

## Biossíntese de Ácido Glicônico e seus Ceto-Derivados por *G. diazotrophicus*: Potencial de Aplicação Biotecnológica







Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-8498

Março/2007

## **Documentos 229**

# **Biossíntese de Ácido Glicônico e seus Ceto-Derivados por *G. diazotrophicus*: Potencial de Aplicação Biotecnológica**

Kátia Regina dos Santos Teixeira

*Seropédica – RJ*  
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Gustavo Ribeiro Xavier e Luis Henrique de Barros Soares

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Felix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2007): 50 exemplares

T266b Teixeira, Kátia Regina dos Santos

Biossíntese de ácido glicônico e seus ceto-derivados por *G. diazotrophicus*: potencial de aplicação biotecnológica. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 18 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 229).

ISSN 1517-8498

1. Biossíntese. 2. Composto orgânico. 3. Ácido orgânico. 4. Bactéria diazotrófica. 5. Fixação biológica de nitrogênio (FBN). I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD 572.45

SHINAGAWA, E.; MATSUSHITA, K.; AMEYAMA, M.; ADACHI, O. Production of 5-keto-Dgluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase. **Journal of Molecular Catalysis BEnzymatic**, Amsterdam, v. 6, p. 341-350, 1999.

SILBERBACH, M.; MAIER, B.; ZIMMERMANN, M.; BÜCHS, J. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans* in shaking-flasks, scaleup and optimization of the pH profile. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New Jersey, v. 62, p. 92-98, 2003.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, p. 67-72, 1991.

TEIXEIRA, K. R. dos S. ***Acetobacter diazotrophicus*, endófito diazotrófico associado à cana-de-acúcar: presença de plasmídeos e sequenciamento do gene *nifA*, responsável pela regulação da fixação biológica de nitrogênio.** 1997. 168 p. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, RJ.

## Autora

### **Kátia Regina dos Santos Teixeira**

Bióloga, PhD em Biologia Celular e Molecular, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.

BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

e-mail: [katia@cnpab.embrapa.br](mailto:katia@cnpab.embrapa.br)

MATSUSHITA, K.; FUJII, Y.; ANO, Y.; TOYAMA, H.; SHINJOH, M.; TOMIYAMA, N.; MIYAZAKI, T.; SUGISAWA, T.; HOSHINO, T.; ADACHI, O. 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1959-1966, 2003.

OLIJVE, W.; KOK, J. J. Analysis of *Gluconobacter oxydans* in glucose-containing media. **Archives of Microbiology**, New York, v. 121, p. 283-290, 1979.

OOSTERHUIS, N. M. G.; GROESBEEK, N. M.; KOSSEN, N. W. F.; SCHENK, E. S. Influence of dissolved oxygen concentration on the oxygen kinetics of *Gluconobacter oxydans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 21, p. 42-49, 1985.

SALUSJÄRVI, T.; POVELAINEN, M.; HVORSLEV, N.; ENEYSKAYA, E. V.; KULMINSKAYA, A. A.; SHABALIN, K. A.; NEUSTROEV, K. N.; KALKKINEN, N.; MIASNIKOV, N. A. Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 65, p. 306-314, 2004.

SHINAGAWA, E.; MATSUSHITA, K.; ADACHI, O.; AMEYAMA, M. D-Gluconate dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconobacter dioxyacetonicus*: purification and characterization. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, p. 1517-1522, 1984.

ELFARI, M.; HA, S. -W.; BREMUS, C.; MERFORT, M.; KHODAVERDI, V.; HERRMANN, U.; SAHM, H.; HELMUT GÖRISCH, H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-d-gluconic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 66, n. 6, p. 668-674, 2005.

FLORES-ENCARNACION, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; URZUA, L. S.; AGUILAR, G. R.; BACA, B. E.; ESCAMILLA, J. E. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 22, p. 6987-6995, 1999.

GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L. Evidence for a membrane-bound pyrroquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 713-716, 1995.

GUPTA, A.; FELDER, M.; VERMA, V.; CULLUM, J.; QAZI, G. N. A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 179, p. 501-506, 1999.

