, atividade enzimática e concentração de aminoácido, utilizando o modelo de Boltzmann (Equação 15).

$$y = a + \frac{(b - a)}{a + \exp\left(\frac{c - x}{d}\right)} \quad \text{Eq. 15}$$

Onde:

- a: Valor inicial do eixo Y $\rightarrow y(+\infty)$. Assíntota inferior;
- b: Valor inicial do eixo Y $\rightarrow y(-\infty)$. Assíntota superior;
- c: Tempo de fermentação;
- d: Constante de tempo. Nível de espalhamento, inclinação da curva;
- y: valor de concentração calculado a partir do modelo;
- x: Ponto de inflexão da curva sigmoide.

As cinéticas foram construídas através do plote dos dados experimentais e as curvas ajustadas pelo modelo.

4.6.2. Determinação dos parâmetros cinéticos e de fermentação

As velocidades instantâneas de crescimento (r_X), formação de produto (r_P) e consumo de aminoácidos (r_S) foram calculadas de acordo com as equações do método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy e Zajic (1973). As velocidades instantâneas são representadas pelos valores das inclinações das tangentes às respectivas curvas em um tempo t , e são representadas pelas Equações 16-18 (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. 16}$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad \text{Eq. 17}$$

$$r_S = \frac{-dS}{dt} \quad \text{Eq. 18}$$

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) representa a quantidade de células produzidas em relação à quantidade de substrato consumido, e foi calculado utilizando a variação da concentração dos aminoácidos, em Molar ($-\Delta S$), e a variação do crescimento microbiano (g/L) (ΔX), de acordo com a Equação 19:

$$Y_{X/S} \text{ (g.L /M)} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad \text{Eq. 19}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

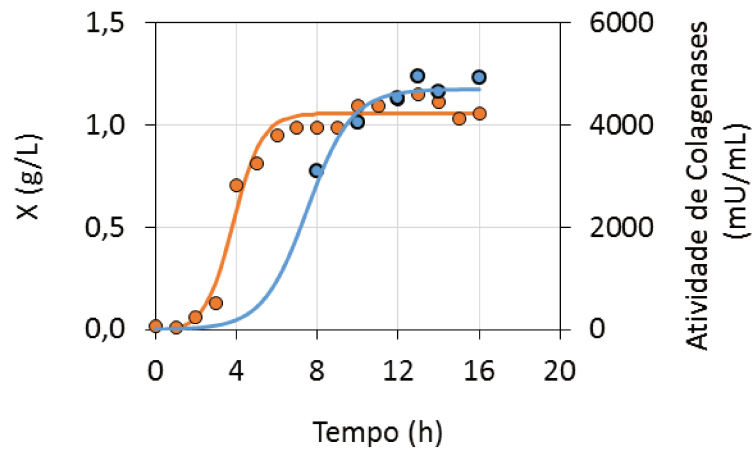
5.1. Cultivo de *C. histolyticum* T248 em batelada simples para produção de collagenases.

A produção de collagenases por *C. histolyticum* T248 foi realizada em meio de cultura líquido, composto por extrato de levedura (3% m/v) e peptona (3% m/v), suplementado com arginina (3,75 g/L) e cisteína (0,675 g/L), pH 7,0, em biorreator com agitação à 100 rpm, 37 °C, por 16 horas. A Figura 18 A apresenta os resultados de crescimento microbiano e a produção de collagenases por *C. histolyticum* T248 nessas condições; os pontos representam os dados experimentais e as curvas sigmoidais foram ajustadas pelo modelo de Boltzmann. A produção de collagenases ocorreu, predominantemente, durante a fase estacionária de crescimento (Figura 19).

O modelo utilizado para descrever os dados de crescimento microbiano e de produção de collagenases apresentou ajuste significativo aos dados experimentais ao longo do processo fermentativo de produção de collagenases ($r^2 = 0,9766$ para X e $r^2 = 0,9952$ para P). A partir das curvas obtidas foram calculadas as velocidades instantâneas de formação de biomassa (r_X) e de produção de collagenases (r_P), os quais atingiram os valores máximos ($r_{Xmáx}$ e $r_{Pmáx}$) de 0,377 g/L.h e 1063,61 mU/mL.h, com 3,75 e 7,50 horas de processo fermentativo, respectivamente (Figura 19 B), evidenciando que a produção de collagenases não está associada a formação de biomassa, já que o microrganismo secreta as collagenases durante a fase estacionária. Os parâmetros cinéticos do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases são sumarizados na Tabela 24.

A análise morfológica dos cultivos de *C. histolyticum* T248, mostrado na Figura 20, confirma a morfologia típica de um bastonete de *Clostridium*, conforme descrito por Hoogerheide (1937).

A



B

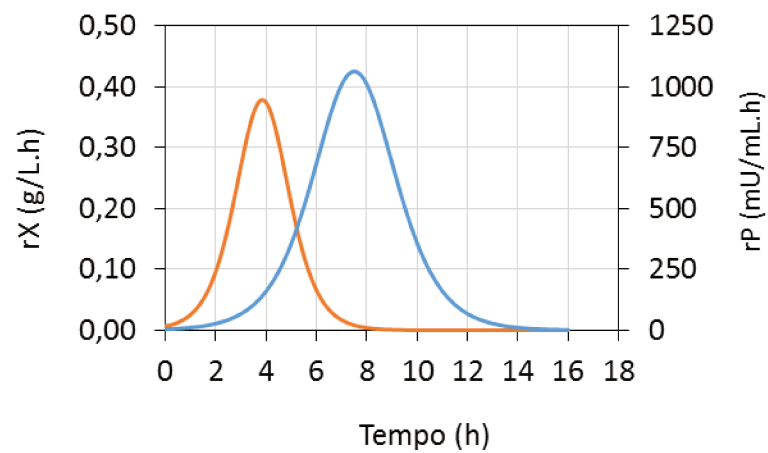


Figura 19. (A) Crescimento de *C. histolyticum* T248 (X , linha e símbolos laranjas) e produção de colagenases (linha e símbolos azuis). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann. (B) Velocidades instantâneas de crescimento, r_X (g/L.h) (linha laranja), e produção de colagenases, r_P (mU/mL.h) (linha azul), durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases. O crescimento foi determinado a partir da conversão de densidade ótica (OD), absorbância à 600 nm, em biomassa seca (1 OD à 600 nm = 0,34 g/L de biomassa).



Figura 20. Análise morfológica do processo fermentativo com *C. histolyticum* para produção de collagenases (16ª hora de cultivo), realizada por microscopia ótica (aumento de 1.000 X).

Tabela 24. Parâmetros cinéticos do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 durante a produção de collagenases.

Parâmetro	Resultados
$t_{X_{max}}$ (h)	6,00
t_f (h)	16,00
X_{max} (g/L)	1,15
$r_{X_{max}}$ (g/L.h)	0,38 (3,75)*
$\mu_{X_{max}}$ (h ⁻¹)	0,7864
$t_{P_{max}}$ (h)	13,00
P_{max} (mU/mL)	4940,97
$r_{P_{max}}$ (mU/mL.h)	1063,61 (7,5)*

$t_{X_{max}}$ = tempo para obtenção de máxima biomassa (h);

t_f (h) = tempo total de processo fermentativo;

X_{max} = máxima biomassa obtida em $t_{X_{max}}$ (g/L);

$r_{X_{max}}$ = velocidade instantânea máxima de formação de biomassa (g/L.h);

$\mu_{X_{max}}$ = velocidade específica máxima de formação de biomassa (h⁻¹);

$t_{P_{max}}$ (h) = tempo para obtenção de máxima atividade de collagenases;

P_{max} = máxima atividade de collagenases obtida em $t_{P_{max}}$ (mU/mL);

$r_{P_{max}}$ = velocidade instantânea máxima de produção de collagenases (mU/mL.h).

*Entre parênteses o tempo no qual foram determinadas $\mu_{X_{max}}$ e $r_{P_{max}}$, em horas.

A análise do perfil protéico das collagenases, através dos géis de SDS-PAGE revelado com prata, das amostras do processo fermentativo, mostram as collagenases de classe I e II, onde são observadas as bandas protéicas majoritárias entre 100 e 120 kDa, as quais são produzidas a partir da oitava hora de cultivo e mostram-se com maior intensidade ao longo do processo fermentativo, até a décima sexta hora de cultivo (Figura 21 A). Similarmente, a zimografia revelou intensidade das bandas de collagenases, em perfil similar às bandas protéicas no gel revelado por prata (Figura 21 B). O gel para a zimografia é completamente impregnado pelo corante *Comassie blue*, exceto nos locais onde estão presentes as proteínas, em sua conformação ativa (collagenases), com atividade gelatinolítica e collagenolítica que, devido à essa ação, a gelatina nesses locais é degradada. Durante a coloração com o corante, o excesso de gelatina presente no gel é corado intensamente de azul, no entanto nas bandas das collagenases ele aparece comparativamente sem coloração, devido a ação gelatinolítica, portanto, indicando atividade gelatinolítica/collagenolítica.

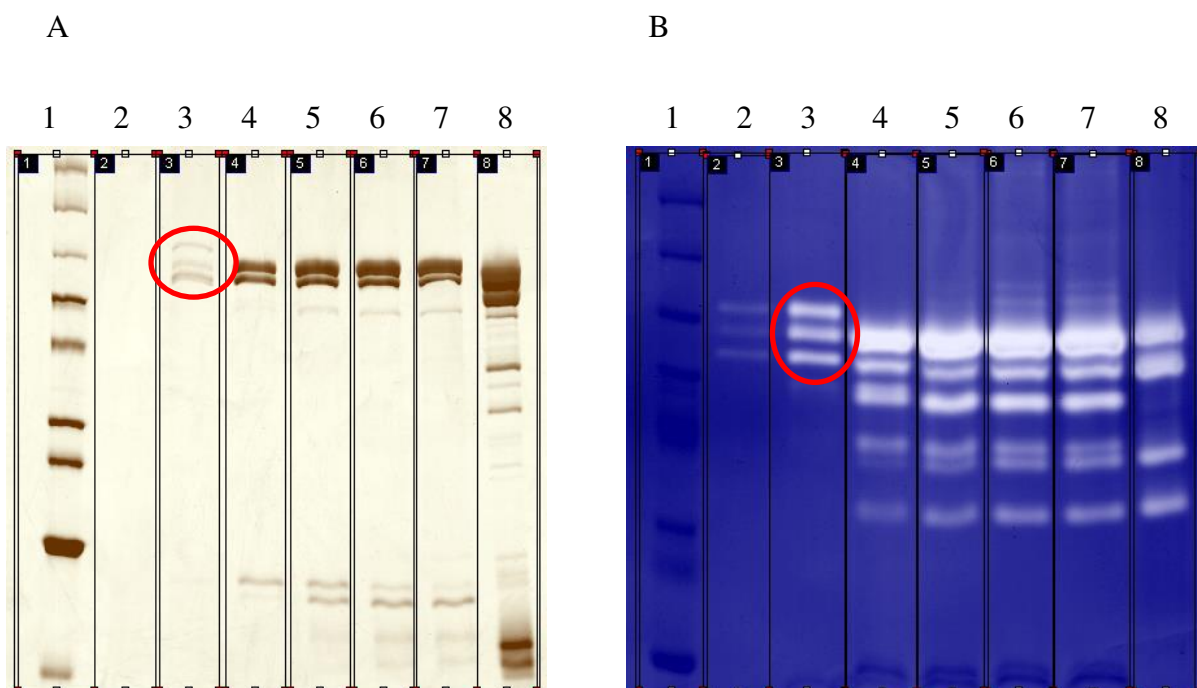


Figura 21. Perfil protéico das amostras do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases (destacadas em círculos vermelhos), analisados por SDS-Page, revelado por prata e por zimografia.

A – Gel de prata; B – Gel de zimografia (Colunas: 1 - Padrão de peso molecular, 2 - Log 6, 3 - Log 8, 4 - Log 10, 5 - Log 12, 6 - Log 14, 7 - Log 16 e 8 - Padrão interno de collagenase).

5.2. Metabolismo de aminoácidos por *C. histolyticum* T248 durante produção de collagenases

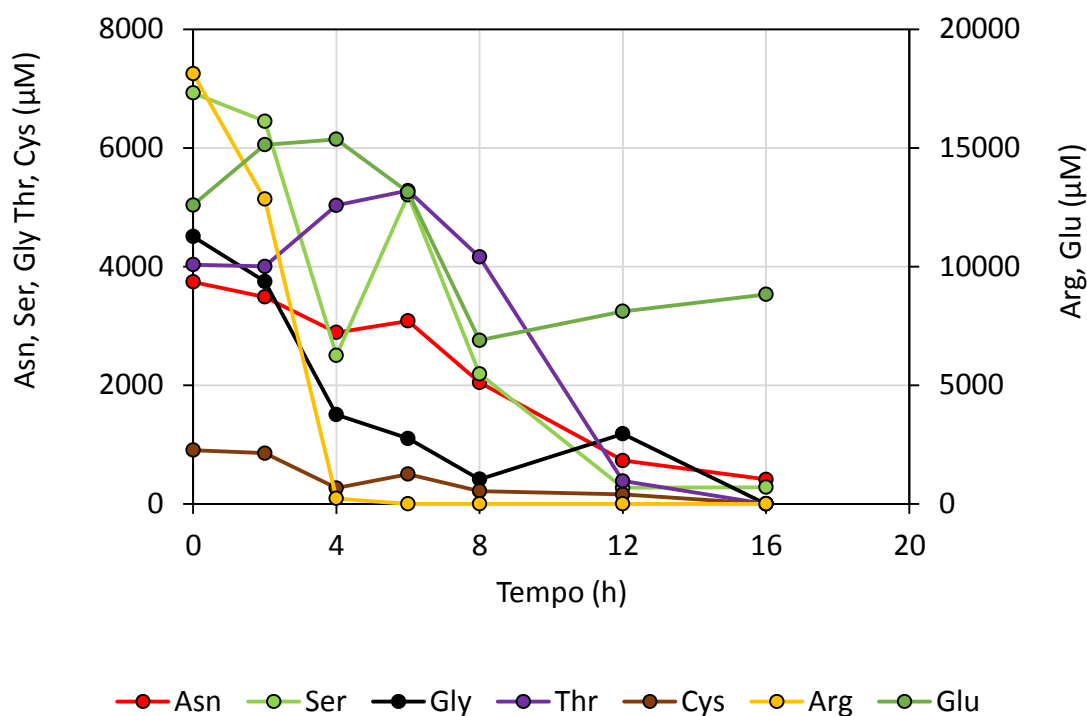
O meio de cultura base para produção de collagenases por *C. histolyticum* T248 possui aminoácidos em sua composição, mas em diferentes concentrações. Dezesete aminoácidos foram quantificados durante o processo fermentativo, sendo que sete deles apresentaram redução em sua concentração durante o processo: asparagina, serina, glicina, treonina, cisteína, arginina e glutamato (Figura 22 A) (ANEXO I); os demais aminoácidos (alanina, prolina, lisina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina) não foram consumidos ou tiveram aumento da concentração ao longo do curso do processo fermentativo (Figura 22 B) (ANEXO II). Adiante, são descritas as possíveis vias metabólicas relacionadas a esses aminoácidos, bem como os subprodutos formados. Os aminoácidos triptofano, glutamina e aspartato não foram analisados devido a composição do Kit analítico utilizado e, adicionalmente, segundo a literatura, esses três aminoácidos não são metabolizados por *C. histolyticum* (MEAD, 1971; ELSDEN, 1976).

A redução da concentração desses sete aminoácidos foi atribuída ao consumo destes por *C. histolyticum* T248. Por outro lado, o aumento da concentração de aminoácidos durante a fermentação parece estar associado à ação de enzimas proteolíticas, sintetizadas por *C. histolyticum* T248, sobre peptídeos e proteínas do meio de cultura, promovendo a formação e liberação de aminoácidos livres a partir desses substratos. Além disso, com menor impacto neste incremento de concentração, está o fato da formação de aminoácidos como subproduto do metabolismo de outro aminoácido.

Deve-se esclarecer que outras enzimas proteolíticas produzidas por *C. histolyticum* T248 estão envolvidas neste processo. Não é possível associar completamente a hidrólise de peptídeos e proteínas à ação isolada de collagenases, devido a duas constatações: (i) sua síntese se iniciou tardiamente, em relação ao início da formação de aminoácidos livres (Figura 23); (ii) assim como todas as enzimas, as collagenases apresentam especificidades com seu substrato, o colágeno, muito provavelmente não sendo tão eficaz em ligações peptídicas que não estejam interligando prolina, hidroxiprolina, glicina e alanina (ECKHARD *et al.*, 2014).

Como pode ser observado na Figura 24, o aumento da concentração de aminoácidos se sobrepõe à curva de crescimento do *C. histolyticum* T248, comportamento que dá suporte à inferência feita acima: enzimas proteolíticas produzidas pela bactéria foram responsáveis pela liberação de aminoácidos livres no meio de cultura.

A



B

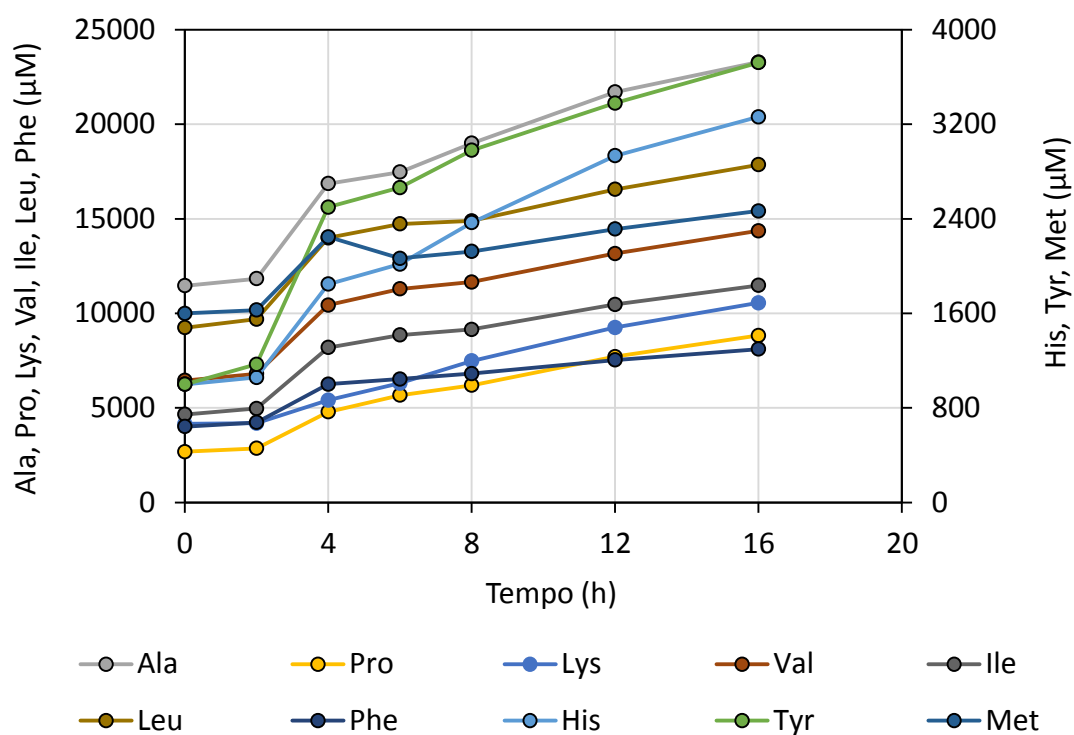


Figura 22. Perfil de redução (A) e aumento (B) das concentrações dos aminoácidos determinados no processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. Asn: Asparagina, Ser: Serina, Gly: Glicina, Thr: Treonina, Cys: Cisteína, Arg: Arginina, Glu: Glutamato, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Lys: Lisina, Val: Valina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Phe: Fenilalanina, His: Histidina, Tyr: Tirosina, Met: Metionina.

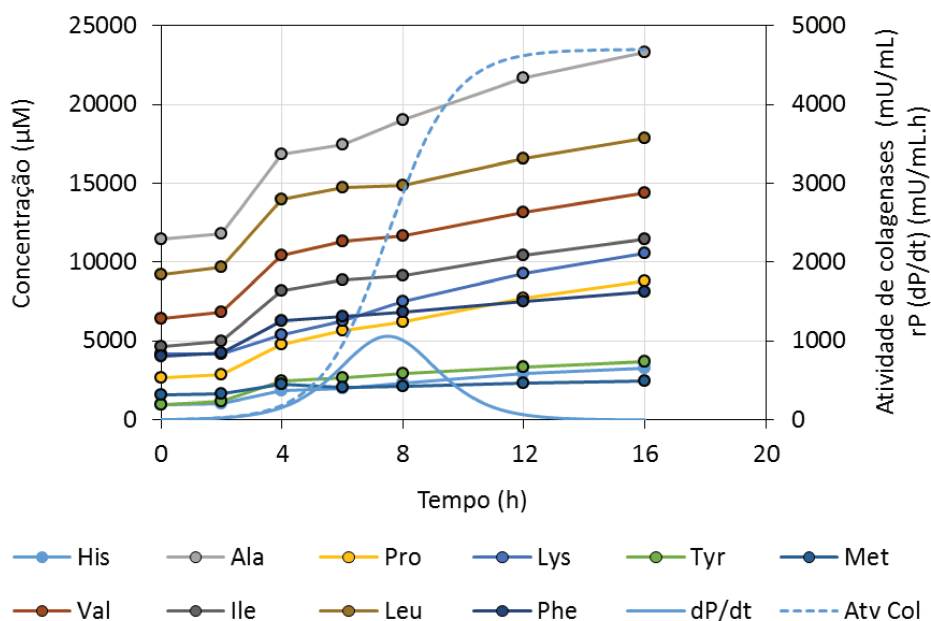


Figura 23. Curvas de concentração de aminoácidos (linhas coloridas), atividade de collagenases (linha azul pontilhada, Atv Col) e velocidade instantânea de produção de collagenases (linha azul, dP/dt) no processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. His: Histidina, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Lys: Lisina, Tyr: Tirosina, Met: Metionina, Val: Valina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Phe: Fenilalanina.

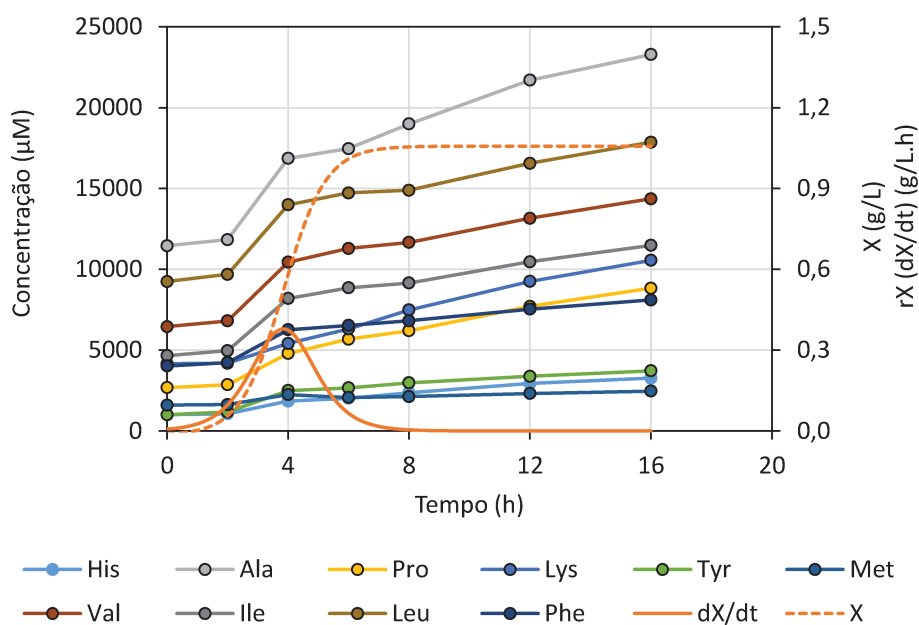


Figura 24. Curvas de concentração de aminoácidos (linhas coloridas) e de células (linha laranja pontilhada, X), e velocidade instantânea de crescimento de *C. histolyticum* T248 (linha laranja, dX/dt) no processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. His: Histidina, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Lys: Lisina, Tyr: Tirosina, Met: Metionina, Val: Valina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Phe: Fenilalanina.

Durante o processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 não foi observado o consumo de prolina, o que indicaria que não haveria a concomitante produção de δ -amino valerato, característica de microrganismos que utilizam a reação de Stickland (STICKLAND, 1935). Adicionalmente, foi observado que não houve a utilização dos pares de aminoácidos participantes da reação de Stickland (MADIGAN *et al.*, 2010), evidenciando que *C. histolyticum* T248 não metaboliza os aminoácidos via reação de Stickland.

5.2.1. Formação de subprodutos, consumo de glicose e ácidos orgânicos

5.2.1.1. Amônio

Simultaneamente ao crescimento microbiano e a produção de collagenases houve formação de amônio (Figura 25), sendo este um dos principais subprodutos do processo fermentativo proteolítico de *C. histolyticum* T248 durante a produção de collagenases.

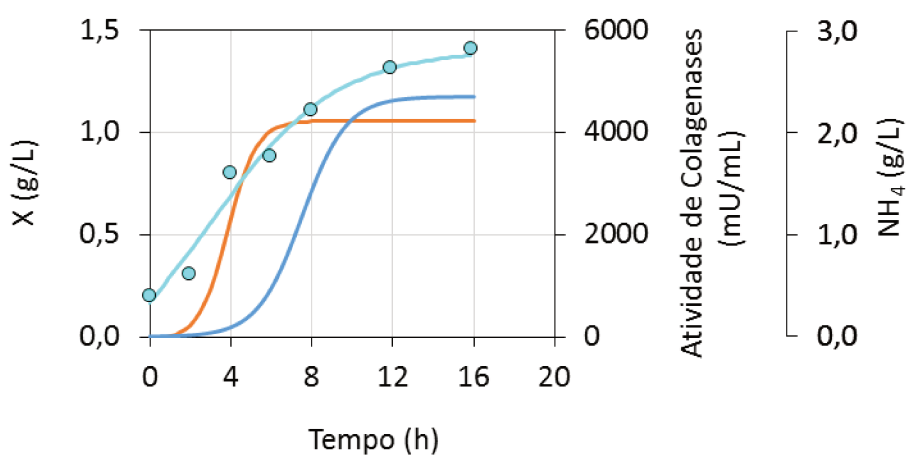


Figura 25. Formação de amônio (linha e símbolos azuis claros) durante crescimento de *C. histolyticum* T248 (linha laranja) para produção de collagenases (linha azul escura). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann.

