

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS - BIOQUÍMICA**

Tese de Doutorado

**Análise do polímero PHA em *Saccharomyces cerevisiae*
recombinante: superexpressão de *phaG*, e a contribuição *in*
vivo das enzimas auxiliares envolvidas na β -oxidação de
ácidos graxos insaturados em peroxissomos**

Heique Marlis Bogdawa

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, 2005

VENTO

O VENTO VENTOSO

VENTAVA VELOZ

ATÉ QUE O VENTINHO DA VENTANIA

VENTOU NO ROSTO DA MENINA

A MENINA LEVEMENTE DISSE AO VENTO:

- SENHOR VENTO DA TÃO GRANDE VENTANIA

ME DÊ UM POUCO DO TEU VENTO

PARA DEIXAR A MINHA VIDA

COM MAIS ALEGRIA

CATARINA PERESSONI RÜTHER, 11 ANOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. João Antonio Pêgas Henriques pela orientação de um grande mestre. A maneira com que conduz a formação de seus alunos pode parecer fugir aos padrões, e sábios são aqueles que conseguem aprender com isso. Foram sete anos de excelente convivência, e tentar velejar em outros mares sem um porto seguro para recuperar o alento não vai ser uma tarefa fácil. Muito obrigada pelo ombro amigo e, principalmente, por ter me mostrado que o mundo da ciência não se resume apenas a ensaios de bancada, mas sim a um conjunto de atitudes e princípios.

Ao Dr. Yves Poirier por ter me acolhido em seu laboratório durante sete meses de uma maneira inexplicável. Obrigada pela oportunidade e confiança na estudante que simplesmente "aterrissou" em seu laboratório. Tive de conquistar espaço na bancada e entre os seus estudantes, e devo confessar que não foi tarefa fácil. Agradeço sua amizade e constante preocupação com minha pessoa. Merci pour tout!

Ao Dr. Giancarlo Pasquali pela paciência, amizade e ensinamentos. Admiro sua grande capacidade intelectual e habilidade de interação pessoal. Obrigada Herr por me acolher em seu mundo e por nos proporcionar um excelente ambiente de trabalho, além de um cantinho para o café, loucuras intelectuais, crises, piadas, ligação *Blunt*, bolachas, Pfx, fofocas.....

Ao CNPq e CAPES pelos financiamentos no Brasil e exterior.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica - pelo apoio e trabalho impecável ao longo deste trabalho.

A minha Família. Este trabalho não teria sido feito sem a ajuda de tantas pessoas queridas. Agradeço em especial a minha Mãe, um exemplo de altruísmo, força e luta.

Ao Eduardo, o "Alemãozinho pai da Lia", antes já casado comigo, pela base emocional durante estes anos todos. Obrigada pelo amor incondicional e paciência, acreditando em mim quando eu já havia perdido as esperanças. O convívio ao teu lado tem sido um laboratório de ensaios bem sucedidos. Agradeço também à Lia Bogdawa Rüter, super pequena mas hiper presente.

Ao Diego, para mim sempre Dieguinho, pela ajuda ao longo deste trabalho e pelos momentos de descontração regados a banalidades científicas.

Ao Dr. Martin Brendel pelo auxílio na transformação de *S. cerevisiae*.

Ao Renato pela paciência na elaboração de algumas das figuras da Tese.

A minha amiga Jacqueline (Dinda da Serra) por me ajudar em todas as horas, mesmo do outro lado do mundo. O que seria da divagação científica sem as coisas mundanas do mundo *fashion*? Obrigada por ser tão companheira.

A Arlete por ter me agüentado nas horas de crise. Bom saber que temos pessoas queridas ao nosso lado.

Ao Philipe, pronto para qualquer parada. O livro Maniatis não seria o mesmo sem os teus anexos divertidos.

As amigas Aurore, America e Karin. A Suíça não teria o mesmo sabor achocolatado sem a doçura de vocês.

Aos colegas do Lab. 219, em especial à Débora, Cleidy, Cassiana, Bacana e Renata, por compartilharem as horas difíceis e divertidas. Foi muito bom o convívio, deixarão saudades!

A todos os colegas dos Labs. 210 e 212, em especial aos veteranos.

Ao pessoal do Lab. do Dr. Giancarlo Pasquali pelo entusiasmo contagiante de cientistas "mirins" apenas na idade. Agradeço em especial a Marina por ter sido impecável em seu trabalho de iniciação científica.

A Márcia, pois tem um "jeitinho" para conseguir com que os alunos entrem em contato com o professor Henriques, esteja onde ele estiver. "Oh Moça", obrigada pela boa vontade e ajuda.

A Cléia, secretária do PPGBioq por seu trabalho dedicado e competente.

Ao Elmo, pela paciência em organizar a estrutura desta Tese e tantos outros trabalhos.

Aos secretários de PPGBCM Sílvia e Luciano, marcas de bom humor ao longo dos corredores do Centro de Biotecnologia.

A todos os professores e funcionários do Centro de Biotecnologia por terem me recebido de braços abertos.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Plásticos biodegradáveis	2
1.2 PHAs: bioplásticos naturais	4
1.2.1 Estrutura e nomenclatura	7
1.2.2 Propriedades físicas	9
1.2.3 Funções fisiológicas.....	10
1.3 PHA-sintases	12
1.4 Organização dos genes da síntese de PHA	16
1.5. Estrutura dos grânulos de PHA.....	16
1.6 Rotas metabólicas da produção de PHAs	18
1.6.1. Síntese de PHA-SCL	19
1.6.2. Síntese de PHA de cadeia longa (PHA-MCL).....	20
1.7. Produção de PHA em eucariotos	24
1.7.1 Síntese de PHA em plantas.....	24
1.7.2 Síntese de PHA-MCL na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : modelo para o estudo da β -oxidação em peroxissomos	30
II OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
 CAPÍTULO I - Expression of polyhydroxyacyl PHA synthase (<i>phaC1_{pa}</i>) and 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transacylase (<i>phaG_{pa}</i>) in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> does not establish the connection between fatty acid biosynthesis (FAB) and MCL-PHA production.....	 45

CAPÍTULO II. Analysis of the contribution of the β -oxidation auxiliary enzymes in the degradation of the dietary conjugated linoleic acid 9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -octadecadienoic acid in the peroxisomes of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
CAPÍTULO III. <i>In vivo</i> contribution of the enzyme $\Delta^{3,5}$, $\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase to the β -oxidation of unsaturated fatty acid <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
III – DISCUSSÃO	99
3.1. Expressão de PhaG _{Pa} e PhaC1 _{Pa} em <i>S. cerevisiae</i> : tentativa de estabelecer a conexão entre biossíntese de ácidos graxos e produção de PHA-MCL	100
3.2. Síntese de PHA-MCL em <i>S. cerevisiae</i> como ferramenta para o estudo da β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos insaturados.....	107
3.2.1. Degradação de ácido rumênico.....	108
3.2.2. Degradação do ácido 10- <i>cis</i> ,13- <i>cis</i> -nonadecadienóico.....	114
IV - CONCLUSÕES.....	119
4. Conclusão geral.....	120
4.1 Conclusões específicas	120
V – PERSPECTIVAS.....	123/124
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126/127
VII – ANEXOS.....	153
Anexo 1.....	154
Anexo 2.....	164

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3HA	ácido 3-hidroxiálcanóico
3HA-SCL	3-hidroxiácido de cadeia curta
3HA-SCL-CoA	tioéster de 3-hidroxiácido de cadeia curta
3HA-MCL-CoA	tioéster de 3-hidroxiácido de cadeia média
4HA-SCL-CoA	tioéster de 4-hidroxiácido de cadeia curta
5HA-SCL-CoA	tioéster de 5-hidroxiácido de cadeia curta
3HA-MCL	3-hidroxiácido de cadeia média
3HB	ácido 3-hidroxiбутírico
3HV	ácido 3-hidroxi-valérico
3HB-co-3HV	copolímero formado por 3HB e 3HV
ACP	proteína carreadora de acilas
CoA	coenzima A
CLA	ácido linoléico conjugado
cPHB	PHB complexado
Dci1p	enzima $\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienoil-CoA isomerase
DNA	ácido desoxirribonucléico
Eci1p	enzima Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase
FASI	complexo da ácido graxo sintase do tipo I (<i>Fatty Acid Synthase type I</i>)
FASII	complexo da ácido graxo sintase do tipo II (<i>Fatty Acid Synthase type II</i>)
HAs	hidroxiácidos
kDa	quilo Dalton
MFE-2	enzima multifuncional Mfe2p/Fox2p
µm	micrômetro

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PHA	poli-hidroxicanoato
PHA-SCL	poli-hidroxicanoato de cadeia curta
PHA-MCL	poli-hidroxicanoato de cadeia longa
PHA SCL-MCL	PHA formado por dois tipos de monômeros SCL e MCL
PHB	poli-hidroxibutirato
PHB-co-PHV	copolímero formado de HB e HV
poliP	polifosfato
RA	ácido rumênico
Sps19p	enzima 2,4-dienoil-CoA redutase
UV	luz ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes aplicações para o PHA (reproduzido de Lenz e Marchessault, 2005).....	7
Figura 2. Estrutura molecular de um PHA. A letra R representa alguns dos grupamentos que podem estar presentes no carbono β	8
Figura 3. Os ácidos 3-hidroxibutírico e 3-hidroxivalérico.	10
Figura 4. Reação catalisada pela PHA-sintase (Anderson e Dawes, 1990).	12
Figura 5. Reação de propagação da cadeia de PHB (reproduzido de Lenz e Marchessault, 2005).	15
Figura 6. Micrografia eletrônica de <i>Azotobacter chroococcum</i> mostrando as inclusões de PHB (Extraída de Lenz e Marchessault, 2005).	17
Figura 7. Rota metabólica de síntese de PHA-MCL em <i>Pseudomonas</i> . Utilização de intermediários da β -oxidação (Adaptado de Poirier, 2002).....	22
Figura 8. Rota metabólica de síntese de PHA-MCL em <i>Pseudomonas</i> . Utilização de intermediários da biossíntese de ácidos graxos (Adaptado de Poirier, 2002).....	24
Figura 9. Metabolismo da β -oxidação em <i>S. cerevisiae</i> : diferentes vias para a degradação de ácidos graxos saturados e insaturados.	35
Figura 10. Provável desvio dos intermediários da síntese e/ou da β -oxidação de ácidos graxos em linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> expressando os genes <i>phaG</i> e <i>phaC</i> de <i>P. aeruginosa</i> para a síntese de PHA-MC.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das PHA-sintases (adaptado de Rehm, 2003).	13
Tabela 2. Benefícios do CLA à saúde humana e seu provável modo de ação (adaptado de Wahle <i>et al.</i> , 2004).	109

RESUMO

Os polímeros do tipo poli-hidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres bacterianos que apresentam as propriedades de termoplásticos e elastômeros biodegradáveis. A síntese deste polímero em plantas de interesse agroindustrial tem sido vista como uma área promissora dentro da biotecnologia de polímeros para a produção em grande escala com baixos custos. Contudo, esta tarefa requer o aprimoramento de diferentes metodologias bioquímicas e moleculares, além de maximizar os processos de extração destes polímeros biológicos.

A produção de PHAs em peroxissomos ou no citoplasma de *Saccharomyces cerevisiae*, por meio da expressão de uma PHA-sintase bacteriana, pode servir como indicador e modulador do fluxo de carbonos que percorre vias biossintéticas como a síntese *de novo* de ácidos graxos e a β -oxidação. Esta levedura tem sido usada como eucarioto modelo para manipular as rotas envolvidas na síntese de PHAs do tipo MCL (PHA com um número médio de carbonos), um polímero menos cristalino e com menor ponto de fusão quando comparado ao PHA-SCL (PHA com um número pequeno de carbonos).

A enzima PhaG (3-hidrosidecanoil-ACP-CoA transacilase) é responsável pela conexão entre a síntese de ácidos graxos e a produção de PHA-MCL em bactérias do gênero *Pseudomonas*, em meios de cultura contendo uma fonte de carbono não-relacionada como gliconato, etanol ou acetato. Para tentar estabelecer esta rota metabólica em *S. cerevisiae*, o presente trabalho avaliou a coexpressão de PhaG_{Pa} e PhaC1_{Pa} (PHA-sintase) de *P. aeruginosa* para a síntese de PHA-MCL a partir de uma fonte de carbono não-relacionada em leveduras. Contudo, a presença de PhaG_{Pa} não alterou a composição ou a quantidade de PHA-MCL em relação à cepa controle contendo apenas PhaC1_{Pa} citoplasmática ou direcionada ao peroxissomo, independentemente da fonte de carbono utilizada (rafinose ou ácido oléico). Este resultado permite sugerir que a ligação entre a síntese de ácidos graxos e a produção de PHA-MCL em *S. cerevisiae* não foi estabelecida, provavelmente devido à ausência de algum passo enzimático que limita o desvio de substratos da síntese de ácidos graxos para a produção de PHA-MCL em organismos que não são capazes de acumular naturalmente este polímero quando cultivados em fontes de carbono não-relacionadas.

A levedura *S. cerevisiae* tem sido usada como um sistema modelo para estudar a β -oxidação de ácidos graxos insaturados em peroxissomos. A produção de PHA-MCL pela expressão de PhaC1_{Pa} em peroxissomos de cepas selvagens e mutantes nulos de *S. cerevisiae* para as enzimas auxiliares da β -oxidação (Eci1p, Sps19p e Dci1p), multiplicadas em meio de cultivo contendo um ácido graxo insaturado como fonte de carbono, permitiu monitorar o fluxo de carbonos que percorre as vias dependente de isomerase, redutase e di-isomerase. Desta forma, o presente estudo permitiu avaliar a β -oxidação *in vivo* dos ácidos graxos linoléico conjugado, 9-*cis*,11-*trans*-CLA (ácido rumênico) ou 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico, para determinar a contribuição das vias alternativas na degradação destes substratos pela utilização de cepas selvagens, mutantes nulos e linhagens contendo um plasmídeo multicópia para os genes *ECII* (Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase), *SPS19* (2,4-dienoil-CoA redutase) e *DCII* ($\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienoil-CoA isomerase).

As linhagens selvagens foram capazes de sintetizar PHA-MCL quando cultivadas em ácido rumênico, mas a atividade da enzima Eci1p foi essencial para a degradação

deste CLA, indicando que a via dependente de isomerase é a única rota *in vivo* necessária para a β -oxidação do ácido rumênico em peroxissomos de *S. cerevisiae*.

A contribuição da enzima di-isomerase (Dci1p) para a degradação do ácido 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico foi avaliada em cepas selvagens, mutantes nulos *dci1* Δ e linhagens de *S. cerevisiae* contendo os plasmídeos multicópia. De acordo com o conteúdo e a quantidade de PHA formado, a β -oxidação de ácidos graxos *cis*-insaturados em um carbono ímpar é, *in vivo*, independente da di-isomerase. Embora este resultado possa indicar o mesmo padrão de envolvimento de Dci1p na degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados em um carbono ímpar em mitocôndrias de mamíferos, esta via alternativa deve ser mais bem investigada em eucariotos superiores.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters that have the properties of biodegradable thermoplastics and elastomers. Synthesis of PHAs in crop plants is being seen as a promising field in polymer biotechnology for the production of large amounts at low costs. However, this technology requires the refinement of different biochemical and molecular methodologies besides the improvement of extraction procedures for these biological polymers.

PHA synthesis may be used both as an indicator and a modulator of the carbon flux toward biosynthetic pathways such as *de novo* fatty acid synthesis and β -oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* when a bacterial PHA synthase is expressed in peroxisomes or cytoplasm. This yeast has been used as a model system to manipulate routes implicated in MCL-PHA synthesis (medium-chain-length PHA), a polymer with reduced crystallinity and melting point compared to SCL-PHA (short-chain-length PHA).

PhaG is a 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase responsible for the connection between fatty acid biosynthesis and PHA production in pseudomonads when strains are cultivated on non-related carbon sources such as gluconate, ethanol or acetate. To establish this metabolic pathway in *S. cerevisiae*, the present study analyzed the MCL-PHA synthesis from non-related carbon sources in yeast by coexpressing PhaG_{Pa} and PhaC1_{Pa} (PHA synthase) from *Pseudomonas aeruginosa*. However, PhaG_{Pa} did not neither changed the composition nor the quantity of MCL-PHA on any of the carbon sources used (raffinose or oleic acid) compared to the control strain harboring cytoplasmatic or peroxisomal PhaC1_{Pa} only. This result suggests that the link between fatty acid biosynthesis and MCL-PHA production in *S. cerevisiae* from a non-related carbon source could probably not be established due to a missing enzymatic step that restricts the diversion of fatty acid biosynthesis intermediates to MCL-PHA production in a non-natural producing organism when cultivated on non-related carbon sources.

The yeast *S. cerevisiae* has been used as a model system to study peroxisomal β -oxidation of unsaturated fatty acids. MCL-PHA synthesis in wild-type strains and null mutants for β -oxidation auxiliary enzymes (Eci1p, Sps19p e Dci1p) grown on medium containing unsaturated fatty acids as the sole carbon source can be used to monitor the carbon flux that flows trough the isomerase, reductase and di-isomerase dependent pathways. In the present study we used wild-type, null mutants and multicopy strains for the genes *ECII* (Δ^3 - Δ^2 -enoyl-CoA isomerase), *SPS19* (2,4-dienoyl-CoA reductase) and *DCII* ($\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase) to analyze the *in vivo* β -oxidation of conjugated linoleic acid (CLA), 9-*cis*,11-*trans*-CLA (rumenic acid) and 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid, and to determine the contribution of the alternative pathways for the degradation of these substrates.

Wild-type yeast cells were able to synthesize MCL-PHA on media containing rumenic acid but Eci1p activity was essential to degrade CLA, indicating that the isomerase-dependent pathway is the only route *in vivo* required for the β -oxidation of rumenic acid in *S. cerevisiae* peroxisomes.

The contribution of the di-isomerase enzyme (Dci1p) for the degradation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid was evaluated in wild-type cells, *dci1* Δ null mutants and multicopy strains. Regarding monomer composition and PHA synthesis, *in vivo* β -oxidation of fatty acids having a *cis* double bond in an odd-numbered carbon is di-

isomerase independent. Although this result might be indicative of a similar Dci1p involvement pattern in the degradation of *cis*-unsaturated fatty acids in an odd-numbered carbon in mammalian mitochondria, this alternative pathway in higher eukaryotes has to be further investigated.

I - INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Plásticos biodegradáveis

O ser humano tem usufruído há milhares de anos de polímeros provenientes da natureza, como a madeira, a borracha e as fibras de algodão e linho. Contudo, a partir do começo do século XX, os polímeros naturais foram substituídos pelos plásticos de origem petroquímica, e esta transição revolucionou um mercado carente de materiais com propriedades físico-químicas apropriadas para o avanço tecnológico da sociedade moderna. Sua durabilidade, peso leve, resistência à degradação e baixo custo de produção são algumas das qualidades intrínsecas destes polímeros petroquímicos que os tornaram comercialmente atrativos.

Cerca de 140 milhões de toneladas de polímeros sintéticos são produzidos anualmente em todo o mundo, e os danos ao meio ambiente são expressivos, uma vez que é um produto bastante estável que não entra diretamente nos ciclos de biodegradação da biosfera (Shimao, 2001). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que o volume de plásticos dos lixos municipais chega a 20%, gerando problemas associados à remoção e destino deste material (Hankermeyer e Tjeerdema, 1999). O Brasil consome 21 kg/habitante/ano de plástico, um valor ainda baixo quando comparado a países mais desenvolvidos como os Estados Unidos, onde este valor chega a 70 kg/habitante/ano (www.ipt.br). No entanto, a demanda aumentará nos próximos anos e as conseqüências serão desastrosas se não houver uma conscientização e planejamento para gerenciar os resíduos plásticos.

Em Porto Alegre, a capital do estado do Rio Grande do Sul, um milhão e trezentos mil habitantes geram 1.600 toneladas de resíduos por dia. Destes, 48% são

constituídos de lixo doméstico. A cada ano aumenta a quantidade de plásticos encontrados durante o processo de triagem, chegando a constituir em média 22% do material separado nas unidades de reciclagem do município (Andrade e Guerrero, 2001). O Brasil produz cerca de 3 milhões de toneladas de plástico anualmente, e, desse total, 10% são reciclados (www.ipt.br).

A reciclagem dos plásticos é um processo de extrema importância para o desenvolvimento sustentável, uma vez que o crescimento exponencial da poluição humana tem levado ao acúmulo de materiais não-degradáveis na natureza. Este cenário gera uma drástica mudança no meio ambiente, afetando a sobrevivência potencial de vários organismos (Luengo *et al.*, 2003), e ameaçando a qualidade de vida nas cidades mais populosas. Muitos programas de reciclagem estão em andamento, mas o custo desta tecnologia ainda é de três a cinco vezes maior do que depositar o material biologicamente resistente em terrenos improdutivos ou aterros inapropriados. Além do mais, somente uma pequena fração de todo plástico utilizado é rotineiramente reciclado (Hankermeyer e Tjeerdema, 1999).

Em resposta a todos os problemas causados pelos polímeros de origem petroquímica, esforços têm sido realizados com o intuito de se identificar novos materiais biológicos que sejam eliminados da biosfera de forma eficaz e segura. Os biomateriais são produtos naturais sintetizados e degradados por diferentes microrganismos e que possuem uma vasta aplicação biotecnológica. Por serem biodegradáveis e biocompatíveis (sem efeitos tóxicos ao hospedeiro), estes materiais possuem consideráveis vantagens em relação aos polímeros sintéticos (Gross *et al.*, 2002; Luengo *et al.*, 2003).

Os bioplásticos representam uma categoria especial de biomateriais, podendo este termo se referir a plásticos biodegradáveis e/ou à origem biológica destes polímeros (Mergaert e Swings, 1996). Poirier *et al.* (1995) definem polímeros biodegradáveis como sendo materiais compostos por uma porção parcial ou total de moléculas que podem ser degradadas por hidrólise não-enzimática ou pela ação de enzimas produzidas por bactérias e fungos. Alguns bioplásticos podem sofrer degradação parcial, como no caso de polímeros contendo uma mistura de amido e polietileno (semi-biodegradáveis), ou ainda 100% biodegradados, como o poli-hidroxibutirato (PHB). Estima-se que 1,3 bilhão de quilos por ano seja produzido dentre uma dúzia de plásticos biodegradáveis que atendem as propriedades necessárias para a elaboração de diversos produtos que se encontram no mercado (Poirier *et al.*, 1995).

1.2. PHAs: bioplásticos naturais

Entre os diferentes tipos de plásticos degradáveis os poli-hidroxialcanoatos (PHAs) compreendem uma classe especial de poliésteres bacterianos de armazenamento compostos por ácidos 3-hidroxialcanóicos (3HAs ou ácidos β -hidroxialcanóicos). A descoberta da produção de poli-3-hidroxibutirato (PHB), pela bactéria *Bacillus megaterium* foi publicada em uma revista francesa de pouca divulgação em 1926 pelo diretor do Laboratório de Fermentação do Instituto Pasteur em Lille, França, chamado Maurice Lemoigne (revisado em Lenz e Marchessault, 2005). Esta observação não chamou muita atenção da comunidade científica da época e a mesma foi quase esquecida até a chamada crise do petróleo na década de 1970, quando um movimento científico buscou desenvolver pesquisas relacionadas com a síntese e a degradação de polímeros de origem eubacteriana como alternativa ao provável comprometimento da fonte de combustível fóssil.

Em 1982, a empresa inglesa ICL (*Imperial Chemical Industries Ltd.*) deu início à fermentação em grande escala de um novo tipo de poliéster biodegradável que substituiria o plástico de origem petroquímica. O produto foi patenteado como “Biopol”, e foi demonstrado que a bactéria *Wautersia eutropha* (anteriormente chamada de *Ralstonia eutropha*) é capaz de acumular até 90% do seu peso seco de PHB no interior de sua célula (Anderson e Dawes, 1990).

Os PHAs servem como reserva de carbono e energia para a maioria dos gêneros de eubactérias e membros da família *Halobacteriaceae* pertencente ao domínio *Archaea* (Rehm e Steinbüchel, 1999; Hezayen *et al*, 2002), quando multiplicados em condições de limitação de nutrientes como enxofre, fósforo e nitrogênio, e na presença de uma fonte de carbono em excesso (Madison e Huisman, 1999; Hankermeyer e Tjeerdema, 1999). Estes polímeros naturais são acumulados na forma de corpos de inclusão (grânulos) insolúveis em água, localizados no citoplasma. Atualmente, estão descritos 150 tipos diferentes de ácidos hidroxialcanóicos que podem compor os PHAs (Rehm, 2003). Assim, o número teórico de diferentes tipos de poliésteres que podem existir é praticamente infinito, sendo que as propriedades físico-químicas de um determinado poliéster biológico são regidas pela disposição e pelos diferentes tipos de 3HAs que compõem a cadeia polimérica.

A diversidade química dos PHAs confere uma ampla gama de aplicações, variando desde plásticos rígidos e quebradiços, até macios, elastômeros, borrachas e colas. Dos vários polímeros bacterianos conhecidos, o PHA possui todos os atributos básicos para substituir os plásticos de origem petroquímica tal como a resistência a solventes orgânicos, a termoplasticidade e a facilidade de processamento industrial em equipamentos já existentes para os plásticos convencionais. Este polímero também se

mostrou altamente versátil, com propriedades físico-químicas inovadoras, possibilitando o surgimento de novos materiais no mercado e com a principal vantagem de ser totalmente biodegradável quando exposto ao ambiente (Byrom, 1987; Fuller, 1999). O tempo médio para a biodegradação é de alguns dias ou meses, dependendo de suas características estruturais, gerando dióxido de carbono e água no final do processo (Müller e Seebach, 1993).

A produção dos bioplásticos naturais ainda chega a ser de 5 a 10 vezes mais dispendioso do que os polímeros de síntese química (Poirier *et al.*, 1995). Portanto, um dos principais objetivos dos laboratórios e empresas privadas que trabalham com poliésteres bacterianos tem sido reduzir o seu preço no mercado global dos plásticos, uma vez que a maioria dos PHAs são produzidos por fermentação microbiana, um processo relativamente lento e caro principalmente pelo alto custo da fonte de carbono usada nos cultivos, quando comparado ao processo petroquímico. Uma alternativa seria o crescimento de linhagens produtoras de PHA em fontes de carbono renováveis, como o melaço da cana-de-açúcar (Bonatto *et al.*, 2004; ver anexos), resíduos agrícolas, ou a partir de materiais industriais excedentes derivados da produção de queijo (Koller *et al.*, 2004). Além disso, diferentes trabalhos mostraram a produção de PHAs em plantas como uma área promissora, uma vez que estabelece um novo ciclo de carbono utilizando apenas a luz como fonte de energia, levando a um sistema com menos efeitos ao meio ambiente do que o processamento tradicional do plástico (Arai *et al.*, 2004).

Mesmo que o valor da produção desses polímeros ainda seja muito elevado para que os mesmos substituam os plásticos convencionais no mercado de embalagens (Figura 1), alguns pesquisadores apostam no seu uso na farmacologia e na medicina. O aprimoramento do processo de síntese de 3HA pode fornecer compostos quirais para o

desenvolvimento de novas drogas como, por exemplo, antibióticos e vitaminas (Zhao *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004; Chen e Wu, 2005). Além disso, o PHA é utilizado como base para a elaboração de materiais médicos em micro e nano-esferas para a liberação de quimioterápicos, moldes para próteses utilizadas na ortopedia, válvulas cardíacas, telas cirúrgicas, contrastes para tomografia, suturas, parafusos cirúrgicos, suporte para cultura de fibroblastos, entre outras aplicações (Zinn *et al.*, 2001; Shishatskaya e Volova, 2004), e na indústria de tintas, sendo usado nas misturas como um aditivo ecologicamente correto (van der Walle, 1999).

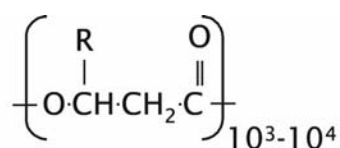


Figura 1. Diferentes aplicações para o PHA (reproduzido de Lenz e Marchessault, 2005)

1.2.1. Estrutura e nomenclatura

Na figura 2 está representada a estrutura química básica de todos os PHAs. Os 3HAs estão conectados via ligações ésteres entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila do monômero adjacente. O átomo de carbono contendo o grupamento hidroxila (carbono β ou posição 3) possui, na maioria dos

PHAs, um grupamento (R) alquila que pode variar até uma tridecila (C13). A posição β deste grupamento é crucial tanto para as propriedades físicas quanto para a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese e degradação dos PHAs. O número de monômeros que forma este biopolímero pode variar, em média, entre 10^5 a 10^6 (Nawrath *et al.*, 1995), e os mesmos são geralmente ácidos R-3-hidroxicarboxílicos, embora 4-, 5- ou 6-hidroxiácidos também possam estar presentes.



R = metila	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
R = etila	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
R = propila	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
R = pentila	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
R = nonila	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA
	Poli(3-hidroxiacetato)	PHA

Figura 2. Estrutura molecular de um PHA. A letra R representa alguns dos grupamentos que podem estar presentes no carbono β . A nomenclatura dos PHAs corresponde ao número de carbonos que compõem o polímero, enquanto que o número de monômeros pode variar entre 10^3 a 10^4 .

A cadeia lateral (R) não é necessariamente saturada, existindo também monômeros insaturados, ramificados, aromáticos, halogenados, clorados, e epoxilados (Steinbüchel e Valentin, 1995; Witholt e Kessler, 1999; van der Walle *et al.*, 1999; Ewering *et al.*, 2002; Rehm, 2003). Embora a maior parte destes monômeros tenha sido encontrada em PHAs produzidos por bactérias em seus ambientes naturais, uma grande fração de monômeros “não usuais” tem sido incorporada na cadeia de PHA quando bactérias são multiplicadas sob condições de laboratório em meios contendo fontes de carbonos exóticas, como no caso de ácidos fenil-hexanóicos (García *et al.*, 1999; Abraham *et al.*, 2001).

A nomenclatura dos PHAs é bastante simples. O polímero composto por apenas ácidos 3-hidroxicarboxílicos com um número pequeno de carbonos (C3-C5) é classificado como **PHA-SCL** (*short-chain-length*; SCL), enquanto que aquele formado por um número médio de carbonos (C6-C16) é denominado de **PHA-MCL** (*medium-chain-length*; MCL). O PHA formado por uma mistura dos dois tipos de monômeros (PHA híbrido) é chamado de **PHA SCL-MCL** (Rehm e Steinbüchel, 1999). A divisão de PHA-SCL e MCL é determinada principalmente pela especificidade ao substrato da PHA-sintase, enzima responsável pela polimerização dos monômeros SCL ou MCL. Além disso, os polímeros formados por apenas um tipo de monômero são conhecidos como homopolímeros, enquanto que os heteropolímeros ou copolímeros são compostos por uma mistura de diferentes unidades monoméricas.

1.2.2. Propriedades físicas

O polímero mais simples e extensivamente estudado da família dos PHAs é o homopolímero poli-3-hidroxi-3-butirato (PHB). O PHB foi descoberto há mais de 75 anos, e é acumulado por diferentes gêneros bacterianos com ampla distribuição taxonômica (Byron, 1987; Anderson e Dawes, 1990; Müller e Seebach, 1993; Hein *et al.*, 1998). Por ser formado por monômeros de 3HB (Figura 3), ele pode ser comparado ao polipropileno por apresentar características físico-químicas bastante idênticas, como peso molecular, temperatura de fusão, cristalinidade e resistência à tração. O PHB possui propriedades vantajosas em relação ao polipropileno já que é atóxico, resistente à luz ultravioleta (UV), e apresenta uma melhor barreira ao oxigênio, à gordura e ao odor (Hankermeyer e Tjeerdema, 1999). Contudo, o PHB é altamente cristalino, rígido e quebradiço, além de apresentar o seu ponto de fusão muito próximo à temperatura em

que o polímero decompõe, limitando o seu uso em diversos setores da indústria de embalagens (Barham *et al.*, 1984; Doi, 1995).

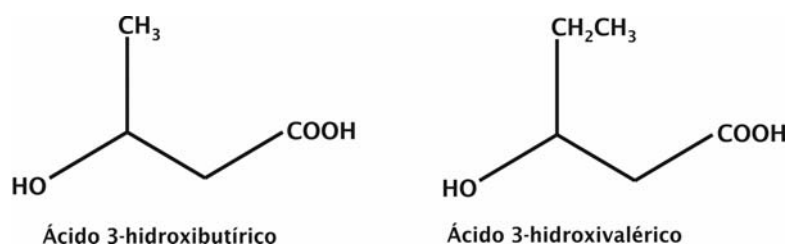


Figura 3. Os ácidos 3-hidroxibutírico e 3-hidroxivalérico.

O copolímero 3HB-co-3HV (PHBV), formado pelos ácidos 3HB e 3-hidroxivalérico (Figura 3), é o polímero mais bem estudado e caracterizado entre os PHAs, sendo um ótimo candidato para aplicações comerciais. Um aumento da fração de 3HV no copolímero confere uma maior flexibilidade à estrutura, reduzindo o ponto de fusão sem afetar a temperatura de degradação, facilitando o processamento deste biopolímero (Lee, 1996). Os PHAs-MCL são tipicamente descritos como elastômeros, embora suas propriedades físico-químicas sejam muito heterogêneas e dependentes da composição monomérica (Anderson e Dawes, 1990). Estes podem sofrer alterações pós-extração como, por exemplo, a irradiação com um feixe de elétrons que permite a ligação cruzada (*crosslinking*) entre ligações insaturadas, gerando um polímero com propriedades de borracha (de Koning *et al.*, 1994).

1.2.3. Funções fisiológicas

A principal vantagem dos polímeros de alto peso molecular (PHAs) é o acúmulo de uma grande quantidade de reserva de carbono sem afetar a pressão osmótica da célula. Em algumas espécies de *Bacillus*, os grânulos de PHA podem servir de fonte de

carbono durante a fase de esporulação, embora a sua presença não seja uma condição para este processo. O PHB em bactérias do gênero *Azotobacter* é essencial para o encistamento, servindo como fonte de carbono e energia durante esta fase (Reusch e Sadoff, 1981). Este homopolímero teria a função de proteger a nitrogenase em bactérias do gênero *Rhizobium*, enzima responsável pela fixação de nitrogênio, contra a ação nociva do oxigênio em elevada concentração no nódulo formado na raiz da planta, ou ainda serviria de fonte de energia quando a bactéria se encontrasse no solo (de Vries *et al.*, 1986; Stam *et al.*, 1986).

Muitos procariotos e eucariotos são capazes de produzir moléculas de PHB de baixo peso molecular (< 200 resíduos) complexadas (cPHB) a macromoléculas em concentrações expressivamente menores (de três a quatro ordens de magnitude) do que em células que acumulam PHA como forma de armazenamento de energia (Huang e Reusch, 1996). O PHB de baixo peso molecular parece ser um constituinte biológico celular universal como os polifosfatos (poliP), e é talvez a macromolécula mais simples e primitiva que se associa ao poliP para formar canais de íons (Reusch, 2000).

Estudos feitos em *Escherichia coli* têm fornecido subsídios para um possível papel fisiológico do cPHB de baixo peso molecular em procariotos associado ao poliP. Este complexo é uma estrutura versátil que desempenha um papel importante na aquisição de ácido desoxirribonucléico (DNA) exógeno em *E. coli* (aquisição da competência), e na formação de um sistema bem regulado e seletivo de transporte de cátions (sobretudo Ca^{+2}) através da membrana plasmática (Huang e Reusch, 1996; Reusch e Sandoff, 1988; Reusch *et al.*, 1986, 1995).

Em eucariotos, o complexo proteína-PHB foi encontrado em uma grande variedade de tecidos e compartimentos celulares, podendo ser constituinte de proteínas

envolvidas na ligação e/ou no transporte de polinucleotídeos. Esta teoria é fundamentada pelo estudo feito por Reusch *et al.* (2002) em histonas de células do timo de novilhos (H1, H2A, H2B, H3 e H4), além da proteína H-NS de *E. coli*. Os pesquisadores mostraram que estas proteínas, responsáveis pela organização do DNA, são modificadas pós-tradução pela associação com PHB de baixo peso molecular, sugerindo que o mesmo possa facilitar a sua função e/ou modelar a estrutura das mesmas em eucariotos e procariotos.

1.3. PHA-sintases

As PHA-sintases são as enzimas-chave para a biossíntese de PHAs. Elas utilizam como substrato os tioésteres de coenzima A (CoA) dos 3HAs e catalisam a polimerização destes HAs em PHA, juntamente com a liberação de CoA (Figura 4).

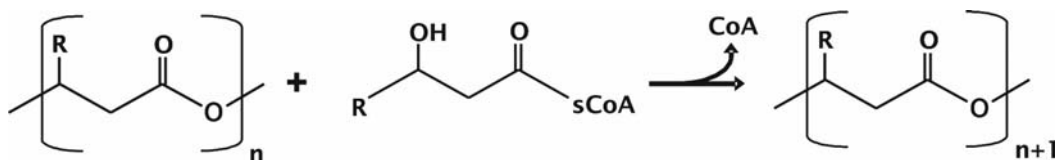


Figura 4. Reação catalisada pela PHA-sintase (Anderson e Dawes, 1990).

A seqüência nucleotídica de 59 PHA-sintases pertencentes a 45 grupos diferentes de bactérias é conhecida atualmente. Baseados na estrutura primária deduzida por estas seqüências, a especificidade do substrato e a composição das subunidades, as PHA-sintases podem ser classificadas em quatro classes de acordo com Rehm (2003). As PHA-sintases pertencentes às classes I e II (Tabela 1) são formadas por apenas uma subunidade enzimática (PhaC) de peso molecular variando entre 60 a 73 kDa. Conforme a especificidade ao substrato *in vivo*, as PHA-sintases do tipo I (*W. eutropha*)

metabolizam tioésteres de CoA de 3HAs de comprimento de cadeia curta (3 a 5 carbonos; 3HA-SCL), enquanto que as PHA-sintases da classe II (*Pseudomonas aeruginosa*) utilizam tioésteres de CoA de 3HAs de comprimento de cadeia média (>6 carbonos; 3HA-MCL).

A classe III das PHA-sintases (*Allochromatium vinosum*) compreendem enzimas constituídas de dois tipos diferentes de subunidades: (i) a subunidade PhaC (de aproximadamente 40 kDa) exibe uma similaridade na seqüência de aminoácidos com as sintases de classe I e II na ordem de 21 a 88%, e (ii) a subunidade PhaE (ao redor de 40 kDa) não apresenta qualquer homologia com as PHA-sintases. As PHA-sintases da classe III preferem tioésteres de CoA de 3HA-SCL.

Tabela 1. Classificação das PHA-sintases (adaptado de Rehm, 2003).

Classe	Subunidades	Espécie	Substrato
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Wautersia eutropha</i>	3HA-SCL-CoA (C3-C5) 4HA-SCL-CoA e 5HA-SCL-CoA
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA-MCL-CoA (C6-C14)
III	PhaC PhaE ~40 kDa ~ 40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA-SCL-CoA
VI	PhaC PhaR ~40 kDa ~ 22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA-SCL-CoA

A classe IV de PHA-sintases (*Bacillus megaterium*) assemelha-se às enzimas da classe III, mas a subunidade PhaE é substituída pela PhaR com aproximadamente 20 kDa.

Existem três exceções na classificação das PHA-sintases. A enzima de *Thiocapsa pfennigii* possui duas subunidades com alta identidade a PhaC de classe III (em torno de 85% de identidade), aceitando tanto 3HA-SCL quanto MCL como substratos

(Liebergesell *et al.*, 2000). A PhaC de *Aeromonas caviae* apresenta uma forte similaridade às enzimas pertencentes à classe I (aproximadamente 45%), produzindo um copolímero formado de 3HB e 3HH (Fukui e Doi, 1997). Em *Pseudomonas sp.* 61-3, as enzimas PhaC1 e PhaC2 possuem alta similaridade às PHA-sintases de classe II (ao redor de 80%), formando um copoliéster composto por 3HB e 3HA-MCL (Matsusaki *et al.*, 1998). O modelo de atividade das PHA-sintases envolve a formação de um homodímero em sintases da classe I e II, e de um heterodímero em sintases que possuem duas subunidades distintas, ou seja, àquelas das demais classes (Rehm e Steinbüchel, 1999).

A comparação de 59 PHA-sintases de diferentes bactérias revelou que estas enzimas apresentam uma alta identidade que varia entre 80 a 96% (Rehm e Steinbüchel, 1999; Rehm, 2003). Quando se compara a região com maior similaridade de seqüências de aminoácidos, uma assinatura de seis blocos conservados é identificada. A região N-terminal desta enzima (aproximadamente 100 aminoácidos em relação à classe I das PHA-sintases) é altamente variável, e a ausência de 36 a 100 aminoácidos desta região mostrou ser dispensável para a atividade da mesma em *W. eutropha* (Rehm *et al.*, 2002). De uma maneira geral, oito resíduos de aminoácidos são idênticos em todas as 59 PHA-sintases descritas, sugerindo um papel importante destes resíduos na função desta enzima.

Análises filogenéticas foram feitas com todas as sintases conhecidas por meio de múltiplos alinhamentos (Rehm, 2003), mostrando que a classe I das sintases é a mais variável entre todas, sugerindo uma maior diversidade nas suas propriedades enzimáticas. A região C-terminal (em torno de 40 aminoácidos) mostrou ser conservada

em todas as classes, funcionando como um domínio de ligação à região hidrofóbica do polímero (*phaC* em classe I e II, e *phaE* e *phaR* em classe III e IV).

Na figura 5 está representada a reação de propagação da cadeia de PHB. O modelo atual do mecanismo de biossíntese envolve dois grupos tiol que desempenham um papel-chave na reação (Amara *et al.*, 2002). Um dos grupos serviria de local de aquisição de 3-HB, enquanto que o segundo seria o sítio para iniciação (*priming*) e propagação (*elongation*) da polimerização. Na iniciação da síntese, os dois grupos tiol formam tioésteres com duas moléculas do monômero, que sofrem uma reação tioéster-oxiéster no sítio ativo para formar um dímero e liberar um dos grupos tiol para que o processo de polimerização avance. A propagação da cadeia continua com a ligação de um outro monômero ao grupo tiol livre seguido de mais uma reação tioéster-oxiéster para formar um trímero, e assim por diante (Lenz e Marchessault, 2005).

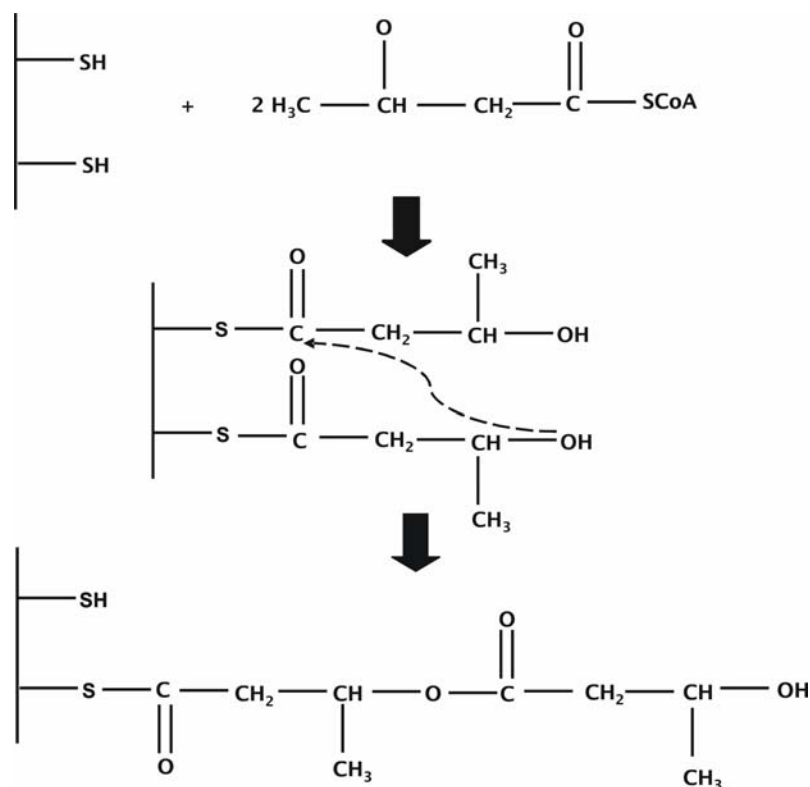


Figura 5. Reação de propagação da cadeia de PHB (reproduzido de Lenz e Marchessault, 2005).