GUPTA, A.; SINGH, V. K.; QAZI, G. N.; KUMAR, A. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Switzerland, v. 3, p. 445-456, 2001.

HWANG, J. W.; YANG, Y. K.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R.; KIM, Y. S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 88, p. 183-188, 1999.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. In: TKACZ, J.; LANGE, L. (Ed.). **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine**. Berlin: Springer, 2004. p. 307-340.

## Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 229/2007 discute o potencial de aplicação biotecnológico da biossíntese de ácido glicônico e seus cetos - derivados que tem aplicação direta na indústria farmacêutica, alimentícia e têxtil. Apresenta informações sobre a produção desse composto pela bactéria *Gluconacetobacter oxydans* que tem sido usado com modelo embora apresente algumas limitações quando explorada em larga escala. Além disso o documento discute o potencial de uso da bactéria fixadora de nitrogênio e endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* cujo genoma foi sequenciado recentemente. Espera-se que o conhecimento acumulado permita identificar genes e funções envolvidas no processo de biossíntese de ácidos glucônicos e ceto-derivados contribuindo assim para o desenvolvimento de insumos biológicos de interesse para as indústrias.

José Ivo Baldani  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. O potencial de produção de ácidos orgânicos por bactérias fixadoras de nitrogênio .....	8
3. Metabolismo de glicose e biossíntese de ácidos orgânicos .....	9
4. <i>Gluconacetobacter oxidans</i> como modelo para biossíntese de ácidos glicônico e ceto-derivados .....	10
5. FBN e a biossíntese de ácidos glicônico e ceto-derivados em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	12
6. Considerações finais.....	14
7. Referências Bibliográficas .....	14

AMEYAMA, M.; ADACHI, O. 5-Keto-D-gluconate reductase from *Gluconobacter suboxydans*. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 89, p. 198-202, 1982b.

ASAI, T. **Acetic acid bacteria - classification and biochemical activities**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1968. p. 59-67.

ATTWOOD, M.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 72, n. 2, p. 101-105, 1991.

CARRILLO, A. E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Naturwissenschaften**, New York, v. 89, p. 428-432, 2002.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 184, p. 311-321, 1996.

DE LEY, J.; SWINGS, J.; GOSSELE, F. The genus *Gluconobacter*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 267-278.

DEPPENMEIER, U.; HOFFMEISTER, M.; PRUST, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 233-242, 2002.



também atua como mecanismo de proteção da nitrogenase contra oxigênio.

## 6. Considerações finais

---

Diante deste cenário, torna-se importante entender os mecanismos envolvidos e a influência de fatores externos sobre a regulação da expressão das enzimas que atuam neste processo em diferentes condições de cultivo. A caracterização desses mecanismos é essencial para estabelecer estratégias para modificações em uma ou ambas as vias metabólicas envolvidas na biossíntese desses AOs por *G. diazotrophicus*, visando o aumento de sua produção através da construção de mutantes sítio-dirigidos. Como resultado deste estudo espera-se comprovar que a associação da FBN e a produção de AOs na estirpe selvagem e/ou mutantes selecionados seja uma vantagem importante para a produção em larga escala desses AOs, pois redireciona os prótons para a redução do N-atmosférico em  $\text{NH}_4^+$ , além de poder contribuir para a diminuição dos custos de produção. Além disso, a disponibilidade de dados do genoma e a construção de mutantes de *G. diazotrophicus* associados à caracterização do genoma funcional permitirá identificar genes e funções envolvidas no processo de biossíntese de ácidos glicônicos e ceto-derivados, contribuindo para o desenvolvimento de insumos biológicos que possam ser adequados para a produção eficiente desses AOS em larga-escala por indústrias biotecnológicas.

## 7. Referências Bibliográficas

---

AMEYAMA, M.; ADACHI, O. 2-Keto-D-gluconate reductase from acetic acid bacteria. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 89, p. 203-210, 1982a.

