

DEGRADACIÓN DE PIRIDINEDIOLES TÓXICOS DERIVADOS DE LA MIMOSINA POR BACTERIAS RUMINALES: I. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Degradation of Toxic Piridinediols Derived from Mimosine by Rumen Bacteria: I. Microbiological Aspects

Marco T. Rincón¹, María G. Domínguez-Bello², Milagros Lovera² y Roberto Romero M.³

¹Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela. E-mail: M.Rincon@rri.sari.ac.uk.

²Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827. Caracas 1020A, Venezuela.

³GlaxoWellcome, Calle Luis de Camoes #115-117, Urb. La Trinidad. Caracas 1080, Venezuela

RESUMEN

La mimosina es un compuesto tóxico presente en la leguminosa tropical *Leucaena leucocephala* que limita el uso nutricional de esta planta en animales domésticos. Tanto animales monogástricos como rumiantes pueden intoxicarse con su consumo, pero algunos la toleran por poseer microorganismos ruminales que pueden degradar la mimosina y sus piridinedioles derivados 3,4- y 2,3-Dihidroxipiridina (3,4- y 2,3-DHP). En el presente trabajo se determinó la presencia de actividad degradadora del 2,3-DHP en cultivos bacterianos mixtos del rumen de animales consumiendo *L. leucocephala* en Venezuela y se caracterizó la degradación de este piridinediol por la bacteria ruminal *Synergistes jonesii*. Experimentos *in vitro* usando cultivos puros de *S. jonesii* indican que la degradación del 2,3-DHP ocurre al final de la fase logarítmica del crecimiento y además describe una cinética de degradación con una marcada inhibición por sustrato a altas concentraciones del piridinediol, sugiriendo que debe existir un umbral de concentración de enzimas que permita la degradación del 2,3-DHP del medio. *S. jonesii* es incapaz de degradar la mimosina, pero mostró actividad degradadora contra los piridinedioles derivados 3,4-DHP y su isomero 2,3-DHP. El 3,4-DHP induce una actividad isomerasa que no está presente cuando el cultivo crece en presencia del 2,3-DHP, esta actividad es la responsable de la isomerización del 3,4-DHP en 2,3-DHP. Se demostró también que el sistema de degradación es inducible por sustrato, aunque la ausencia de sustrato puede causar la pérdida irreversible de la

actividad degradadora. El 2,3-DHP se confirmó como sustrato intermediario en la degradación de piridinedioles pero también induce la expresión de enzimas degradadoras en la bacteria *S. jonesii*.

Palabras clave: Piridinediol, 2,3-Dihidroxipiridina, 3,4-Dihidroxipiridina, mimosina, *Synergistes jonesii*.

ABSTRACT

Mimosine is a toxic compound presents in the tropical legume *Leucaena leucocephala* which restrict the nutritional use of this plant in domestic animals. Both monogastrics and ruminants could undergo toxicity consuming this plant. Some ruminants can tolerate it because they have rumen microorganisms able to degrade mimosine and its pyridinediols derivatives: 3,4- y 2,3-Dihidroxypyridine (3,4- and 2,3-DHP). In the present study the existence of 2,3-DHP degrading-activity in mixed rumen bacterial cultures from cattle consuming *L. leucocephala* in Venezuela was determined, and the degradation of toxic pyridinediols by the rumen bacterium *Synergistes jonesii* was characterized. *In vitro* experiments using pure culture of *S. jonesii* indicated that the 2,3-DHP degradation was carried out at the end of the log-phase of bacterial growth and also the system showed substrate inhibition at high concentration of pyridinediols suggesting that a threshold of enzymes that allows 2,3-DHP-degradation from the medium is needed. *S. jonesii* is unable to degrade mimosine but it showed degrading activity against the mimosine derivatives 3,4-DHP and its isomer 2,3-DHP. 3,4-DHP induces an isomerase activity, which is lacking

when the culture grows in 2,3-DHP. This latest activity is the responsible of the transformation of 3,4-DHP into 2,3-DHP. It was also showed that the degradation is a substrate-induced enzymatic system. However, the lack of substrate might cause the irreversible lost of 2,3-DHP degrading-activity. 2,3-DHP was found as intermediary substrate and also induced the expression of degrading enzymes in *S. jonesii*.

Key words: Pyridinediols, 2,3-Dihydroxypyridine, 3,4-Dihydroxypyridine, mimosine, *Synergistes jonesii*.

INTRODUCCIÓN

La *Leucaena leucocephala* es una leguminosa arbustiva actualmente difundida a lo largo de toda la faja tropical y algunas regiones sub-tropicales [38]. La planta es utilizada en la alimentación animal debido a que posee un alto valor nutritivo considerando su elevado contenido en proteína cruda (24-37%), materia seca (54,7%) y es también una buena fuente de vitaminas y micronutrientes [39]. La digestibilidad de la proteína alcanza el 63% medida *in vivo* [11], es resistente al pastoreo y a las enfermedades causadas por fitopatógenos [40]. El uso de esta planta ha estado limitado debido a la presencia de síntomas de toxicidad en animales domésticos en ciertas regiones geográficas. En Australia, Papua Nueva Guinea, algunas partes de África y ciertas regiones de la India se han reportado casos de toxicidad en el ganado atribuidas al consumo de dietas con alta proporción de *L. Leucocephala* [48].

La toxicidad es producida por un compuesto secundario denominado mimosina, el cual es un aminoácido no proteico, una alanina β-sustituida con un anillo de 3-hidroxi-4 (1H)-piridona (3,4-DHP), FIG. 1. Este compuesto juega un papel importante en la resistencia de la planta a una gran variedad de agentes fitopatógenos [33, 40]. Los típicos signos de toxicidad en rumiantes que consumen una dieta con alto contenido de *L. leucocephala* incluyen: alopecia, anorexia, ganancia reducida de peso, salivación profusa, lesiones a nivel de esófago, papilas necróticas en rumen y retículo, hiperplasia de la glándula tiroidea y bajos niveles de la hormona tiroxina T₄ circulante. La

toxicosis puede ser aguda o crónica y conllevar, incluso a la muerte [1, 4, 14, 23, 30, 32, 37, 45]. Los efectos sobre la reproducción incluyen bajo índice reproductivo debido a la mortalidad embrionaria precoz y a la muerte perinatal [14].

Bajo condiciones metabólicas, la mimosina puede ser degradada, sin destrucción del anillo heterocíclico aromático, a 3,4-DHP el cual presenta menor toxicidad que la mimosina [31] y es el responsable de la disfunción de la glándula tiroidea en rumiantes siendo un potente agente bociógeno [17]. Se ha aislado una enzima mimosinasa a partir de extractos de la hoja de *L. leucocephala* que hidroliza la mimosina dando como producto el 3,4-DHP [46]. También se ha reportado presencia de actividad hidrolítica en el rumen de animales que consumen *L. Leucocephala* [30, 44].

La variación geográfica de la toxicosis por *L. leucocephala* ha sido atribuida a la presencia o ausencia de bacterias ruminales capaces de degradar el 3,4-DHP [22, 23]. En Australia, el problema de la intoxicación por *L. leucocephala* se logró subsanar gracias a la transferencia de la actividad degradadora de 3,4-DHP a partir de un cultivo mixto de bacterias ruminales provenientes de animales tolerantes. Luego de la inoculación, la excreción urinaria de 3,4-DHP declinó y los signos clínicos de toxicidad a la *L. leucocephala* desaparecieron [26]. La colonización de las bacterias con capacidad degradadora de 3,4-DHP a otros animales del rebaño ocurrió en un tiempo relativamente rápido. El mecanismo de la transferencia a través del ambiente no ha sido fielmente comprobado, pero se han podido aislar bacterias viables con capacidad degradadora a partir de las heces de animales adaptados, sugiriendo que este podría ser un mecanismo de diseminación de la bacteria [14].

