

УДК 591.05

ВИКОРИСТАННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСАЛАТІВ У МОНІТОРИНГОВИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ І. ГРИБИ

К.М. Хлус

Буковинська державна медична академія

В обзорі приведені дані про поширеність щавлевої кислоти та її солей в тканинах грибів. Розглянуто вплив факторів середовища на основні шляхи синтезу та утилізації оксалатів

Щавелева кислота, оксалати, гриби

Випадки захворювання та смерті внаслідок споживання надмірної кількості багатих на оксалат або ураженої пліснявими грибами їжі добре відомі серед тварин і людей [4, 23, 25, 29, 31]. Сезонне споживання великої кількості багатих на щавлеву кислоту та її солі овочів є одним із шкідливих для здоров'я популяції чинників [31]. Зокрема, придатність кальцію, магнію та інших катіонів до всмоктування залежить від наявності в їжі оксалатів, і тому утримання від прийому високооксалатних продуктів набуває суттєвого значення під час перебування в стані кальцієвого дефіциту, наприклад, у похилому віці, при вагітності, нестачі вітаміну D₃, при порушеннях всмоктування [31].

Оксалатні токсикози ведуть до гіпокальціємії [16], літогенезу з наступною уремією [23], електролітного дисбалансу, гальмування ключових ферментативних реакцій з метаболічними розладами [7, 15, 21, 39], розбалансування антиоксидантної системи [7], гастроінтестинальних, кардіоваскулярних і нервових порушень з ушкодженням локомоції [8, 30, 46], запалень і кровотеч [49].

Першим, хто описав кристали оксалату кальцію у дріжджах, був С. Шмідт [44]. В. Зопф [52] показав, що *Saccharomyces hansenii* виробляє щавлеву кислоту замість етанолу з ферментованого розчину вуглеводів, а Балдвін Х. [12] відзначив її синтез дріжджами при зростанні на сахарозі та екстракті з яловичини, а також у пивному виробництві.

В.М. Хамлет і С.Б. Пловрайт [26], Де Барі [20], С. Вехмер [48] і Дж. Зеллнер [51] спостерігали преципітацію оксалату кальцію в тілах багатьох поширених плодових грибів, зокрема *Agaricus* Fr. emend. Karst., *Lactarius* S.F. Gray, *Russula* (Fr.) S.F. Gray, *Boletus* Fr., *Polyporus* Mich. ex. Fr., *Peziza* St. Am. Wehmer [48] показав, що *Aspergillus niger* Tiegh., *Penicillium glaucum* Link і деякі інші гриби нагромаджують оксалат у великій кількості при рості на різноманітних субстратах. Великі кількості оксалату продукують *Sclerotium rolfisii* Sacc. і *S. delphinii* [28, 40], *Metarhizium anisopliae* [32]. В. Дж. Вілсон з співавт. [50] знайшли високий вміст оксалатів у 23 видів грибів, в тому числі *Penicillium oxalicum* Curriect Thom., *Aspergillus niger* Tiegh., *A. lucknowensis* Rai, Tewari et Agarwal, *A. flavus* Link, *Mucor mucedo* Fres., *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizopus nigricans*, а П. Фриис з співавт. [23] встановили, що саме великий вміст оксалатів обумовлює нефротоксичні властивості *Penicillium viridicatum* Westl.

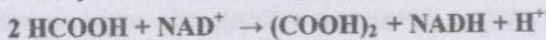
Вміст оксалату кальцію може складати до 45 % сухої маси міцелію, як, наприклад, у *Aspergillus* Mich. [41, 43] і лишайника *Lecanora* (Ach.) Th. Fr. [19]. Максимальний синтез оксалату грибами спостерігається при високій концентрації вуглеводів внаслідок неможливості їх використання на потреби росту [18], зокрема при дефіциті тіаміну. Цьому ж сприяють: 1) обмежений запас неорганічних речовин [17, 41]; 2) відносно високий початковий рівень рН, що пригнічує синтез ферменту оксалатдекарбоксилази, який розкладає щавлеву кислоту до формиату та оксиду вуглецю (IV) [45]; 3) адекватна аерація.