# Biossíntese de Ácido Glicônico e seus Ceto-Derivados por *G. diazotrophicus*: Potencial de Aplicação Biotecnológica

---

Kátia Regina dos Santos Teixeira

## 1. Introdução

---

A produção de ácidos orgânicos (AOs) por microrganismos, tais como fungos e bactérias, é um processo de grande impacto e aplicação comercial para a produção e conservação de alimentos, fármacos e que pode ser utilizado em processos de síntese de diversos produtos biodegradáveis, atendendo a grande demanda de uso de recursos renováveis em benefício do meio ambiente. Além disso, a geração de dados em larga-escala nas áreas de Genômica e Proteômica tem permitido, devido a identificação de genes e estruturas funcionais de proteínas, uma revolução no setor da indústria biotecnológica para o agronegócio e outros setores da cadeia produtiva. Apesar deste fato e da redução do tempo entre a geração de tecnologia e comercialização de produto, ainda existem limitações para aplicação de processos biotecnológicos em escala industrial. Enzimas secretadas, de fácil purificação, estáveis e funcionais *in vitro* (em condições ótimas de pH, temperatura, salinidade, etc.) são facilmente adotadas durante os processos industriais. No entanto, ainda são necessários estudos para a aplicação de processos dependentes de fermentação e que requerem microrganismos capazes de gerar produtos de interesse comercial de forma eficiente para aplicações biotecnológicas.

## 2. O potencial de produção de ácidos orgânicos por bactérias fixadoras de nitrogênio.

Diversas bactérias, principalmente aquelas capazes de fixar nitrogênio (diazotróficas) em associação com culturas de interesse econômico como a cana-de-açúcar e outras gramíneas ou leguminosas, são capazes de produzir AOs ou de induzir a extrusão de prótons e AOs, em vida livre ou em associação com plantas (STEPHAN et al., 1991; CHABOT et al., 1996; CARRILLO et al., 2002). O potencial biotecnológico de bactérias da família Acetobacteriaceae para produção de compostos intermediários durante a oxidação incompleta de vários substratos tem sido explorado por séculos, principalmente em processos de fermentação para a produção de vinhos, vinagres e outras substâncias ou precursores utilizados amplamente em diversos setores industriais. Dentre os vários AOs produzidos, a produção de ácido glicônico e seus ceto-derivados é de importância econômica devido a sua aplicação nas indústrias farmacêuticas (como precursor da vitamina C, agentes antimicrobianos, etc.), alimentícia (como agente e precursor de substâncias antioxidantes), indústria têxtil e como precursor de reagente quirál utilizado em processos de síntese orgânica (citado por ELFARI et al., 2005). MAGNUSON & LASURE (2004), citam que apesar da tecnologia de produção de ácido glicônico ser realizada pela fermentação de glicose utilizando como agente o fungo *Aspergillus niger* é desejável desenvolver um processo enzimático para a produção comercial que seja estável e economicamente viável. Em geral, esses processos biológicos envolvem enzimas ou complexos enzimáticos localizados no interior ou espaços periplasmáticos das células e associadas à membrana celular. Em muitos casos são necessários modificações pós-traducionais, interações com outras moléculas e dependência de cofatores para realizarem suas funções. Uma alternativa a esta limitação é a prospecção de

a produção de ácido glicônico do que *G. diazotrophicus*. Ao contrário de *G. oxydans*, estudos *in vitro* sugeriram que em *G. diazotrophicus* a glicose desidrogenase dependente de piridina apresenta uma característica marcante, pois é estritamente dependente de NAD e sua atividade representou apenas 10 – 17% da atividade da PQQ-glicose desidrogenase. No entanto, estes autores não consideraram a capacidade desta bactéria fixar nitrogênio como uma característica importante a ser explorada, tendo sido estes dados obtidos na presença de 20 mM de sulfato de amônia. O cultivo de *G. diazotrophicus* em condições de FBN revelou que a produção de ácido glicônico e seus ceto-derivados é acompanhada pelo aumento do consumo de O<sub>2</sub> sugerindo que esse processo oxidativo funciona como mecanismo de proteção contra efeitos deletérios do oxigênio sobre a formação do complexo da nitrogenase ou inativação de seu sítio ativo (STEPHAN et al., 1991). A enzima responsável pela transformação de glicose a ácido glicônico em *G. diazotrophicus* é uma glicose desidrogenase ligada a um cofator de pirroloquinolina quinona (PQQ-GDH) do tipo II (GALAR & BOIARDI, 1995). Estudos realizados em cultivo de *G. diazotrophicus*, sob diferentes concentrações de oxigênio, revelaram que a PQQ-GDH apresentou aumento de sua atividade em condições de FBN concomitante com aumento no consumo de O<sub>2</sub> e também dos níveis de expressão das enzimas que participam do sistema de transporte de elétrons, principalmente da citocromo-oxidase tipo *ba*, associadas à membrana deste microrganismo (GALAR & BOIARDI, 1995; FLORES-ENCARNACIÓN et al., 1999). Estes dados reforçam a hipótese, postulada por TEIXEIRA (1997), de que em *G. diazotrophicus* além da PQQ-GDH funcionar como componente de um sistema auxiliar para geração de energia, a reação de oxidação e transporte de elétrons ao nível de membrana durante a biossíntese de AOS