Posteriormente, varios autores reportaron el aislamiento de bacterias con capacidad degradadora provenientes de diferentes nichos ecológicos: Domínguez-Bello y Stewart [8] aislaron por vez primera una bacteria perteneciente al género *Clostridium* con capacidad degradadora de 3,4-DHP y mimosina a partir de animales que consumían *L. leucocephala* en Venezuela. Allison y col. [4] aislaron, identificaron y caracterizaron un nuevo género de bacteria aislada del rumen capaz de de-

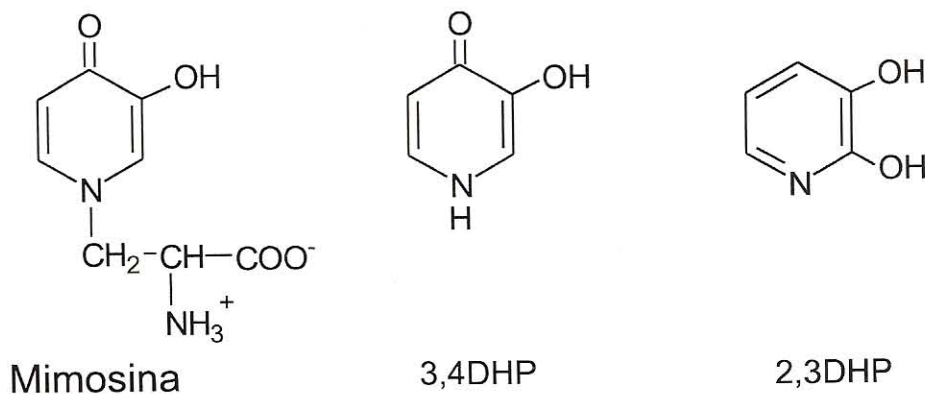


FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MIMOSINA, 3,4-DHP Y 2,3-DHP.

gradar 3,4-DHP que bautizaron bajo el nombre de *Synergistes jonesii*. Tan y Wang [43] aislaron del rumen de animales que consumían *L. leucocephala* bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacilos*, *Clostridium sporogenes* y *Streptococcus bovis*, todos ellos anaerobios estrictos, capaces de degradar mimosina, 3,4-DHP y su isómero el 2,3-DHP. Soedarjo y col. [42] encontraron cepas de *Rhizobium* aisladas de nódulos de raíces de la *L. leucocephala* capaces de utilizar el 3,4-DHP, como fuente de carbono y nitrógeno.

Los propósitos del presente trabajo fueron: a) estudiar la presencia de actividad degradadora de piridinedioles tóxicos en animales rumiantes que consumían *L. leucocephala* en Venezuela y b) caracterizar la degradación del 2,3- y 3,4-DHP *in vitro* por parte de la bacteria ruminal *S. jonesii*

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Para el aislamiento de bacterias con capacidad degradadora y la determinación de la degradación de 2,3- y 3,4-DHP, siguiendo las técnicas de preparación de cultivos anaerobios [21, 35], se utilizaron los siguientes medios de cultivos: Medio M-10 [6]. Medio 98-5 modificado [3]; Medio YTR (Extracto de levadura-tripticasa-licor ruminal) [35].

Cepas bacterianas y obtención de cultivos mixtos

Muestras de contenido ruminal de novillas consumiendo una dieta de pasto *Digitaria decumbens* suplementada con *L. leucocephala* fueron extraídas usando una sonda buco-esofágica. Las muestras fueron colocadas en viales estériles y 0,2 mL del licor ruminal fue inoculado en medio 98-5 modificado, M-10 ó YTR suplementados con mimosina, 3,4-DHP ó 2,3-DHP. Los cultivos fueron incubados estáticamente a 38°C.

La bacteria *Synergistes jonesii* cepa 78-1 fue gentilmente donada por el Dr. Milton Allison (Animal Disease Center-US. Department of Agriculture, Iowa) y cultivada en medio 98-5 modificado.

Aislamiento de cepas con actividad degradadora

Se prepararon tubos (Bellco 16 x 125 mm) con agar M-10 (5 mL), a los cuales se adicionó 0,006% (p/v) FeCl_3 para la determinación de colonias sulfato-reductoras. Los tubos fueron inoculados (1 mL) con una dilución del cultivo (10^{-8}) utilizando solución buffer carbonato-salina a partir de cultivos mixtos con actividad degradadora. La preparación de los tubos enrolados se hizo de acuerdo a las especificaciones de Ogimoto e Imai [35]. Luego de un período de incubación, que osciló entre 1 a 3 semanas, se tomaron colonias negras (sulfato-reductoras) e inoculadas en medio M-10 con 2,3-DHP y se evaluó el crecimiento y la degradación del 2,3-DHP.

Inoculación de medios bacteriológicos y crecimiento de la bacteria

Los medios de cultivo fueron inoculados con 0,2 mL de un cultivo de *S. jonesii* en fase estacionaria de crecimiento y luego de haber degradado todo el 2,3-DHP del medio (4,5 mM). El crecimiento se realizó incubando los cultivos anaeróbicos estáticamente a 38°C (incubadora WTB binder modelo 78532). Los cultivos fueron inoculados cada 7 días en medio fresco, para mantener la actividad degradadora de la cepa. El crecimiento del cultivo se evaluó diariamente midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 20D, Milton Roy). Debido a que el crecimiento de la bacteria en cultivo fue relativamente bajo, la actividad específica de la degradación de piridinedioles y el crecimiento de la bacteria se calculó tomando como parámetros los valores de piridinediol consumido en unidades de molaridad y empleando datos de unidades de densidad óptica medida por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda, corregida por la lectura de fondo del medio, en vez de los valores de peso seco de la masa bacteriana.

Determinación espectrocromimétrica de la degradación de mimosina, 3,4- y 2,3-DHP

La actividad degradadora en medios de cultivo se determinó a través de la cuantificación espectrofotométrica de la mimosina, 2,3- ó 3,4-DHP. El método utilizado fue una modificación del método de Matsumoto y Sherman [34]. Una alícuota de 50 μL del medio de cultivo se colocó en una microplaca de 96 hoyos de fondo plano (Nunc, TC microwell 96F). Se agregó 250 μL de la solución 0,06% p/v FeCl_3 (en HCl 0,1 N) y se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Bio kinetic Reader EL340, Bio-tek Instruments). Los medios con 3,4-DHP se analizaron de igual manera pero la longitud de onda usada fue de 540 nm.

Determinación de la inducción de actividad degradadora de 2,3-DHP o 3,4-DHP en cultivo

Cultivos de *S. jonesii* en fase estacionaria fueron transferidos (0,2 mL) a un medio con 2,3-DHP ó 3,4-DHP. El crecimiento de la bacteria y la degradación de los piridinedioles fue monitoreada espectrofotométricamente de acuerdo al método mencionado con anterioridad. Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria y la degradación del 2,3-DHP ó 3,4-DHP llegó a completitud, una nueva adición de 2,3-DHP ó 3,4-DHP fue adicionada como sigue: cultivos que habían degradado el 2,3-DHP les fue adicionado nuevamente 3,4-DHP a cambio mientras que los cultivos que degradaron el 3,4-DHP les fue adicionado 2,3-DHP. Los controles fueron tomados como aquellos cultivos que habían degradado el 2,3-DHP a los que se les agregó nuevamente 2,3-DHP y los cultivos con 3,4-DHP les fue adicionado igualmente 3,4-DHP.

