

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA DEGRADACIÓN DE PIRIDINEDIOLES  
TÓXICOS DERIVADOS DE LA MIMOSINA POR  
LA BACTERIA RUMINAL *SYNERGISTES JONESII***

**Biochemical Aspects of Mimosine-Derived Toxic Pyridinediols Degradation by  
the Rumen Bacterium *Synergistes jonesii***

Marco T. Rincón<sup>\*.1\*\*</sup>, María G. Domínguez-Bello<sup>\*\*</sup>, Milton J. Allison<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Roberto Romero<sup>\*,\*\*\*\*\*</sup>, Ysaura D'Sanctis<sup>\*\*\*</sup> y Fabian Michelangeli<sup>\*\*</sup>

*Cátedra de Bioquímica\*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia.  
Apartado postal 15252. Maracaibo 4005-A, Estado Zulia, Venezuela.*

*\*\*Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal y \*\*\*Laboratorio de Química Inorgánica,  
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apartado postal 21827,  
Caracas 1020A. Venezuela. \*\*\*\*National Disease Centre. U.S Department of  
Agriculture, Ames, Iowa. USA. \*\*\*\*\*GlaxoWellcome, calle Luis de Camoes #115-  
117, Urb. La Trinidad, Caracas 1080. Venezuela.*

**Correo-E: M.Rincon@rowett.ac.uk**

Recibido: 24/11/03 - Aprobado: 16/01/04

RESUMEN

ABSTRACT

*Synergistes jonesii* es una bacteria anaeróbica aislada del rumen de animales resistentes a los efectos tóxicos de la leguminosa *Leucaena leucocephala* que exhibe actividad degradadora sobre piridinedioles tóxicos derivados de la mimosina. En el siguiente trabajo extractos proteicos libres de células de cultivos anaeróbicos de la bacteria *S. jonesii* fueron analizados para estudiar algunos aspectos bioquímicos del metabolismo de las piridinas. Se demostró que la actividad degradadora de piridinedioles se lleva a cabo en presencia de  $\alpha$ -ceto-ácidos (piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato) bajo una atmósfera de nitrógeno, o bien en presencia de metil viologen

*Synergistes jonesii* is an anaerobic bacterium isolated from the rumen of animals resistant to the toxic effect of the legume *Leucaena leucocephala*, which exhibits degrading activity on mimosine-derived toxic pyridinediols. The following work reports analyses on cell-free protein extracts from anaerobic cultures of *S. jonesii* that were used to study some biochemical aspects of the metabolism of pyridinediols. It was demonstrated that the pyridinediol-degrading activity was carried out when either  $\alpha$ -keto acids (pyruvic or  $\alpha$ -keto-glutaric acid) were present in anaerobic condition or methyl viologen was present only under hydrogen atmosphere.

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

solamente en presencia de hidrógeno. La degradación de piridinedioles en presencia de metil viologen e hidrógeno se lleva a cabo gracias a la existencia de enzimas hidrogenasas en el extracto enzimático. El requerimiento de  $\alpha$ -ceto-ácidos y agentes reductores de bajo potencial redox en atmósfera anaeróbica ( $N_2$  o  $H_2$  respectivamente), indica que durante la degradación del anillo de 2,3-dihidroxipiridina (2,3DHP) concurren reacciones de reducción enzimática. Entre los intermediarios evaluados el flavín adenín dinucleótido (FAD) y la coenzima A (CoA) estimularon la actividad degradadora en el sistema  $\alpha$ -ceto-ácido/ $N_2$  pero no estimularon la degradación del 2,3DHP por sí solos. La carencia de amonio en los productos finales de la degradación del anillo de piridina sugiere que alguno de los compuestos intermediarios de la degradación debe ser nitrogenado. Mediante el análisis por HPLC y GC de muestras de células de *S. jonesii* resuspendidas en solución buffer carbonato, suplementada con amonio, se determinó la presencia de ornitina y ácido propiónico como posibles compuestos intermediarios del metabolismo del 2,3DHP.

**(Palabras clave:** Leucaena leucocephala, Synergistes jonesii, alcaloides, degradación, toxicidad.)

## INTRODUCCIÓN

En países tropicales, la gran mayoría de las gramíneas forrajeras usadas en la alimentación de herbívoros son plantas del tipo C<sub>4</sub>. Dichos forrajes poseen una gran cantidad de material fibroso y son en general de baja calidad nutritiva. Durante mucho tiempo se han utilizado diversas

Pyrideniols degradation occurred under hydrogen and methyl viologen due to the presence of hydrogenases in the cell-free extract. The requirement for  $\alpha$ -keto acids and low redox potential reducing agents under anaerobic conditions ( $N_2$  or  $H_2$ ) indicate that reduction mechanisms are involved in the degradation of 2,3-dihydroxypyridine (2,3DHP). From the intermediary compounds tested flavin adenine dinucleotide (FAD) and coenzyme A (CoA) stimulated the degrading activity in  $\alpha$ -keto acid/ $N_2$  system but failed to stimulate the 2,3DHP degradation by themselves. Lack of ammonium in the end products from degradation of the aromatic pyridine suggests that at least some of the intermediary products could be a nitrogen-containing compound. HPLC and GC analyses of samples taken from *S. jonesii* cells resuspended in carbonate buffered solution supplemented with ammonium showed the presence of ornitine and propionate as possible intermediary products of the 2,3DHP metabolism.

**(Key words:** Leucaena leucocephala, Synergistes jonesii, alkaloids, chemical degradation, toxicity.)

plantas leguminosas de alto contenido proteico para suplementar los forrajes tropicales y cubrir la demanda de nutrientes como una alternativa a la usualmente costosa suplementación con alimentos concentrados. Esta práctica ha generado la aparición de problemas de toxicidad en animales de granja por el consumo de leguminosas que poseen metabolitos secun-

darios de diversa naturaleza que, de una u otra forma, pueden afectar el consumo (Provenza, 1996) o la salud del animal e incluso llegan a causar la muerte por intoxicación de animales no adaptados (Smith, 1992). No obstante, el rumiante posee ciertas ventajas en la detoxificación de metabolitos secundarios. Anatómicamente el rumen está situado previo a los órganos de absorción y, además, posee una variada y compleja población microbiana (Van Soest, 1987). Algunos microorganismos ruminales tienen la capacidad de absorber ciertas moléculas tóxicas y biodegradarlas hasta producir nutrientes útiles para el microorganismo lo que podría traducirse en beneficio para el animal.

Muchas reacciones hidrolíticas en el rumen podrían ser consideradas como detoxificantes. Un gran número de toxinas presentes en las plantas se encuentran conjugadas mediante enlaces de tipo éter, siendo el grupo más notable los glicósidos. Una rápida liberación de agliconas de tales compuestos ha sido reportada en el rumen (Majak, 1992). De igual manera ha sido reportada degradación de ácidos aromáticos (cinámico, caféico, y ferúlico) (Prins, 1981) así como también la transformación de alcaloides a productos menos dañinos por parte de microorganismos ruminales (Craig *et al.*, 1992; Craig, 1995).

En condiciones aeróbicas la degradación microbiana de anillos aromáticos se realiza gracias al concurso de enzimas mono- o di-oxigenasas (Butler y Mason, 1997). Estas enzimas incorporan uno o dos átomos de oxígeno para formar compuestos dihidroxilados sustituidos en la posición *orto* (ejemplo, el catecol) o en la posición *para* (ejemplo, el ácido gentísico) (Lam y Bugg, 1994). Consecuentemente el anillo hidroxilado sufre una ruptura oxidativa y las estructuras abiertas resul-

tantes pueden ser metabolizadas en dicarboxilatos o tricarboxilatos y degradados por reacciones tales como la hidratación, hidrólisis y fisión de aldolasas para producir ácidos grasos de cadena corta (Besle *et al.*, 1995). Frente a la carencia de oxígeno molecular, bajo condiciones anaeróbicas, los microorganismos adoptan varios mecanismos para provocar fisión de anillos aromáticos, entre las que se cuentan: i) fotometabolismo; ii) aceptores químicos de electrones (como nitrato, sulfato, hierro y carbonato); iii) bacterias metanogénicas como aceptores de electrones en consorcios indefinidos cooperando para formar cadenas alimenticias y iv) transferencia de electrones a compuestos orgánicos en cultivos puros (Evans y Fuchs, 1988). El primer paso en la desestabilización de núcleos aromáticos en anaerobiosis involucra una reacción de reducción más que una oxidación (Besle *et al.*, 1995). Los sustituyentes hidroxilos afectan la estabilidad del sistema de electrones  $\pi$  y favorecen reacciones de adición electrofílicas del anillo aromático (Besle *et al.*, 1995).