5.2.1.2. Ácidos orgânicos

Nove ácidos orgânicos, incluindo ácidos oxálico, cítrico, málico, pirúvico, succínico, fórmico, acético, butírico e lático, foram avaliados durante o processo fermentativo de *C. histolyticum* T248 para identificação da formação destes como subprodutos do metabolismo

microbiano ou consumo a partir da presença na composição inicial do meio de cultura. A Figura 26 apresenta o cromatograma, com as análises sobrepostas de cada tempo de cultivo, os quais foram feitas as identificações e quantificações dos ácidos orgânicos (ANEXO III).

Houve a formação dos ácidos acético (Figura 27), fórmico (Figura 28) e oxálico (Figura 29), evidenciando estes ácidos orgânicos como subprodutos do metabolismo de *C. histolyticum* T248 (Tabela 25). Por outro lado, ácidos pirúvico, succínico e cítrico foram consumidos ao longo do processo fermentativo, com maior consumo durante a fase exponencial de crescimento (Tabela 26 e Figuras 30 à 32). Ácido málico foi formado, inicialmente, até a quarta hora de cultivo, quando, a partir de então, procede-se o consumo deste ácido orgânico (Figura 33). Por esse motivo, não foi possível modelar estes dados, com formação seguida por consumo do ácido málico. Outros dois ácidos orgânicos foram formados, em níveis expressíveis (conforme observado no cromatograma da Figura 26), porém não foram identificados, e estão descritos como pico 1 e pico 2 (Figuras 34 e 35). Confrontando informações técnicas, a partir de dados disponibilizados pelo fornecedor da coluna cromatográfica, com base no tempo de retenção e perfil cromatográfico, o pico 1 poderia ser atribuído ao ácido propiônico, enquanto o pico 2 poderia ser ácido isobutírico. Ácido butírico não foi detectado, ou seja, não estava presente inicialmente na composição do meio de cultura e nem foi formado como subproduto do metabolismo.

Tabela 25. Parâmetros cinéticos da formação de ácidos orgânicos durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases: velocidades instantâneas máxima (rSP_{max}), tempo de máximo de formação ($t_{SP_{max}}$) e variação da formação em $t_{SP_{max}}$ (ΔSPt_{max}) dos ácidos orgânicos gerados como subprodutos, acético, fórmico, oxálico e láctico. *Entre parênteses o tempo no qual foram determinadas rSP_{max} , em horas.

Parâmetro cinético	Ac. acético	Ac. fórmico	Ac. oxálico	Ac. láctico
rSP_{max} ($\mu\text{mol/L.h}$)	17013,70 (7,75)*	22869,22 (5,75)*	1800,83 (3,25)*	1,34 (7,00)*
$t_{SP_{max}}$ (h)	16,00	8,00	10,00	12,00
ΔSPt_{max} (μM)	93110,00	20050,00	6940,00	38,345

Tabela 26. Parâmetros cinéticos do consumo de ácidos orgânicos durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases: velocidades instantâneas máxima (rSP_{max}), tempo de máximo de consumo ($t_{SP_{max}}$) e variação do consumo em $t_{SP_{max}}$ (ΔSPt_{max}) dos ácidos orgânicos consumidos, pirúvico, succínico e cítrico. Entre parênteses o tempo no qual foram determinadas rSP_{max} , em horas.

Parâmetro cinético	Ac. pirúvico	Ac. succínico	Ac. cítrico
rSP_{max} ($\mu\text{mol/L.h}$)	4827,03 (5,50)*	4099,26 (3,25)*	2858,00 (4,50)*
$t_{SP_{max}}$ (h)	16,00	6,00	16,00
ΔSPt_{max} (μM)	-23930,000	-15920,000	-8110,000

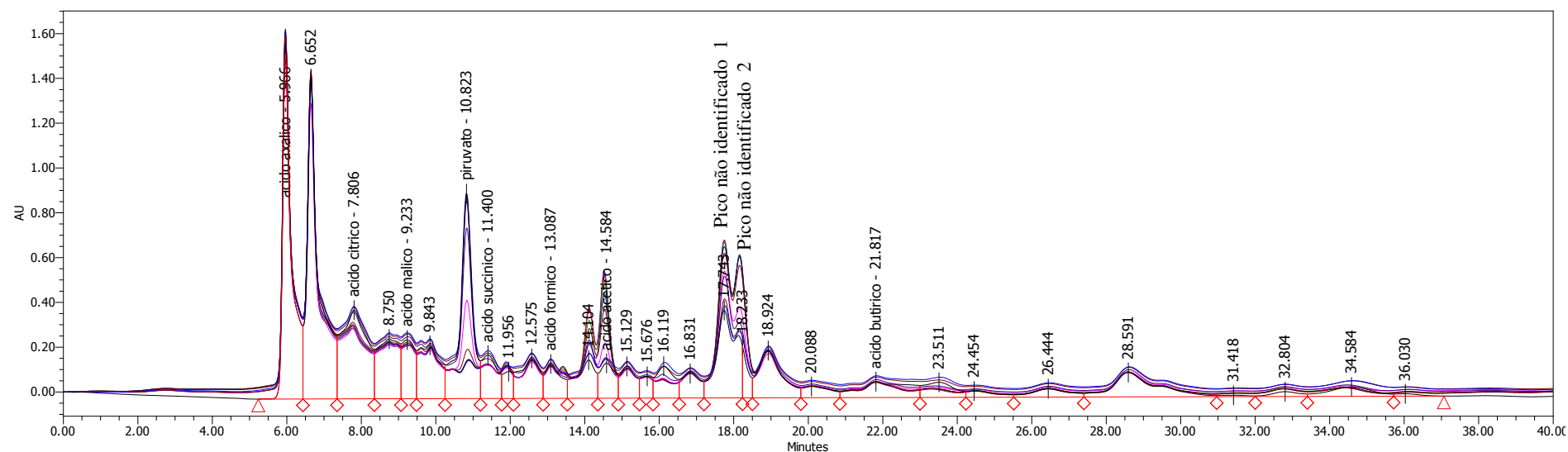
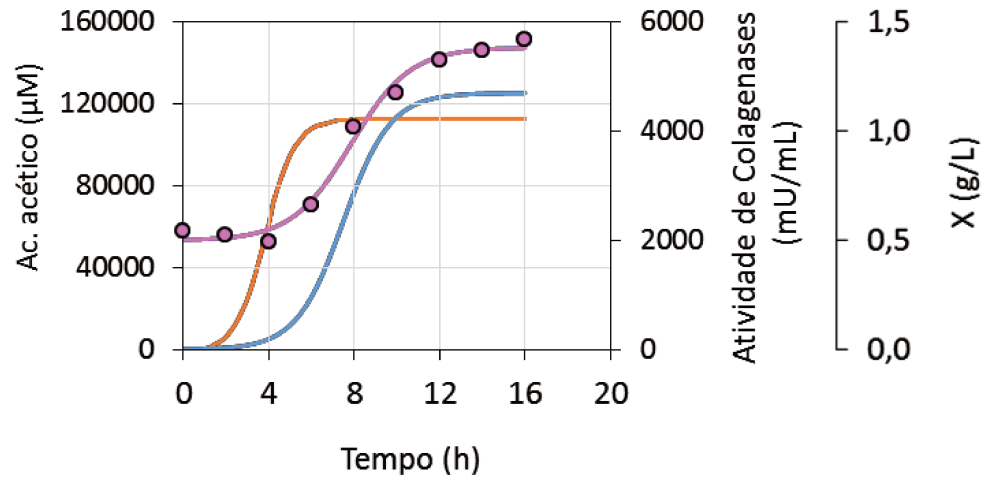


Figura 26. Cromatogramas sobrepostos das análises de ácidos orgânicos do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases. Condições cromatográficas: Coluna analítica Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column, Plataforma HPLC Alliance (Waters), Detector UV (monitoramento em 210 nm), Fase Móvel com 5mM de ácido sulfúrico, Fluxo de 0,6 mL/min, Temperatura da Coluna de 50 °C e Temperatura da Amostra de 4 °C.

A



B

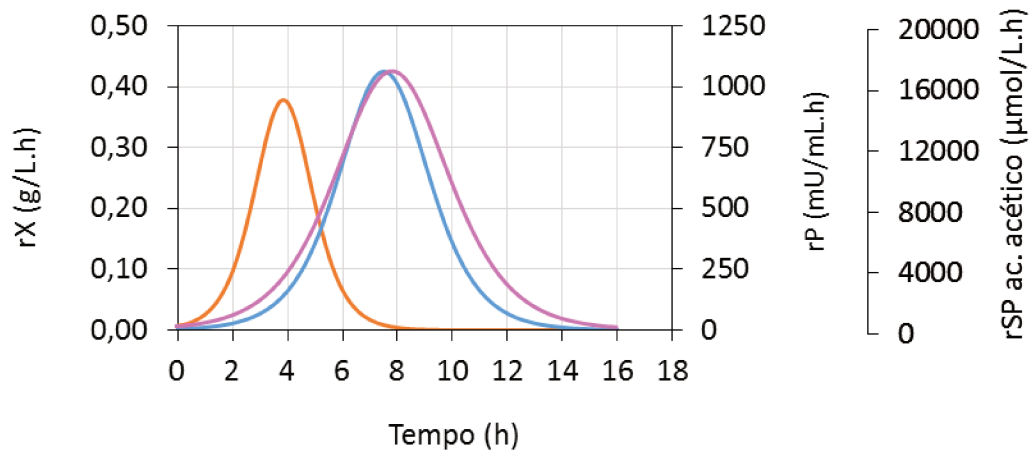
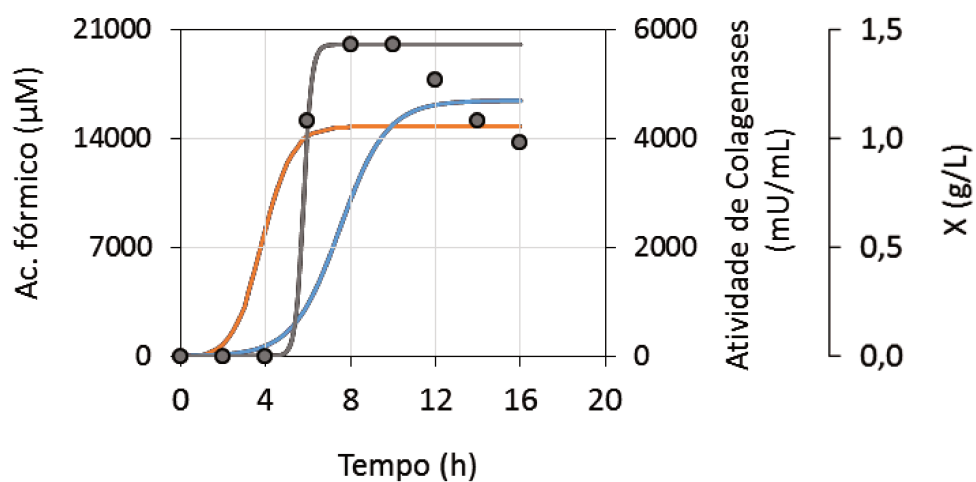


Figura 27. (A) Curva de formação de ácido acético. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido acético – rosa, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido acético (linha rosa), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

A



B

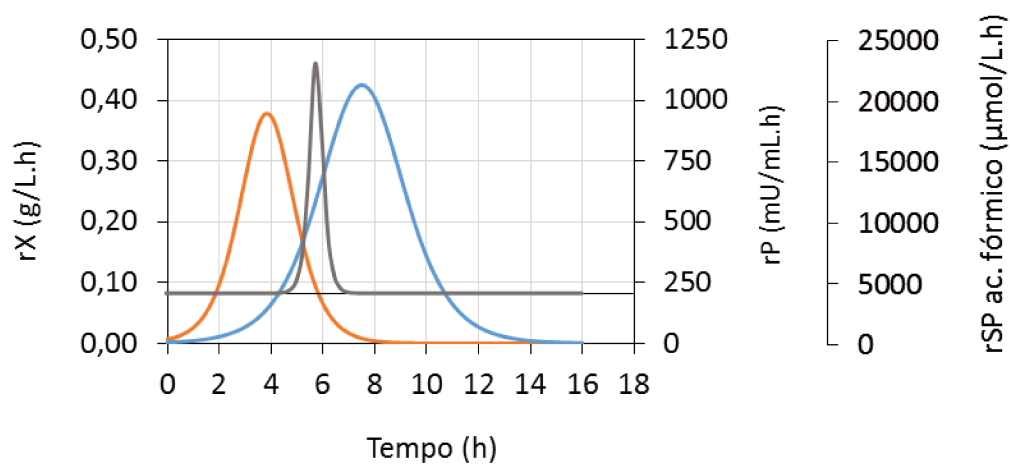
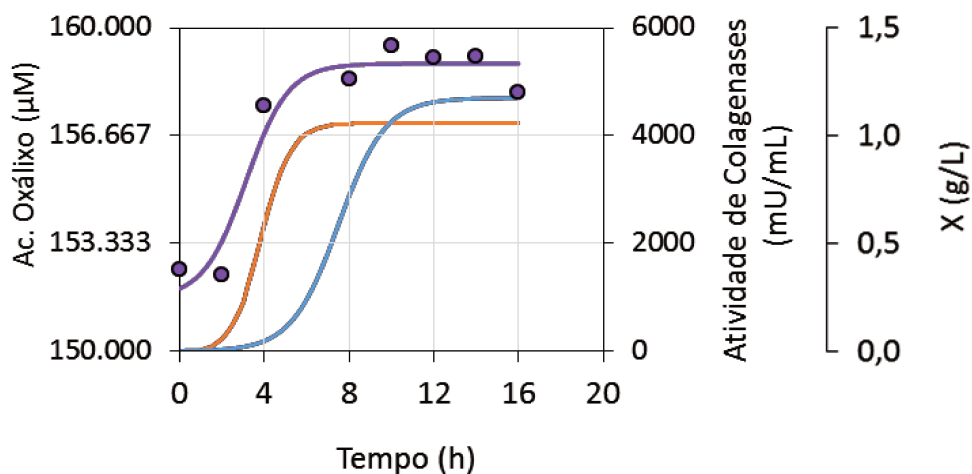


Figura 28. (A) Curva de formação de ácido fórmico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido fórmico – cinza, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido fórmico (linha cinza), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

A



B

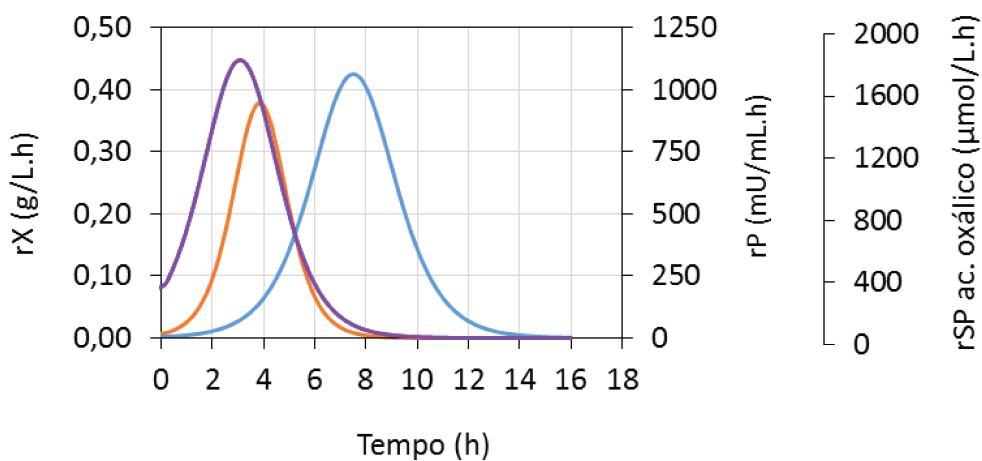
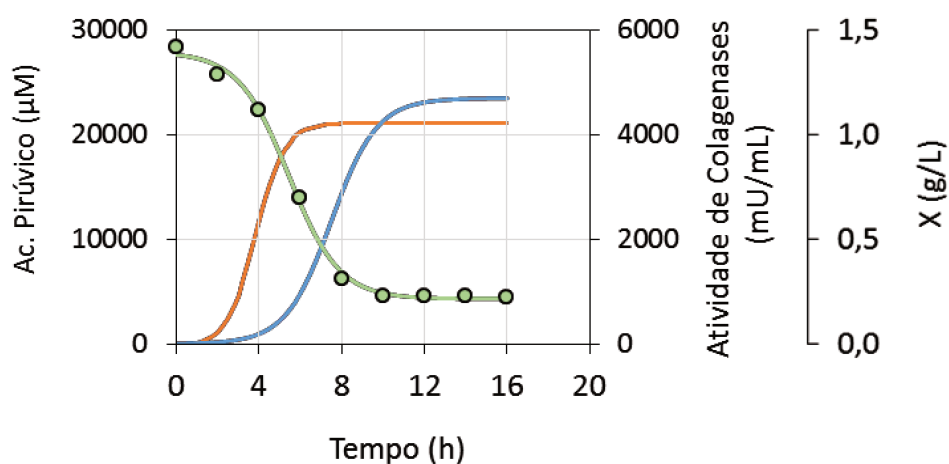


Figura 29. (A) Curva de formação de ácido oxálico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido oxálico – roxo, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido oxálico (linha roxa), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

A



B

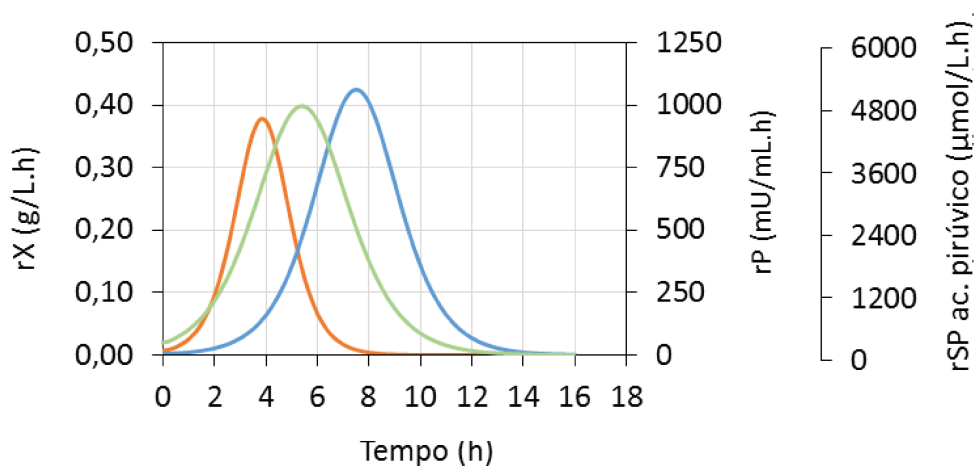
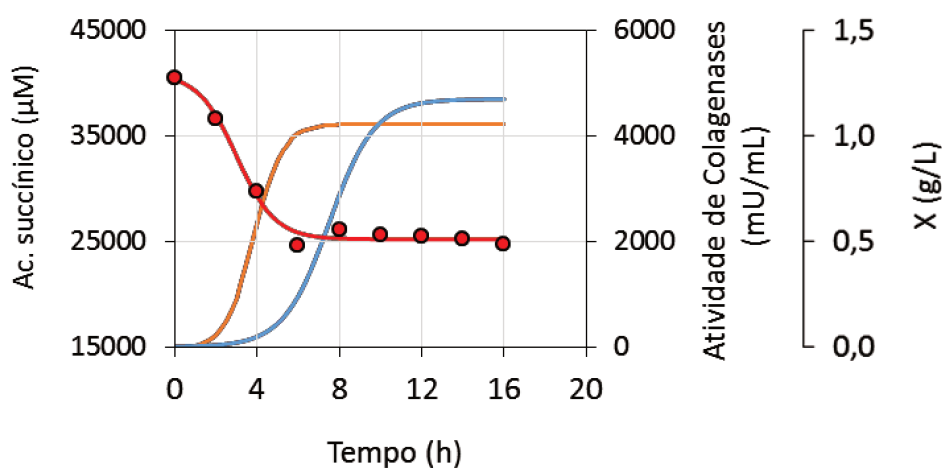


Figura 30. (A) Curva de consumo de ácido pirúvico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido pirúvico – verde claro, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido pirúvico (linha verde claro), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *Clostridium histolyticum* T248 para produção de colagenases.

A



B

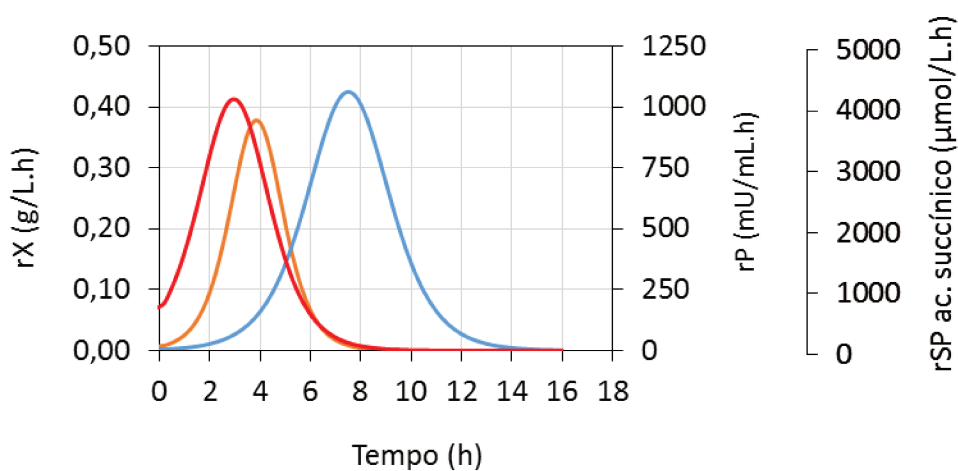
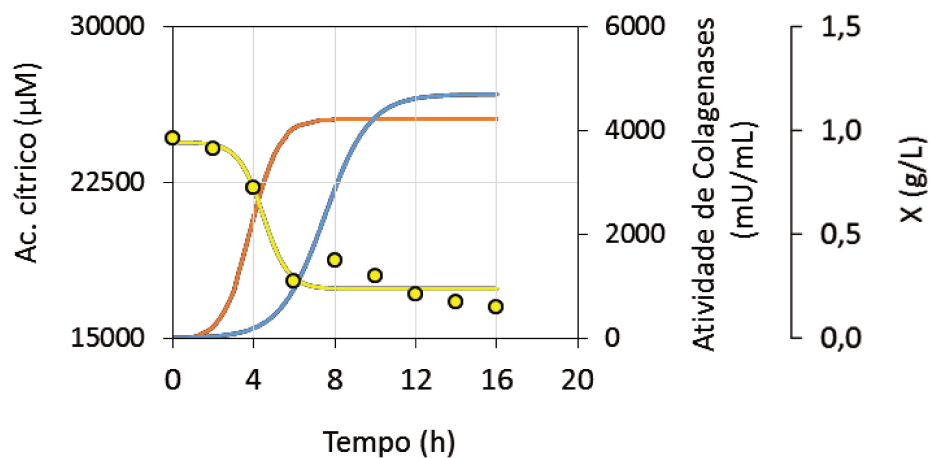


Figura 31. (A) Curva de consumo de ácido succínico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido succínico – vermelho, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido succínico (linha vermelha), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

A



B

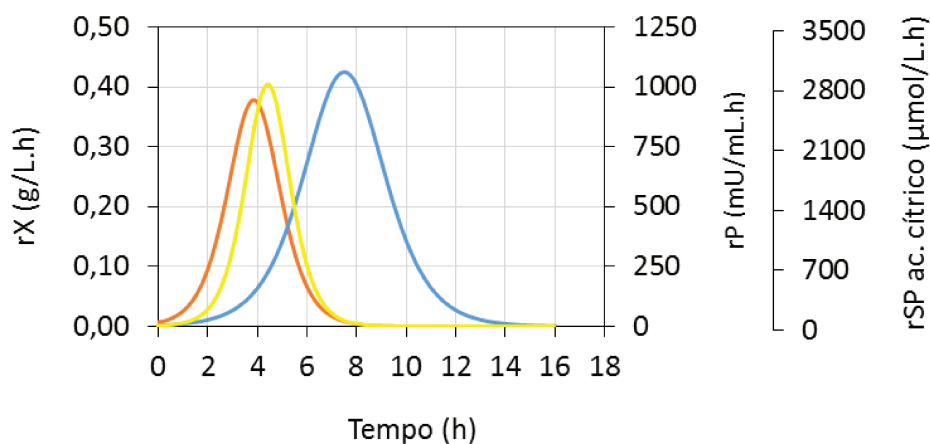


Figura 32. (A) Curva de consumo de ácido cítrico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido cítrico – amarelo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de formação de ácido cítrico (linha amarela), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

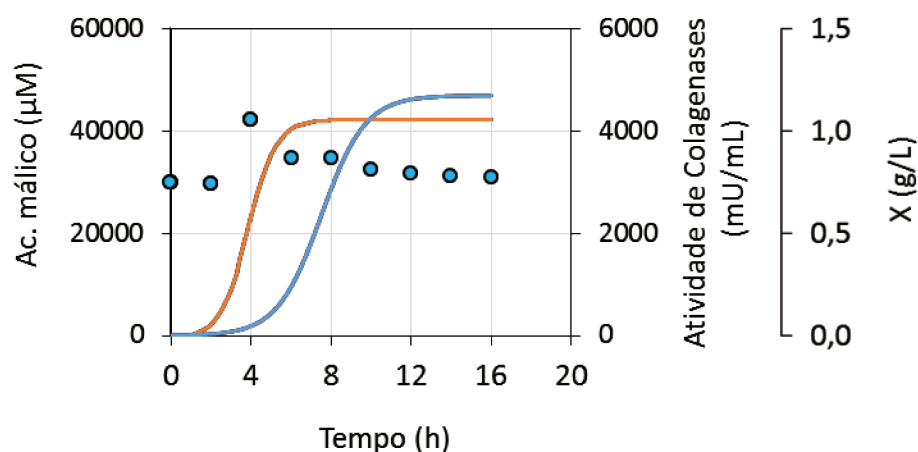


Figura 33. Curva de formação (até 4h de fermentação) e consumo (a partir de 4h de fermentação) de ácido málico. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

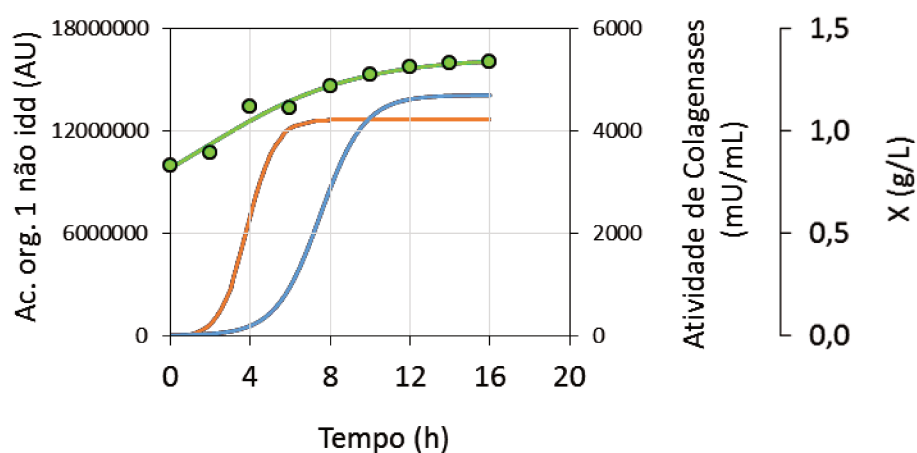


Figura 34. Curva de formação de ácido orgânico 1 não identificado, representado em unidade arbitrária mensurada no HPLC (AU). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido orgânico 1 não identificado – verde limão, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

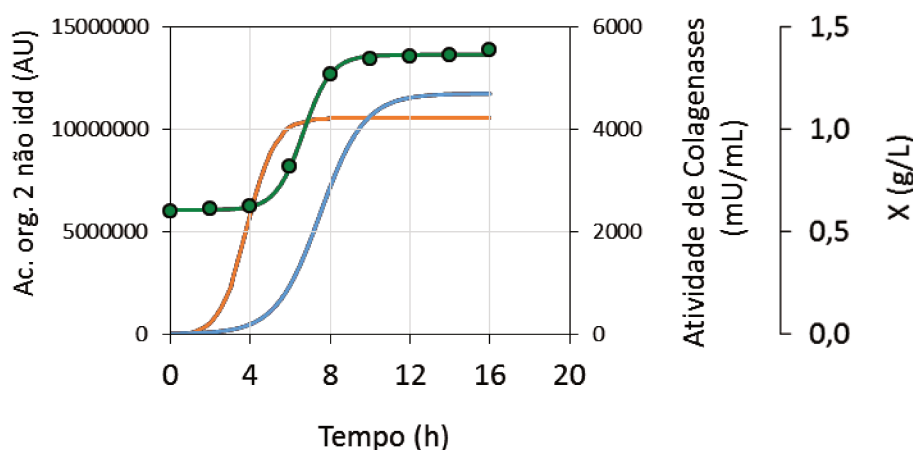


Figura 35. Curva de formação de ácido orgânico 2 não identificado representado em unidade arbitrária mensurada no HPLC (AU) Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ácido orgânico 2 não identificado – verde escuro, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

5.2.1.3. Ácido láctico e glicose

Açúcares como hexoses são catabolizados a piruvato pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. *C. histolyticum* T248 fermentou glicose à ácido láctico, durante todo período do processo fermentativo (Figura 36). Durante essa catálise, lactato desidrogenase foi detectada (Tabela 27). Assim como *C. sporogenes*, *C. histolyticum* T248 pode fermentar glicose à piruvato e, posteriormente, deste à lactato, conforme observado por Rogers (1986) (Figura 37). Contudo, para ambas as espécies, os substratos preferenciais para a obtenção de energia são os aminoácidos, os quais são fermentados por *C. sporogenes* através da reação de *Stickland* (ALLISON & MACFARLANE, 1990), ou sequencialmente, como no caso de *C. histolyticum* T248.