1.4. Organização dos genes da síntese de PHA

Mais de 25 genes envolvidos na síntese de PHA de diferentes bactérias foram clonados até o momento (Steinbüchel *et al.*, 1992). A arquitetura das seqüências envolvidas no metabolismo de PHAs é geralmente delineada na forma de agrupamentos (*clusters*).

De regra, os genes da classe I de PHA-sintase (*W. eutropha*; β -proteobactérias) constituem o operon *phaCAB*. Neste se encontram os genes *phaC* (sintase), *phaA* (3-cetoacil-CoA tiolase) e *phaB* (acetoacil-CoA redutase NADPH dependente). As bactéria que apresentam PHA-sintases de classe II (*Pseudomonas*) possuem dois genes de PHA-sintase nos seus genomas, separados por uma seqüência gênica codificadora da PHA despolimerase intracelular (*phaZ*). Além disto, a jusante da organização dos genes *phaC1* e *phaC2*, localiza-se o gene de função desconhecida *phaD*, seguido pelos genes *phaI* (proteína estrutural) e *phaF* (proteína reguladora negativa e proteína estrutural; Prieto *et al.*, 1999; Kessler e Witholt, 2001), que são transcritos na direção oposta aos genes das sintases (Rehm, 2003). Em todas as bactérias que possuem uma PHA-sintase de classe III, *phaC* e *phaE* estão diretamente ligados e constituem um único operon (Rehm e Steinbüchel, 1999). Na classe IV de PHA-sintases os genes *phaR* e *phaC* estão separados por *phaB* (gênero *Bacillus*).

1.5. Estrutura dos grânulos de PHA

Os grânulos de PHA consistem de pequenas inclusões insolúveis em água formadas pelo núcleo hidrofóbico do poliéster cercado por uma membrana constituída por diferentes classes de proteínas associadas: (i) PHA-sintase, (ii) faseínas de função estrutural (PhaP, PhaI e PhaS), (iii) PHA despolimerase, (iii) faseínas com função reguladora como PhaR, PhaF e PhaQ, e (iv) proteínas com função ainda não conhecida. Em particular, as faseínas são proteínas estruturais que formam uma capa protéica na

superfície das inclusões, gerando uma interface entre a região hidrofílica do citoplasma e o núcleo hidrofóbico do grânulo de PHA (Kessler e Witholt, 2001; Matsumoto *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Pötter, 2005).

Na maioria das vezes, 8 a 12 grânulos variando entre 0,2 a 0,5 μm de diâmetro são encontrados intracelularmente, podendo, em bactérias, constituir o volume praticamente total da célula (Figura 6; Anderson e Dawes, 1990; Gerngross e Martin, 1995; Steinbüchel *et al.*, 1995; York *et al.*, 2001).

A síntese dos grânulos de PHA não ocorre aleatoriamente no interior da célula bacteriana. De acordo com Jedrossek (2005), o melhor modelo *in vivo* que descreve a formação do grânulo é o do brotamento. Por este modelo foi estabelecido que os estágios iniciais da formação do polímero ocorrem próximos aos pólos da célula e à membrana plasmática, isto é, PhaC estaria ancorada à membrana no citoplasma, e a cadeia crescente de PHB seria liberada da camada fosfolipídica da membrana, resultando na formação do grânulo. À medida que o processo de formação das inclusões de PHA ocorre em estágios mais tardios, a sua distribuição tornar-se-ia mais aleatória no interior da célula.

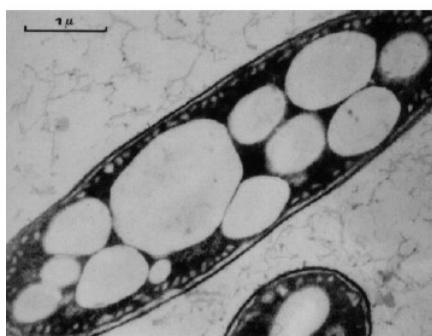


Figura 6. Micrografia eletrônica de *Azotobacter chroococcum* mostrando as inclusões de PHB (Extraída de Lenz e Marchessault, 2005).

1.6 Rotas metabólicas da produção de PHAs

A composição monomérica do biopolímero depende da PHA-sintase do hospedeiro e do aporte de tioésteres de 3HA-CoA. Esta contribuição é diretamente dependente das rotas metabólicas do organismo e da fonte externa de carbono (Aldor e Keasling, 2003).

Os ácidos 3HAs são um dos produtos finais opticamente ativos do metabolismo de uma determinada fonte de carbono, antes de serem polimerizados em PHAs na célula eubacteriana pela enzima PHA-sintase. A fonte de carbono pode ser um carboidrato, um lipídeo, dióxido de carbono ou um ácido graxo, adquirida pela célula ativa ou passivamente incorporada a partir do meio ambiente (Müller e Seebach, 1993; Steinbüchel e Valentin, 1995).

A regulação do metabolismo de PHA pode ocorrer em diferentes níveis: (i) ativação da expressão dos genes *pha* devido a sinais ambientais específicos, como a falta de nutrientes; (ii) ativação das enzimas de PHA por componentes celulares específicos ou intermediários metabólicos; (iii) inibição de enzimas pertencentes a rotas metabólicas de competição, enriquecendo, assim, os intermediários necessários para a síntese de PHA; ou (iv) a combinação de todas as alternativas acima (Kessler e Witholt, 2001).

De maneira geral, as bactérias produtoras de PHA podem ser subdivididas em dois grupos. Um grupo produz PHA de comprimento de cadeia curta (PHA-SCL) como a bactéria *W. eutropha*, enquanto que o outro sintetiza polímeros de comprimento de cadeia média (PHA-MCL). Este último grupo possui representantes de diferentes espécies de *Pseudomonas*.

1.6.1. Síntese de PHA-SCL

Grande parte do conhecimento a respeito da biossíntese de PHB tem sido obtida pelos estudos feitos com a bactéria *W. eutropha*. A biossíntese de PHB ocorre pela ação em seqüência de três enzimas a partir de acetil-CoA (Anderson e Dawes, 1990). A acetil-CoA é o substrato para a enzima 3-cetotiolase (PhaA; 3-cetoacil-CoA tiolase), que catalisa a condensação reversível de duas porções de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A acetoacetil-CoA redutase NAPH-dependente (PhaB) reduz acetoacetil-CoA a R-3-hidroxi-butiril-CoA que é polimerizado pela ação de uma PHA-sintase (PhaC) levando à formação de PHB (Anderson e Dawes, 1990; Leaf e Scrienc, 1998).

A síntese de PHB é regulada em nível enzimático, e as concentrações de acetil-CoA e de CoA livre desempenham um papel fundamental na regulação da síntese do poliéster (Senior e Dawes, 1971; Haywood *et al.*, 1988). A enzima citrato sintase é uma proteína-chave na regulação da via sintética de PHA, uma vez que possui a habilidade de controlar o fluxo de CoA que entra no ciclo do ácido cítrico e, conseqüentemente, a atividade da enzima 3-cetotiolase (PhaA). Foi demonstrado que altos níveis citoplasmáticos de NADH e NADPH estimulam a produção do polímero, e inibem a enzima citrato sintase (Lee *et al.*, 1995; Henderson e Jones, 1997).

W. eutropha também produz uma ampla variedade de PHAs contendo monômeros variando entre C3 a C5. A natureza e a proporção destes monômeros é influenciada pelo tipo e quantidade de fonte de carbono suplementada ao meio de cultura. Além disso, as três enzimas envolvidas possuem uma ampla especificidade de substratos que podem ser utilizados (Steinbüchel e Schlegel, 1991). A adição de ácido propiônico ou ácido valérico no meio de cultivo contendo glicose leva à síntese de um copolímero composto por 3-HB e 3-HV (PHB-co-PHV; Luzier, 1992; Lee, 1996;

Williams e Peoples, 1996). A produção deste copolímero implica na condensação de propionil-CoA com acetil-CoA, sendo esta reação enzimática realizada por uma ou duas redutases distintas (BtkB e BtkC) (Slater *et al.*, 1998). Estas redutases possuem maior especificidade à propionil-CoA do que a enzima PhaA. Após a redução de 3-cetovaleril-CoA à R-3-hidrovaleril-CoA, a reação de síntese do polímero é a trivial, com as subseqüentes intervenções de PhaB e PhaC (Slater *et al.*, 1998).

São poucos os gêneros bacterianos capazes de produzir PHA-SCL que não o PHB quando multiplicadas em glicose. Um exemplo é *Rhodococcus ruber*, que produz um copolímero 3HB-3HV em meio de cultivo contendo apenas glicose (Haywood *et al.*, 1991).

1.6.2. Síntese de PHA de cadeia longa (PHA-MCL)

A maioria das *Pseudomonas* pertencentes ao grupo de homologia do rRNA ribossomal I acumulam copolímeros de PHA do tipo PHA-MCL. As bactérias *P. stutzeri*, *P. fragi* e *P. maltophilia* não são capazes de acumular qualquer tipo de PHA (Huisman *et al.*, 1989).

Os 3-hidroxiacil-CoA tioésteres do tipo MCL são provenientes de duas rotas metabólicas distintas. Os intermediários da β -oxidação podem servir de substrato para a produção de PHA-MCL em várias bactérias como, por exemplo, *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. oleovorans*, quando uma fonte de carbono relacionada, ou seja, ácidos graxos ou ácidos alcanóicos, são adicionados ao meio de cultivo (Figura 7). Nestas bactérias, a composição dos monômeros está diretamente influenciada pelo substrato de cultura utilizado na fermentação (Huisman *et al.*, 1989; Timm e Steinbüchel, 1990; Qi *et al.*, 1998; Hoffman e Rehm, 2004). A composição dos monômeros na cadeia polimérica é tipicamente composta por unidades que são $2n$ ($n \geq 0$) carbonos menores que o substrato adicionado ao cultivo. Por exemplo, se o crescimento de *P. oleovorans*

for em octanoato, o polímero será formado por monômeros C8 e C6. Caso o cultivo seja em dodecanoato (C12), as unidades do polímero serão C12, C10, C8 e C6 (Huisman *et al.*, 1989). Os HAs presentes no meio de crescimento são transportados para o interior da célula onde são primariamente convertidos em ésteres de CoA antes de serem direcionados à β -oxidação, onde diferentes 3-hidroxiacil-CoA são gerados. Durante este metabolismo, são formados na bactéria S-3-hidroxiacil-CoAs que, por sua vez, não são substrato para a PHA-sintase. Uma vez que somente isômeros do tipo R-3-hidroxiacil-CoA são polimerizados na cadeia de PHA, a bactéria necessita de uma enzima capaz de gerar este enantiômero (Huisman *et al.*, 1989; Timm e Steinbüchel, 1990; Qi *et al.*, 1998; Hoffman e Rehm, 2004).

A enzima 3-hidroxiacil-CoA epimerase converte reversivelmente os isômero S em R de 3-hidroxiacil-CoA, e a sua atividade faz parte da proteína multifuncional (MFP1) envolvida na β -oxidação. A MFP1 é a segunda enzima a atuar no metabolismo da degradação de ácidos graxos e, além da atividade de epimerase, ela apresenta as atividades de enoil-CoA hidratase I, S-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase (Yang *et al.*, 1988).

Em algumas bactérias como *Pseudomonas*, *A. caviae* e *Rhodospirillum rubrum*, foi identificada uma enoil-CoA hidratase II (*trans*-2,3-enoilacil-CoA hidratase) que converte diretamente enoil-CoA em R-3-hidroxiacil-CoA (Fukui e Doi, 1997; 1999; Tsuge *et al.*, 1999; 2003; Reiser *et al.*, 2000; Fiedler *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003). Embora os intermediários da β -oxidação possam ser convertidos em R-3-hidroxiacil-CoA pela atuação de uma epimerase ou hidratase, uma 3-cetoacil-CoA redutase também pode gerar este substrato para a PHA-sintase. Esta enzima está envolvida na síntese de ácidos graxos e pode converter tanto 3-cetoacil-CoA quanto 3-cetoacil-ACP

em R-3-hidroxiacil-CoA (Campos-García *et al.*, 1998; Taguchi *et al.*, 1999a; Ren *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002).

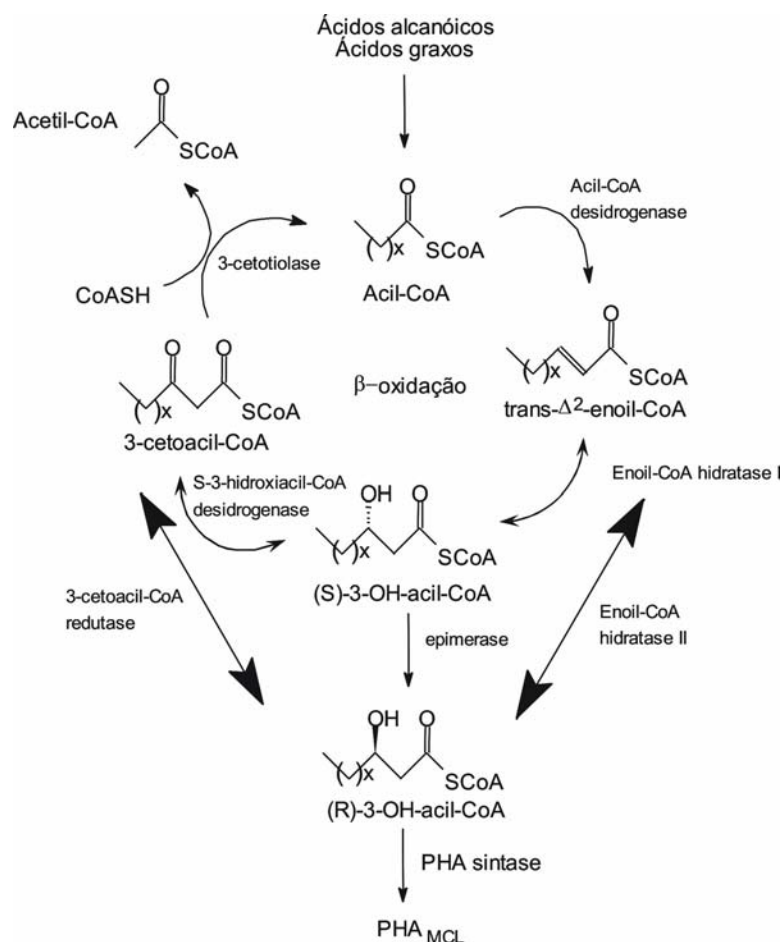


Figura 7. Rota metabólica de síntese de PHA-MCL em *Pseudomonas*. Utilização de intermediários da β -oxidação (Adaptado de Poirier, 2002).

A segunda via de produção de PHA-MCL encontrada na maioria das espécies de *Pseudomonas* envolve a utilização de intermediários do metabolismo biossintético de ácidos graxos. Esta rota fornece precursores para a síntese quando a bactéria multiplica-se em meio contendo uma fonte de carbono não relacionada, ou seja, que é metabolizada à acetil-CoA antes de entrar na via de produção como gliconato, acetato ou etanol (Figura 8; Huisman *et al.*, 1989; Timm e Steinbüchel, 1990; Qi *et al.*, 1998;

Hoffman e Rehm, 2004). Em *P. aeruginosa*, *P. putida* e *Pseudomonas* sp 61-3, a enzima 3-hidroxiacil-ACP-CoA-transacilase (PhaG) é responsável pela conexão entre a síntese de ácidos graxos e a síntese de PHA-MCL, permitindo a conversão de 3-hidroxiacil-ACP em 3-hidroxiacil-CoA, o substrato da PHA-sintase (Rehm *et al.*, 1998, 2001; Fiedler *et al.*, 2000, Hoffmann *et al.*, 2000; 2002a,b; Matsumoto *et al.*, 2001). A transacilase PhaG de *P. putida* foi a primeira enzima identificada e caracterizada que catalisa a transferência reversível da porção R-3-hidroxi-decanoil do tioéster ACP para CoA (Rehm *et al.*, 1998). Entre espécies de *Pseudomonas*, esta enzima apresenta uma homologia variando entre 75% a 98% (Hoffmann *et al.*, 2002a).

A conexão entre metabolismo de ácidos graxos e PHA pode ser estabelecida em *P. fragi*, uma bactéria não-produtora de PHA (Rehm *et al.*, 1998; Fiedler *et al.*, 2000). Da mesma forma, a superexpressão de *phaG* em *P. oleovorans* permitiu o acúmulo de PHA quando multiplicada em gliconato, mostrando que a enzima realmente possui uma atividade de transacilase (Hoffmann *et al.*, 2002b). Os autores apontaram a baixa expressão do gene *phaG* de *P. oleovorans* em cepas selvagens como sendo o motivo da síntese reduzida de PHA quando as mesmas eram cultivadas em fontes de carbono não-relacionadas. Curiosamente, a co-expressão de *phaC1* de *P. aeruginosa* e *phaG* de *P. putida* em células de *E. coli* cultivadas em glicose não pode fornecer precursores para a síntese de PHA (Rehm *et al.*, 1998). Como *P. fragi*, *E. coli* não é capaz de acumular naturalmente PHA. Acredita-se que esta incapacidade se deva a diferenças entre rotas metabólicas de espécies produtoras e não-produtoras de PHA, impedindo a atividade de enzimas como PhaC e/ou PhaG (Rehm *et al.*, 1998).

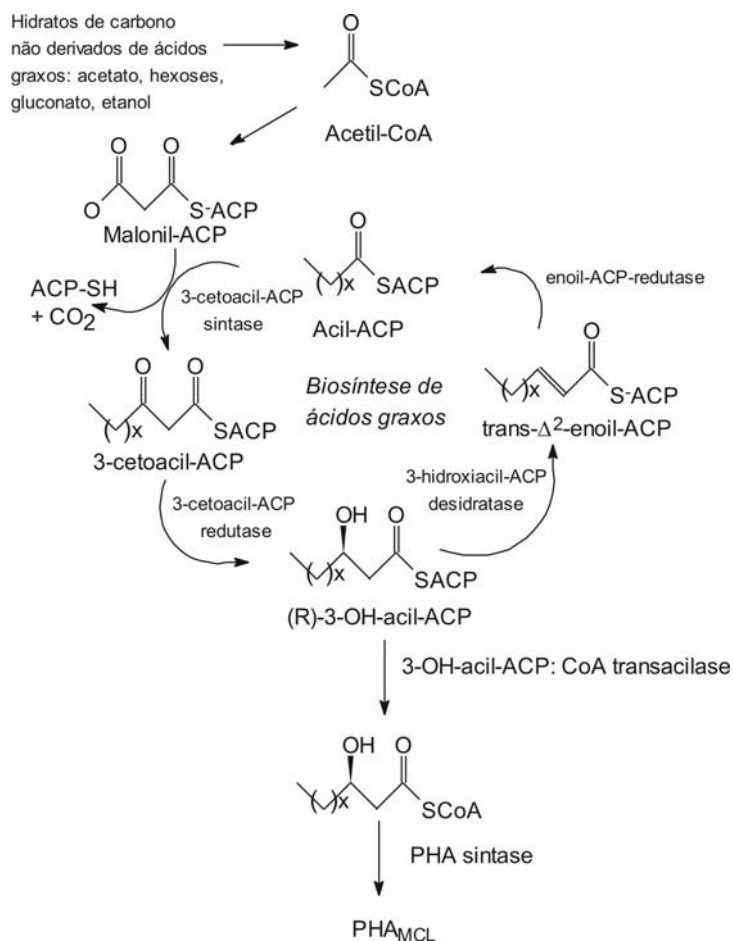


Figura 8. Rota metabólica de síntese de PHA-MCL em *Pseudomonas*. Utilização de intermediários da biossíntese de ácidos graxos (Adaptado de Poirier, 2002).

1.7. Produção de PHA em eucariotos

1.7.1 Síntese de PHA em plantas

Embora a celulose e o amido sejam os polímeros mais utilizados para a produção de plásticos biodegradáveis, a produção de novos biomateriais em plantas de interesse agroindustrial como milho, tabaco, canola e soja é um método alternativo ao processo fermentativo microbiológico (Nawrath *et al.*, 1995). A síntese em plantas estabeleceria um novo ciclo do carbono para uso comercial, utilizando apenas a luz como fonte de energia para a produção, diminuindo o preço final dos poliésteres biológicos no

mercado internacional e o impacto ao meio ambiente (Poirier *et al.*, 1999). Além disso, as plantas produzem uma grande quantidade de biomassa pela fixação de CO₂ durante a fotossíntese, e não são capazes de degradar PHAs por não apresentarem despolimerases endógenas. A incapacidade de degradação do biopolímero pode representar um reservatório final de carbono não-reciclável (Poirier, 2002). Até o momento, uma grande variedade de PHAs foi sintetizada em plantas transgênicas, incluindo o homopolímero PHB, o co-polímero PHB-co-PHV, assim como diferentes PHA-MCL. A viabilidade comercial da produção de PHAs em plantas dependerá principalmente da quantidade que será produzida, sem afetar diretamente a extração de outros produtos industrialmente importantes como óleos e proteínas (Poirier, 2002). Desta forma, a produção de PHA nestes organismos poderia criar um mercado valioso para a agricultura.

Poirier *et al.* (1992) foram os pioneiros em modificar geneticamente *Arabidopsis thaliana*, introduzindo genes envolvidos na rota metabólica de síntese de PHAs sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S). A biossíntese de isoprenóides forneceu substratos para a ação de duas proteínas de *W. eutropha* expressas no citosol de *Arabidopsis*, uma acetoacetil-CoA redutase (PhaB) e uma PHA-sintase (PhaC). Plantas homozigotas expressando individualmente cada um dos transgenes foram cruzadas, gerando plantas que produziram entre 20 a 100 µg de PHB por grama de peso seco. As plantas que expressaram PHB no citoplasma acumularam 0,1% do seu peso seco neste produto, uma quantidade aproximadamente 200-400 vezes menor do que o acúmulo de ácidos graxos em sementes como canola e soja. Em relação a bactérias recombinantes como *E. coli*, a síntese no citoplasma foi de 800-900 vezes menor do que a naturalmente ocorrente em *W. eutropha* (Poirier *et al.*,

1992). Além da produtividade baixa, as plantas apresentaram um fenótipo atrofiado, sugerindo que o citosol não seria o melhor local para o acúmulo do polímero. Os problemas observados podem ter sido gerados pelo baixo fluxo de acetil-CoA e acetoacetil-CoA no citosol, necessário para a manutenção do metabolismo da planta e para a formação de PHB (Nawrath *et al.*, 1995).

Com o passar dos anos, grande empenho tem sido realizado com o objetivo de sintetizar novos tipos do biopolímero pela mudança em rotas metabólicas de uma variedade de espécies vegetais, com o acúmulo de PHA em diferentes compartimentos celulares como plastídeos (pelo direcionamento de proteínas ou ainda pelo desenvolvimento de plantas transplastômicas) e peroxissomos (Nawarath *et al.*, 1994, 1995; John e Keller, 1996; Hahn *et al.*, 1997, 1999; Mittendorf *et al.*, 1998; Houmiel *et al.*, 1999; Nakashita *et al.*, 1999; 2001; Slater *et al.*, 1999; Valentin *et al.*, 1999; Bohmert *et al.*, 2000; 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Lössl *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2003; Arai *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 2004; Wróbel *et al.*, 2004).

Uma alternativa para contornar a baixa produtividade seria o direcionamento de genes responsáveis pela síntese de PHA aos plastídeos, uma vez que a biossíntese de ácidos graxos e o acúmulo de vários compostos de reserva em plantas ocorrem neste compartimento celular especializado (Possingham, 1980). O fluxo de acetil-CoA nestas organelas é alto, principalmente em tecidos com alta proporção de lipídeos onde há abundância de leucoplastos, estabelecendo um ambiente favorável para a síntese do biopolímero. Os plastídeos, como amiloplastos, poderiam acumular grandes quantidades de amido sem o rompimento da organela, podendo-se esperar um maior número de inclusões de PHA sem afetar a integridade de outros processos fisiológicos (Nawrath *et al.*, 1994, Slater *et al.*, 1999; Valentin *et al.*, 1999; Bohmert *et al.*, 2000). Contudo, as

plantas transgênicas com produção de PHB em cloroplastos apresentaram clorose, e a relação entre quantidade de polímero e crescimento foi inversamente proporcional. Estes resultados mostraram que a produção de PHA em cloroplastos possui um limite no qual existe um limiar seguro de direcionamento de substratos para a rota de síntese de PHA sem afetar o metabolismo da planta, principalmente em relação ao fornecimento de acetil-CoA (Bohmert *et al.*, 2000). Além da baixa produção do copolímero PHB-co-PHV em leucoplastos de canola, as plantas transformadas apresentaram baixa produção de sementes, esterilidade, baixo vigor e morte antes da formação das sementes (Slater *et al.*, 1999; Valentin *et al.*, 1999). Mesmo que o acúmulo de PHB em leucoplastos de sementes de canola (3-8% do peso seco de polímero; Houmiel *et al.*, 1999; Valentin *et al.*, 1999) tenha sido maior do que em cloroplastos de *A. thaliana* (entre 3-4% de peso seco do polímero; Nawrath *et al.*, 1994), e que as sementes tenham germinado normalmente, não se pode ter certeza de quando a produção de PHB começa a interferir no armazenamento de lipídeos e outras proteínas de semente.

Ainda em relação ao direcionamento de genes envolvidos na síntese de PHA em plastídeos, a expressão da enzima 3-hidroxiacil-ACP-CoA-transacilase (PhaG) de *P. putida*, responsável pela conexão entre a síntese de ácidos graxos e a síntese de PHA-MCL em bactérias, juntamente com a PHA-sintase (PhaC1) de *P. oleovorans*, mostrou ser ineficaz para a síntese de PHA-MCL em *A. thaliana* (V. Mittendorf, dados não publicados; Aquin, 2001). A expressão constitutiva de *phaG* de *P. putida* em cloroplastos levou a efeitos severos no crescimento do tecido vegetal, com plantas anãs apresentando folhas pregueadas e um conjunto de sementes bastante reduzido (V. Mittendorf, dados não publicados). A interferência da transacilase com a biossíntese de

ácidos graxos poderia, talvez, explicar o fenótipo observado nas plantas transformadas. Contudo, Romano *et al.* (2005) obtiveram plantas transgênicas de *A. thaliana* produtoras de PHA-MCL (C6-C12) expressando as duas enzimas (PhaG e PhaC1). As plantas acumularam um conteúdo baixo de PHA (0,026% de peso seco em polímero) e apresentaram um fenótipo anormal como retardo no crescimento e ausência de flores. Este resultado, como já mencionado anteriormente, pode ser decorrente da interferência da transacilase no metabolismo de ácidos graxos influenciando na viabilidade celular e regeneração das plantas.

A geração de plantas transplastômicas também mostrou ser uma nova estratégia válida para a produção de PHA (Nakashita *et al.*, 2001; Lössl *et al.*, 2003). Esta tecnologia consiste na transformação do genoma do cloroplasto, chamado de plastoma, e possui diversas vantagens como a expressão de operons na célula vegetal e melhor controle do evento de transformação gênica, já que a integração dos genes é sítio dirigida, além de reduzir os riscos de escape gênico via pólen. A estrutura do plastoma e os mecanismos de regulação e organização gênica são semelhantes aos dos organismos procariotos (Mullet, 1993; Maliga, 2004). Assim, a expressão policistrônica dos genes responsáveis pela síntese de PHB de *W. eutropha* (um operon contendo os genes *phaA*, *phaB* e *phaC*) mostrou o acúmulo do polímero em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.; Nakashita *et al.*, 2001; Lössl *et al.*, 2003). No entanto, mesmo que uma rota metabólica completa tenha sido introduzida no plastoma, a produção foi baixa (1,7% do peso seco da planta) e as plantas apresentaram retardo no crescimento e esterilidade (Lössl *et al.*, 2003). Assim, a geração de plantas transplastômicas para a produção comercial de PHA ainda necessita de muitos ajustes metabólicos.

Os peroxissomos de plantas estão envolvidos em uma série de funções metabólicas incluindo fotorrespiração, detoxificação de espécies reativas de oxigênio e catabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (Olsen, 1998). A β -oxidação e o ciclo do glioxalato participam na quebra de ácidos graxos à acetil-CoA, e na sua conversão a succinato, respectivamente. Muitos anos de pesquisa científica têm sido dedicados para a compreensão dos mecanismos implicados no controle do fluxo de carbono de determinadas rotas metabólicas a fim de tirar proveito de benefícios como o aumento da concentração de amido, lipídios e aminoácidos em tecidos de reserva (Mittendorf *et al.*, 1999). O controle do fluxo de carbono no ciclo da β -oxidação ganhou grande importância por representar um impacto potencial no acúmulo de lipídios em plantas transgênicas de cultivares oleíferas (Eccleston e Ohlrogee, 1998), assim como na produção de PHAs (Poirier, 1999; 2002; Poirier *et al.*, 1999; Mittendorf *et al.*, 1998, 1999; Allenbach e Poirier, 2000; Moire *et al.*, 2004).

A síntese de PHA em peroxissomos não representa apenas um sistema de produção de biopolímeros para a biotecnologia de plantas. A formação polímero pode ser explorada como uma nova ferramenta para o estudo de diversas rotas metabólicas (Poirier, 2002). Até o momento, tem se explorado a expressão de uma PHA-sintase de *P. aeruginosa* em peroxissomos de *A. thaliana* como indicador do fluxo de carbono pela β -oxidação neste compartimento celular (Mittendorf *et al.*, 1998, 1999; Allenbach e Poirier, 2000; Poirier, 2002; Arai *et al.*, 2002; Moire *et al.*, 2004). O PHA encontrado nestas plantas foi sintetizado durante a germinação, e formado de 3-hidroxiácidos saturados e insaturados variando entre 6 e 16 carbonos provenientes dos intermediários da β -oxidação de ácidos graxos derivados de triacilglicerídeos (Mittendorf *et al.*, 1998). A manipulação da composição dos ácidos graxos em plantas, pelo uso de mutantes em

desaturases de ácidos graxos como pelo fornecimento de ácidos graxos no meio de cultura, demonstrou que a composição do PHA reflete a natureza e a quantidade de ácidos graxos que é direcionada pela β -oxidação no peroxissomo (Mittendorf *et al.*, 1999). A coexpressão de uma acil-ACP tioesterase de cadeia média em plantas e uma PHA-sintase demonstrou a presença de um ciclo fútil de ácidos graxos não-usuais de cadeia média (aqueles que não são encontrados na membrana lipídica mas apenas em triacilglicerídeos) que são rapidamente degradados pelo ciclo da β -oxidação em peroxissomos. Assim, a incapacidade de acumular ácidos graxos não-usuais pode ser devido a uma baixa síntese ou a uma baixa eficiência de incorporação em lipídeos, levando a uma rápida degradação em peroxissomos (Poirier *et al.*, 1999, Moire *et al.*, 2004). Desta forma, a produção de PHA tem sido principalmente explorada para acessar a presença de um ciclo fútil de ácidos graxos em plantas transgênicas, e os estudos nesta área ainda deverão continuar contribuindo significativamente para o entendimento da bioquímica vegetal (Poirier, 2002).

1.7.2 Síntese de PHA-MCL na levedura *Saccharomyces cerevisiae*: modelo para o estudo da β -oxidação em peroxissomos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem uma longa história de uso na indústria e na pesquisa em genética e biologia molecular. A combinação de muitas características desejáveis em um único sistema permitiu que esta levedura fosse escolhida como modelo eucariótico para a investigação de diversos processos celulares complexos como ciclo celular, direcionamento de proteínas e secreção, transcrição e metabolismo (Trotter, 2001). Manter linhagens de leveduras em laboratório é fácil, econômico e rápido, considerando-se que o tempo de geração é de aproximadamente noventa minutos, em meio rico. A geração, o isolamento e a análise de linhagens mutantes são

realizados com relativa facilidade, uma vez que as células podem ser multiplicadas no estado haplóide ou diplóide. A complementação fenotípica de várias linhagens mutantes de *S. cerevisiae* é possível pela disponibilidade de uma grande coleção de plasmídeos e bibliotecas genômicas. Os métodos de transformação de leveduras estão disponíveis há mais de uma década (Ausubel *et al.*, 1995), possibilitando o uso deste organismo como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas. Além disso, o seu genoma foi totalmente seqüenciado em 1996 (Goffeau *et al.*, 1996), representando a primeira seqüência completa do genoma de um organismo eucariótico. Diferentes bancos de dados estão acessíveis (*Saccharomyces Genome Database*, *Yeast Proteome Database* e *MIPS Yeast Genome Database*) disponibilizando informações de grande importância dos quadros abertos de leitura (*open reading frames* ou orf) encontrados neste genoma. Em relação a estes bancos de dados, espera-se que para aproximadamente cada gene em *S. cerevisiae* exista um homólogo em outros organismos eucariotos (Goffeau *et al.*, 1996; Botstein *et al.*, 1997).

As células da levedura *S. cerevisiae* são capazes de se multiplicar em uma variedade de fontes de carbono, incluindo ácidos graxos. A adição de ácidos graxos ao meio de cultivo como fonte de carbono e energia ativa a transcrição dos genes envolvidos no processo de β -oxidação que ocorre exclusivamente em peroxissomos neste organismo eucariótico (Veenhuis *et al.*, 1987). Embora a maioria dos genes envolvidos na degradação de ácidos graxos em *S. cerevisiae* já tenha sido identificada com o auxílio da genética clássica, permitindo a caracterização das principais rotas envolvidas, ainda existem questões importantes a serem respondidas em relação à oxidação de ácidos graxos. Entre estas, as principais dúvidas referem-se ao processo auxiliar da degradação, incluindo o transporte de ácidos graxos e seus metabólitos

através das membranas e a regulação de funções celulares pelos ésteres de acil-CoA (Trotter, 2001; Hiltunen *et al.*, 2003).

A levedura *S. cerevisiae* tem a habilidade de degradar ácidos graxos saturados por um processo que requer a atividade de quatro enzimas (hélice da β -oxidação; Figura 9A). O metabolismo é iniciado pela oxidação de acil-CoA em trans- Δ^2 -enoil-CoA pela acil-CoA oxidase codificada pelo gene *FOX1/POX1*, formando peróxido de hidrogênio que é detoxificado pela catalase peroxissomal (Cta1p). A proteína multifuncional (MFE-2) Fox2p/Mfe2p, que possui as atividades de trans- Δ^2 -enoil-CoA hidratase II e (R)-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase específica, produz 3-cetoacil-CoA. Na próxima reação do ciclo da β -oxidação, 3-cetoacil-CoA sofre a ação de uma 3-cetoacil-CoA tiolase (Fox3p/Pot1p) gerando acetil-CoA e acil-CoA encurtada em dois carbonos. Este último intermediário serve novamente de substrato para a Fox1p (Cohen *et al.*, 1985; Dmochowska *et al.*, 1990; Einerhand *et al.*, 1991; Hiltunen *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994).

A levedura *S. cerevisiae* também é capaz de utilizar ácidos graxos insaturados e poli-insaturados contendo ligações duplas nas configurações *cis* ou *trans* como fonte de carbono (Gurvitz *et al.*, 2001). Enquanto os ácidos graxos saturados (Figura 9A) e insaturados contendo uma ligação dupla *trans* em carbonos pares podem ser totalmente degradados pelas enzimas da hélice da β -oxidação (Figura 9B), os demais ácidos graxos insaturados (ligação dupla *trans* ou *cis* em carbonos ímpares e *cis* em carbonos pares) requerem a ação de enzimas auxiliares (Figura 9C e D, respectivamente). A combinação das proteínas auxiliares com as principais enzimas da β -oxidação permite que o processo de degradação de ésteres de enoil-CoA poli-insaturados prossiga por rotas alternativas (Gurvitz *et al.*, 2001; Hiltunen *et al.*, 2003).

A degradação de ácidos graxos contendo dupla ligação *cis* em um carbono par como o ácido petrosílico (18:1 Δ^6 *cis*) gera um intermediário 2-*trans*,4-*cis*-dienoil-CoA que é convertido pela enzima 2,4-dienoil-CoA redutase (Sps19p; Gurvitz *et al.*, 1997) em 3-*trans*-enoil-CoA. Este éster de enoil-CoA é, então, metabolizado a 2-*trans*-enoil-CoA pela Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase (Eci1p; Geisbrecht *et al.*, 1998; Gurvitz *et al.*, 1998), sendo este último intermediário um substrato trivial do ciclo da β -oxidação (Figura 9B).

Em mamíferos e leveduras, a degradação de ácidos graxos que possuem uma ligação dupla *cis* em um carbono ímpar como o ácido oléico (18:1 Δ^9 *cis*) resulta na formação do intermediário 2-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA que pode ser metabolizado por três rotas distintas (Figura 9C; Tserng e Jin, 1990; Smeland *et al.*, 1992; Geisbrecht *et al.*, 1998; Shourky e Schulz, 1998; Gurvitz *et al.*, 1998, 1999; Ren e Schulz, 2003). Uma das rotas envolve uma etapa adicional da hélice de β -oxidação para formar 3-*cis*-enoil-CoA que é convertida a 2-*trans*-enoil-CoA pela enzima Eci1p (rota dependente de isomerase). Como forma alternativa, o intermediário 2-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA pode ser metabolizado a 3-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA pela Eci1p, que é convertida a 2-*trans*,4-*trans*-dienoil-CoA pela enzima $\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienoil-CoA isomerase (di-isomerase; Dci1p). Este último substrato pode ser metabolizado por duas vias distintas. Uma delas, chamada de rota dependente de redutase, converte 2-*trans*,4-*trans*-dienoil-CoA a 2-*trans*-enoil-CoA pela ação seqüencial de Sps19p e Eci1p. A outra possibilidade, rota dependente de di-isomerase, permite a entrada direta de 2-*trans*,4-*trans*-dienoil-CoA na hélice da β -oxidação pela ação da enzima multifuncional Fox2p (Gurvitz *et al.*, 1999).

As ligações duplas encontradas na maior parte dos ácidos graxos insaturados está na conformação *cis*. Contudo, alguns alimentos como carnes, leite e margarina podem

conter ácidos graxos na configuração *trans* devido ao metabolismo enzimático de microrganismos que habitam o aparelho gastrointestinal de ruminantes, ou pela hidrogenização parcial de algumas graxas e óleos vegetais durante o processo industrial (Sinclair, 1990). A degradação de ácidos graxos insaturados com ligação dupla *trans* posicionada em carbonos pares (Figura 9B) gera um intermediário do tipo *2-trans,4-trans*-dienoil-CoA que pode entrar em duas rotas metabólicas distintas. Na rota dependente de redutase, existe a geração de *3-trans*-enoil-CoA pela enzima *2,4-enoil-CoA* redutase (Sps19p) e, finalmente, a produção de *2-trans*-enoil-CoA pela Eci1p para ser metabolizada pelas enzimas principais da β -oxidação (Smeland *et al.*, 1992). Existe ainda a possibilidade de *2-trans,4-trans*-dienoil-CoA sofrer a ação direta da atividade da enoil-CoA hidratase II pertencente à enzima multifuncional MFE-2 e, posteriormente, *3-hidroxi,4-trans*-enoil-CoA ser degradada pelas demais enzimas da hélice de β -oxidação (rota dependente direta de MFE; Cuebas e Schulz, 1982; Shourky e Schulz, 1998; Gurvitz *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2005) sem a necessidade de proteínas auxiliares. No entanto, a ação da enzima Eci1p é indispensável para o metabolismo de ácidos graxos com ligação dupla *trans* posicionada em carbonos ímpares, uma vez que a molécula *3-trans*-enoil-CoA é gerada (Figura 9C, ilustrando-se apenas a rota dependente de isomerase).

A síntese de PHA-MCL em *S. cerevisiae* e *Picchia pastoris* tem sido demonstrada pela expressão, no peroxissomo, de diferentes PHA-sintases como as derivadas de *P. aeruginosa* (Poirier *et al.*, 2001; 2002; Marchesini e Poirier, 2003; Marchesini *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2005), *A. caviae* e *W. eutropha* (Oliveira *et al.*, 2004). Contudo, o acúmulo de PHA-MCL em células de leveduras foi semelhante ao obtido em plantas, mas muito baixo quando comparado ao de bactérias, atingindo o

máximo de 0,45% do peso seco celular. Desta forma, como a síntese de PHA é um indicador importante do fluxo de ácidos graxos que percorre a β -oxidação, ao invés de visualizar apenas o lado comercial da produção do biopolímero em leveduras, alguns trabalhos de produção de PHA em leveduras estão elucidando diferentes aspectos da

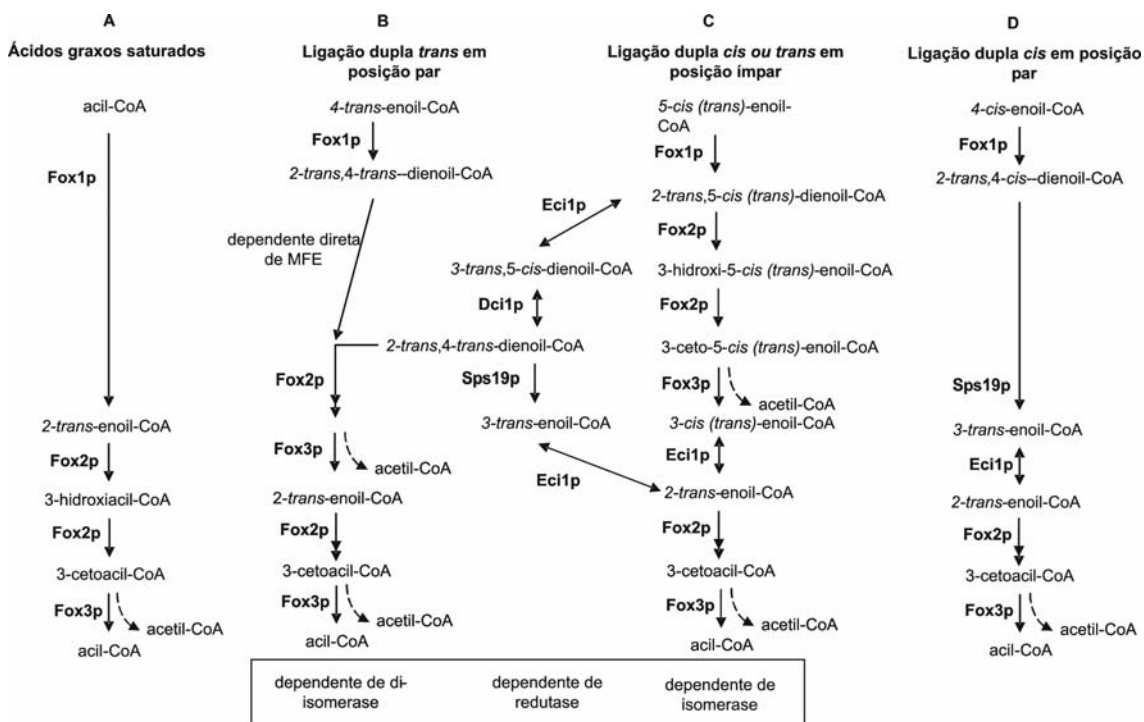


Figura 9. Metabolismo da β -oxidação em *S. cerevisiae*: diferentes vias para a degradação de ácidos graxos saturados e insaturados. A. Hélice da β -oxidação de ácidos graxos saturados; B. β -Oxidação de ácidos graxos insaturados com ligação dupla *trans* em carbonos pares. As duas rotas possíveis: dependente direta de MFE e dependente de redutase; C. β -Oxidação de ácidos graxos insaturados com ligação dupla *cis* ou *trans* em carbonos ímpares, demonstrando as três rotas possíveis para *cis* (dependente de di-isomerase, dependente de redutase, e dependente de isomerase), e uma para *trans* (apenas dependente de isomerase). D. β -Oxidação de ácidos graxos insaturados com ligação dupla *cis* em carbonos pares. As enzimas da hélice são: Fox1p (acil-CoA oxidase), Fox2p (2-enoil-CoA hidratase II e (R)-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase), Fox3p (3-cetoacil-CoA tiolase). As enzimas auxiliares são: Eci1p (Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase), Sps19p (2,4-dienoil-CoA redutase) e Dci1p ($\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienoil-CoA isomerase). Em Fox2p, a seta dupla representa os dois passos da enzima (hidratase e desidrogenase). Adaptado de Gurvitz *et al.* (1999 e 2001) e Robert *et al.* (2005).

degradação de ácidos graxos no peroxissomo, principalmente no que diz respeito às enzimas e rotas preferenciais envolvidas neste metabolismo e a manipulação de suas enzimas para a modificação da composição do PHA-MCL.