La mimosina es un amino ácido no proteico presente en la leguminosa forrajera tropical *L. leucocéfala* la cual ha sido responsable de síntomas de toxicidad en algunas especies de animales domésticos (Al Dehneh *et al.*, 1994; Hegarty *et al.*, 1979; Holmes *et al.*, 1981; Luo *et al.*, 2000; Puchala *et al.*, 1996; Reis, 1975a; Reis *et al.*, 1975b; Reis *et al.*, 1999; Tang y Ling, 1975). La mimosina posee un anillo aromático de 3-hidroxi-4-(1H)-piridona (3,4DHP) (Mostad *et al.*, 1973) estructuralmente análogo a la tirosina. Debido a su semejanza a la tirosina, presumiblemente la mimosina funciona como inhibidor o antagonista en muchos procesos en los que interviene la tirosina como intermediario (Hammond, 1995; Hegarty *et al.*, 1979; Holmes *et*

al., 1981; Li, 1987). El anillo aromático de 3,4DHP se encuentra en estado libre en el rumen y en la circulación de animales intoxicados, indicando que la mimosina es fácilmente hidrolizada en el rumen (Kudo *et al.*, 1984; Lowry *et al.*, 1983; Tangendjaja y Wills, 1983; Tangendjaja *et al.*, 1985). Resultados previos demostraron que la bacteria *S. jonesii*, aislada del rumen de animales resistentes al consumo de la *L. leucocéfala* (Allison *et al.*, 1992) convierte el 3,4DHP en su isómero 2,3DHP (Rincón *et al.*, 2000). La reacción de isomerización del 3,4DHP pareciera ser un requisito previo en la preparación del anillo aromático de piridina para su subsecuente degradación (Rincón *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos del análisis bioquímico de la degradación metabólica del piridinediol 2,3DHP derivado de la mimosina por parte de extractos proteicos libres de células de la bacteria ruminal *S. jonesii* en sistemas enzimáticos anaeróbicos. Sobre la base de estos resultados se propone una ruta metabólica tentativa de degradación de mimosina en rumiantes portadores de la bacteria *S. jonesii*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Medios de cultivo, reactivos y cepas bacterianas utilizadas**

La bacteria *S. jonesii* cepa 78-1 (Allison *et al.*, 1992) fue cultivada anaerobicamente en medio de cultivo bacteriológico 98-5 modificado suplementado con licor ruminal (Allison, 1991) para la preparación de células resuspendidas. Para la preparación del extracto proteico libre de células en vasos de fermentación de 12 L se optó por usar el medio arginina-extracto de levadura (ARG-YE)

(McSweeney *et al.*, 1993) el cual demostró mantener un crecimiento copioso de células a la vez que eliminaba la alternativa de usar licor ruminal en grandes cantidades.

Nicotinamida adenín dinucleótido en forma reducida u oxidada (NADH y NAD<sup>+</sup>, respectivamente), nicotinamida adenín dinucleótido fosfato en forma reducida u oxidada (NADPH y NADP<sup>+</sup>, respectivamente), flavín adenín dinucleótido en forma reducida u oxidada (FADH<sub>2</sub> y FAD, respectivamente), Coenzima A (CoA), pirofosfato de tiamina (TPP), glutamato, histidina, citocromo C, metil viologen, arginina, piruvato, ácido  $\alpha$ -ceto-glutarato, prolina, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), ditiotreitól (DTT) y ácido fórmico fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

### **Inoculación de medios bacteriológicos y crecimiento de la bacteria**

*S. jonesii* fue cultivado en medio 98-5 modificado en presencia de 4,5 mM de 2,3DHP para mantener la actividad degradadora del cultivo. El medio ARG-YE suplementado con 5 mM de 2,3DHP fue utilizado para obtener el extracto proteico libre de células a partir de 50 ml de medio ARG-YE cultivado anaerobicamente por 72 h y transferido a un fermentador anaeróbico de 12 L de capacidad con un flujo de CO<sub>2</sub> de 15 ml/min a 37°C y agitación constante. El crecimiento de la bacteria se evaluó a intervalos de 24 h midiendo la densidad óptica del medio de cultivo a 600 nm (Spectronic 20D, Milton Roy).

### **Cuantificación espectrofotométrica del 2,3DHP**

La actividad degradadora en medios de cultivo y en la mezcla enzimática se

determinó a través de la cuantificación espectrofotométrica del 2,3DHP mediante una adaptación del método de Matsumoto y Sherman (1951). Una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de la muestra fue depositada en una microplaca de 96 hoyos de fondo plano (Nunc, TC microwell 96F). Tras la adición de 250  $\mu\text{L}$  de solución  $\text{FeCl}_3$  (0,06% p/v  $\text{FeCl}_3$  disuelto en 0,1 M HCl) se midió la absorbancia a 600 nm de longitud de onda en un lector de microplacas (Bio kinetic Reader EL340, Bio-tek Instruments).

#### **Preparación del extracto proteico libre de células.**

Un cultivo de *S. jonesii* en fase estacionaria y con actividad degradadora sobre el 2,3DHP mantenido en medio ARG-YE en un fermentador anaeróbico de 12 L de capacidad se centrifugó en una centrifuga de flujo continuo (Sparcplus). El pellet celular se lavó dos veces en 20 ml de una solución buffer  $\text{PO}_4$ -DTT-PMSF (50 mM buffer fosfato de sodio, pH 6.8, 2 mM DTT y 1 mM PMSF) con centrifugación a 16,000 x g por 20 min. (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments). El pellet fue resuspendido en una solución  $\text{PO}_4$ -DTT-PMSF a razón de 2,5 ml de solución por cada gramo de peso húmedo de pellet bacteriano. La lisis celular se realizó usando una prensa francesa a 1,250 psi. Se ajustó la concentración de  $\text{MgCl}_2$  hasta 4.95 mM y 20-30  $\mu\text{g/ml}$  de DNasa I (Sigma) en el lisado bacteriano y se incubó a temperatura ambiente por espacio de 20 min. Luego de la incubación la solución se centrifugó a 12,000 x g por 10 min. (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments) y el sobrenadante de este paso fue sometido a ultracentrifugación a 186,000 x g durante 1h a 4°C (Sorvall OTD5B ultracentrifuge, Du Pont Instruments). El

sobrenadante se dispensó en tubos de vidrio 13 x 100 mm con tapón de goma y se almacenó a -70°C hasta nuevo uso. Todos los pasos se realizaron anaerobicamente bajo flujo de  $\text{CO}_2$  hasta donde fue posible.

#### **Ensayos enzimáticos**

La degradación del 2,3DHP se llevó a cabo en tubos de ensayo 13 x 100 mm. La degradación enzimática del 2,3DHP por extractos libres de células de *S. jonesii* se llevó a efecto usando dos sistemas anaeróbicos: el sistema  $\text{N}_2/\alpha$ -ceto-ácido y el sistema  $\text{H}_2$ /metil viologen. En el sistema  $\text{N}_2/\alpha$ -ceto-ácido la mezcla enzimática se preparó adicionando 50 mM buffer fosfato pH 6.8, 1 mM DTT, 5 mM 2,3DHP, 50  $\mu\text{M}$  CoA (cuando era requerido), 50  $\mu\text{M}$  TPP (cuando era requerido). Los compuestos donadores de electrones evaluados (piruvato,  $\alpha$ -ceto-glutarato, histidina, arginina, glutamato, formiato) se adicionaron a concentraciones de 10 mM bajo una atmósfera anaeróbica de  $\text{N}_2$ . En el sistema  $\text{H}_2$ /metil viologen la mezcla enzimática se preparó de la misma manera que el anterior pero el compuesto donador de electrones fue el metil viologen a una concentración final de 10 mM bajo una atmósfera anaeróbica de  $\text{H}_2$ . El extracto proteico se adicionó en último lugar para dar comienzo a la reacción enzimática a concentraciones de 20% v/v. En ambos casos el volumen final fue ajustado a 2 ml tras la adición de agua deionizada. Todas las soluciones fueron envasadas anaerobicamente bajo flujo de  $\text{N}_2$  o  $\text{H}_2$  según el caso.