Хоча доведено, що вирішальну роль у синтезі оксалату з глюкози у грибів відіграє оцтова кислота - вони перетворюють на оксалат до 93-100 % ацетату [5], - значна кількість щавлевої кислоти утворюється також при рості на інших органічних сполуках. Наприклад, синтез оксалату з C₄-дикарбонових кислот здійснюється грибами, які руйнують деревину, а створене агресивне середовище допомагає міцелію розповсюджуватися в організмі хазяїна. Це показано, зокрема, для *Merulius niveus*, *M. tremellosus* Fr., *M. confluens* і *Fomes annosus* [38], для *A. terreus* Thom. - одного з найбільш активних целюлозоруйнуючих грибів [1] та для низки інших грибів [5, 6]. У препараті „Бефунгін” та густих екстрактах, вироблених з

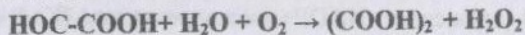
чаги (гриба *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil., що паразитує на березах), міститься 3,98-4,50 % щавлевої кислоти (на суху масу) [9]. *A. niger* Tiegh., *A. oryzae* Cohn. і *A. flavus* Link, які уражають полімерні матеріали (пластмаси, що містять органічні наповнювачі), разом з іншими органічними кислотами, продукують велику кількість щавлевої кислоти [1]. *A. flavus* Link, завдяки синтезованій щавлевій кислоті викликає деструкцію парафінів та паперу, чому вважається небезпечним шкідником у бібліотеках та фондах [1].

Як показано численними експериментами з культурами *Aspergillus niger* Tiegh., оксалат синтезується при використанні як єдиного джерела вуглецю: 1) мурашиної кислоти [13]; 2) C₂- і C₄-кислот - гліколевої, гліоксилевої, щавлевооцтової, бурштинової, фумарової, винної [6, 10, 11, 14, 22, 27, 48]; 3) C₆-кислот - лимонної, яблучної [34-36]; 4) амінокислот [48]; 5) гліцеролу [48].

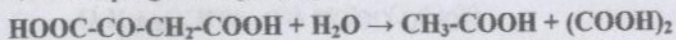
Подібне різноманіття хімічних джерел щавлевої кислоти вказує на відсутність єдиного шляху її синтезу. Роль основних попередників оксалату можуть виконувати три органічні кислоти: мурашина, гліоксилевова та щавлевооцтова [5]. Форміатдегідрогеназа (форміат: NAD⁺ оксидоредуктаза, КФ 1.2.1.2) каталізує реакцію окислення двох молекул мурашиної кислоти з утворенням молекули щавлевої кислоти [5] й у *Coriolus versicolor* виступає основним генератором NADH [33]:



Інший спосіб утворення щавлевої кислоти реалізується за участю ферменту гліоксилатоксидази (гліоксилат: кисень оксидоредуктаза, КФ 1.2.3.5), який каталізує реакцію окислення гліоксилату до оксалату [24]:

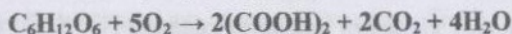


Гідроліз оксалоацетату під дією ферменту оксалоацетази (оксалоацетат ацетилгідролаза, КФ 3.7.1.1) веде до утворення оцтової та щавлевої кислот [24], і саме цей фермент відповідальний за продукцію оксалату міцелієм *Aspergillus niger* [42]:

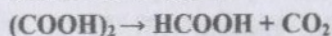


Нещодавно у руйнуючого деревину базидіоміцета *Fomitopsis (Tyromyces) palustris* знайдено флавопротеїновий фермент гліоксилатдегідрогеназу [47], який каталізує дегідровання гліоксилату до

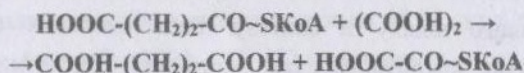
оксалату в присутності цитохрому *c* і, об'єднуючи між собою два провідних метаболічних шляхи – цикл трикарбонових кислот і гліоксилатний цикл [33], бере участь у реалізації енергетичних властивостей глюкози згідно сумарного рівняння:



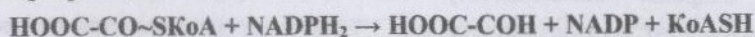
Щавлева кислота широко використовується грибами як джерело енергії [2, 10, 11]. По-перше, фермент оксалатдекарбоксилаза (оксалат карбоксилаза, КФ 4.1.1.2) каталізує реакцію перетворення оксалату на мурашину кислоту та оксид вуглецю (IV) [33]:



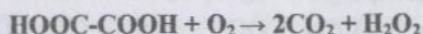
По-друге, оксалат здатний перетворюватися на власні КоА-ефіри в реакціях з форміл-КоА, апетил-КоА та сукциніл-КоА під впливом відповідних КоА-трансфераз [33], наприклад, оксалат КоА-трансфераза (сукциніл-КоА: оксалат КоА-трансфераза, КФ 2.8.3.2) каталізує реакцію:



Синтезований оксаліл-КоА в подальшому може декарбоксилюватися під дією тіамініпрофосфатзалежної оксаліл КоА-декарбоксилази (оксаліл-КоА карбокси-ліаза, КФ 4.1.1.8) з утворенням оксиду вуглецю (IV) та форміл-КоА; останній перетворюється на форміат або гідролітичним шляхом (з утворенням вільного КоА), або шляхом переносу КоА на наступну молекулу оксалату (із синтезом нової молекули оксаліл-КоА). Крім того, оксаліл-КоА може використовуватися для синтезу гліцерату після відновлення до гліоксилату за участю гліоксилатдегідрогенази (ацилюючої) [гліоксилат: NADP+ оксидоредуктаза (КоА-оксалююча), КФ 1.2.1.17] в реакції:



По-третє, оксалат легко окиснюється молекулярним киснем під дією оксалатоксидази (оксалат: кисень оксидоредуктаза, КФ 1.2.3.4):



Таким чином, численні експериментальні дані вказують на наявність у грибів основних ферментативних систем, відповідальних як за синтез метаболічних попередників оксалату, так і за його утилізацію. При цьому з

усіх органічних кислот, що містяться в живих організмах (зокрема, в рослинах), щавлева кислота в нормі виявляється найменш хімічно активною, про що свідчать експерименти з використанням її радіоактивних препаратів, а також її накопичення у вигляді кальцієвої солі [6]. Під впливом деяких несприятливих факторів навколишнього середовища метаболізм щавлевої кислоти значною мірою перебудовується, що призводить як до змін її абсолютного вмісту в організмі, так і до змін її співвідношення з іншими органічними кислотами [3]. Це може надати можливість застосовувати параметри оксалатного метаболізму в живих організмах як біоіндикаторні показники стану довкілля, і розробка системи використання оксалату як складової частини комплексного екологічного моніторингу місцевості в зв'язку з цим набуває перспективного характеру.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Білай В.И., Коваль Г.З. *Аспергиллы: Определитель*. - Киев: Наукова думка, 1988. - 204 с.
2. Быковская С.В., Троценко Ю.А. *Метаболізм метилотрофных дрожжей Candida methylca* // *Микробиология*. - 1980. - 49, № 5. - С.695-701.
3. Голубцова В.Ч., Щербакова Е.Л., Рунковская Л.Л., Ермакова В.Н. *Изменение соотношения лимонной и щавелевой кислот у Aspergillus niger под влиянием мутагенных факторов* // *Микробиология*. - 1979. - 48, № 6. - С. 1060-1065.
4. Даниленко В.С., Родионов Н.В. *Острые отравления растениями*. - Киев: Здоров'я, 1981. - 104 с.
5. Кретович В.Л. *Биохимия растений*. - М.: Высшая школа, 1980. - 445 с.
6. Солдатенков С.В. *Биохимия органических кислот растений*. - Л.: Издательство ЛГУ, 1971. - 142 с.
7. Хлус К.Н. *Биохимические механизмы токсического действия оксалатов* // *Укр. биохим. журн.* - 1998. - 70, № 3. - С. 92-99.
8. Хлус К.М., Бойко Л.І., Толстюк С.М., Хлус Л.М. *Кардіотоксичність щавлевої кислоти* // *Практична медицина*. - 1998, № 5-6. - С. 117-119.