A utilização de mutantes nas enzimas acil-CoA oxidase (*fox1Δ0*) e MFE-2 (*fox2Δ0*) de *S. cerevisiae* mostrou que a produção de PHA-MCL neste organismo é resultado da polimerização do intermediário R-3-hidroxiacil-CoA gerado pelo ciclo da β-oxidação. Isto é corroborado pelo fato de que nestes mutantes não há síntese do polímero, já que as duas primeiras enzimas da via de degradação de ácidos graxos (Fox1p e Fox2p) são necessárias para a formação do substrato da PHA-sintase de *P. aeruginosa* (C6-C14; Marchesini e Poirier, 2003). Como em *A. thaliana*, a composição do PHA em leveduras é diretamente influenciada pela natureza dos ácidos graxos adicionados ao meio de cultivo (Poirier *et al.*, 2001, 2002). Desta forma, a adição de ácido oléico (18:1Δ9*cis*) na cultura de linhagens selvagens resulta em um polímero composto apenas por monômeros com um número par de carbonos (H6:0, H8:0, H10:0, H12:0, H14:1 e H14:0; H representa o monômero seguido do número de átomos de carbono insaturados), enquanto que o crescimento em ácido Δ10*cis*-heptadecenóico resulta em um PHA formado principalmente por monômeros de cadeia ímpar (H5:0, H7:0, H9:0, H11:0 e H13:1; Poirier *et al.*, 2001; Poirier, 2002).

A composição do PHA em mutantes para a enzima 3-cetotiolase (*fox3Δ0*; H6:0, H8:0, H10:0 e H12:0) mostrou que o substrato para a síntese não era proveniente dos ácidos graxos do meio de cultura e, sim, de ésteres de acil-CoA derivados de ácidos graxos intracelulares, indicando a liberação prematura de ácidos graxos de cadeia curta e média do complexo da ácido graxo sintase (complexo FASI; Marchesini *et al.*, 2003). Estes mutantes não deveriam produzir PHA em meio contendo ácido oléico, já que

apenas 3-hidroxi-decaoctanoil-CoA pode ser formada, e este não é substrato para a PHA-sintase. Da mesma forma, o substrato para a síntese do polímero em linhagens selvagens crescidas em carboidratos (H6:0, H8:0, H10:0 e H12:0) também foi resultado de um ciclo fútil, onde intermediários de cadeia curta e média provenientes da via biossintética citoplasmática de ácidos graxos são direcionados diretamente para a β -oxidação peroxissomal de maneira substancial. Isto é bastante evidente pelo fato do PHA nestas cepas não ser formado por monômeros que poderiam indicar a degradação de ácidos graxos que compõem mais de 98% da célula durante a fase estacionária e exponencial do crescimento (ácidos palmitoléico, oléico, palmítico e esteárico), enquanto que aqueles ácidos graxos com ≤ 14 carbonos representam menos de 2%. Assim, a presença de um ciclo fútil de ácidos graxos de cadeia curta e média em leveduras poderia indicar que a liberação destas acil-CoAs do complexo FASI *in vivo* é consideravelmente maior do que indicam os experimentos *in vitro* ou a composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios de *S. cerevisiae* (Marchesini e Poirier, 2003).

Variantes da MFE-2 peroxissomal de *S. cerevisiae* contendo diferentes atividades de R-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase foram utilizados para modificar a composição do polímero PHA-MCL (Marchesini *et al.*, 2003). O mutante MFE-2(a Δ) possui uma mutação pontual que inativa o domínio A da desidrogenase, retendo ainda uma ampla afinidade para R-3-hidroxiacil-CoAs de comprimento de cadeia curta (C4), média (C10) e longa (C16), enquanto que MFE-2(b Δ) apresenta uma mutação que inativa o domínio B da enzima, perdendo a capacidade de aceitar R-3-hidroxiacil-CoAs de comprimento de cadeia curta (Qin *et al.*, 1999). Mutantes *fox2*($\Delta 0$), expressando a PHA-sintase de *P. aeruginosa* direcionada ao peroxissomo, não são capazes de sintetizar PHA-MCL. A complementação do fenótipo mutante com o plasmídeo

contendo a MFE-2 selvagem [*fox2*($\Delta 0$):MFE-2] permitiu o acúmulo do polímero quando as células foram multiplicadas em meio de cultura contendo ácido oléico (18:1 $\Delta 9cis$) ou ácido $\Delta 10cis$ -heptadecenóico. Estas cepas sintetizaram um polímero contendo monômeros de cadeia par quando cultivadas em ácido oléico (H6, H8, H10, H12, H14:1 e H14), ou ímpar em ácido $\Delta 10cis$ -heptadecenóico (H5, H7, H11 e H13:1). A transformação de cepas *fox2*($\Delta 0$) com os vetores contendo MFE-2(a Δ) [*fox2*($\Delta 0$):MFE-2(a Δ)] resultou na formação de um polímero com a mesma composição da linhagem *fox2*($\Delta 0$): MFE-2. Em contraste, a expressão de MFE-2(b Δ) em células *fox2*($\Delta 0$) [*fox2*($\Delta 0$): MFE-2(b Δ)] resultou em um substancial aumento na proporção de 3-hidroxiácidos de cadeia curta, tanto em ácido oléico quanto em ácido $\Delta 10cis$ -heptadecenóico, sem afetar bruscamente a quantidade total de PHA. O desvio a favor de 3-hidroxiacil-CoAs de cadeia curta é de se esperar nas linhagens *fox2*($\Delta 0$): MFE-2(b Δ), já que as mesmas não são capazes de utilizar com eficiência monômeros de cadeia mais longa no ciclo da β -oxidação. A maior concentração dos intermediários mais curtos aumenta a sua disponibilidade para a PHA-sintase (Marchesini *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004). Este modelo de maior acesso às 3-hidroxiacil-CoAs de cadeia curta demonstra que a utilização de mutantes na MFE-2 pode modificar consideravelmente as propriedades cinéticas desta enzima para controlar os intermediários que estão entrando no ciclo da β -oxidação peroxissomal de *S. cerevisiae*.

Como método alternativo para monitorar a degradação de ácidos graxos no peroxissomo, a produção de PHA em *S. cerevisiae* foi utilizada para analisar a β -oxidação de ácidos graxos com ligação dupla na forma *trans* ou *cis* em carbonos pares (Robert *et al.*, 2005). Por uma questão de abundância na natureza, a maioria dos autores focou seus trabalhos na degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados. No entanto, os

trans-insaturados são amplamente consumidos na dieta alimentar na forma de carnes, margarinas e derivados do leite, elevando os riscos de doenças do coração (Stender e Dyerberg, 2004).

A degradação dos ácidos Δ^{10} *cis*-heptadecenóico e Δ^{10} *trans*-heptadecenóico foi analisada em diferentes cepas simples- e duplo-mutantes dos genes *Eci1*, *Dci1* e *Sps19* de *S. cerevisiae*. A síntese de PHA em células cultivadas em meio contendo o ácido Δ^{10} *cis*-heptadecenóico foi dependente da presença das atividades das enzimas 2,4-dienoil-CoA redutase (*Sps19p*) e Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerase (*Eci1p*). Enquanto a quantidade e a composição do polímero em mutantes *dci1* Δ não foram diferentes das observadas em cepas selvagens (em torno de 0,5%), a síntese de PHA foi drasticamente reduzida em cerca de 100 vezes no mutante *eci1* Δ , enquanto que em *sps19* Δ , praticamente nenhum polímero foi detectado. Da mesma forma, não foi observada qualquer produção de PHA nas cepas duplo-mutantes *eci1* Δ *dci1* Δ , *eci1* Δ *sps19* Δ e *dci1* Δ *sps19* Δ . O drástico decréscimo na síntese de PHA observado nos mutantes *eci1* Δ e *sps19* Δ multiplicados em ácido Δ^{10} *cis*-heptadecenóico confirma a necessidade destas enzimas auxiliares para uma eficiente degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados com a dupla ligação em carbonos pares. Aparentemente, a enzima *Dci1p* não desempenha um papel importante na degradação destes ácidos graxos como havia sido proposto por outros autores, visto que a sua ausência (mutantes *dci1* Δ) não afetou a quantidade nem a composição do polímero quando comparados à linhagem selvagem. Contudo, mesmo que tenha existido uma diminuição no acúmulo de PHA nas células *eci1* Δ , isto revelou que a enzima *Dci1p* possui uma função, mesmo que discreta, na degradação destes ácidos graxos *in vivo* (Robert *et al.*, 2005).

Nesse mesmo trabalho, os autores avaliaram a degradação do ácido Δ^{10} *trans*-heptadecenóico nas mesmas linhagens celulares (Robert *et al.*, 2005). Estudos anteriores mostraram que a degradação de intermediários 2-*trans*,4-*trans*-enoil-CoA podem ser metabolizados *in vitro* pela ação direta das enzimas da hélice da β -oxidação em mitocôndrias de mamíferos (Cuebas e Schulz, 1982; Shourky e Schulz, 1998). A análise do conteúdo de PHA no mutante *sps19* Δ confirmou que a degradação *in vivo* de ácidos graxos *trans*-insaturados pode ocorrer diretamente pela via MFE. Embora o ácido Δ^{10} *trans*-heptadecenóico possa ser exclusivamente degradado pela via dependente direta de MFE, a diminuição de cerca de 15-20% do conteúdo de PHAs em células *sps19* Δ , *ecil* Δ *sps19* Δ e *dcil* Δ *sps19* Δ em relação às selvagens, revelou que o fluxo de carbono através do ciclo da β -oxidação é significativamente reduzido na ausência de uma rota dependente de redutase. Assim, em cepas selvagens, Sps19p e Fox2p estariam competindo pelo metabólito 2-*trans*,4-*trans*-enoil-CoA. No entanto, a redução na síntese da polímero em linhagens *sps19* Δ comparada à selvagem indica que a via dependente direta de MFE não é capaz de compensar totalmente a ausência de Sps19p para manter o fluxo pela β -oxidação (Robert *et al.*, 2005).

II - OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Muitas áreas da biologia de eucariotos têm sido imensamente influenciadas pela utilização da *S. cerevisiae* como organismo modelo. O fato de muitos processos celulares serem fisiologicamente conservados entre diferentes eucariotos, combinados às potentes ferramentas genéticas e moleculares disponíveis para *S. cerevisiae*, faz desta levedura um valioso sistema pelo qual se tem a oportunidade de entender como rotas metabólicas podem ser modificadas para a biossíntese de PHAs em eucariotos, incluindo plantas. Desta forma, pelo presente trabalho, temos como objetivo principal analisar a produção do polímero PHA em cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de expressar *phaC1_{Pa}* e *phaG_{Pa}* de *P. aeruginosa*, além de avaliar a contribuição *in vivo* das enzimas auxiliares envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos insaturados em peroxissomos.

2.2 Objetivos específicos

1. Transformar linhagens celulares da levedura *S. cerevisiae* com os genes *phaC1_{Pa}* (PHA-sintase de classe II) e da *phaG_{Pa}* (3-hidroxicil-ACP-CoA-transacilase) de *P. aeruginosa* clonados em vetores plasmidiais simples-cópia.

1a. Analisar o conteúdo do polímero biodegradável PHA nas cepas recombinantes co-expressando *phaC1_{Pa}* (citoplasma ou peroxissomo) e *phaG_{Pa}* (citoplasma) multiplicadas em ácido oléico ou rafinose;

1b. Verificar a possibilidade da enzima 3-hidroxicil-ACP-CoA-transacilase realizar a conexão entre a biossíntese de ácidos graxos e a síntese de PHA em células

recombinantes de *S. cerevisiae*, tal como é observado em bactérias do gênero *Pseudomonas*;

1c. Estabelecer se existe diferença no conteúdo dos monômeros que formam o polímero PHA quando a expressão de *phaG*_{Pa} ocorrer juntamente com uma PHA-sintase direcionada ao peroxissomo ou que permaneça no citoplasma.

2. Avaliar a contribuição das enzimas auxiliares da β -oxidação (*Eci1p*, *Sps19p* e *Dci1p*) na degradação do ácido rumênico (ácido linoléico conjugado; CLA; ácido 9-*cis*,11-*trans*-octadecenóico) em *S. cerevisiae* pela expressão da PHA-sintase de *P. aeruginosa* (*phaC1*_{Pa}) modificada para o envio ao peroxissomo.

2a. Analisar a composição do polímero PHA formado em linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* com *phaC1*_{Pa} (cepas selvagens e mutantes nulos para as enzimas auxiliares da β -oxidação) quando as células forem cultivadas em meio contendo ácido rumênico.

3. Estudar a contribuição *in vivo* das enzimas *Eci1p*, *Sps19p* e *Dci1p* na degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados utilizando o PHA como indicador do fluxo de carbono pela β -oxidação peroxissomal de *S. cerevisiae* em linhagens expressando *phaC1*_{Pa}.

3a. Utilizar uma cepa selvagem e o mutante nulo *dci1* Δ de *S. cerevisiae* para analisar a composição do PHA quando as células forem multiplicadas em meio de cultivo contendo o ácido 10-*cis*,13-*cis*-nonadecenóico;

3b. Construir vetores plasmidiais multi-cópia para a expressão dos genes *ECI1*, *SPS19* e *DCI1* nos peroxissomos de *S. cerevisiae* em linhagens recombinantes para o gene *phaC1*_{Pa}, e verificar se o fluxo de carbono que percorre a β -oxidação pode ser

influenciado pelo aumento da transcrição dos genes nesta organela, além de verificar a contribuição de cada uma das rotas na degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados em um carbono ímpar.

Capítulo I

Expression of polyhydroxyacyl PHA synthase (*phaC1_{Pa}*) and 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transacylase (*phaG_{Pa}*) in *Saccharomyces cerevisiae* does not establish the connection between fatty acid biosynthesis (FAB) and MCL-PHA production

Applied and Environmental Microbiology (a ser submetido)

Expression of polyhydroxyacyl PHA synthase (*phaC1_{pa}*) and 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transacylase (*phaG_{pa}*) in *Saccharomyces cerevisiae* does not establish the connection between fatty acid biosynthesis (FAB) and MCL-PHA production

Heique Marlis Bogdawa¹, Yves Poirier² and João Antonio Pêgas Henriques¹#

¹Laboratório de Radiobiologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Prédio 43421, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Département de Biologie Moléculaire Végétale, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

Corresponding author: João Antonio Pêgas Henriques

Tel: +55 51 33 16 6069

Fax: +55 51 33 16 6073

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, polyhydroxyalkanoates, PHA synthase, 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transacylase

Most fluorescent pseudomonads belonging to rRNA homology group I produce polyhydroxyalkanoates (PHA) consisting of 3-hydroxy fatty acids ranging from 6 to 14 carbons (MCL-PHA). *De novo* fatty acid biosynthesis (FAB) is the main route supplying intermediates for MCL-PHA production during growth on non-related carbon sources such as gluconate, ethanol or acetate, and the enzyme responsible for this connection in pseudomonads is 3-hydroxydecanoyl-ACP-CoA-transacylase (PhaG). Recombinant *S. cerevisiae* strains coexpressing PHA (PhaC1_{pa}) synthase and PhaG_{pa} isolated from *Pseudomonas aeruginosa* were not able to increase PHA synthesis or 3-hydroxydecanoyl content when cultivated either on raffinose or on oleic acid. The transacylase-mediated PHA biosynthesis could not be established in *S. cerevisiae* probably due to a missing enzymatic step in such a non-natural PHA producing host that not can use FAB derivates to produce PHA.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters of 3-hydroxyalkanoic acids that are produced as intracellular granules by many different bacteria. Most of the bacteria accumulate PHA as carbon and energy storage if a carbon source is provided in excess and if another nutrient, such as nitrogen, phosphate, magnesium, potassium or oxygen is scarce (1, 7). Meanwhile, approximately 150 hydroxyalkanoic acids are known to occur as constituents of PHA and, depending on the monomer composition, they can change physical properties, ranging from stiff and brittle plastics to softer plastics, elastomers, rubbers and glues (31). PHAs are considered good candidates for biodegradable plastics since they possess material properties similar to those of synthetic plastic polymers currently in use and are completely biodegradable after disposal (13). However, one of the main limitations for the commercial use of PHA biopolymers is their relatively high production costs in bacterial fermenters compared with polyethylene, a petrochemical-derived plastic. Efforts have been made to use metabolic engineering to synthesize PHA in recombinant eukaryotes such as plants and yeasts (3, 14, 19, 21-25). Direct synthesis of PHA has been extensively demonstrated in genetically engineered crop plants as a promising alternative to decrease costs in polymer production. Nevertheless, synthesis in plants, as well as in yeasts, still has to be enhanced and much remains to be elucidated in the metabolic network involved in the improvement of yield and the monomer composition of eukaryotic hosts.

Fluorescent pseudomonads belonging to rRNA homology group I produce PHAs consisting of 3-hydroxyalkanoic acids with carbon chain lengths ranging from 6 to 14 carbon atoms (medium-chain-length or MCL-PHA; 11). MCL-PHA is suitable for applications in which flexibility in elasticity is required such as biocompatible materials

for medical purposes, or for chiral R-3-hydroxycarboxylic acids, and environmentally friendly coatings and paintings (26, 30, 34, 36).

At least three different metabolic routes are found in pseudomonads for the synthesis of 3-hydroxyacyl coenzyme A thioesters, which are polymerized by the PHA synthase (PhaC; 4, 27, 33). (i) β -Oxidation is the main pathway observed when cells are grown on fatty acids; (ii) fatty acid biosynthesis (FAB) is an important alternative route when non-related carbon sources are metabolized to acetyl-CoA like gluconate, sucrose, acetate or ethanol; (iii) chain elongation reaction, in which acetyl-CoA moieties are condensed to 3-hydroxyacyl-CoA, is involved in MCL-PHA production during growth on hexanoate. The 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-hydroxyacyl transacylase (PhaG) has been identified in nine *Pseudomonas* species including *P. putida* and *P. aeruginosa*, this enzyme being responsible for the connection between FAB and PHA production during cultivation on non-related carbon sources (8, 10, 17, 27). PhaG catalyzes the reversible transfer of the R-3-hydroxydecanoyl moiety from the ACP thioester to the acyl carrier protein (ACP; 27), and this *in vivo* transfer has not been described for any other type of transacylase (9). In the present communication, we report the failure in establishing the link between *de novo* FAB and the production of MCL-PHA in recombinant *S. cerevisiae* coexpressing a PHA synthase (PhaC_{1Pa}) directed to the peroxisomes or cytoplasm and 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transacylase (PhaG_{Pa}) from *P. aeruginosa*.

Two distinct *phaC*_{1Pa} DNA constructs were used. The gene was modified either at the N-termini by using oligonucleotides that added the first 16 amino acids derived from the *S. cerevisiae* peroxisomal 3-ketothiolase protein (*FOX3*), which harbors a peroxisomal

targeting sequence (PTS2), or was directly amplified from *P. aeruginosa* without further modification. The *phaG_{Pa}* open reading frame was also amplified by PCR from *P. aeruginosa* DNA. All three genes were cloned separately into the yeast centromeric plasmids p415GPD or p416GPD (18), which contain the constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (GPD) and the cytochrome-*c* oxidase terminator (CYC1), resulting in the constructs p415GPD:PTS2PHAC_{Pa}, p415GPD:PHAC_{Pa} and p416PHAG_{Pa}. The vectors were sequenced and transformed by the lithium acetate procedure (5) into the *S. cerevisiae* wild-type strain BY4742 (*matΔ his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) obtained from EUROSCARF (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>). Resulting strains contained a unique PHA synthase gene (directed to the peroxisome or cytoplasm, PTS2PHAC_{Pa} and CyPHAC_{Pa}, respectively), or a combination of different PHA synthases and the *phaG_{Pa}* gene (PTS2PHAC_{Pa}/PHAG_{Pa} and CyPHAC_{Pa}/PHAG_{Pa}). For PHA synthesis, cells were grown in selective medium containing 0.1% (v/v) oleic acid (18:1Δ9*cis*) or 3% (w/v) raffinose, and the polymer was analyzed as formerly described (24).

The quantity and monomer composition of the strains used in this study are summarized in Table 1. Synthesis of PHA in cells grown on oleic acid expressing the PHA synthase targeted to the peroxisome (PTS2PHAC_{Pa}) resulted in the formation of a polymer composed by even-chain monomers from 6 to 14 carbons, namely H6:0, H8:0, H10:0, H12:0, H14:1, H14:0 (3-hydroxy acid monomers are represented with the prefix H, followed by the numbers of carbons and unsaturated bonds). This result is in agreement with the β-oxidation of fatty acids having a *cis*-unsaturated bond at an odd-numbered position (6), and with MCL-PHA synthesized in recombinant *S. cerevisiae* expressing

the PHA synthase from *P. aeruginosa* in the peroxisomes (24, 15, 16). The same monomer composition was observed when cells were cultured on raffinose-containing medium, even though 3-hydroxy acids with 14 carbons were not detected, supporting the idea that R-3-hydroxyacyl-CoAs are derived from intracellular fatty acids in cells grown on carbohydrates as main carbon source, in order to feed the PHA synthase (15). The quantity of accumulated PHA in oleic acid- or raffinose-fed cells was not significantly different. Although monomer composition was the same either on oleic acid or raffinose among cells expressing *phaC1_{Pa}* limited to the cytoplasm, PHA content was 10 to 20 times lower than the polymer produced in peroxisomes. It has been demonstrated that cytoplasmatic expression of the *Wausteria eutropha* PHA synthase (PhaC_{We}) in *S. cerevisiae* led to the production of 0.5% of the cell dry-weight as polyhydroxybutyrate. Wild-type cells exhibited native enzyme activities of R-3-hydroxy-CoA dehydrogenase and acetoacetyl-CoA thiolase which, together with PHAC_{We}, were shown to allow the synthesis of PHA composed of C4 to C6 3-hydroxyacids in recombinant strains (12). The decrease in PHA accumulation found in the CyPHAC_{Pa} strain compared to cells expressing a PHA synthase from *W. eutropha* could be explained by a lower turnover of 3-hydroxyacyl-CoA thioesters composed of 6 to 14 carbons in this cell compartment. Yeast cells solely expressing 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-hydroxyacyl transacylase did not accumulate PHA. Thus, as described for *P. putida* PhaG_{Pp} mutants cultivated under non-limited nitrogen conditions (27), PHAG_{Pa} does not exhibit a PHA synthase activity.

3-Hydroxyacyl-ACP intermediates provided by FAB are presumably the substrates for PHA production. Since these ACP intermediates could not be polymerized by the PHA

synthase, there must be a metabolic way to either directly transesterify them to the corresponding CoA derivatives or to transfer them to CoA thioesters by the combination of a thioesterase and a thiokinase (27). The malonyl-CoA-ACP-transferase, which catalyzes the transfer of the malonyl moiety from CoA to ACP, is one example of well-characterized transacylase (35). Since no homologous gene to *phaG* exists in the *E. coli* genomic DNA (2), this bacterium might employ the malonyl-CoA-ACP-transferase enzyme (FabD), besides 3-ketoacyl-ACP synthase III (FabH), in a similar manner as PhaG to supply 3-hydroxyacyl-CoA from 3-hydroxyacyl-ACP intermediate in the FAB cycle to synthesize PHA from sugars when these genes are overexpressed (20, 32). However, functional heterologous expression of *P. putida* PhaG_{Pp} and PhaC1_{Pa} in *E. coli* JM109 did not lead to PHA accumulation when cells were grown on glucose (27).

In order to verify if the FAB cycle could supply intermediates for PHA production in eukaryotic model organisms, we coexpressed the *phaC1_{Pa}* and *phaG_{Pa}* genes from *P. aeruginosa* in *S. cerevisiae*. Although MCL-PHA could be detected in strains harboring the PhaC1_{Pa} directed to peroxisomes or cytoplasm, both PHA quantity and monomer composition were the same when PhaG_{Pa} was coexpressed (PTS2PHAC_{Pa}/PHAG_{Pa} and CyPHAC_{Pa}/PHAG_{Pa} strains, respectively), independently of the carbon source on which cells were cultivated. Since it has been shown that *P. aeruginosa* PhaG_{Pa} has substrate specificity for 3-hydroxydecanoyl-ACP intermediates (8), we expected a higher H10:0 monomer content in PHA synthesized by the CyPHA_{Pa}/PHAG_{Pa} strain. If changes in this monomer fraction and PHA quantity would be observed within cells accumulating the polymer in peroxisomes (PTS2PHAC_{Pa}/PHAG_{Pa} strain), then they could reveal the direct influence of PHAG_{Pa} transacylase activity by increasing the R-3-

hydroxydecanoyl-CoA flux into these organelles. Although only one study has reported MCL-PHA production in higher plants coexpressing PhaC_{Po} and PhaG_{Pp} from *P. oleovorans* and *P. putida*, respectively (29), the authors were very careful in suggesting that the polymer accumulated in potato transgenic plants established for the first time a possible route for MCL-PHA from FAB in plants.

The failure in producing MCL-PHA in recombinant *S. cerevisiae* coexpressing PhaC1_{Pa} and PhaG_{Pa} might be explained by the fact that, in yeast, the Fatty Acid Synthase is a multifunctional polypeptide (FASI), in which each FAB reaction is catalyzed by a distinct domain, while in plants and prokaryotes, FAS has several individual monofunctional polypeptides (FASII; 28). As a multifunctional enzyme in *S. cerevisiae*, it might be possible that PhaG_{Pa} could not access efficiently the R-3-hydroxyacyl-ACPs generated by FAB cycle to transesterify them into CoA thioesters, precluding PHA synthesis. We can not rule out the possibility that PhaG_{Pa} is not functional in *S. cerevisiae* or that constitutive expression of *phaG_{Pa}* in *S. cerevisiae* prevents FAB, although we did not observe a decrease in the final weight of cell biomass in PhaG_{Pa}-overexpressing strains.

It has been reported that the transacylase-mediated PHA biosynthesis pathway from non-related carbon sources could be established in recombinant *E. coli* harboring *phaG_{Pp}* and *phaC1_{Pa}* genes when triclosan, a specific inhibitor for the enoyl-ACP reductase (FabI), was added to the culture medium (27). In *W. eutropha*, a naturally PHA producing bacterium, MCL-PHA production was achieved by the heterologous

expression of *Pseudomonas* sp. 61-3 PhaG_{Ps} and PhaC_{Ps} in *W. eutropha* PHA-negative mutants grown on sugars (17).

In this study, we demonstrated that MCL-PHA production was not possible in recombinant *S. cerevisiae* using intermediates of *de novo* FAB through the expression of *P. aeruginosa* PHA synthase (*phaC1_{Pa}*) and 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transacylase (*phaG_{Pa}*). We believe that in non-natural PHA producing hosts such as *S. cerevisiae*, the flux of intermediates through FAB may not be sufficient or is impaired to supply monomers to PHA synthesis. A crucial enzymatic step that PhaG activity not can restore might be missing in such organisms to increase polymer accumulation in *S. cerevisiae* cultivated on non-related carbon sources.

This research was funded by the Brazilian agencies FAPERGS, CNPq, as well as a fellowship from the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to HMB. This work was also supported by Etat de Vaud, Université de Lausanne, and a grant from the Fonds National Suisse (grant # 31-61731.00) and the Herbette Foundation to YP. The authors are very grateful to Dr. Giancarlo Pasquali and Dr. Diego Bonatto for critical reading of the manuscript.

References

1. **Anderson, A.A. and E.A. Dawes.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
2. **Blattner, F.R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
3. **Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawarath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R.N. and L. Willmitzer.** 2000. Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta* **211**: 841-845.
4. **Fiedler, S., Steinbüchel, A. and B.H.A. Rehm.** 2000. PhaG-mediated synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**:2117-2124.
5. **Gietz, D., St Jean, A., Woods R.A. and R.H. Schiestl.** 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.* **20**:1425.
6. **Gurvitz, A., Mursula, A.M., Yagi, A.I., Hartig, A., Ruis, H., Rottensteiner, H. and J.K. Hiltunen.** 1999. Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the β -oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**:24514-24521.
7. **Hankermeyer, C.R. and R.S Tjeerdema.** 1999. Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **159**:1-24.

8. **Hoffmann, N., Steinbüchel, A. and B.H.A. Rehm.** 2000. The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:253-259.
9. **Hoffman, N., Amara, A.A., Beermann, Br. B., Qi, Q., Hinz, J.-J. and B.H.A. Rehm.** 2002. Biochemical characterization of *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid *de novo* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**:42926-42936.
10. **Hoffmann, N., Steinbüchel, A. and B.H.A. Rehm.** 2002. Homologous functional expression of cryptic *phaG* from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:665-670.
11. **Huisman, G.W., de Leeuw, O., Eggink, G and B. Witholt.** 1989. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **8**:1949-1954.
12. **Leaf, T.A., Peterson, M.S., Stoup, S.K., Somers, D. and F. Scienc.** 1996. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. *Microbiology* **5**:1169-1180.
13. **Lee, S.Y.; Choi, J.-IL. and H.H. Wong.** 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *Intern. J. Biol. Macromol.* **25**:31-36.
14. **Lössl, A., Eibl, C., Harloff, H.-J., Jung, C. and H.-U. Koop.** 2003. Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of

- polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep.* **21**:891-899.
15. **Marchesini, S. and Y. Poirier.** 2003. Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal β -oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Biochem.* **278**:32596-32601.
16. **Marchesini, S., Erard, N., Glumoff, T., Hiltunen, J.K. and Y. Poirier.** 2003. Modification of the monomer composition of polyhydroxyalkanoate synthesized in *Saccharomyces cerevisiae* expressing variants of the β -oxidation-associated multifunctional enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**:6495-6499.
17. **Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. and Y. Doi.** 2001. Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaG* gene involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Biomacromol.* **2**:142-177.
18. **Mumberg D., Müller R. and M. Funk.** 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
19. **Nawarath, C., Poirier, Y. and C. Somerville.** 1995. Plant polymers for biodegradable plastics: cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates. *Molecular Breeding* **1**:105-122.
20. **Nomura, C.T., Taguchi, K., Taguchi, S. and Y. Doi.** 2004. Coexpression of genetically engineered 3-ketocoyl-ACP synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) genes leads to short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production from glucose in *Escherichia coli* JM109. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**:999-1007.

21. **Poirier, Y.** 1999. Production of new polymeric compounds in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:181-185.
22. **Poirier, Y.** 2002. Polyhydroxyalkanoates synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Prog. Lipid. Res.* **41**:131-155.
23. **Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K. and C. Somerville.** 1992. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* **256**:520-523.
24. **Poirier, Y., Erard, N. and J.M.-C. Petétot.** 2001. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid β -oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5254-5260.
25. **Poirier, Y., Erard, N. and J.M.-C. Petétot.** 2002. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Picchia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**:97-102.
26. **Prieto, M.A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B and B. Kessler.** 1999. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* Gpo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* **181**:858-868.
27. **Rehm, B. H. A., Kruger, N. and A. Steinbüchel.** 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis: the *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxy-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J. Biol. Chem.* **273**:24044-24051.
28. **Rock, C.O. and J.E. Cronan.** 1996. Escherichia coli as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* **12**:1-16.

29. **Romano, A., van der Plas, L.H.W., Witholt, B., Eggik, G. E. and H. Mooibroek.** 2005. Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. *Planta* **220**:455-464.
30. **Saad, B., Neuenschwander, P., Uhlschmid, G.K. and U.W. Suter.** 1999. New versatile, elastomeric, degradable polymeric materials for medicine. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**:293-301.
31. **Steinbüchel, A. and H.E. Valentin.** 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS* **128**:219-228.
32. **Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T. and Y. Doi.** 1999. Over-expression of 3-keto-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB 101. *Biotechnol. Lett.* **21**:579-584.
33. **Timm, A. and A. Steinbüchel.** 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**:3360-3367.
34. **van der Walle, G.A.M., Buisman, G.J.H., Weusthuis, R.A. and G. Eggink.** 1999. Development of environmentally friendly coatings paints using medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) as polymer binder. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**:123-128.
35. **Verwoert, I.I., Verhagen, E.F., van der Linden, K.H., Verbree, E.C. Nijkamp, H.J. and A.R. Stuitje.** 1994. Molecular characterization of an *Escherichia coli*

mutant with a temperature-sensitive malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. FEBS Lett. **348**:311-314.

36. **Zinn, M; Witholt, B. and T. Egli.** 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv. Drug Deliv. Rew. **53**:5-21.

Table legend

Table 1. PHA synthesis in different *S. cerevisiae* strains grown on oleic acid or raffinose. Cells were grown on media containing 0.1% oleic acid (OA) or 3% raffinose (RAF). ^a 3-hydroxy acid monomers are represented with the prefix H followed by the numbers of carbons and unsaturated bonds. ^b PHA quantity is indicated as (gram weight of PHA/gram of cell dry-weight) x 10⁻⁴. Data are the mean of three measurements. SE are not indicated for simplification of the table, but are less than 20% of the mean values. Control strains with empty vectors (PTS2PHAC_{Pa}/p416GPD, PHAC_{Pa}/p416GPD, PHAG_{Pa}/p415GPD) have the same monomer composition and PHA content as their counterparts represented in table (data not shown). nd represents not detectable.

Strain	Monomer Composition (mol%) ^a													
	PHA Quantity ^b		H6:0		H8:0		H10:0		H12:0		H14:1		H14:0	
	OA	RAF	OA	RAF	OA	RAF	OA	RAF	OA	RAF	OA	RAF	OA	RAF
PTS2PHAC _{Pa}	2.1	3.4	11.2	11.2	41.4	64.1	24.3	22.0	16.1	2.6	5.6	nd	1.3	nd
CyPHAC _{Pa}	0.2	0.2	19.4	10.1	48.2	71.0	21.1	16.9	10.0	2.3	nd	nd	nd	nd
PHAG _{Pa}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PTS2PHAC _{Pa} /PHAG _{Pz}	2.0	3.7	9.8	11.8	44.8	70.6	23.4	16.2	14.3	1.3	6.2	nd	1.5	nd
CyPHAC _{Pa} /PHAG _{Pa}	0.2	0.2	18.6	9.7	53.7	73.2	19.5	16.3	8.2	1.9	nd	nd	nd	nd

Table 1

Capítulo II

Analysis of the contribution of the β -oxidation auxiliary enzymes in the degradation of the dietary conjugated linoleic acid 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoic acid in the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*

Biochimica et Biophysica Acta (2005) 1735:204-213

Analysis of the contribution of the β -oxidation auxiliary enzymes in the degradation of the dietary conjugated linoleic acid 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoic acid in the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*

Heique Bogdawa¹, Syndie Delessert, Yves Poirier*

Département de Biologie Moléculaire Végétale, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Received 7 March 2005; received in revised form 25 May 2005; accepted 9 June 2005

Available online 24 June 2005

Abstract

β -Oxidation of the conjugated linoleic acid 9-*cis*,11-*trans*-octadecadienoic acid (rumenic acid) was analyzed in vivo in *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring polyhydroxyalkanoate production in the peroxisome. Polyhydroxyalkanoate is synthesized by the polymerization of the β -oxidation intermediates 3-hydroxyacyl-CoAs via a bacterial polyhydroxyalkanoate synthase targeted to the peroxisome. The amount of polyhydroxyalkanoate synthesized from the degradation of rumenic acid was found to be similar to the amount synthesized from the degradation of 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid, oleic acid or 10-*cis*-heptadecenoic acid. Furthermore, the degradation of 10-*cis*-heptadecenoic acid was found to be unaffected by the presence of rumenic acid in the media. Efficient degradation of rumenic acid was found to be independent of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase but instead relied on the presence of Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity. The presence of the unsaturated monomer 3-hydroxydodecenoic acid in polyhydroxyalkanoate derived from rumenic acid degradation was found to be dependent on the presence of a Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity. Together, these data indicate that rumenic acid is mainly degraded in vivo in *S. cerevisiae* through a pathway requiring only the participation of the auxiliary enzymes Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase, along with the enzyme of the core β -oxidation cycle.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Conjugated linoleic acid; Peroxisome; *Saccharomyces cerevisiae*; Dienoyl-CoA isomerase; Enoyl-CoA isomerase; Dienoyl-CoA reductase; Rumenic acid

1. Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) refers to a group of isomers of octadecadienoic acid with conjugated double bonds. The principal isomers of CLA found in food are 9-*cis*,11-*trans*-CLA and 10-*trans*,12-*cis*-CLA. The isomer 9-*cis*,11-*trans*-CLA, also named rumenic acid, is found mainly in milk and other dairy products as well as meat

of ruminants and is synthesized via microbial conversion of linoleic acid in the rumen or Δ^9 desaturation of vaccenic acid (11-*cis*-octadecenoic acid) in the mammary glands [1]. CLA has been found to have numerous beneficial effects in animal studies, including protection against cancer and arteriosclerosis, stimulation of immune functions, reduction of body fat and normalization of impaired glucose tolerance in diabetes [1–3]. CLA has been found to affect prostaglandin synthesis potentially through a decrease in the supply of the precursor arachidonic acid. Rumenic acid is known to be a high affinity ligand of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) involved in the control of gene expression and lipid metabolism [1–3].

* Corresponding author. Tel.: +41 21 692 4222; fax: +41 21 692 4195.

E-mail address: yves.poirier@unil.ch (Y. Poirier).

¹ Present address: Laboratório Radiobiologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia Prédio 43421, 91501-907 Porto Alegre, RS, Brazil.

CLA has been shown to be metabolized in animal tissues to a variety of products which may have important biological activities [4]. CLA can undergo Δ^6 desaturation, elongation and further Δ^5 desaturation, while conserving its conjugated diene (CD) structure, resulting in the production of CD18:3, CD20:3 and CD20:4, the latter being an analogue of arachidonic acid. CD16:2 and CD16:3 fatty acids were detected in tissues of rat fed with CLA and it has been hypothesized that these 16-carbon metabolites are generated via partial β -oxidation of CLA [5]. β -Oxidation of rumenic acid has been reported in *in vitro* experiments with incubated rat liver slices or purified rat liver mitochondria, or in *in vivo* experiments with rats fed with CLA [6–9]. β -oxidation of CLA can have important consequences on the bioavailability of CLA and derived metabolites.

In contrast to the degradation of saturated fatty acids, which can be mediated completely by the four enzyme activities of core β -oxidation cycle, namely the acyl-CoA oxidase (in peroxisomes) or acyl-CoA dehydrogenase (in mitochondria), enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and 3-ketothiolase, the degradation of several types of unsaturated fatty acids has been shown to require the presence of auxiliary enzymes [10–12]. Degradation of fatty acids having a *cis* double bonds on an odd carbon, such as oleic acid (9-*cis*-octadecenoic acid) yields a 2-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA intermediate, which can be metabolized by three distinct routes [13–15]. One pathway involves one further round through the core β -oxidation to give 3-*cis*-enoyl-CoA that is converted to 2-*trans*-enoyl-CoA by an Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. Alternatively, the 2-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA can first be converted to the conjugated intermediate 3-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA by an Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase, which is then converted to 2-*trans*,4-*trans*-dienoyl-CoA by a $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase. Further metabolism of this latter intermediate can be mediated either by the conversion to 3-*trans*-enoyl-CoA and 2-*trans*-enoyl-CoA by the stepwise action of a 2,4-dienoyl-CoA reductase and a Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase, or its direct entry into the core β -oxidation via the enoyl-CoA hydratase. Degradation of fatty acids having a *trans* double bond on an odd carbon yields a 3-*trans*-enoyl-CoA that is thought to be converted to 2-*trans*-enoyl-CoA by an Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase before entering the core β -oxidation cycle. Although these studies provide some insights into how conjugated fatty acids could be degraded, few studies have precisely addressed the pathway and auxiliary enzymes involved in the degradation of conjugated fatty acids such as rumenic acid.

Saccharomyces cerevisiae has been extensively used as a model system to study the degradation of unsaturated fatty acids that occurs exclusively in the peroxisomes [10,12]. In most studies using *S. cerevisiae*, the degradation of unsaturated fatty acids in wild type or mutants affected in various β -oxidation auxiliary enzymes was evaluated either through the ability of cells to grow in media containing fatty

acids as the main carbon source or by the monitoring of a clearing zone around colonies growing on solid turbid media containing unsaturated fatty acids dispersed with Tween detergents [16–19]. In this study, we have used an alternative method to monitor the degradation of rumenic acid in yeast that relies on the synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA).

PHAs are polymers of R-3-hydroxyalkanoic acids that are synthesized as intracellular inclusions by a wide variety of bacteria and are used as a carbon reserve [20,21]. Pseudomonads, such as *Pseudomonas oleovorans*, typically synthesize PHA containing 3-hydroxyacids ranging from 6 to 14 carbons in length when cells are grown on alkanolic acids as a carbon source. PHA is synthesized by the PHA synthase from the polymerization of 3-hydroxyacyl-CoA intermediates generated by the β -oxidation of alkanolic acids.

PHA has been used as a valuable indicator of the flux of carbon through the peroxisomal β -oxidation pathway in several recombinant eukaryotes. In the plant *Arabidopsis thaliana*, as well as the yeasts *S. cerevisiae* and *Pichia pastoris*, expression of a PHA synthase from *Pseudomonas aeruginosa* modified for peroxisomal targeting was shown to lead to PHA synthesis with the PHA monomer composition adequately reflecting both the nature and quantity of fatty acid directed towards the β -oxidation cycle [20–28]. In yeast, synthesis of peroxisomal PHA has been used to reveal the existence of a futile cycle of intermediates of the fatty acid biosynthetic pathway towards the β -oxidation cycle, to monitor the substrate specificity of mutants of the multifunctional enzyme Fox2p, as well as to study the degradation of *trans*-unsaturated fatty acids [29–31]. In the present study, we used of the synthesis of PHA in peroxisomes of *S. cerevisiae* to analyze the β -oxidation of rumenic acid and determine the role of the auxiliary enzymes in its degradation.