Para el ensayo de intermediarios electrónicos la mezcla de reacción enzimática se preparó siguiendo los dos sistemas de degradación de 2,3DHP según se menciona y los compuestos intermediarios analizados ( $\text{NADH}$ ,  $\text{NADPH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ,

citocromo C y CoA) se adicionaron en concentraciones de 10  $\mu$ M, excepto CoA que fue adicionado a concentraciones de 50  $\mu$ M, en presencia o ausencia de 10 mM metil viologen o piruvato bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> o N<sub>2</sub> respectivamente.

La determinación de la reducción del NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> en el extracto proteico se realizó por espectrofluorimetría. La mezcla de reacción enzimática fue reconstituida en un volumen total de 3 ml agregando 50 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 5 mM piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutárico, 10  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> ó NADP<sup>+</sup>. Previo al ensayo enzimático el extracto proteico fue sometido a ultrafiltración con Centriplus 10 (límite de filtración de ~ 10,000 Dalton, Amicom), según especificaciones del fabricante, para reducir la cantidad de cofactores enzimático que pudieran estar presentes originalmente en el extracto proteico. La reacción se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo con flujo constante de N<sub>2</sub>. El análisis se realizó en un espectrofluorímetro (Photon Technology Inc.) a temperatura constante (37°C) registrando el incremento de la fluorescencia a 460 nm (excitación 340 nm).

#### **Cuantificación de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el micro-método colorimétrico de Lowry para proteínas totales (Sigma), según especificaciones del fabricante. La lectura se hizo en un lector de microplacas (Bio kinetic reader EL340, Bio-Tek Instruments) a 750 nm de longitud de onda.

#### **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. El cultivo se incubó anaerobicamente a 38°C. Luego que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de cre-

cimiento y demostró una degradación total del 2,3DHP (4,5 mM) se centrifugó a 3,000 x g por 10 min. (Sorvall T 6000B, Du Pont Instruments). El pellet celular fue resuspendido en una solución de buffer carbonato-salina [30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 28 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 16 mM NaCl, 7,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,6 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 3,5 mM cisteína-HCl, pH 6.8] hasta un volumen final de 4 ml. Las soluciones a evaluar fueron adicionadas a las concentraciones indicadas. El volumen final se completó hasta 5 ml.

#### **Cuantificación de la liberación de amonio**

El análisis de la liberación de amonio en el extracto proteico libre de células se realizó mediante el método de azul de indofenol. La mezcla de reacción enzimática se reconstituyó bajo el sistema N<sub>2</sub>/ $\alpha$ -ceto-ácido. Luego del tiempo final de incubación se agregó ácido tricloroacético (20% v/v) para detener la reacción y para precipitar las proteínas. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 x g por 10 min. (Eppendorff centrifuge). Veinte  $\mu$ L del sobrenadante se mezclaron con 0,5 ml de reactivo de fenol (5 g de fenol, 0,025 g de nitroferrocianuro de sodio en 100 ml de agua destilada). Luego de 5 min. se adicionaron 0,5 ml del reactivo de hipoclorito de sodio (2,5 g de NaOH, 2 ml de solución de hipoclorito al 4,25%, en 100 ml de agua destilada). Se incubaron por 15 min. a 39°C y luego se agregaron 5 ml de agua destilada. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Spectronic 20D, Milton Roy) a 630 nm de longitud de onda.

### **Análisis de los productos finales de la reacción por cromatografía de capa fina (TLC)**

Muestras de 1 ml fueron tomadas a intervalos horarios a partir de un ensayo enzimático usando el sistema  $H_2$  en presencia de 10 mM metil viologen. La reacción fue detenida con ácido perclórico (10% v/v) y las muestras acidificadas se sometieron a centrifugación 14,000 x g por 20 min. (Eppendorf microcentrifuge) y el sobrenadante fue neutralizado con una solución de KOH saturada y se centrifugó nuevamente a 3,000 x g por 10 min. El sobrenadante libre de sales se aplicó sobre una placa de TLC (Whatman AL SIL G/UV). La cromatografía se desarrolló en una mezcla de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio en proporciones de 17:7:1 respectivamente. Las manchas fueron reveladas por exposición a luz u.v. a 254 nm luego de ser impregnadas por aspersión con el reactivo de fluorescamina (0,010 g de fluorescamina en 50 ml de acetona).

### **Análisis de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases (GC)**

Muestras de sobrenadante de las células en estado estacionario de *S. jonesii* resuspendidas en solución anaeróbica de buffer carbonato-salina y suplementadas con piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato fueron recolectadas luego que degradaron el 2,3DHP de la solución. Los ácidos grasos volátiles se evaluaron por GC (Hewlett Packard instruments) con columna capilar Carbowax HP-20M (30 m). Las muestras fueron deproteinizadas con  $H_3PO_4$  (2% v/v) y filtradas en filtros de nitrocelulosa 0,2  $\mu$ m (Millipore). Un volumen de 5  $\mu$ L de muestra se inyectó a la columna. Las condiciones del análisis fueron: temperatura del puerto de inyección 170°C, temperatura de la columna 110°C,

temperatura del detector (índice de ionización a la llama, FID) 180°C. El ácido heptanóico (5 mM) fue utilizado como estándar interno.

### **Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida (HPLC)**

Los productos finales del metabolismo de piridinedioles en el sobrenadante de células resuspendidas se analizaron por la técnica de HPLC para aminoácidos usando el método de derivatización por cloruro de dansilo en una columna de fase reversa (Brownlee Spheri-5, RP-18, 220 x 4,6 mm) de acuerdo a las siguientes condiciones: solvente A (25 mM buffer acetato de sodio, pH 6,5, 4% v/v dimetilformamida), solvente B (acetonitrilo). El gradiente fue ajustado como sigue (A%/B% min.): 90/10 10 min., 65/35 29.9 min., 45/55 14 min., 15/85 2 min., 90/10 10 min. La separación se realizó a 44°C y el flujo fue ajustado a 1 ml/min. Se usó un detector de fluorescencia a 436 nm de emisión. La derivatización se realizó en tubo con rosca, adicionando 10  $\mu$ L 5 mM norleucina (estándar interno), 20  $\mu$ L muestra deproteinizada, 80  $\mu$ L 50 mM  $Na_2CO_3$ , 160  $\mu$ L de la solución de cloruro de dansilo (0,013 g/10 ml acetonitrilo). La mezcla se incubó por 10 min. a 70°C y a temperatura ambiente por 10 min. adicionales. Posteriormente se adicionó 270  $\mu$ L 50 mM buffer fosfato (pH 7, disuelto en etanol a razón de 1:1). La mezcla fue filtrada en filtro de nitrocelulosa 0,2  $\mu$ m. Un volumen total de 5  $\mu$ L de la mezcla de derivatización fue utilizado para el análisis.

### **Análisis estadístico**

Las diferencias entre los valores promedios en las tablas 3 y 4 se evaluaron con el análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Origin v 4.0 para

MS-Windows. Las diferencias fueron consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### **Degradación de piridinedioles en extractos proteicos libres de células de *S. jonesii***

El extracto proteico libre de células parcialmente purificado fue capaz de degradar el 2,3DHP en dos sistemas anaeróbicos: i) bajo una atmósfera anaeróbica (ej. nitrógeno) y con piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato como agentes reductores, y ii) bajo una atmósfera exclusivamente de hidrógeno y con metil viologen como agente reductor (Tabla 1), siendo la actividad mayor con el  $\alpha$ -ceto-glutarato. El metil viologen no es reducido por la sola presencia del hidrógeno en el ambiente, sino por la presencia de hidrogenasas en el extracto libre de células que oxidan el hidrógeno molecular a la vez que reducen el metil viologen. También es posible observar degradación del 2,3DHP en presencia de metil viologen prescindiendo de la actividad hidrogenasa (ejemplo, en atmósfera de nitrógeno) usan-

do, en sustitución, un compuesto que sea capaz de reducir químicamente el metil viologen, tal como el ditionito de sodio o titanio (III) (datos no mostrados).