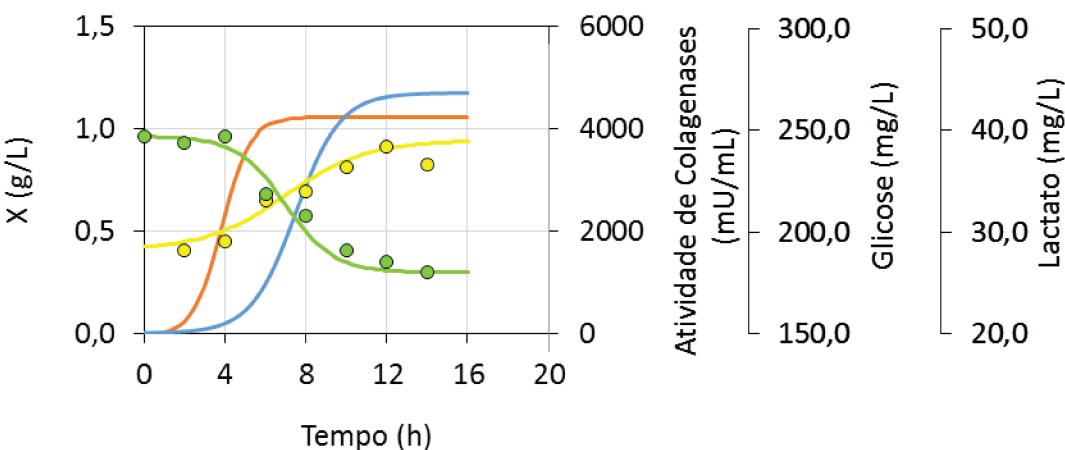


Figura 36. Crescimento de *C. histolyticum* T248 (linha laranja), produção de colagenases (linha azul escura), consumo de glicose (linha e símbolos verdes) e formação de lactato (linha e símbolos amarelos). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann.

Tabela 27. Atividade de Lactato Desidrogenase, LDH (U/L), durante crescimento de *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

Tempo (h)	Atividade de LDH (U/L)
2	9,78
4	10,31
6	7,63
8	10,12
10	8,07
12	9,66
14	10,65

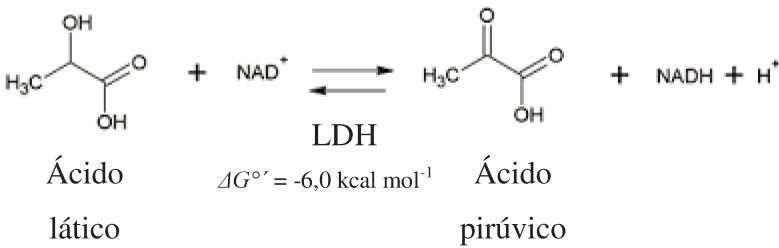


Figura 37. Via de conversão de ácido pirúvico à ácido lático catalisada por lactato desidrogenase (LDH).

Embora a literatura sobre metabólitos de *C. histolyticum* seja bem escassa e antiga, os resultados do presente estudo estão em concordância aos reportes anteriores. Piruvato é utilizado ou convertido pela maioria das espécies de *Clostridium*, incluindo *C. histolyticum* e alguns também utilizam o ácido láctico, a partir de glicose. *C. histolyticum* produz predominantemente ácidos acético, seguido por láctico e em menores concentrações fórmico e succínico e não produz ácidos orgânicos de cadeias com 5 ou 6 carbonos (MOORE *et al.*, 1966).

5.2.2. Parâmetros cinéticos do consumo de aminoácidos

Considerando que o aumento da concentração celular, decorrente do metabolismo dos substratos, aumenta durante o processo fermentativo, as velocidades instantânea e específica máxima de consumo dos aminoácidos foram então calculadas, permitindo a comparação entre as velocidades de consumo dos diferentes aminoácidos presentes na composição do meio de cultura com as velocidades instantâneas de crescimento microbiano e de produção de colagenases.

A partir dos modelos ajustados aos dados experimentais foram calculados parâmetros cinéticos, incluindo as velocidades instantâneas r_{Smax} ($\mu\text{mol /L.h}$) e específicas máximas $\mu_{S \max}$ (h^{-1}) para os sete aminoácidos utilizados, as quais indicaram que determinados aminoácidos foram consumidos a partir do início do cultivo, enquanto outros foram consumidos posteriormente, de uma forma sequencial, em intervalos de tempo diferentes (Tabela 28).

Tabela 28. Parâmetros cinéticos de consumo de aminoácidos durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248. Entre parênteses estão os tempos nos quais os parâmetros foram determinados (em horas).

Parâmetro	Aminoácido						
	Asn	Ser	Arg	Gly	Glu	Thr	Cys
t_{Smax} (h)	16,00	12,00	4,00	8,00	8,00	16,00	16,00
ΔSt_{max}	-3328,23	6656,83	17910,26	-4093,24	-5699,69	-4032,566	-905,705
r_{Smax} ($\mu\text{mol /L.h}$)	433,28 (7,50)	1105,70 (7,00)	8821,22 (2,50)	1068,76 (3,75)	4069,08 (6,50)	1297,23 (9,50)	176,45 (4,0)
$\mu_{S \max}$ (h^{-1})	21312,74 (1,00)	3504521 (1,00)	778406,13 (1,00)	96596,20 (1,00)	3938,02 (6,50)	1227,66 (9,50)	20765,31 (1,00)

5.2.2.1. Asparagina

C. histolyticum T248 consumiu asparagina desde o início do cultivo, onde a concentração inicial era de 3740,2 μM e reduziu à 411,9 μM após as 16 horas de cultivo (Figura 38 A). A sobreposição das velocidades instantâneas de consumo de asparagina, de crescimento microbiano e de produção de collagenases mostram que a asparagina está sendo metabolizada por *C. histolyticum* T248 durante o metabolismo primário, na fase exponencial de crescimento, muito provavelmente para a formação de biomassa e manutenção celular, com máxima velocidade instantânea (433,28 $\mu\text{mol/L.h}$) ocorrendo em 7,5 h (Figura 38 B).

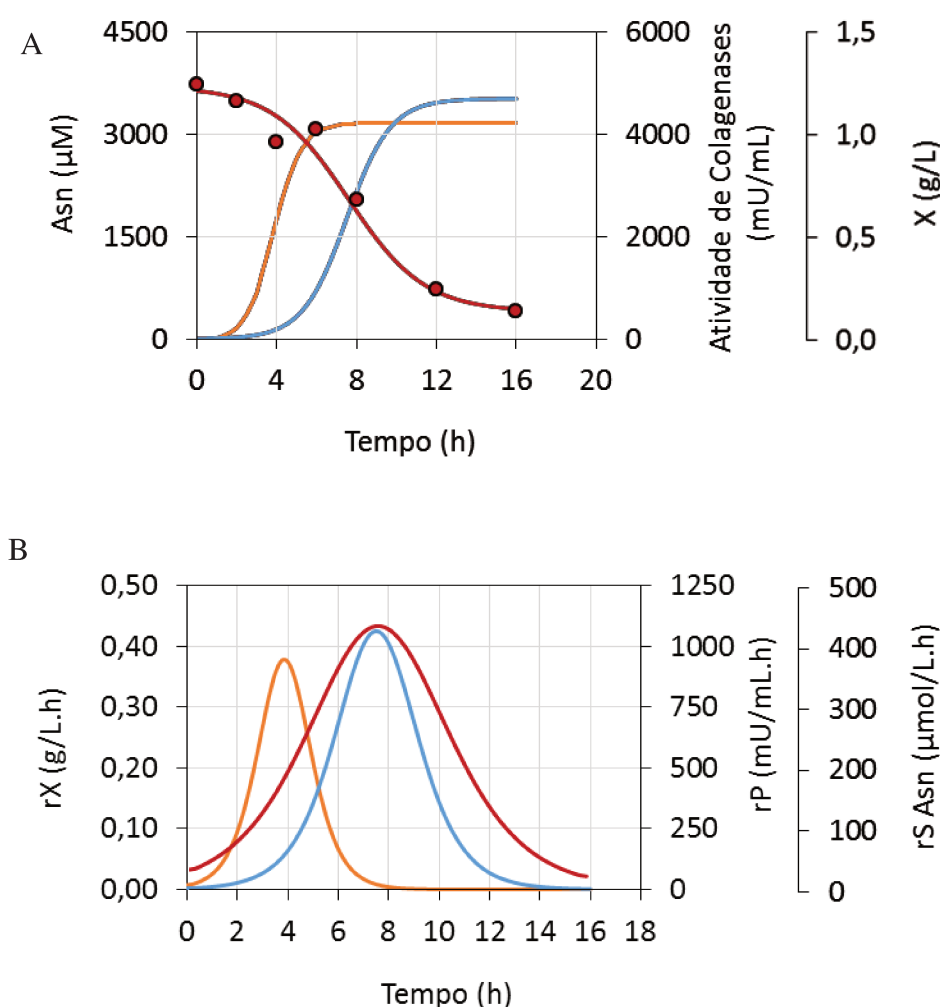


Figura 38. (A) Curva de consumo de asparagina (Asn). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Asn – vermelho, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Asn (linha vermelha), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

Poucas informações estão disponíveis para elucidar a via catabólica de asparagina por *C. histolyticum*. Aparentemente, com base em dados obtidos para *C. tetani* e *C. perfringens*, o mais provável é que inicialmente a asparagina seja convertida a aspartato pela ação da enzima L-asparaginase. Os produtos da fermentação do aspartato por *C. tetani* são: amônia, dióxido de carbono, ácidos orgânicos como acetato, butirato, lactato e malato; e álcoois, como etanol e butanol (GUNSALUS & STANIER, 1960). Contudo, segundo Gottschalk (1986), o aspartato é fermentado por muitas bactérias anaeróbicas facultativas e estritas, sendo desaminado à fumarato, o qual é parcialmente reduzido à succinato e parcialmente oxidado a acetato.

5.2.2.2. Serina e Cisteína

As discussões sobre os consumos de serina e cisteína foram agrupadas em um único item devido às similaridades nos perfis de consumo/formação, bem como nas vias de catabolismo. Ambos os aminoácidos foram consumidos a partir de duas horas de fermentação, após um aumento de concentração ser determinado em seis horas, o consumo é retomado e a depleção foi determinada ao final do cultivo (16 h) (Figuras 39 e 40). Muito provavelmente, este aumento pode ser atribuído à formação de aminoácidos livres devido à ação de enzimas proteolíticas sobre peptídeos do meio de cultura.

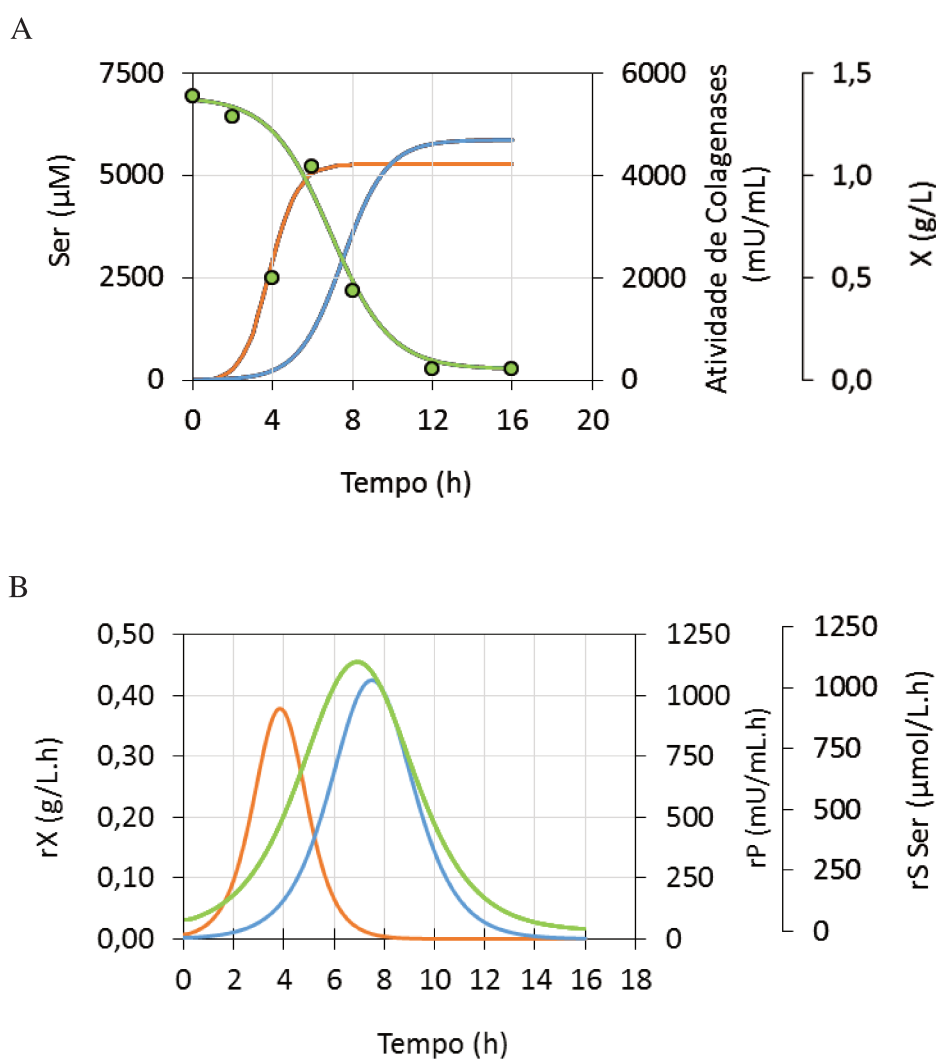


Figura 39. (A) Curva de consumo de serina (Ser). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Ser – verde claro, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Ser (linha verde claro), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

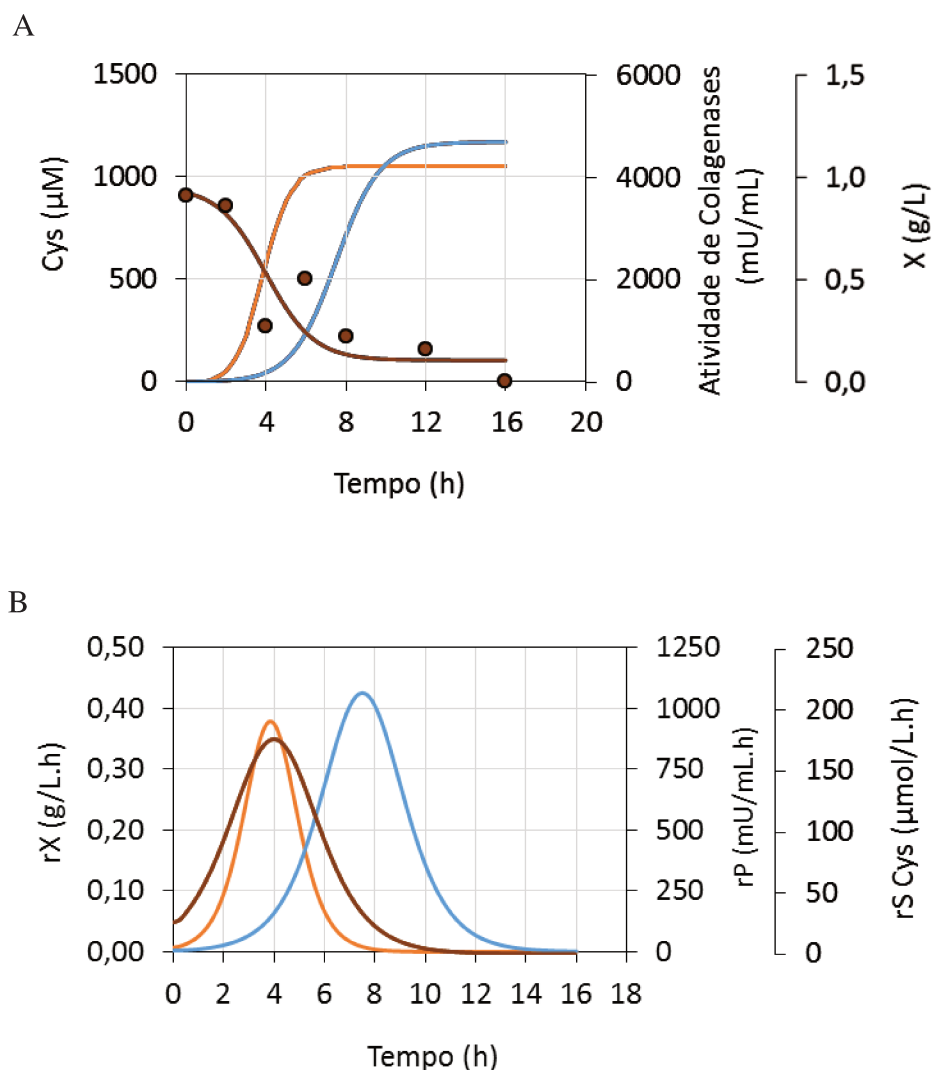


Figura 40. (A) Curva de consumo de cisteína (Cys). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Cys – marrom, crescimento – laranja e atividade de colagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Cys (linha marrom), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de colagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de colagenases.

Baseando-se em informações obtidas no banco de dados de genes, KEGG, para *C. perfringens*, no banco de dados de enzimas, BRENDA e na reconhecida capacidade de *C. histolyticum* de metabolizar o piruvato, as vias de catabolismo de serina e cisteína foram sugeridas, e estão dispostas na Figura 41.

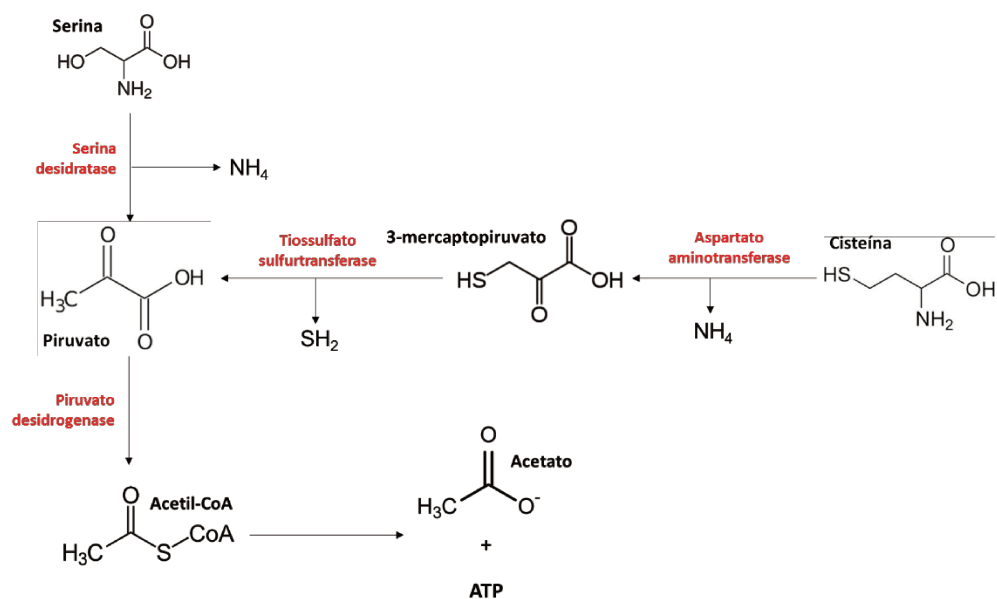


Figura 41. Vias de catabolismo de serina e cisteína propostas para *C. histolyticum* T248.

5.2.2.3. Arginina

Nas primeiras seis horas de fermentação a arginina foi completamente consumida pelo *C. histolyticum* T248, onde a concentração inicial era de 18135,1 μM (Figura 42 A). A velocidade máxima de consumo de arginina foi de 8821,22 $\mu\text{mol/L.h}$ em 2,5 horas e seu consumo parece estar relacionado a formação de biomassa devido a sobreposição das curvas de velocidade instantânea (Figura 42 B).

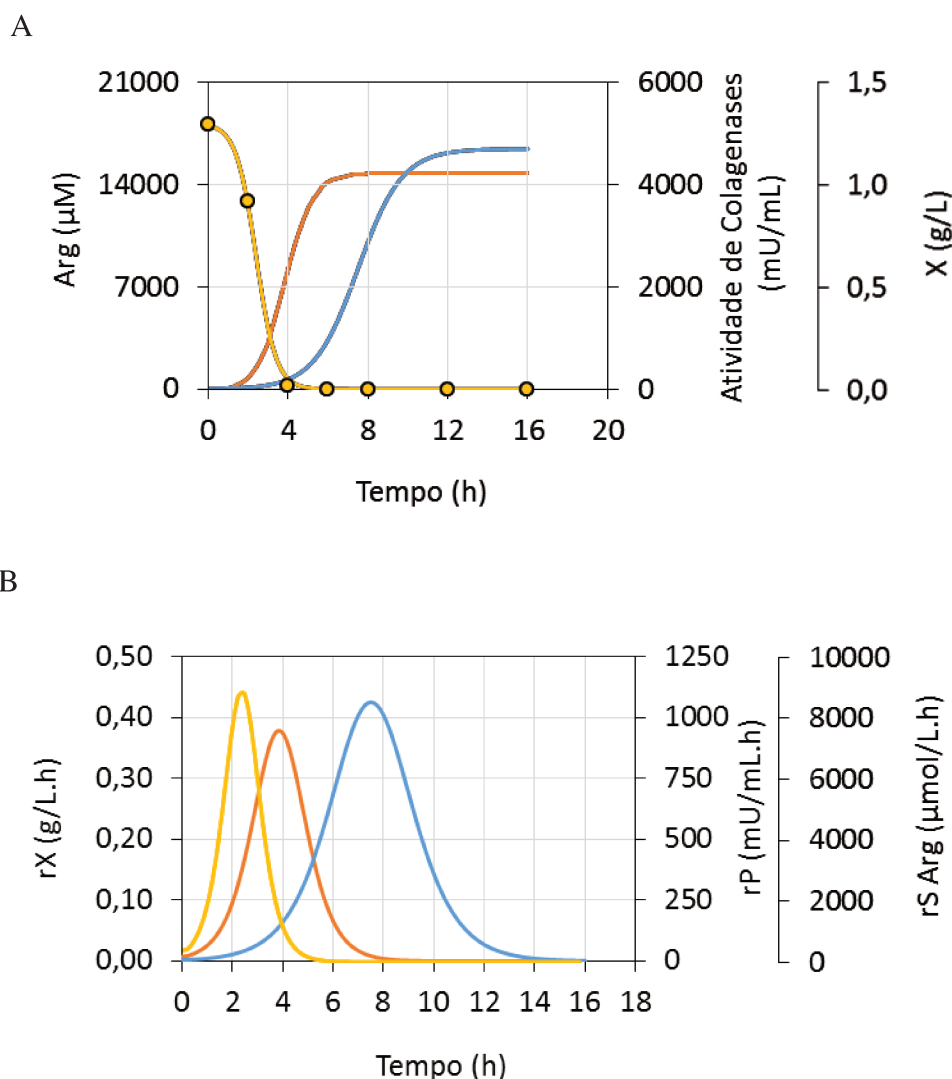


Figura 42. (A) Curva de consumo de arginina (Arg). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Arg – amarelo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Arg (linha amarela), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

A via arginina diidrolase ilustrada na Figura 43, é sugerida para ser utilizada pelo *C. histolyticum* T248. Nesta via a arginina é convertida em ornitina, amônio e dióxido de carbono, com a formação de um mol de adenosina trifosfato (ATP) por mol de arginina consumida (CUNIN *et al.*, 1986).