2. Materials and methods

2.1. Strains, plasmids and culture conditions

Wild type *S. cerevisiae* strain BJ1991 (*mata leu2 ura3-52 trp1 pep4-3 prb1-1122*) as well as the mutants *dci1* Δ (*dci1* Δ ::*kanMX4*), *eci1* Δ (*eci1* Δ ::*kanMX4*), *sps19* Δ (*sps19* Δ ::*LEU2*), *eci1* Δ *dci1* Δ (*eci1* Δ ::*URA3 dci1* Δ ::*kanMX4*) *eci1* Δ *sps19* Δ (*eci1* Δ ::*kanMX4 sps19* Δ ::*LEU2*) and *dci1* Δ *sps19* Δ (*dci1* Δ ::*kanMX4 sps19* Δ ::*LEU2*), all derived from the strain BJ1991 strain, were obtained from Aner Gurvitz (Vienna Biocenter, Vienna) and have previously been described [14,19].

The plasmid pYE352-PHA, containing the gene for the PHAC1 synthase from *P. aeruginosa*, modified at the carboxy end by the addition of a peroxisomal targeting sequence and placed under the control of the catalase A (CTA1) promoter and terminator, has been previously

described [26]. The plasmids pYIplac111-PHA and pYIplac128-PHA contain the same CTA1 promoter-PHA synthase-CTA1 terminator cassette in the pYIplac111 and pYIplac128 vectors, respectively [32]. The plasmids pYE352-PHA and pYIplac128-PHA were transformed into the wild type BJ1991, the plasmid pYE352-PHA was transformed into the mutants *dcil* Δ , *eci1* Δ , *sps19* Δ , *eci1* Δ *sps19* Δ , and *dcil* Δ *sps19* Δ , while the plasmid pYIplac111-PHA was transformed in the mutant *eci1* Δ *dcil* Δ . All transformations were done by the lithium acetate procedure [33].

S. cerevisiae strains harboring the PHA synthase gene were maintained in uracil-deficient, leucine-deficient or uracil- and leucine-deficient media (0.67% yeast nitrogen base without amino acids [Difco, MI], 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose and 0.69 g/L of the appropriate drop-out supplement [Clonotect, CA]). For experiments analyzing PHA synthesis in cells growing on media containing fatty acids, a stationary phase culture was harvested by centrifugation, cells were washed once in water and resuspended at a 1:10 dilution in fresh media containing 0.1% (w/v) glucose, 2% Pluronic-127 (w/v) (Sigma Co., St. Louis, MO) and 0.05% (v/v) fatty acids. Cells were grown for an additional 3–4 days before harvesting them for PHA analysis.

The clearing zone assay by cells grown on solid media was performed essentially as described by Gurvitz et al. [17,34]. Wild type BJ1991 stably transformed with the pYIplac128-PHA plasmid were compared to untransformed BJ1991 cells for clearing zone formation in solid media containing 0.1% (w/v) 9-*cis*,11-*trans*-octadecadienoic acid and 0.5% (v/v) Tween-40 (Sigma, St. Louis, MI).

Oleic acid, 10-*cis*-heptadecenoic acid, 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid, and 9-*cis*,11-*trans*-octadecadienoic acid ($\geq 95\%$ purity) were purchased from Nu-Check-Prep (Elysian, MN).

2.2. Analysis of PHA

PHA was analyzed as previously described [26]. Briefly, cells were harvested by centrifugation, washed with water and lyophilized in a glass tube. The dried material was washed with warm methanol (65 °C) in order to remove free fatty acids, lipids and acyl-CoAs, and the remaining material, including PHA, was trans-esterified at 94 °C for 4 h with one ml of methanol/chloroform mixture (1:1) containing 3% sulfuric acid. One ml of 0.9% NaCl was added to the cooled mixture, vortexed vigorously and centrifuged at 5000 \times g for 5 min. The chloroform phase containing the methyl esters of 3-hydroxyacids was then analyzed and quantified by GC/MS using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph (HP-5MS column) coupled to a Hewlett-Packard 5972 mass spectrophotometer. Monomers ranging from 5 to 13 carbons are generally detectable in PHA produced in yeast because of the chain-length specificity of the PHA synthase of *Pseudomonas aeruginosa* [20,21].

3. Results

3.1. Synthesis of PHA in wild type cells grown in media containing ruminic acid

Based on the current knowledge of the activity of *S. cerevisiae* auxiliary enzymes involved in β -oxidation of unsaturated fatty acids, the degradation of ruminic acid could potentially occur via 4 partially overlapping pathways (Fig. 1). One pathway, named the isomerase-dependent pathway, involves the conversion of the intermediate 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA to 2-*trans*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA via the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase (Eci1p; pathway 1). Alternatively, the intermediate 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA can be converted to 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA by the action of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase (Dci1p). This latter intermediate can be further

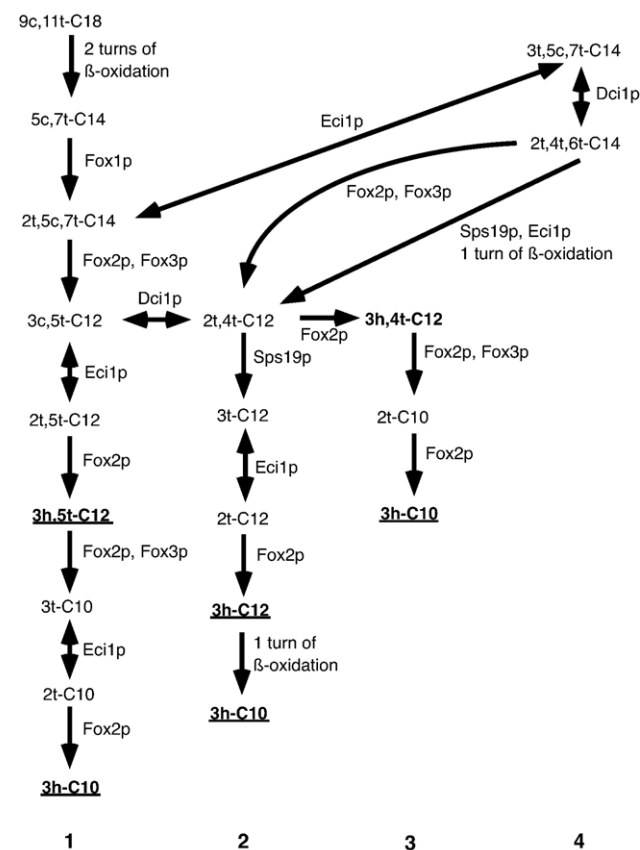


Fig. 1. Potential pathways for the degradation of ruminic acid in the peroxisome of *S. cerevisiae*. All 3-hydroxyacyl-CoA intermediates of 12 and 10 carbons generated by the degradation of ruminic acid are indicated in bold, with substrates for the PHA synthase being additionally underlined. Numbers below refer to the different potential pathways. Pox1p, acyl-CoA oxidase; Fox2p, multifunctional protein; Fox3p, 3-ketothiolase; Sps19p, 2,4-dienoyl-CoA reductase; Eci1p, Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase; Dci1p, $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase. The nomenclature used is : position and conformation of the double bond (t for *trans* and c for *cis*) or position of the hydroxy group (h), followed by the number of carbons of the aliphatic chain of the CoA ester (thus 3t-C10 is 3-*trans*-decenoyl-CoA and 3h,5t-C12 is 3-hydroxy,5-*trans*-dodecenoyl-CoA).

metabolized either through a pathway requiring the successive participation of the 2,4-dienoyl-CoA reductase (Sps19p) and Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase (the reductase-dependent pathway, pathway 2), or through a pathway involving only the participation of the multifunctional enzyme (Fox2p) and other enzymes of the core β -oxidation cycle (pathway 3). A fourth pathway involves the successive conversion of the intermediate 2-*trans*,5-*cis*,7-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA to 3-*trans*,5-*cis*,7-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA and 2-*trans*,4-*trans*,6-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA by the successive action of the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase and $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase (pathway 4). The latter intermediate 2-*trans*,4-*trans*,6-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA can then be converted into 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA to rejoin pathway 2 or 3 via a reductase-dependent pathway or via Fox2p and the core β -oxidation cycle, respectively. The various proposed pathways generate different 3-hydroxyacyl-CoA intermediates. Of particular importance for this study, pathway 1 generates the unsaturated intermediate 3-hydroxy,5-*trans*-dodecenoyl-CoA, pathway 2 generates the saturated intermediate 3-hydroxydodecanoyl-CoA, and pathway 3 generates the unsaturated intermediate 3-hydroxy,4-*trans*-dodecenoyl-CoA. While the intermediates 3-hydroxy,5-*trans*-dodecenoyl-CoA and 3-hydroxydodecanoyl-CoA are substrates for the bacterial PHA synthase, 3-hydroxyacyl-CoAs with an unsaturated bond on the fourth carbon, such as 3-hydroxy,4-*trans*-dodecenoyl-CoA, are known to be very poor substrates for the PHA synthase [22,23]. PHA analysis cannot, therefore, directly reveal the presence of pathway 3. While the saturated intermediate 3-hydroxydodecanoyl-CoA can be generated by the degradation of the endogenous fatty acids present in yeast membranes or their biosynthetic intermediates, including saturated even-chain fatty acids and oleic acid, the intermediate 3-hydroxy,5-*trans*-dodecenoyl-

CoA is not generated by the β -oxidation of endogenous yeast fatty acids, and thus, can be used as a unique marker for the degradation of ruminic acid via the isomerase-dependent pathway (pathway 1) (Fig. 1).

PHA synthesized in wild type cells grown in media containing either ruminic acid, 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid, oleic acid or 10-*cis*-heptadecenoic acid was analyzed and compared (Fig. 2). Cells grown in media containing ruminic acid or 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid were found to accumulate a PHA containing primarily the monomers H12:1, H12:0, H10:0, H8:0 and H6:0 (3-hydroxyacid monomers are identified with the prefix H, followed by the number of carbon and the number of unsaturated bonds). Although very low level (≤ 1 mol%) of 14-carbon 3-hydroxyacids could sometime be detected in PHA derived from ruminic acid and other fatty acids, their reproducible detection and quantification was found to be problematic. These monomers were thus excluded from subsequent analysis. As previously reported, degradation of oleic acid via β -oxidation generated a PHA containing the monomers H12:0, H10:0, H8:0 and H6:0, while no H12:1 was detectable [26]. Degradation of the external odd-chain 10-*cis*-heptadecenoic acid yielded a PHA containing primarily the odd-chain monomers H13:1, H11:0, H9:0, H7:0 and H5:0, with a significant amount of the even chain monomers H12:0, H10:0, H8:0 and H6:0. These even-chain monomers are presumed to be primarily generated by the degradation of the cells endogenous even-chain fatty acids, including their biosynthetic intermediates [30]. The quantities of PHA synthesized in cells grown in media containing the various fatty acids were similar, ranging from 4.4×10^{-4} g PHA per g of dry cells for 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid to 12×10^{-4} g PHA per g of dry cells for ruminic acid (Fig. 2). Both the quantity of PHA as well as the presence of a significant amount of the H12:1 monomer

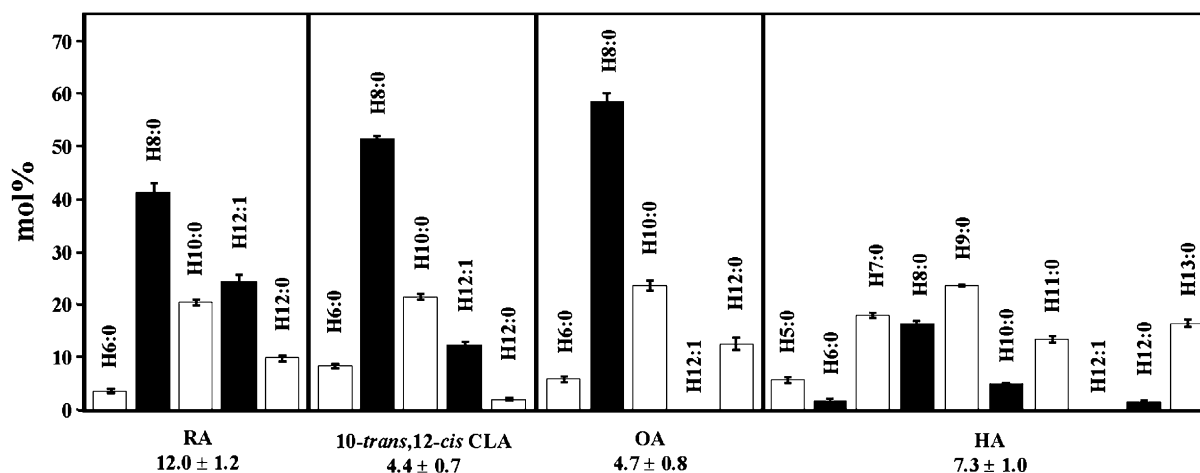


Fig. 2. Synthesis of PHA in *S. cerevisiae* grown in media containing ruminic acid or other unsaturated fatty acids. Cells were grown in media containing 0.1% glucose and 0.05% of either ruminic acid (RA), 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid (10-*trans*,12-*cis*-CLA), oleic acid (9-*cis*-octadecenoic acid) (OA), or 10-*cis*-heptadecenoic acid (HA). The amount of PHA synthesized for the different treatments is indicated below each histogram ([weight PHA/cell dry weight] $\times 10^{-4}$). The y axis represents the proportion of each PHA monomer in mol%. Values are average \pm standard deviation ($n \geq 3$). PHA synthesized from ruminic acid, 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid, or oleic acid does not contain detectable amount of odd-chain monomers.

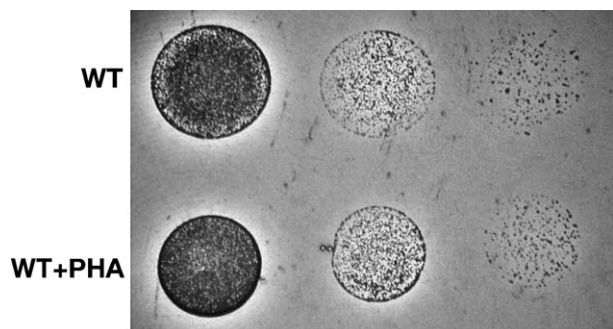


Fig. 3. Influence of PHA synthesis on the clearing zone plate assay. Serial dilution of untransformed BJ1991 cells (WT) and BJ1991 cells transformed with the plasmid pYIplac128-PHA (WT+PHA) and synthesizing PHA were grown for 6 days in solid media containing 0.1% rumenic acid and 0.5% Tween-40.

found in the polymer of cells grown in the presence of rumenic acid revealed that the conjugated fatty acids could be efficiently degraded in *S. cerevisiae* and that at least a portion of the carbon flux through β -oxidation was occurring through the isomerase-dependent pathway (pathway 1) (Fig. 1).

The potential influence of PHA synthesis on the capacity of cells to utilize external rumenic acid via the β -oxidation cycle was examined using the plate clearing zone assay [17,34]. Wild type BJ1991 cells transformed with the integrative plasmid pYIplac128-PHA and expressing the peroxisomal PHA synthase were compared to untransformed wild type cells for their ability to form a clearing zone around colonies growing on solid media containing rumenic acid. As previously reported, clearing zones was found only around very dense cells mass but not around single colonies [34] (Fig. 3). No difference in the extent of

the clearing zone was found between untransformed cells and cells expressing the peroxisomal PHA synthase.

Studies performed with rat liver mitochondria had previously indicated that degradation of rumenic acid may negatively influence the β -oxidation of other fatty acids, such as palmitoleic acid [6,7]. The effect of rumenic acid on the β -oxidation cycle was thus examined in *S. cerevisiae* by comparing the extend of odd-chain PHA synthesized from the degradation of 10-*cis*-heptadecenoic acid in cells grown in media containing either only 10-*cis*-heptadecenoic acid, or a mixture of 10-*cis*-heptadecenoic acid with an equal amount of oleic acid or rumenic acid (Fig. 4). No significant differences were observed either in the quantity or composition of the odd-chain component of the PHA synthesized in cells grown in the various media, indicating the absence of a detectable negative effect of rumenic acid on the β -oxidation of 10-*cis*-heptadecenoic acid.

3.2. Degradation of rumenic acid in mutants deficient in the auxiliary enzymes of β -oxidation

In order to gain insights into the contribution of the various auxiliary enzymes to the degradation of rumenic acid, synthesis of PHA was analyzed in various single and double mutants with deficiencies in the enzymes Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase, $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase and 2,4-dienoyl-CoA reductase, encoded by the genes *Eci1*, *Dci1* and *Sps19*, respectively (Fig. 5).

The amount of PHA produced from rumenic acid in *sps19* Δ , *dci1* Δ and *dci1sps19* Δ cells were reduced to approximately 45, 50 and 70% of wild type level, respectively. In all three mutants, there was a significant decrease in the proportion of the H12:0 monomer in PHA, going from 9 mol% in wild type to approximately 2–3

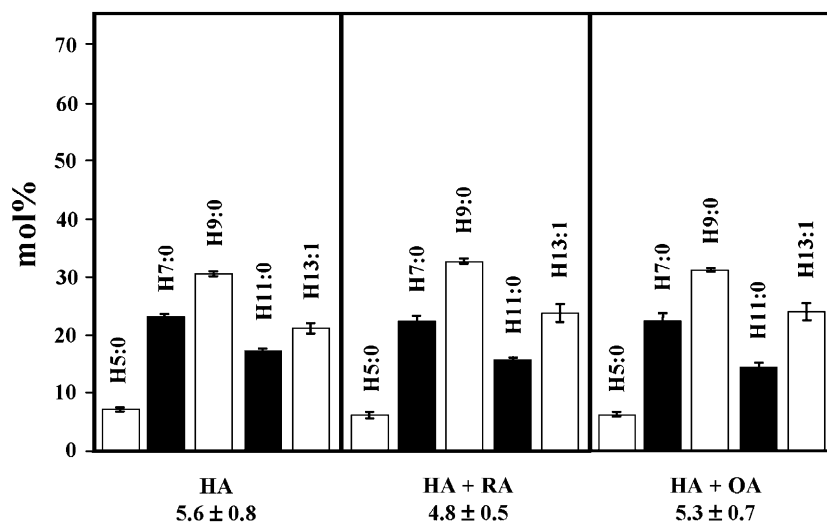


Fig. 4. Effects of rumenic acid on the β -oxidation of monounsaturated fatty acids. Cells were grown in media containing 0.1% glucose and 0.05% 10-*cis*-heptadecenoic acid alone (HA) or in combination with 0.05% oleic acid (HA+OA) or rumenic acid (HA+RA). PHA was quantified only for the odd-chain monomers derived from the β -oxidation of 10-*cis*-heptadecenoic acid. The amount of PHA synthesized for the different treatments is indicated below each histogram ([weight PHA/cell dry weight] $\times 10^{-4}$). The y axis represents the proportion of each PHA monomer in mol%. Values are average \pm standard deviation ($n \geq 3$).

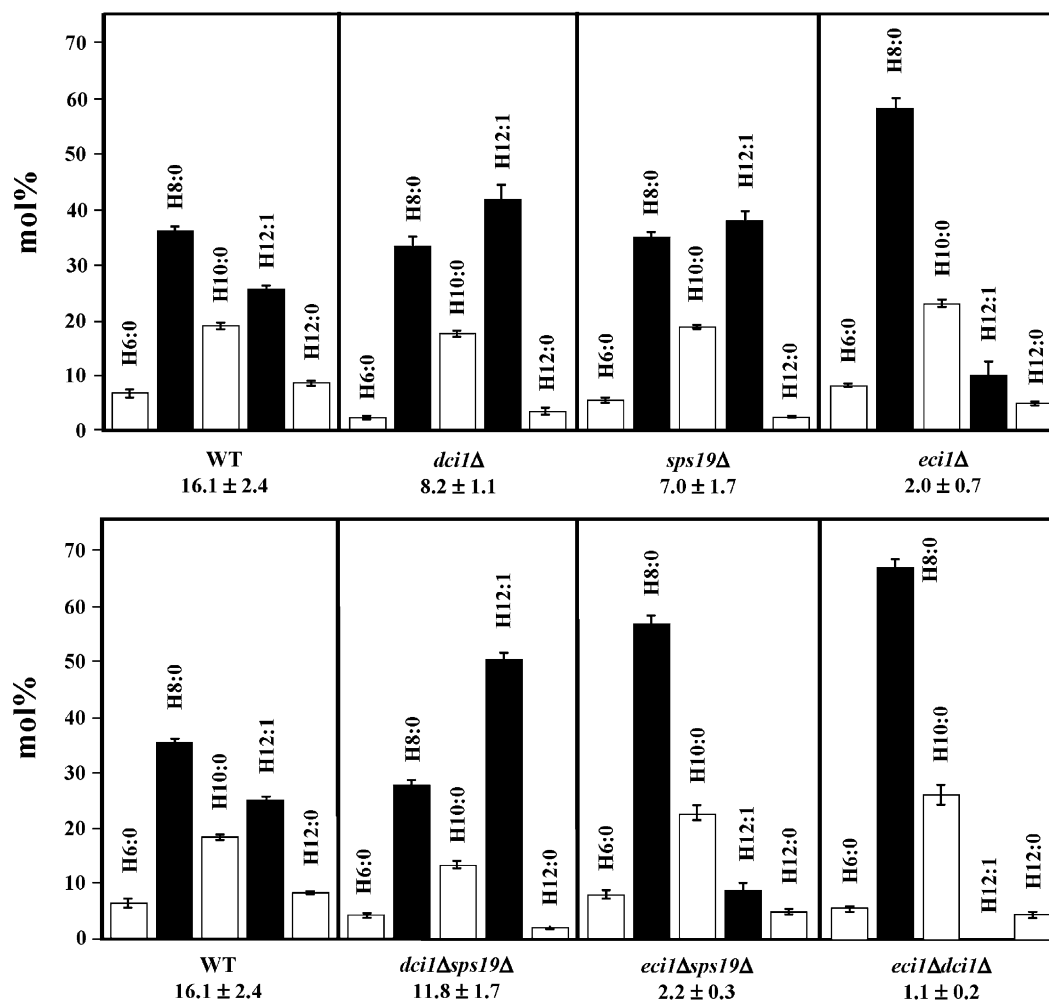


Fig. 5. Synthesis of PHA in wild type and mutant cells grown in media containing rumenic acid. Cells were grown in media containing 0.1% glucose and 0.05% rumenic acid. Each histogram is identified with the strain (wild type, WT or *eci1*Δ, *dci1*Δ and *sps19*Δ single and double mutants) and the amount of PHA synthesized ([weight PHA/cell dry weight] × 10⁻⁴). The y axis represents the proportion of each PHA monomer in mol%. Values are average ± standard deviation ($n \geq 3$).

mol% in the mutants, as well as a significant increase in the H12:1 monomer, from 27 mol% in wild type to 38–51 mol% in the mutants. Deletion of the *Eci1* gene had larger negative impact on PHA synthesis. Thus, the amount of PHA in the *eci1*Δ and *eci1*Δ*sps19*Δ were reduced to approximately 13% of wild type level, while it was reduced to 7% of wild type in the *eci1*Δ*dci1*Δ mutant. In all these mutants, there was a significant decrease in the H12:0 monomer compared to wild type, as well as a large decrease in the proportion of the H12:1 monomer, being 9.6 and 5.0 mol% for the *eci1*Δ and *eci1*Δ*sps19*Δ mutants, respectively, while H12:1 was undetectable in the *eci1*Δ*dci1*Δ mutant.

4. Discussion

Complete β-oxidation of the CLA isomers 9-*cis*,11-*trans*-octadecadienoic acid and 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid has previously been reported in in vitro

experiments with incubated rat liver slices or purified rat liver mitochondria, or in in vivo experiments with rats fed with CLA [6–9]. Degradation of the conjugated intermediate 5,7-decadienoyl-CoA has also been studied with rat liver mitochondria extracts [35]. Thus, the β-oxidation cycle of animal cells appear capable of completely degrading fatty acids with conjugated bonds.

Degradation of CLA in *S. cerevisiae* has previously been studied using the extent of clearing zones around colonies growing in media containing a turbid suspension of fatty acids as the main indicator of fatty acid utilization via β-oxidation [34]. In that study, 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid was found to be efficiently utilized by *S. cerevisiae* by a pathway requiring the participation of the 2,4-dienoyl-CoA reductase and the Δ^{3,5},Δ^{2,4}-enoyl-CoA isomerase, but not of the Δ^{3,5},Δ^{2,4}-dienoyl-CoA isomerase [34]. In contrast, wild type *S. cerevisiae* was shown to poorly utilize rumenic acid in the clearing zone assay, thus preventing further studies of the auxiliary enzymes involved in its potential β-oxidation.

In the present study, the quantity and monomer composition of PHA synthesized from the 3-hydroxyacyl-CoAs generated by the β -oxidation of fatty acids present in the media was used as a tool to study the pathway of ruminic acid degradation. Although the majority of PHA is derived from the degradation of the exogenous fatty acid, significant degradation of endogenous fatty acids can still contribute to PHA accumulation. This is exemplified in the results obtained with wild type cells grown in media containing 10-*cis*-heptadecenoic acid, where odd-chain monomers derived from the β -oxidation of the external fatty acid contribute to 76% of the PHA synthesized (5.5×10^{-4} g of PHA/g cell dry weight) while even-chain monomers derived from the β -oxidation of endogenous fatty acids contribute to 24% of the PHA synthesized (1.7×10^{-4} g of PHA/g cell dry weight) (Fig. 2). Although it is difficult to precisely determine the contribution of the degradation endogenous fatty acids to PHA synthesis under every experimental conditions where even-chain fatty acids are used as an external carbon source, the value of 1 to 2×10^{-4} g of PHA/g cell dry weight derived from endogenous fatty acid appears consistent, in the present study, with the quantities of PHA obtained in the *ecil* Δ *dci* Δ mutant (1.1×10^{-4} g of PHA/g cell dry weight) that is severely compromised in the degradation of external ruminic acid and where PHA is expected to be mainly derived from endogenous fatty acids (Fig. 5). In this perspective, the synthesis of 4.2×10^{-4} and 4.7×10^{-4} g of PHA/g cell dry weight obtained for wild type cells grown in media containing 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid and oleic acid, respectively, as well as between 7×10^{-4} and 12×10^{-4} g of PHA/g cell dry weight for wild type cells and the *dci1* Δ , *sps19* Δ and *dci1* Δ *sps19* Δ mutants grown in media containing ruminic acid, clearly indicate that these exogenous fatty acids are efficiently degraded by the β -oxidation cycle and that the majority of PHA monomers are derived from the external fatty acids. Furthermore, the presence of the H12:1 monomer in PHA derived only from the degradation of 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid and ruminic acid is a clear indication of the degradation of the external conjugated fatty acids since this monomer is not generated by the degradation of endogenous fatty acids or by external oleic acid (Fig. 2). The generation of the H12:1 PHA monomer for cells grown in media containing 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid implicates the conversion of the intermediate 2-*trans*,4-*trans*,6-*cis* dodecatrienoyl-CoA to 2-*trans*,6-*cis*-dodecadienoyl-CoA via a pathway requiring the participation of the 2,4-dienoyl-CoA reductase and Δ^3 - Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. These results are in agreement with a recent study showing substantial carbon flux through a reductase-dependent pathway for the degradation of 10-*trans*-heptadecenoic acid [31]. The implication of the presence of the H12:1 PHA monomer in cells grown in media containing ruminic acid is described in detail below.

The evidence of adequate β -oxidation of ruminic acid obtained with PHA synthesis contrasts with data previously

obtained in *S. cerevisiae* whereby failure of single colonies of wild-type cells to efficiently form a clearing zone in medium containing ruminic acid was interpreted as a failure to efficiently metabolize the fatty acid [34]. The reason for this discrepancy is not clear. The extent of a clearing zone around a colony could be influenced not only by the capacity of the β -oxidation cycle to degrade fatty acids but also by the extent of internalization of the external fatty acids and inclusion into intracellular oil bodies as well as the ability of cells to grow in media containing the fatty acids. It remains also possible that the withdrawal of 3-hydroxyacyl-CoA intermediates from the β -oxidation cycle for PHA synthesis may influence and increase the flux through β -oxidation, thus enabling a more efficient degradation of ruminic acid in cells producing PHA. There are, however, little direct evidences indicating that PHA synthesis may influence the carbon flux through β -oxidation. For example, cells producing PHA were not more competent in the formation of a clearing zone around colonies growing in media containing ruminic acid than cells unable to synthesize PHA (Fig. 3). Synthesis of PHA in yeast peroxisomes can thus offer a valuable complementary view of the degradation of fatty acids through the β -oxidation cycle by providing an alternative way of measuring the carbon flux through β -oxidation that can be uncoupled from indirect effects of fatty acids on growth.

Studies with purified rat liver mitochondria revealed that ruminic acid is more slowly oxidized compared to linoleic acid [6,7]. Furthermore, prior oxidation of CLA rendered mitochondria much less capable of oxidizing palmitoleic and linoleic acid under carnitine-dependent conditions, indicating that CLA is capable of interfering with the oxidation of usual unsaturated fatty acids [6,7]. In this study, the presence of competing ruminic acid or oleic acid in media containing 10-*cis*-heptadecenoic acid resulted in a similar amount of odd-chain PHA produced from 10-*cis*-heptadecenoic acid, indicating that ruminic acid was not interfering with the degradation of unsaturated fatty acids in yeast (Fig. 4).

Degradation of ruminic acid through the β -oxidation pathway could follow several pathways. Following two rounds through the core β -oxidation cycle combined with one further reaction by the acyl-CoA oxidase, ruminic acid generates the intermediate 2-*trans*,5-*cis*,7-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA (Fig. 1). Completion of one further round through the core β -oxidation cycle would generate the intermediate 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA that can have two different fates. In one pathway, 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA is converted to 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA by the $\Delta^{3,5}$, $\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase. This latter intermediate can itself be metabolized by two pathways, namely by a pathway implicating the action of the multifunctional enzyme Fox2p and other enzymes of the core β -oxidation cycle (pathway 3), or by a reductase-dependent pathway implicating the stepwise action of the 2,4-dienoyl-CoA reductase and Δ^3 , Δ^2 -enoyl-CoA isomerase

(pathway 2) to generate 2-*trans*-dodecanoyl-CoA that can then re-enter the core β -oxidation cycle. Alternatively, 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA can be metabolized by the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase to 2-*trans*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA, which can then be completely degraded by a combination of the core β -oxidation enzymes and one additional Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase step (pathway 1). Finally, an additional pathway can be postulated from the conversion of the early intermediate 2-*trans*,5-*cis*,7-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA to 3-*trans*,5-*cis*,7-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA and 2-*trans*,4-*trans*,6-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA by the successive action of the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase and the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase (pathway 4). Similar to the metabolism of the intermediate 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA via pathway 2 and 3, the intermediate 2-*trans*,4-*trans*,6-*trans*-tetradecatrienoyl-CoA can then be converted to 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA either via a pathway implicating one further round through the core β -oxidation cycle or via a pathway implicating the action of the 2,4-dienoyl-CoA reductase and Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase.

Previous studies examining the degradation of conjugated fatty acids in rat liver mitochondria concluded that the intermediate 3,5-octadienoyl-CoA was significantly metabolized only via 2,4-octadienoyl-CoA generated by the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase and not via the conversion to 2,5-octadienoyl-CoA by the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase pathway [13,15]. One reason for this situation was thought to be the greater thermodynamic stability of 3,5-octadienoyl-CoA as compared to the 2,5-isomer, making the conversion of the 3,5-isomer into the 2,5 isomer an energetically unfavorable reaction. Analysis of PHA synthesized from the degradation of rumenic acid revealed the presence of the H12:1 monomer. The intermediate 3-hydroxy,5-*trans*-dodecenoyl-CoA is expected to be generated only via pathway 1 where the intermediate 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA is converted to 2-*trans*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA via the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. The fact that the PHA synthesized in the *eci* Δ *dci* Δ mutant grown in media containing rumenic acid is devoid of the H12:1 monomer while the *dci* Δ mutant contains this monomer fully supports the view that the intermediate 3-hydroxy,5-*trans*-dodecenoyl-CoA is generated in vivo via the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity. The fact that the mutants *eci* Δ and *eci* Δ *sps19* Δ still produce a PHA containing the H12:1 monomer can be explained by the fact that the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase from *S. cerevisiae* harbors a significant Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity [14]. The amount of PHA synthesized in the *eci* Δ , *eci* Δ *sps19* Δ and *eci* Δ *dci* Δ mutants represent only 7–13% of wild type level, indicating a severe reduction in the capacity of the β -oxidation cycle to degrade rumenic acid. In the *eci* Δ and *eci* Δ *sps19* Δ mutants, the level of both the H12:1 and H12:0 monomers in the PHA is reduced compared to wild type, indicating a reduced flux through pathways 1 and 2. In the *eci* Δ *dci* Δ mutant, where degradation of rumenic acid is expected to be completely blocked, the residual PHA

detected is expected to be generated from the degradation of endogenous saturated fatty acids or from the degradation of fatty acid biosynthetic intermediates as previously described [30]. In contrast to mutants devoid of Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity, mutants devoid of $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase activity, such as *dci* Δ and *dci* Δ *sps19* Δ , maintain adequate synthesis of PHA, with levels being 50–70% of wild type. Furthermore, the *dci* Δ and *dci* Δ *sps19* Δ mutants show significant increase in the level of the H12:1 monomer and decrease in the H12:0 monomer in the PHA. These changes would be consistent with a relative increase flux through pathway 1 resulting from the absence of flux through pathways 2, 3 and 4, which are all dependant on the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase. It is thus concluded that in *S. cerevisiae*, the degradation of rumenic acid is independent of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase and that a pathway requiring only the participation of the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity is sufficient to maintain adequate levels of rumenic acid degradation via β -oxidation. Although the conversion of 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA into 2-*trans*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA may be energetically unfavorable, our results suggest that the in vivo activity of the enoyl-CoA hydratase II towards 2-*trans*,5-*trans*-dodecadienoyl-CoA is sufficiently high to maintain a substantial carbon flux through the isomerase-dependent pathway.

The *sps19* Δ mutant grown in media containing rumenic acid synthesized PHA to 45% of wild type level and showed a relative increased proportion of the H12:1 monomer and a decrease in H12:0. These results are consistent with a decrease carbon flux through the reductase-dependant pathway (pathway 2) for the metabolism of the intermediate 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA with a concomitant increase in the flux through the isomerase-dependent pathway (pathway 1). These results would thus indicate that the metabolism of 2-*trans*,4-*trans*-dodecadienoyl-CoA via the multifunctional enzyme Fox2 and the core β -oxidation enzymes (pathway 3) is relatively minor compared to the reductase-dependant pathway. These results are in agreement with studies on the degradation of oleic acid in rat heart mitochondria that showed that the intermediate 2,4-tetradecadienoyl-CoA, generated by the isomerisation of 3,5-tetradecadienoyl-CoA via the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase, is mainly metabolized by the 2,4-dienoyl-CoA reductase and not directly by the multifunctional enzyme of the core β -oxidation enzymes [13,15]. Furthermore, recent experiments looking at the synthesis of PHA in wild type *S. cerevisiae* and mutants deficient in the auxiliary enzymes Ecip, Dcip or Sps19 and synthesizing PHA from the degradation of 10-*trans*-heptadecenoic acid also revealed that a major carbon flux occurred through the reductase-dependent pathway [31].

In conclusion, this study shows that *S. cerevisiae* can efficiently degrade the conjugated fatty acid rumenic acid in the peroxisome and that its metabolism does not hamper the degradation of other fatty acids, such as 10-*cis*-heptadecenoic

noic acid. The main pathway for rumenic acid degradation requires the participation of the Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase, while pathways requiring the participation of the $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase activity are minor and not essential in this host. It is interesting to note that $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase activity has also been shown to be non-essential in *S. cerevisiae* for the metabolism of unsaturated fatty acids having *cis* double bonds on odd-chain carbons, such as oleic acid [14]. It does remain to be determined what is the essential role of the $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase, if any, in the metabolism of fatty acids in yeast and other organisms.

Acknowledgements

This research was funded, in part, from the Etat de Vaud, the Université de Lausanne, and grants from the Fonds National Suisse (grant #3100A0-105874) and the Herbette Foundation to YP, as well as a fellowship from the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior to HB. The authors are very grateful to Aner Gurvitz (Vienna Biocenter, Vienna, Austria) for providing various yeast strains used in this study. The authors also thank Simon Goepfert for critical reading of the manuscript.

References

- [1] K.W. Wahle, S.D. Heys, D. Rotondo, Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 553–587.
- [2] M.A. Belury, Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 505–531.
- [3] S. Stender, J. Dyerberg, Influence of trans fatty acids on health, *Ann. Nutr. Met.* 48 (2004) 61–66.
- [4] S. Banni, Conjugated linoleic acid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 261–266.
- [5] S. Banni, A. Petroni, M. Blasevich, G. Carta, E. Angioni, E. Murru, B.W. Day, M.P. Melis, S. Spada, C. Ip, Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites, *Biochim. Biophys. Acta* 1682 (2004) 120–127.
- [6] P. Clouet, L. Demizieux, J. Gresti, P. Degrace, Mitochondrial respiration on rumenic and linoleic acid, *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 320–325.
- [7] L. Demizieux, P. Degrace, J. Gresti, O. Loreau, J.P. Noel, J.M. Chardigny, J.L. Sebedio, P. Clouet, Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 2112–2122.
- [8] D. Gruffat, A. De La Torre, J.M. Chardigny, D. Durand, O. Loreau, J.L. Sebedio, D. Bauchart, In vitro comparison of hepatic metabolism of 9*cis*-11 *trans* and 10*trans*-12*cis* isomers of CLA in the rat, *Lipids* 38 (2003) 157–163.
- [9] J.P. Sergiel, J.M. Chardigny, J.L. Sebedio, O. Berdeaux, P. Juaneda, O. Loreau, B. Pasquis, J.P. Noel, Beta-oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats, *Lipids* 36 (2001) 1327–1329.
- [10] J.K. Hiltunen, A.M. Mursula, H. Rottensteiner, R.K. Wierenga, A.J. Kastaniotis, A. Gurvitz, The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 35–64.
- [11] W.H. Kunau, V. Dommès, H. Schulz, beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress, *Prog. Lipid Res.* 34 (1995) 267–342.
- [12] C.W. van Roermund, H.R. Waterham, L. Ijlst, R.J. Wanders, Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1838–1851.
- [13] K. Shoukry, H. Schulz, Significance of the reductase-dependent pathway for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds. Mitochondrial metabolism of 2-*trans*-5-*cis*-octadienoyl-CoA, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 6892–6899.
- [14] A. Gurvitz, A.M. Mursula, A.I. Yagi, A. Hartig, H. Ruis, H. Rottensteiner, J.K. Hiltunen, Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the beta-oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of YOR180c/DC11 encoding peroxisomal delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24514–24521.
- [15] Y. Ren, H. Schulz, Metabolic functions of the two pathways of oleate beta-oxidation double bond metabolism during the beta-oxidation of oleic acid in rat heart mitochondria, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 111–116.
- [16] A. Gurvitz, H. Rottensteiner, S.H. Kilpelainen, A. Hartig, J.K. Hiltunen, M. Binder, I.W. Dawes, B. Hamilton, The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene SPS19, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22140–22147.
- [17] A. Gurvitz, A.M. Mursula, A. Firzinger, B. Hamilton, S.H. Kilpelainen, A. Hartig, H. Ruis, J.K. Hiltunen, H. Rottensteiner, Peroxisomal Delta3-*cis*-Delta2-*trans*-enoyl-CoA isomerase encoded by EC11 is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 31366–31374.
- [18] B.V. Geisbrecht, D. Zhu, K. Schulz, K. Nau, J.C. Morrell, M. Geraghty, H. Schulz, R. Erdmann, S.J. Gould, Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Delta3, Delta2-enoyl-CoA isomerase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33184–33191.
- [19] A. Gurvitz, B. Hamilton, H. Ruis, A. Hartig, Peroxisomal degradation of trans-unsaturated fatty acids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 895–903.
- [20] Y. Poirier, C. Nawrath, C. Somerville, Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants, *Bio/technology* 13 (1995) 142–150.
- [21] A. Steinbüchel, B. Fuchtenbusch, Bacterial and other biological systems for polyester production, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 419–427.
- [22] V. Mittendorf, E.J. Robertson, R.M. Leech, N. Krüger, A. Steinbüchel, Y. Poirier, Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid beta-oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13397–13402.
- [23] V. Mittendorf, V. Bongcam, L. Allenbach, G. Coullerez, N. Martini, Y. Poirier, Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow through beta-oxidation, *Plant J.* 20 (1999) 45–55.
- [24] L. Allenbach, Y. Poirier, Analysis of the alternative pathways for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids using transgenic plants synthesizing polyhydroxyalkanoates in peroxisomes, *Plant Physiol.* 124 (2000) 1159–1168.
- [25] Y. Poirier, G. Ventre, D. Caldelari, Increased flow of fatty acids toward beta-oxidation in developing seeds of *Arabidopsis* deficient in diacylglycerol acyltransferase activity or synthesizing medium-chain-length fatty acids, *Plant Physiol.* 121 (1999) 1359–1366.
- [26] Y. Poirier, N. Erard, J. MacDonald-Comber Petétot, Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* using intermediates of fatty acid beta-oxidation, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5254–5260.
- [27] Y. Poirier, N. Erard, J. MacDonald-Comber Petétot, Synthesis of

- polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol. Lett.* 207 (2002) 97–102.
- [28] Y. Poirier, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 131–155.
- [29] S. Marchesini, N. Erard, T. Glumoff, J.K. Hiltunen, Y. Poirier, Modification of the monomer composition of polyhydroxyalkanoate synthesized in *Saccharomyces cerevisiae* expressing variants of the beta-oxidation-associated multifunctional enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 6495–6499.
- [30] S. Marchesini, Y. Poirier, Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal beta-oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 32596–32601.
- [31] J. Robert, S. Marchesini, S. Delessert, Y. Poirier, Analysis of the β -oxidation of trans unsaturated fatty acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a peroxisomal PHA synthase reveals the involvement of a reductase-dependent pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1734 (2005) 169–177.
- [32] R.D. Gietz, A. Sugino, New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites, *Gene* 74 (1988) 527–534.
- [33] D. Gietz, A. St Jean, R.A. Woods, R.H. Schiestl, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 1425.
- [34] A. Gurvitz, B. Hamilton, H. Ruis, A. Hartig, J.K. Hiltunen, Degradation of conjugated linoleic acid isomers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1533 (2001) 81–85.
- [35] X. Liang, D. Zhu, H. Schulz, $\Delta^{3,5,7}, \Delta^{2,4,6}$ -trienoyl-CoA isomerase, a novel enzyme that functions in the β -oxidation of polyunsaturated fatty acids with conjugated double bonds, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13830–13835.

Capítulo III

In vivo* contribution of the enzyme $\Delta^{3,5}$, $\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase to the β -oxidation of unsaturated fatty acid in *Saccharomyces cerevisiae

***FEBS Letters* (submetido para publicação)**

In vivo contribution of the enzyme $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase to the β -oxidation of unsaturated fatty acid in *Saccharomyces cerevisiae*.