### **Ensayo enzimático con intermediarios electrónicos**

Con el propósito de conocer el compuesto que pudiese estar implicado como intermediario electrónico en la reducción del anillo aromático del 2,3DHP se evaluó la actividad específica de reducción del  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  en presencia de piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato. Los resultados indican una mayor actividad de reducción del  $\text{NADP}^+$  que del  $\text{NAD}^+$ , aún más notable en presencia del ácido  $\alpha$ -ceto-glutarico (Tabla 2). No obstante la actividad de reducción del  $\text{NADP}^+$  en presencia de  $\alpha$ -ceto-ácidos, el extracto proteico no presentó actividad degradadora en presencia de éste cofactor ( $\text{NADPH}$ ) cuando fue añadido a la mezcla enzimática al compararlo con el control (piruvato o metil viologen) (Tabla 3). Tampoco se evidenció actividad en presencia de citocromo C o  $\text{NADH}$ . Sin embargo, cuando la reac-

**Tabla 1.** Efecto de diferentes donadores de electrones sobre la actividad degradadora del 2,3DHP por extractos proteicos libre de células de *S. jonesii*. La mezcla de reacción enzimática fue incubada en presencia de 5 mM 2,3DHP y en presencia de diferentes compuestos a concentraciones de 10 mM bajo una atmósfera de nitrógeno, excepto el metil viologen que fue evaluado usando hidrógeno. Los datos presentados representan los valores promedios ( $n=3$ ) acompañados de la desviación estándar correspondiente

Sustrato	Actividad específica nmoles 2,3DHP.min <sup>-1</sup> .mg proteína <sup>-1</sup> )
Ninguno	0,00 ± 0.00
Piruvato	15,83 ± 0.72
$\alpha$ -ceto-glutarato	14,18 ± 0.95
Arginina	0,01 ± 0.12
Histidina	0,03 ± 0.09
Glutamato	5,40 ± 0.78
Prolina	0,01 ± 0.13
Hidrógeno	0,00 ± 0.00
Formato	0,01 ± 0.23
Metil viologen ( $\text{H}_2$ )	12,37 ± 0.95

**Tabla 2.** Actividad específica de la reducción del NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> [nmol NAD(P)<sup>+</sup> reducido. min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>] en el extracto libre de células de *S. jonesii* en presencia de ácidos pirúvico o α-ceto-glutárico. El NADH y NADPH fueron analizados por espectrofluorimetría bajo flujo constante de N<sub>2</sub> en la mezcla de reacción enzimática en presencia de 5 mM 2,3DHP y 10 mM de piruvato o α-ceto-glutarato. Los datos presentados representan los valores promedios (n=3) acompañados de la desviación estándar correspondiente

Sustrato	Cofactor	
	NADH	NADPH
Ninguno	0,260 ± 0.01	0,260 ± 0.04
Piruvato	0,683 ± 0.09	1,917 ± 0.07
a-ceto-glutarato	0,950 ± 0.05	4,150 ± 0.67

ción ocurrió en presencia de piruvato y de FAD se observó un ligero incremento en la actividad degradadora del 2,3DHP (Tabla 3). Los resultados obtenidos con el CoA indican que este cofactor enzimático pudiera estar involucrado en la degradación del 2,3DHP en presencia de piruvato puesto que la actividad

degradadora fue notablemente mayor con este compuesto en comparación al control.

#### **Producción de amonio y compuestos intermedios nitrogenados**

Cuando la reacción de degradación del 2,3DHP por el extracto enzimático se llevó a efecto en un medio carente de una

**Tabla 3.** Actividad específica del extracto proteico libre de células de *S. jonesii* en presencia de algunos cofactores enzimáticos. La mezcla de reacción enzimática conteniendo 5 mM de 2,3DHP fue incubada en presencia de 10 mM de piruvato (atmósfera de N<sub>2</sub>) o metil viologen (atmósfera de H<sub>2</sub>). Los cofactores enzimáticos se encontraban en concentraciones de 10 μM, exceptuando CoA a 50 μM. La degradación del 2,3DHP fue analizada espectrofotométricamente. Los datos presentados corresponden a los valores promedios (n=3) acompañados por los valores de desviación estándar correspondientes.

Cofactor	Actividad específica (nmoles 2,3 DHP. min <sup>-1</sup> .mg proteína <sup>-1</sup> )
Hidrógeno	0,00 <sup>b</sup> ± 0,00
Metil viologen (Control H <sub>2</sub> )	10,03 <sup>a</sup> ± 0,97
Metil viologen + Citocromo C	10,15 <sup>a</sup> ± 0,87
Metil viologen + NAD <sup>+</sup>	11,93 <sup>a</sup> ± 0,94
Metil viologen + NADP <sup>+</sup>	11,50 <sup>a</sup> ± 0,90
Piruvato (Control N <sub>2</sub> )	9,69 <sup>a</sup> ± 0,11
Piruvato + NAD <sup>+</sup>	10,53 <sup>a</sup> ± 0,52
Piruvato + NADP <sup>+</sup>	8,84 <sup>c</sup> ± 0,96
Piruvato + FAD	13,45 <sup>d</sup> ± 0,35
Piruvato + CoA	18,22 <sup>e</sup> ± 0,29
Citocromo C	0,01 <sup>b</sup> ± 0,10
NADH	0,06 <sup>b</sup> ± 0,04
NADPH	0,06 <sup>b</sup> ± 0,10
FADH <sub>2</sub>	0,04 <sup>b</sup> ± 0,08
CoA	0,01 <sup>b</sup> ± 0,05

a,b,c,d,e Valores con letras diferentes con diferencia significativa (P < 0,05)

fuente de amonio, no se observó una liberación neta de amonio durante el curso de la reacción de degradación del 2,3DHP (Tabla 4), sugiriendo que el producto final o intermediarios de la reacción de degradación enzimática del 2,3DHP en este extracto proteico conserva aún el átomo de nitrógeno, constituyente del anillo aromático de 2,3DHP.

La Figura 1, muestra los resultados obtenidos de la separación de compuestos de la mezcla enzimática después de la incubación con el sustrato usando la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). En esta figura se aprecia un nuevo compuesto ( $R_f$  0,87) que aparece encima de la mancha del 2,3DHP ( $R_f$  0,75) y que se incrementa a medida que es degradado el 2,3DHP, no apareciendo en ausencia del sustrato (líneas 9 y 10). Este compuesto es de mayor polaridad que el 2,3DHP y posee un grupo amonio (amina primaria o secundaria) que reacciona con fluorescamina. El compuesto fue extraído de la silica con metanol y sometido a análisis por resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -rmn, datos no mostrados). Sin embargo, el análisis químico no pudo llevarse a término para dilucidar la estructura de este nuevo compuesto debido, al parecer, a la

impureza del material extraído o por alteraciones químicas producidas en el proceso de extracción.

#### **Análisis de ácidos grasos volátiles en células resuspendidas por GC**

El sobrenadante de células de *S. jonesii* resuspendidas fue sometido a análisis cromatográfico de ácidos grasos volátiles luego de la incubación con el 2,3DHP. De los resultados obtenidos (Tabla 5) se deduce que la inclusión de piruvato produce un aumento considerable en la concentración de ácido acético, mientras que la inclusión de  $\alpha$ -cetoglutaratato en la mezcla de reacción produjo un aumento en el ácido propiónico. El aumento de la concentración de 2,3DHP de 5 mM a 10 mM duplica la concentración de ácido propiónico, lo que sugiere que este último pudiera ser un producto derivado de la hidrólisis del piridinediol.