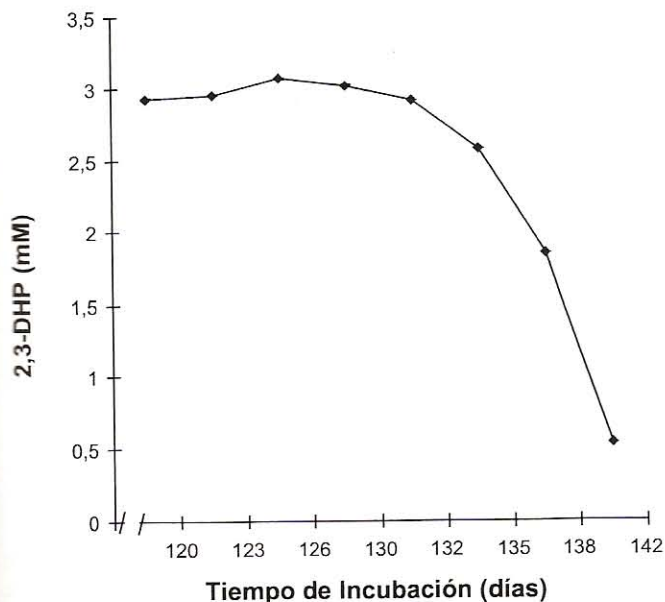


FIGURA 2. ACTIVIDAD DEGRADADORA DEL 2,3-DHP EN CULTIVOS BACTERIANOS MIXTOS AISLADOS DEL RUMEN DE ANIMALES RESISTENTES AL CONSUMO DE LA *L. leucocephala*.

Efecto de la aerobiosis en la degradación de 2,3-DHP en cultivo

Cultivos de *S. jonesii* en fase estacionaria y activos en la degradación del 2,3-DHP fueron transferidos (0,2 mL) a 10 mL de medio fresco. Un set de tubos fue inoculado en ausencia de CO₂ (aeróbicamente), mientras que otro se inoculó anaeróbicamente para luego inyectarle por medio de una jeringa estéril 4 mL de aire. Los tubos controles permanecieron en anaerobiosis durante el curso de este ensayo.

Preparación de las células resuspendidas

Medios de cultivo 98-5 modificado (10 mL) fueron inoculados con 0,2 mL de un cultivo de *S. jonesii* en fase estacionaria de crecimiento. Luego que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento y demostró una degradación total del 2,3-DHP (4,5 mM) fue centrifugado a 3000 x g 10 min (Sorvall T 6000B, Du Pont Instruments). El sobrenadante se descartó y el pellet celular se resuspendió en 5 mL solución buffer carbonato-salina.

Análisis de piridinedioles por Cromatografía líquida (HPLC)

Células resuspendidas en solución carbonato-salina fueron ensayadas para determinar la conversión de 3,4-DHP hacia 2,3-DHP. La reacción se llevó a cabo en una tienda anaeróbica (Coy Instrument, aproximadamente 80% N₂, 15% CO₂ y 5% H₂). Muestras de 0,45 mL fueron tomadas a intervalos horarios y se les adicionó 50 µL de ácido tricloroacético. Se cen-

trifugaron a 14000 x g por 20 min. (Eppendorf microcentrifuge). El sobrenadante se neutralizó con Na₂CO₃ y filtró en filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,22 µ (Millipore). El análisis del 3,4- y 2,3-DHP se realizó usando HPLC (Shimadzu LC-6A, integrador Shimadzu CR-3B) con una columna de fase reversa C₁₈ (µ-Bondapack 2,1 x 30 mm., Waters). Las condiciones del análisis fueron: Solución de H₃PO₄ al 2% v/v con un flujo de 0,5 mL/min, detector uv-vis 280 nm.

Microscopía electrónica

Muestras de cultivo de *S. jonesii* en fase estacionaria fueron centrifugadas a 5000 x g 5 min. El pellet celular fue resuspendido en un volumen de suero bovino y mezclado. Para la fijación del espécimen, se adicionó un volumen de solución al 2% de glutaraldehído en 0,1 M buffer cacodilato, pH 7,3. La fijación se llevó a cabo por 4 horas a 4°C. Luego de la incubación, el espécimen se lavó tres veces durante 30 min en una solución de 0,25 M sacarosa en 0,1 M buffer cacodilato. Una nueva fijación se llevó a cabo a temperatura ambiente por espacio de 2 horas usando la solución fijadora de Palade (12,5 mL 2% tetroxido de Osmio, 5 mL buffer Veronal-acetato, 5 mL 0,1 N ácido clorhídrico y 2,5 mL agua destilada, pH 7,3). El espécimen fue deshidratado en soluciones de concentración creciente de acetona por 20 min y luego en acetona absoluta dos veces por 20 min. Se embebió en la resina epóxica y cortada en ultramicrotomo en secciones delgadas para luego teñirlas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron observadas en microscopio electrónico de transmisión de la Unidad de Microscopía Electrónica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Análisis estadístico

Las diferencias entre las medias se evaluaron con el análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Origin version 4,0. Las diferencias fueron consideradas significativas para P<0,05.

RESULTADOS

Bacterias degradadoras de mimosina, 3,4-DHP ó 2,3-DHP en animales en Venezuela

Del muestreo de la actividad degradadora de piridinedioles en cultivos mixtos del rumen provenientes de 12 animales que consumían *L. leucocephala* en Venezuela, sólo se encontró actividad degradadora de 2,3-DHP en 3 animales luego de 120 días en cultivo. No obstante la actividad degradadora del 2,3-DHP, FIG. 2, estos cultivos no tenían capacidad de degradar tampoco la mimosina, ni el 3,4-DHP. De estos cultivos mixtos se aislaron colonias en cultivos puros, seleccionándose colonias aisladas de tubos de agar, particularmente sulfato reductoras, cuyas colonias son negras (algunos degradadores tienen esta característica [3, 8]), sin encontrarse actividad degradadora del 2,3-DHP en ninguno de los cultivos puros.

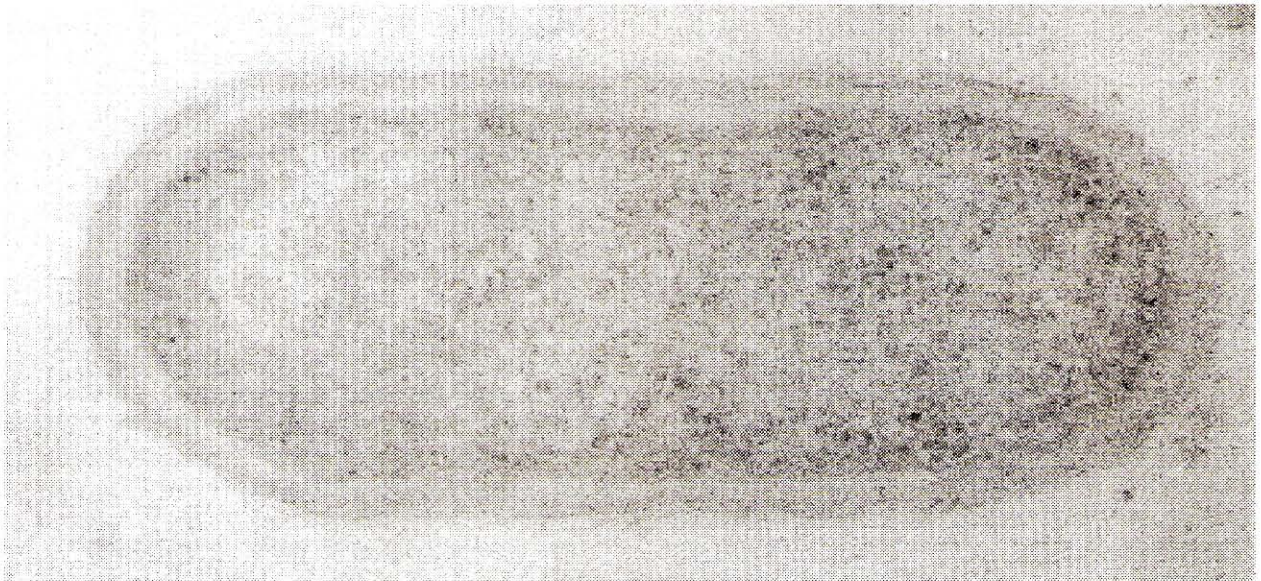


FIGURA 3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LA BACTERIA *Synergistes jonesii* (AUMENTO 7000 X).