9. Шиврина А.Н. Химическая характеристика действующих начал чаги // *Продукты биосинтеза высших грибов и их использование*. - М.- Л.: Наука, 1966. - С. 49-57.
10. Allsopp A. The formation of oxalic acid by *Aspergillus niger* // *New Phytologia*. - 1937. - 36. - P. 327-356.
11. Allsopp A. Further studies on the acid metabolism of *Aspergillus niger*. The formation and utilization of oxalic acid // *J. Exp. Botany*. - 1950. - 1. - P. 71-87.
12. Baldwin H. An experimental study of oxaluria with special eference to its fermentative origin // *J. Exp. Medicine*. - 1900. - 5. - P. 27-46.
13. Bernhauer K., Slanina F. *Chemismus Enzymchemie der Säurebildungsund Säurebildungsvorgange bei Schwimmelpilzen*. XI. Die Oxalsäurebildung aus Ameisensäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure und anderen Säure durch *Aspergillus niger* // *Biochemische Zeitschrift*. - 1934. - 274. - S. 97-111.
14. Bromstein R.A., Johnson M.J. The mechanism of formation of citrate and oxalate by *Aspergillus niger* // *J. Biol. Chem.* - 1952. - 198. - P. 143-153.
15. Buc H., Demaugre F., Leroux J.P. The kinetic effects of oxalate on liver and erythrocyte pyruvate kinases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1978. - 85, № 2. - P. 774-779.
16. Buck W.B., Preston K.S., Abel M., Marshall V.L. Perirenal edema in swine: a disease caused by common weeds // *J. Amer. Vet. Med. Ass.* - 1966. - 148, № 12. - P. 1525-1531.
17. Chesters C.G.C., Rolinson G.N. The role of zinc in plant metabolism // *Biological Reviews of the Cambridge Phitosophical Society*. - 1951. - 26. - P. 239-252.
18. Cochrane V.W. *Physiology of fungi*. - N.Y.- London: Wiley and Sons. - 1958. - 144 p.
19. Crombie W.M.L. Metabolism of "extracyclic" organic acids // *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 12, № 2. - Berlin, 1960. - P. 897 - 902.
20. De Bary A. Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten // *Botanische Zeitung*. - 1886. - 44. - S. 393 - 404.

21. Emerson P.M., Wilkinson J.H., Withycombe W.A. Effect of oxalate on the activity of lactate dehydrogenase isoenzymes // *Nature*. - 1964. - 202, № 4939. - P. 1337-1338.
22. Franke W., De Boer W. Oxydationsfermente aus Schimmelpilzen und Hefen. II. Zum enzymatischen Abbau der Glycol- und Glyoxylsäure durch *Aspergillus niger* // *Zeitschrift für Physiol. Chemie*. - 1959. - 314. - S. 70-89.
23. Friis P., Hasselager E., Krogh P. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs // *Acta path. microbiol. scand.* - 1969. - 77. - P. 559-560.
24. Gadd G.M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes // *Adv. Microb. Physiol.* - 1999. - № 41. - P. 47-92.
25. Ghio A.J., Peterseim D.S., Roggli V.L., Piantadosi C.A. Pulmonary oxalate deposition associated with *Aspergillus niger* infection. An oxidant hypothesis of toxicity // *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jun. - 145(6). - P. 1499-502.
26. Hamlet W.M., Plowright C.B. On the occurrence of oxalic acid in fungi // *Chemical News*. - 1877. - 36. - P. 93-94.
27. Hayaishi O., Shimazono H., Katagiri M., Saito Y. Enzymatic formation of oxalate and acetate from oxaloacetate / *J. Am. Chem. Soc.* - 1956. - 78. - P. 5126-5127.
28. Higgins B.B. Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii* Sacc. // *Phytopathology*. - 1927. - 17. - P. 417-448.
29. James L.F. Serum electrolyte, acid-base balance, and enzyme changes in acute *Halogeton glomeratus* poisoning in sheep. // *Can. J. Comp. Med.* - 1968. - 32. - P. 539-543.
30. James L.F. Locomotor disturbance of cattle grazing *Halogeton glomeratus* // *J. Amer. Vet. Med. Ass.* - 1970. - 156, № 9. - P. 1310-1312.
31. James L.F. Oxalate toxicosis. // *Clin. Toxicol.* - 1972. - 5, 2. - P. 231-243.
32. Leger R.J., Nelson J.O., Screen S.E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity // *Microbiology*. - 1999. - 145, № 10. - P. 2691-2699.