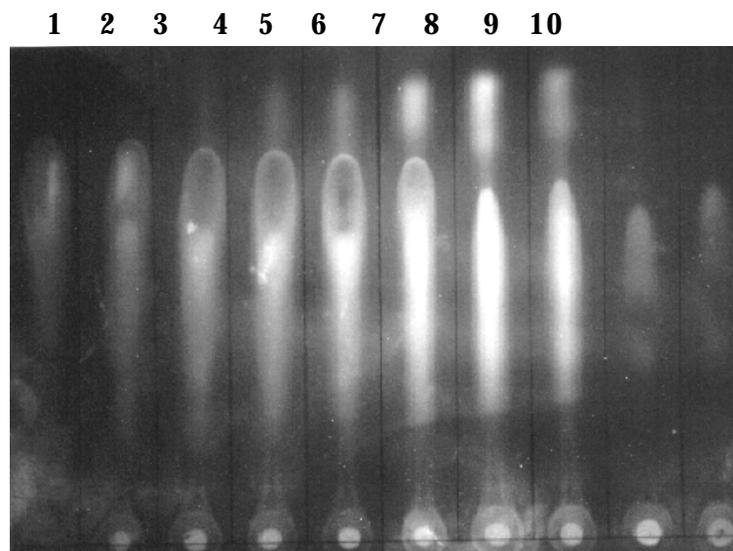
#### **Análisis de aminoácidos en células resuspendidas por HPLC**

Un intento por determinar la presencia de productos finales de la degradación del 2,3DHP se realizó en células en estado estacionario de crecimiento resuspendidas en solución mineral

**Tabla 4.** Producción de amonio por extractos proteicos libres de células de *S. jonesii*. La concentración de amonio se determinó luego de 12 horas de incubación en presencia o ausencia de 5 mM 2,3DHP. La atmósfera utilizada se indica entre paréntesis ( $\text{H}_2$  ó  $\text{N}_2$ ). Los datos presentados corresponden a los valores promedios ( $n=3$ ) acompañados por los valores de desviación estándar correspondiente

Sustrato	Amonio liberado ( $\mu\text{M}$ )	
	Con 2,3DHP	Sin 2,3DHP
Metil viologen ( $\text{H}_2$ )	0,45 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	0,44 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09
Piruvato ( $\text{N}_2$ )	0,34 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	0,57 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10
$\alpha$ -ceto-glutarato ( $\text{N}_2$ )	2,44 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01	2,13 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01

<sup>a,b</sup> Valores con letras diferentes con diferencia significativa ( $P < 0,05$ )



**Figura 1.** Cromatografía en capa fina de los productos finales de la degradación del 2,3DHP por extractos proteicos libres de células de *S. jonesii*. Muestras de la mezcla de reacción en el sistema  $H_2$ /metil viologen fueron tomadas a intervalos horarios y deproteinizadas. Las muestras fueron aplicadas en una placa de TLC. Compuestos con aminas primarias o secundarias fueron visualizados con luz u.v. luego de reaccionar con el reactivo de fluorescamina. Línea 1: 2,3DHP; líneas 2-8: 0, 1, 2, 4, 12, 19 y 24 horas de incubación con 4,5 mM 2,3DHP respectivamente; líneas 9-10: muestras control sin 2,3DHP a las 0 y 24 horas respectivamente

**Tabla 5.** Análisis de ácidos grasos volátiles del sobrenadante de células resuspendidas de *S. jonesii*. La suspensión fue incubada a dos diferentes concentraciones de 2,3DHP (5 y 10 mM) en presencia de 10 mM piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato bajo una atmósfera de nitrógeno. Los ácidos grasos volátiles se determinaron por cromatografía de gases. Los datos presentados corresponden a los valores promedios ( $n=3$ ) acompañados por los valores de desviación estándar correspondiente

Cofactor	Producto final <sup>a</sup>		
	Acético	Propiónico	Butírico
2,3DHP <sup>2</sup>	0,8 ± 0,02	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Piruvato <sup>2</sup>	4,1 ± 0,12	0,0 ± 0,00	0,8 ± 0,21
2,3DHP <sup>1</sup> + piruvato <sup>2</sup>	6,5 ± 0,08	1,1 ± 0,05	0,6 ± 0,15
2,3DHP <sup>2</sup> + piruvato <sup>2</sup>	6,9 ± 0,30	3,0 ± 0,07	0,7 ± 0,09
2,3DHP <sup>2</sup> + $\alpha$ -ceto-glutarato <sup>2</sup>	4,8 ± 0,17	7,3 ± 0,13	0,0 ± 0,00

<sup>a</sup> Datos en concentraciones milimol/L.

<sup>1</sup> Concentración 5 mM

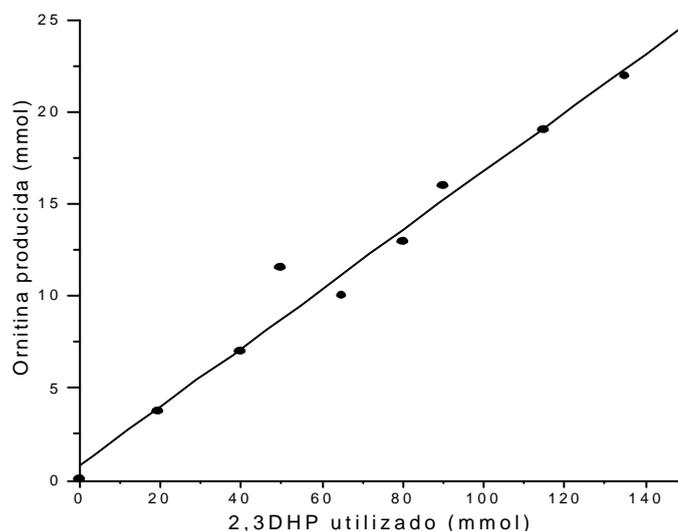
<sup>2</sup> Concentración 10 mM

tamponada con carbonato y en presencia de una fuente de amonio. El análisis por HPLC del sobrenadante de la reacción reveló la existencia de ornitina en los productos finales del metabolismo del 2,3DHP, que luego de un análisis de correlación con referencia al 2,3DHP consumido en el transcurso de la reacción, dio como resultado una correlación positiva ( $r=0,98$ ) entre la ornitina producida y el 2,3DHP consumido (Figura 2), sugiriendo que en la ruta de degradación del anillo de piridinediol la ornitina pudiera ser uno de los productos intermediarios del metabolismo del 2,3DHP.

#### DISCUSIÓN

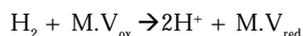
La actividad degradadora del extracto proteico libre de células ocurre en ambientes estrictamente anaeróbicos. Para efectos prácticos de este trabajo se definieron dos sistemas: i) sistema  $N_2/\alpha$ -ceto-ácido en presencia de piruvato o ácido  $\alpha$ -ceto-glutarato bajo una atmósfera de nitrógeno; o ii) en presencia de metil viologen

bajo una atmósfera exclusivamente de hidrógeno. Cabe destacar que la degradación del 2,3DHP en presencia de  $\alpha$ -ceto-ácidos ocurre debido a que estos compuestos están acoplados al metabolismo intermediario de la célula y generan, presumiblemente durante reacciones de oxidación, electrones que son utilizados a su vez para la adición electrofílica del anillo de piridinediol. Desafortunadamente el intermediario electrónico nativo utilizado por la célula aún queda por ser determinado. Cuando la degradación de 2,3DHP estuvo acoplada a la adición de  $\alpha$ -ceto-ácidos, el gas utilizado para lograr la anaerobiosis, condición necesaria para que ocurra la degradación, fue irrelevante. La misma reacción se llevó a efecto bien sea bajo flujo de  $N_2$ ,  $CO_2$  o incluso  $H_2$ . La razón de usar  $N_2$  estriba en un hecho simplemente práctico, es menos costoso en comparación que el  $CO_2$  y mucho más seguro para trabajar en comparación al  $H_2$ . Por otra parte el 2,3DHP también pudo ser degradado utilizando el agente reduc-