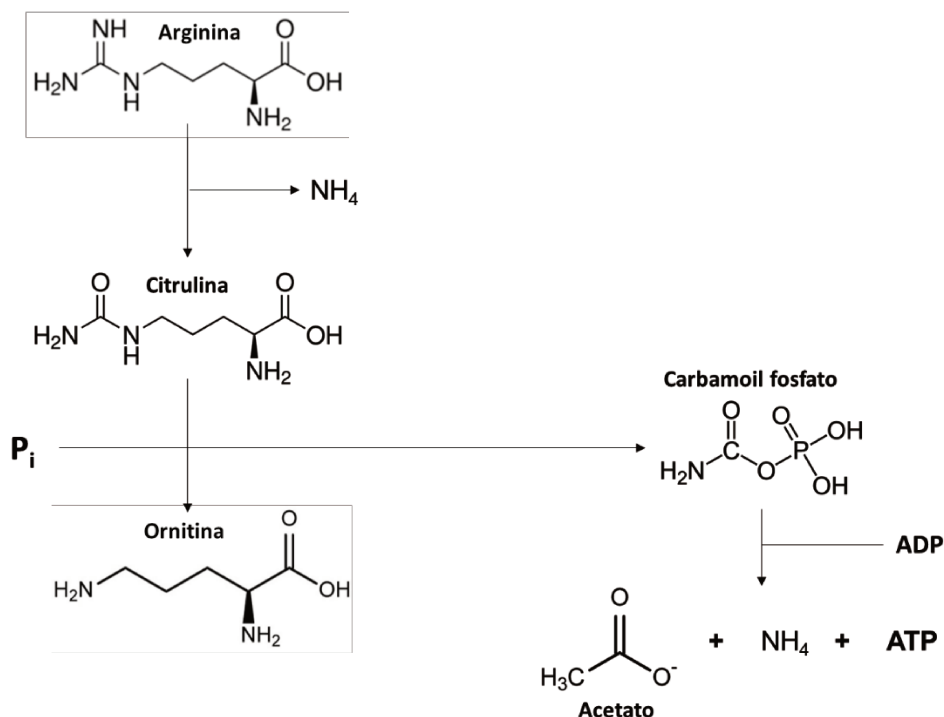


Figura 43. Etapas da via arginina diidrolase (CUNIN *et al.*, 1986).

Segundo Elsdén e Hilton (1979), o *C. histolyticum* utiliza um número muito limitado de aminoácidos, catabolizando completamente glicina e arginina, produzindo ornitina.

Venugopal e Nadkarni (1977) determinaram as atividades das enzimas da via arginina diidrolase em *C. sporogenes*, durante o crescimento e esporulação, chegando à conclusão que a utilização de arginina por este microrganismo é regulada essencialmente pela arginina desaminase. A via supracitada, a qual é reconhecidamente produtora de energia, é composta por três enzimas: arginina desaminase (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferase (EC 2.1.3.3) e carbamato quinase (EC 2.7.2.2). Essas enzimas têm sido reportadas em *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis* e muitas espécies de *Bacillus*.

5.2.2.4. Glicina

O *C. histolyticum* T248 consumiu a glicina durante a fermentação e sua concentração foi reduzida de 4506,10 para 412,81 μM nas primeiras oito horas de fermentação (Figura 44 A). A velocidade máxima de consumo atingida foi de 1068,76

$\mu\text{mol/L.h}$ em 3,75 horas e seu consumo parece estar relacionado à formação de biomassa, após analisar a sobreposição das curvas de velocidade instantânea de crescimento e de formação de collagenases (Figura 44 B).

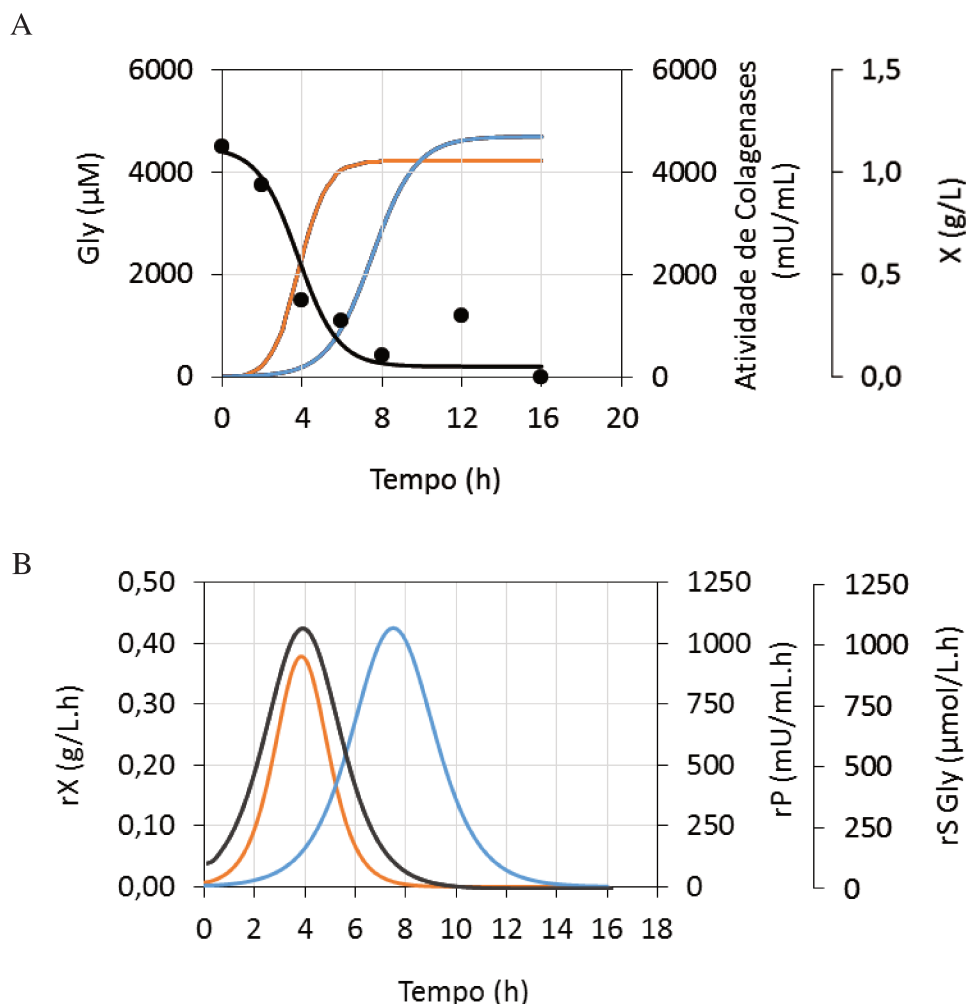


Figura 44. (A) Curva de consumo de Glicina (Gly). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Gly – preto, crescimento - laranja e atividade de collagenases - azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Gly (linha preta), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

De acordo com Lebertz e Andreesen (1988) o *C. histolyticum* não realiza a reação de Stickland utilizando pares de alanina e glicina, mas é capaz de fermentar a glicina, conforme Equação 20 abaixo:



Eq. 20

No trabalho de Lebertz e Andreessen (1988) o consumo completo de glicina exigiu a presença de nutrientes complexos. A via de consumo de glicina por *C. histolyticum* T248 pode ser similar à utilizada pelo *C. purinolyticum*, empregando a glicina redutase como única enzima chave. O envolvimento de selenoproteínas no complexo glicina redutase explica os requerimentos usuais por selênio para o crescimento em meios com glicina.

Um esquema da via catalítica de glicina redutase é apresentado na Figura 45. O complexo glicina redutase é composto por três proteínas complexas, A, B e C, das quais A e B contém selenocisteínas. Um resíduo da subunidade de 47 kDa GrdB da proteína heterodimérica B (GrdBB') forma uma base de Schiff com glicina. O resíduo selenocisteína de um pequeno transportador de carbono e redox, proteína A (17 kDa, GrdA), assume o grupo carboximetil da glicina, enquanto que o amônio permanece como imina em GrdB. O éter selênico (selenoeter) formado sobre proteína A é clivado redutivamente com a ajuda de um grupo SH adjacente a um intermédio ceteno hipotético, catalisado pela proteína C. Isso leva à formação de uma ligação S- Se oxidada na proteína A, que é reduzida novamente pelo NADPH, mediada por uma tiorredoxina redutase e tiorredoxina. O ceteno reage imediatamente com um grupo SH de uma das duas subunidades da proteína C (GRDC e GrdD) para formar um éster de acetil – tiol. O radical acetil é clivado por fosfato, para se obter como produto final acetilfosfato, catalisado por GrdCD. Assim, um mol de ATP pode ser conservado por mol de glicina. O amônio é liberado a partir do grupo de proteína iminocarbonil B, ou por hidrólise, ou pela próxima entrada glicina (DÜRRE, 2005).

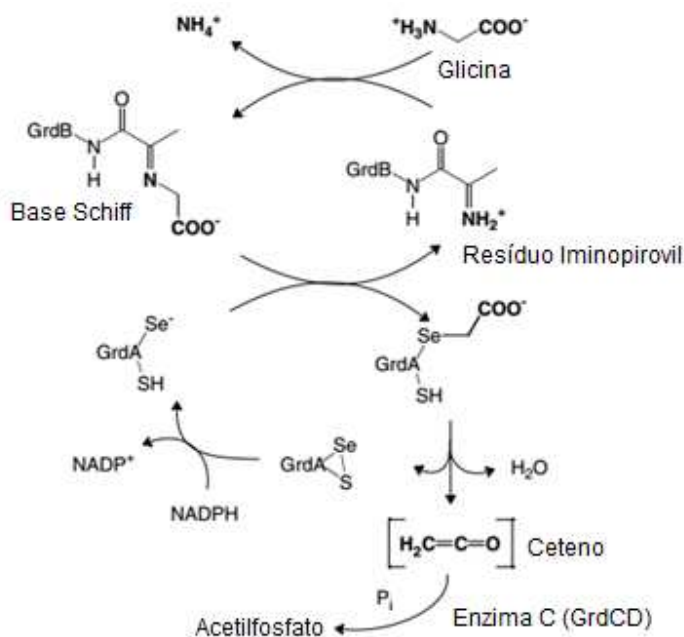
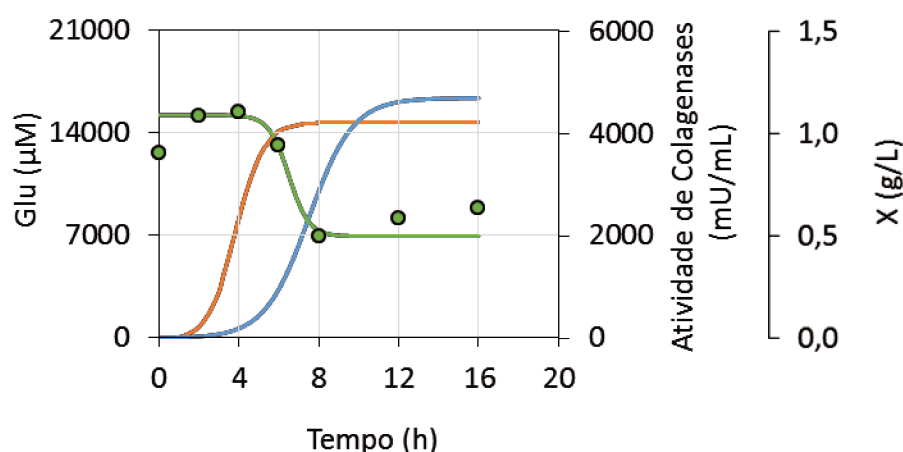


Figura 45. Redução da glicina à amônio e acetilfosfato (versão reduzida do que foi descrito no texto).

5.2.2.5. Glutamato

Nas primeiras horas de cultivo, a concentração de glutamato, a qual inicialmente era de 12593,1 μM , aumentou gradualmente, até atingir o valor de 15365,60 μM , após 4 horas, assim como a velocidade instantânea máxima de consumo foi de 4069,08 $\mu\text{mol/L.h}$ em 6,5 horas (Figura 46). Após atingir seu valor máximo em quatro horas de cultivo, a concentração de glutamato caiu progressivamente ao longo das quatro horas subsequentes, chegando a 7286,97 μM após oito horas de fermentação. Entretanto, seria incorreto afirmar que o consumo de glutamato por *C. histolyticum* T248 ocorreu apenas neste intervalo de tempo, uma vez que, reações de síntese de glutamato ocorreram simultaneamente.

A



B

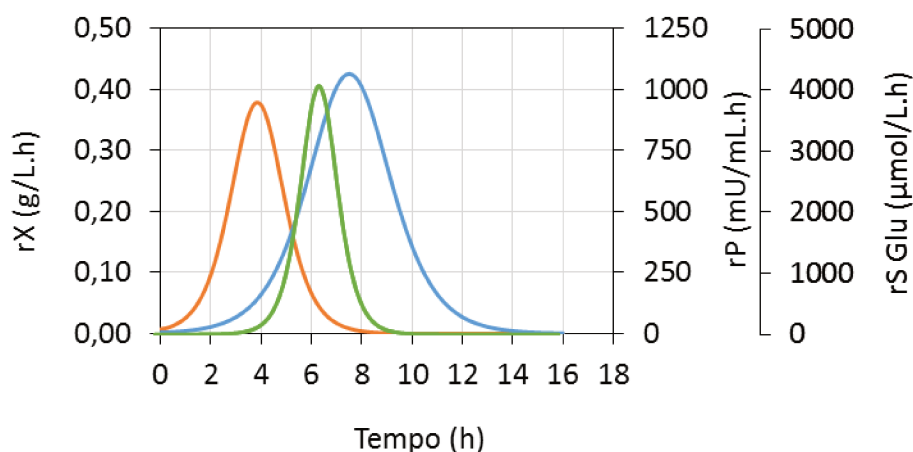


Figura 46. (A) Curva de consumo de glutamato (Glu). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Glu – verde escuro, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Glu (linha verde escuro), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

Duas hipóteses podem explicar este aumento de concentração do glutamato durante fermentação com *C. histolyticum* T248:

- (i) liberação de resíduos de glutamato por ação de enzimas proteolíticas de *C. histolyticum* T248 sobre peptídeos do meio, e/ou;
- (ii) a presença ou a ação de enzimas com atividade de glutamato desidrogenase.

Quanto à última hipótese, a síntese de glutamato é comumente observada em certos microrganismos por meio da reação de transaminação de aminoácidos; um α -aminoácido reage com o α -cetoglutarato formando glutamato e α -cetoácido. Hammer e Johnson (1988) determinaram altas atividades específicas de glutamato desidrogenase (dependente de NAD^+) em cepas proteolíticas de *C. botulinum* tipos A, B e F (grupo I); um contraponto em relação às baixas atividades determinadas para as cepas não proteolíticas (grupo II).

Como pode ser visto na Figura 47 a reação catalisada pela glutamato desidrogenase é reversível, motivo pelo qual Hammer e Johnson (1988) concluem que a síntese desta enzima é importante para o metabolismo de *C. botulinum*, uma vez que, por meio de sua ação, o α -cetoglutarato é produzido e utilizado como substrato para reações de transaminação. Assim, podemos inferir que o glutamato pode ser um aminoácido importante para a ação proteolítica de *C. histolyticum*, bem como manutenção do equilíbrio redox.

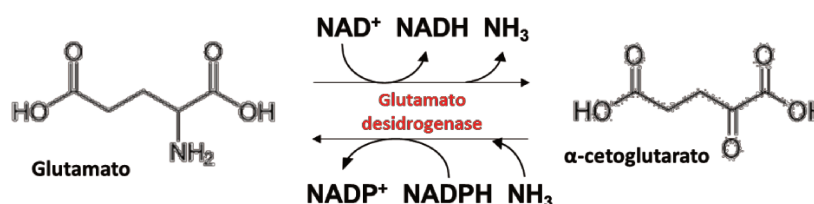


Figura 47. Reações catalisadas pela enzima glutamato desidrogenase.

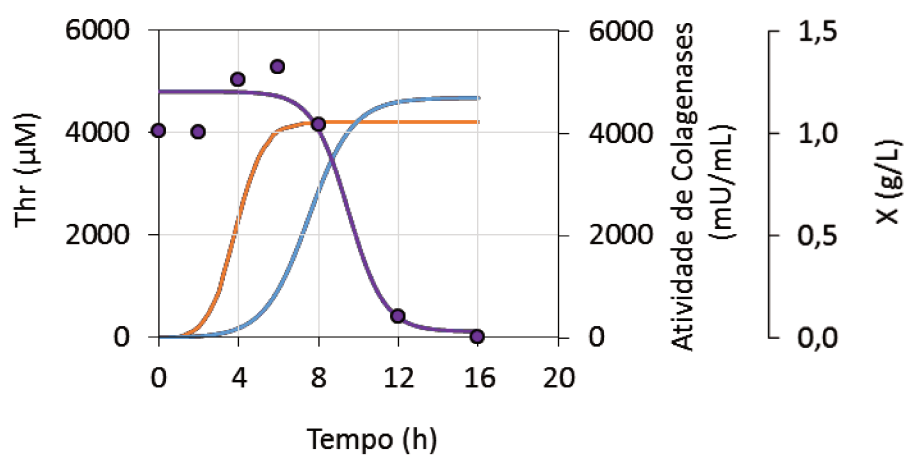
Duas vias são utilizadas para fermentar o glutamato entre os microrganismos: via metilaspártato e via hidroxiglutarato. Em ambas, os produtos finais são butirato, dióxido de carbono, acetato, amônia e hidrogênio.

De acordo com o estudo de Buckel e Barker (1973), o qual avaliou 15 cepas de 9 espécies diferentes, todos os microrganismos que utilizaram a via metilaspártato para catabolizar o glutamato foram do gênero *Clostridium*, dentre eles: *C. tetanomorphum*, *C. sticklandii*, *C. tetani*, *C. cochlearium*, *C. saccharobutyricum*, *C. sp. B1* (semelhante ao *C. tetanomorphum*) e *C. sp. C141* (semelhante ao *C. cochlearium*).

5.2.2.6. Treonina

A concentração de treonina que no início do cultivo era de 4032,6 μM , inicialmente aumentou para 5279,2 μM após 6 horas de cultivo (Figura 48 A). Possivelmente, este aumento está relacionado apenas à atividade de enzimas proteolíticas do *C. histolyticum* T248 sobre peptídeos do meio de cultura. O consumo significativo de treonina se deu a partir oito horas de fermentação, ocasionando o esgotamento deste aminoácido ao final do cultivo de 16 horas. A velocidade instantânea de consumo de treonina foi calculada e o máximo reportado foi de 1297,23 em 9,5 horas (Figura 48 B).

A



B

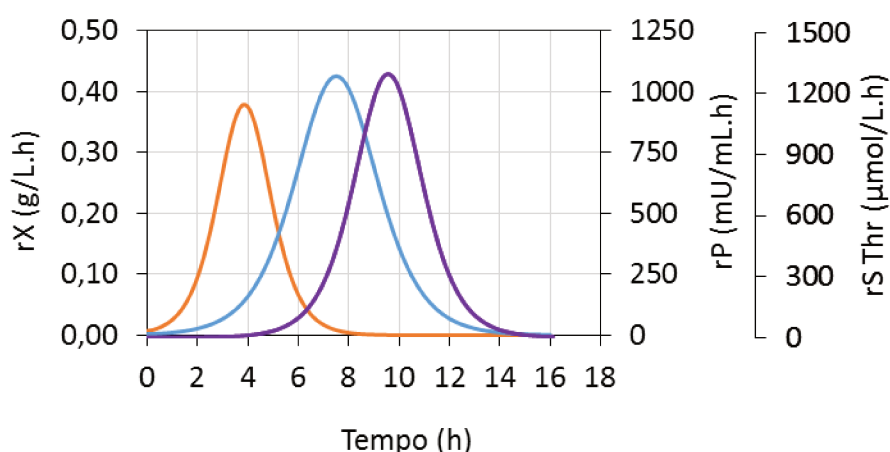


Figura 48. (A) Curva de consumo de treonina (Thr). Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais pelo modelo de Boltzmann (Thr – roxo, crescimento – laranja e atividade de collagenases – azul). (B) Velocidades instantâneas de consumo de Thr (linha roxa), crescimento microbiano (linha laranja) e produção de collagenases (linha azul) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases.

A via proposta na Figura 49 foi determinada a partir do trabalho de Fonknechten *et al.* (2010) utilizando *C. sticklandii* e das bases de dados de genes, KEGG (considerando os dados referentes ao *C. perfringens*) e de enzimas, BRENDA.

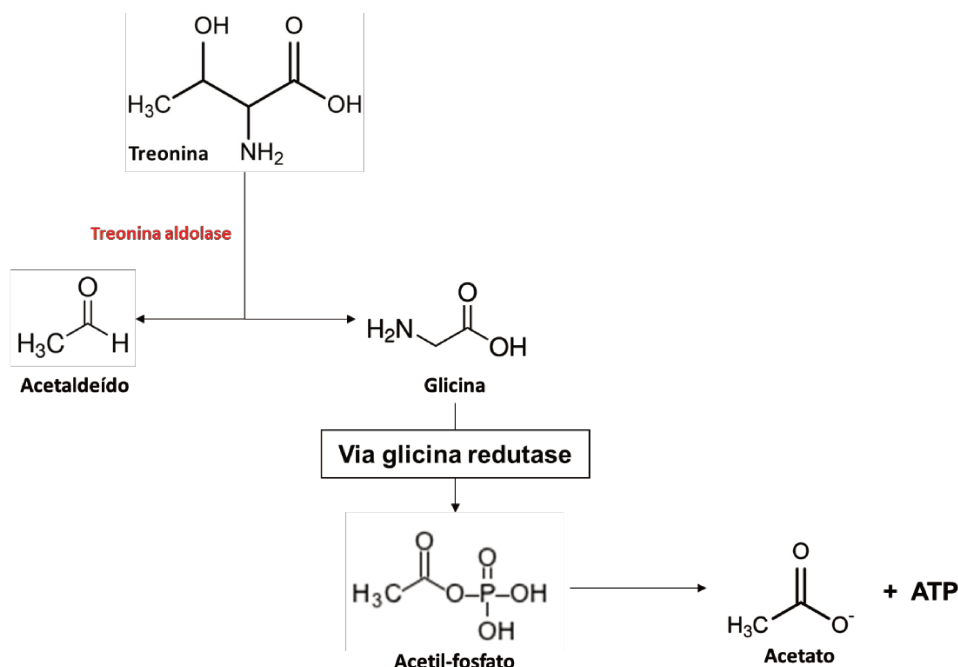


Figura 49. Via de catabolismo de treonina proposta para *C. histolyticum* T248.

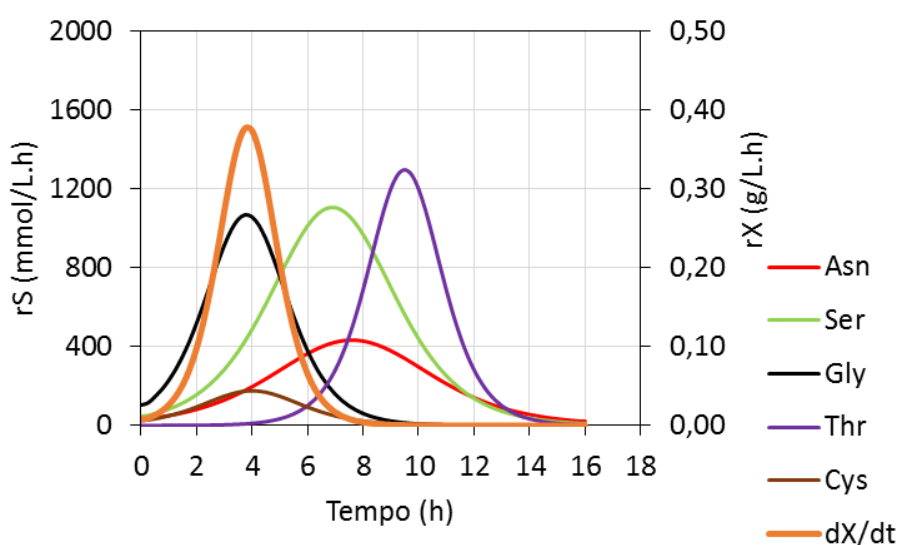
5.2.2.7. Consumo sequencial de aminoácidos por *C. histolyticum* T248 e proposta de um mapa metabólico central

De modo geral, o crescimento do *C. histolyticum* T248 se sobrepôs, pelo menos em parte, ao consumo dos sete aminoácidos, mas considerando as áreas de intersecção nas análises dos parâmetros cinéticos de consumo, aparentemente, asparagina, serina, arginina, glicina, foram os aminoácidos que contribuíram, inicialmente, de forma mais efetiva para o aumento de concentração celular. Sequencialmente, cisteína, glutamato e treonina contribuíram tanto para o aumento da concentração celular, quanto para a manutenção celular, contudo, para estes três últimos aminoácidos, o máximo consumo ocorreu durante o metabolismo secundário (Figura 50), concomitante à produção de colagenases (Figura 51). Desta forma, os aminoácidos são consumidos e catabolizados sequencialmente, gerando energia, que irá suprir as demandas necessárias da célula naquele momento do cultivo, seja

metabolismo de manutenção ou crescimento celular, incluindo a própria síntese protéica, o qual relaciona a produção de collagenases.

Além disso, arginina e glutamato foram os aminoácidos mais consumidos em termos de valor bruto de concentração, dentre eles, arginina no início do crescimento e glutamato predominantemente durante a fase estacionária de crescimento (Figura 52 A). Durante o metabolismo secundário de *C. histolyticum* T248 o consumo total de aminoácidos é menor, onde ocorre a produção de collagenases (Figura 52 B) e formação dos principais subprodutos do metabolismo, acetato e amônio (Figura 52 C).