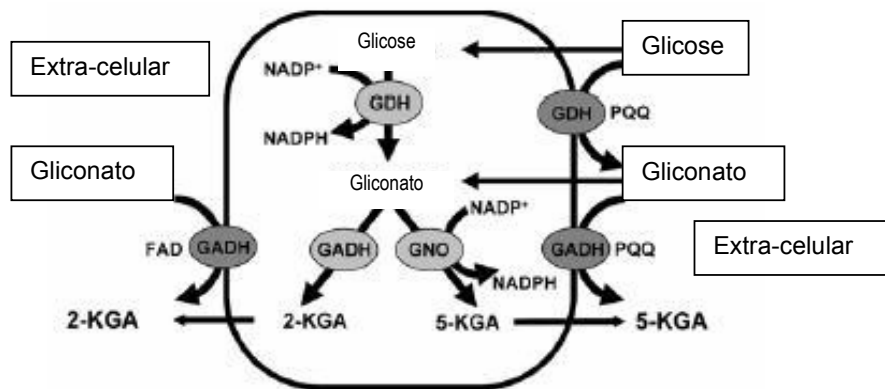


Figura 1 – Esquema das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de ácido glicônico e ceto-derivados por *G. oxydans* (Elfari et al., 2005).

Legenda: 2-KGA = ácido 2 cetoglicônico; 5-KGA = ácido 5 cetoglicônico; GADH = gliconato desidrogenase; GDH = Glicose desidrogenase; GNO= Gliconate 5-oxidoreductase; PQQ = pirroquinolina quinona; FAD = Flavina adenina dinucleotídeo; NADP+= Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; NADPH= Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

### 5. FBN e a biossíntese de ácidos glicônico e ceto-derivados em *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

A produção de AOs tais como ácido glicônico e ceto-derivados, do tipo ácido 2-cetoglicônico (2KGA) ou 5-cetoglicônico (5KGA) e 2,5 di-cetoglicônico (2,5KGA) foi descrita também em *G. diazotrophicus*, bactéria fixadora de nitrogênio isolada a partir de cana-de-açúcar (STEPHAN et al., 1991). A identificação desses produtos da oxidação direta da glicose por *G. diazotrophicus* ocorreu quase simultaneamente a publicação de estudos comparativos da eficiência de produção do ácido glicônico por *G. oxydans* e *G. diazotrophicus* realizado por ATTWOOD et al. (1991). Estes autores observaram que em condições não controladas de pH *G. oxydans* é mais susceptível a acidificação do meio durante

genes e funções em microrganismos cultiváveis que sejam tolerantes ou adaptáveis às condições extremas de cultivo, como *Gluconobacter oxydans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Ao contrário de *G. oxydans*, *G. diazotrophicus* apresenta como característica peculiar uma correlação direta entre sua capacidade de oxidar glicose a AOs e fixar nitrogênio atmosférico, inclusive em condições extremas de pH, oxigênio e elevada pressão osmótica. Alguns genes e proteínas responsáveis por este processo já foram identificados em *G. diazotrophicus*, graças a dados de anotação do genoma desta bactéria diazotrófica endofítica, através da Rede RIOGENE e a disponibilização do genoma de *G. oxydans*.