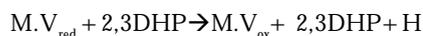
**Figura 2.** Correlación lineal entre la producción de ornitina y la degradación del 2,3DHP por células resuspendidas de *S. jonesii*. Muestras de sobrenadante de células resuspendidas ( $n=3$ ) fueron tomadas a intervalos horarios. La degradación del 2,3DHP fue monitoreada espectrofotométricamente mientras que la ornitina fue analizada por HPLC. Los puntos en el gráfico equivalen a los valores promedios del 2,3DHP consumido y la ornitina producida en el mismo intervalo de tiempo. Los datos fueron ajustados al modelo de regresión lineal ( $r=0,98$ )

tor metil viologen exclusivamente bajo una atmósfera de  $H_2$ . El metil viologen es un agente reductor que puede aceptar electrones posiblemente a partir de enzimas de tipo hidrogenasas, casualmente presentes en el extracto proteico. La hidrogenasa es una enzima bacteriana que cataliza la oxidación reversible del hidrógeno. Esta actividad ha sido reportada en un gran número de procariotas anaerobios y aerobios (Wu y Mandrand, 1993). La función fisiológica de esta enzima es la oxidación del hidrógeno gaseoso acoplada a la transferencia de electrones a compuestos intermediarios con un ahorro considerable de energía. Otra función importante de las hidrogenasas es la producción de protones el cual mantiene el pH y el potencial redox intracelular (Wu y Mandrand, 1993). Las hidrogenasas presentes en el extracto proteico preparado a partir de *S. jonesii* pudieran suministrar los electrones al metil viologen ( $M.V_{ox}$ ) pasando este a su forma reducida ( $M.V_{red}$ ):



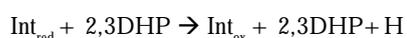
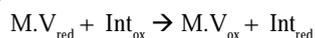
A su vez el  $M.V_{red}$  estaría acoplado al metabolismo del 2,3DHP de una manera aún desconocida, pero que se podría resumir de la forma siguiente:

a) directamente:



En esta reacción el metil viologen serviría como el intermediario electrónico que estaría cediendo los electrones directamente al anillo aromático del 2,3DHP a través de una enzima aún desconocida.

b) Indirectamente:



En este escenario el metil viologen estaría motorizando la actividad degradadora del extracto proteico cediendo su poder reductor a un segundo intermediario electrónico el cual a su vez estaría acoplado a la degradación del 2,3DHP. El citocromo C ha sido reportado como uno de los aceptores o donadores de electrones en sistemas en donde operan las hidrogenasas (Adams 1990). No obstante, el citocromo C no exhibió efecto sobre la degradación del 2,3DHP por sí solo o en el sistema  $H_2$ /metil viologen (Tabla 3). Cabe destacar que existen otros medios químicos de reducción del metil viologen tal como el ditionito de sodio, el cual tiene la propiedad de reducir espontáneamente el metil viologen bajo una atmósfera reductora. En este último caso se prescindiría de la actividad de hidrogenasas presentes en el extracto proteico y por ende el gas utilizado para lograr la anaerobiosis pasaría a ser irrelevante. Por ejemplo, en presencia de ditionito de sodio y metil viologen el extracto proteico exhibió aún actividad degradadora sobre el 2,3DHP incluso cuando la reacción se llevó a cabo bajo  $N_2$  en vez de  $H_2$  (datos no mostrados). No obstante, el 2,3DHP no sufrió degradación en un sistema carente de proteínas, lo que indica que el metabolismo del 2,3DHP en presencia de metil viologen es una reacción catalizada por enzimas especializadas. Reacciones de reducción enzimática de anillos aromáticos por parte del metil o benzil viologen han sido reportadas previamente en *Desulfobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp. (Evans y Fuchs, 1988; Gorny y Shink, 1994).

Los requerimientos de  $\alpha$ -ceto-ácidos como co-sustratos o el uso de transportadores de electrones de bajo potencial redox cuando el hidrógeno es la fase gaseosa de la reacción, indican que existen reacciones de adiciones electrofílicas envueltas en el metabolismo del 2,3DHP. El piruvato

es el producto intermediario clave en el metabolismo fermentativo de varios sustratos, entre los que se cuentan los carbohidratos y algunos aminoácidos (Clark, 1989). La relativa rápida utilización de  $\alpha$ -ceto-ácidos por el extracto y células en cultivo indican que la bacteria posee la maquinaria metabólica para utilizar el piruvato eficientemente, probablemente en reacciones de reoxidación del NADH (Mendz *et al.*, 1994). En cultivos anaerobios los  $\alpha$ -ceto-ácidos son interconvertidos en intermediarios  $C_4$  del ciclo de Krebs, tales como succinato, por la vía de la transformación del piruvato en fosfoenolpiruvato, y la condensación de éste último con  $CO_2$  para formar oxalacetato, reacción ésta catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (Clark, 1989). Bajo condiciones anaeróbicas el ciclo del ácido cítrico es transformado en una forma no cíclica por represión del complejo  $\alpha$ -ceto-glutarato dehidrogenasa y el reemplazo de la succinato dehidrogenasa por fumarato reductasa (Clark, 1989). La bacteria *S. jonesii* es incapaz de fermentar una amplia gama de carbohidratos en el medio de cultivo. En cambio, la histidina y la arginina son usadas por la bacteria como sustratos proveedores de energía (Allison *et al.*, 1992), asomando la posibilidad de que estos aminoácidos sean catabolizados hasta intermediarios di- o tri-carboxílicos e incorporados a las vías metabólicas anteriormente expuestas explicando parcialmente la existencia de vías del metabolismo de  $\alpha$ -ceto-ácidos con la consiguiente producción de intermediarios electrónicos. El CoA está íntimamente involucrado en el metabolismo oxidativo de los  $\alpha$ -ceto-ácidos como un cofactor enzimático, lo que parcialmente explicaría el aumento de la actividad específica de la degradación del 2,3DHP cuando este es incubado en presencia de piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato. Sin

embargo, un papel más directo del CoA sobre el metabolismo del 2,3DHP no puede descartarse completamente. El CoA pudiera estar implicado en pasos posteriores a la adición electrofílica del anillo aromático del 2,3DHP.

El cofactor electrónico fisiológico común que pudiera estar acoplado a la reacción en presencia de  $\alpha$ -ceto-ácidos aún queda por ser determinado. De los cofactores electrónicos estudiados en este trabajo solamente el FAD reveló un aumento estadísticamente significativo en la actividad específica de la reacción en presencia de piruvato (Tabla 3). Sin embargo, en la degradación del ácido nicotínico por *Clostridium* spp. se ha demostrado que la reacción de reducción del anillo de ácido 6-hidroxi-nicotínico, un intermediario del ácido nicotínico, ocurre en presencia de ferredoxina, dando como productos finales de este paso la aparición de un derivado 6-oxo-tetrahidro-nicotínico (Holcenberg y Tsai, 1969). La participación de una ferredoxina en el metabolismo del 2,3DHP aún queda por confirmar. No obstante el aumento de la degradación en presencia de FAD y piruvato, el extracto proteico mostró una marcada actividad de reducción de intermediarios del tipo nicotinamida, especialmente el  $NADP^+$ , quien mostró mayor reciclaje asociado a la presencia de piruvato o  $\alpha$ -ceto-glutarato (Tabla 2). Sin embargo, la adición de NADH o NADPH a la mezcla de reacción enzimática conteniendo solamente 2,3DHP no mostró efecto sobre la actividad degradadora del mismo, indicando que el NADH o NADPH están involucrados en el metabolismo oxidativo de los  $\alpha$ -ceto-ácidos y no directamente en la degradación del 2,3DHP.

La determinación de amonio liberado en el curso de la reacción aunada a la necesidad de añadir sales de amonio en las células resuspendidas para la degrada-

ción total del 2,3DHP sugieren que el átomo de nitrógeno del anillo de 2,3DHP pudiera estar formando parte de la estructura química de al menos algunos de los productos intermediarios del metabolismo del 2,3DHP en el extracto proteico dejando abierta la posibilidad de analizar los productos finales del metabolismo del 2,3DHP empleando técnicas de  $^{15}\text{N}$ -nmr usando el mismo átomo de nitrógeno como trazador interno de los productos intermediarios.