A



B

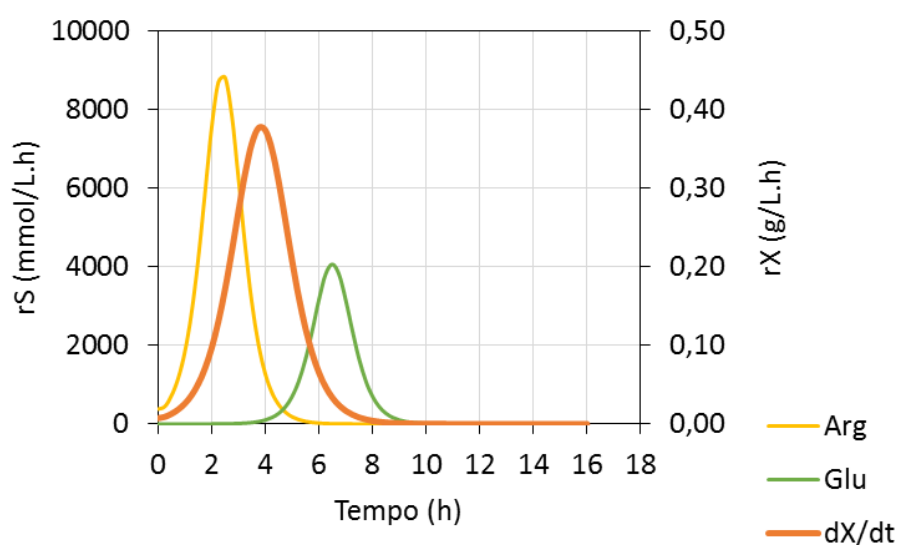
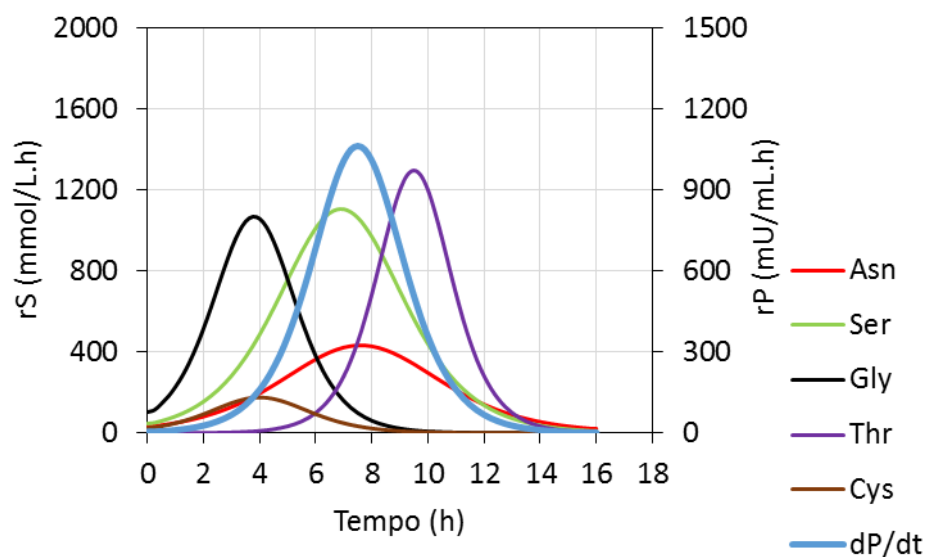


Figura 50. (A) Velocidades instantâneas de consumo de Asn, Ser, Gly, Thr, Cys e crescimento microbiano (linha laranja); e (B) Velocidades instantâneas de consumo de Arg, Glu e crescimento microbiano (linha laranja) durante fermentação com *Clostridium histolyticum* T248 para produção de collagenases.

A



B

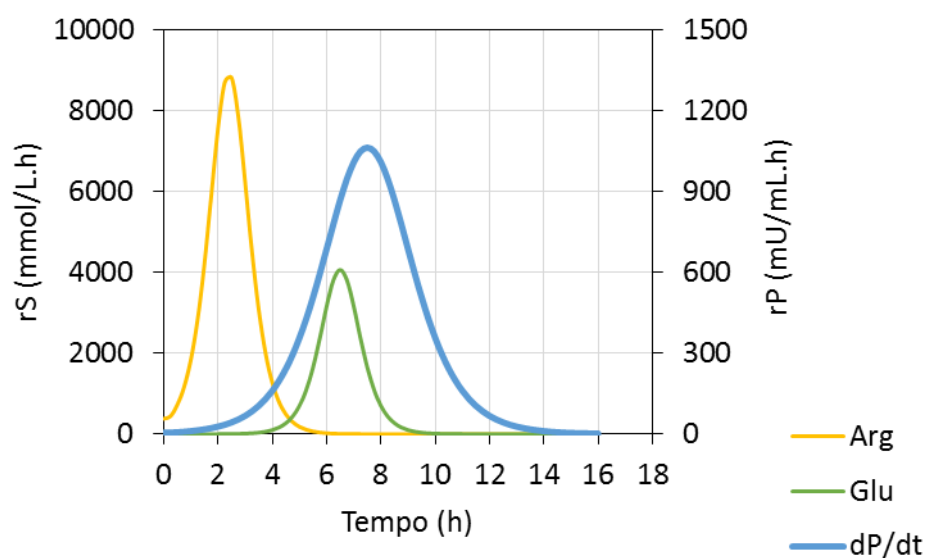
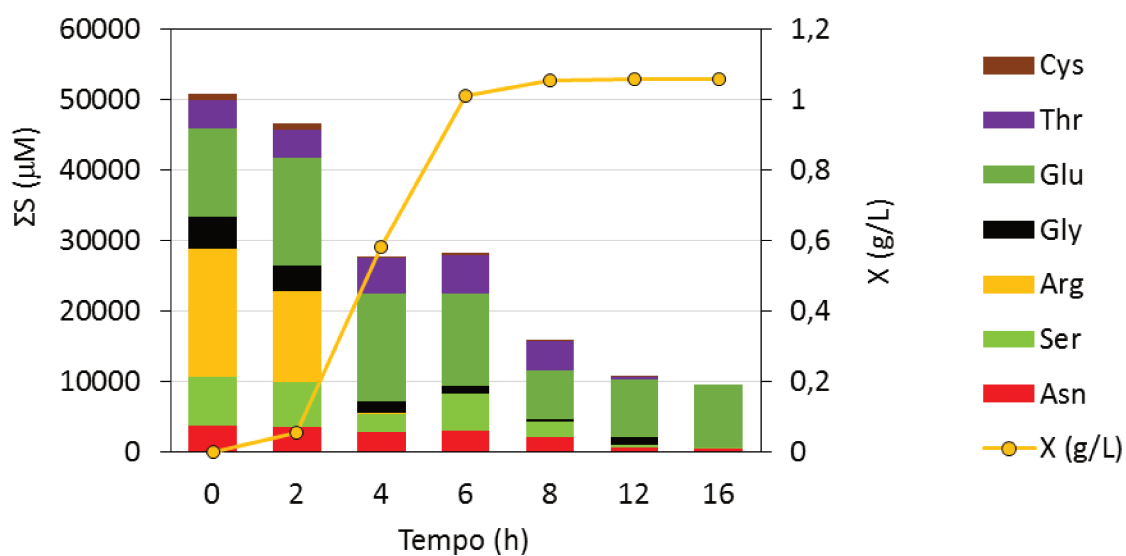
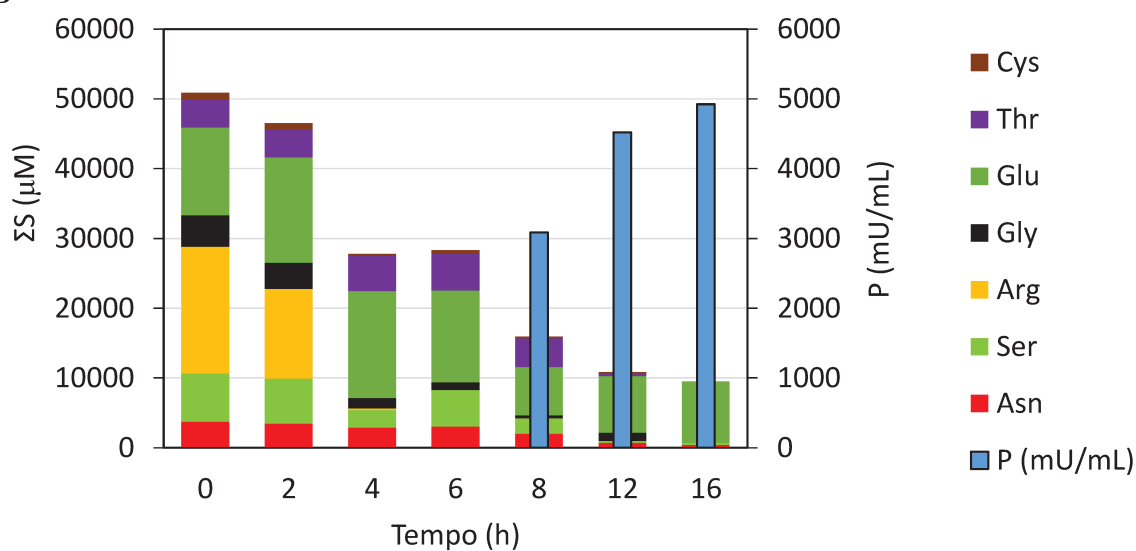


Figura 51. (A) Velocidades instantâneas de consumo de Asn, Ser, Gly, Thr, Cys e produção de collagenases (linha azul); e (B) Velocidades instantâneas de consumo de Arg, Glu e produção de collagenases (linha azul) durante fermentação com *Clostridium histolyticum* T248 para produção de collagenases.

A



B



C

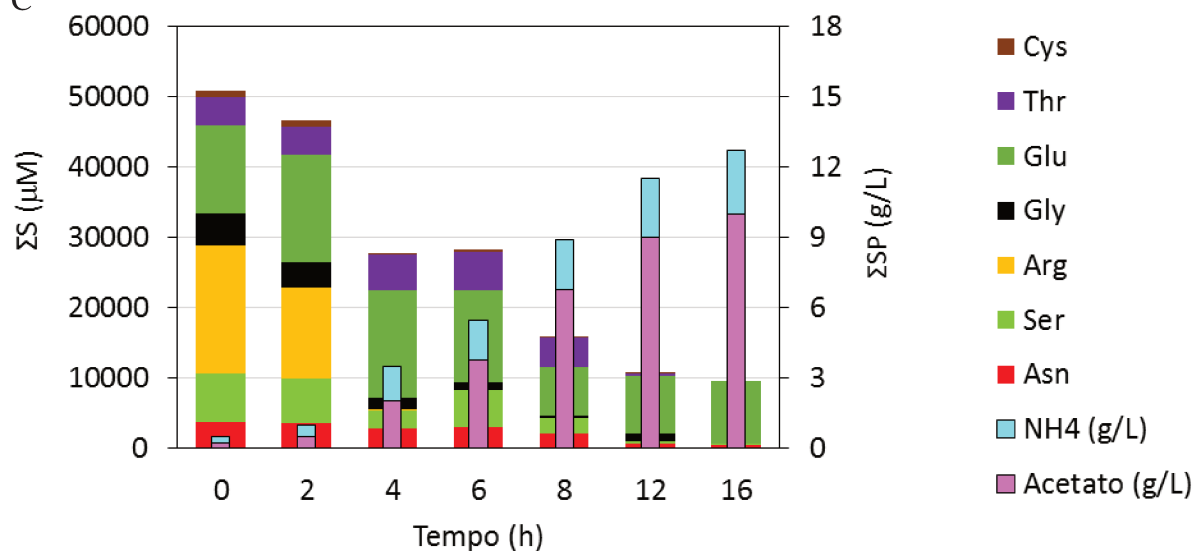


Figura 52. (A) Consumo acumulado de aminoácidos (ΣS) durante crescimento de *C. histolyticum* T248, X (g/L). (B) Produção de collagenases, P (mU/mL) e (C) formação dos subprodutos acetato e amônio (g/L).

A Figura 53 apresenta a curva do fator instantâneo de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), sendo o substrato determinado como a soma de todos os aminoácidos consumidos. Como pode ser observado, o maior direcionamento de aminoácidos para biossíntese ocorre entre cerca de duas a oito horas de fermentação, com pico em quatro horas e meia, aproximadamente, evidenciando a maior parte da energia de consumo dos aminoácidos para o metabolismo primário.

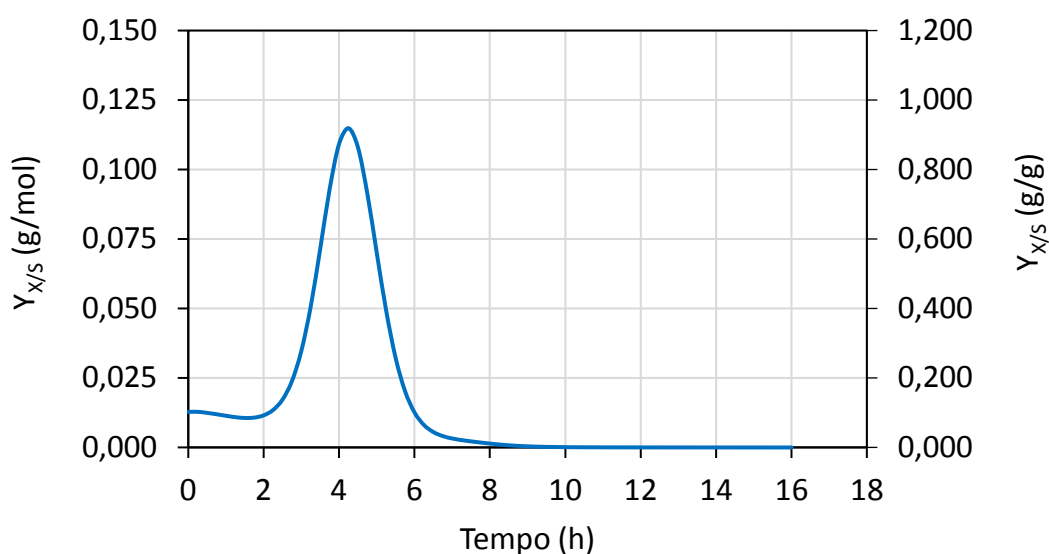


Figura 53. Curva do fator instantâneo de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$, em g/mol ou g/g) durante processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 Para produção de collagenases.

De acordo com os dados da fermentação, o crescimento celular do *C. histolyticum* T248 cessou aproximadamente após dez horas de processo fermentativo, entrando em fase estacionária. Desta forma, podemos sugerir a segregação do consumo de aminoácidos em duas fases: (i) fase inicial de consumo (de zero a dez horas de fermentação), onde a energia proveniente do catabolismo dos aminoácidos é direcionada à biossíntese, incluindo divisão celular, e ao metabolismo de manutenção; (ii) fase final de consumo (de dez a dezesseis horas de fermentação), na qual esta energia é direcionada principalmente para o metabolismo de manutenção celular. Caso esta hipótese seja verdadeira, seria possível definir quais aminoácidos exerceriam maior contribuição para o aumento da concentração celular, possibilitando assim a otimização das suas concentrações no meio de cultura inicial.

O padrão de consumo de aminoácidos, sequencial e preferencialmente, por bactérias que metabolizam aminoácidos, é um mecanismo bioquímico dinâmico para obtenção de energia, definido pelo genoma microbiano (BAPAT *et al.*, 2006,

FONKNECHTEN *et al.* 2010, NEUMANN-SCHAAL *et al.*, 2015, LICONA-CASSANI *et al.* 2016). Fonknechten e colaboradores (2010) observaram um consumo preferencial e sequencial de aminoácidos, sendo arginina, serina, treonina, cisteína, prolina e glicina foram consumidos na fase exponencial de crescimento, enquanto lisina, histidina, asparagina e valina foram consumidos na fase estacionária de crescimento e os demais aminoácidos não consumidos durante o processo fermentativo apresentaram evidências de um papel essencial no desenvolvimento de *C. sticklandii*. Baseado no padrão de consumo, os autores avaliaram o consumo de aminoácidos em três meios de cultura diferentes, desenvolvidos a partir do conhecimento dos aminoácidos consumidos em diferentes fases de crescimento: o primeiro meio foi formulado com aminoácidos que são consumidos na fase exponencial de crescimento, o segundo meio continha os aminoácidos utilizados nas fases exponencial e estacionária de crescimento e o terceiro meio foi equivalente ao segundo, suplementando com aminoácidos que aparentemente não eram metabolizados. Surpreendentemente, não foi observado crescimento no meio com a segunda combinação de aminoácidos (exponencial + estacionária), semelhantemente ao observado por Golovchenko e colaboradores (1985) utilizando uma cepa de *C. sticklandii*. Fonknechten *et al.* (2010) argumentaram que a combinação de aminoácidos influencia o crescimento de *C. sticklandii* e provavelmente existem propriedades reguladoras dos aminoácidos, implicando que a presença ou ausência de alguns aminoácidos pode reprimir a utilização ou a biossíntese de outros aminoácidos. Bouillaut e colaboradores (2013) demonstraram que a prolina redutase é um regulador do metabolismo central de *C. difficile*, atuando nas vias de oxirredução de prolina e glicina, nas reações de Stickland, e na produção de toxina.

Com base nos resultados de metabolismo de aminoácidos, utilização de glicose e formação de sub-produtos foi sugerido um modelo de mapa metabólico para *C. histolyticum* T248 (Figura 54).

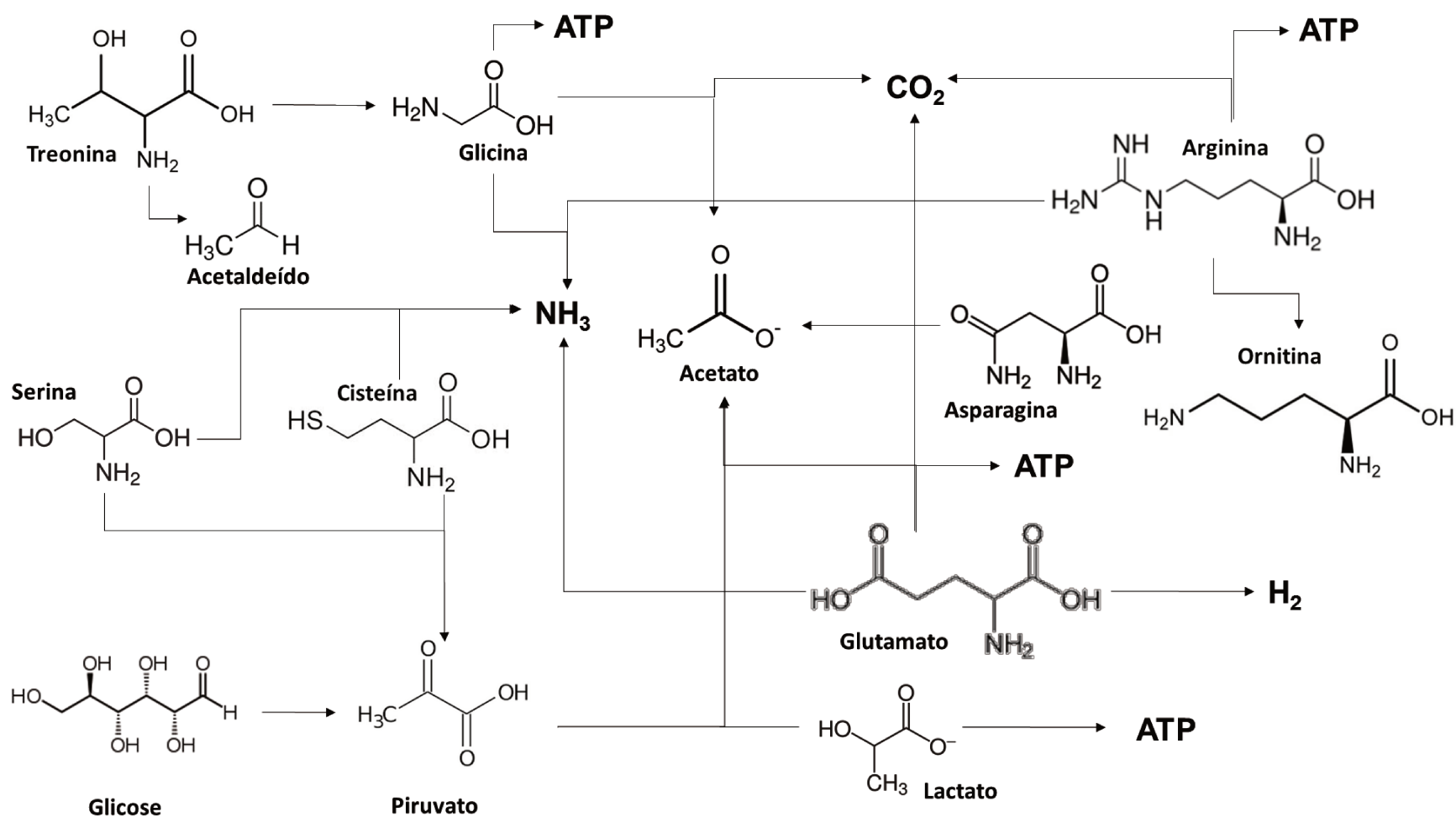


Figura 54. Mapa metabólico central de utilização dos aminoácidos, glicose e formação de produtos intermediários por *C. histolyticum* T248.

5.2.3. Indução e/ou estímulo da produção de collagenases por *C. histolyticum* T248

O metabolismo proteolítico de *C. histolyticum* T248 durante a produção de collagenases envolve, predominantemente, o catabolismo dos aminoácidos arginina, glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina e glutamato, gerando amônio, ácidos acético, fórmico, oxálico e possivelmente CO₂, H₂, ácidos propiônico e isobutírico como subprodutos; e o consumo de glicose à lactato. Considerando as análises dos parâmetros cinéticos de fermentação durante a produção de collagenases, incluindo a velocidade instantânea de consumo dos aminoácidos, curva dos fatores instantâneos de conversão de substrato em células, geração dos subprodutos, crescimento microbiano, produção de collagenases e a descrição das principais vias bioquímicas de catálise destes aminoácidos, é possível inferir que não ocorre indução da produção de collagenases pelo consumo de algum aminoácido especificamente, ou seja, o consumo dos aminoácidos está direcionado para o crescimento e manutenção celular e não diretamente para a produção de collagenases por *C. histolyticum* T248; enquanto os aminoácidos forem consumidos para a geração de energia, não haverá necessidade de atividade proteolítica para a obtenção das collagenases, que ocorre durante o metabolismo secundário. O consumo de glicose também evidencia que este substrato contribui à obtenção de energia. A produção de collagenases está associada ao metabolismo secundário, estimulada pelo esgotamento nutricional do meio.

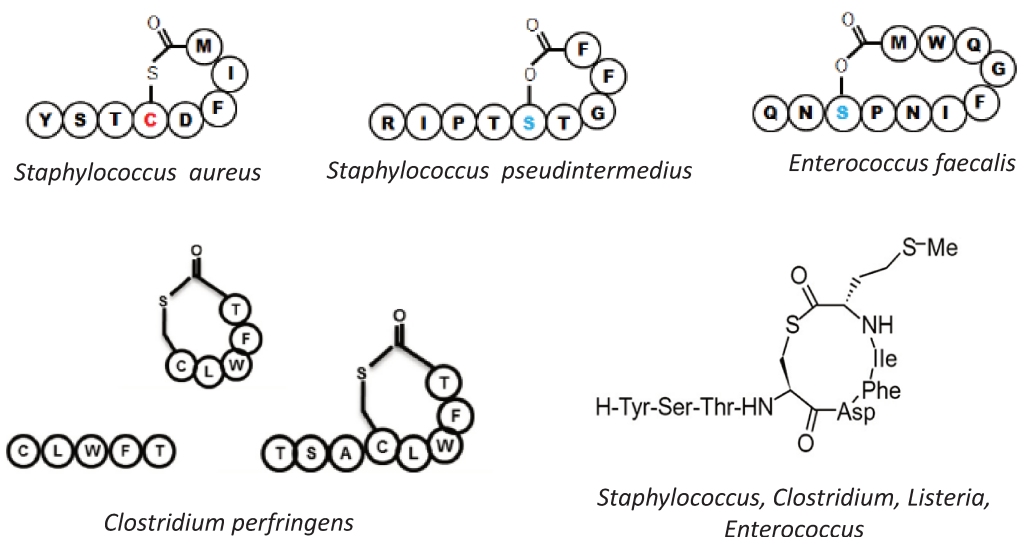
Karlsson e colaboradores (1999) avaliaram a repressão da toxina de *C. difficile* por aminoácidos. A expressão da toxina por *C. difficile* não foi afetada pela taxa de crescimento, fase de crescimento ou repressão catabólica. O fato do aumento das concentrações de certos aminoácidos no meio de cultura reprimirem a produção de toxina indicou que os genes da toxina podem responder à mecanismos reguladores moleculares envolvidos no esgotamento nutricional ou no metabolismo dos aminoácidos. Adicionalmente, a expressão da toxina ocorreu quando houve esgotamento de biotina, cofator utilizado nas reações de carboxilação, e também devido ao aumento da concentração de bicarbonato, indicando que a assimilação de CO₂ ou HCO₃⁻ regulam direta ou indiretamente os genes que expressam a toxina. A causa da regulação positiva na produção de toxinas por *C. difficile* durante a limitação de biotina não é compreendida. Contudo, a biotina é necessária na maioria das reações de fixação de CO₂, por exemplo, a conversão de acetil-CoA à malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase, primeiro passo na síntese de ácidos graxos. Além das toxinas, várias proteínas menores (22 kDa) foram reguladas positivamente durante a limitação da biotina.

O mecanismo de produção de enzimas proteolíticas durante o metabolismo secundário ocorre em outras espécies de *Clostridium*. A depleção de aminoácidos no meio induziu a produção da toxina tetânica por *C. tetani*, no qual o crescimento exponencial foi caracterizado pelo consumo de aminoácidos preferenciais, seguido por uma fase de desaceleração do crescimento, onde os peptídeos foram consumidos e a toxina foi produzida (LICONA-CASSANI *et al.* 2016). Da mesma forma, a formação de proteases por *C. sporogenes*, ocorre no final da fase exponencial de crescimento e, predominantemente, durante a fase estacionária (ALLISON & MACFARLANE, 1990). Neste trabalho, os autores observaram que a adição de aminoácidos triptofano, prolina, tirosina e isoleucina, amônia, glicose e fosfato reprimiram a síntese de proteases, bem como adição de ATP e ADP diminuíram a taxa de síntese de proteases, concluindo que a quantidade de energia disponível para as células influenciou fortemente a produção de proteases por *C. sporogenes*, ou seja, enquanto houver energia disponível não há necessidade de síntese da toxina para proteólise de substratos para a obtenção adicional de energia. Wiersma e colaboradores (1978) observaram que a síntese protéica de *C. sporogenes* foi reprimida quando o nível de energia das células estava elevado. Outros exemplos deste fenômeno de estímulo na produção de proteases durante esgotamento nutricional na fase estacionária têm sido observados também em bactérias gram-negativas, como víbrios (DAATSELAAR & HARDER, 1974; LONG *et al.*, 1981), *Achromobacter iophagus* (REID, 1978), *Aeromonas hydrophila* (PANSARE *et al.*, 1985), e espécies de *Pseudomonas* (MCKELLAR, 1982; WHOOLEY *et al.*, 1983). Adicionalmente, tal fenômeno está relacionado à sinalização molecular promovida pela própria célula durante o metabolismo secundário, através da síntese de peptídeos reguladores.