Degradación de 2,3-DHP y 3,4-DHP por cultivos de *S. jonesii*

En vista de los resultados negativos en la obtención de una bacteria autóctona con actividad degradadora, se decidió trabajar con la bacteria *S. jonesii*, caracterizada por Allison y col. [4]. Esta bacteria es un bacilo Gram negativo de aproximadamente 1,5 x 5 µm, FIG. 3. La misma es capaz de degradar el 2,3-DHP del medio, FIG. 4. A concentraciones de 4,5 mM 2,3-DHP, la actividad degradadora comenzó a apreciarse después de 2 días de incubación, coincidiendo con la última etapa del crecimiento exponencial del cultivo. La degradación completa del compuesto ocurrió entre los días 4-5 de incubación, es decir, unas 72 horas. Sin embargo, luego de la reedición de 2,3-DHP al cultivo en fase estacionaria, la degradación de 2,3-DHP ocurre entre 12-16 horas. En vista de la actividad degradadora de *S. jonesii* sobre el 2,3-DHP, y de la disponibilidad comercial, este sustrato se usó para caracterizar la actividad degradadora en cultivos de *S. jonesii*.

Notablemente, los cultivos con actividad degradadora de 3,4-DHP fueron capaces de degradar el 2,3-DHP con actividades específicas similares, TABLA I. Sin embargo, cuando la

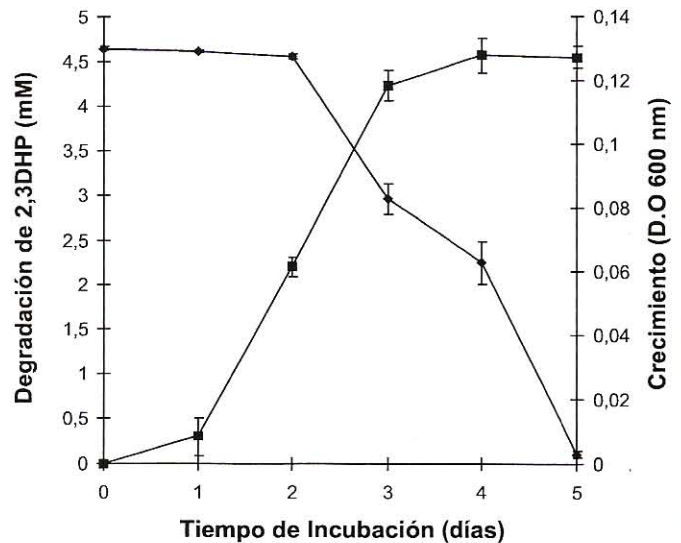


FIGURA 4. CRECIMIENTO (■) DE LA BACTERIA *Synergistes jonesii* Y DEGRADACIÓN DEL 2,3-DHP EN CULTIVO ANAEROBIO (◆).

TABLA I

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA DEGRADACIÓN DE 2,3DHP Y 3,4DHP EN CULTIVO DE *Synergistes jonesii* EN MEDIO 98-5 MODIFICADO. ACTIVIDAD CALCULADA EN NMOLES DE DHP DEGRADADO.MIN⁻¹.D.O_{600NM}⁻¹

		Cultivo con 2,3DHP	Cultivo con 3,4DHP
1 ^{era} degradación ^a	2,3DHP	90,8 ^x ± 5,2	-
	3,4DHP	-	97,3 ^x ± 12,0
2 ^{da} degradación ^b	2,3DHP	173,0 ^y ± 13,2	119,4 ^x ± 19,7
	3,4DHP	2,1 ^z ± 3,3	91,9 ^x ± 5,8

^a Valores obtenidos en la degradación del 2,3DHP y 3,4DHP en el medio de cultivo durante la fase exponencial del crecimiento. ^b Valores obtenidos en la degradación del 2,3DHP o 3,4DHP tras ser añadido al medio de cultivo en la fase estacionaria del crecimiento a las 130 horas. ^{x,y,z} Valores con letras diferentes con diferencia significativa, valores con letras iguales sin diferencia significativa (P<0,05).

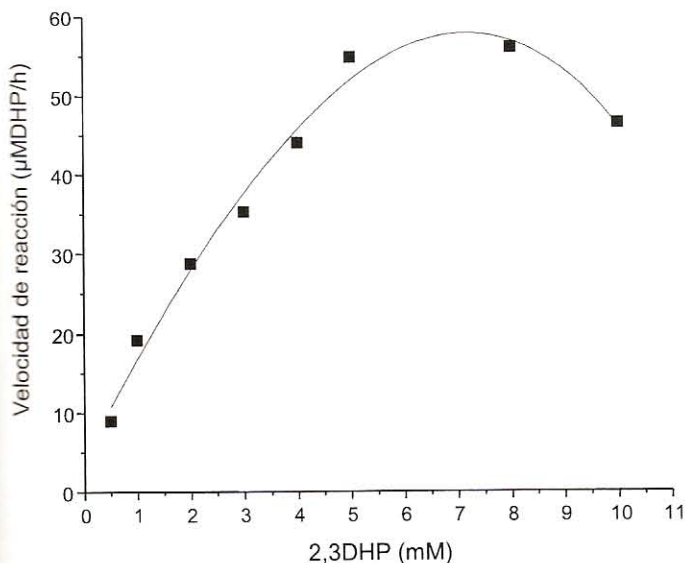


FIGURA 5. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DEL 2,3-DHP POR LA BACTERIA *Synergistes jonesii* EN CULTIVO ANAEROBIO (LOS VALORES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN FUERON MEDIDOS EN MOLES DE 2,3-DHP. $H^{-1} \cdot DO_{600} \text{NM}^{-1}$).

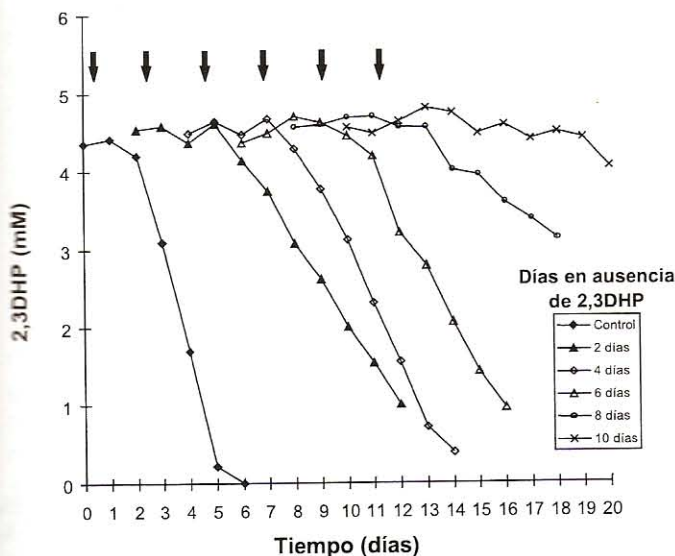


FIGURA 6. PÉRDIDA DE LA ACTIVIDAD DEGRADADORA DEL 2,3-DHP EN CULTIVOS ANAEROBIOS DE LA BACTERIA *Synergistes jonesii*. EL CULTIVO SE MANTUVO EN AUSENCIA DE LA TOXINA POR (♦) 0 DÍAS; (■) 2 DÍAS; (▲) 4 DÍAS; (●) 6 DÍAS; (□) 8 DÍAS Y (*) 10 DÍAS. LAS FLECHAS INDICAN EL MOMENTO EN QUE SE ADICIONÓ EL 2,3-DHP (4,5 mM) AL CULTIVO.

bacteria fue cultivada en medio con 2,3-DHP, mostró menor actividad degradadora sobre el isómero 3,4-DHP, TABLA I.