Heique Bogdawa^{1,2}, Silvia Marchesini¹, João Antonio Pêgas Henriques² and Yves Poirier¹#

¹Département de Biologie Moléculaire Végétale, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland, ²Laboratório de Radiobiologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia Prédio 43421, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil,

#Corresponding author : Yves Poirier

Tel : +41 21 692 4222

Fax : +41 21 692 4195

Email : yves.poirier@unil.ch

Key words: β -oxidation, oleic acid, peroxisome, *Saccharomyces cerevisiae*, dienoyl-CoA isomerase

Summary

The contribution of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase (Dci1p) to the β -oxidation of fatty acids with odd-numbered *cis* unsaturated bonds was analyzed *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring polyhydroxyalkanoate production from the polymerization 3-hydroxyacyl-CoAs via a bacterial polyhydroxyalkanoate synthase. Comparison of polyhydroxyalkanoate quantity and monomer composition between wild type and *dci1* Δ mutant revealed that only a small carbon flux through a pathway requiring the participation of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase for the β -oxidation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid occurred *in vivo*. This flux was not influenced by overexpression of the genes encoding the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase, Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase or the 2,4-dienoyl-CoA reductase.

1. Introduction

In contrast to the degradation of saturated fatty acids, which can be mediated completely by the four enzyme activities of core β -oxidation cycle, namely the acyl-CoA oxidase (in peroxisomes) or acyl-CoA dehydrogenase (in mitochondria), enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and 3-ketoacyl-CoA thiolase, the degradation of several types of unsaturated fatty acids has been shown to require the presence of auxiliary enzymes [1-3]. Degradation of fatty acids having a *cis* double bonds on an odd carbon, such as oleic acid (9-*cis*-octadecenoic acid) yields a 2-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA intermediate, which can be metabolized by three distinct routes [4-8]. One pathway, named the isomerase-dependent pathway, involves one further round through the core β -oxidation to give 3-*cis*-enoyl-CoA that is converted to 2-*trans*-enoyl-CoA by the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. In the second route, named the reductase-dependent pathway, the 2-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA is first metabolized to the conjugated intermediate 3-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA by the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase, which is then converted to 2-*trans*,4-*trans*-dienoyl-CoA by the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase. This later intermediate is then converted to 3-*trans*-enoyl-CoA and 2-*trans*-enoyl-CoA by the stepwise action of the 2,4-dienoyl-CoA reductase and the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. In the third route, referred as the direct multifunctional enzyme [MFE]-pathway (also previously named the di-isomerase-dependent pathway), the intermediate 2-*trans*,5-*cis*-dienoyl-CoA is also first metabolized to the conjugated intermediate 2-*trans*,4-*trans*-dienoyl-CoA via the successive action of Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase and $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase, but the intermediate 2-*trans*,4-*trans*-dienoyl-CoA then directly enters into the core β -oxidation via the enoyl-CoA hydratase activity of the multifunctional enzyme. Thus, of the three alternative routes involved in the degradation of oleic acid, only the

reductase-dependent and the direct MFE-dependent pathways require the participation of the auxiliary enzyme $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase.

Although the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase appears well conserved in a broad spectrum of organisms, its physiological contribution to fatty acid metabolism remains poorly defined. Studies with animal mitochondria have yielded conflicting results as to the relative contribution of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase to the degradation of oleic acid. An estimate of the degradation of 5-*cis*-tetradecenoyl-CoA, an intermediate of oleic acid β -oxidation, gave values of 65-85% flux through the reductase-dependent pathway in intact mitochondria from liver or heart, respectively [9]. In contrast, studies with solubilized rat heart mitochondria demonstrated that more than 80% of oleate β -oxidation occurs via the isomerase-dependent pathway [4,6]. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase was found to be non-essential for the degradation of oleic acid, with strain deficient in this enzyme activity being indistinguishable compared to wild type in its ability to grow in liquid media containing oleic acid as the main carbon source or to form a clearing zone around colonies growing on solid turbid media containing oleic acid dispersed with Tween-80 [5,10].

In this study, we have used the synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) in the peroxisome of *S. cerevisiae* as an alternative method to monitor the *in vivo* flux through the pathways involved in the degradation of fatty acids having a *cis* double bonds on an odd-numbered carbon. PHAs are polymers of R-3-hydroxyalkanoic acids that are synthesized from the polymerization of 3-hydroxyacyl-CoA intermediates generated by the β -oxidation of fatty acids [11-13]. PHA has been previously shown to be a valuable indicator of the flux of carbon

through the peroxisomal β -oxidation pathway in recombinant *S. cerevisiae* expressing a PHA synthase from *Pseudomonas aeruginosa* modified for peroxisomal targeting [14-18].

2. Materials and methods

2.1 Strains, plasmids and culture conditions

Wild type *S. cerevisiae* strain BJ1991 (*mat α leu2 ura3-52 trp1 pep4-3 prbq-1122*) as well as the isogenic mutant *dci1* Δ (*dci1* Δ ::*kanMX4*) have previously been described [5]. The wild type *S. cerevisiae* strain BY4742 (*mat α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*) and the isogenic mutants Δ *dci1*, Δ *eci1*, and Δ *sps19* were obtained from EUROSCARF (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>).

The plasmid pYES352-PHA, containing the gene for the PHAC1 synthase from *P. aeruginosa*, modified at the carboxy end by the addition of a peroxisomal targeting sequence and placed under the control of the catalase A (CTA1) promoter and terminator, has been previously described [17]. All strains used in this study contained the pYES352-PHA plasmid.

For studies aimed at overexpressing the *Eci1*, *Sps19* and *Dci1* genes, the protein coding sequences of the respective genes were amplified by PCR using high-fidelity PfuI polymerase and the following oligonucleotides generating novel and unique restriction enzyme sites at the 5' and 3' end of the genes: *Eci1*, 5'-ACCGGATCCATGTCGCAAGAAATT-3' and 5'-ACCGAATTCATAAACGATGCTTCCTT-3'; *Dci1*, 5'-TAAGGATCCACTATGAGCAGTCGT-3' and 5'-TATGAATTCCTATCTCTAAATGCTATA-3'; *Sps19*, 5'-TAAGGATCCTATGTTTCGAGTCATG-3' and 5'-TAAGAATTCAGTACTCAATACCTATAC-3'. Each PCR fragment was digested with the appropriate restriction enzyme and then cloned in the multicopy plasmid pGPD-423, putting the genes under the control of the constitutive

glycerol-3-phosphate dehydrogenase promoter [19]. All strains were transformed with the various plasmids by the lithium acetate procedure [20].

S. cerevisiae strains were maintained in YND media (0.67% yeast nitrogen base without amino acids [Difco, Detroit, MI], 0.5% ammonium sulfate, 2% dextrose and 0.69 g/L of the appropriate drop-out supplement [BD Biosciences, Mountain View, CA]). For experiments analyzing PHA synthesis, a stationary phase culture was harvested by centrifugation, cells were washed once in water and resuspended at a 1:10 dilution in fresh media containing 0.1% (w/v) glucose, 2% Pluronic-127 (w/v) (Sigma, St-Louis, MO) and 0.05% (v/v) fatty acids. Cells were grown for an additional 3 days before harvesting them for PHA analysis or RNA extraction. Oleic acid and 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid ($\geq 99\%$ purity) were purchased from Nu-Check-Prep (Elysian, MN).

2.2 Analysis of PHA

PHA was analyzed as previously described [17]. PHA produced in yeast includes 3-hydroxyacid monomers ranging between 5 and 14 carbons in length because of the chain-length specificity of the PHA synthase of *Pseudomonas aeruginosa* [11,12]. Because this study was focused on the degradation of the odd-chain fatty acid 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid, the analysis of PHA produced from β -oxidation was limited to odd-chain monomers.

2.3 Analysis of the expression level of *Eci1*, *Sps19* and *Dci1* by RT-PCR.

BY4742 cells expressing the peroxisomal PHA synthase and transformed with the plasmids p423-GPD, p423-GPD-*Eci1*, p423-GPD-*Dci1*, or p423-GPD-*Sps19*, were grown until stationary phase in selective medium with 2% of glucose, harvested by centrifugation, washed

once in water and resuspended at a 1:10 (v/v) dilution in fresh selective media containing 0.1% (w/v) glucose, 2% Pluronic-127 (w/v) (Sigma, St-Louis, MO) and 0.1% (v/v) of oleic acid. Cells were grown for 24 hours before harvesting for the total RNA extraction procedure according to Iyer and Struhl [21]. Equal amounts of total RNA (3 ug) previously treated with DNase amplification grade (Invitrogen, Carlsbad, CA) were subjected to first strand cDNA synthesis using the specific antisense primers located at the 3' ends of the *Eci1* (5'-TCAGCGTTTGAAGATGGCAT-3'), *Sps19* (5'-TGGAGCAATGCAATTCGAAC-3') and *Dci1* (5'-CACTTTTCGGATAAAGCCCTT-3') genes, using the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR was carried out with *Taq* DNA polymerase on the first strand cDNA synthesis reaction using the previously described antisense primers combined with the sense primers for *Eci1* (5'-AAAAGCCCAAGGGGATGATA-3'), *Sps19* (5'-TGGCTATTGCAAACGTCG-3') and *Dci1* (5'-TCCTCGGGAGGTAAGTTTTCA-3') genes. The size of the RT-PCR fragments generated were 393, 382 and 477 bp for the *Eci1*, *Sps19*, and *Dci1* genes, respectively. The PCR reaction temperatures and number of cycles were the same for all genes, namely one cycle of 94°C for 2 min followed by 23 cycles of 94°C for 15 s/ 48°C for 15 s/ 72°C for 1 min.

3. Results

Because most 3-hydroxyacyl-CoA intermediates generated from the β -oxidation of even-chain fatty acids with odd-numbered *cis* unsaturated bonds, such as oleic acid (9-*cis*-octadecenoic acid), cannot be distinguished from intermediates generated by the degradation of the yeast endogenous fatty acids, including oleic acid and palmitic acid, the fatty acid 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid, generating odd-chain 3-hydroxyacyl-CoA intermediates, was used. Four complete turns of the β -oxidation cycle involving the participation of the auxiliary enzymes Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase (Eci1p) and 2,4-dienoyl-CoA reductase (Sps19p), to metabolize the first unsaturated bond in the *cis* conformation on an even-numbered carbon, leads to the intermediate 5-*cis*-undecenoyl-CoA, which can be oxidized by the acyl-CoA oxidase to 2-*trans*-5-*cis*-undecadienoyl-CoA. Based on the current knowledge of the activity of *S. cerevisiae* auxiliary enzymes involved in β -oxidation of unsaturated fatty acids, the further metabolism of 2-*trans*-5-*cis*-undecadienoyl-CoA could occur via several partially overlapping pathways (Figure 1). Importantly, the pathways involved in the metabolism of 5-*cis*-undecenoyl-CoA can be distinguished by the nature of the 11-carbon 3-hydroxyacyl-CoA generated. Thus, in the isomerase-dependent pathway, the intermediate 3-hydroxy,5-*cis*-undecenoyl-CoA is generated, while the intermediate 3-hydroxyundecanoyl-CoA and 3-hydroxy,4-*trans*-undecenoyl-CoA are generated by the reductase-dependent and direct MFE-dependent pathways, respectively, the later two pathways requiring the participation of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase (Dci1p) (Figure 1). While the intermediates 3-hydroxy,5-*cis*-undecenoyl-CoA and 3-hydroxyundecanoyl-CoA are substrates for the bacterial PHA synthase, 3-hydroxyacyl-CoAs with *cis* or *trans* unsaturated bond on the fourth carbon, such as 3-hydroxy,4-*trans*-undecenoyl-CoA, are known to be very poor substrates for the PHA synthase [18,22,23]. PHA analysis cannot, therefore, directly reveal the presence of the pathway direct MFE-dependent pathway. However, the presence of the monomer 3-

hydroxy,5-*cis*-undecenoic acid and 3-hydroxyundecanoic acid are markers of the carbon flux through the isomerase-dependant and reductase-dependent pathways, respectively.

PHA synthesized in wild type BJ1999 and the isogenic *dci1* Δ mutant cells from the β -oxidation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid added to the media was analyzed and compared (Figure 2). A small but statistically significant (t-test $p < 0.05$) increase in PHA produced in *dci1* Δ mutant was observed. For both strains, the major PHA monomer was H11:1 (3-hydroxyacid monomers are identified with the prefix H, followed by the number of carbon and the number of unsaturated bonds) reaching 68 mol% in wild type cells and increasing slightly but significantly (t-test $p < 0.05$) to 74 mol% in the Δ *dci1* mutant. The monomer H11:0 was found at approximately 1 mol% only in the wild type strains, while the same monomer was undetectable in the Δ *dci1* strains. Similar results were obtained with wild type and Δ *dci1* cells in the BY4742 genetic background (data not shown). No significant differences were observed in PHA quantity or monomer composition between wild type or mutant strains deficient in peroxisomal proteins unrelated to the auxiliary enzymes, such as the catalase A (*cta1* Δ) or citrate synthase (*cit2* Δ), indicating that the absence of the H11:0 monomer in the *dci1* Δ was specific to the absence of the Dci1p protein and not linked to any defect in peroxisomal proteins (data not shown).

No PHA was synthesized in Δ *eci1* or Δ *sps19* mutant cells from the β -oxidation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid (data not shown). These results are in agreement with the requirement of the Eci1p and Sps19p enzymes for the metabolism of fatty acids with a *cis* unsaturated bond on an even-numbered carbon, the first double bond encountered by the β -oxidation cycle in the degradation 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid [18].

In order to determine if the relative carbon flux through the isomerase-dependent or the reductase-dependent pathways could be modulated by changing the expression levels of the various auxiliary enzymes, the *Dci1*, *Eci1* and *Sps19* genes were cloned in the multicopy shuttle plasmid pGPD-423, putting the genes under the control of the constitutive glycerol-3-phosphate dehydrogenase promoter. Overexpression of the genes in wild type cells transformed with the relevant plasmids was monitored by semi-quantitative RT-PCR. Figure 3 shows that the expression level of the *Dci1*, *Eci1* and *Sps19* genes in cells grown in media containing fatty acids was enhanced by the presence of the corresponding gene on the pGPD-423 multicopy plasmids. Appropriate activity of the proteins encoded by the various plasmids was tested through complementation of the corresponding mutants. Thus, as recently reported, the mutants *eci1* Δ and *sps19* Δ could metabolize 10-*cis*-heptadecenoic acid and synthesize PHA only when complemented by the multicopy plasmid containing the *Eci1* and *Sps19* genes, respectively (data not shown) [18]. Furthermore, the *dci1* Δ strain transformed with the *Dci1* gene construct could synthesize a PHA containing the H11:0 monomer when grown in media containing 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid (data not shown). Wild type BY4742 cells transformed with the peroxisomal PHA synthase and overexpressing the *Eci1*, *Sps19*, or *Dci1* genes produced a PHA, when grown in media containing 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid, with a monomer composition that was not significantly different from wild type cells expressing only the PHA synthase (Figure 4).

4. Discussion

The presence of the H11:1 and H11:0 monomers in PHA derived from 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid reveal metabolism of the fatty acid via both the isomerase-dependent and reductase-dependent pathways, respectively. The absence of the H11:0 monomer in PHA synthesized in the *dci1* Δ mutant is a further confirmation that the intermediate 3-hydroxyundecanoyl-CoA is synthesized via the reductase-dependent pathway. The fact that the H11:1 is the predominant monomer compared to H11:0, and that the total amount of PHA and overall monomer composition is only slightly affected in the *dci1* Δ mutant, particularly the absence of the H11:0 monomer and slight increase in the H11:1 monomer, both indicate that the isomerase-dependent pathway is the predominant pathway used for the degradation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid. Carbon flux could also potentially occur through the direct MFE-dependent pathway, generating the intermediate 3-hydroxy,4-*trans*-undecenoyl-CoA, which cannot be detected in PHA. However, recent experiments looking at the synthesis of PHA in wild type *S. cerevisiae* and *eci1* Δ , *sps19* Δ and *dci1* Δ mutants from the degradation of 10-*trans*-heptadecenoic acid revealed that the metabolism of the intermediate 2-*trans*,4-*trans*-dienoyl-CoA occurred principally through a reductase-dependent pathway instead of a direct MFE-dependent pathway [18]. Thus, the intermediate 2-*trans*,4-*trans*-undecadienoyl-CoA that would be generated by the action of the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase would be principally metabolized via the reductase-dependent pathway.

The $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase has previously been found to be non-essential for the degradation of oleic acid, with strain deficient in this enzyme activity being indistinguishable compared to wild type in its ability to grow in media containing oleic acid as the main carbon source [5,10]. Such results are in accord with the present conclusion that degradation of fatty

acids with odd-numbered *cis* unsaturated bonds, such as oleic acid or 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid, occur primarily via the isomerase-dependent pathway. However, the presence of the H11:0 monomer, dependent on the activity of Dci1p, in PHA derived from 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid degradation clearly indicate that some carbon flux via the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase does occur in *S. cerevisiae*.

Previous studies with extracts from rat heart mitochondria revealed that more than 80% of oleic acid β -oxidation occurs via the isomerase-dependent pathway [4,6]. A major reason for the limited flux via the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase in that system was the very rapid decrease in the concentration of 2-*trans*,5-*cis*-tetradecadienoyl-CoA due to its hydration by the enoyl-CoA hydratase, thus limiting the rate of isomerization to 3-*trans*,5-*cis*-tetradecadienoyl-CoA by the Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase [6]. Despite this, the intermediate 2-*trans*,4-*trans*-tetradecadienoyl-CoA could be found to accumulate during the β -oxidation of 2-*trans*,5-*cis*-tetradecadienoyl-CoA, indicating that the reaction catalyzed by the 2,4-dienoyl-CoA reductase may limit the flux through the reductase-dependent pathway even though the entry into this pathway is already restricted by the competition with the dominant isomerase-dependent pathway [6]. In *S. cerevisiae*, the flux through the $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase did not appear to be influenced by the over-expression of *Eci1*, *Sps19* or *Dci1* genes since no significant effects on PHA quantity or monomer composition were observed in cells over-expressing these genes. Although these results do not directly reveal what is the determining factor influencing the carbon flux through the various alternative pathways in *S. cerevisiae*, they nevertheless reveal that the expression level of the genes encoding the auxiliary enzymes is not a limiting factor.

Acknowledgements

This research was funded, in part, from the Etat de Vaud, the Université de Lausanne, and a grants from the Fonds National Suisse (grant # 3100A0-105874) and the Herbette Foundation to YP, as well as a as well as a fellowship from the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to HB. The authors are grateful to Aner Gurvitz (Vienna Biocenter, Vienna, Austria) for providing some of the yeast strains used in this study.

References

- [1] Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J. and Gurvitz, A. (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 35-64.
- [2] Kunau, W.H., Dommes, V. and Schulz, H. (1995) beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* 34, 267-342.
- [3] van Roermund, C.W., Waterham, H.R., Ijlst, L. and Wanders, R.J. (2003) Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1838-51.
- [4] Shoukry, K. and Schulz, H. (1998) Significance of the reductase-dependent pathway for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds. Mitochondrial metabolism of 2-trans-5-cis-octadienoyl-CoA. *J. Biol. Chem.* 273, 6892-6899.
- [5] Gurvitz, A., Mursula, A.M., Yagi, A.I., Hartig, A., Ruis, H., Rottensteiner, H. and Hiltunen, J.K. (1999) Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the beta-oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of YOR180c/DCI1 encoding peroxisomal delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase. *J. Biol. Chem.* 274, 24514-24521.
- [6] Ren, Y. and Schulz, H. (2003) Metabolic functions of the two pathways of oleate β -oxidation double bond metabolism during the β -oxidation of oleic acid in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 278, 111-116.
- [7] Tserng, K.-Y. and Jin, S.-J. (1990) NADPH-dependent pathway for the β -oxidation of oleic acid. *J. Biol. Chem.* 266, 11614-11620.

- [8] Smeland, T.E., Nada, M., Cuebas, D. and Schulz, H. (1992) NADPH-dependent beta-oxidation of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6673-6677.
- [9] Tserng, K.-Y., Jin, S.-J. and Chen, L.-S. (1996) Reduction pathway of *cis*-5 unsaturated fatty acids in intact rat-liver and rat-heart mitochondria: assessment with stable-isotope-labelled substrates. *Biochem. J.* 313, 581-588.
- [10] Geisbrecht, B.V., Schulz, K., Nau, K., Geraghty, M.T., Schulz, H., Erdmann, R. and Gould, S.J. (1999) Preliminary characterization of Yor180Cp: identification of a novel peroxisomal protein of *Saccharomyces cerevisiae* involved in fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 28-34.
- [11] Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C. (1995) Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/technology* 13, 142-150.
- [12] Steinbüchel, A. and Fuchtenbusch, B. (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* 16, 419-427.
- [13] Poirier, Y. (2002) Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 41, 131-55.
- [14] Marchesini, S. and Poirier, Y. (2003) Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal beta-oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 32596-32601.
- [15] Marchesini, S., Erard, N., Glumoff, T., Hiltunen, J.K. and Poirier, Y. (2003) Modification of the monomer composition of polyhydroxyalkanoate synthesized in *Saccharomyces cerevisiae* expressing variants of the beta-oxidation-associated multifunctional enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6495-6499.

- [16] Poirier, Y., Erard, N. and MacDonald-Comber Petétot, J. (2002) Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Lett. 207, 97-102.
- [17] Poirier, Y., Erard, N. and MacDonald-Comber Petétot, J. (2001) Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* using intermediates of fatty acid β -oxidation. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5254-5260.
- [18] Robert, J., Marchesini, S., Delessert, S. and Poirier, Y. (2005) Analysis of the β -oxidation of trans unsaturated fatty acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a peroxisomal PHA synthase reveals the involvement of a reductase-dependent pathway. Biochim. Biophys. Acta in press.
- [19] Mumberg, D., Müller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156, 119-122.
- [20] Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 20, 1425.
- [21] Iyer, V. and Sruhl, K. (1996) Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5208-5212.
- [22] Mittendorf, V., Robertson, E.J., Leech, R.M., Krüger, N., Steinbüchel, A. and Poirier, Y. (1998) Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid β -oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13397-13402.
- [23] Mittendorf, V., Bongcam, V., Allenbach, L., Coullerez, G., Martini, N. and Poirier, Y. (1999) Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow through β -oxidation. Plant J. 20, 45-55.

Figure legends

Figure 1. Potential pathways for the degradation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid in the peroxisome of *S. cerevisiae*. All 3-hydroxy-acyl-CoA intermediates of 11 and 9 carbons generated by the degradation of 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid are indicated in bold, with substrates for the PHA synthase being additionally underlined. Pox1p, acyl-CoA oxidase; Fox2p, multifunctional protein (MFE); Fox3p, 3-ketothiolase; Sps19p, 2,4-dienoyl-CoA reductase; Eci1p, Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase; Dci1p, $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase. The nomenclature used is : position and conformation of the double bond (t for *trans* and c for *cis*) or position of the hydroxy group (h), followed by the number of carbons of the aliphatic chain of the CoA ester (thus 5c-C11 is 5-*cis*-undecenoyl-CoA and 3h,5c-C11 is 3-hydroxy,5-*cis*-undecenoyl-CoA).

Figure 2. Synthesis of PHA in *S. cerevisiae* grown in media containing 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid. Wild type and *dci1* Δ cells in the BJ1991 genetic background were used. The amount of PHA synthesized for the different treatments is indicated below each histogram ([weight PHA/cell dry weight] x 10⁻⁴). The y axis represents the proportion of each odd-chain PHA monomer in mol%. Values are average \pm standard deviation (n \geq 3).

Figure 3. Overexpression of the *Eci1*, *Sps19* and *Dci1* genes in *S. cerevisiae*. Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed using RNA isolated from wild type BY4742 cells transformed with the plasmids pGPD-423 (A), pGPD-423-Dci1 (B), pGPD-423-Eci1 (C), and pGPD-423-Sps19(D). The *Eci1*, *Sps19* and *Dci1* transcripts were amplified by RT-PCR using gene-specific oligonucleotides as described in the Materials and Methods. Total RNA (lower panel) was isolated from cells grown in media containing 0.1% oleic acid for 24 h.

Figure 4. Synthesis of PHA in *S. cerevisiae* overexpressing the *Eci1*, *Sps19*, or *Dci1* genes and grown in media containing 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic acid. Wild type BY4742 cells transformed with the following plasmids are shown: white bar, pGPD-423 control vector; grey bar, pGPD-423-*Eci1*; black bar, pGPD-423-*Sps19*; hatched bar, pGPD-423-*Dci1*. All strains were grown in media containing 0.05% 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienoic. The y axis represents the proportion of each PHA monomer in mol%. Values are average \pm standard deviation ($n \geq 3$).

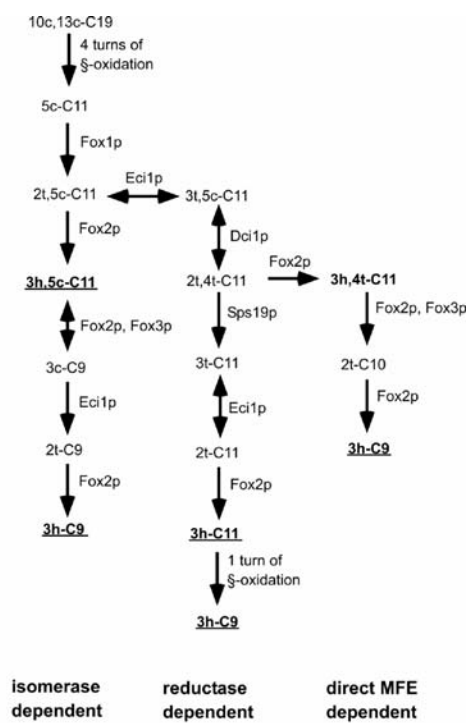


Figure 1

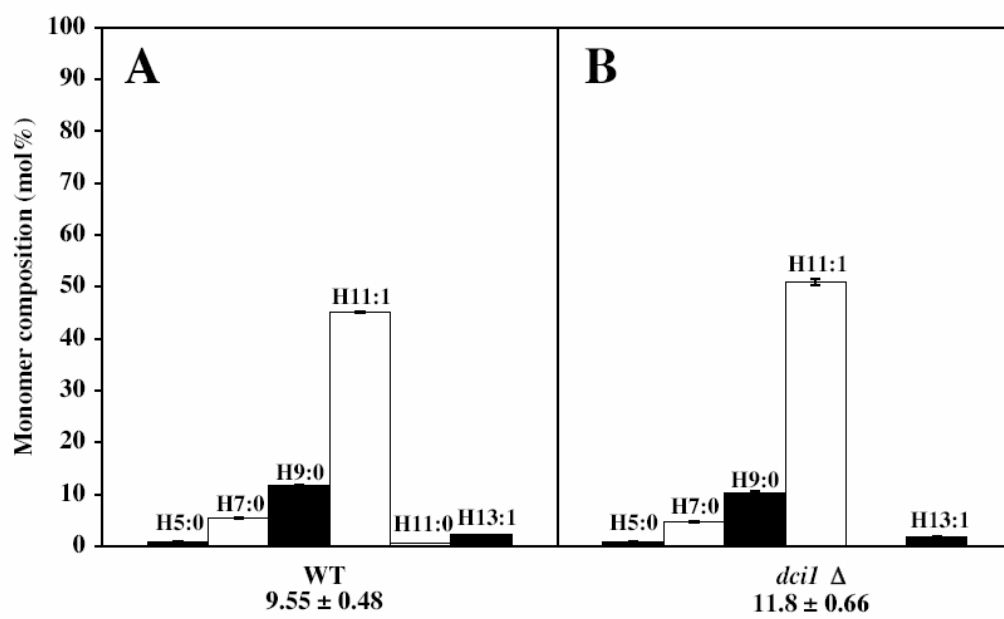


Figure 2

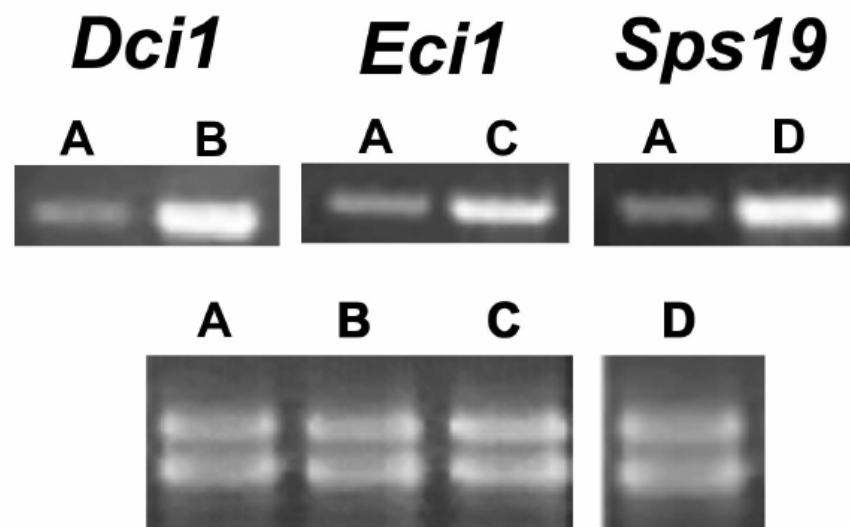


Figure 3

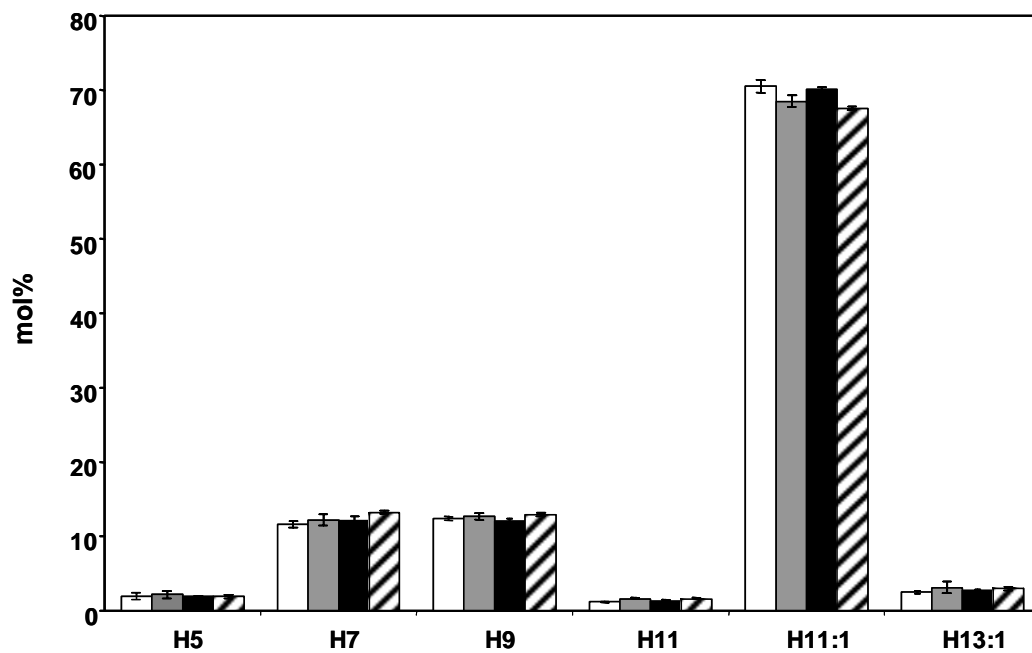


Figure 4

III - DISCUSSÃO

3. Discussão

3.1. Expressão de PhaG_{Pa} e PhaC1_{Pa} em *S. cerevisiae*: tentativa de estabelecer a conexão entre biossíntese de ácidos graxos e produção de PHA-MCL

A vantagem da produção de PHA a partir de intermediários da biossíntese de ácidos graxos, ao invés de substratos derivados da β -oxidação, é a possibilidade de utilizar meios de cultura que não necessitam da adição de inibidores da degradação de ácidos graxos nem o uso de linhagens deficientes em β -oxidação. Além disso, a utilização de glicose ou açúcares relacionados diminui consideravelmente os custos da produção de PHA. Assim, a universalidade das reações envolvidas na biossíntese de ácidos graxos torna este metabolismo bastante explorável para a produção de biopolímeros do tipo PHA.

A proteína PhaG foi identificada como sendo a enzima responsável pelo elo metabólico entre a síntese de ácidos graxos e a síntese de PHA-MCL em bactérias do gênero *Pseudomonas* (Rehm *et al.*, 1998, 2001; Fiedler *et al.*, 2000, Matsumoto *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2000a,b; 2002). Essas bactérias, quando multiplicadas em meios contendo carboidratos, desviam intermediários da síntese de ácidos graxos para servirem de substrato para a PHA-sintase. No entanto, estes metabólitos estão na forma de 3-hidroxiacil-ACP e devem ser convertidos em tioésteres de R-3-hidroxiacil-CoA. O gene *phaG* codifica uma 3-hidroxiacil-ACP-CoA-transacilase, a qual catalisa a transferência reversível da porção R-3-hidroxiacil do tioéster ACP para CoA (Rehm *et al.*, 1998).

A produção de PHA-MCL a partir de uma fonte de carbono não-relacionada como gliconato foi evidenciada em linhagens recombinantes de *P. fragi* pela co-expressão de PhaG_{pp} e PhaC_{pa}. Esta espécie de *Pseudomonas* não é capaz de acumular

naturalmente PHA em qualquer fonte de carbono, mesmo existindo a atividade de uma PHA-sintase (Fiedler *et al.*, 2000). Em *P. oleovorans*, a síntese de PHA-MCL ocorre exclusivamente na presença de ácidos graxos (fonte de carbono relacionada). Linhagens desta bactéria expressando PhaG foram capazes de acumular PHA-MCL quando cultivadas em gliconato (Rehm *et al.*, 1998). Estes dados mostram que a atividade de transacilase de PhaG pode restabelecer a síntese de PHA a partir dos intermediários desviados da síntese de ácidos graxos em meio de crescimento contendo fontes de carbono simples.

Como *P. fragi*, *E. coli* não é capaz de acumular naturalmente PHA, e a produção de PHA-MCL neste procaríoto modelo tem tido bastante limitada a fontes de carbono relacionadas como decanoato e dodecanoato (Lagenbach *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2002). A síntese em fontes de carbono não-relacionadas apresenta uma baixa eficiência e são poucos os estudos que abordam esta dificuldade (Lagenbach *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1997; Klinke *et al.*, 1999; Rehm e Steinbüchel, 2001; Rehm *et al.*, 2001).

No trabalho apresentado no Capítulo I foram geradas cepas recombinantes da levedura *S. cerevisiae* expressando PhaG e PhaC de *P. aeruginosa* para verificar se o desvio de intermediários da biossíntese de ácidos graxos pode levar à produção de PHA-MCL nesse eucarioto (Capítulo I). Duas construções plasmidiais contendo *phaC_{Pa}* foram utilizadas, uma capaz de enviar a enzima para o local de degradação de ácidos graxos em leveduras (peroxissomo), e outra capaz de promover a expressão de PhaC_{Pa} no citoplasma. Os dois vetores foram introduzidos em uma linhagem selvagem de *S. cerevisiae* e as células foram multiplicadas em meio contendo ácido oléico (18:1 Δ 9*cis*) ou rafinose.

As cepas contendo PhaC_{Pa} citoplasmática apresentaram uma produção de PHA-MCL em torno de 10 vezes menor do que em linhagens contendo a sintase

peroxissomal. Entre as fontes de carbono utilizadas, não houve diferença significativa na síntese de PHA-MCL. A composição do polímero não foi muito distinta entre as linhagens, variando entre 6 e 14 carbonos em meio com ácido oléico, e entre 6 a 12 carbonos em meio com rafinose (Tabela 1, Capítulo I).

Os monômeros encontrados no PHA formado em meio com ácido oléico estão de acordo com a degradação de ácidos graxos contendo uma ligação *cis* em carbonos ímpares (H6:0, H8:0, H10:0, H12:0, H14:1 e H14:0; Gurvitz *et al.*, 1999) e com a produção de PHA-MCL em *S. cerevisiae* expressando a mesma PHA-sintase (Marchesini e Poirier, 2003, Poirier *et al.*, 2001).

A síntese de PHA em carboidratos demonstra que os ácidos graxos intracelulares entre 6 a 12 carbonos são utilizados pela sintase. A ausência dos monômeros H14:1 e H14:0 observada em meio com rafinose já havia sido descrita para a mesma fonte de carbono e glicose (Marchesini e Poirier, 2003). Os ácidos graxos que compõem as membranas de *S. cerevisiae* são principalmente ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (C18:0) e ácido oléico (C18:1). Ácidos graxos menores ou iguais a 14 carbonos representam menos de 2% do conteúdo celular (Daum *et al.*, 1998). Assim, pode-se inferir que a composição do PHA em meio contendo rafinose deriva do fluxo intracelular de ácidos graxos ao invés de um *turnover* daqueles que compõem as membranas celulares.

Seria esperado que a síntese de PHA-MCL em meio com ácido oléico fosse maior do que em meio com rafinose nas linhagens de *S. cerevisiae* expressando *phaC_{pa}* peroxissomal. O fluxo de carbonos ao longo da β -oxidação deveria ser elevado, uma vez que as células dependem do ácido graxo adicionado ao meio de cultura para a multiplicação celular. Embora o PHA formado nestas cepas não represente necessariamente o fluxo direto de carbonos que percorre a β -oxidação, existe um fluxo

de ácidos graxos de cadeia curta e média liberados prematuramente pelo complexo da ácido graxo sintase I (*Fatty Acid Synthase I* ou FASI), servindo como substrato para a PhaC_{Pa}. Esta liberação antecipada foi denominada de “ciclo fútil de ácidos graxos de cadeia curta e média”, e o mecanismo molecular envolvido neste evento ainda não foi elucidado em *S. cerevisiae* (Marchesini e Poirier, 2003). Foi demonstrado que o complexo multienzimático FASI purificado libera preferencialmente, *in vitro*, ácidos graxos de cadeia longa, mas que a proteína ligadora de acil-CoA (*Acyl-CoA Binding Protein* ou ACBP1) em leveduras desempenha um papel importante na liberação de acil-CoAs de comprimento médio do FASI (Schjerling *et al.*, 1996). Portanto, a natureza do PHA formado em cepas multiplicadas em meio com rafinose indica que a liberação prematura de acil-CoAs de cadeias curta e média é muito mais significativa do que a observada em experimentos *in vitro* sobre a composição dos lipídeos de membrana de leveduras (Marchesini e Poirier, 2003).

Pode-se afirmar que a análise do conteúdo e da quantidade de PHA sintetizada em linhagens co-expressando PhaG_{Pa} e PhaC_{Pa} (peroxissomal ou citoplasmática) em meios contendo rafinose ou ácido oléico não mostrou qualquer alteração quando comparada às cepas com apenas PhaC_{Pa} (Tabela 1, Capítulo I). Uma vez que PhaG_{Pa} possui afinidade ao substrato R-3-hidroxidecanoil-CoA (H10:0), seria esperado o aumento deste tioéster na composição do polímero, tanto derivado da PHA-sintase citoplasmática quanto da forma peroxissomal. Além disso, a maior síntese em cepas contendo a transacilase e a sintase direcionada ao peroxissomo indicaria um maior fluxo de 3HD-CoA para o interior desta organela.

Foi demonstrado que a co-expressão de PhaG e PhaC em *E. coli* não permite a síntese de PHA-MCL em gliconato, mesmo quando mutantes para a degradação de ácidos graxos foram utilizados (mutantes *fad*). O uso de triclosan no meio de cultivo,

um inibidor da enzima enoil-ACP redutase (FabI), possibilitou a formação de cerca de 3% do polímero em presença de gliconato como fonte de carbono (Rehm *et al.*, 2001). Os autores acreditam que o fluxo de carbono que percorre a síntese de ácidos graxos, ou seja, o *pool* de intermediários formados, é crucial para a formação de PHA-MCL, e que a síntese de ácidos graxos em espécies de *Pseudomonas* é diferente de *E. coli* (Rehm *et al.*, 2001). Levando-se em consideração esta hipótese, pode-se postular que realmente existam diferenças na biossíntese e/ou na disponibilidade de intermediários derivados da síntese de ácidos graxos entre bactérias naturalmente produtoras de PHA e não-produtoras como, no caso, *E. coli*. Poderia-se considerar que o mesmo conceito é válido para a levedura *S. cerevisiae*.

O mais intrigante nesse tema é que a formação extracelular de 3-hidroxiacetato (3HB) em linhagens recombinantes de *E. coli* expressando PhaG de *P. putida* em meio de cultura contendo frutose está descrita na literatura (Zheng *et al.*, 2004a,b). A produção de 3-hidroxiacetato (3HD) no meio de cultura foi atribuída à alta concentração intracelular de 3HD-CoA resultante da atividade de PhaG. Este desequilíbrio metabólico teria transportado o excesso de 3HD-CoA, convertido em 3HD, por meio de uma tioesterase (TesB), para fora da célula bacteriana. Os resultados descritos neste trabalho (Capítulo I) confirmam que PhaG possui atividade de R-3-hidroxiacetatoil-ACP-CoA transacilase, e a expressão heteróloga desta enzima pode ser empregada para a geração de certos compostos químicos de alto valor agregado como os ácidos hidroxiácidos (Zheng *et al.*, 2004a,b). No trabalho descrito no Capítulo I não foi averiguado se, no meio de cultura utilizado nos experimentos, existia 3HD, já que a disponibilidade de 3HD-CoA no meio intracelular serviria de substrato para a PHA-sintase de *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, a síntese de PHA-MCL no interior da célula. Se 3HD tivesse sido detectado extracelularmente, poderia-se sugerir que

PhaG_{Pa} estaria atuando como uma tioesterase. Mesmo que isto fosse verdadeiro, haveria um maior fluxo de 3HD para o interior do peroxissomo, com sua ativação para o tioéster 3HD-CoA pela ação da acil-CoA sintetase (Faa2p; Hiltunen *et al.*, 2003) e a degradação do mesmo seria evidenciada na composição do PHA-MCL. Além disso, os estudos feitos *in vitro* com PhaG mostraram claramente a sua atividade de transacilase, convertendo 3HD-ACP em 3HD-CoA (Rehm *et al.*, 1998). Na Figura 10, está representado um resumo do possível destino dos intermediários da síntese e/ou da degradação de ácidos graxos para a formação de PHA-MCL como consequência da atividade das enzimas PhaG_{Pa} e PhaC_{Pa} nas linhagens recombinantes utilizadas no presente estudo.