A repressão da síntese enzimática durante o início do crescimento microbiano, seguida pela desrepressão no final da fase exponencial, ou no início da fase estacionária, é um fator comum de formação de enzimas extracelulares em determinadas espécies proteolíticas de bactérias. A produção de proteases é iniciada pela limitação de nutrientes no meio e/ou pelo sistema conhecido como *Quorum Sensing* (QS). Esse fenômeno ocorre em várias bactérias, as quais regulam a expressão do gene em resposta a densidade populacional, envolvendo a produção de moléculas sinalizadoras extracelulares (autoindutoras – Ais, Figura 55). Em geral, vários autoindutores conhecidos de bactérias gram-positivas são peptídeos ativamente secretados de diversos tamanhos, natureza e estrutura (OHTANI *et al.*, 2009). Embora muitos aspectos da fisiologia microbiana possam ser controlados por QS, como: bioluminescência, esporulação, competência, produção de antibiótico, formação de biofilme e

secreção do fator de virulência, os mecanismos de autorregulação são complexos e variam conforme a espécie e o mecanismo fisiológico (RUTHERFORD & BASSLER, 2016).

A – AIs peptídicos



B – AIs não-peptídicos

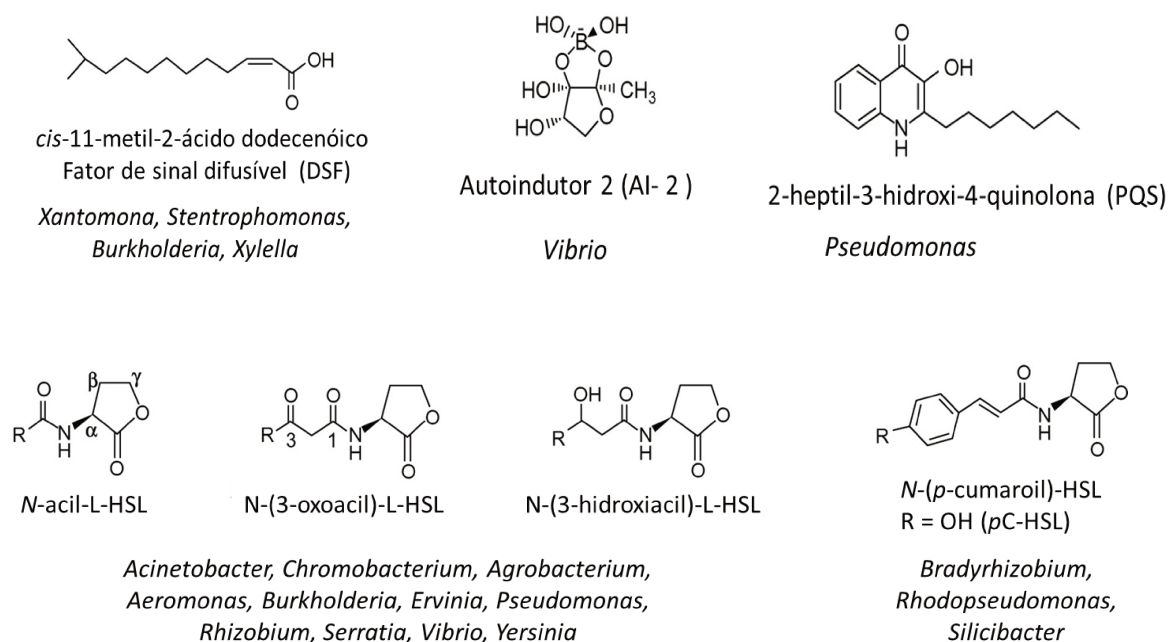


Figura 55. Sequências de peptídeos autorreguladores no sistema QS. A – Sequências de autoindutores peptídicos de: *Staphylococcus aureus* (YSTCDFIM), *Staphylococcus pseudintermedius* (RIPTSTGFF), *Enterococcus faecalis* (QNSPNIFGQWM) e *Clostridium perfringens* (CLWFT linear e cíclico e TSACLWFT) (MA *et al.*, 2015); B – Estrutura de compostos orgânicos que atuam como AIs de: *Listeria, Vibrio, Xantomona, Strentrophomonas, Burkholderia, Xylella, Vibrio, Acinetobacter, Chomobacteruim, Agrobacteruim, Aeromonas, Ervinia, Rhizobuim, Serratia, Yersinia, Bradyrhizobium, Rhodopseudomonas* e *Silicibacter* (LADE *et.al*, 2014).

Apesar das diferenças estruturais, nos mecanismos moleculares e componentes regulatórios, os QS dependem de três princípios (RUTHERFORD & BASSLER, 2016):

1) Produção de moléculas sinalizadoras, os AIs, os quais em baixas densidades celulares estão presentes em quantidades inferiores ao limite de detecção analítico. Em elevadas densidades celulares a produção é cumulativa, permitindo a detecção;

2) Os AIs são detectados por receptores que existem no citoplasma ou na membrana celular;

3) Ativa a expressão dos genes necessários para cooperação e detecção dos AIs resultando na ativação de sua produção.

Entretanto é importante diferenciar entre o verdadeiro sinal molecular envolvido na comunicação célula-célula e outros metabólitos como o acúmulo no meio extracelular durante a fase de crescimento específico ou sob certas condições fisiológicas, ou em resposta a mudanças ambientais específicas; reconhecimento por uma superfície celular específica ou receptor citoplasmático específico; e capacidade para induzir uma resposta celular que se estende além das alterações fisiológicas necessárias para metabolizar ou eliminar a toxicidade da molécula (ATKINSON & WILLIAMS, 2009).

Em *C. perfringens*, o regulador de crescimento do sistema QS tipo Agr, controla a produção de várias toxinas, incluindo a β -toxina (CPB), a virulência e a esporulação. Esse regulador de crescimento foi primeiramente descoberto em *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus pyogenes* regulam a expressão de seus fatores de virulência via sistema QS utilizando peptídeos sinalizadores de 7 a 17 aminoácidos. Bactérias gram-positivas utilizam o peptídeo autoinduzível no sistema QS tipo Agr que varia de 5 a 12 aminoácidos e os sinalizadores podem conter um anel de tiolactona ou lactona (MA *et al.*, 2015).

O sistema QS Agr tem sido reportado como responsável pela regulação da produção de toxinas em diferentes espécies de *Clostridium* (DARKOH & ASIEDU, 2015). Vidal e colaboradores (2012) demonstraram que um aminoácido-8, AgrD, derivado de um peptídeo nomeado 8-R superregula a produção de β -toxina pelo sistema QS em *C. perfringens*. Ohtani e colaboradores (2009), e Ohtani (2016), mostraram que a produção de enzimas extracelulares e toxinas por *C. perfringens*, como alfa, beta e kappa toxinas, codificadas pelos genes *plc*, *pfoA* e *colA*, respectivamente, são positivamente reguladas por dois componentes do sistema VirR/VirS, sendo considerado o maior regulador de virulência nesse microrganismo. Esse sistema é muito importante para a ativação da produção da toxina,

que resulta na degradação da célula hospedeira e é crítico para a sobrevivência de *C. perfringens* dentro do hospedeiro. VirS é um sensor histidina quinase e VirR é um regulador de resposta; quando VirS é estimulado no meio, VirS autofosforila a um resíduo de histidina, transferindo o fosfato para VirR. Uma vez que o VirR seja ativado por fosforilação, ocorre a regulação da expressão do gene. Um esquema da produção de toxinas por *C. perfringens* modulada por este sistema é mostrado na Figura 56.

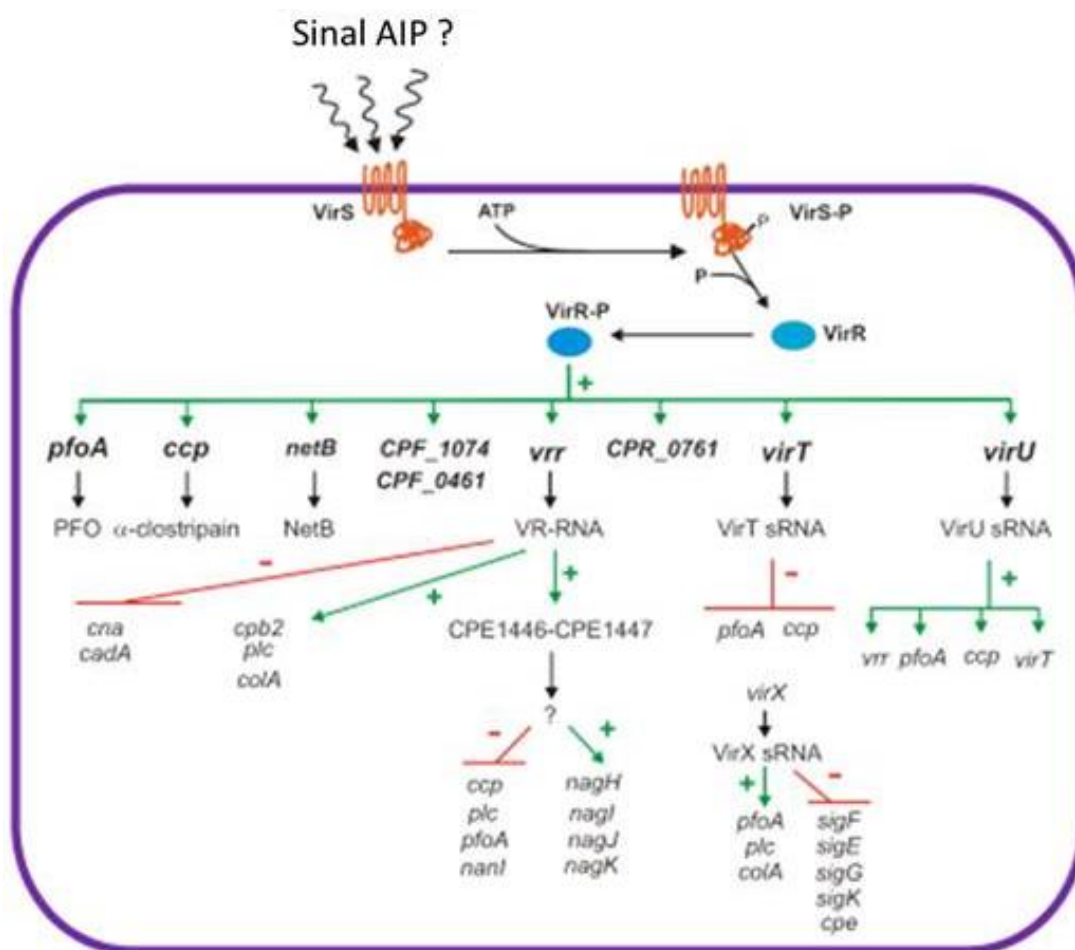


Figura 56. Modelo da regulação da expressão gênica pelo sistema de transdução de sinal de dois componentes VirSR. Regulação positiva: seta verde e símbolos +; Regulação negativa: linhas vermelhas e símbolos -. Após a detecção de um sinal externo (potencialmente um AIP), o VirS- sensor histidina quinase (mostrado em laranja) autofosforila e, em seguida, torna-se o doador de fosfato para o seu correspondente regulador resposta, VirR (mostrado em azul). O VirR fosforilado regula diretamente a expressão de *pfoA*, *ccp*, *netB*, *vrr*, *virT*, *virU*, *CPF_1074*, *CPF_0461* e *CPR_0761* por ligação à VirR localizado nas regiões promotoras destes genes. VirR regula indiretamente a toxina indicada, ou os genes do fator de virulência, através das moléculas de RNA VR-RNA, VirU ou VirT. O sistema CPE1446 / CPE1447 controlado por VR-RNA regula positivamente a expressão de genes de hialuronidase, mas regula negativamente a transcrição de *ccp*, *plc*, *pfoA* e *nanI*. O VirSR-independente, VirX sRNA, regula positivamente a expressão de *pfoA*, *plc* e *colA*, e controla negativamente a transcrição de *cpe* e a esporulação Sigma, *sigE*, *sigG* e *sigK* (CARTER *et al.*, 2014).

Além das bactérias, as células de mamíferos, plantas e algas secretam compostos não-antibióticos de inibição de quórum, os quais ativam ou inibem o QS bacteriano. As plantas medicinais tradicionais são umas das fontes mais promissoras na busca de componentes inibitórios naturais QS. Assim, vários compostos de origem natural, identificados como metabolitos secundários, produzidos por algas, fungos, bactérias e plantas superiores, podem interferir no sistema QS bacteriano e inibir a formação de biofilmes, pois interferem na expressão de características específicas. Esses compostos são estruturalmente semelhantes ao das moléculas de sinal QS e então antagonizam a eles, e também tem a capacidade de degradar os receptores de sinais. A Tabela 29 mostra um resumo dos compostos naturais inibitórios QS (LADE *et al.*, 2014). Com base nessas informações, possivelmente, a produção de collagenases por *C. histolyticum* T248 pode estar relacionada ao sistema QS, através da regulação da expressão do gene específico utilizando AIs sinalizadores e não unicamente ao catabolismo dos aminoácidos.

Contudo, a partir da compreensão de parte do metabolismo microbiano de *C. histolyticum* T248, ao menos o estágio fisiológico durante a produção de collagenases na fase estacionária de crescimento, é possível estabelecer estratégias de processo visando o aumento de produtividade volumétrica de collagenases, considerando que a produção ocorre após esgotamento nutricional durante o metabolismo secundário.

Tabela 29. Compostos naturais como inibidores de *Quorum Sensing* (modificada de Lade *et. al*, 2014).

Componente Natural	Fonte	Atividade QS
Furanona/ 2(5H)-Furanona	Macroalga (<i>Delisea pulchra</i>)	Inibe a formação de biofilme em <i>A. hydroph</i>
(5Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona	Macroalga (<i>Delisea pulchra</i>)	Inibe a mobilidade e formação de biofilme em <i>E. coli</i>
Ajoene (1-Alildisulfonil-3,2-(propeno-1-sulfonil)-propeno)	Extrato de alho (<i>Allium sativum</i>)	Diminui a expressão de RNAs regulatórios em <i>P. aeruginosa</i> PAO1
Iberin (1-Isotiocianato-3-(metilsulfonil)propano)	Extrato de rábano (<i>Armoracia rusticana</i>)	Inhibe a expressão dos genes responsáveis pelo fator de virulência em <i>P. aeruginosa</i>
Sulforafano (1-Isotiocianato-4-(metilsulfonil)butano)	Brócolis	Reduz a expressão de lasI-luxCDABE em <i>P. aeruginosa</i>
Erucin (4-metiltiobutil isotiocianate)	Brócolis	Reduz a expressão de lasI-luxCDABE em <i>P. aeruginosa</i>
Naringin (4'5-diOH-Flavona-7-rhgluc)	Extrato de Citrus	Diminui o QS mediado a formação de biofilme e a mobilidade em <i>Y. enterocolitica</i>
Naringenin (4',5,7-Trihidroxiflavanona)	Extrato da casca Malagasy (<i>Combretum albiflorum</i>)	Reduz a produção de piocianina e elastase em <i>P. aeruginosa</i> PAO1.
Taxifolina / Distilina (Diidroquercetina)	Extrato da planta Malagasy (<i>Combretum albiflorum</i>)	Reduz a produção de piocianina e elastase em <i>P. aeruginosa</i> PAO1
Morina (2',3,4',5,7-Pentahidroxiflavona)	Toranja (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	Inhibe LasR e RhlR protease dependente, elastase and hemolisina em <i>P. aeruginosa</i> PAO1
Patulina/ Clavacina (4-Hidroxi-4H-furo[3,2-c] 2(6H)-pirano)	<i>Penicillium sp.</i>	Sub-regula os genes QS para a formação de biofilme e virulência em <i>P. aeruginosa</i>
Ácido Penicílico (3-Metóxi-5-metil-4-oxo-2,5-ácido hexadienoico)	<i>Penicillium sp.</i>	Sub-regula os genes QS para a formação de biofilme em <i>P. aeruginosa</i>
Vanilina (4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeido)	Extrato de baunilha (<i>Vanilla planifolia Andrews</i>)	Inibe a formação de biofilme em <i>A. hydrophila</i>
Ácido Rosmarínico (R-O-(3,4-Dihidroxicinamoil)-3-(3,4-dihidroxifenil) ácido láctico)	Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	Inibe a protease, elastase, produção de hemolisina, formação de biofilme e fator de virulência em <i>P. aeruginosa</i>

5.3. Bateladas sequenciais como estratégia para aumento da produtividade volumétrica de collagenases por *C. histolyticum* T248

Na produção industrial que utiliza processos fermentativos, os fatores que governam a produtividade e rendimentos do processo são determinantes para estabelecimento da máxima capacidade de produção da instalação industrial, considerando aspectos do processo biológico, como: conversão do substrato, estequiometria, fisiologia microbiana, produtividade da cepa, dentre outros, bem como aspectos de engenharia de processo, que permitem um diagnóstico preciso acerca da produtividade do processo diante das instalações disponíveis. Numa análise preliminar, a racionalização das informações técnico-científicas permite a adoção de estratégias de processo que visem o aumento de produtividade e rendimento, sem que seja necessária a aquisição de equipamentos maiores, ou aquisição de mais equipamentos, ou seja, primeiramente deve-se explorar a capacidade máxima de produção nas atuais circunstâncias.

Convencionalmente, e consensualmente, os processos fermentativos são classificados em três tipos: batelada, batelada alimentada e contínuo. O termo batelada (ou batelada simples) é empregado para a produção em função de tempo, conduzida em um único fermentador, sem adição de nutrientes ao longo do processo; a batelada é reconhecida como um método clássico de cultivo. A batelada alimentada, ou descontínua com alimentação, consiste em uma cultura descontínua seguida de alimentação contínua ou gradual do fermentador com nutrientes a uma velocidade adequada, sem retirar meio de cultura, resultando no aumento do volume total do meio líquido. Nesse tipo de processo, a alimentação é efetuada antes do esgotamento dos nutrientes fundamentais ou mesmo antes que um deles atinja uma concentração muito elevada. Já o processo fermentativo contínuo é caracterizado por fornecer suprimento de nutrientes de forma contínua ao microrganismo, em uma determinada taxa de alimentação, procurando manter o crescimento microbiano controlado, e simultaneamente com drenagem do meio fermentado para recuperação do produto, em taxa semelhante à de alimentação, para manter o equilíbrio de todo o sistema (MALÉK & FENCL, 1966). Esta última estratégia é a mais desejável em processos fermentativos industriais, devido a maiores rendimento e produtividade, embora alguns aspectos operacionais mereçam atenção (GERARDI, 2010).

Variações de cada um dos três modos de fermentação incluem modificações ou particularidades, como por exemplo, o método semi-contínuo, uma variação do processo

contínuo, onde uma parte do volume fermentado é retirada do fermentador, em intervalos de tempo adequados, e preenchidos com novo meio nutriente. Esse método representa as chamadas bateladas sequenciais. A estratégia de bateladas sequenciais é simplesmente uma variação do antigo e conhecido processo em tratamento de águas residuárias, na formação de lodos ativados. Entretanto, as bateladas sequenciais diferem das plantas de lodos ativados, pois combinam todas as etapas do processo fermentativo em um único tanque ou reator, enquanto que as instalações convencionais de lodo ativado dependem de vários tanques em sequência (WILDERER *et al.*, 2001; POLTAK, 2005).

Em processos fermentativos industriais para a produção de xilitol e etanol (CHENG, *et al.*, 2014), de biohidrogênio (ORTIGUEIRA *et al.*, 2015) e tratamento de efluentes Kraft de fábricas de papel (XAVIER *et al.*, 2008), é frequentemente utilizada a estratégia de bateladas sequenciais. Além disso, reatores em bateladas sequenciais têm sido usados como uma ferramenta estratégica de engenharia evolutiva, ou seja, seleção de fenótipos microbianos desejáveis a processos específicos, como cepas mutantes e mais estáveis, através de repiques sucessivos em sistemas controlados (SAUER, 2001). Outro exemplo dessa aplicação tem sido reportado por Wright e colaboradores (2011), para seleção de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RWB218 tolerante a elevadas concentrações de ácido acético, visando a produção de etanol a partir de hidrolisados de plantas de biomassa ligno-celulósicos.

A estratégia de bateladas sequenciais tem sido adotada ao longo de muitos anos por apresentar muitas características favoráveis para produção, tais como: redução da influência das condições de inóculo, redução da fase lag de crescimento microbiano, ausência de operações de propagação da cultura, aumento de produtividade volumétrica e redução de custos. Ainda, o *layout* de plantas de fermentação que utilizam esta estratégia pode combinar a utilização de um ou mais biorreatores (ORTIGUEIRA *et al.*, 2015, WILDERER *et al.*, 2001, CRUZ *et al.*, 2012, ABBOTT, 2009).

Ortigueira e colaboradores (2015) observaram que a produção de biohidrogênio usando como substrato, a biomassa da microalga *Spirogyra* sp. pré-tratada por hidrólise ácida (1N de H₂SO₄), utilizando a estratégia de bateladas sequenciais, aumentou a produção do biogás, mantendo-se próximo a um nível constante durante três bateladas. Outras vantagens demonstradas pelos autores foram a eliminação da fase lag de crescimento, obtenção de elevado rendimento e do acúmulo de metabólitos, os quais podem diminuir o pH dentro do biorreator.

Estratégias de processo fermentativo como batelada alimentada, reciclo de células ou processo contínuo não seriam adequadas para o aumento da produção de collagenases por *C. histolyticum* T248, pois o microrganismo não teria o esgotamento nutricional necessário para a sinalização da produção de collagenases. Informações obtidas a partir de ensaios realizados no nosso grupo de pesquisa, considerando algumas dessas estratégias, e outros modos de fermentação, evidenciaram que não houve aumento significativo na produção de collagenases por *C. histolyticum* T248, mesmo sendo obtido aumento de biomassa. Os mecanismos que estimulam a produção de metabólitos secundários são complexos e variam em cada espécie microbiana, podendo ser regulados por sistemas moleculares, proteínas específicas, esgotamento nutricional ou mesmo estes fatores conjuntamente (KARLSSON *et al.*, 1999; KOLTER, 1999, DARKOH & ASIEDU, 2015; STOCK, 2016).

Contudo, processos fermentativos em bateladas sequenciais são interessantes e usualmente utilizados em processos industriais, incluindo fermentações anaeróbias. No presente estudo, a estratégia adotada consistiu inicialmente, na condução de processo fermentativo em batelada simples, pelo período previamente estabelecido (20 h) e, ao final do processo fermentativo, um percentual do volume do caldo fermentado foi drenado e coletado (90%); o fermentado remanescente serviu como inóculo para a propagação em nova batelada, sequencialmente. Novo meio de cultura foi adicionado ao fermentado remanescente no fermentador, respeitando a mesma proporção de fermentado coletado anteriormente. Prosseguiu-se então uma nova batelada de processo fermentativo, em sequência à batelada anterior, por período avaliado de acordo com o perfil de crescimento, para então, ao final do processo, novamente parte do fermentado ser drenado, coletado e novo meio de cultura ser adicionado ao fermentado remanescente, e assim prosseguiu-se o processo sucessivamente.

A Figura 57 apresenta as cinéticas de crescimento e a produção de collagenases empregando-se quatro bateladas sequenciais nos fermentadores de bancada. O processo fermentativo teve desempenho satisfatório, não sendo observada redução do crescimento ao longo das bateladas sequenciais, nem redução na produção de collagenases.

Ao longo das bateladas sequenciais, o tempo de processo reduz significativamente, devido a redução da fase lag a partir da segunda batelada, o que tem impacto direto na produtividade do processo (Tabela 30). Com isso, a redução no tempo de fermentação da segunda batelada para catorze horas, da terceira e quarta batelada para doze horas, promoveram aumento de produtividade. Adicionalmente, a máxima produção de collagenases na segunda, terceira e quarta batelada ocorreu com 10 horas, o que contribuiria

ainda mais com o aumento de produtividade caso as bateladas prosseguissem com esse tempo de processo. Os parâmetros cinéticos das bateladas sequenciais são mostrados na Tabela 31.

Vale ressaltar que, durante as bateladas, as células mantiveram a produção de biomassa e a formação de collagenases em nível relativamente elevado, característica importante e possivelmente relacionada à estabilidade fisiológica da cepa produtora.

Analisando os resultados das velocidades instantâneas máximas de produção de biomassa e de formação de produto é possível observar que ocorre uma diminuição no tempo de produção/formação a partir da segunda batelada, também observado para as velocidades específicas máximas, as quais foram maiores em um tempo menor de processo. Essa constatação está diretamente relacionada a redução da fase lag, observada a partir da segunda batelada. Certamente, a maior contribuição para aumento de produtividade volumétrica de collagenases foi a redução da fase lag e, adicionalmente, a reposição sucessiva de meio de cultura garantiu a entrada de nutrientes e diminuiu o acúmulo de metabólitos, os quais podem significativamente prejudicar o cultivo, conforme observado por outros autores (ORTIGUEIRA *et al.*, 2015).

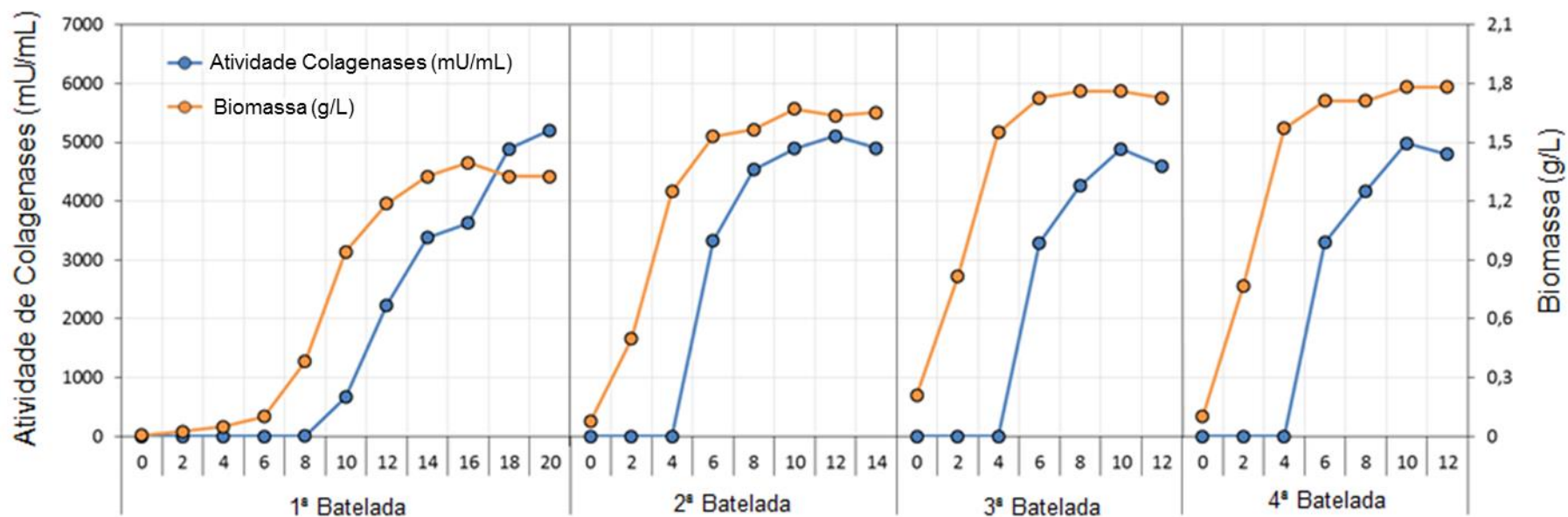


Figura 57. Produção de colagenases e cinética de crescimento de *C. histolyticum* T248 em quatro bateladas sequenciais. As linhas e pontos azuis representam a atividade de colagenases (mU/mL). As linhas e pontos laranjas representam o crescimento microbiano, em biomassa (g/L).