El análisis de los productos finales de la degradación del 2,3DHP por parte de células resuspendidas dió como resultado un incremento en la formación del ácido propiónico asociado con la degradación del 2,3DHP. La formación de ornitina a partir del 2,3DHP en células en suspensión de *S. jonesii* (Figura 2) corroboró los resultados del análisis por TLC (Figura 1) en donde se reporta un compuesto desconocido pero poseedor de aminas primarias como parte de su estructura química. Existe una correlación entre la formación de ornitina y la degradación del 2,3DHP en este ensayo, aunque no existe una clara evidencia de la relación estequiométrica entre estos dos compuestos. Estos resultados indican que la ruta metabólica del 2,3DHP en la célula pu-

diera seguir vías diferentes dependientes de la presencia de otros co-sustratos.

Sobre la base de este estudio es posible resumir la degradación de la mimosina en el rumen por parte de bacterias constituyentes de la flora normal del animal. Se propone la ruta de degradación de la mimosina comenzando con una reacción de hidrólisis del compuesto para dar origen al 3,4DHP y alanina (Figura 3) de acuerdo a reportes previos de la literatura (Luo *et al.*, 2000). Esta reacción se conoce que no se cumple en la bacteria *S. jonesii* puesto que, tanto en el extracto proteico libre de células como en el cultivo, ésta bacteria fue incapaz de degradar la mimosina (Rincón *et al.*, 2000). Seguidamente el 3,4DHP sufre una reacción de isomerización para dar paso al 2,3DHP (Rincón *et al.*, 2000). Posteriormente, la consecuente reacción de reducción del 2,3DHP pudiera dar origen a un derivado saturado el cual sufre a su vez una reacción de fisión y subsecuentemente reacciones de oxidación para dar origen al ácido propiónico como producto final. La formación de ornitina, la cual posee dos grupos amino en su estructura, como producto intermediario de la degradación catalítica del 2,3DHP sugiere la existencia de reacciones de transaminación. La ruptura del anillo de

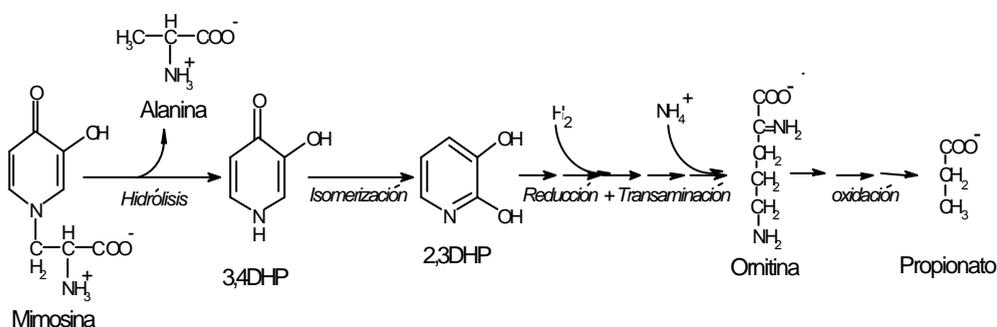


Figura 3. Ruta propuesta de la degradación de mimosina en el rumen.

piridinediol ocurre presumiblemente entre el enlace N-C<sub>2</sub> por lo que la reacción previa de isomerización del 3,4DHP hasta convertirse en 2,3DHP sirve como una reacción de reacomodo intramolecular para facilitar la fisión del anillo de piridenediol entre el átomo de nitrógeno y uno de los carbonos adyacentes (Rincón *et al.*, 2001). En apoyo a esta última idea cabe destacar que el extracto de proteínas solubles de la bacteria también mostró actividad de degradación sobre 2,6-dihidroxipiridina (2,6DHP) pero falló en degradar derivados mono-hidroxilados de la piridina. En este mismo orden de ideas el catecol, un anillo tipo benceno con sustitución adyacente de dos grupos hidroxilos, no sufrió degradación alguna sugiriendo que, además de los sustituyentes hidroxilos, el átomo de nitrógeno juega un papel importante en el mecanismo de fisión del anillo de piridina (datos no mostrados).

La degradación anaeróbica de anillos de piridina sustituidos en otros sistemas bacterianos procede de manera similar a la expuesta en este trabajo. Watson *et al.* (1974) reportaron que extractos celulares de *Agrobacterium* spp. transformaron el 3,4DHP en ácido 3-formimino-pirúvico, piruvato, 2 moléculas de ácido fórmico y amonio. La identificación del ácido 3-formiminopirúvico como intermediario restringe la posibilidad de una ruptura en el anillo de 3,4DHP a los enlaces del carbono 2 y 3 o carbonos 5 y 6. Debido a que la fisión de este anillo entre átomos no sustituidos es rara, la fisión entre los carbonos 2 y 3 del anillo de piridina es el sitio más probable (Kaiser *et al.*, 1996). Por otra parte, en la degradación anaeróbica del ácido nicotínico, el anillo aromático sufre una reacción de hidroxilación en la posición 6, dando lugar al ácido 6-hidroxi-nicotínico, en una reacción que prepara al anillo a una posterior fisión. El ácido 6-hidroxi-nicotínico

es reducido hasta 1,4,5,6-tetrahydro-6-oxonicotináto el cual a su vez es escindido entre el enlace C<sub>6</sub>-N para convertir el compuesto, con la posterior liberación del nitrógeno en forma de amonio, en ácido  $\alpha$ -metilenglutárico (Tsai *et al.*, 1966).

Allison *et al.* (1992) demostraron que *S. jonesii* es capaz de utilizar arginina como fuente de carbono y energía y McSweeney *et al.* (1993) demostraron que la ruta de degradación de arginina en ésta bacteria procede por la vía de la arginina deaminasa, la cual involucra la formación de ornitina durante el proceso de asimilación de la arginina con la correspondiente síntesis de ATP por la vía del carbamil-fosfato. La ornitina es un intermediario común a muchas de las vías que toma la arginina. En éste punto se podría especular que la producción de ornitina a partir de 2,3DHP pudiera acoplarse en la ruta de degradación de arginina en la célula y seguir rutas de oxidación que le permitan obtener energía a partir de este compuesto, lo que explicaría parcialmente a su vez el crecimiento bacteriano a partir de 2,3DHP (Rincón *et al.*, 2000). Abdelal (1979) propone una ruta de degradación de ornitina en microorganismos que degradan arginina en la que la ornitina pudiera convertirse en ácido  $\Delta^1$ -pirrolín-5-carboxiláto el cual es un precursor de la prolina, o bien, la ornitina pudiera convertirse en ácido glutámico- $\gamma$ -semialdehído que es un precursor de glutamato. Esta última conversión requiere la participación del NAD<sup>+</sup> que, luego de ser reducido, podría estar acoplado al metabolismo energético de la bacteria. Esta última reacción, de ocurrir en *S. jonesii*, explicaría la estimulación del metabolismo del 2,3DHP en presencia de  $\alpha$ -ceto-ácidos y de NADP<sup>+</sup>, tal como revelan los resultados obtenidos en éste trabajo.

## CONCLUSIONES

1. El extracto proteico de *S. jonesii* preparado a partir de células en cultivo es activo en la degradación de 2,3DHP en presencia de compuestos comunes del metabolismo intermediario tales como  $\alpha$ -ceto-ácidos en atmósfera anaeróbica, tal como el nitrógeno, o en presencia del agente reductor metil viologen en presencia exclusivamente de hidrógeno.

2. La degradación inicial del 2,3DHP involucra reacciones de reducción del anillo de piridinediol. Los posibles productos finales del metabolismo de los piridinedioles son la ornitina y el ácido propiónico.

3. El intermediario electrónico fisiológico que interviene en la célula aún se desconoce. Sin embargo, FAD estimuló la reacción de degradación del 2,3DHP en presencia de  $\alpha$ -ceto-ácidos. El cofactor enzimático CoA también impulsó el metabolismo del 2,3DHP. No obstante ambos compuestos fallaron en estimular la degradación del 2,3DHP por sí solos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al CONICIT por el apoyo económico prestado en esta investigación. Igualmente un reconocimiento al Laboratory of Microbiology, Animal Disease Center, US-Dept. Agriculture, Ames, Iowa por la ayuda prestada en el desarrollo de este trabajo.