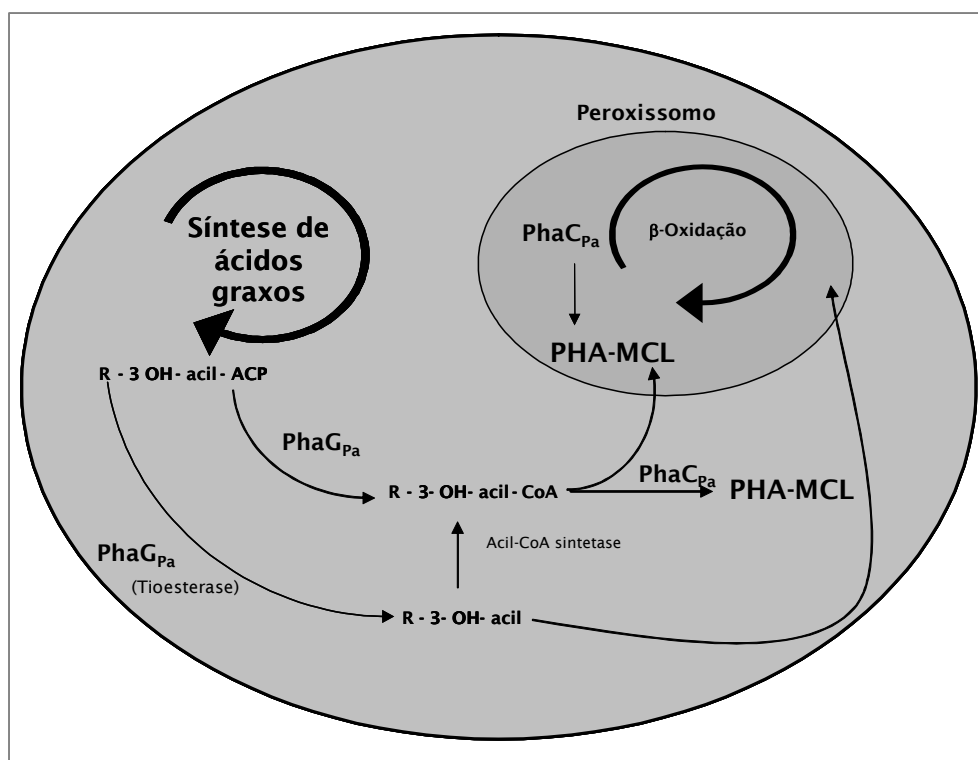


Figura 10. Provável desvio dos intermediários da síntese e/ou da β-oxidação de ácidos graxos em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* expressando os genes *phaG* e *phaC* de *P. aeruginosa* para a síntese de PHA-MCL. As linhagens expressando PhaC_{Pa} podem conter a enzima no citoplasma ou direcionada ao peroxissomo, e as com PhaG_{Pa} expressam a proteína somente no citoplasma. PhaG_{Pa} poderia desempenhar a atividade de uma tioesterase ao invés de transacilase.

Mesmo que a superexpressão de *phaG_{Pa}* em *S. cerevisiae* não tenha fornecido substratos para a síntese de PHA-MCL (presente estudo, Capítulo I), a expressão de transacilases para a síntese de PHA em fontes de carbono não-relacionadas foi demonstrado em *E. coli*. As enzimas 3-cetoacil-ACP sintase III (FabH) e malonil-CoA-ACP (FabD) possuem atividade de transacilase, convertendo acetil-CoA em acetil-ACP, e malonil-CoA em malonil-ACP, respectivamente (Magnuson *et al.*, 1993). *E. coli* deve valer-se destas enzimas para formar 3HB-CoA a partir do intermediário 3HB-ACP proveniente da síntese de ácidos graxos. A superexpressão de *fabH* e *fabD*, juntamente com *phaC* de *A. caviae* (PhaC_{Ac}) permitiu que células de *E. coli* acumulassem PHB a partir de seus cultivos em meio contendo glicose, mostrando que estas enzimas desempenham o mesmo papel de PhaG_{Pa} em *E. coli* (Tagushi *et al.*, 1999). As enzimas FabH e FabD estão presentes no genoma de *E. coli*, mas somente a expressão de PhaC_{Ac} não levou à produção de PHB. Isto ressalta a complexa regulação da primeira etapa da síntese de ácidos graxos, a formação de acetoacetil-ACP (Magnuson *et al.*, 1993). Somente a superexpressão destas enzimas pode suprimir este passo limítrofe da formação de ácidos graxos, resultando na síntese de PHB (Tagushi *et al.*, 1999). Portanto, em *E. coli*, FabH e FabD podem estabelecer a conexão entre biossíntese de ácidos graxos e produção de PHA.

Pelo presente estudo (Capítulo I), não é possível descartar a hipótese de que PhaG_{Pa} não tenha acesso ao seu substrato em organismos que apresentam o complexo FASI. Sendo um complexo contendo sete atividades enzimáticas somado à ACP, e distribuídas entre duas cadeias polipeptídicas multifuncionais (subunidades α e β) (Kuziora *et al.*, 1983), a conformação desse esqueleto impediria a atividade de PhaG. Pode-se sugerir que a incapacidade em aumentar a produção de PHA-MCL em cepas de *S. cerevisiae* expressando PhaG_{Pa} e PhaC_{Pa} cultivadas em meio contendo uma fonte de

carbono não-relacionada deva-se à ausência de alguma etapa enzimática para a formação de 3HA-CoAs a partir de 3HA-ACP presente em espécies naturalmente produtoras. Este passo é provavelmente crucial para o desvio de intermediários da síntese de ácidos graxos, não podendo, no entanto, interferir no metabolismo destes compostos na célula.

3.2. Síntese de PHA-MCL em *S. cerevisiae* como ferramenta para o estudo da β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos insaturados

A via de β -oxidação consiste basicamente em um metabolismo que envolve quatro reações enzimáticas que atuam nos carbonos 2 ou 3 de ésters de acil-CoA com o conseqüente encurtamento da cadeia de acil. Para permitir que diferentes variantes de grupos acil possam prosseguir ao longo da degradação, diferentes estratégias foram desenvolvidas como a evolução de enzimas parálogas que possuem distintas afinidades ao tamanho da cadeia de acil-CoA, compartimentalização em células eucariotas, controle do transporte de metabólitos através das membranas e o surgimento de enzimas auxiliares (revisado em Hiltunen e Qin, 2000).

O leque de uso e destino dos ácidos graxos no interior da célula dificulta o estudo de aspectos da bioquímica destas moléculas sem a interferência de outras funções fisiológicas. Em células de mamíferos, por exemplo, a β -oxidação de ácidos graxos ocorre em dois compartimentos celulares: peroxissomos e mitocôndrias. A interpretação dos resultados em experimentos com células de mamíferos é muitas vezes difícil e confusa pelo fato das duas organelas necessitarem de um conjunto distinto de enzimas (Eaton *et al.*, 1996). Portanto, o uso da levedura *S. cerevisiae* para estudar certos aspectos da β -oxidação de mamíferos é uma ferramenta de grande valor, uma vez que este metabolismo encontra-se confinado a um único compartimento celular, o

peroxissomo. A disponibilidade de diferentes mutantes bloqueados em vários passos da β -oxidação, e a possibilidade de repor estes genes com seqüências codificantes de mamíferos, permite inferir não somente aspectos básicos da biologia da degradação de ácidos graxos, como também servir de modelo *in vivo* para o estudo de proteínas causadoras de doenças metabólicas em mamíferos (Hettema e Tabak, 2000; Gurvitz *et al.*, 2001; Hiltunen *et al.*, 2003).

Nos trabalhos apresentados nos Capítulos II e III, foi utilizada a síntese de PHA como metodologia alternativa para monitorar a degradação dos ácidos rumênico (9-*cis*,11-*trans*-octadecenóico; Capítulo II) e 10-*cis*,13-*cis*-nonadecenóico (Capítulo III) em linhagens selvagens e mutantes de *S. cerevisiae* expressando a Pha-sintase de *P. aeruginosa*. O objetivo foi avaliar o papel das enzimas auxiliares da β -oxidação no metabolismo destes ácidos graxos.

3.2.1. Degradação de ácido rumênico

A denominação “ácido graxo linoléico conjugado” (CLA) é um termo genérico utilizado para designar um grupo de isômeros do ácido octadienóico (18:2) encontrados em alimentos derivados de animais ruminantes ou que apresentam um processo fermentativo semelhante. Estudos feitos com modelos animais e cultura de células humanas derivadas de células de câncer de mama, próstata, adenocarcinoma de pulmão e hepatoma, vêm demonstrando que o CLA atua em uma variedade de sistemas biológicos em benefício à saúde humana (Miller *et al.*, 2002; Palombo *et al.*, 2002).

O CLA tem recebido bastante atenção da comunidade científica desde a descoberta de seu envolvimento no processo anticarcinogênico. Além disto, uma vasta literatura sugere que tais compostos apresentam propriedades fisiológicas anti-inflamatórias, anti-diabética, anti-adipogênicas, anti-escleróticas e anti-osteoporose,

além de modularem o sistema imunológico, estimulando a síntese de imunoglobulinas (Watkins e Seifert, 2000; Tabela 1). Achados recentes demonstram que o CLA regula a expressão gênica em células do fígado, músculo e tecido adiposo de roedores, além da maquinaria de síntese de ácidos graxos e lipídios (Belury, 2002; Wahle *et al.*, 2004; Lampen *et al.*, 2005).

O CLA é encontrado principalmente em produtos lácteos e carnes vermelhas em geral. Cerca de 75-90% do tecido adiposo de ruminantes é composto de ácido rumênico (9-*cis*,11-*trans*-CLA; RA) seguido pelo isômero 10-*trans*,12-*cis*-CLA (Forgerty *et al.*, 1998). Recentemente, foi descrito na literatura que este último CLA possui efeitos citotóxicos em células de hepatoma de ratos pela ativação da apoptose (Yamasaki *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2005).

Tabela 2. Benefícios do CLA à saúde humana e seu provável modo de ação (adaptado de Wahle *et al.*, 2004).

Benefícios do CLA à saúde humana	Modo de ação
Anti-câncer	inibição do crescimento tumoral/metástase inibição da proliferação celular inibição da angiogênese
Anti-arteriosclerose	redução da formação de placas inibição da produção de citocina inibição da angiogênese
Anti-obesidade	redução do depósito de gordura redução da diabetes
Modulação da imunidade	inibição de citocina inflamatória aumento na produção de anticorpos

Mesmo que muitos estudos destaquem os efeitos benéficos do CLA, pouco se sabe sobre a degradação dos seus isômeros e o papel que estes possuem na modulação

no fluxo da β -oxidação. Além disto, o CLA é ativo em baixos níveis na alimentação, sendo a sua eficiência dependente da preservação do estado não-oxidado de alguns de seus metabólitos (Clouet *et al.*, 2001).

Está descrito na literatura que os ácidos rumênico e 10-*trans*,12-*cis*-octadecadienóico podem ser totalmente degradados em tecidos animais, a partir de experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (Liang *et al.*, 1999; Sergiel *et al.*, 2001; Clouet *et al.*, 2001, Demizieux *et al.*, 2002, Gruffat *et al.*, 2003). Contudo, *S. cerevisiae* não foi capaz de metabolizar eficientemente o ácido rumênico em relação ao isômero 10-*trans*,12-*cis*-CLA (Gurvitz *et al.*, 2001). A capacidade de utilização destes ácidos graxos foi medida avaliando-se o tamanho das zonas claras ao redor das colônias formadas em meio sólido contendo CLA. A extensão destas áreas claras seria a evidência direta da utilização do ácido graxo como fonte de carbono. Os autores compararam o crescimento da linhagem selvagem com mutantes nulos simples isogênicos das enzimas Eci1p (*eci1* Δ), Sps19p (*sps19* Δ) e Dci1p(*dci1* Δ), e duplo mutante *dci1* Δ *eci1* Δ (Gurvitz *et al.*, 2001). Os resultados mostraram que, para a degradação de 10-*trans*,12-*cis*-CLA, apenas as enzimas Eci1p e Sps19p são essenciais. Nos ensaios realizados no Capítulo II, a presença do monômero H12:1 no PHA sintetizado pela linhagem selvagem também indicou que a degradação deste CLA é dependente de 2,4-dienoil-CoA isomerase (Eci1p) e Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA redutase (Sps19p) em *S. cerevisiae*, já que a oxidação de qualquer outro ácido graxo interno não formaria este intermediário. Estas duas enzimas são responsáveis pela conversão do intermediário 2-*trans*,4-*trans*,6-*cis*-dodecatrienoil-CoA a 2-*trans*,6-*cis*-dodecadienoil-CoA e, portanto, mutantes *eci1* Δ e *sps19* Δ são incapazes de metabolizar ácidos graxos insaturados contendo uma ligação *trans* em um carbono par como, por exemplo, o ácido 10-*trans*-heptadecenóico (Robert *et al.*, 2005).

Ainda no trabalho de Gurvitz *et al.* (2001), foi demonstrado que as diferentes cepas de *S. cerevisiae* foram incapazes de degradar totalmente o ácido rumênico, contrastando com o resultado encontrado no presente estudo, uma vez que a linhagem selvagem foi capaz de formar uma zona clara de degradação ao redor das colônias multiplicadas em meio sólido contendo este CLA (Figura 3, Capítulo II). Além disto, nenhuma das nossas linhagens apresentou diferenças na densidade celular quando multiplicadas nos diversos meios de cultura (dados não mostrados).

A discrepância entre os resultados obtidos no Capítulo II e os de Gurvitz *et al.* (2001) quanto às cepas selvagens de *S. cerevisiae* pode ressaltar as diferenças nas metodologias empregadas em ambos os trabalhos, uma vez que a medida da zona clara de degradação no meio de cultivo sólido contendo ácido graxo não é, necessariamente, uma evidência direta de sua internalização, posterior metabolização celular ou, ainda, da disponibilidade para diferentes funções biológicas.

A linhagem selvagem de *S. cerevisiae* foi capaz de sintetizar PHA em diferentes meios de cultivo contendo ácidos graxos (Figura 2, Capítulo II), não se encontrando diferenças significativas na quantidade e na composição do polímero quando o ácido 10-*cis*-heptadecenóico foi adicionado à cultura juntamente com o ácido rumênico (Figura 4, Capítulo II). Estudos anteriores mostraram que em mitocôndrias de ratos alimentados com ácido rumênico, a oxidação dos ácidos linoléico e palmitoléico foi alterada devido ao acúmulo deste CLA no interior da organela celular, podendo também modificar a atividade do ciclo de Krebs (Clouet *et al.*, 2001; Demizieux *et al.*, 2002). Pelos resultados alcançados no Capítulo II, pode-se sugerir que o ácido rumênico é adequadamente degradado em *S. cerevisiae*, e que esta oxidação não limita o metabolismo de outros ácidos graxos.

Foi proposto, por diferentes estudos, que a dificuldade de metabolizar diferentes isômeros de CLA se deve à formação do intermediário 3,5-dienoil-CoA, um metabólito supostamente recalcitrante para a β -oxidação de *S. cerevisiae in vivo* (Shoukry e Schulz, 1998; Gurvitz *et al.*, 1999; Gurvitz *et al.*, 2001). Além disto, pesquisas anteriores com CLA, envolvendo a degradação de 3,5-*trans*-dienoil-CoA em mitocôndrias derivadas de células de fígado de ratos, demonstraram que este intermediário é preferencialmente transformado em 2,4-dienoil-CoA pela ação da di-isomerase (Dci1p; via dependente de redutase) ao invés de 2,5-dienoil-CoA pela isomerase (Eci1; via dependente de isomerase; Figura 1, Capítulo II; Shoukry e Schulz, 1998; Ren e Schulz, 2003). Ou seja, existiria um maior fluxo ao longo da via dependente de redutase, levantando à questão de quão necessária ou, até mesmo, operante, seria a rota dependente da Δ^3, Δ^2 -isomerase na degradação do ácido rumênico, sendo importante que se determine qual das rotas efetivamente contribui para a metabolização de 3,5-*trans*-dienoil-CoA.

Uma possível explicação para a preferência de metabolização de 3,5-dienoil-CoA para o isômero 2,4 é a maior estabilidade termodinâmica do intermediário 3,5-dienoil-CoA comparado a 2,5-dienoil-CoA, sendo a entrada deste intermediário na via dependente de isomerase uma reação energeticamente desfavorável (Shoukry e Schulz, 1998). Adicionalmente, a ausência da via dependente de redutase levaria ao acúmulo de 3,5-dienoil-CoA, impedindo a função oxidativa da mitocôndria pelo declínio da concentração de CoA livre e, possivelmente, a inibição de algumas das enzimas da β -oxidação (Ren e Schulz, 2003). No entanto, nos ensaios desenvolvidos no presente estudo, foi detectada a presença do monômero H12:1 na linhagem selvagem e sua ausência nos mutantes *eci1 Δ dci1 Δ* (Capítulo II). Uma vez que este monômero só pode ser formado pela via dependente de isomerase, concluiu-se que, *in vivo*, o metabólito 3-*cis*,5-*trans*-dodecadienoil-CoA é convertido no isômero 2-*trans*,5-*trans* pela via

dependente de isomerase (Figura 1, Capítulo II). Além disto, acredita-se que a atividade de enoil-CoA hidratase II da proteína multifuncional MFE2 (Fox2p) seria, *in vivo*, suficiente para impedir o acúmulo de 2-*trans*-5-*trans*-dodecadienoil-CoA durante a degradação do ácido rumênico, evitando, assim, algum possível efeito negativo deste intermediário no fluxo de carbonos ao longo da via dependente de isomerase.

Embora a linhagem selvagem de *S. cerevisiae* tenha acumulado PHA nas mesmas proporções em todos os ácidos graxos utilizados nos experimentos aqui descritos, o polímero sintetizado em ácido rumênico, em alguns dos mutantes nulos das enzimas auxiliares da β -oxidação (*eci1* Δ , *eci1* Δ *sps19* Δ e *eci1* Δ *dci1* Δ), sofreu uma drástica redução, chegando a apenas 7% da quantidade de PHA produzida pela linhagem selvagem no duplo mutante *eci1* Δ *dci1* Δ , corroborando, mais uma vez, para a importância da via dependente de isomerase na metabolização do intermediário 3,5-dienoil-CoA (Capítulo II).

No PHA sintetizado pelas cepas *eci1* Δ e *eci1* Δ *sps19* Δ de *S. cerevisiae*, ainda se detecta o tioéster H12:1 (Capítulo II). Este resultado deve-se ao fato de que a enzima Dci1p possui uma atividade intrínseca de Δ^3, Δ^2 -isomerase de cerca de 10% (Gurvitz *et al.*, 1999). A superexpressão de Dci1 foi capaz de restaurar o fenótipo de linhagens *eci1* Δ multiplicadas em meio com ácido oléico, onde a di-isomerase não é essencial (Gurvitz *et al.*, 1999). A reação enzimática catalisada pelas enzimas Eci1p e Dci1p é muito semelhante, já que ambas realizam a isomerização da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do substrato. Além disto, Dci1p pode, simultaneamente, fazer a isomerização do átomo do carbono 5 para o carbono 4 ou, ainda, converter 3,5,7-trienoil-CoA em 2,4,6-trienoil-CoA. Esta atividade de tri-isomerase de Dci1p foi descrita por Liang *et al.* (1999) em mitocôndrias de fígado de rato, e também parece estar presente na enzima peroxissomal de *S. cerevisiae*. As duas enzimas fazem parte da

superfamília da hidratase/isomerase, sendo 50% idênticas na composição de seus aminoácidos (Geisbrecht *et al.*, 1999; Karpichev e Small, 2000). Desta forma, na ausência de ambas as enzimas (mutante *eci1Δdci1Δ*), a β -oxidação do ácido rumênico é totalmente bloqueada, e a quantidade de PHA formada nas cepas deficientes em Dci1 (*dci1Δ* e *dci1Δsps19Δ*) ainda representa 50 a 70% da síntese de linhagens selvagens (Capítulo II).

Levando-se em consideração os resultados obtidos e descritos no Capítulo II, pode-se concluir que a degradação do ácido rumênico em *S. cerevisiae* dispensa a atividade da enzima Dci1p, sendo a via dependente da participação da Δ^3, Δ^2 -isomerase suficiente para manter o fluxo de carbonos ao longo da β -oxidação.

3.2.2. Degradação do ácido 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico

A ausência de um efeito significativo na quantidade e na composição do PHA sintetizado por linhagens de *S. cerevisiae* selvagens e *dci1Δ* multiplicadas em meios contendo ácido rumênico (Bogdawa *et al.*, 2005; Capítulo III) ou ácidos graxos contendo uma ligação *cis* em um carbono ímpar (Gurvitz *et al.*, 1997, 1999, 2001) levantam a questão da importância desta di-isomerase na β -oxidação em *S. cerevisiae*. Mesmo que a contribuição seja singela, novos estudos devem ser conduzidos para elucidar o papel desta enzima no metabolismo de ácidos graxos em organismos eucariotos. Desta forma, o trabalho descrito no Capítulo III tentou avaliar, por meio da síntese de PHA, o fluxo de carbonos que percorre a β -oxidação em *S. cerevisiae in vivo* na presença do ácido graxo 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico na cepa selvagem e mutante *dci1Δ* de *S. cerevisiae* contendo a PHA-sintase de *P. aeruginosa*. Além disto, tinha-se por objetivo analisar o possível efeito da superexpressão das enzimas auxiliares Eci1p, Sps19p e Dci1p na degradação deste substrato para melhor entender a contribuição das

mesmas neste metabolismo. O ácido graxo 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico, a partir daqui designado simplesmente por 19:2, foi escolhido para melhor distinguir entre os intermediários gerados pela degradação de ácidos graxos endógenos da levedura e aqueles formados pela β -oxidação de 19:2.

Em *S. cerevisiae* e mamíferos, a β -oxidação de ácidos graxos insaturados contendo uma ligação dupla *cis* em um carbono ímpar pode proceder ao longo de três vias: (i) a via dependente de isomerase, (ii) a via dependente de redutase, e (iii) a via dependente de MFE (Figura 1, Capítulo III). A via dependente de redutase, onde a enzima Dci1p está implicada, vem sendo alvo de extensiva investigação e controvérsia (Tserng e Jin, 1990; Smeland *et al.*, 1992; Tserng *et al.*, 1996; Shoukry e Schulz, 1998, Gurvitz *et al.*, 1999; Ren e Schulz, 2003). Um estudo feito com mitocôndrias de coração e fígado de ratos mostrou que a degradação do ácido *cis*-5-tetradecenóico foi completamente metabolizado pela via dependente de redutase (Tserng *et al.*, 1996). No entanto, a utilização de 2,5-octadecanoil-CoA por extratos de mitocôndrias de ratos mostrou que 80% deste intermediário da degradação de oleato foi metabolizado pela via dependente de isomerase, e que a via dependente de redutase preveniria o acúmulo de 3,5-*cis*-dienoil-CoA quando este fosse formado por Eci1 (Shoukry e Shoulz, 1998; Ren e Schulz, 2003). Na ausência desta última rota, a degradação de 3,5-*cis*-dienoil-CoA seria limitada pela capacidade de Sps19p em reduzir 2-*trans*,4-*trans*-dienoil-CoA para seguir na via dependente de redutase (Ren e Schulz, 2003).

Uma vez que os peroxissomos de ratos também possuem todas as enzimas necessárias para a via dependente de redutase, seria plausível assumir que as duas rotas (dependente de isomerase e redutase) ocorrem em peroxissomos de *S. cerevisiae* (Gurvitz *et al.*, 1999). A geração de linhagens de leveduras deficientes na atividade de Dci1p mostrou que a degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados em um carbono ímpar

é independente da enzima Dcip em *S. cerevisiae* (Geisbrecht *et al.*, 1999; Gurvitz *et al.*, 1999). Dependendo do *background* genético utilizado, a capacidade de utilização de ácido oléico como fonte de carbono de uma linhagem deficiente na atividade desta di-isomerase foi equivalente, ou levemente alterada, em comparação à cepa selvagem multiplicada em meio líquido contendo ácido oléico como fonte de carbono, ou na formação de zonas claras ao redor das colônias quando o ácido oléico foi disperso com Tween-80 (Geisbrecht *et al.*, 1999; Gurvitz *et al.*, 1999).

Pelos resultados apresentados no Capítulo III, foi possível demonstrar que os mutantes nulos *eci1Δ* e *sps19Δ* de *S. cerevisiae* não foram capazes de sintetizar PHA em meio líquido contendo o ácido graxo 19:2 (dados não mostrados). De acordo com observações anteriores, foi confirmado que, em *S. cerevisiae*, as duas enzimas são essenciais para a degradação de um ácido graxo *cis*-insaturado em um carbono ímpar (Gurvitz *et al.*, 1997, 1998; Geisbrecht *et al.*, 1998; Robert *et al.*, 2005).

A composição e a quantidade de PHA formado pela linhagem *dci1Δ* de *S. cerevisiae* em relação à selvagem manteve-se muito semelhante. O que é mais relevante é a ausência do monômero H11:0, sendo o monômero H11:1 predominante no PHA sintetizado pela cepa deficiente em di-isomerase (Figura 2, Capítulo III). Estes dois intermediários da β -oxidação de 19:2 são marcadores das vias dependente de redutase e isomerase, respectivamente (Figura 1, Capítulo III). Desta forma, estes dados indicam que a principal rota de metabolismo de 19:2 é dependente da enzima Δ^3, Δ^2 -isomerase, embora a presença de um dos monômeros especificamente gerados pela via dependente de redutase indica que a atividade de Dcip contribui de alguma forma para a degradação de ácidos graxos *cis*-insaturados em *S. cerevisiae*.

Mutantes nulos de *S. cerevisiae* nas enzimas catalase A (*cta1Δ*) e citrato sintase (*cit2Δ*) contendo a PHA-sintase de *P. aeruginosa* foram multiplicados em meio

contendo ácido oléico como controles negativos para demonstrar que os peroxissomos com uma matriz deficiente em enzimas que não são auxiliares da β -oxidação não possuem problemas para acumular PHA. Este resultado indica que a falta do monômero H11:0 no PHA de cepas *dcil1* Δ é um indicativo da ausência da enzima Dci1p e não de algum defeito nas proteínas da matriz peroxissomal (Capítulo III).

A capacidade da cepa deficiente em Cta1p em sintetizar PHA como na cepa selvagem vem de encontro aos achados de Hiltunen *et al.* (2003), que demonstram que esta enzima não necessita estar funcional para uma eficiente β -oxidação em *S. cerevisiae*. A enzima Fox1p transfere os elétrons provenientes da conversão de acil-CoA a 2-*trans*-enoil-CoA diretamente ao oxigênio para formar peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, é convertido em água e oxigênio pela catalase, uma marca registrada de peroxissomos e outras estruturas análogas. Cepas de *S. cerevisiae* deficientes na catalase peroxissomal e citosólica (Ctt1p), ou ambas, foram capazes de se multiplicar em placas contendo ácido oléico como fonte única de carbono (Hiltunen *et al.*, 2003). O mesmo perfil foi observado em uma linhagem celular de ovário de hamster chinês contendo peroxissomos sem atividade de catalase em meio contendo ácido graxo de comprimento longo de cadeia (*very-long-chain fatty acids*, VLCFA). Estas células foram capazes de entrar em divisão celular da mesma forma que a linhagem selvagem, indicando que a β -oxidação não é dependente do funcionamento da catalase peroxissomal (Fujiwara *et al.*, 2000).

A proliferação de peroxissomos e o aumento da atividade das enzimas envolvidas na β -oxidação em *S. cerevisiae* são observados quando as células são transferidas de um meio contendo glicose para um outro acrescido de ácido oléico como fonte exclusiva de carbono. A expressão de muitos genes codificadores de proteínas peroxissomais como, por exemplo, acil-CoA oxidase (*POX1*) e tiolase (*FOX3*), é

reprimida em presença de glicose no meio de cultivo ($\geq 2\%$). Contudo, a expressão de genes que codificam enzimas da β -oxidação em *S. cerevisiae* é aumentada cerca de 10 a 20 vezes em meio com ácido oléico (Veenhuis *et al.*, 1987; Hiltunen *et al.*, 1996). A seqüência do promotor destes genes pode conter dois elementos que atuam em *cis* mediando a indução dos mesmos na presença de ácidos graxos, denominados de ORE1 (*Oleate Responsive Gene*; ORE; Einerhand *et al.*, 1991, 1993; Filipits *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994) e UAS1 (*type 1 upstream activation sequence*), encontrado nos genes *CTA1*, *SPS19*, *FOX1* e *FOX3* além de ORE (Simon *et al.*, 1991; Igual e Navarro, 1996; Gurvitz *et al.*, 2000, 2001).

Na tentativa de se determinar o fluxo de carbonos ao longo das vias dependentes de isomerase e redutase, foram construídos vetores plasmidiais multicópia para de superexpressão dos genes *ECII*, *SPS19* e *DCII*. A transcrição destes genes foi monitorada por RT-PCR semi-quantitativa das linhagens multiplicadas em meio contendo ácido oléico (Figura 3, Capítulo III). Os resultados obtidos mostraram que houve uma maior expressão dos genes das cepas de *S. cerevisiae* com os vetores multicópia em relação ao controle selvagem com o plasmídio vazio. Contudo, não foi possível notar diferenças significativas no conteúdo ou na composição do PHA sintetizado de quaisquer das cepas superexpressando os genes em relação à selvagem, que continha apenas a PHA-sintase (Figura 4, Capítulo III). Sugere-se, a partir desta observação, que o fluxo de carbonos ao longo da via dependente de isomerase ou redutase não é afetado pelo aumento da atividade das enzimas auxiliares. Embora tenha sido observado maiores níveis de expressão destas proteínas nas cepas recombinantes, provavelmente não foi este o fator limitante da síntese de PHA ou da modificação do conteúdo de seus monômeros (Capítulo III).

IV - CONCLUSÕES

4. Conclusões

4.1. Conclusão geral

A expressão de PhaG de *P. aeruginosa* em *S. cerevisiae* contendo PhaC1_{Pa} não estabeleceu a conexão entre a síntese *de novo* de ácidos graxos e a produção de PHA-MCL nesta levedura quando multiplicada em meio de cultura contendo uma fonte de carbono não-relacionada.

A atividade da enzima Dc1p não é fisiologicamente relevante para a multiplicação de *S. cerevisiae* em meio de cultivo contendo ácido rumênico ou ácido 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico como fonte de carbono. Este achado poderia ser cautelosamente extrapolado para a β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos que apresentam uma ligação dupla *cis* em um carbono ímpar em mamíferos, embora a implicação desta rota alternativa na β -oxidação mitocondrial em eucariotos superiores deva ser mais detalhadamente investigada.

4.2. Conclusões específicas

- A superexpressão da enzima 3-hidroxiacil-ACP-CoA-transacilase de *P. aeruginosa* (PhaG_{Pa}) não forneceu intermediários para modificar a composição ou o conteúdo de PHA-MCL de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* cultivadas em meios contendo ácido oléico ou rafinose expressando PhaC1_{Pa} citoplasmática ou peroxissomal.

- A percentagem de 3-hidroxi-decanoato, monômero indicativo da atividade de PhaG_{Pa}, mostrou-se inalterada nas cepas recombinantes em todos os meios de cultura independente da presença de PhaG_{Pa}.

- As linhagens de *S. cerevisiae* contendo a PHA-sintase peroxissomal acumularam cerca de 10 vezes mais polímero do que as cepas expressando PHA-sintase citoplasmática.

- A expressão heteróloga de PhaG_{Pa} em organismos que apresentam um complexo FASI, como no caso de *S. cerevisiae*, pode não ter fornecido intermediários para a síntese de PHA-MCL por uma questão de acesso da transacilase ao seu substrato 3HA-ACP.

- Baseando-se em bactérias que não produzem naturalmente PHA, a incapacidade de linhagens modificadas geneticamente de *S. cerevisiae* para a produção desse biopolímero a partir de intermediários da biossíntese de ácidos graxos em meio de cultura contendo uma fonte de carbono não-relacionada pode sugerir que esses organismos são limitados em algum passo enzimático importante que supre o correto tioéster para a formação de PHA.

- Cepas de *S. cerevisiae* expressando PhaC1_{Pa} em peroxissomos foram capazes de sintetizar PHA-MCL na presença do ácido CLA 9-*cis*,11-*trans*-octadienóico (ácido rumênico) da mesma forma que em cultivos contendo os ácidos oléico, 10-*trans*,12-*cis*-octadienóico ou 10-*cis*-heptadecenóico.

- A adição de ácido 10-*cis*-heptadecenóico no meio de cultivo juntamente com o ácido rumênico não alterou a síntese de PHA, mostrando que a degradação do CLA não interfere no metabolismo de outros ácidos graxos insaturados em peroxissomos de *S. cerevisiae*.

- A via dependente de isomerase é, *in vivo*, a única rota essencial para a β -oxidação de ácido rumênico. Mesmo que a conversão de 3,5-dienoil-CoA a 2,5-dienoil-CoA seja desfavorável energeticamente, a atividade de hidratase II de Fox2p é

suficiente para manter a degradação deste CLA ao longo da via dependente de isomerase.

- Existe um maior fluxo de carbono pela via dependente de redutase para a degradação de 2-*trans*,4-*trans*-dienoil-CoA do que via dependente de MFE2.
- Em *S. cerevisiae*, mutantes das enzimas catalase A (*cta1*Δ) e citrato sintase (*cit2*Δ) foram capazes de sintetizar PHA, demonstrando-se que essas proteínas da matriz peroxissomal não necessitam estar ativas para uma correta β-oxidação.
- A superexpressão dos genes *ECII*, *SPS19* e *DCII* não modificou a composição ou a quantidade de PHA-MCL em *S. cerevisiae*, sugerindo que a maior atividade das enzimas auxiliares da β-oxidação não é o ponto chave que restringe a síntese de PHA.
- As vias dependentes de isomerase e redutase são necessárias para a β-oxidação de ácidos graxos *cis* insaturados em um carbono par em *S. cerevisiae*, enquanto que a enzima Δ^{3,5}-Δ^{2,4}-dienoil-CoA isomerase (*Dci1p*) é dispensável, ao invés de redundante, para a degradação de ácidos graxos insaturados neste organismo.

V - PERSPECTIVAS

5. Perspectivas

A síntese de PHA-MCL em linhagens recombinantes da levedura *S. cerevisiae* tem se mostrado um sistema modelo para compreender os processos metabólicos que podem alterar a composição do polímero a fim de otimizar a produção comercial. O direcionamento de intermediários da síntese *de novo* ou da β -oxidação de ácidos graxos foram as duas estratégias utilizadas neste estudo para tentar controlar a entrada de 3HAs na cadeia de PHA-MCL. A expressão de uma transacilase não mostrou ser efetiva para desviar intermediários da síntese de ácidos graxos em *S. cerevisiae* para a produção de PHA-MCL. Contudo, a composição e a quantidade de polímero de cepas selvagens e mutantes para as enzimas auxiliares da β -oxidação *ECII*, *SPS19* e *DCII* puderam indicar o fluxo de carbono que percorre as vias alternativas na degradação de ácidos graxos insaturados. Assim, para podermos melhor entender quais foram os empecilhos que impediram a síntese de PHA-MCL em cepas expressando PhaG_{Pa}, além de estender a informação sobre o envolvimento das rotas alternativas da β -oxidação de ácidos graxos insaturados em *S. cerevisiae* pela análise do PHA, propõem-se:

- Por meio de RT-PCR e *Western-Blot*, verificar a presença de PhaG_{Pa} e de transcritos deste gene nas linhagens recombinantes.
- Analisar a presença de 3HAs no meio extracelular de culturas de *S. cerevisiae* que co-expressam PhaG_{Pa} e PhaC1_{Pa} multiplicadas em rafinose ou ácido oléico para melhor compreender o verdadeiro papel de PhaG_{Pa} em organismos que não produzem naturalmente PHA.
- Uma vez que linhagens recombinantes de *W. eutropha* foram capazes de produzir PHA-MCL com a superexpressão das enzimas 3-cetoacil-ACP sintase III (FabH) ou malonil-CoA-ACP transacilase (FabD) de *E. coli*, poderia-se transformar

linhagens de *S. cerevisiae* com estes dois genes na tentativa de prover intermediários para a síntese de PHA em culturas contendo uma fonte de carbono não-relacionada.

- Existem dúvidas quanto à interação das proteínas Eci1p e Dci1p em *S. cerevisiae*. Estudos com o sistema dois-híbridos mostraram que estas duas enzimas interagem para uma eficiente β -oxidação neste organismo. Para termos certeza de que a complementação fenotípica da linhagem *dci1* Δ é realmente devido à atividade de di-isomerase e não de isomerase desta enzima, seria interessante a transformação de mutantes *dci1* Δ com uma di-isomerase de rato (ECH1) que não apresenta atividade intrínseca de isomerase ou, ainda, transformar estas mesmas linhagens com *ECII*. Neste último experimento, não pode haver complementação fenotípica de *dci1* Δ .

- O ácido 10-*cis*,13-*cis*-nonadecadienóico gera, no terceiro ciclo de β -oxidação, o intermediário 4-*cis*,7-*cis*-tridecadienóico, que é degradado com o auxílio das enzimas Eci1p e Sps19p. A utilização de mutantes nulos para estas proteínas não permite inferir a contribuição das vias dependentes de isomerase e redutase para a oxidação de ácidos graxos *cis*-insaturados em um carbono ímpar pois estas rotas são essenciais para o metabolismo de ácidos *cis*-insaturados em um carbono par. Desta forma, o uso de um ácido graxo que não possui qualquer ligação *cis*-insaturada em um carbono par, como o 9-*cis*-pentadecenóico, poderia fornecer subsídios do fluxo de carbono que percorre as vias dependentes de isomerase, redutase e di-isomerase de uma maneira mais consistente.

**VI – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

6. Referências Bibliográficas

- Abraham, G. A., Gallardo A., San Roman, J., Olivera, E. R., Jodra R., García, B., Minambres, B., García, J. L. e Luengo, J. M. (2001). Microbial synthesis of poly(β -hydroxyalkanoates) bearing phenyl groups from *Pseudomonas putida*: chemical structure and characterization. *Biomacromol.*, 2:256-257.
- Aldor, I. S. e Keasling, J. D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Op. Biotechnol.*, 14:475-483.
- Allenbach, L. e Poirier, Y. (2000). Analysis of alternative pathways for the β -oxidation of unusual fatty acids using transgenic plants synthesizing polyhydroxyalkanoates in peroxisomes. *Plant Physiol.*, 124:1159-1168.
- Amara, A. A., Steinbüchel, A. e Rehm, B. H. (2002). *In vivo* evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:477-482.
- Anderson, A. A. e Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54: 450-472.
- Andrade, J. A. e Guerrero, P. R. (2001). 20 experiências de gestão e cidadania: unidades de reciclagem de Porto Alegre em: *Programa gestão pública e cidadania*, 248p. Farah, M.F.S. e Barbosa, H.B. (orgs.), São Paulo.
- Aquin, S. (2001). Production de polyhydroxyalcanoate chez les plantes. Thèse présentée à la Faculté des études supérieur de l'Université Laval, Département de Phytologie, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Laval, Canadá, 372p.

- Arai, Y., Nakashita, H., Susuki, Y., Kobayashi, Y., Shimizu, T., Yasuda, M., Doi, Y. e Yamagushi, I. (2002). Synthesis of a novel class of polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis* peroxisomes, and their use to monitoring short-chain-length intermediates of β -oxidation. *Plant Cell Physiol.*, 43: 555-562.
- Arai, Y., Shikanai, T., Doi, Y., Yamaguchi, I e Kakashita, H. (2004). Production os polyhydroxybutyrate by polycistronic expression of bacterial genes in tobacco plastid. *Plant Cell Physiol.*, 45:1176-1184.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingstone R. E., Moore, D. D, Seidman, J. G., Smith, J. A. e Strhul, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, USA.
- Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L. & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *J. Mat. Sci.* **19**: 2781-2794.
- Belury, M. A. (2002). Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanism of action. *Rec. Adv. Nutr. Sci.*, 2995-2998.
- Byrom, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology*, 5:246-250.
- Bogdawa, H., Delessert, S. e Poirier, Y. (2005). Analysis of the contribution of the β -oxidation auxiliary enzymes in the degradation of the dietary conjugated linoleic acid 9-*cis*-11-*trans*-octadienoic acid in the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1735:204-213.
- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawarath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R. N., e Willmitzer, L. (2000). Transgenic *Arabidopsis*

- plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta*, 211: 841-845.
- Bohmert, K., Balbo, I., Steinbüchel, A., Tischendorf, G., e Willmitzer, L. (2002). Constitutive expression of the β -ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant Physiology*, 128:1282-1290.
- Bonato, D., Matias, F., Lisbôa, M. P., Bogdawa, H. M. e Henriques, J. A. P. (2004). Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 20:395-403.
- Botstein, D., Chervitz, S. S. e Cherry, J. M. (1997). Yeast as a model organism. *Science*, 277:1259-1260.
- Campos-García, J., Caro, A. D., Nájera, R., Miller-Maier, R. M., Al-Tahhan, R. A. e Soberón-Chávez, G. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH- dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.*, 180:4442-4451.
- Chen, G.-Q. e Wu, Q. (2005). Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:592–599.
- Clouet, P., Demizieux, L., Gresti, J. e Degrace, P. (2001). Mitochondrial respiration on ruminic acid and linoleic acids. *Biochem. Soc. Trans.*, 29:320-325.
- Cohen, G., Fessl, F., Traczyk, A. Rytka, J. e Ruis, H. (1985). Isolation of catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of *cta1* mutation. *Mol. Gen. Genet.*, 200:74-79.

- Cuebas, D. e Schulz, H. (1982). Evidence for a modified pathway of linolate degradation. Metabolism of 2,4-decadienoyl-coenzyme A. *J. Biol. Chem.*, 257:14140-14144.
- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M e Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14:1471-1510.
- de Koning, G. J. M., van Bilsen, H. M. M., Lemstra, P. J., Hazenberg, W., Witholt, B., Preusting, H., van der Galien, J. G., Schirmer, A. e Jendrossek, D. (1994). A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer*, 35: 2090-2097.
- de Vries, W., Stam, H., Duys, J. G., Ligtenberg, A. J., Simons, L. H. e Stouthamer, A.H. (1986). The effect of dissolved oxygen concentration and anabolic limitations on behavior of *Rhizobium* ORS571 in chemostat cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 52:85-96.
- Demizieux, L., Degrace, P., Gresti, J., Loreau, O., Noël, J.-P., Chardigny, J.-M., Sébédio, J.-L. e Clouet, P. (2002). Conjugated linoleic isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation. *J. Lipid. Res.*, 43:2112-2122.
- Doi, Y. (1995) Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromol. Symp.*, 98: 585-599.
- Dmoschowska, A. Dignard, D., Maleszka, R. e Thomas, D. Y. (1990). Structure and control of *POXI* gene encoding acyl-CoA oxidase. *Gene*, 88:247-252.
- Eaton, S., Bartlett, K. e Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.*, 320:345-357.

- Eccleston, V. S. e Ohlrogge, J. B. (1998). Expression of lauryl-acyl carrier protein thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathways for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation. *Plant Cell*, 10:613-622.
- Einerhand, A. W. C., Voorn-Brouwer, T. M., Erdmann, R., Kunau, W.-H. e Tabak, H. F. (1991). Regulation of transcription of the gene coding for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 200:113-122.
- Einerhand, A. W. C., Kos, W. T., Distel, B. e Tabak, H. F. (1993). Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur. J. Biochem.*, 214:323-331.
- Ewering, C., Lütke-Eversloh, T., Luftmann, H. e Steinbüchel, A. (2002). Identification of novel sulfur-containing bacterial polyesters: biosynthesis of poly(3-hydroxy-S-propyl-x-thioalkanoates) containing thioester linkages in the side chains. *Microbiol.*, 148:1397–1406.
- Fiedler, S., Steinbüchel, A. e Rehm, B. H. A. (2002). The role of the fatty acid β -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Arch. Microbiol.*, 178:149–160.
- Fiedler, S., Steinbüchel, A. e Rehm, B. H. A. (2000). PhaG-mediated synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5:2117-2124.