Tabela 30. Parâmetros de processo durante as etapas de produção de collagenases por *C. histolyticum* T248 em quatro bateladas sequenciais.

Parâmetros	Etapas	Bateladas sequenciais				Total
		1° batch	2° batch	3° batch	4° batch	
Atividade Collagenases (mU/mL)	Fermentado	5.204	4.897	4.595	4.796	-
	Clarificado	3.959	4.536	4.286	4.185	-
	Concentrado FT 5 kDa	94.348	105.068	93.293	89.689	-
	Liofilização (U/g)*	4.003	3.755	3.403	3.741	-
mU total	Fermentado	26.020.408	22.037.837	20.678.443	21.583.229	90.319.919
	Clarificado	17.818.322	19.506.891	18.430.778	17.995.900	73.751.894
	Concentrado FT 5kDa	11.695.448	13.617.065	11.237.411	10.853.103	47.403.027
	Liofilização	6.925.726	5.332.313	3.879.272	4.451.338	20.588.649
Tempo de processo (h)	Inóculo	18	0	0	0	18
	Fermentação	20	14	12	12	58
	Fermentação total					76
	Concentração FT 5 kDa	8	8	8	8	32
	Tempo total efetivo**					84*
P_v	Fermentação					1.188.420
(mU.mL/h)	Concentração FT 5 kDa					564.322

*unidade enzimática do líofilo expressa em mU/g

**o processo de recuperação por FT 5 kDa (8h) durante as bateladas sequenciais ocorre simultaneamente aos processos fermentativos.

FT 5 kDa = filtração tangencial em *cutoff* de 5 kDa.

Tabela 31. Parâmetros cinéticos obtidos nas bateladas sequenciais: velocidades instantâneas máximas de formação de biomassa ($r_{X_{max}}$) e de formação de produto ($r_{P_{max}}$), e velocidades específicas máximas de formação de biomassa ($\mu_{X_{max}}$) e de formação de produto ($\mu_{P_{max}}$).

Parâmetro	Bateladas sequenciais			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
$r_{X_{max}}$ (g/L.h)	0,27 (9,00)	0,48 (3,00)	0,53 (2,25)	0,60 (2,25)
$r_{P_{max}}$ (mU/mL.h)	1029,86 (12,50)	2924,40 (5,75)	2945,84 (5,75)	2693,15 (5,75)
$\mu_{X_{max}}$ (h ⁻¹)	0,67 (6,50)	0,83 (1,50)	0,74 (1,25)	0,93 (1,25)
$\mu_{P_{max}}$ (U/g.h)	811,44 (12,5)	1863,67 (5,75)	1709,87 (5,75)	1553,23 (5,75)

Entre parênteses estão os tempos nos quais os parâmetros foram determinados.

A caracterização das collagenases obtidas nas bateladas sequenciais indicou que não houveram modificações no produto. As análises de SDS-Page e Zimografia indicaram que o perfil protéico das collagenases se manteve o mesmo ao longo de cada batelada sequencial, não sendo observada degradação das enzimas ou alteração no perfil protéico (dados não mostrados). Similarmente, após processamento para obtenção do IFA (líófilo) de cada batelada sequencial, o perfil protéico, analisado por SDS-Page e Zimografia (Figura 58) e eletroforese capilar (Figura 59 e Tabela 32), também foi o mesmo em cada batelada.

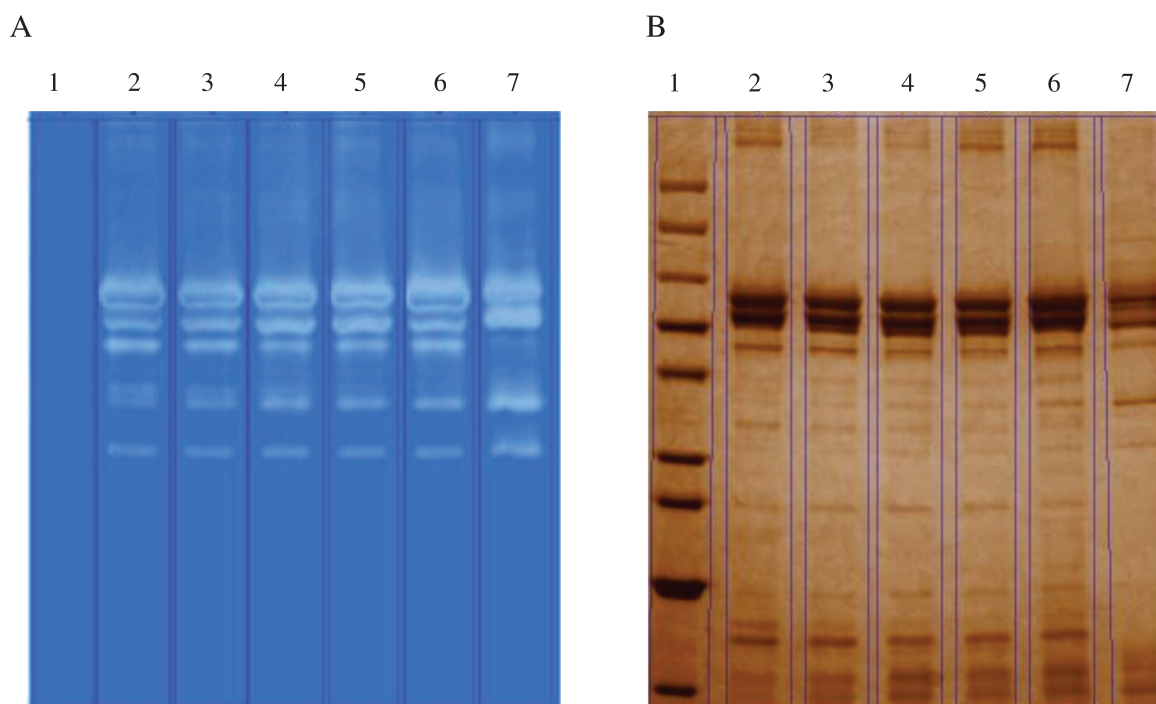


Figura 58. Perfil protéico dos líófilos obtidos em bateladas sequenciais, analisados por SDS-Page, revelado por zimografia (A) e prata (B). Linhas: 1 - Padrão de peso molecular, 2 –primeira batelada, 3 –segunda batelada, 4 – terceira batelada, 5 –quarta batelada, 6 – Líófilo da batelada simples, 7 – Padrão interno de Collagenases.

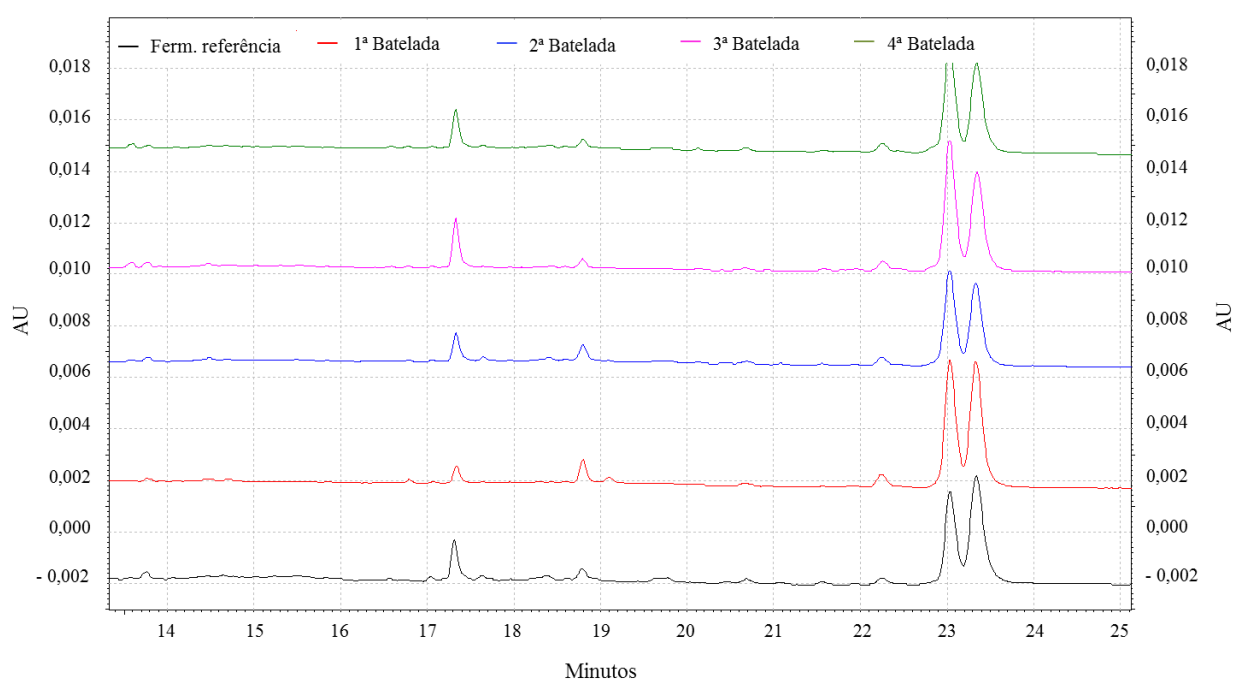


Figura 59. Perfil protéico das collagenases, pela análise de SDS capilar, dos liófilos gerados das bateladas sequenciais comparado ao liófilo de uma fermentação padrão, utilizada como referência.

Tabela 32. Resultados das análises dos eletroferogramas, de Eletroforese Capilar, obtidas dos liófilos das bateladas sequenciais e batelada simples para produção de collagenases por *C. histolyticum* T248.

Liófilo	Área total	Área total relativa (%)	Altura total	Altura total relativa (%)	Relação baixo/alto peso (Area)
1ª Batelada	98.163	84,4	9.788	0,938	0,881
2ª Batelada	67.246	76,9	6.878	0,654	1,053
3ª Batelada	87.423	80,4	8.918	0,872	1,144
4ª Batelada	74.863	78,5	7.666	0,618	1,074
Batelada Simples	81.563	76,1	7.804	0,810	0,678

Os resultados das análises dos liofilizados gerados das bateladas sequenciais, analisados por cromatografia em troca iônica MonoQ, estão representados na Figura 60 e Tabela 33. Para a análise dessa metodologia, considerou-se que o cromatograma da solução padrão corresponde a fermentação referência e a identificação das collagenases foi feita por comparação do tempo de retenção das collagenases referências do padrão USP I e II, em que a pureza das collagenases foram avaliadas usando o método de porcentagem de área e excluindo picos associados com o branco. O perfil cromatográfico das collagenases provenientes de bateladas sequenciais e do processo em batelada simples foi o mesmo. Desta forma,

corroborando os resultados anteriores de SDS-Page, Zimografia e cSDS, os resultados de caracterização das collagenases por MonoQ evidenciaram elevada similaridade no processo conduzido em batelada sequencial.

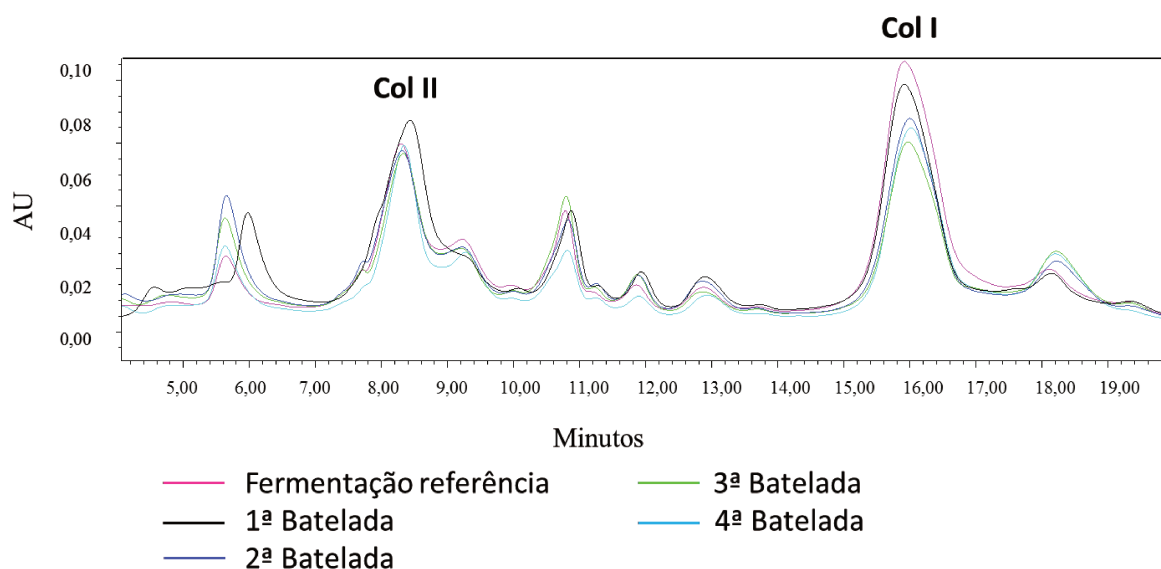


Figura 60. Cromatograma de Mono Q sobrepostos mostrando o perfil protéico das amostras liofilizadas do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248. Condições cromatográficas: Coluna analítica MonoQ 5/50 GL (GE), Plataforma HPLC Alliance (Waters), Detector DAD (monitoramento em 280 nm). A – Perfil das amostras liofilizadas das bateladas sequenciais 1, 2, 3 e 4, comparadas com o perfil de uma fermentação referência (batelada simples) destacando os picos das collagenases I e II. AU: unidade arbitrária.

Tabela 33. Resultados das análises cromatográficas em Mono Q, obtidas dos líofilos das bateladas sequenciais e batelada simples.

Liófilo	Área Absoluta			Área %		
	Col I	Col II	Total	Col I	Col II	Total
1ª Batelada	4.283.365	3.480.207	7.763.572	11,53	9,37	20,90
2ª Batelada	3.542.858	2.274.379	5.817.237	13,09	8,40	21,49
3ª Batelada	3.092.369	2.155.384	5.247.753	9,13	6,37	15,50
4ª Batelada	3.414.553	2.038.645	5.453.198	14,06	8,40	22,46
Batelada Simples	5.114.276	2.401.079	7.515.355	10,08	4,73	14,81

Os resultados obtidos adotando o modo de fermentação em bateladas sequenciais foram promissores. O sistema de bateladas sequenciais nesse estudo foi capaz de manter a produção de collagenases em forma semi-contínua.

No nosso laboratório de pesquisa é possível realizar duas bateladas simples, uma em seguida da outra, considerando expediente normal de uma semana, de segunda à sexta-feira com três turnos de trabalho, devido a própria viabilidade de tempo do processo. Entretanto, adotando a estratégia de bateladas sequenciais seria possível realizar até seis bateladas numa mesma semana. Nesse sentido, a Tabela 34 mostra um comparativo entre diferentes parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais, com uma batelada simples e quatro bateladas sequenciais, e considerando uma simulação de duas bateladas simples, uma após a outra, e uma simulação de seis bateladas sequenciais. A estratégia de processo utilizando seis bateladas sequenciais apresentaria significativamente maior produtividade, devido ao aumento na produtividade volumétrica e rendimento do processo (Tabela 34).

Os resultados obtidos no presente estudo foram promissores para aplicação em escala industrial. É possível obter aumento de produtividade e rendimento adotando-se a estratégia de bateladas sequenciais para produção de colagenases por *C. histolyticum* T248. Além de aumento no rendimento e na produtividade, esta estratégia apresentaria outras vantagens em escala industrial, como: redução de operações unitárias, redução de custos, maior controle do processo, redução de *setup* de equipamentos, redução do custo de materiais e insumos, redução de análises de controle em processo, redução da possibilidade de contaminações durante transferências para expansão do cultivo, redução do número de limpezas entre lotes, redução da geração de efluentes, simplificação de documentação atribuída à qualidade.

Embora os resultados do presente estudo tenham sido promissores, muitos ensaios experimentais são necessários para melhor avaliação da possibilidade de utilização de bateladas sequenciais na escala industrial, além do monitoramento da caracterização dos materiais obtidos.

Tabela 34. Análise comparativa dos parâmetros obtidos experimentalmente em batelada simples e quatro bateladas sequenciais e comparação com uma simulação considerando duas bateladas simples e seis bateladas sequenciais.

Parâmetros	Dados experimentais		Simulação	
	Batelada simples	Quatro Bateladas sequenciais	Duas bateladas simples, uma após a outra	Seis bateladas sequenciais
t_f inóculo (h)	18	18	36	18
t_f fermentação (h)	34	76	68	100
$mU_{fermentação}$	24.620.000	90.319.919	49.240.000	135.479.878
$Pv_{fermentação}$ (mU.mL/h)	724.118	1.188.420	724.118	1.354.799
t_f processo (h)	42	84	84	108
$mU_{processo}$	8.474.468	47.403.027	16.948.936	71.104.541
$Pv_{processo}$ (mU.mL/h)	201.773	304.679	141.241	355.459
Recuperação (%)	34,4	28,3	34,4	28,3
Fator de aumento de produção (vezes)	1,00	3,02	2,00	4,53
Fator de aumento de produtividade volumétrica (vezes)	1,00	1,51	0,70	1,76

t_f inóculo = tempo para produção de inóculo (h);

t_f fermentação = tempo total de processo fermentativo (h);

$mU_{fermentação}$ = unidades totais de collagenases produzidas no processo fermentativo (mU);

t_f processo (h) = tempo total de processo, incluindo fermentação e recuperação por FT 5kDa;

$mU_{processo}$ = unidades totais de collagenases produzidas no processo, após FT 5kDa;

$Pv_{processo}$ = produtividade volumétrica do processo após FT 5kDa;

Recuperação (%) = percentual de recuperação calculado a partir de mU produzida no processo fermentativo (%);

Fator de aumento de produção = calculado considerando aumento em relação a $mU_{processo}$ em “Batelada Simples” (vezes);

Fator de aumento de produtividade volumétrica = calculado a partir da $Pv_{processo}$ em “Batelada Simples” (vezes);

FT 5 kDa = filtração tangencial em *cutoff* de 5 kDa.

6. CONCLUSÕES

- A análise de parte do metabolismo de *C. histolyticum* T248 durante o processo de produção de collagenases, visando a descrição de um perfil metabólico básico, permitiu identificar e quantificar a utilização dos principais aminoácidos consumidos durante o processo produtivo, bem como a geração dos subprodutos oriundo dessas reações, sendo arginina, asparagina, glicina, cisteína, treonina, glutamato e serina os aminoácidos utilizados para a obtenção de energia e formação de biomassa. Os demais aminoácidos não foram metabolizados pelo microrganismo;
- A identificação dos principais subprodutos gerados durante o processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 durante o metabolismo proteolítico, tais como acetato, formiato, lactato, propionato e amônio, a identificação e o perfil de consumo de determinados aminoácidos, permitiram, juntamente com apoio da literatura, a elaboração de um esboço de mapa metabólico de *C. histolyticum* T248, descrevendo as principais vias metabólicas envolvidas para obtenção de energia a partir do consumo de aminoácidos;
- A produção de collagenases por *C. histolyticum* T248 muito provavelmente não está relacionada à indução por aminoácidos, conforme verificado pelas análises dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo, mas possivelmente relacionado ao sistema *Quorum Sensing*;
- Embora as collagenases de *C. histolyticum* T248 sejam constitutivas, um mecanismo de estímulo da produção enzimática foi discutido, em analogia à produção de toxinas por outras espécies de *Clostridium*, os quais estão relacionados ao esgotamento nutricional durante o metabolismo secundário e ao sistema de regulação da produção *Quorum Sensing*, que promove a produção de toxinas, analogamente a produção de collagenases em *C. histolyticum* T248.
- A partir dos resultados do presente estudo, acerca do conhecimento de parte do metabolismo de *C. histolyticum* T248, uma estratégia de produção de collagenases visando aumento de produtividade foi avaliada e apresentou-se promissora para aplicação na escala industrial. Os ensaios adotando a estratégia de processos fermentativos em bateladas

sequenciais evidenciaram aumento significativo de produtividade de collagenases e rendimento do processo, além das primeiras evidências relevantes de viabilidade para escalonamento;

- As collagenases produzidas em bateladas sequenciais apresentaram características similares às condições de processos fermentativos padrão, conduzido em batelada simples, características analisadas e evidenciadas nos líófilos de cada batelada por SDS-Page, Zimografia, Atividade enzimática, cSDS e MonoQ;
- O conhecimento de parte do metabolismo de *C. histolyticum* T248 poderá subsidiar pesquisas futuras com objetivo de melhorias no processo produtivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A., SUIR, E., DUONG, G-H., HULSTER, E., PRONK, J. T., van MARRIS, A. J. A. Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, v75, n8, p.2320-2325, 2009.

ADVANCE BIOFACTURES CORPORATION, Lynbrook, NY, Angelo J. Chiulli, Edwin H. Wegman. Process of producing collagenase. US 3821364 A, Jun, 28, 1974.

ALFANO, M. C., MORHART, R. E., METCALF, G., DRUMMOND, J. F. Presence of Collagenase from *Clostridium histolyticum* in Gingival Sulcal Debris of a Primitive Population. *Journal of Dental Research*, v.53, n.1, p.142–142, 1974.

ALIPOUR, H., RAZ, A., ZAKERI, S., DJADID, N. D. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.6, n.1, p.975-981, 2016.

ALLISON, C., MACFARLANE, G. F. Regulation of Protease Production in *Clostridium sporogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.11, p.3485-3490, 1990.

ATKINSON, S., WILLIAMS, P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 6, 959–978, 2009.

ATO, M., ISHII, M., IGARASHI, Y. Enrichment of amino acid-oxidizing, acetate-reducing bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.118, n.2, p.160–165, 2014.

BARKER, H. A. Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria. *Annual review of biochemistry*, v.50, p.23–40, 1981.

BEELEY, J. A., Yip, H. K., STEVENSON, A. G. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. *British dental journal*, v.188, n.7, p.277-281, 2000.

BEERENS, H., SCHAFFNER, Y., GUILLAUME, J., CASTEL, M. M. Les bacilles anaérobies non sporules á Gram-negatif favorises par la bile. Annales de l'Institut Pasteur de Lille, v.14, p.5-48, 1963.

BANEVER, G. T., MORIARTY, K. P., SACHS, B. F., COURTNEY, R. A., KONEFAL JR., S. H., BARBEAU, L. Pediatric Hand Treadmill Injuries. The Journal of Craniofacial Surgery, v.14, p.487-490, 2003.

BAPAT, P. M., DAS, D., SOHONI, S. J., WANGIKAR, P. P. Hierarchical amino acid utilization and its influence on fermentation dynamics: rifamycin B fermentation using *Amycolatopsis mediterranei* S699, a case study. Microbial Cell Factories, v.5, n.32, p.1-14, 2006.

BILEK, S. E., BAYRAM, S. K. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. Journal of Function Foods, v.14, p.562-569, 2015.

BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP., Lynbrook, NY (US). Thomas L. Wegman, N. Merrick, Bo Yu, Fresh Meadows. Compositions and methods for producing clostridial collagenases, US 2012/0237497 A1, Set, 20, 2012.

BIOSPECIFICS TECHNOLOGIES CORP. Disponívem em: <http://www.biospecifics.com>. Acesso em 17 dez, 2016.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Catabolism and turnover of collagens: collagenases. Methods in Enzymology, v.144, p.140-171, 1987.

BOEHRINGER MANNHEIM CORPARATION. Francis E. Dwulet, Marilyn E. Smith. Enzyme Composition for tissue dissociation, WO 1998024889 A. US1997/022848, Dez, 4, 1997.

BOND, M. D., VAN WART, H. E. Purification and separation of individual collagenases of *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography. Biochemistry, v.23, n.13, p.3077–3085, 1984a.

- BOND, M. D., VAN WART, H. E. Characterization of the Individual Collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*, v.23, n.13, p.3085–3091, 1984b.
- BORNEMAN, J., TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.7, p.2647–2653, 1997.
- BOUILLAUT, L., SELF, W. T., SONENSHEIN, A. L. Proline-Dependent Regulation of *Clostridium difficile* Stickland Metabolism. *Journal of Bacteriology*, v.195, n.4, p. 844–854, 2013
- BOYD, M., LOGAN, M. A., TYTELL, A. A. The Growth Requirements of *Clostridium perfringens* (WELCHII) BP6K. *Journal of Biological Chemistry*, v.174, p.1013–1025, 1948.
- BRAZIER, J. S., GAL, M., HALL, V., MORRIS, T. E. Outbreak of *Clostridium histolyticum* infections in injecting drug users in England and Scotland. *Euro Surveill*, v.9, n.9, p.15-16, 2004.
- BRENDA- The Comprehensive Enzyme Information System, 1987. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/>. Acesso em: 13 jun. 2016.
- BUCKEL, W., BARKER, H. A. Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, v.117, n.3, p.1248–1260, 1974.
- BURGOS, A., GIMÉNEZ, J., MORENO, E., LAMBERTO, E., UTRERA, M., URRACA, E., VÉLEZ, F., LÓPEZ, E., MARTÍNEZ, M., GÓMEZ, M. J., GARCÍA, L. Cost, Efficacy, Efficiency and Tolerability of Collagenase Ointment versus Hydrocolloid Occlusive Dressing in the Treatment of Pressure Ulcers. A Comparative, Randomised, Multicentre Study. *Clinical Drug Investigation*, v.19, n.5, p.357–365, 2000.
- CARTER, G. P., CHEUNG, J. K., LARCOMBE, S., LYRAS, D. Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia. *Molecular Microbiology*, v.91, n.2, p.221-231, 2014.

CHENG, K., WU, J., LIN, Z. N., ZHANG, J. A. Aerobic and Sequential Anaerobic Fermentation to Produce Xylitol and Ethanol Using Non-Detoxified Acid Pretreated Corncob. *Biotechnology for Biofuels*, v.7, n.166, p.1-9, 2014.

CLIFTON, C. E. The Utilization of Amino Acids and Related Compounds by *Clostridium tetani*. *Journal of bacteriology*, v.44, n.2, p.179–183, 1942.

CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, Itapira, SP, Marcos C. Alegria, Lucidio C. Fardelone, Marina B. R. Delalana, Josef E. Thiemann, Filho Spartaco Astolfi, Roberto C. D. Moreira, Ogari C. Pacheco. Meio de cultura para bactérias do gênero *clostridium* livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadante contendo uma ou mais proteases com atividade colagenolítica e gelatinolítica. PCT/BR2013/000192, Dez, 5, 2013.

CRUZ, A. L. B., VERBON, A. J., GEURINK, L.J., VERHEIJEN, P. J. T., HEIJNEN, J. J., van GULIK, W. M. Use of Sequential-Batch Fermentations to Characterize the Impact of Mild Hypothermic Temperatures on the Anaerobic Stoichiometry and Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.109, n.7, p.1735-1744, 2012.

CUNIN, R., GLANSDORFF, N., PIÉRARD, A., STALON, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological reviews*, v.50, n.3, p.314–352, 1986.

DAATSELAAR, M. C. C., HARDER, W. Some aspects of the production of extracellular proteolytic enzymes by a marine bacterium. *Archives of Microbiology*, v.101, n.1, p.21-34, 1974.

DANEAULT, A., COXAM, V., WITTRANT, Y. Biological Effect of Hydrolyzed Collagen on Bone Metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59p., 2015.

DARKOH, C., ASIEDU, G. A. Quorum Sensing System in Clostridia, in KALIA, V. C., *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*, Springer, 2015, p. 390.

DEL MAR, G., M., RODRÍGUEZ, E., VARGAS, P. Diversity of mesophilic clostridia in Costa Rican soils. *Anaerobe*, v.11, n.6, p.322–326, 2005.

DÜRRE, P. Handbook on Clostridia. Boca Raton: CRC-Press, 2005, 920p.

ECKHARD, U., SCHÖNAUER, E., DUCKA, P., BRIZA, P., NÜSS, D., BRANDSTETTER, H. Biochemical characterization of the catalytic domains of three different clostridial collagenases. *Biological Chemistry*, v.390, n.1, p.11-18, 2009.

ECKHARD, U., SCHÖNAUER, E., NÜSS, D., BRANDSTETTER, H. Structure of collagenase G reveals a chew and digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat Struct Mol Biol.*, v.18, n.10, p.1109–1114, 2012.

ECKHARD, U., HUESGEN, P. F., BRANDSTETTER, H., Overall, C. M. Proteomic protease specificity profiling of clostridial collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen. *Journal of Proteomics*, v. 100, p. 102 – 114, 2014.

ELSDEN, S. R., HILTON, M. G. Amino Acid Utilization Patterns in Clostridial Taxonomy. *Archives of Microbiology*, v.123, n.2, p.137–141, 1979.

ELSDEN, S. R., HILTON, M. G., WALLER, J. M. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. *Archives of Microbiology*, v.107, n.3, p.283–288, 1976.

EMING, S. A., KRIEG, T., DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, v.127, n.3, p.514-25, 2007.

FERREIRA, C. E. A., NAKANO, V., AVILA-CAMPOS, M. J. Cytotoxicity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitalized children with acute diarrhea. *Anaerobe*, v.10, n.3, p.171–177, 2004.

FONKNECHTEN, N., CHAUSSONNERIE, S., TRICOT, S., LAJUS, A., ANDREESSEN, J. R., PERCHAT, N., PELLETIER, E., GOUYVENOUX, M., BARBE, V., SALANOUBAT, M., LE PASLIER, D., WEISSENBAACH, J., COHEN, G. N., KREIMEYER, A. *Clostridium*

sticklandii, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. BMC genomics, v.11, p.555, 2010.

FRENCH, M. F., MOOKHTIAR, K. A., VAN WART, H. E. Limited proteolysis of type I collagen at hyperreactive sites by class I and II *Clostridium histolyticum* collagenases: complementary digestion patterns. Biochemistry, v.26, n.3, p.681–687, 1987.

FUKUSHIMA, J., OKUDA, K. 106 – *Vibrio* collagenase. In Handbook of Proteolytic Enzymes, p.414–415, 2004.

GALE, E. F. Enzymes Concerned in the Primary Utilization of Amino Acids by Bacteria. Bacteriological reviews, v.5, n.1, p.135–176, 1941.

GELBARD, M. K., WALSH, R., KAUFMAN, J. J. Collagenase for Peyronie's Disease Experimental Studies. Urological Research, v.10, n.3, p.135–140, 1982.

GERARDI, M. H. Troubleshooting the Sequencing Batch Reactor. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2010, p. 216.

GOLDMAN, E., GREEN, L. H. Practical Handbook of Microbiology. 3.ed. Reading: Petter Dürre, 2015. Cap.28: *Clostridium*, p.467-481.

GOLOVCHENKO, N., BELOKOPYTOV, B., CHUVIL'SKAYA, N., AKIMENKO, V. Minimal synthetic culture medium for the bacterium *Clostridium sticklandii*. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 20, p. 430-434, 1985.

GOTTSCHALK, G. Bacterial Metabolism. 2.ed. Springer Series in Microbiology. Springer, New York, 1986. Cap.8: Bacterial Fermentations, p.208-282.

GRAY, B., HALL, P., GRESHAM, H. Targeting agr- and agr-Like Quorum Sensing Systems for Development of Common Therapeutics to Treat Multiple Gram-Positive Bacterial Infections. Sensors review, v.13, p.5130-5166, 2013.

GROSS, J, LAPIERE, C. M. Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: a Tissue Culture Assay. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.48, n.6, p.1014-1022, 1962.

HAMMER, B. A., JOHNSON, E. A. Purification, properties, and metabolic roles of NAD⁺-glutamate dehydrogenase in *Clostridium botulinum* 113B. Archives of Microbiology, v.150, n.5, p.460-464, 1988.

HARPER, E., SEIFTER, S., HOSPELHORN, V. D. Evidence for Subunits in Bacterial Collagenase. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.18, n.4, p.627-632, 1965.

HOLMBECK, K., BIRKEDAL-HANSEN, H. Collagenases. Protein/Enzyme Structure Function and Degradation I Collagenases, v.1, p.478-481, 2013.

HOOGERHEIDE, J. C. Variability in Morphological and Biochemical Properties of *Clostridium histolyticum* (Weinberg and Seguin). Journal of Bacteriology, v.34, n.4, p.387–407, 1937.

HUGENHOLTZ, J., LJUNGDAHL, L. G. Amino acid transport in membrane vesicles of *Clostridium thermoautotrophicum*. FEMS Microbiol Lett. v. 57, n. 1-2, p. 117-121, 1990.

JACKSON, S., CALOS, M., MYERS, A., SELF, W. T. Analysis of Proline Reduction in the Nosocomial Pathogen *Clostridium difficile*. Journal of Bacteriology, v.188, n.24, p. 8487–8495, 2006.

JUNG, W., WINTER, H. Considerations for the use of clostridial collagenase in practice from clinical drug investigation. Clinical Drug Investigation, v.15, n.3, p.245–252, 1998.

KARLSSON, S., BURMAN, L. G., AKERLUND, T. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. Microbiology, v. 145, p. 1683-1693, 1999.

KEGG: KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES, Kenehisa Laboratories, 1995. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: 13 jun. 2016.

KEMBHAVI, A. A., BUTTLE, D. J., RAUBER, P., BARRET, A. J. Clostripain: characterization of the active site. Federation of European Biochemical Societies, v.283, n.2, p.277-280, 1991.

KOCHOLATY, W., SMITH, L., WEIL, L. Studies on the endo-enzymes, particularly the peptidases, of *Clostridium histolyticum*. In Bacterial Endo-Enzymes, p. 1981 – 1695, 1938.

KOLTER, R. Growth in Studying the Cessation of Growth. Journal of Bacteriology, v. 181, n. 3, p. 697–699, 1999.

KÖNIG, M., VANSCHIEDT, W., AUGUSTIN, M., KAPP, H. Enzymatic versus autolytic debridement of chronic leg ulcers: a prospective randomised trial. Journal of Wound Care, v.14, n.7, p.320–323, 2005.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, T. N. Tratado de Micologia médica. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.44, n.5, p.297–298, out. 2002.

LADE, H., PAUL, D., KWEON, J. H. Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. International Journal of Biological Sciences, v. 10, n. 5, p. 550-565, 2014.

LEBERTZ, H., ANDREESSEN, J. R. Glicine fermentation by *Clostridium histolyticum*. Archives of Microbiology, v.150, n.1, p.11–14, 1988.

LEDUY, A., ZAJIC, J. E. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation. Biotechnology and Bioengineering, v.XV, n.4, p.805–810, 1973.

LICONA-CASSANI, C., STEEN, J. A., ZARAGOZA, N. E., MOONEN, G., MOUTAFIS, G., HODSON, M. P., POWER, J., NIELSEN, L. K., MARCELLIN, E. Tetanus toxin production is triggered by the transition from amino acid consumption to peptides. *Anaerobe*, v. 41, p. 113–124, 2016.

LOESCHE, W. J., PAUNIO, K. U., WOOLFOLK, M. P., HOCKETT, R. N. Collagenolytic activity of dental plaque associated with periodontal pathology. *Infection and Immunity*, v.9, n.2, p.329–336, 1974.

LONG, S., MOTHIBELI, N. A., ROBB, F. T., WOODS, D. R. Regulation of extracellular alkaline protease activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain. *Journal of General Microbiology*, v.127, n.1, p.193-199, 1981.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R., MANZANO-GAYOSSO, P., MIER, T., MÉNDEZ-TOVAR, L. J., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v.36, n.1, p.17-20, 1994.

MA, M., LI, J., MCCLANE, B. A. Structure-Function Analysis of Peptide Signaling in the *Clostridium perfringens* Agr-Like Quorum Sensing System. *Journal of Bacteriology*, v.197, n.10, p.1807-1818, 2015.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1128 p.

MALÉK, I., FENCL, Z. Theoretical and Methodological Basis of Continuous Cultures of Microorganisms. Academic Press: New York and London, 1966. Cap.1: Introduction, p.11-29.

MALL, F. P. Reticulated Tissue and its Relation to the Connective Tissue Fibrils. *Johns Hopkins Hosp. Rept.* v.1, p.171-208, 1896.

MALLYA, S. K., MOOKHTIAR, K. A., VAN WART, H. E. Kinetics of hydrolysis of type I, II, and III collagens by the class I and II *Clostridium histolyticum* collagenases. *Journal of Protein Chemistry*, v.11, n.1, p.99–107, 1992.

MANDL, I., MCLENNAN, J., HOWES, E. L. Isolation and Characterization of Proteinase and Collagenase from *Clostridium histolyticum*. The Journal of Clinical Investigation, v.32, n.1, p.1323–1329, 1953.

MANDL, I., ZIPPER, H., FERGUSON, L. T. *Clostridium histolyticum* collagenase: Its purification and properties. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.74, n.2, p.465–475, 1958.

MATSUSHITA, O., JUNG, C. M., MINAMI, J., KATAYAMA, S., NISHI, N., OKABE, A. A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase. Journal of Biological Chemistry, v.273, n.6, p.3643–3648, 1998.

MATSUSHITA, O., OKABE, A. Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. Toxicon, v.39, n.11, p.1769–1780, 2001.

MATTHEW, T., ZHOU, W., RUPPRECHT, J., LIM, L., THOMAS-HALL, S. R., DOEBBE, A., KRUSE, O., HANKAMER, B., MARX, U. C., SMITH, S. M., SCHENK, P. M. The Metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following Induction of Anaerobic H₂ Production by Sulfur Depletion. The Journal of Biological Chemistry, v.284, n.35, p. 23415–23425, 2009.

MAZZOLI, R. Development of microorganisms for cellulose-biofuel consolidated bioprocessings: metabolic engineers' tricks. Computational and Structural Biotechnology Journal, v.4, n.3, 2012.

MCCALLON, S. K., WEIR, D., LANTIS, J. C. Optimizing Wound Bed Preparation With Collagenase Enzymatic Debridement. Journal of the American College of Clinical Wound Specialists, v.6, p.14–23, 2015.

MCKELLAR, R. C. Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Applied Bacteriology, v.53, n.3, p.305–316, 1982.

MEAD, G. C. The Amino Acid-fermenting Clostridia. Journal of General Microbiology, v.67, p.47–56, 1971.

- MOOKHTIAR, K. A., VAN WART, H. E. *Clostridium histolyticum* collagenases: a new look at some old enzymes. Matrix Supplement, v.1, p.116-126, 1992.
- MOORE, W. E. C., CATO, E. P., HOLDEMAN, L. V. Fermentation patterns of some *Clostridium* species. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 16, n. 4, p. 383-415, 1966.
- MULLER, E., LEEN, M. VAN, BERGEMANN, R. Economic evaluation of collagenase-containing ointment and hydrocolloid dressing in the treatment of pressure ulcers. Pharmacoeconomics, v.19, n.12, p.1209–1216, 2001.
- NEUMANN-SCHAAL, M., HOFMANN, J. D., WILL, S. E., SCHOMBURG, D. Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630 Δ erm and concomitant fermentation product and toxin formation. BMC Microbiology, v.15, n.281, p. 1-12, 2015.
- NISHIDA, S., IMAIZUMI, M. Toxigenicity of *Clostridium histolyticum*. Journal of Bacteriology, v.91, n.2, p.477–483, 1966.
- OHBAYASHI, N., YAMAGATA, N., GOTO, M., WATANABE, K., YAMAGATA, Y., MURAYAMA, K. Enhancement of the Structural Stability of Full-Length Clostridial Collagenase by Calcium Ions. Applied and Environmental Microbiology, v. 78, n. 16, p. 5839-5844, 2012.
- OHTANI, K. Gene regulation by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. Anaerobe, p.1-5, 2016.
- OHTANI, K., YUAN, Y., HASSAN, S., WANG, R., WANG, Y., SHIMIZU, T. Virulence Gene Regulation by the agr System in *Clostridium perfringens*. Journal of Bacteriology, v.191, n.12, p.3919-3927, 2009.
- ORTIGUEIRA, J., PINTO, T., GOUVEIA, L., MOURA, P. Production and storage of biohydrogen during the sequential batch fermentation of *Spirogyra* hydrolyzate by *Clostridium butyricum*. Energy, v.88, p.528-536, 2015.

PAL, G. K., SURESH, P. V. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition, RSC Adv., v.6, p. 33763-33780, 2016.

PANSARE, A. C., VENUGOPAL, V., LEWIS, N. F. A note on nutritional influence on extracellular protease synthesis in *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Bacteriology, v.58, n.1, p.101-104, 1985.

PHILOMINATHAN, S. T. L., KOIDE, T., HAMADA, K., YASUI, H., SEIFERT, S., MATSUSHITA, O., SAKON, J. Unidirectional binding of clostridial collagenase to triple helical substrates. Journal of Biological Chemistry, v.284, n.16, p.10868–10876, 2009.

PISARCIKOVÁ, J., VÁRADYOVÁ, Z., MIHALIKOVÁ, K., KISIDAYOVÁ, S. Quantification of organic acids in ruminal in vitro batch culture fermentation supplemented with fumarate using a herb mix as a substrate. Canadian Journal of Animal Science, v.96, n.1, p.60–68, 2016.

POLTAK, R. F. Sequencing batch reactor design and operational considerations. 1.ed. New england interstate water pollution control commission. Ellen Frye, Enosis – The Environmental Outreach Group, 2005, Cap.1: Características de reatores em batelada seqüencial (SBRs), p. 3-6.

PÜLLEN, R., POPP, R., VOLKERS, P., FÜSGEN, I. Prospective randomized double-blind study of the wound-debriding effects of collagenase and fibrinolysin/deoxyribonuclease in pressure ulcers. Age and Ageing, v.31, n.2, p.126–130, 2002.

RAMUNDO J., GRAY, M. Enzymatic wound debridement. Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing, v.35, p.273-280, 2008.

RAMUNDO, J., GRAY, M. Collagenase for Enzymatic Debridement a Systematic Review. Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing, v.36, n.6, p.4–11, 2009.

REID, G. C., ROBB, F. T., WOODS, D. R. Regulation of extracellular collagenase production in *Achromobacter iophagus*. Journal of General Microbiology, v.109, n.1, p.149-154, 1978.

RILEY, K. N., HERMAN, I. M. Collagenase Promotes the Cellular Responses to Injury and Wound Healing In Vivo. *Journal of Burns and Wounds*, v.4, p.112-124, 2005.

RIMBAULT, A., NIEL, P., VIRELIZIER, H., DARBORDW. J.C., LELUAN, G. L-Methionine, a Precursor of Trace Methane in Some Proteolytic Clostridia. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 1581-1586, 1988.

RIPPON, J. W., HOO, M. S. Determination of Fungal Elastase. *Applied Microbiology*, v. 22, n.3, p.471–472, 1971.

RIPPON, J. W., LORINCZ, A. L. Collagenase Activity of *Streptomyces* (*Nocardia*) *Madurae*. *Journal of Investigative Dermatology*, v.43, n.6, p.483–486, 1964.

ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Mannheim, DE., Werner Hoelke, Artur Hoffmann, Thomas Marx, Kirsten Sonn, Bernhard Suppmann, Johann-Peter Thalhofer. Growth medium for *Clostridium histolyticum* without ingredients of mammalian sources. EP20090007502, Jun, 06, 2009.

ROHINI, B., JAYALAKSHMI, S. Isolation and characterisation of *Clostridium histolyticum* and it's toxin. *Journal of Advanced Studies in Agricultural, Biological and Environmental Sciences*, v. 2, n. 1, p. 2394-2606, 2015.

ROSA, R. R., LISUKA, H., HIGASHI, H. G., CARDOSO, J. L., JORGE, M. T., SILVA, M. V. Isolamento de bactérias de lesões provocadas por picadas de ofídios peçonhentos. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1983, Rio de Janeiro, 166p.

RUTHERFORD, S. T., BASSLER, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.1-25, 2016.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Advanced Biochemistry Engineering/Biotechnology*, v. 73, p.129-169, 2001.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Modelagem Matemática e Simulação de Processo Fermentativo. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, v. 2, 541p., 2001.

SEIFTER, S., GALLOP, P. M., KLEIN, L., MEILMAN, E. Studies on Collagen: II. Properties of Purified Collagenase and Its Inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, v.234, p.285–293, 1959.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 71, n.3, p.530-539, 2012.

SMITH, L. D. S., WILLIAMS, B. L. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. Springfield: CC Thomas, 1984, 331p.

STEINBRINK, D. R., BOND, M. D., VAN WART, H. E. Substrate specificity of beta-collagenase from *Clostridium histolyticum*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.260, n.5, p.2771–2776, 1985.

STICKLAND, L. H. Studies in the Metabolism of the Strict Anaerobes (Genus *Clostridium*). II The Reduction of Proline by *Cl. sporogenes*. *Biochemical Journal*, v.29, n.2, p.288–290, 1935a.

STICKLAND, L. H. Studies in the Metabolism of the Strict Anaerobes (Genus *Clostridium*). III. The oxidation of alanine by *C. sporogenes*. *Biochemical Journal*, v.29, n.2, p.889–296, 1935b.

STICKLAND, L. H. Studies in the Metabolism of the Strict Anaerobes (Genus *Clostridium*). IV. The reduction of glycine by *C. sporogenes*. *Biochemical Journal*, v.29, n.2, p.296–298, 1935c.

THOMAS, A., BAYAT, A. The emerging role of *Clostridium histolyticum* collagenase in the treatment of Dupuytren disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v.6, p.557–572, 2010.

TOYOSHIMA, T., MATSUSHITA, O., MINAMI, J., NISHI, N., OKABE, A., ITANO, T. Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagenase exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo. *Connective Tissue Research*, v.42, n.4, p.281–290, 2001.

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, U. S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/EnforcementActivitiesbyFDA/SelectedEnforcementActionsonUnapprovedDrugs/ucm119646.htm>. Acesso em 15 dez , 2016.

VENUGOPAL, V., NADKARNI, G. B. Regulation of the Arginine Dihydrolase Pathway in *Clostridium sporogenes*. *Journal of Bacteriology*, v.131, n.2, p.693-695, 1997.

VIDAL, J. E., MA, M., SAPUTO, J., GARCIA, J., UZAL, F. A., MC-CLANE, B. A. Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Molecular Microbiology*, v.83, n.1, p.179 –194, 2012.

VITACYTE LLC, Biochemical Analysis of Crude Collagenase Products used in Adipose Derived Stromal Cell Isolation Procedures and Development of a Purified Tissue Dissociation Enzyme Mixture RC McCarthy, AG Breite, FE Dwulet, 2009. Disponível em: <http://www.vitacyte.com/wp-content/uploads/2009/01/ifats-vitacyte.pdf>. Acesso 03 out, 2016.

XAVIER, A. M. R. B., TAVARES, A. P. M., AGAPITO, M. S. M., EVTUGUIN, D.V. Sequential batch reactor for eucalypt kraft pulp effluent treatment with *Trametes versicolor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, p.1602-1608, 2008.

XIAFLEX- ENDO PHARMACEUTICALS INC., 2016. Disponível em: <https://www.xiaflex.com/>. Acesso em: 20 nov. 2016.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63, n.5, p.520–526, 2004.

WEINBERG, M., RANDIN, A. Fibrolytic enzyme of microbiological origin. Compt. Rend. Soc. Biol., v.107, p.27-28, 1931.

WIERSMA, M., HANSEN, T. A., HARDER, W. Effect of environmental conditions on the production of two extracellular proteolytic enzymes by *Vibrio* SA1. Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology Serological, v.44, n.2, p.129-140, 1978.

WILDERER, P. A., IRVINW, R. L., GORONSZY, M. C., ROBERT, L. I., MERVYN, C. G. Sequencing Batch Reactor Technology. London: IWA Publishing, 2001, 100p.

WHOOLEY, M. A., J. A. O'CALLAGHAN, AND A. J. MCLOUGHLIN. Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Journal of General Microbiology, v.129, n.4, p.981-988, 1983.

WOODS, D. D., CLIFTON, C. E. studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus clostridium) VI. Hydrogen production and amino-acid utilization by *Clostridium tetanomorphum*. Biochemical Journal, v.31, n.10, p.1774-1788, 1937.

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, Enzyme Manual, Collagenase, 1959, New Jersey. Disponível em: <<http://www.worthington-biochem.com/CLS/default.html>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

WRIGHT, J., BELLISSIMI, E., HULSTER, E., WAGNER, A., PRONK, J. T., VAN MARIS, A. J. A. Batch and Continuous Culture-Based Selection Strategies for Acetic Acid Tolerance in Xylose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research, v.11, n.3, p.299-306, 2011.

YOSHIDA, E., NODA, H. Isolation and characterization of collagenases I and II from *Clostridium histolyticum*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation, v.105, n.3, p.562-574, 1965.

YOSHIHARA, K., MATSUSHITA, O. MINAMI, J. OKABE, A. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the colH Gene from *Clostridium histolyticum* Encoding a Collagenase and a Gelatinase. Journal of bacteriology, v.176, n.21, p.6489-6496, 1994.

ANEXOS

ANEXO I

Dados brutos dos aminoácidos consumidos: Asp, Ser, Arg, Gly, Glu, Thr, Cys durante fermentação com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases

Tempo (h)	Aminoácidos consumidos (μM)						
	Asn	Ser	Arg	Gly	Glu	Thr	Cys
0,0	3740,2	6926,6	18135,1	4506,1	12593,1	4032,6	905,7
2,0	3488,1	6448,6	12839,9	3749,6	15134,0	4003,2	852,5
4,0	2887,9	2502,9	224,8	1502,2	15365,6	5032,8	266,3
6,0	3082,2	5206,2	0,0	1101,1	13140,3	5279,2	501,4
8,0	2044,6	2189,2	0,0	412,8	6893,5	4161,8	215,9
12,0	728,8	269,8	0,0	1180,7	8114,7	383,8	156,8
16,0	411,9	278,6	0,0	0,0	8825,2	0,0	0,0

ANEXO II

Dados brutos dos aminoácidos não consumidos: His, Ala, Pro, Lys, Tyr, Met, Val, Ile, Leu, Phe e Trp, durante fermentação com *C. histolyticum* T248 para produção de collagenases

Tempo (h)	Aminoácidos não consumidos										
	Concentração (μM)										
	His	Ala	Pro	Lys	Tyr	Met	Val	Ile	Leu	Phe	Trp
0,0	999,7	11456,7	2681,5	4155,2	999,5	1599,1	6452,9	4657,6	9238,3	4012,4	1423,2
2,0	1058,3	11829,6	2859,6	4189,7	1168,7	1627,3	6806,4	4965,9	9690,0	4229,9	1545,9
4,0	1847,6	16857,9	4789,8	5410,5	2497,7	2246,8	10434,4	8195,8	13987,1	6257,8	1039,5
6,0	2016,1	17464,1	5673,1	6308,2	2663,7	2064,4	11292,5	8850,6	14725,9	6525,3	1006,4
8,0	2367,1	18988,5	6193,5	7482,3	2978,3	2122,9	11657,5	9148,0	14885,4	6814,9	1126,2
12,0	2933,2	21698,4	7707,8	9249,0	3378,9	2312,8	13156,4	10467,3	16556,0	7536,3	1248,7
16,0	3261,3	23280,4	8827,8	10551,2	3721,3	2465,3	14361,1	11479,0	17860,6	8104,1	1337,1

ANEXO III

Dados brutos dos ácidos orgânicos presentes nas amostras do processo fermentativo com *C. histolyticum* T248 para obtenção da collagenases

Tempo (h)	Ácido Oxálico (mM)	Ácido Cítrico (mM)	Ácido Málico (mM)	Piruvato (mM)	Ácido Succínico (mM)	Ácido Fórmico (mM)	Ácido Acético (mM)	Ácido Butírico (mM)	Pico não identificado 1 (Área Absoluta)	Pico não identificado 2 (Área Absoluta)
Meio Cultura	152,10	24,60	28,96	28,43	40,47	0	62,98	0	10498134	6211372
0,0	152,51	23,79	29,84	26,93	37,34	0	58,17	0	9960518	5990915
2,0	152,34	24,13	29,59	25,72	36,68	0	55,56	0	10688616	6129793
4,0	157,58	22,23	42,15	22,33	29,73	0	52,63	0	13418443	6231626
6,0	145,87	17,73	34,84	13,96	24,55	15,11	70,65	0	13340770	8168226
8,0	158,41	18,71	34,76	6,15	26,08	20,05	108,82	0	14591736	12720126
10,0	159,45	17,99	32,35	4,63	25,57	20,07	125,66	0	15310645	13435305
12,0	159,07	17,07	31,74	4,59	25,44	17,80	141,62	0	15768214	13570179
14,0	159,13	16,74	31,31	4,54	25,27	15,11	146,24	0	15969437	13620552
16,0	157,98	16,49	31,03	4,50	24,68	13,72	151,28	0	16041000	13883107