En la FIG. 5 se muestra la velocidad de la degradación del 2,3-DHP en cultivo a concentraciones crecientes del sustrato. La velocidad de degradación se incrementa inicialmente de manera lineal y luego se hace hiperbólica, típico de una ci-

nética de Michaelis-Menten. No obstante, el sistema enzimático se satura con el sustrato la velocidad de reacción disminuye, indicando una inhibición por sustrato.

La actividad degradadora puede perderse irreversiblemente si el cultivo es desprovisto de 2,3-DHP. A medida que transcurre el tiempo de incubación de un cultivo en ausencia del 2,3-DHP, la actividad degradadora tiende a perderse paulatinamente, FIG. 6. A partir del octavo día de incubación en ausencia de 2,3-DHP, comienza a notarse una pérdida apreciable de la capacidad degradadora del cultivo, reteniendo solamente el 30% de dicha actividad inicial. Si el cultivo permanece 10 días sin la toxina, la capacidad degradadora no aparece.

La estricta anaerobiosis permite un crecimiento y degradación óptima del 2,3-DHP. La aireación parcial de los cultivos (inyección de 4 mL de aire o la inoculación abriendo la tapa del tubo al aire libre), causó una disminución del crecimiento, FIG. 7A, y de la actividad degradadora del 2,3-DHP, FIG. 7B, pero que representó una disminución de las actividades específicas ($7,0 \mu\text{M } 2,3\text{-DHP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{D.O}_{600\text{nm}}^{-1}$ en el cultivo anaerobio, 2,1 en el cultivo con inyección de 4 mL de aire, y 1,3 en el cultivo inoculado al aire)

La bacteria emprende una reacción de isomerización del 3,4-DHP para convertirlo en 2,3-DHP, tal como se aprecia en el análisis cromatográfico realizado, FIG. 8. El 3,4-DHP es convertido en 2,3-DHP en el transcurso de la reacción y luego este último comienza a ser degradado. Dicha reacción también puede apreciarse en los ensayos de registro de la degradación del 3,4-DHP mediante el análisis espectrofotométrico del complejo 3,4-DHP- Fe^{3+} . Este complejo revela una coloración rojo-violáceo, mientras que el complejo 2,3-DHP- Fe^{3+} exhibe una coloración azul intenso. A medida que transcurre la degradación, hay un viraje del color rojo-violáceo hacia el azul, indicando la presencia de 2,3-DHP en la mezcla de reacción.

DISCUSIÓN

En Venezuela existe carencia de reportes en la literatura sobre casos de intoxicación por consumo de la planta *L. leucocephala* en animales rumiantes. El presente trabajo demuestra la presencia de actividad degradadora de los piridinedioles tóxicos derivados de la mimosina en el rumen, lo que podría explicar la tolerancia al consumo de *L. leucocephala* y por ende, la ausencia de síntomas de toxicidad en el ganado, como ha sido señalado por otros autores [2, 24, 26]. A partir de tres de los doce animales estudiados, los cuales estaban consumiendo la planta, se obtuvieron cultivos mixtos de bacterias ruminales capaces de degradar el 2,3-DHP.

Detoxificar la mimosina requiere tanto de actividad mimosinasa como degradadora del piridinediol, derivado por parte de diferentes grupos bacterianos especializados en la degradación de estos compuestos. En la degradación de la mi-

mosina se han señalado la participación de actividad hidrolítica no enzimática del compuesto, para dar origen al 3,4-DHP [31] y la catalizada por enzimas presentes en la planta que son liberadas tras la masticación [46], y quizás alguna actividad hidrolítica inespecífica de la población microbiana del rumen.

Sorpresivamente, ninguno de los cultivos bacterianos de animales venezolanos fue capaz de degradar mimosina ó 3,4-DHP. Existen bacterias del rumen capaces de degradar selectivamente uno de los dos piridinedioles isómeros [2, 14], y éste podría ser el caso en el grupo de animales estudiados. No obstante, está claro que existen otras bacterias (como el *S. jonesii*) capaces de degradar ambos isómeros de estos piridinedioles. En la degradación de 3,4- y 2,3-DHP sólo participa una bacteria, por lo que es muy probable que en el metabolismo de los piridinedioles tóxicos de la *L. leucocephala* no se requiera de un consorcio de bacterias, como ocurre con la degradación bacteriana de otros compuestos aromáticos [5, 9, 10, 12].

La degradación del 2,3-DHP en cultivo anaerobico, comienza a notarse cuando el cultivo se encuentra en el último tercio de la fase exponencial del crecimiento a concentraciones de 4,5 mM de 2,3-DHP. Es posible que se requiera de una biomasa crítica que produzca una concentración umbral de enzima(s), a partir de la cual ocurre la degradación del piridinediol. A altas concentraciones, los sustratos comúnmente actúan como inhibidores, particularmente en las reacciones enzimáticas en las que participan dos o más sustratos. La inhibición competitiva de sustrato es característica del mecanismo de ping-póng clásico. Este tipo de inhibición resulta cuando uno de los sustratos interactúa con dos o más formas de la enzima, compitiendo con el segundo sustrato por el mismo sitio de unión. Cuando alguno de los sustratos se encuentra en concentraciones mayores que el segundo sustrato, tiene lugar la inhibición [7]. La bacteria en cultivo necesita alcanzar una biomasa crítica para vencer los mecanismos de inhibición que se presentan. Esta inhibición de la degradación del 2,3-DHP en cultivo pudiera tener consecuencias en el animal *in vivo*. Por una parte, si el animal ingiere grandes cantidades de la mimosina, 3,4-DHP ó 2,3-DHP podrían verse comprometidos los mecanismos de detoxificación, y por la otra, estos resultados indican la presencia de un segundo sustrato en la degradación del 2,3-DHP, lo que hace pensar posiblemente, en la participación de un compuesto intermediario reductor que facilite los electrones necesarios para llevar a cabo una reducción del anillo aromático.

Los resultados obtenidos indican que existe una pérdida de la actividad degradadora en cultivos *in vitro* cuando la bacteria *S. jonesii* crece en un medio carente de 2,3-DHP. La pérdida de la actividad se hace más evidente a partir del octavo día de cultivo, FIG. 6. Por el contrario, si la bacteria crece en un medio en presencia del 2,3-DHP a lo largo del ensayo, la actividad degradadora persiste en el tiempo (datos no mostrados). Este resultado es importante en el mantenimiento de cultivos activos en el laboratorio. Los cultivos, incluso para ser almacenados en refrigeración, deben ser colectados al momento de exhibir acti-