- Filipts, M., Simon, M. M., Rapatz, W., Hamilton, B. e Ruiz, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene*, 132:49-55.
- Forgerty, A., Ford, G. e Svoronos, D. (1998). Octadeca-9,11-dienoic acid in foodstuffs and in lipids of human blood and breast milk. *Nutr. Rep. Int.*, 38:937-944.
- Fuller, R. C. (1999). Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. *Intern. J. Biol. Macromol.*, 25:21-29.
- Fujiwara, C., Imamura, A. Hashiguchi, N., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Imanaka, T., Tsukamoto, T. e Osumi, T. (2000). Catalase-less peroxisomes. Implication in the milder forms of peroxisome biogenesis disorder. *J. Biol. Chem.*, 275:37271-37277.
- Fukui, T. e Doi, Y. (1997) Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes on *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.*, 179: 4821-4830.
- Fukui, T., Yokomizo, S., Kobayashi, G. e Doi, Y. (1999). Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (*R*)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170:69-75.
- García, B., Olivera, E. R., Minambres, B., Fernandez-Valverde, Canedo, L. M., Prietoi, M. A., García, J. L., Martinez, M. e Luengo, J. M. (1999). Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. *J. Biol. Chem.*, 274:29228-29241.
- Geisbrecht, B. V, Khu, D., Schulz, K., Nau, K., Morell, J. C., Geraghty, M., Schulz, H., Erdmann, R. e Gould, S. J. (1998). Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Δ^3, Δ^2 - enoyl-CoA isomerase. *J. Biol. Chem.*, 273:31366-31374.

- Geisbrecht, B. V., Schulz, K., Nau, K., Geraghty, M. T., Shulz, H., Erdmann, R. e Gould, S. J. (1999). Preliminary characterization of Yor180Cp: identification of a novel peroxisomal protein of *Saccharomyces cerevisiae* involved in fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 260:28-34.
- Gerngross, T. U. e Martin, D. P. (1995). Enzyme-catalyzed synthesis of poly [(R)- (—)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6279-6283.
- Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274:546-567.
- Gross, R. A. e Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science* 297:803-807.
- Gruffat, D., De La Torre, A., Chardigny, J.- M., Durand, D., Loreau, O., Sébédio, J.- L., e Bauchart, D. (2003). In vitro comparison of hepatic metabolism of 9cis-11trans and 10trans-12cis isomers of CLA in rat. *Lipids*, 38:157-163.
- Gurvitz, A., Rottensteiner, H., Kilpeälinen, S. H., Hartig, A., Hiltunen, J. K., Binder, M., Dawes, I. W., e Hamilton, B. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoil-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene *SPS19*. *J. Biol. Chem.*, 272:22140-22147.
- Gurvitz, A., Mursula, A. M., Firzinger, A., Hamilton, B., Kilpeälinen, S. H., Hartig, A., Ruis, H., Hiltunen, J. K. e Rottensteiner, H. (1998). Peroxisomal Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-enoyl-CoA isomerase encoded by *ECII* is required for growth of the *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 273:31366-31374.

- Gurvitz, A., Mursula, A. M., Yagi, A. I., Hartig, A., Ruis, H., Rottensteiner, H. e Hiltunen, J. K. (1999). Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the β -oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 274:24514-24521.
- Gurvitz, A., Wabnegger, L., Rottensteiner, H., Dawes, I. W., Hartig, A., Ruis, H. e Hamilton, B. (2000). Adr1p-dependent regulation of the oleic acid-inducible yeast gene *SPS19* encoding the peroxisome β -oxidation auxiliary enzyme 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.*, 4:81-89.
- Gurvitz, A., Hamilton, B., Ruis, H. e Hartig, A. (2001). Peroxisomal degradation of *trans*-unsaturated fatty acids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 276:895-903.
- Hahn J. J., Eschenlauer, A. C., Narrol, M. H., Somers, D. A. e Scrienc, F. (1997). Growth kinetics, nutrient uptake, and expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly(β -hydroxybutyrate) synthesis pathway in transgenic maize cell suspension cultures. *Biotechnol. Prog.*, 13: 347-354.
- Hahn J. J., Eschenlauer, A. C., Sleytr, U. B., Somers, D. A. e Scrienc, F. (1999). Peroxisomes as site for synthesis of polyhydroxyalkanoates in transgenic plants. *Biotechnol. Prog.*, 15:1053-1057.
- Hankermeyer, C. R. e Tjeerdema, R. S. (1999). Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 159:1-24.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L. e Dawes, E. A. (1988). The role of DADH- and NADHP-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 52:259-264.

- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Williams, D. R., Dawes, E. A. e Ewing, D. F. (1991). Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus sp.* NCIMB 40126. *Int. J. Bio. Macromol.*, 13:83-88.
- Hein, S., Tran, H. e Steinbüchel, A. (1998). *Synechosystis sp.* PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, 170:162-170.
- Henderson, R. A. e Jones, C. W. (1997). Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaliges eutrophus*; purification characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. *Arch. Microbiol.*, 168:486-492.
- Hettema, E. H. e Tabak, H. F. (2000). Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1486:18-24.
- Hezayen, F. F., Tindall, B. J., Steinbüchel, A. e Rehm, B. H. (2002). Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov. and transfer to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:2271-2280.
- Hiltunen J. K. e Qin, Y.-M. (2000). β -Oxidation- strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1484:117-128.
- Hiltunen, J. K., Wenzel, B., Beyer, A., Erdmann, R., Fossa, A. e Kunau, W.-H. (1992). Peroxisomal multifunctional β -oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular analysis of the *FOX2* gene and gene product. *J. Biol. Chem.*, 267:6646-6653.

- Hiltunen, J. K., Filpulla, S. A., Koivuranta, K. T., Siivari, K., Qin, Y. M. e Hayrinen, H. M. (1996). Peroxisomal beta-oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 804:116-128.
- Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A. J. e Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal β -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 35-64.
- Hoffmann, N., Steinbüchel, A. e Rehm., B. H. A. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* *phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol. Lett.*, 184:253-259.
- Hoffman, N., Amara, A. A., Beermann, Br. B., Qi, Q., Hinz, J.-J. e Rehm, B. H. A. (2002a). Biochemical characterization of *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid *de novo* biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 277:42926-42936.
- Hoffmann, N., Steinbüchel, A., Rehm., B. H. A. (2002b). Homologous functional expression of cryptic *phaG* from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:665-670.
- Hoffmann, N. e Rehm, B. H. A. (2004). Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237:1-7.
- Houmiel, K. L., Slater, S., Broyles, D., Casagrande, L., Colburn, S., Gonzalez, K., Mitsky, T. A., Reiser, S. E., Shah, D., Taylor, N. B., Tran, M., Valentin, H.E. e

- Gruys, K. J. (1999). Poly(β -hydroxybutyrate) production in oilseed leucoplasts of *Brassica napus*. *Planta*, 209:547-550.
- Huang, R. e Reusch, R. (1996). Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 271:22169-22202.
- Huisman, G. W., de Leeuw, O., Eggink, G. e Witholt, B. (1989). Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8:1949-1954.
- Igual, J. C. e Navarro, B. (1996). Respiration and low cAMP-dependent protein kinase activity are required for high-level expression of the peroxisomal thiolase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 252:446-455.
- Jendrossek, D. (2005). Fluorescence microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria. *Biomacromol.*, 6:598-603.
- John, M. E. e Keller, G. (1996). Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1268-12773.
- Karpichev, I. V. e Small, G. M. (2000). Evidence for a novel pathway for the targeting of a *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal protein belonging to the isomerase/hydratase family. *J. Cell Sci.*, 133:533-544.
- Kessler, B. e Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.*, 86:97-104.
- Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B. e Kessler, B. (1999). Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2:540-548.

- Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., e Varila P. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromol.*, 6:561-565.
- Kuziora, M. A., Chalmers, J. H. Jr., Douglas, M. G., Hitzeman, R. A., Mattick, J. S. e Wakil, S. J. (1983). Molecular cloning of fatty acid synthetase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 258:11648-11653.
- Lagenbach, S., Rehm, B. H. A. e Steinbüchel, A. (1997). Functional expression of the PHA synthase gene from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 150:303-309.
- Lampen, A., Leifheit, M., Voss, J. e Nau, H. (2005). Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1735:30-40.
- Leaf, T. A. e Scrienc, F. (1998). Metabolic modeling of polyhydroxybutyrate biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 57:557-570.
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, 49:1-14.
- Lee, I. Y., Kim, M. K., Chang, H. N. e Park, Y. H. (1995). Regulation of poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 31:35-39.
- Lee, T-R., Lin, J-S., Wang, S-S. e Shaw, G-C. (2004). PhaQ, a new class of poly- β -hydroxybutyrate (phb)-responsive repressor, regulates *phaQ* and *phaP* (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB. *J. Bacteriol.*, 186:3015–3021.

- Lenz, R. W. e R. H. Marchessault (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromol.*, 6:1-8.
- Liang, X., Zhu, D. e Schulz, H. (1999). $^{3,5,7}\Delta, \Delta^{2,4,6}$ -trienoyl-CoA isomerase, a novel enzyme that functions in the β -oxidation of polyunsaturated fatty acids with conjugated double bonds. *J. Biol. Chem.*, 274:13830-13835.
- Liebergesell, M., Rahalkar, S. e Steinbüchel, A. (2000). Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:186-194.
- Lössl, A., Eibl, C., Harloff, H.-J., Jung, C. e Koop, H.-U. (2003). Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep.*, 21:891-899.
- Lu, X., Zhang, J., Wu, Q. E. Chen, G.-Q. (2003). Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221:97-101.
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. e Oliveira, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:251-260.
- Luzier, W. D. (1992). Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:839-842.
- Madison, L. L. e Huisman, G. W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63:21-53.

- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O. e Cronan Jr., J. E. (1993). Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 57:522-542.
- Maliga, P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:289-313.
- Marchesini, S. e Poirier, Y. (2003). Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal β -oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Biochem.*, 278:32596-32601.
- Marchesini, S., Erard, N., Glumoff, T., Hiltunen, J. K. e Poirier, Y. (2003). Modification of the monomer composition of polyhydroxyalkanoate synthesized in *Saccharomyces cerevisiae* expressing variants of the β -oxidation-associated multifunctional enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11:6495-6499.
- Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. e Doi, Y. (2001). Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaG* gene involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Biomacromol.*, 2:142-177.
- Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. e Doi, Y. (2002). Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromol.*, 3:787-792.
- Matsusaki, H., Manji, S., Tagushi, K., Kato, M., Fukui, T. e Doi, Y. (1998). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.*, 180:6459-6467.
- Mergaert, J. e Swings, J. (1996). Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *J. Indust. Microbiol.*, 17:463-469.

- Miller, A., Stanton, R. e Devery, R. (2002). Cis9, trans11- and trans10, cis12- conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultures SW480 cells. *Anticancer Res.*, 22:3879-3887.
- Mittendorf, V., Robertson, E. J., Leech, R.M., Kruger, N., Steinbüchel, A. e Poirier, Y. (1998). Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13397-13404.
- Mittendorf, V., Bongcam, V., Allenbacg, L., Coullerez, G., Martini, N. e Poirier, Y. (1999). Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow trough β -oxidation. *Plant J.*, 20:45-55.
- Moire, L., Rezzonico, E., Goepfert, S. e Poirier, Y. (2004). Impact of unusual fatty acid synthesis on futile cycling through β -oxidation and on gene expression in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 134:423-442.
- Mullet, J. E. (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.*, 103:309-313.
- Müller, H.-M. e Seebach, D. (1993). Poly(hydroxyalkanoates): a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32:477-502.
- Nakashita, H., Arai, Y., Yoshioka, K., Fukui, T., Doi, Y., Usami, R., Horikoshi, K. e Yamagushi, I. (1999). Production of biodegradable polyester by a transgenic tobacco. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 63:870-874.
- Nakashita, H., Arai, Y, Shikanai, T., Doi, Y e Yamagushi, I. (2001). Introduction of bacterial metabolism into higher plants by polycistronic transgenic expression. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 65:1688-1691.

- Nawarath, C., Poirier, Y. e Somerville, C. (1994). Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12760-12764.
- Nawarath, C., Poirier, Y. e Somerville, C. (1995). Plant polymers for biodegradable plastics: cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates. *Molecular Breeding*, 1:105-122.
- Oliveira, V. C., Maeda, I., Delessert, S. e Poirier, Y. (2004). Increasing carbon flux toward synthesis of short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate in peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* through modification of the β -oxidation cycle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 9:5685-5687.
- Olsen, L. J. (1998). The surprising complexity of peroxisome biogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 38:163-189.
- Palombo, J. D., Ganguly, B. R., Bristian, M. P. e Menard, M. P. (2002). The antiproliferative effects of biologically active isomer of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett.*, 177:163-172.
- Park, S. J., Park, J. P. e Lee, S. Y. (2002). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. *FEMS Microbiol. Lett.*, 214:217-222.
- Poirier, Y. (1999). Production of new polymeric compounds in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10:181-185.
- Poirier, Y. (2002). Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.*, 41:131-155.

- Poirier, Y., Dennis, D. E., Klomparens, K. e Somerville, C. (1992). Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, 256:520-523.
- Poirier, Y., Nawarath, C. e Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/Technology*, 13:142-150.
- Poirier, Y., Ventre, G. e Caldelari, D. (1999). Increased flow of fatty acids toward β -oxidation in developing seeds of *Arabidopsis* deficient in diacylglycerol acyltransferase activity or synthesizing medium-chain-length fatty acids. *Plant Physiol.*, 121:1359-1366.
- Poirier, Y., Erard, N. e Petétot, J. M.-C. (2001). Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid β -oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:5254-5260.
- Poirier, Y., Erard, N. e Petétot, J. M.-C. (2002). Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Picchia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 207:97-102.
- Possingham, J. V. (1980). Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31:113-130.
- P  tter, M., Müller, H. e Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 151: 825-833.
- Prieto, M. A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B e Kessler, B. (1999). PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* Gpo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.*, 181:858-868.

- Qi, Q., Steinbüchel A. e Rehm, B. H. A. (1997). Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol. Lett.*, 157:155-162.
- Qi, Q., Steinbüchel A. e Rehm, B. H. A. (1998). Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid β -oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiol. Lett.*, 167:89-94.
- Qin, Y.-M., Marttila, M.S., Haapalainen, A. M., Siivari, K. M., Glumoff, T. e Hiltunen, J. K. (1999). Yeast peroxisomal multifunctional enzyme: (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase domains A and B are required for optimal growth on oleic acid. *J. Biol. Chem.*, 274:28619-28625.
- Rehm, B. H. (2003). Polyester synthases: natural catalyst for plastics. *Biochem. J.*, 376:15-33.
- Rehm, B. H. A. e Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 25:3-19.
- Rehm, B. H. A. e Steinbüchel, A. (2001). Heterologous expression of the acyl-acyl carrier protein thioesterase gene from the plant *Umbellularia californica* mediates polyhydroxyalkanoate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55:205-209.
- Rehm, B. H. A., Kruger, N. e Steinbüchel, A. (1998). A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis: the *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxy-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J. Biol. Chem.*, 273:24044-24051.

- Rehm, B. H. A., Mitsky, T. A. e Steinbüchel, A. (2001). Role of fatty acid *de novo* biosynthesis and polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (*phaG*)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:3102-3109.
- Rehm, B. H. A., Antonio, R. V., Speikermann, P., Amara, A. A. e Steinbüchel, A. (2002). Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. *Bioch. Biophys. Acta*, 1594:178-190.
- Reiser, S. E., Mitsky, T. A., Gruys, K. J. (2000). Characterization and cloning of an (R)-specific trans-2,3-enoylacyl-CoA hydratase from *Rhodospirillum rubrum* and use of this enzyme for PHA production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53:209-218.
- Ren, Q., Sierro, N., Witholt, B e Kessler, B. (2000). FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 5:2978-2981.
- Ren, Y. e Schulz, H. (2003). Metabolic functions of the oleate β -oxidation double bond metabolism during β -oxidation of oleic acid in hart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 278:111-116.
- Reusch, R. N. (2000). Transmembrane ion transport by polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochem Moscow*, 65:280-295.
- Reusch, R. N. e Sadoff, H. L. (1981). Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 145:889-895.

- Reusch, R. N. e Sadoff, H. L. (1988). Putative structure and functions of a poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4176-4180.
- Reusch, R. N. Hiske, T. W. e Sadoff, H. L (1986). Poly- β -hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 168:553-562.
- Reusch, R. N, Huang, R. e Bramble, L. L. (1995). Poly- β -hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{+2} channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophys. J.*, 69:754-766.
- Reusch, R. N, Shabalin, O., Crubaugh, A., Wagner, W., Schröder, O. e Wurm, R. (2002). Posttranscriptional modification of *E. coli* histone-like protein H-NS and bovine histone by short-chain poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB). *FEBS Lett.*, 57:319-322.
- Robert, J., Marchesini, S., Delessert, S. e Poirier, Y. (2005). Analysis of the β -oxidation of trans-unsaturated fatty acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a peroxisomal PHA synthase reveals the involvement of a reductase-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Acta*, 1734:169-177.
- Romano, A., van der Plas, L. H. W., Witholt, B., Eggik, G. E. e Mooibroek, H. (2005). Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. *Planta*, 220:455-464.
- Schjerling, C. K., Hummel, R., Hansen, J. K., Borsting, C., Mikkelsen, J. M., Kristiansen, K. e Knudsen, J. (1996). Disruption of the gene encoding the acyl-CoA

- binding protein (ACB1) perturbs acyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 37:22514-22521.
- Senior, P. J. e Dawes, E. A. (1971). PHB-biosynthesis and regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.*,134:225-238.
- Sergiel, J.- P., Chardigny, J.- M., Sébédio, J.- L., Berdeaux, O., Juaneda, O., Loreau, O., Pasquis, B. e Noël, J.- P. (2001). Beta-oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. *Lipids*, 36:1327-1329.
- Simon, M., Adam, G., Rapatz, W., Spevak, W. e Ruiz, H. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *ADRI* gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 11:699-704.
- Sinclair, H. M. (1990). Essential fatty acids: an historical perspective. *Biochem. Soc. Trans.*,18: 756-761.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.*,12: 242-247.
- Shishatskaya, E. I. e Volova, T. G. (2004). A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for *in vitro* cell cultures. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.*,15: 915-923.
- Shourky, K. e Schulz, H. (1998). Significance of the reductase-dependent pathway for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds. Mitochondrial metabolism of 2-trans-5-cis-octadienoyl-CoA. *J. Biol. Chem.*, 273: 6892-6899.
- Slater, S., Houmiel, K. L., Tran, M., Mitsky, T. A., Taylor, N. B., Padgette, S. R., e Gruys, K. J. (1998). Multiple β -ketoacyl synthases mediate poly (β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.*, 180:1979-1987.

- Slater, S., Mitsky, T. A., Houmiel, K. L., Hao, M., Reiser, S. E., Taylor, N. B., Tran, M. Valentin, H. E., Rogrigez, D. J., Stone, D. A., Padgette, S. R., Kishore, G. e Gruys, K. (1999). Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nat. Biotechnol.*, 17:1011-1016.
- Smeland, T. E., Nada, M., Cuebas, D. e Schulz, H. (1992). NADPH-dependent beta-oxidation of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6673-6677.
- Stam, H., van der Verseveld, H. W., de Vries, W. e Stouthamer, S. (1986). Utilization of poly- β -hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiol. Lett.*, 35:215-220.
- Steinbüchel, A. e Schlegel, H. G. (1991). Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.*, 5:535-542.
- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A. e Valentin, H. (1992). Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acid in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 103:217-230.
- Steinbüchel, A. e Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS*, 128:219-228.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follmer, C., Liebergesell, M., Mayer, F., Pieperfurst, U., Valentin, H. E. e Wieczorek, R. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoate acid inclusions. *Can. J. Microbiol.*, 41:94-105.

- Stender, S. e Dyerberg, J. (2004). Influence of *trans* fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.*, 48:61-66.
- Suzuki, Y., Kurano, M., Arai, Y., Nakashita, H, Doi, Y., Usami, R., Horikoshi, K. e Yamagushi, I. (2002). Enzyme inhibitors to increase poly-3-hydroxybutyrate production by transgenic tobacco. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66:2537-2542.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T. e Doi, Y. (1999a). Co-expression of 3-keto-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol. Lett.*, 176:183-190.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T. e Doi, Y. (1999b). Over-expression of 3-keto-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB 101. *Biotechnol. Lett.* 21:579-584.
- Timm, A. e Steinbüchel, A. (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11:3360-3367.
- Trotter, P. J. (2001). The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.*, 21:97-119.
- Tserng, K.-Y. e Jin, S.-J. (1990). NADPH-dependent pathway for the β -oxidation of oleic acid. *J. Biol. Chem.*, 266:11614-11620.
- Tserng, K.-Y., Jin, S.-J. e Chen., L.-S. (1996). Reduction pathway of cis-5 unsaturated fatty acids in intact rat-liver and heart mitochondria: assessment with stable-isotope-labelled substrates. *Biochem. J.*, 313:581-588.

- Tsuge, T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G., Ishizaki, A. e Doi, Y. (1999). Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 184:193-198.
- Tsuge, T., Taguchi, K., Taguchi, S. E Doi, Y. (2003). Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 31:195-205.
- Valentin, H. E., Broyles, D. L., Casagrande, L. A., Colburn, S. M., Creely, W. L., DeLaquil, P.A., Felton, H. M., Gonzales, K.A., Houmiel, K. L., Lutke, K., Mahadeo, D. A., Mitsky, T. A., Padgett, S. R., Reiser, S. E., Slater, S., Stark, D. M., Stock, R. T., Taylor, N. B., Thorne, G. M., Tran, M. e Gruys, K. (1999). PHA production, from bacteria to plants. *Int. J. Macromol.*, 25:303-306.
- van der Walle, G. A. M., Buisman, G. J. H., Weusthuis, R. A. e Eggink, G. (1999). Development of environmentally friendly coatings paints using medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) as polymer binder. *Int. J. Biol. Macromol.*, 25:123-128.
- Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.-H. e Harder, W. (1987). Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 3:77-84.
- Wang, T., Luo Y. e Small, G. M. (1994). The POX1 gene encoding peroxisomal acyl-CoA oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* is under the control of multiple regulatory elements. *J. Biol. Chem.*, 269:24480-24485.
- Watkins, B. A. e Seifert, M. F. (2000). Conjugated linoleic acid and bone biology. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19:478S-486S.

- Wahle, K. W. J., Heys, S. D. e Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lip. Res.*, 43:553-587.
- Williams, M. D. e Peoples, O. P. (1996). Biodegradable plastics from plants. *Chemtech.* 38:38-44.
- Witholt, B. e Kesler, B. (1999). Perspective of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:279-289.
- Wróbel, M., Zebrowski, J. e Szopa, J. (2004). Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *J. Biotechnol.*, 107:41-54.
- Yang, S.-Y., Li, J. M., He, X.-Y., Cosloy, S. D. e Schultz, H. (1988). Evidence that the *fadB* gene of the *fadAB* operon of *Escherichia coli* encodes 3-hydroxy-coenzyme A (CoA) epimerase, Δ^3 -*cis*- Δ^2 -trans-enoyl CoA isomerase, and enoyl-CoA hydratase in addition to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, 170:2543-2548.
- Yamasaki, M., Chujo, H., Koga, Y., Rikimaru, T., Shimada, M., Sugimachi, H., Tachibana, H. e Yamada, K. (2002). Potent cytotoxic effect of *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid on rat hepatoma dRLh-84 cells. *Cancer Lett.*, 188:171-180.
- Yamasaki, M., Miyamoto, Y., Chujo, H., Nishiyama, K., Tachibana, H. e Yamada, K. (2005). *Trans*-10,*cis*12-conjugated linoleic acid induces mitochondria-related apoptosis and lysosomal destabilization in rat hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1735:176-184.
- York, G. M., Junker, B. H., Stubbe, J. A. e Sinskey, A. J. (2001). Accumulation of the PhaP phasing of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *J. Bacteriol.*, 183:4217-4226.

- Zhao K.; Tian, G. Zheng, Z.; Chen, J.-C. e Chen, G.-Q. (2003). Production of D-(—)-3-hydroxyalkanoic acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218:59-64.
- Zheng, Z., Zhang, M.-J.; Zhang, G.; Chen, G.-Q. (2004a). Production of 3-hydroxydecanoic acid by recombinant *Escherichia coli* HB101 harboring *phaG* gene. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85:93-101.
- Zheng, Z., Gong, Q., Liu, T., Deng, Y., Chen, J.-C. e Chen, G.-Q. (2004b). Thioesterase II of *Escherichia coli* plays an important role in 3-hydroxydecanoic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 7:3807-3813.
- Zinn, M; Witholt, B. e Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53:5-21.
- Zhong, H., Teymouri F., Chapman, B., Maqbool, S. B., Sabzikar, R., El-Maghraby, Y., Dale, B. e Sticklen, M. B. (2003). The pea (*Pisum sativum* L.) *rbcS* transit peptide directs the *Alcaligenes eutrophus* polyhydroxybutyrate enzymes into the maize (*Zea mays* L.) chloroplasts. *Plant Science*, 165:455-462.

VII - ANEXOS

Anexo I

**Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by newly
isolated *Ralstonia pickettii* strain**

**Bonato, D., Matias, F., Lisbôa, M. P., Bogdawa, H. M. and
Henriques, J. A. P.**

***World Journal of Microbiology & Biotechnology* (2004) 20:395-403**

Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain

Diego Bonatto, Fernanda Matias, Márcia Pagno Lisbôa, Heike Marlis Bogdawa and João Antonio Pêgas Henriques*

Centro de Biotecnologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, Caixa Postal 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

* Author for correspondence: Tel.: +55-51-3316-6089, Fax: +55-51-3316-6084, E-mail: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Received 20 May 2003; accepted 4 December 2003

Keywords: Microbial bioprospection, *Ralstonia pickettii*, ssc-PHAs, sucrose, sugarcane molasses

Summary

In order to obtain better bacterial species or strains for production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] (ssc-PHA) from cheap carbon sources, a bioprospecting programme was performed in a subtropical rainforest soil. From 398 bacterial isolates, one produced high amounts of ssc-PHA when grown on sugarcane molasses or sucrose as detected by spectrophotometric scanning and gas chromatography coupled to mass spectrometry. Also, the GC-MS analysis indicated that the polymer was composed basically of poly[3-hydroxybutyrate] (PHB). Phylogenetic studies using 16S rDNA analysis showed that the isolated bacterium belonged to the *Ralstonia pickettii* species and had a high identity/similarity with 16S rDNA obtained from total DNA of uncultured strains of soils and with unidentified bacteria at species level. The new strain was named *R. pickettii* 61A6. Spectrofluorometric analysis showed that the best rates of ssc-PHA accumulation within the cells occurred in 10% (w/v) sucrose and in 5% (w/v) sugarcane molasses at the stationary phase, with a yield of 231 and 357 mg/l of ssc-PHA per g dry cell weight, respectively.

Introduction

Poly[hydroxyalkanoic] acids (PHAs) are natural polyesters that occur in many prokaryotic species (Anderson & Dawes 1990; Madison & Huisman 1999). These polymers are accumulated when the bacteria are grown in the presence of an excess carbon source and under limiting nutrient conditions, such as phosphate or nitrogen starvation (Madison & Huisman 1999). They constitute a stored carbon source that is metabolized when the levels of nutrients available in the environment are sufficient for cellular metabolism (Anderson & Dawes 1990; Madison & Huisman 1999).

PHAs are considered environmentally friendly thermoplastics because of their very short half-life when compared with synthetic plastics and because they can be produced from renewable resources (Madison & Huisman 1999; Shimaó 2001). Actually, PHAs can be grouped in two major classes: short side chain-poly[hydroxyalkanoate] (ssc-PHA), with carbon numbers of monomers ≤ 5 , and medium side chain-poly[hydroxyalkanoate] (m-sc-PHA), with carbon numbers of monomers ≥ 6 (Madison & Huisman 1999). The ssc-PHA class

comprises the best known polymers in terms of prokaryotic metabolism and physico-chemical properties: the poly[3-hydroxybutyrate] (PHB), the poly[3-hydroxyvalerate] (PHV), and the copolymer P(HB-co-HV). These polymers were firstly used for disposable and biodegradable packages (Madison & Huisman 1999), but today the ssc-PHA has other industrial applications, e.g. (i) as a substrate for production of pure D(-)-3-hydroxybutyric acid, a valuable chiral building block used for the synthesis of many fine chemicals such as antibiotics, vitamins, aromatics, and pheromones (Zhao *et al.* 2003); (ii) as a drug carrier and scaffold material for tissue engineering, due to their biodegradability and biocompatibility with mammalian tissues (Zinn *et al.* 2001); and (iii) as an additive of environmentally friendly paints and coatings (van der Walle *et al.* 1999). Thus, bioprospecting for new microorganisms that can accumulate high amounts of ssc-PHA using cheap carbon substrates or agro-industrial wastes are industrially very welcome.

One characteristic of ssc-PHA is its wide taxonomical and environmental (anaerobic or aerobic habitats) distribution, with many genera of Eubacteria (gram-negative

and gram-positive) and Archaea able to accumulate this polymer in variable amounts (Zinn *et al.* 2001). Of the many bacteria isolated from environments such as soil, water or domestic sewage, those belonging to the genera *Pseudomonas* and *Ralstonia* are predominant within the group of gram-negative bacteria (Gomez *et al.* 1996; Vaisanen *et al.* 1998; de Lima *et al.* 1999). The genus *Ralstonia*, especially *Ralstonia eutropha*, is considered the model organism for production of ssc-PHAs from simple organic substrates. However, this species cannot use sucrose or sugarcane molasses as carbon sources.

R. pickettii is a nonfermenting gram-negative rod that is an occasional pathogen of nosocomial septicaemia and tissue infections in humans and animals (Labarca *et al.* 1999; Maroye *et al.* 2000; Yoneyama *et al.* 2000; De Baere *et al.* 2001). The ability of *R. pickettii* to use a wide range of carbon sources, from glucose to nitroaromatic and alkylaromatic organic compounds, makes this organism a very interesting candidate for studies of carbon metabolism associated with the production of molecules of biotechnological interest (Yabannavar & Zylstra 1995; Hemachander & Puvanakrishnan 2000; Hemachander *et al.* 2001) as is the case of PHAs. Traditionally, *R. pickettii* strains are used as model organisms to study the biodegradation of alkylaromatic hydrocarbon compounds in hypoxic aquifer environments (Kahng *et al.* 2000).

The aim of this study was to analyse the ability of *R. pickettii* 61A6, isolated from the soil of a subtropical rainforest, to produce high amounts of ssc-PHAs in a simple defined culture medium containing high concentrations of sugarcane molasses and sucrose in batch culture.

Materials and methods

Bacterial strains, culture media, plasmid and growth conditions

The culture media that were used to isolate the bacterial strains from soil and to induce PHA accumulation in *R. pickettii* 61A6 and *R. eutropha* H16 are described in Table 1. *R. eutropha* PHB-4 was used as negative control in all assays. For growth and maintenance of *Ralstonia* species at 30 or 37 °C, nutrient broth (NB) (3 g/l bacto-peptone, 5 g/l beef extract, 20 g/l bacto-agar) was used. When necessary, micronutrient solution (50 g/l EDTA, 11.4 g/l H₃BO₃, 22.0 g/l ZnSO₄ · 7H₂O, 5.06 g/l MnCl₂ · 4H₂O, 4.99 g/l FeSO₄ · 7H₂O, 1.61 g/l CoCl₂ · 6H₂O, 1.57 g/l CuSO₄ · 5H₂O, 1.1 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O) was added (Guirard & Snell 1981). Medium 21C (Table 1), a defined medium poor in nitrogen, was used to induce accumulation of PHAs in all bacterial species. *Escherichia coli* TOP10 (*F*⁻*mcrA* Δ(*mrr-hdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *araD139*Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*) was grown at 37 °C in Luria Bertani (LB) medium supplemented with kanamycin at a final concentration of 50 μg/ml. Plasmid pZErOTM-2 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) was used to clone the 16S rDNA gene of *R. pickettii* 61A6.

In order to determine the capacity of the cells to grow on sugarcane molasses or sucrose as carbon source for growth and ssc-PHA production, the colonies were inoculated on solid NB, and after growth for 2 days at 30 °C were replica-plated to solid 21C medium containing 0.2, 5 or 10% (w/v) of sucrose or sugarcane molasses. After 2 days at 30 °C the plates were scored for growth.

Table 1. Chemical composition of the culture media used for isolation of bacteria from soil and for growth and induction of PHA accumulation in *Ralstonia* spp.

Compounds (per l)	Culture Media								
	2A	5A ^a	8A	11A	21C ^a	26A	43C ^a	58A	61A
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)				0.5	0.05				
Nicotinic acid (mg)					1.0				
Biotin (mg)					0.01				
CaCl ₂ · 2H ₂ O (g)			0.05				0.02		
Thiamine chloride (mg)					0.5				
Yeast extract (g)	3.0	5.0		0.05				10.0	
FeSO ₄ · 7H ₂ O (mg)									10.0
Glucose (g)		1.0	1.0					2.5	
K ₂ HPO ₄ (g)			0.04				0.016		1.0
KH ₂ PO ₄ (g)			0.04	1.06	2.77				
KNO ₃ (g)		0.5							3.0
MgSO ₄ (g)			0.075	0.1			0.1		0.5
MnCl ₂ · 4H ₂ O (g)							0.2		
Na ₂ HPO ₄ (g)									
NaCl (g)						5.0			0.5
NH ₄ Cl (g)					0.05				
Peptone (g)	3.0		0.5	0.05					20.0
Sucrose (g)									30.0
Tryptone (g)		5.0				8.0			
pH	6.8	7.0	7.0	7.0	6.8	6.0	7.5	7.0	6.8

^a Micronutrients solution was added in the following media (l⁻¹): 5A (1.0 ml), 21C (20.0 ml) and 43C (1.0 ml).

R. pickettii 61A6 is available from the authors upon request.

Isolation procedures

Approximately 3 g of 24 soil samples from a subtropical rainforest situated near the university were added to 99 ml of bacterial diluent buffer (8.5 g/l NaCl, 0.3 g/l KH₂PO₄, 0.6 g/l Na₂HPO₄, 0.1 g/l gelatin) and incubated at 30 °C in a gyratory shaker for 15 min at 200 rev/min (Gerhardt 1981). Aliquots of 100 µl were taken and spread on the solid culture media described in Table 1. The plates were incubated for a minimum of 10 days at 28 °C to allow for slow growth. Colonies were selected by their appearance as described by Smibert & Krieg (1981) and were restreaked two or three times to obtain pure cultures for PHA analysis.

Screening for PHA production

PHA-producing isolates were selected on the media described in Table 1 and in NB medium, all supplemented with 0.5 µg Nile red/ml (Sigma-Aldrich Co. Ltd.). An alcoholic solution of 0.02% (w/v) Sudan black B (Sigma-Aldrich Co. Ltd.) was used as a second dye to confirm the results (Schlegel *et al.* 1970). Nile blue A (Sigma-Aldrich Co. Ltd.) was used to verify the cellular inclusions of PHA in dry smears of formalin-treated cells under fluorescent microscopy at 450 nm as previously described (Ostle & Holt 1982).

Scanning spectrophotometry and GC-MS analysis

Scanning spectrophotometry was used to detect ssc-PHAs (Slepecky & Law 1960). Spectra were obtained against a blank of sulphuric acid using a Shimadzu UV-160A spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) in the wavelength range from 200 to 300 nm. GC-MS analysis of the Nile red and Nile blue A fluorescent isolates was performed after methanolysis (Klinkle *et al.* 1999) in a Perkin Elmer 8420 gas chromatograph coupled to the mass spectrometer QMD 1000 with a Permaphase PEG 25Mx column and a flame ionization detector (Perkin Elmer & Co. GmbH, Überlingen, Germany).

Total DNA isolation from *R. pickettii* 61A6

Two millilitre of a NB culture were centrifuged (10 min at 10,000 × *g*) and the collected cells resuspended in 1 ml TEG (50 mM glucose, 25 mM TrisCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). One millilitre of phenol buffered to pH 8.0 was added and the suspension was vortexed for 30 s. The mixture was incubated at 65 °C for 1 h and centrifuged (5 min at 12,000 × *g*) to separate the phases. The aqueous phase was transferred to a new tube and total DNA was precipitated by adding absolute ethanol and centrifuging at 12,000 × *g* for 10 min. The precipitated

total DNA was washed with ethanol 70% (v/v) and resuspended in TrisHCl buffer (10 mM, pH 8.5).

PCR amplification and cloning of 16S rDNA from *R. pickettii* 61A6

A volume of 1 µl from the solution of total DNA of *R. pickettii* 61A6 was used in the polymerase chain reaction (PCR) with universal primers from the downstream and upstream region of the 16S gene: 16S-27 (5'-GAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3') and 16S-1525 (5'-AGA-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). The primers were purchased from MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany). The PCR reaction was carried out using a proofreading *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen Corporation) in a total volume of 50 µl. PCR cycles included the following steps: 1 min at 94 °C for denaturation, 1 min at 55 °C for annealing and 2 min at 72 °C for extension in a total of 35 cycles followed by a final extension of 10 min at 72 °C. The amplified product was isolated from the 1% (w/v) agarose gel and ligated into an *EcoRV* digested pZERTM-2 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen Corporation). *E. coli* TOP10 was transformed using the CaCl₂ procedure as previously described (Ausubel *et al.* 1987). Plasmids containing the 16S rDNA were isolated from transformed cells by alkaline lysis (Ausubel *et al.* 1987) and used in DNA sequencing.

Sequencing and phylogenetic analysis

The cloned 16S rDNA was sequenced using DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit for MegaBACE (Amersham-Pharmacia Biotech Limited, Buckinghamshire, England) with the primers 16S-27 and 16S-1525 in an automatic sequencer MegaBACE 1000 (Amersham-Pharmacia). The phylogenetic data were obtained by alignment of the different 16S rDNA sequences listed in Table 2 using the program CLUSTAL W version 1.8 (Thompson *et al.* 1994) and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; National Center for Biotechnology Information [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]) with the standard parameters. The alignments were visually corrected when necessary. An unrooted phylogram was obtained by the neighbor-joining method (Thompson *et al.* 1994). Bootstrap analysis was performed (heuristic option, 100 replications) to check the tree topology for robustness.

Quantification of PHA productivity by Nile red spectrofluorometry

For the analysis of PHA productivity in *R. pickettii* 61A6, approximately 60 ml of 21C medium with three different concentrations (0.2, 5 and 10% [w/v]) of sugarcane molasses and sucrose were inoculated with 1.8 ml of an overnight NB culture of *R. pickettii* 61A6. The cells were grown at 37 °C for 96 h in a gyratory shaker at 200 rev/min. Aliquots of 2 ml were taken

Table 2. Bacterial species used in the phylogenetic analysis of *Ralstonia pickettii* 61A6.

Bacterial species	Strain	GenBank number	Origin	Reference
Beta proteobacterium	MC3	AB013421	Soil	Paster <i>et al.</i> (2001)
<i>Burkholderia</i> sp. oral clone	AK168	AY005032.1	Human subgingival plaque	Paster <i>et al.</i> (2001)
<i>Cupriavidus necator</i>		AF191737	ATCC strain	Unpublished
Earthworm burrow bacterium	B3D3	AY039386.1	Soil	Unpublished
<i>Pseudomonas pickettii</i>		X67042.1	ATCC strain	Li <i>et al.</i> (1993)
<i>Pseudomonas</i> sp.	BUV1	AF396930	Ultrapure water	Unpublished
<i>Pseudomonas</i> sp.	MF254A	AF368759	Ultrapure water	Unpublished
<i>Pseudomonas syzygii</i>	RAL09	PSY270253	Nosocomial infection	De Baere <i>et al.</i> (2001)
<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	LMG6866	RTH270258	Nosocomial infection	De Baere <i>et al.</i> (2001)
<i>Ralstonia eutropha</i>		AFARGSSA	ATCC strain	Unpublished
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NCPBP342	AF207896	Soil	Suyama <i>et al.</i> (1998)
<i>Ralstonia</i> sp.	APF11	AB045276	Heavy water	Unpublished
<i>Ralstonia</i> sp.	ML7	AB013428	Soil	Suyama <i>et al.</i> (1998)
<i>Ralstonia</i> sp.	ML10	AB013429	Soil	Unpublished
<i>Ralstonia</i> sp.	W-15	AF390082	Soil	Unpublished
<i>Ralstonia</i> sp.	YL13	AB013438	Soil	Suyama <i>et al.</i> (1998)
<i>Ralstonia</i> sp.	HAB-08	AB051682	Soil	Futamata <i>et al.</i> (2001)
<i>Ralstonia</i> sp.	HAB-18	AB051684	Soil	Futamata <i>et al.</i> (2001)
Uncultured bacterium	OSs75	AF018064	Neolithic Glacier Mummy	Unpublished
Uncultured bacterium	AT425_EubE3	AY053492.1	Gas hydrates	Lanoil <i>et al.</i> (2001)
Uncultured beta proteobacterium	CR-PA50	AF141431	Columbia River	Crump <i>et al.</i> (1999)
Uncultured eubacterium	3-24	UEU11148	Baikal picoplankton	Semenova & Kuznedelov (1998)
Unidentified bacterium	OxSCC-14	UBA387867	Flooded rice paddy soil	Ludemann <i>et al.</i> (2000)

every 2 h for the first 72 h and then every 24 h. All aliquots were subdivided into two aliquots of 1 ml each. The first aliquot was used immediately to measure cell density by optical density at 660 nm. The results of the measurement were used to estimate the cellular dry weight according to Koch (1981). The second aliquot was centrifuged at $12,000 \times g$ for 1 min and the pellet was resuspended in a solution of 0.1% (v/v) formalin for 30 min to fix the cells. The cells were washed twice with sterile bacterial diluent buffer and resuspended in the same buffer to an A_{540} of 0.5 and 1 μ l of Nile red (25 mM in DMSO) ml^{-1} was added. The reaction was carried out for 60 min at 25 °C. This suspension was immediately used to quantify the intracellular PHA accumulated in *R. pickettii* 61A6 by the spectrofluorometric assay as described by James *et al.* (1999).

GenBank accession number

The partial sequence of 16S rDNA from *R. pickettii* 61A6 can be accessed under GenBank accession number AY072880.

Results

Isolation of bacterial strains from subtropical rainforest soil and PHA analysis of colonies and cells

A total of 398 different bacterial colonies with distinct appearance were isolated from rainforest soil samples using the culture media listed in Table 1. These culture media were selected because they supply the macro and

microelements biochemically necessary for the growth of some important groups of bacteria that are predominant in soils, for example, the large Proteobacteria and Gram-positive bacterial groups (Guirard & Snell 1981). From this first selection, 38 colonies were selected using Nile red and Sudan black B screening staining after 2 days of growth at 30 °C. These colonies were further studied for the presence of PHA granules by microscopical analysis to eliminate false positives. Finally, eight distinct bacterial colonies were identified that showed fluorescent granules when Nile blue A was used as an intracellular dye. After growth in NB for 24 h at 30 °C, all cultures, including *R. eutropha* H16, showed the presence of PHB or P(HB-HV), as assessed by spectrofluorometry. One organism was able to grow at all concentrations of sucrose and sugarcane molasses in less than 2 days at 30 °C and to produce PHA as assessed by fluorescence microscopy using Nile blue A. This strain, named 61A6, was phylogenetically classified and analyzed for ssc-PHA production.

