

Wpłynęło 06.10.2014 r.
Zrecenzowano 25.11.2014 r.
Zaakceptowano 10.12.2014 r.
A – koncepcja
B – zestawienie danych
C – analizy statystyczne
D – interpretacja wyników
E – przygotowanie maszynopisu
F – przegląd literatury

AKTYWNOŚĆ METABOLICZNA GRZYBNI TRUFLI LETNIEJ

Tuber aestivum/Tuber uncinatum Vittad.

Urszula JANKIEWICZ¹⁾ ABEF, Stefan RUSSEL²⁾ AF,
Ewa BAGIŃSKA³⁾ BF, Dorota HILSZCZAŃSKA⁴⁾ AD

¹⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Katedra Biochemii

²⁾ Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, Zakład Biologii Środowiska i Higienizacji Wsi

³⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów

⁴⁾ Instytut Badawczy Leśnictwa w Sękocinie

Streszczenie

Celem prezentowanych badań było oznaczenie aktywności enzymów wydzielanych do podłoża przez dwie formy trufli letniej: *Tuber aestivum* i *Tuber uncinatum* Vittad. W pracy wykazano, że *T. aestivum* i *T. uncinatum* uwalniają do podłoża hodowlanego białka enzymatyczne o aktywności: lakazy, proteazy, lipazy oraz celulazy i ksylanazy. Analiza aktywności enzymatycznej w płynnych hodowlach obu form trufli letniej wykazała znaczne różnice biochemiczne pomiędzy nimi. Obserwowano zdecydowanie większą aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów u *T. aestivum*, szczególnie lakazową i peptydazową. Wyniki badań wskazują na różną swoistość substratową lipaz wydzielanych przez te trufle: *T. uncinatum* syntetyzuje lipazy wykazujące aktywność tylko do octanu p-nitrofenolu, natomiast *T. aestivum* – także do palmitynianu p-nitrofenolu. W hodowlach obu form trufli wykryto niewielką aktywność celulolityczną i ksylanolityczną. Ksylanazy i celulazy oraz lakazy wydzielane przez grzybnię obu form tych trufli mogą brać udział w procesie zawiązywania symbiozy mykoryzowej.

Słowa kluczowe: celulaza, ksylanaza, lakaza, lipaza, proteaza, *Tuber aestivum/uncinatum*

Do cytowania For citation: Jankiewicz U., Russel S., Bagińska E., Hilszczańska D. 2015. Aktywność metaboliczna grzybni trufli letniej *Tuber aestivum/Tuber uncinatum* Vittad. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 15. Z. 1 (49) s. 59–67.

WSTĘP

Trufle są zaliczane do grupy makrogrzybów, zwanych też wielkowocnikowymi. Ich owocniki są zbudowane ze ściśle przylegających do siebie i zróżnicowanych anatomicznie strzępek grzybni, które tworzą kształt bulwy. Rodzaj trufli (*Tuber* spp.) obejmuje ok. 70 gatunków, z czego 32 występują w Europie [STREIBLOVÁ i in. 2010]. Grzyby te są rzadko spotykane. Wytwarzają podziemne owocniki jadalne cenione przez ludzi i zwierzęta ze względu na niezwykły smak i aromat. Mikoryza umożliwia wzajemną wymianę substancji pokarmowych, która gwarantuje lepszy wzrost i rozwój obu komponentom [CSORBAINÉ i in. 2009; HILSZCZAŃSKA 2009]. Gatunek *Tuber aestivum* Vittad., nazywany truflą letnią, jest najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem w Europie, dlatego też jest spotykany pod wieloma nazwami regionalnymi. Trufle tworzą symbiozę ektomykoryzową z wieloma gatunkami drzew i krzewów, jak np. dąb szypułkowy (*Quercus robur* L.), buk zwyczajny (*Fagus sylvatica* L.), leszczyna pospolita (*Corylus avellana* L.), lipa drobnolistna (*Tilia cordata* Mill.) oraz grab pospolity (*Carpinus betulus* L.) i jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior* L.) [ROSA-GRUSZECKA i in. 2014; STREIBLOVÁ i in. 2010]. Z powodu skomplikowanego i mało poznanego cyklu rozwojowego hodowla trufli jest bardzo trudna. Zmniejszenie podaży trufli powoduje znaczne zwiększenie popytu na te grzyby, dlatego ceny niektórych ich gatunków, np. *Tuber magnatum*, są bardzo wysokie [HALL i in. 2003]. Do głównych czynników determinujących plon trufli naukowcy zaliczają: siedlisko, temperaturę, opady, warunki glebowe, mykoryzę oraz zmienność wewnątrzgatunkową. W najnowszych hipotezach o owocowaniu trufli zakłada się, że współżyją one z innymi mikroorganizmami glebowymi, a nie tylko z drzewami [CSORBAINÉ i in. 2009]. Istnieje wiele nieścisłości związanych z fizjologią tych grzybów, a procesy biochemiczne związane z ich rozwojem poznano w bardzo niewielkim stopniu. Dlatego celem niniejszej pracy był pomiar zewnątrzkomórkowej aktywności enzymatycznej dwóch form trufli letniej *T. aestivum* i *T. uncinatum* Vittad.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Material biologiczny

Grzybnia hodowlana dwóch form trufli *Tuber aestivum* oraz *T. uncinatum* Vittad., rosnąca na pożywce MMN, pochodziła z kolekcji Zakładu Ekologii Lasu, Instytutu Badań Leśnictwa w Sękocinie Starym. Podczas badań grzyby przechowywano na podłożu stałym Martina w temperaturze 4°C.