33. Munir E., Yoon J.J., Tokimatsu T., Hattori T., Shimada M. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – 98, № 20. – P. 1126-1130.
34. Müller H.M. Untersuchungen zum Säurestoffwechsel von *Aspergillus niger*. V. Zur Beteiligung des Glucon- und Citronensaureabbaus an der Oxalsäureanheftung // *Archiv für Microbiologie.* - 1966. - 55. - S. 81-90.
35. Müller H.M. Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. I. Biosynthesis of oxalate from its ultimate precursor // *Archives of Microbiologie.* - 1975. - 103. - P.185-189.
36. Müller H.M., Frosch S. Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. II. Involvement of the tricarboxylic acid cycle // *Archive of Morphologie.* - 1975. - 104. - P.159-162.
37. Nakagawa Y., Shimazu K., Ebihara M., Nakagawa K. *Aspergillus niger* pneumonia with fatal pulmonary oxalosis // *J. Infect. Chemother.* - 1999. – 5, № 2. – P. 97-100.
38. Nord F.F., Vitucci J.C. On the mechanism of enzymic action. XXIX. The acetate metabolism of certain wood-destroying molds and the mechanism of wood decay // *Arch. Biochem.* - 1947. - 14. - P. 229-241.
39. Northrop D.B., Wood H.Y. Transcarboxylase VII. Exchange reactions and kinetics of oxalate inhibition // *J. Biol. Chem.* - 1969. - 244, № 21. - P. 5820-5827.
40. Perlman D. On the nutrition of *Sclerotium delphinii* // *Am. J. Botany.* - 1948. - 35. - P. 360 - 363.
41. Rippel A., Behr G. Über die Bedeutung des Kalium im Stoffwechsel von *Aspergillus niger* // *Archive für Morphologie.* - 1934. - 5. - S. 561-577.
42. Ruijter G.J., van de Vondervoort P.J., Visser J. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese // *Microbiology.* – 1999. – 145, № 9. – P. 2569-2576.
43. Sayer J.A., Kierans M., Gadd G.M. Solubilisation of some naturally occurring metal-bearing minerals, limescale and lead phosphate by *Aspergillus niger* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – 154, № 1. – P. 29-35.

44. Schmidt C. Ueber das Vorkommen des oxalsauren Kalks in den einfachsten Zellenpflanzen und dem Secret der Schleimhaute // *Annales der Chemie und Pharmacie (Heidelberg)*. - 1847. - 61. - S. 288-306.
45. Shimazono H. Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood-destroying fungi // *J. Biochem.* - 42. - 1955. - 321-340.
46. Singh P.P., Kothari L.K., Sharma H.S. Cardiovascular effects and toxicity of oxalic acid and oxalates // *Asian Med. J.* - 1973. - 16, № 5. - P. 287-293.
47. Tokimatsu T., Nagai Y., Hattori T., Shimada M. // Purification and characteristics of a novel cytochrome c dependent glyoxylate dehydrogenase from a wood-destroying fungus *Tyromyces palustris* // *FEBS Lett.* - 1998. - 437, № 1-2. - P. 117-121.
48. Wehmer C. Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. // *Botanische Zeitung*. - 1891. - 49. - S. 233-638.
49. Williams M.C. Effects of sodium and potassium salts on growth and oxalate content of halogeton // *Plant Physiol.* - 1960. - 35. - P. 500-505.
50. Wilson B.J., Wilson C.H. Oxalate formation in moldy fud stuffs as a possible factor in livestock toxic disease // *Am. J. Vet. Res.* - 1961. - 22, № 91. - P. 961-969.
51. Zellner J. *Chemie der höheren*. - Leipzig: Verlag WilhelmEngelmann, 1907. - 353 S.
52. Zopf W. Oxalsäuregahrung (an Stelle von Alkoholgahrung) bei einem typischen (endosporen) Saccharomyceten (*S. Hansenii* sp.) // *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. - 1889. - 7. - S. 94-97

NATURAL SOURCES OF OXALIC ACID (REVIEW). I. FUNGI

K.M. Khlus

In the review the data on prevalence oxalic acid and its salts in mushrooms tissues of are resulted. The basic ways of synthesis and utilization of oxalates are considered.