Phylogenetic analysis of *R. pickettii* 61A6

R. pickettii 61A6 was classified to genus and species level from the sequence analysis of 16S rDNA amplified by PCR and cloned in pZErOTM-2 vector. A total of 482 bp were sequenced. After sequencing, a comparative study of this sequence with others present in GenBank (Table 2) using CLUSTAL W and BLAST was performed. Clustering analysis (Figure 1) obtained by the neighbor-joining method showed $\geq 98\%$ identity with the 16S rDNA of *R. pickettii* and with other bacterial species not cultivated or identified at the moment, probably indicating that these species are taxonomically

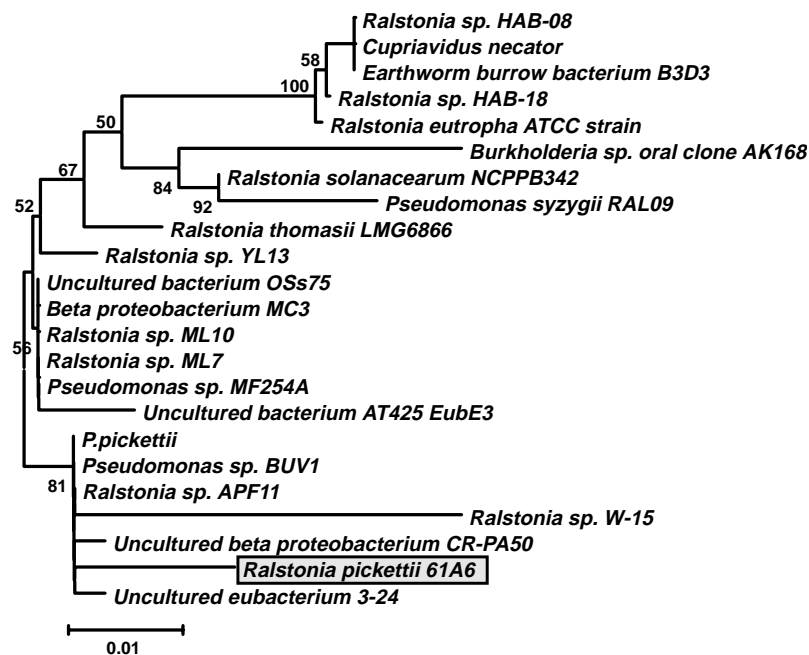


Figure 1. Unrooted phylogram obtained by neighbour-joining of the 16S rDNA sequences listed in Table 2 with 16S rDNA of *Ralstonia pickettii* 61A6. Bootstrap numbers are indicated at the nodes. *R. pickettii* 61A6 is highlighted in the phylogram by a grey box. The scale bar represents the number of changes in the nucleotide sequences.

very close to environmental and clinical strains of *R. pickettii*.

Production of ssc-PHA by *R. pickettii* 61A6

The ability of *R. pickettii* 61A6 to grow in simple media containing different concentrations of sugarcane molasses or sucrose was studied in batch cultures at 37 °C for approximately 96 h and the intracellular accumulation of ssc-PHA was determined by spectrofluorometric assay.

At a sucrose concentration of 0.2% (w/v), the bacterium showed poor growth after 96 h and a ssc-PHA accumulation of approximately 63 mg/l (Figure 2A) after 48 h of growth. In 5% (w/v) sucrose, growth increased and ssc-PHA accumulation was 82 mg/l after 54 h (Figure 2B). However, the best ssc-PHA accumulation and growth occurred at a concentration of 10% (w/v) sucrose (Figure 2C), when intracellular ssc-PHA reached 177 mg/l in 50 h of culture.

In 0.2% (w/v) sugarcane molasses there was good growth but poor ssc-PHA accumulation (approximately 57 mg/l) in all incubation times (Figure 3A). At a concentration of 5% (w/v) of sugarcane molasses, the ssc-PHA accumulation increased dramatically, reaching 183 mg/l after 28 h, and then lowering to 90 mg/l after 56 h. After this period of time a rapid ssc-PHA accumulation was observed, reaching an intracellular concentration of 357 mg/l after 96 h of growth (Figure 3B). In 10% (w/v) sugarcane molasses, the bacterium showed a long lag phase (25 h) and accumulated 102 mg/l intracellular ssc-PHA after 48 h of growth (Figure 3C).

Chemical analysis of ssc-PHA from *R. pickettii* 61A6

Scanning spectrophotometry detected ssc-PHA in all cultures of *R. pickettii* 61A6 and *R. eutropha* H-16 but not in *R. eutropha* PHB-4 (Figure 4). Using GC-MS, the polymer produced by *R. pickettii* 61A6 was shown to be a ssc-PHA containing high amounts of 3-hydroxybutyrate (>95 mol% of HB) and some 3-hydroxyalkanoates not yet identified (Figure 5).

Discussion

We isolated 398 bacterial colonies from subtropical rainforest soil at the first screening. The choice of media was governed by the fact that the major bacterial groups have some physiological characteristics (e.g. use of micronutrients or carbohydrates for growth) that distinguish one group from the others (Slater *et al.* 1992). These characteristics can thus be employed to selectively enrich a desired bacterial group in the medium, and thus to proceed towards a second screening for isolation of those bacterial colonies with the capacity to accumulate PHA in reasonable quantities (Gomez *et al.* 1996).

A strain of *R. pickettii*, identified by 16S rDNA analysis, accumulated ssc-PHA in the presence of high concentrations of sucrose or sugarcane molasses. Sugarcane molasses is an industrial by-product in sugar production and constitutes a cheap microbial growth medium. Alternatively, sucrose is a cheap substrate when compared to glucose or to the propionic acid that has been used to feed *R. eutropha* and recombinant

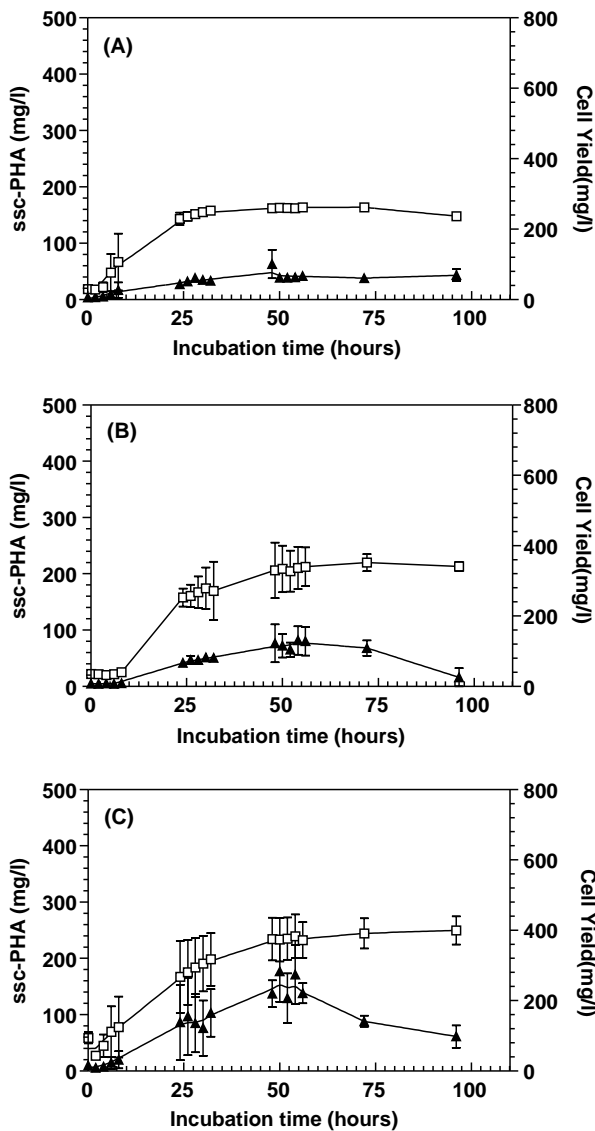


Figure 2. Cell yield in milligrams of dry weight per litre of culture (\square) and ssc-PHA accumulation pattern (\blacktriangle) of *Ralstonia pickettii* 61A6 in defined medium 21C (pH 6.8) containing sucrose at a concentration of (A) 0.2% (w/v); (B) 5% (w/v) and (C) 10% (w/v). The cells were grown at 37 °C for 96 h in a gyratory shaker at 200 rev/min.

E. coli harbouring the operon *phaCAB* of *R. eutropha* to produce a copolyester of P(HB-HV) (Slater *et al.* 1992; Gomez *et al.* 1996). In this way, a PHA-accumulating bacterium naturally able to use sucrose or sugarcane molasses has a great potential for industrial application. The ssc-PHA accumulation pattern and growth response in *R. pickettii* 61A6 were different for sucrose and sugarcane molasses. In sucrose, the accumulation was positively correlated with increase in sucrose concentration (Figure 2A–C), following the PHA accumulation model described for *Ralstonia eutropha* H16 (Madison & Huisman 1999). In sugarcane molasses, the pattern of PHA accumulation was found more erratic (Figure 3A–C) in all experiments. One possible explanation for this might be that at high concentrations the osmotic pressure exerts deleterious effects on the cells. In addition, untreated sugarcane molasses have

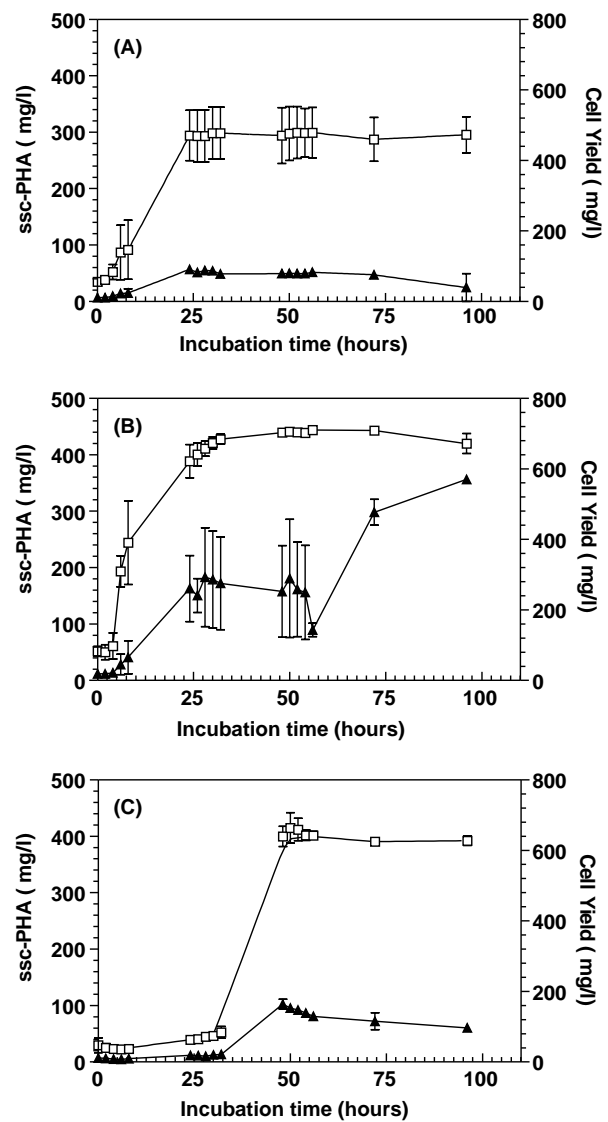


Figure 3. Cell yield in milligrams of dry weight per litre of culture (\square) and ssc-PHA accumulation pattern (\blacktriangle) of *Ralstonia pickettii* 61A6 in defined medium 21C (pH 6.8) containing sugarcane molasses at a concentration of (A) 0.2% (w/v); (B) 5% (w/v) and (C) 10% (w/v). The cells were grown at 37 °C for 96 h in a gyratory shaker at 200 rev/min.

high levels of organic nitrogen and iron salts that interfere with the production of PHA (Gouda *et al.* 2001). Even at 0.2% of sugarcane molasses, the cells probably found themselves in a rich environment that did not induce the stress-related production of PHA. However, 5% (w/v) molasses combined the physiological levels of nutrients necessary to support bacterial metabolism with the osmotic stress required to induce accumulation of PHA. However, it is necessary to stress that the growth and PHA-production parameters of this strain were not optimized in this work.

The yield of ssc-PHA produced by this *R. pickettii* in a non-optimized condition was surprisingly high. Compared with its closest species *R. eutropha* strain H16, that can accumulate up than 90% of ssc-PHAs by cell dry weight under optimized conditions, our strain showed a good industrial potential. Moreover, compa-

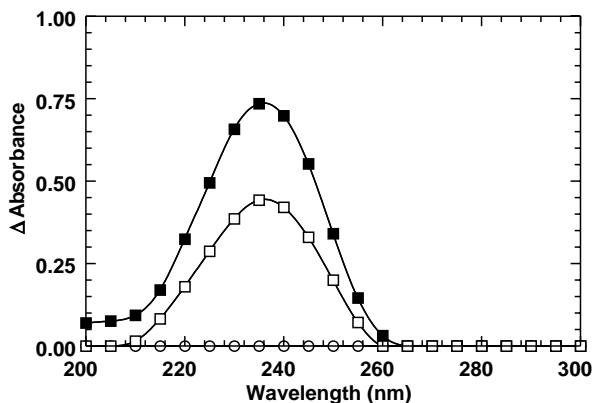


Figure 4. Scanning spectra of ssc-PHA from *Ralstonia pickettii* 61A6 (■), *Ralstonia eutropha* H16 (□) and *Ralstonia eutropha* PHB-4 (○).

risation with wild-type nitrogen-fixing bacteria *Alcaligenes latus* and *Azotobacter vinelandii*, that produce ssc-PHA in the presence of sucrose or sugarcane molasses, showed that our isolate has advantages that these more known bacteria do not have. *A. latus* accumulates ssc-

PHA during its exponential growth phase (Madison & Huisman 1999), and the resulting biomass obtained is significantly low when compared with other PHA-producing bacteria, due to the growth inhibition induced by intracellular ssc-PHAs. Wild-type *A. vinelandii*, in its turn, produces copious amounts of extracellular alginate, that makes industrial downstream processes more difficult (Byrom 1987). *R. pickettii* 61A6 accumulates ssc-PHAs only during the stationary growth phase and does not produce alginate or other complex extracellular carbohydrates. We expect that both biomass and polymer yield will increase significantly during a more controlled growth, e.g. in a bench fermentor.

The *R. pickettii* strains are found in diverse environments: (i) those containing very low concentrations of nutrients, such as distilled water, mineral water or even saline solutions for hospital use (Labarca *et al.* 1999; Maroye *et al.* 2000; Yoneyama *et al.* 2000); (ii) patients with serious nosocomial infections or in hospital outbreaks (Labarca *et al.* 1999; Maroye *et al.* 2000; Yoneyama *et al.* 2000); (iii) hypoxic environments containing alkylaromatic or nitroaromatic compounds

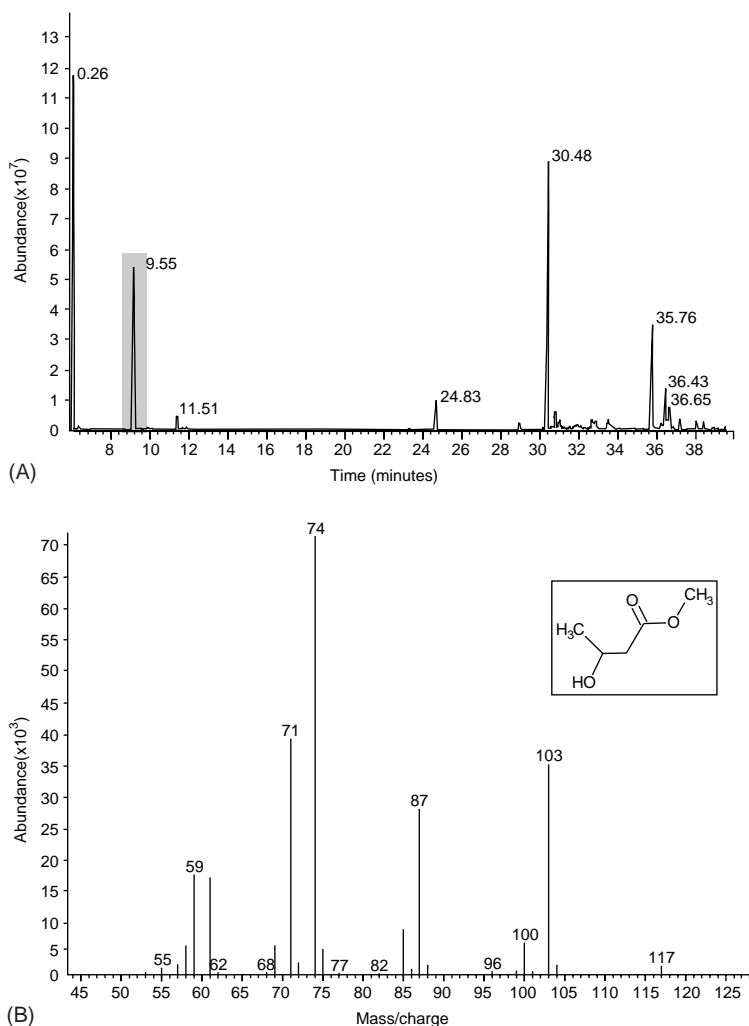


Figure 5. Gas chromatography (A) and mass spectrometry (B) analysis of ssc-PHAs extracted from *Ralstonia pickettii* 61A6. The grey area at the retention time of 9.55 min in (A) indicates the 3-hydroxybutyrate methyl ester GC peak analysed by MS.

of industrial origin (Yabannavar & Zylstra 1995; Kahng *et al.* 2000). The metabolic diversity within the species is demonstrated by the ability of one strain, *R. pickettii* PKO1, to use toluene and benzene as carbon sources as well as long chain carboxylic acids (Yabannavar & Zylstra 1995; Hemachander & Puvanakrishnan 2000; Hemachander *et al.* 2001). This metabolic diversity and adaptability of *R. pickettii* makes it an interesting organism for biotechnological applications and advanced metabolic engineering in comparison with *R. eutropha*, the current model bacterium for ssc-PHA production.

The presence of *R. pickettii* in soil was not surprising, but its ability to produce ssc-PHA in high concentrations of sucrose and sugarcane molasses is noteworthy. Most studies on the production of PHAs in the genus *Ralstonia* use *R. eutropha* as bacterial model, and little is known about other species, which may be more metabolically and environmentally flexible as are *R. pickettii* and *R. solanacearum* strains. The results from the phylogenetic analysis show a high similarity of some unculturable or unidentified bacteria isolated from soil or water with *R. pickettii* 61A6, probably indicating that these bacteria belong to the *Ralstonia* genus or that they represent different *R. pickettii* strains. One close species, *R. mannitolilytica*, which is responsible for nosocomial infections in hospitals generated by contaminated saline solutions (Vanechoutte *et al.* 2001), showed a high degree of phylogenetic similarity with *R. pickettii* 61A6 as well as with *P. syzygii*, the agent of Sumatra disease of cloves and a phytopathogen of banana crops (Seal *et al.* 1993; Taghavi *et al.* 1996).

New *Ralstonia* species or strains able to grow on agroindustrial wastes, resulting from bioprospecting of soil and water, could be attractive alternatives to *Ralstonia eutropha*, improving the current production of PHA both in terms of yield and cost. On the other hand, the genes and operons responsible for the metabolism of sucrose, sugarcane molasses or even alkylaromatic compounds that are found in these *Ralstonia* species, could be cloned in *Ralstonia eutropha* strains, thus improving, by metabolic engineering, the ability of *Ralstonia eutropha* in to use a wide range of cheap carbon compounds for PHA production. Alternatively, there is the possibility of engineering *R. pickettii* strains for production of medium side chain-poly[hydroxyalkanoate] (msc-PHAs) from industrial or agro-industrial wastes. In other words, is necessary to expand the studies of PHA production in *R. eutropha* to other *Ralstonia* species in order to improve our industrial capability for production of PHAs for commercial use.

Acknowledgements

We thank Drs Beatriz Mendez, Alexander Steinbüchel, Bernd Rehm and Christine Gaylarde for helpful discussions, GC-MS analysis, *Ralstonia eutropha* strains and

critical reading of the manuscript. This work was supported by European Project No ERB 3514PL962027 and GENOTOX (Genotoxicity Laboratory, UFRGS).

References

- Anderson, A.J. & Dawes, E.A. 1990 Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* **54**, 450–472.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 1987 *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons. ISBN 0-471-13781-2.
- Byrom, D. 1987 Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology* **5**, 246–250.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V. & Baross, J.A. 1999 Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3192–3204.
- De Baere, T., Steyaert, S., Wauters, G., De Vos, P., Goris, J., Coenye, T., Suyama, T., Verschraegen, G. & Vanechoutte, M. 2001 Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/*thomasi* strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolilytica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 547–558.
- de Lima, T.C.S., Grisi, B.M. & Bonato, M.C.M. 1999 Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. *Brazilian Journal of Microbiology* **30**, 214–224.
- Futamata, H., Harayama, S. & Watanabe, K. 2001 Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4671–4677.
- Gerhardt, P. 1981 Diluents and biomass measurement. In *Manual of Methods for General Microbiology*, ed. Gerhardt, P. pp. 504–507. Washington: American Society for Microbiology. ISBN 0-914826-30-1.
- Gomez, J.G.C., Rodrigues, M.F.A., Alli, R.C.P., Torres, B.B., Bueno Netto, C.L., Oliveira, M.S. & da Silva, L.F. 1996 Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 785–791.
- Gouda, M.K., Swellam, A.E. & Omar, S.H. 2001 Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research* **156**, 201–207.
- Guirard, B.M. & Snell, E.E. 1981 Biochemical factors in growth. In *Manual of Methods for General Microbiology*, ed. Gerhardt, P. pp. 79–111. Washington: American Society for Microbiology. ISBN 0-914826-30-1.
- Hemachander, C. & Puvanakrishnan, R. 2000 Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process Biochemistry* **35**, 809–814.
- Hemachander, C., Bose, N. & Puvanakrishnan, R. 2001 Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochemistry* **36**, 629–633.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., Keevil, C.W. & Wait, R. 1999 Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 822–827.
- Kahng, H.Y., Byrne, A.M., Olsen, R.H. & Kukor, J.J. 2000 Characterization and role of *tbuX* in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1. *Journal of Bacteriology* **182**, 1232–1242.
- Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B. & Kessler, B. 1999 Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 540–548.
- Koch, A.L. 1981 Growth measurement. In *Manual of Methods for General Microbiology*, ed. Gerhardt, P. pp. 179–207. Washington: American Society for Microbiology. ISBN 0-914826-30-1.

- Labarca, J.A., Trick, W.E., Peterson, C.L., Carson, L.A., Holt, S.C., Arduino, M.J., Meylan, M., Mascola, L. & Jarvis, W.R. 1999 A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. *Clinical Infectious Diseases* **29**, 1281–1286.
- Lanoil, B.D., Sassen, R., La Duc, M.T., Sweet, S.T. & Nealson, K.H. 2001 Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5143–5153.
- Li, X., Del Dot, T., Dorsh, M., Stackebrandt, E., Sly, L.I. & Hayward, A.C. 1993 Phylogenetic studies on rRNA group II *Pseudomonas* using 16S rRNA sequences. *The Journal of Applied Bacteriology* **74**, 324–329.
- Ludemann, H., Arth, I. & Liesack, W. 2000 Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 754–762.
- Madison, L.L. & Huisman G.W. 1999 Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 21–53.
- Maroye, P., Doermann, H.P., Rogues, A.M., Gachie, J.P. & Megraud, F. 2000 Investigation of an outbreak of *Ralstonia pickettii* in a paediatric hospital by RAPD. *The Journal of Hospital Infection* **44**, 267–272.
- Ostle, A.G. & Holt, J.G. 1982 Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 238–241.
- Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F.E. 2001 Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* **183**, 3770–3783.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. & Trigalet, A. 2000 Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an african subdivision. *Microbiology* **146**, 1679–1692.
- Schlegel, H.G., Lafferty, R. & Krauss, I. 1970 The isolation of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. *Archiv für Mikrobiologie* **71**, 283–294.
- Seal, S.E., Jackson, L.A., Young, J.P. & Daniels, M.J. 1993 Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* **139**, 1587–1594.
- Semenova, E.A. & Kuznedelov, K.D. 1998 A study of the biodiversity of Baikal picoplankton by comparative analysis of 16S rRNA gene 5'-terminal regions. *Molecular Biology* **32**, 754–760.
- Shimao, M. 2001 Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 242–247.
- Slater, S., Gallaher, T. & Dennis, D. 1992 Production of poly-(3-hydroxybutyrate-Co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1089–1094.
- Slepecky, R.A. & Law, J.H. 1960 A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analytical Chemistry* **32**, 1697–1699.
- Smibert, R.M. & Krieg, N.R. 1981 General characterization. In *Manual of Methods for General Microbiology*, ed. Gerhardt, P. pp. 409–443. Washington: American Society for Microbiology. ISBN 0-914826-30-1.
- Suyama, T., Tokiwa, Y., Ouichanpagdee, P., Kanagawa, T. & Kamagata, Y. 1998 Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5008–5011.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L.I. & Fegan, M. 1996 Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 10–15.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Vaisanen, O.M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F.A., Busse, H.J. & Salkinoja-Salonen, M.S. 1998 Microbial communities of printing paper machines. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 1069–1084.
- Valentin, H.E., Broyles, D.L., Casagrande, L.A., Colburn, S.M., Creely, W.L., DeLaquil, P.A., Felton, H.M., Gonzales, K.A., Houmiel, K.L., Lutke, K., Mahadeo, D.A., Mitsky, T.A., Padgett, S.R., Reiser, S.E., Slater, S., Stark, D.M., Stock, R.T., Stone, D.A., Taylor, N.B., Thorne, G.M., Tran, M. & Gruys, K.J. 1999 PHA production, from bacteria to plants. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 303–306.
- van der Walle, G.A.M., Buisman, G.J.H., Weusthuis, R.A. & Eggink, G. 1999 Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 123–128.
- Vanechoutte, M., De Baere, T., Wauters, G., Steyaert, S., Claeys, G., Vogelaers, D. & Verschraegen, G. 2001 One case of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with *Ralstonia mannitolilytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 4588–4590.
- Yabannavar, A.V. & Zylstra, G. 1995 Cloning and characterization of the genes for *p*-nitrobenzoate degradation from *Pseudomonas pickettii* YH105. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4284–4290.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Arakawa, M. 1992 Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology* **36**, 1251–1275.
- Yoneyama, A., Yano, H., Hitomi, S., Okuzumi, K., Suzuki, R. & Kimura, S. 2000 *Ralstonia pickettii* colonization of patients in an obstetric ward caused by a contaminated irrigation system. *The Journal of Hospital Infection* **46**, 79–80.
- Zhao, K., Tian, G., Zheng, Z., Chen, J.-C. & Chen, G.-Q. 2003 Production of D-(–)-3-hydroxyalkanoic acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **218**, 59–64.
- Zinn, M., Witholt, B. & Egli, T. 2001 Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **53**, 5–21.

Anexo II

**Production of PHB by a *Pseudomonas* sp. strain grown in sugar
cane molasses**

**Bonatto, D., Matias, F., Lisbôa, M. P., Bogdawa, H. M. and
Henriques, J. A. P.**

**in: *Biotechnological Advances and Applications in Bioconversion of
Renewable Raw Materials*. GBF, Braunschweig, Germany; ed. Jonas, R.,
Pandey, A., and Tharun, G. (2004)**

PRODUCTION OF PHB BY A *PSEUDOMONAS* SP. STRAIN GROWN IN SUGARCANE MOLASSES

Diego Bonatto, Fernanda Matias, Márcia P. Lisbôa, Heique M. Bogdawa, João Antônio P. Henriques
Centro de Biotecnologia – Dept. de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento
Gonçalves, 9500, Cx. Postal 15005, Porto Alegre, RS, Brazil. pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

INTRODUCTION

Poly[hydroxyalkanoates] (PHAs) are natural polyesters that occur in many groups of prokaryotes such as bacteria and some archeal cells (STEINBÜCHEL & VALENTIN 1995). These polymers accumulate when bacterial cells are grown in the presence of an excess of carbon sources and a lack of phosphate and/or nitrogen compounds in the environment (ANDERSON & DAWES 1990). Accumulated in an amorphous state and in cytoplasmic granules, PHAs serve as a stored carbon source, metabolized when the levels of phosphate and/or nitrogen compounds increase in the environment (ANDERSON & DAWES 1990, KRANZ ET AL. 1997). The metabolism of PHAs is well known in different species of bacteria such as *Bacillus megaterium* and *Ralstonia eutropha*. The genes involved in the metabolism of PHAs from different bacteria have been characterized and there has been a considerable development in this field during the last ten years (SCHEMBRI ET AL. 1995). Moreover, the importance of PHAs to the industrial and biotechnological fields is in strong scientific and technical development.

PHAs have the same physical and chemical properties of their petrochemical analogs with one basic difference: biological PHAs are biodegradable in the environment (ANDERSON & DAWES 1990). Because of the stereochemical properties of their monomers constituents of the polymer chain, biological PHAs have a shorter half-life in the environment when compared with synthetic plastics. Months, or even days, are necessary for the degradation of biological PHAs, whereas synthetic plastics require years or centuries to degrade. Unfortunately the cost of biological PHAs is still very high for commercial purposes (ANDERSON & DAWES 1990).

Aiming at the reduction of the cost of biological PHAs for commercial applications, the European Community has developed an international project named „PHA production from sugarcane and derivatives“ with the collaboration of laboratories in Argentina, Spain, Germany and Brazil. Each laboratory is responsible for one of the working packages.

In Brazil, the Molecular Radiobiology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul is in charge of the isolation of new species of bacteria that produce different kinds of PHAs, or strains having the capacity to use sucrose present in sugarcane molasses to produce industrial PHAs. In the first screening of 300 bacterial isolates from many sources (soil, water and domestic sewage) 10 isolates showed the potential to produce different PHAs and one showed the capacity to synthesize poly[hydroxybutyrate] (PHB) under high concentration of sugarcane molasses in the culture medium (0.2%-10% w/v). The procedure to isolate bacterial strains was based in microbial ecology studies that considered the metabolic requirements of different bacterial groups under appropriate culture media conditions. These protocols are being used for the isolation of bacterial cells with some biotechnological or industrial potential (DEMAIN & SOLOMON 1986).

MATERIAL AND METHODS

Culture medium and growth conditions

The culture media used for the isolation of bacterial strains and to grow *Pseudomonas* sp. 61A6 are described in Table 1. Defined 21C medium, poor in nitrogen source, was used to grow the *Pseudomonas* sp. 61A6. Approximately 60 mL of 21C medium with sugarcane molasses was inoculated with 1.8 mL of an overnight culture of *Pseudomonas* sp. 61A6 in nutrient broth (NB) (bacto-peptone 3 g/L, beef extract 5 g/L). The cells were grown at 37°C during a period of 110 hours in an Erlenmeyer flask of one liter. During the first 72 hours, 2 mL aliquots were taken at every 2 hours. After this period 2 mL aliquots were taken at every 24 hours. Each aliquot was subdivided into two 1 mL portions. One was used for the

measurement of optical density at 660 nm. The other was processed to separate the cells of the culture medium for the measurement of the pH.

PHA analysis

Selection of PHA-producing isolates was performed in the different media described in Table 1 and in NB medium using a solution of Nile Red (Sigma-Aldrich Co. Ltd.) in DMSO at a concentration of 0.25 mg/mL. The PHA-producing colonies were isolated by its characteristic fluorescence at 450 nm. Gas chromatography (GC) of the fluorescent isolates was performed using a Perkin Elmer 8420 gas chromatograph coupled to a QMD 1000 mass spectrometer with a Permaphase PEG 25Mx column and a flame ionization detector (Perkin Elmer & Co. GmbH, Überlingen – Germany). The isolates were grown in a PHA-inducible liquid culture and were submitted to a controlled methanolysis. The chloroform extracts with the carboxylic acid methyl esters were run in the gas chromatography apparatus (TIMM & STEINBÜCHEL 1990).

Table 1. Chemical composition of the culture media used for isolation of bacteria from soil and for growth and induction of PHA accumulation in *Pseudomonas sp.* 61A6.

Compounds (per liter)	Culture Media								
	2A	5A ¹	8A	11A	21C ¹	26A	43C ¹	58A	61A
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)				0.5	0.05				
Nicotinic acid (mg)					1.0				
Biotin (mg)					0.01				
CaCl ₂ ·2H ₂ O (g)			0.05				0.02		
Thiamine chloride (mg)					0.5				
Yeast extract (g)	3.0	5.0		0.05				10.0	
FeSO ₄ ·7H ₂ O (mg)									10.0
Glucose (g)		1.0	1.0					2.5	
K ₂ HPO ₄ (g)			0.04				0.016		1.0
KH ₂ PO ₄ (g)			0.04	1.06	2.77				
KNO ₃ (g)		0.5							3.0
MgSO ₄ (g)			0.075	0.1			0.1		0.5
MnCl ₂ ·4H ₂ O (g)							0.2		
Na ₂ HPO ₄ (g)									
NaCl (g)						5.0			0.5
NH ₄ Cl (g)					0.05				
Peptone (g)	3.0		0.5	0.05					20.0
Sucrose (g)									30.0
Tryptone (g)		5.0				8.0			
pH	6.8	7.0	7.0	7.0	6.8	6.0	7.5	7.0	6.8

¹ Micronutrients solution was added in the following media (L⁻¹): 5A (1.0 mL), 21C (20.0 mL) and 43C (1.0 mL).

RESULTS AND DISCUSSION

We isolated 300 bacterial colonies in the first screening in a few weeks. From the 300 isolates, 10 showed PHA inclusions by Nile red and Nile blue procedures that were confirmed by GC. One showed the capacity to grow in undefined and in defined media containing sugarcane molasses at concentration of 10% (w/v) and to accumulate PHB as determined by GC-MS analysis (Figure 1). Gram test demonstrated this bacterium to be Gram-negative. Test for catalase also was negative as well as the Schaeffer-Fulton procedures for endospore presence. Morphological analysis by bright field microscopy indicated that the bacterium was a coccobacillus. Biochemical assays indicated that this bacterium belonged to a non defined species of the generum *Pseudomonas* (data not shown). We designated this strain *Pseudomonas* sp. 61A6.

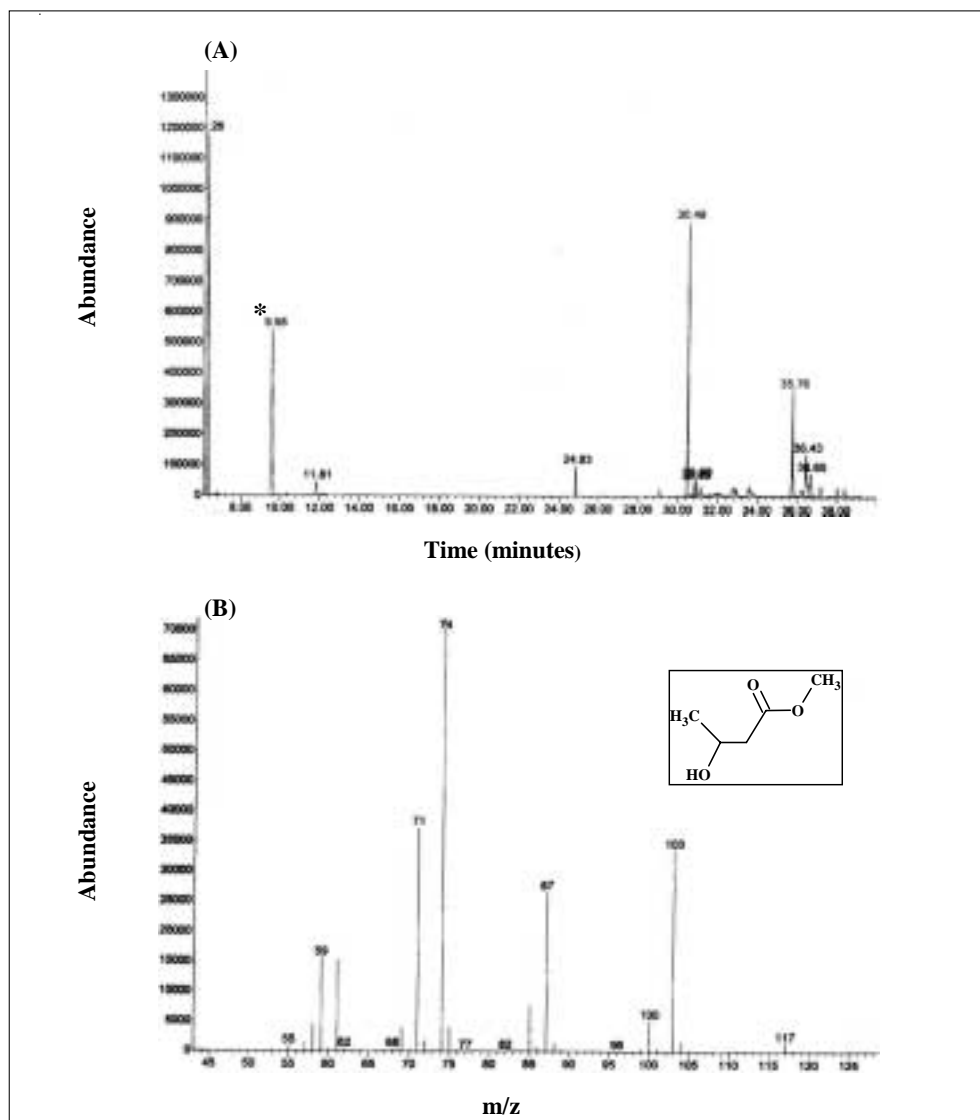


Figure 1. GC (A) and MS (B) analysis of PHB extracted from *Pseudomonas* sp. 61A6. The asterisk at the retention time of 9.55 minutes indicates the 3-hydroxybutyrate GC peak analyzed by MS.

Best growth rates for this isolate were obtained at different sugarcane molasses concentrations from 0.2% to 10% (w/v) in 21C medium. The intracellular concentration of PHB, as determined by GC-MS analysis was: (i) 15.21% (w/w) for the culture containing 0.2% (w/v) of molasses in eight hours of incubation; (ii) 55.26% (w/w) for the culture containing 5% (w/v) of molasses in 96 hours of incubation and (iii) 30.17 (w/w) for the culture containing 10% (w/v) of molasses in 56 hours of incubation (Figures 2A, 2B and 2C, respectively). The pH curves stayed constant during the whole period of batch cultivation (Figures 2D, 2E and 2F).

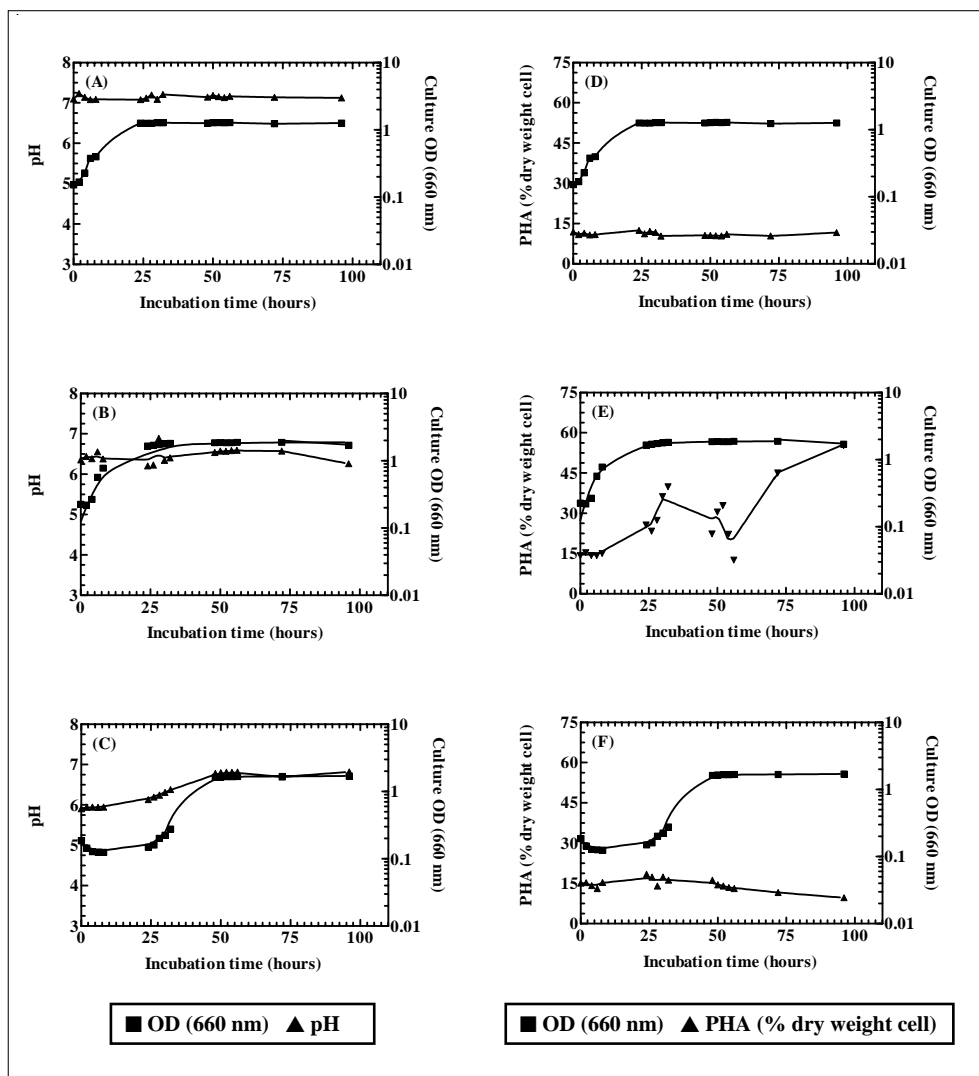


Figure 2. Growth analysis of *Pseudomonas* sp. 61A6 in defined medium 21C containing sugarcane molasses at concentration of 0.2% (w/v) (A and D), 5% (w/v) (B and E) and 10% (C and F). Graphics (A) to (C): variation of pH of the culture medium. Graphics (D) to (F): production of PHA by cellular dry weight.

SUMMARY

This work is part of an international project sponsored by the European Union, „PHA production from sugarcane and derivatives“, aiming at the isolation of new bacterial strains able to metabolize sugarcane molasses as a carbon source, reducing the costs of production of PHAs for commercial purposes. One of the strains obtained accumulated high amounts of poly[hydroxybutyrate] (PHB) in the presence of sugarcane molasses. The new strain was biochemically classified and named *Pseudomonas* sp. 61A6. GC-MS analysis showed that the best rates of PHA accumulation within the cells occurred in 5% (wt/vol) sugarcane molasses, with a yield of 55.26% PHA per dry cell weight.

CONCLUSION

- *Pseudomonas* sp. 61A6 is the first bacterium in the generum *Pseudomonas* that produces PHB in presence of a complex mixture of carbohydrates, such as sugarcane molasses;
- In the presence of sugarcane molasses, the maximum PHA production verified was 55.26% (w/w) after 96 hours of incubation. This productivity is adequate for industrial scale-up;
- Moreover, the strain is amenable to metabolic engineering and genetic manipulation using the methods established for the generum *Pseudomonas*;
- These results could help to change the actual paradigm that *Pseudomonas* can not produce PHB in the presence of carbohydrates.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. Alexander Steinbüchel and Bernd Rehm for helpful discussions and GC-MS analysis. This work was supported by European Project No ERB 3514PL962027 and GENOTOX (Laboratório de Genotoxicidade – Centro de Biotecnologia, UFRGS).

REFERENCES

- Anderson AJ, Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54:450-472.
- Demain AL, Solomon NA (1986) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams & Wilkins Company, Balimore, USA.
- Kessler B, Palleroni NJ (2000) Taxonomic implications of synthesis of poly-beta-hydroxybutyrate and other poly-beta-hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 711-713.
- Kranz RG, Gabbert KK, Locke TA, Madigan MT (1997) Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3003-3009.
- Schembri MA, Bayli RC, Davies JK (1995) Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.*, 177:4501-4507.
- Steinbüchel A, Valentin HE (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiol. Lett.*, 128:219-228.
- Timm A, Steinbüchel A (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 177:3360-3367.