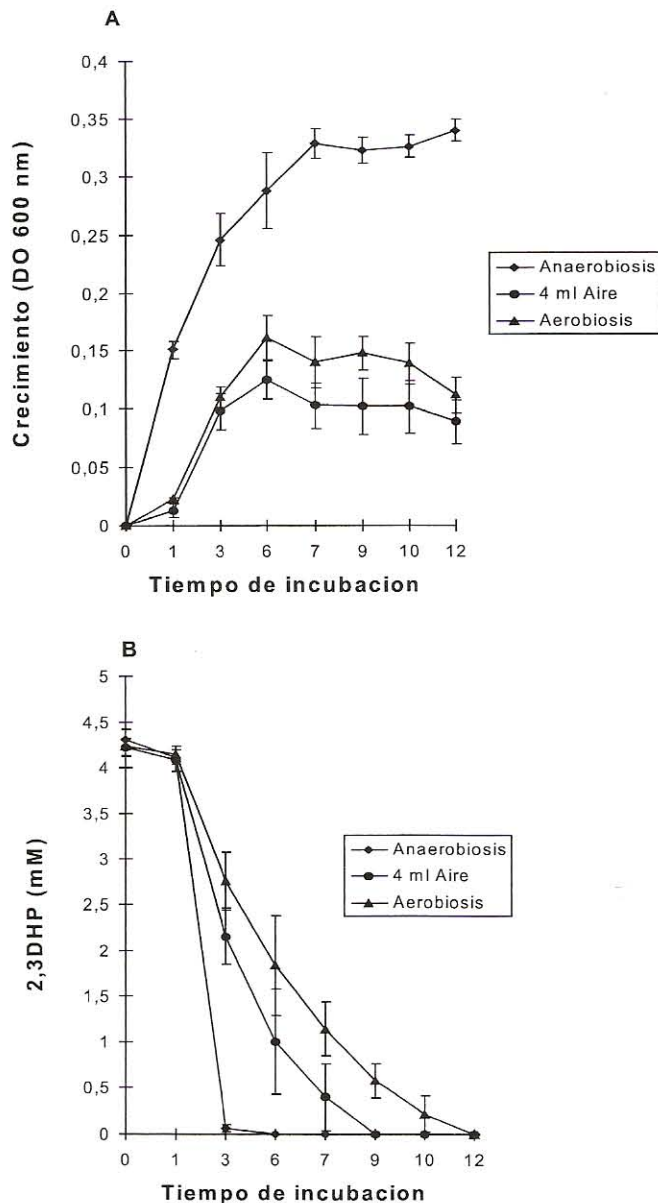


FIGURA 7. EFECTO DE LA AIREACIÓN PARCIAL DEL CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO (A) Y LA DEGRADACIÓN DEL 2,3-DHP (B) DE LA BACTERIA *Synergistes jonesii* EN CULTIVO. (◆) CULTIVO MANTENIDO EN ANAEROBIOSIS; (●) ADICIÓN DE 4 ml DE AIRE AL CULTIVO AL MOMENTO DE LA INOCULACIÓN DE LA BACTERIA Y (▲) CULTIVO INOCULADO EN AEROBIOSIS Y LUEGO INCUBADO EN ANAEROBIOSIS.

vidad degradadora y no permanecer por mucho tiempo en ausencia del compuesto. Experiencias previas han demostrado que sí los cultivos permanecen, aún en refrigeración, en ausencia de la toxina pierden la capacidad degradadora.

Los mecanismos de control genético de la actividad degradadora de 2,3-DHP que operan en el *S. jonesii* son desconocidos, pero, de acuerdo a los resultados anteriores, la persistencia y pérdida de la actividad degradadora pudieran expli-

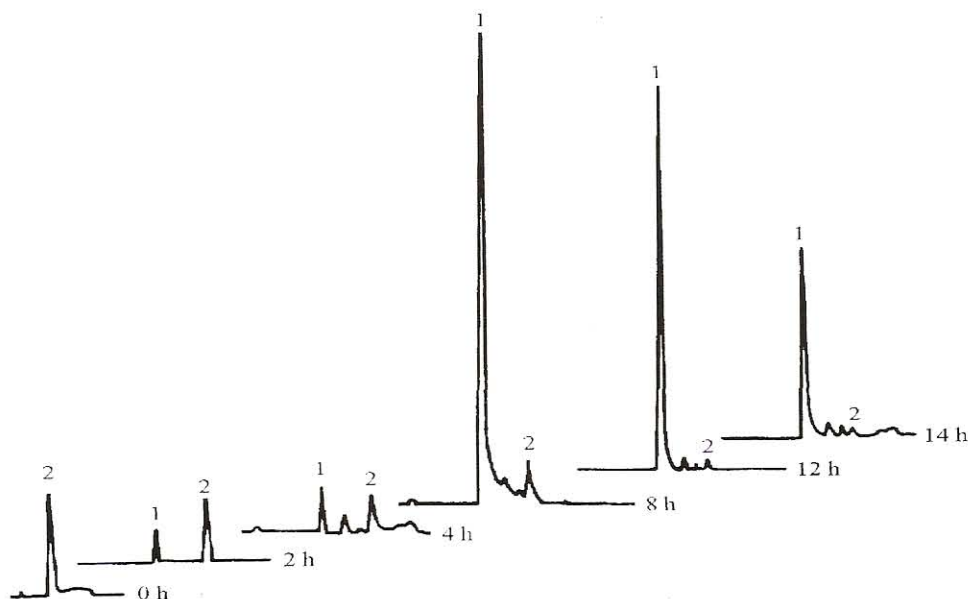


FIGURA 8. ISOMERIZACIÓN DEL 3,4-DHP (2) HACIA EL 2,3-DHP (1). SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE *Synergistes jonesii*, PREVIAMENTE SENSIBILIZADAS A LA DEGRADACIÓN DEL 3,4-DHP, FUERON RESUSPENDIDAS EN BUFFER CARBONATO EN PRESENCIA DE 3,4-DHP. MUESTRAS A INTERVALOS HORARIOS FUERON TOMADAS Y ANALIZADAS EN HPLC.

carse tomando en consideración los siguientes argumentos:

a) El sistema enzimático de degradación es inducible. La expresión de las enzimas responsables de la degradación de piridinedioles en la bacteria se encuentran reprimidas en ausencia de la toxina e inducidas en presencia de la misma; b) Existen bacterias degradadoras en conjunción con bacterias no degradadoras en la población de *S. jonesii*. La presencia de la toxina favorece la prevalencia de las bacterias degradadoras, mientras que su ausencia favorece la población de bacterias carentes de actividad degradadora; c) La actividad degradadora puede residir en plásmidos. Las bacterias pueden perder o ganar el plásmido de acuerdo a la presencia de la toxina en el medio. Experiencias previas en el laboratorio fallaron en determinar la presencia de plásmidos en la bacteria. Kolenbrander y Weinberger [29] investigando la localización de los genes de la transformación de 2-hidroxipiridina en *Anthrobacter crystallopoietes*, encontraron que los genes de las enzimas degradadoras residían en plásmidos; consecuentemente, la bacteria pierde la habilidad de degradar la 2-hidroxipiridina debido a que el plásmido no siempre se transfiere durante la propagación. Sin embargo, en *A. pyridinolis* y *A. viridescens*, los genes responsables de la degradación de 2-hidroxipiridina se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano [27]. d) Las bacterias degradadoras pierden actividad por mutación cromosomal, sin alterar la población de las mismas. Mutaciones reversas pudieran tener ventajas sobre bacterias no degradadoras en presencia de la toxina.

La persistencia y pérdida de la actividad degradadora en cultivos tiene también implicaciones al considerar los sistemas de degradación *in vivo*. Hammond [14] fue capaz de demostrar la persistencia de bacterias degradadoras de 3,4-DHP por va-

rios meses en el rumen sobre substratos diferentes al 3,4- o 2,3-DHP. Jones y col. [25] reportaron que bacterias degradadoras de 2,3 y 3,4-DHP podían persistir en el rumen por nueve meses luego de remover la Leucaena de la dieta, pero después de 12 meses, solamente se observa actividad degradadora sobre el 2,3-DHP. Es posible que existan diferentes géneros de bacterias como de hecho se han reportado [4, 8, 42, 43], con diferencias substanciales en el control genético de la inducción de las enzimas responsables de la degradación de piridinedioles en el rumen.