## REFERENCIAS

Abdelal, A. T. 1979. Arginine catabolism by microorganism. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:139-168.

Adams, M. W. 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta.* 1020:115-45.

Al Dehneh, A.; Pierzynowski, S. G.; Smuts, M.; Sahl, T. and Fernández, J. M. 1994. Blood metabolite and regulatory hormone concentrations and response to metabolic challenges during the infusion of mimosine and 2,3-dihydroxypyridine in alpine goats. *J. Anim. Sci.* 72:415-420.

Allison, M.J. 1991. Simplified cultural test for ruminal bacteria that degrade toxic dihydroxypyridine compounds produced from mimosine. *Leucaena Res. Rep.* 12:105-108.

Allison, M. J.; Mayberry, W. R.; McSweeney, C. S. and Stahl, D.A. 1992. *Synergistes jonesii*, gen. nov., spp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:522-529.

Besle, J.M.; Jouany, J.P. and Cornu, A. 1995. Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:33-52.

Butler, C.S. and Mason, J.R. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. En: *Advances in Microbial Physiology* (R. Poole, eds.). *Academic Press.* London, UK, pp. 47-84.

Clark, D. P. 1989. The fermentation pathway of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 63:223-234.

Craig, A. M.; Latham, C.J.; Blythe, L.L.; Schmotzer, W.B. and O'Connor, O.A. 1992. Metabolism of toxic pyrrolyzidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) in ovine ruminal fluid under anaerobic condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2730-2736.

Craig, A.M. 1995. Detoxification of plant and fungal toxins by ruminant microbiota. En: *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth, and reproduction.*

- Proceedings of the 8th symposium on ruminant physiology* (W. V. Engelhardt, W. v.; S. Leonhard-Marek; G. Breves y D. Giesecke, eds.). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 271-288.
- Evans, W.C. and Fuchs, G. 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:289-317.
- Gorny, N. and Schink, G. 1994. Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* spp. strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3396-3400.
- Hammond, A.C. 1995. *Leucaena* toxicosis and its control in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:1487-1492.
- Hegarty, M.P.; Lee, C.P.; Christie, G.S.; Court, R.D. and Haydock, K.P. 1979. The goitrogen 3-hydroxy-4(1H)-pyridone, a ruminal metabolite from *Leucaena leucocephala*: effects in mice and rats. *Aust. J. Biol. Sci.* 32:27-40.
- Holcenberg, J.S. and Tsai, L. 1969. 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.
- Holmes, J.H.; Humphrey, J.D.; Walton, E. A. and O'Shea, J.D. 1981. Cataracts, goitre and infertility in cattle grazed on an exclusive diet of *Leucaena leucocephala*. *Aust. Vet. J.* 57:257-261.
- Kaiser, J.P.; Feng, Y. and Bollag, J.M. 1996. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 60:483-498.
- Kudo, H.; Cheng, K. J.; Majak, W.; Hall, J. W. and Costerton, W. 1984. Degradation of mimosine in rumen fluid from cattle and sheep in Canada. *Can. J. Anim. Sci.* 64:937-942.
- Lam, W.W. and Bugg, T.D.H. 1994. Chemistry of extradiol aromatic ring cleavage: isolation of a stable dienol ring fission intermediate and stereochemistry of its enzymatic hydrolytic cleavage. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 116:1163-1164.
- Li, P.H. 1987. Effect of 3-hydroxy-4-(1H)pyridone on the basal and thyrotropin-releasing hormone-stimulated release of thyroid-stimulating hormone from perfused anterior pituitary fragments. *Life Sci.* 41:1645-1650.
- Lowry, J.B.; Tangendjaja, M. and Tangendjaja, B. 1983. Autolysis of mimosine to 3-hydroxy-4-(1H)pyridone in green tissues of *Leucaena leucocephala*. *J. Sci. Food Agric.* 34:529-533.
- Luo, J.; Litherland, A.J.; Sahl, T.; Puchala, R.; Lachica, M. and Goetsch, A.L. 2000. Effects of mimosine on fiber shedding, follicle activity, and fiber regrowth in Spanish goats. *J. Anim. Sci.* 78:1551-1555.
- Majak, W. 1992. Biotransformation of toxic glycosides by ruminal microorganisms. En: Natural toxins: toxicology, chemistry and safety (R.F. Keder; N. B. Mandava y A. T. Tu, eds.). Alaken Inc. Fort Collins, USA, pp. 86-103.
- Matsumoto, H. and Sherman, G.D. 1951. A rapid colorimetric method for the determination of mimosine. *Arch. Biochem. Biophys.* 33:195-200.
- McSweeney, C.S.; Allison, M.J. and MacKie, R.I. 1993. Amino acid utilization by ruminal bacterium *Synergistes jonesii* strain 78-1. *Arch. Microbiol.* 159:131-135.
- Mendz, G.L.; Hazell, S.L. and Van Gorkonz, L. 1994. Pyruvate metabolism of *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 162:187-192.
- Mostad, A.; Romming, C. y Rosenqvist, E. 1973. The structure of L-mimosine, an L-DOPA analogue. *Acta Chem. Scand.* 27:164-176.
- Prins, R.A. 1981. Rumen microbial metabolism of plant secondary compounds, xenobiotic and drugs. En: Physiological and Pharmacological Aspects of the Reticulo-Rumen (L. A. A. Ooms, eds.)

- Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Holland, pp. 199-225.
- Provenza, F.D. 1996. Acquired aversion as the basis for varied diets of ruminants foraging on rangelands. *J. Anim. Sci.* 74:2010-2020.
- Puchala, R.; Pierzynowski, S.G.; Sahlu, T. and Hart, S. P. 1996. Effects of mimosine administered to a perfused area of skin in Angora goats. *Br. J. Nutr.* 75:69-79.
- Reis, P.J. 1975a. Effects of intravenous infusion of mimosine on wool growth of Merino sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 28:483-493.
- Reis, P. J.; Tunks, D.A. and Chapman, R.E. 1975b. Effects of mimosine, a potential chemical defleecing agent, on wool growth and the skin of sheep. *Aust. J Biol. Sci.* 28:69-84.
- Reis, P. J.; Puchala, R.; Sahlu, T. and Goetsch, A.L. 1999. Effects of mimosine and 2,3-dihydroxypyridine on fiber shedding in Angora goats. *J. Anim. Sci.* 77:1224-1229.
- Rincón, M.T.; Dominguez-Bello, M.G.; Lovera, M. and Romero, R. 2000. Degradación de piridinedioles tóxicos derivados de la mimosina por bacterias ruminales: I. Aspectos microbiológicos. *Rev. Cientif. Fac. Cs. Vet. LUZ* 10:222-232.
- Smith, G.S. 1992. Toxification and detoxification of plant compounds by ruminants: an overview. *J. Range Manag.* 45:25-30.
- Tang, S.Y. and Ling, K.H. 1975. The inhibitory effect of mimosine on collagen synthesis. *Toxicon* 13:339-342.
- Tangendjaja, B. and Wills, R.B. 1983. Analysis of mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 265:143-144.
- Tangendjaja, B.; lowry, J.B. and Wills, R.B. 1985. Degradación de mimosina y 3-hidroxi-4(1H)-piridona (DHP) por cabras de Indonesia. *Prod. Anim. Trop.* 10:41-45.
- Tsai, W.C.; Pastan, I. and Stadtman, E.R. 1966. Nicotinic acid metabolism. II The isolation and characterization of intermediates in the fermentation of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 241:1807-1813.
- Van Soest, P. J. 1987. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2<sup>nd</sup> ed., Cornell University Press. Ithaca, NY. USA.
- Watson, G.K.; Houghton, C. and Cain, R.B. 1974. Microbial metabolism of the pyridine ring: The hydroxylation of 4-hydroxypyridine to 3,4-diol (3,4-dihydroxypyridine) by 4-hydroxypyridine-3-hydroxylase. *Biochem. J.* 140:265-276.
- Wu, L.F. and Mandrand, L.A. 1993. Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signature and phylogeny. *FEMS Microbiol. Rev.* 104:243-270.