### 3. Metabolismo de glicose e biossíntese de ácidos orgânicos

Nos últimos 15 anos, a geração de dados genômicos em larga-escala associados aos avanços na área de bioinformática e ao desenvolvimento de técnicas de quantificação da expressão gênica e de caracterização estrutural e funcional de proteínas tem revolucionado o setor da indústria biotecnológica. A identificação de novos genes e a caracterização de suas funções vem sendo realizada com maior eficácia e precisão, reduzindo o tempo entre a concepção de novas tecnologias, geração do produto e sua comercialização.

Bactérias da família Acetobacteriaceae são capazes de realizar metabolismo incompleto de uma variedade de carboidratos, álcoois e principalmente açúcares entre outros compostos (DE LEY et al., 1984). Bactérias deste grupo podem oxidar, por exemplo, quase toda glicose fornecida como fonte de carbono em ácido glicônico e ceto-derivados através de um processo oxidativo (ASAI, 1968; SHINAGAWA

et al., 1984, 1999). Em geral o processo de oxidação da glicose pode ocorrer por duas vias metabólicas diferentes, inclusive em relação à localização desses processos (OLIJVE & KOK, 1979; AMEYAMA & ADACHI, 1982ab). A via intracelular depende da fosforilação da glicose e seu transporte para o citosol, onde estão localizadas enzimas da via da pentose fosfato responsáveis pela oxidação e biossíntese de precursores para participação em outras vias metabólicas ou posterior dissimilação dos subprodutos (metabólitos secundários) para o meio. A outra via responsável pela oxidação rápida da glicose em ácido glicônico e seus derivados é caracterizada por um processo denominado oxidação direta (descrito inicialmente como fermentação oxidativa), realizada por um conjunto de enzimas associadas à membrana celular. Este processo oxidativo é altamente

influenciado pelo pH e oxigênio dissolvido no meio de cultivo, os quais em condições adequadas podem resultar na produção desses ácidos assim como de precursores de vias metabólicas para a biossíntese de diversos tipos de polímeros (OOSTERHUIS et al., 1985; HWANG et al., 1999; SILBERBACH et al., 2003).

#### **4. *Gluconacetobacter oxidans* como modelo para biossíntese de ácidos glicônico e ceto-derivados.**

Ao contrário de bactérias do gênero *Acetobacter*, a oxidação incompleta de uma variedade de açúcares principalmente a D-glicose é mais pronunciada em *G. oxydans*, sendo este microrganismo um dos mais importantes para produção de ácido glicônico e seus ceto-derivados (GUPTA et al., 2001; DEPPENMEIER et al., 2002). A figura 1 apresenta um esquema das rotas metabólicas envolvidas diretamente no metabolismo da glicose para a síntese de ácidos glicônicos e

ceto-derivados. A aplicação de *G. oxydans* em larga-escala, no entanto, ainda é limitada à produção de vinhos, principalmente devido à exigência de várias vitaminas e aminoácidos para o crescimento ótimo e principalmente devido à rápida acidificação do meio, observada na fase inicial de seu crescimento. Durante décadas vários estudos visaram esclarecer a fisiologia e regulação do mecanismo de produção desses AOs em diferentes estirpes de *G. oxydans*. SILBERBACH et al. (2003) desenvolveram um método de cultivo para aumentar a eficiência da produção de 2,5 di-cetoglicônico, baseado em dados obtidos sobre a influência do pH na atividade ótima das enzimas envolvidas na biossíntese desse composto. Porém, estes autores não excluem que, em resposta à alteração de fatores externos, a regulação da expressão desses genes pode ocorrer influenciando a atividade enzimática e conseqüentemente ser responsável pela variação na taxa de oxidação da glicose a ácido glicônico e produção da sua forma mais oxidada, o ácido 2,5 di-cetoglicônico. Outros pesquisadores têm focado seus estudos na produção eficiente dos ácidos 2-cetoglicônico, intermediário da biossíntese do 2,5 di-cetoglicônico, ou do ácido 5-cetoglicônico utilizando como ferramentas a clonagem e mutagênese direcionada (GUPTA et al., 1999; MATSUSHITA et al., 2003; SALUSJÄRVI et al., 2004).