El 2,3-DHP ha sido reportado como un isómero del 3,4-DHP que aparece durante el metabolismo de la mimosina en rumiantes [1, 25]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que esta isomerización ocurre durante la degradación del 3,4-DHP por *S. jonesii*. No obstante, *S. jonesii* no es capaz de degradar mimosina, lo que sí ocurre *in vivo* por intermedio de enzimas presentes en la hoja de la planta [31, 46] o bien, por la actividad microbiana del rumen [14, 16, 17, 37, 41, 44, 45]. *S. jonesii* sólo exhibe capacidad degradadora para el 2,3-DHP y 3,4-DHP sólo cuando es cultivado en presencia del 3,4-DHP. La presencia del 3,4-DHP induce la expresión de enzimas degradadoras, e implica la presencia del intermediario 2,3-DHP. Sin embargo, sí la bacteria es crecida en presencia únicamente de 2,3-DHP se inducen las enzimas degradadoras de éste, mientras que la actividad sobre el 3,4-DHP permanece marginal.

Por otra parte, la actividad responsable de la isomerización del 3,4-DHP, sólo se expresa cuando el cultivo crece en presencia del 3,4-DHP, permaneciendo inhibida cuando el cultivo crece en presencia de 2,3-DHP. De acuerdo a estos ha-

llazgos, se presume que la actividad degradadora sobre los piridinedioles es expresada mediante una inducción metabólica estando presente el compuesto en el medio.

Existen varios reportes en la literatura [15, 18, 19, 20, 28, 36, 47], que remarcan la conversión de anillos aromáticos mediante reacciones de isomerización o hidroxilación durante la biodegradación de estos. Houghton y Cain [20] reportaron que la bacteria *Achromobacter* spp. puede transformar piridinas monohidroxiladas. 2- y 3-hidroxipiridinas fueron transformadas a 2,5-dihidroxipiridina, mientras que 4-hidroxipiridina lo hizo a 3,4-dihidroxipiridina. La 2,5-dihidroxipiridina se acumuló durante la transformación de 3-hidroxipiridina en una bacteria gram negativa aislada del suelo [28]. Durante el metabolismo del ácido nicotínico por parte de un *Clostridium* sp. existe una reacción de hidroxilación que convierte el ácido nicotínico en ácido 6-hidroxi-nicotínico, una reacción que prepara la ruptura en el enlace 1-6 del anillo [15, 18, 19, 36, 47].

La isomerización del 3,4-DHP hasta 2,3-DHP parece ser un requisito necesario para preparar el anillo a la subsecuente reacción de reducción. El anillo de piridina, desde el punto de vista químico, presenta ciertas propiedades especiales al ser una estructura aromática que tiene una estabilidad por resonancia similar al benceno. Sin embargo, en términos de reactividad, se ha encontrado que la posición 3 o β posee propiedades típicas de los compuestos aromáticos, en cambio, las posiciones 2, 4 y 6 tienen conductas anómalas debido a la atracción electrónica que posee el átomo de nitrógeno. La densidad electrónica en las posiciones 2, 4 y 6 se encuentra reducida, lo que hace al sistema susceptible de sufrir reacciones de sustitución nucleofílica [13, 15]. Los sustituyentes hidroxilos en las posiciones 2, 4 ó 6 afectan la estabilidad por resonancia del sistema de electrones π desapareados del anillo, favoreciendo la energética de la degradación [5].

CONCLUSIONES

Existe una actividad microbiana de degradación de piridinedioles tóxicos en animales rumiantes que consumen la planta *Leucaena leucocephala* en Venezuela.

La bacteria ruminal *S. jonesii* es capaz de metabolizar el 3,4-DHP y su isómero el 2,3-DHP, pero incapaz de metabolizar la mimosina. La actividad degradadora sobre el 2,3-DHP exhibe una inhibición por sustrato.

La actividad degradadora sobre los piridinedioles es inducible metabólicamente, aunque los mecanismos de control genético no se conozcan aún. La actividad degradadora puede perderse irreversiblemente, si el cultivo es desprovisto de la toxina.

En el metabolismo del 3,4-DHP existe una reacción de isomerización para convertirlo en 2,3-DHP, previo a la degradación catabólica.

RECOMENDACIONES

Nuevos estudios son necesarios para determinar y clasificar bacterias con actividad degradadora de piridinedioles tóxicos en el ganado venezolano. Así mismo, precisar las vías de propagación de este tipo de microorganismos en el ambiente. Es importante también, ahondar en estudios que permitan una mejor caracterización bioquímica del sistema enzimático de degradación con miras a explotar el uso potencial de éste, por métodos biotecnológicos, en la detoxificación de la *Leucaena leucocephala* y así poder hacer un uso más extenso de las bondades de esta planta, especialmente en la nutrición de animales monogástricos carentes de bacterias detoxificadoras.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al CO-NICIT por el soporte concedido y a Milton Allison, Animal Disease Center-US Department of Agriculture, Iowa, por ceder-nos gentilmente la cepa bacteriana usada en este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AL-DEHNEH, A.; PIERZYNOWSKI, S.G.; SMUTS, M.; SAHLU, T.; FERNÁNDEZ, J.M. Blood metabolite and regulatory hormone concentrations and response to metabolic challenges during the infusion of mimosine and 2,3-dihydroxy-pyridine in alpine goats. **J. Anim. Sci.** 72: 415-420. 1994.
- [2] ALLISON, M.J.; HAMMOND, A.C.; RAYMOND, J.J. Detection of ruminal bacteria that degrade toxic Dihydroxypyridine compounds produced from mimosine. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 590-594. 1990.
- [3] ALLISON, M.J. Simplified cultural test for ruminal bacteria that degrade toxic dihydroxypyridine derivatives of mimosine. **Leucaena Res. Reports.** 12: 105-108. 1991.
- [4] ALLISON, M.J.; MAYBERRY, W.R.; MCSWEENEY, C.S.; STAHL, D.A. *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. **System. Appl. Microbiol.** 15: 522-529. 1992.
- [5] BESLE, J.M.; JOUANY, J.P.; CORNU, A. Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. **FEMS Microbiol. Rev.** 16: 33-52. 1995.
- [6] CALDWELL, D.R.; BRYANT, M.P. Medium without rumen fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. **Appl. Microbiol.** 14: 794-801. 1966.
- [7] CLEELAND, W.W. Steady state kinetics. *In: The enzyme* 2nd edition. Boyer, P. Ed. Academic Press, New York. 2: 1-66. 1970.

- [8] DOMÍNGUEZ-BELLO, M.G.; STEWART, C.S. Characteristic of a rumen *Clostridium* capable of degrading mimosine, 3-hydroxy-4(1H)-pyridone and 2,3-dihydroxy pyridine. **Syst. Appl. Microbiol.** 14: 67-71. 1991.
- [9] EDWARDS, E.A.; GRBIC-GALIC, D. Anaerobic degradation of toluene and O-xylene by a methanogenic consortium. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 313-322. 1994.
- [10] EVANS, W.C.; FUCHS, G. Anaerobic degradation of aromatic compounds. **Ann. Rev. Microbiol.** 42: 289-317. 1988.
- [11] FARINU, G.O.; AJIBOYE, S.O.; AJAO, S. Chemical composition and nutritive value of leaf protein concentrate from *Leucaena leucocephala*. **J. Sci. Food Agric.** 59: 127-129. 1992.
- [12] GALLERT, C.; WINTER J. Anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate: reductive dehydroxylation of 4-hydroxy-benzoyl-CoA and ATP formation during 4-hydroxybenzoate decarboxylation by phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42: 408-414. 1994.
- [13] GILCHRIST, T.L. **Heterocycle chemistry**, Logman Scientific & Technical, New York. 430 pp. 1985.
- [14] HAMMOND, A.C. *Leucaena* toxicosis and its control in ruminants. **J. Anim. Sci.** 73: 1487-1492. 1995.
- [15] HARARY, I. Bacterial fermentation of nicotinic acid. II Anaerobic irreversible hydroxylation of nicotinic acid to 6-hydroxynicotinic acid. **J. Biol. Chem.** 227: 823-831. 1957.
- [16] HEGARTY, M.P.; SCHINCKEL, P.G.; COURT, R.D. Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth. and to its toxic principle mimosine. **Aust. J. Agric. Res.** 15: 153-160. 1964
- [17] HEGARTY, M.P.; COURT, R.D.; CHRISTIE, G.S.; LEE, P.C. Mimosine in *Leucaena leucocephala* is metabolized to a goitrogen in ruminants. **Aust Vet. J.** 52: 490-498. 1976.
- [18] HOLCENBERG, J.S.; STADTMAN, E.R. Nicotinic acid metabolism. III Purification and properties of nicotinic acid hydroxylase. **J. Biol. Chem.** 241: 1194-1203. 1966.
- [19] HOLCENBERG, J.S.; TSAI, L. Nicotinic acid metabolism. IV Ferredoxin-dependent reduction of 6-hydroxynicotinic acid to 6-oxo-1,4,5,6-tetrahydronicotinic acid. **J. Biol. Chem.** 244: 1204-1211. 1969.
- [20] HOUGHTON, C.; CAIN, R.B. Microbial metabolism of the pyridine ring. **Biochem. J.** 130: 879-893. 1972.
- [21] HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**, Academic Press., New York. 1-533. 1966.
- [22] JONES, R.J. Does ruminal metabolism of mimosine and DHP explain the absence of *Leucaena* toxicity in Hawaii?. **Aust. Vet. J.** 57: 55-58. 1981.
- [23] JONES, R.J.; MEGARRITY, R.G. Comparative toxicity responses of goats fed on *Leucaena leucocephala* in Australia and Hawaii. **Aust. J. Agric. Res.** 34: 781-790. 1983.
- [24] JONES, R.J.; LOWRY J.B. Australian goats detoxify goitrogen 3-hydroxy-4(1H)-pyridone (DHP) after rumen infusion from an Indonesian goat. **Experimentia.** 40: 1435-1436. 1984.
- [25] JONES, R.J.; FORD, C.W.; MEGARRITY, R.G. Conversion of 3,4DHP to 2,3DHP by rumen bacteria. **Leucaena Res. Rep.** 6: 3-4. 1985.
- [26] JONES, R.J.; MEGARRITY, R.G. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of *Leucaena*. **Aust. Vet. J.** 63: 259-262. 1986.
- [27] KAISER, J.P.; FENG, Y.; BOLLAG, J.M. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. **Microbiol. Rev.** 60: 483-498. 1996.
- [28] KHANNA, M.; SHUKLA, O.P. Microbial metabolism of 3-hydroxypyridine. **Indian J. Biochem. Biophys.** 14: 301-302. 1977.
- [29] KOLENBRANDER, P.E.; WEINBERGER, M. 2-hydroxypyridine metabolism and pigment formation in three *Achromobacter* species. **J. Bacteriol.** 132: 51-59. 1977.
- [30] KUDO, H.; CHENG, K.J.; MAJAK, W.; HALL, J.W.; COSTERTON, W. Degradation of mimosine in rumen fluid from cattle and sheep in Canada. **Can. J. Anim. Sci.** 64: 937-942. 1984.
- [31] LOWRY, J.B.; TANGENDAJA, M.; TANGENDAJA, B. Autolysis of mimosine to 3-hidroxy-4-1(H)pyridone in green tissues of *Leucaena leucocephala*. **J. Sci. Food Agric.** 34: 529-533. 1983.
- [32] MARTÍNEZ, M.A.; SCHEFERT, H.S. The virulence of *Leucaena leucocephala* for goats in northeastern Mexico. **Barl. Munch. Tieraztl. Wochenschr.** 104: 257-262. 1991.
- [33] MATHEWS, A.; VITTAL-RAI, P. Mimosine content of *Leucaena leucocephala* and the sensitivity of *Rhizobium* to mimosine. **J. Plant Physiol.** 117: 377-382. 1985.
- [34] MATSUMOTO, H.; SHERMAN, G.D. A rapid colorimetric method for the determination of mimosine. **Arch. Biochem. Biophys.** 33: 195-200. 1951.
- [35] OGIMOTO, K.; IMAI, S. Techniques of rumen microbiology *In: Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies, Tokyo, 175-190. 1981.
- [36] PASTAN, I.; TSAI, L.; STADTMAN, E.R. Nicotinic acid metabolism: I Distribution of isotope in fermentation

- product of labeled nicotinic acid. **J. Biol. Chem.** 239: 902-906. 1964.
- [37] RAM, J.J.; ATREJA, P.P.; CHOPRA, R.C.; CHABRA, A. Mimosine degradation in calves fed a sole diet of *Leucaena leucocephala* in India. **Trop. Anim. Health Prod.** 26: 199-206. 1994.
- [38] RODRÍGUEZ, I.; ROSERO, O. Efectos de la harina de hojas de *Leucaena* en la alimentación de cerdos en finalización. **Revista Científica de la Facultad de Veterinaria-LUZ**. 5: 131-137. 1995.
- [39] SAMANTA, A.K.; CHOPRA, R.C.; ATREJA, P.P.; CHABRA, A. An attempt to inactivate mimosine of *Leucaena leucocephala* by mineral supplementation for feeding to ruminants. **Anim. Feed Sci. Technol.** 50: 157-165. 1994.
- [40] SERRANO, E.P.; LAG, L.L.; MENDOZA, E.M. Biochemical mechanisms of mimosine toxicity to *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Aust. J. Biol. Sci.** 36: 445-454. 1983.
- [41] SHARRY, L.F.; O'KEEFE, J.H.; DOWNES, A.M. The fate of L-[3H]mimosine in the sheep. **Proc. Aust. Biochem. Soc.** 14: 45-51. 1981.
- [42] SOEDARJO, M.; HEMSCHIEDT, T.K.; BORTHAKUR, D. Mimosine, a toxin present in leguminous trees (*Leucaena sp.*) induces a mimosine-degrading enzyme activity in some *Rhizobium* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4268-4272. 1994.
- [43] TAN, P.; WANG, J. Rumen bacteria degrading toxic mimosine and dihydroxypyridine compounds in China. **Wei. Sheng Wu Hsueh Pao.** 34: 379-384. 1994.
- [44] TANGENDJAJA, B.; HOGAN, J.P.; WILLS, R.B. Degradation of mimosine by rumen contents: effects of feed composition and *Leucaena* substrates. **Aust. J. Agric. Res.** 34: 289-293. 1983.
- [45] TANGENDJAJA, B.; LOWRY, J.B.; WILLS, R.B. Degradación de mimosina y 3-hidroxi-4(1H)-piridona (DHP) por cabras de Indonesia. **Producción Animal Tropical.** 10: 41-45. 1985.
- [46] TANGENDJAJA, B.; LOWRY, J.B.; WILLS, R.B. Isolation of a mimosine degrading enzyme from *Leucaena* leaf. **J. Sci. Food Agric.** 37: 523-526. 1986.
- [47] TSAI, L.; PASTAN, I.; STADTMAN, E.R. Nicotinic acid metabolism. II The isolation and characterization of intermediates in the fermentation of nicotinic acid. **J. Biol. Chem.** 241: 1807-1813. 1966.
- [48] WAYNE, R. The key to the *Leucaena* problem is in the rumen. **Rural Res. CSIRO, Aust.** 123: 17-19. 1984.