Warunki hodowli trufli

Szczepy *T. aestivum* i *T. uncinatum* Vittad. hodowano na podłożu o następującym składzie (w przeliczeniu na dm³ podłoża): glukoza – 10 g, maltoza – 5 g, KH₂PO₄ – 0,5 g, MgSO₄ – 0,5g oraz tiamina HCl – 0,0005 g i biotyna – 0,005 g.

Hodowle prowadzono przez 25 dni w temperaturze 28°C, próby pobierano sterylnie do oznaczeń, co 5 dni.

Otrzymywanie preparatu enzymatycznego

Źródłem preparatów grzybowych, w których oznaczano aktywność enzymatyczną były tzw. płyny pohodowlane, otrzymane po oddzieleniu biomasy grzybni od reszty pożywki w odpowiednio prowadzonych hodowlach grzybów, dodatkowo filtrowane przez sączi z bibuły i w razie konieczności wirowane (10 000 obr.·min⁻¹ przez 10 min), w celu osiągnięcia klarowności roztworu do oznaczeń enzymatycznych.

Metody oznaczania aktywności enzymów

Aktywność lakazy oznaczano z użyciem ABTS – kwasu 2,2'-azynobis (3-etylenobenzotiazolinowego) (Sigma) jako substratu, stosując zmodyfikowaną metodę FERNANDESA i in. [2005]. Absorbancję prób zmierzono przy $\lambda = 420$ nm. Aktywność lakazy (U) wyrażono w mikromolach produktu powstałego w wyniku działania lakazy na substrat w temperaturze 25°C i w pH 5,2 w ciągu 1 min reakcji.

Aktywność proteazy oznaczono z użyciem azokazeiny (Sigma) jako substratu. Mieszanina reakcyjna składała się z 300 μ l enzymu, do którego dodawano 150 μ l 1% azokazeiny w 0,1 M Tris-HCl o pH 6,8. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 30 min w temperaturze 40°C. Reakcję przerywano, dodając 600 μ l 10% kwasu trójchlorooctowego. Mieszaninę odwirowywano i mierzono absorbancję przy $\lambda = 420$ nm, względem próby kontrolnej [JANKIEWICZ i in. 2012]. Aktywność (U) wyrażono w wartości absorbancji przeliczonej na 1 min reakcji.

Aktywność lipazy oznaczono zmodyfikowaną metodą WILLERDINGA i in. [2011] z użyciem octanu p-nitrofenolu (Sigma) i palmitynianu p-nitrofenolu (Sigma) jako substratów. Aktywność lipazy (U) wyrażono w mikromolach p-nitrofenolu, otrzymanego w wyniku reakcji w 0,1 M buforze Tris-HCl o pH 6,8 w temperaturze 37°C, pH = 7,8. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 405$ nm wobec próby kontrolnej.

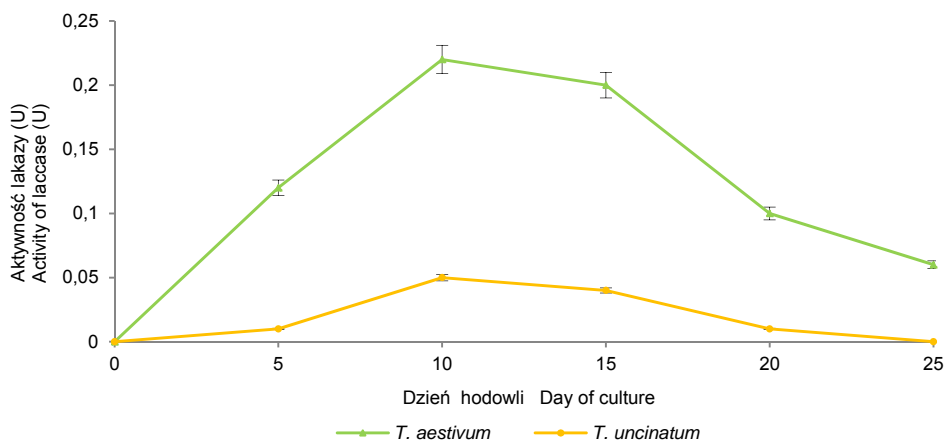
Aktywność ksylanazy oznaczono zmodyfikowaną metodą BAILEYA [1992] z użyciem jako substratu 1% xylanu (Sigma) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0 i wyrażono ilością powstałych w reakcji cukrów redukujących. Zawartość cukrów redukujących oznaczono z zastosowaniem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) metodą MILLERA [1959]. Absorbancję zmierzono przy $\lambda = 540$ nm, wobec próby kontrolnej. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto liczbę mikromoli cukrów redukujących, uwolnionych w ciągu 1 minuty reakcji.

Aktywność celulazy oznaczono z użyciem 1% roztworu karboksymetylocelulozy (Sigma) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0 i wyrażono w mikromolach cukrów redukujących oznaczanych w obecności DNS metodą MILLERA [1959]. Absorbancję zmierzono przy $\lambda = 540$ nm. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto liczbę mikromoli cukrów redukujących uwolnionych w ciągu 1 min reakcji.

Wszystkie wyniki przedstawione w pracy są średnią z co najmniej trzech powtórzeń doświadczenia. Błąd względny nie przekraczał 5%.

WYNIKI BADAŃ

Aktywność lakazy wykryto zarówno w hodowli *T. aestivum*, jak i *T. uncinatum*, jednak jej poziom był różny. W hodowlach *T. aestivum* aktywność ta była kilkakrotnie większa niż w hodowlach *T. uncinatum* (rys. 1).



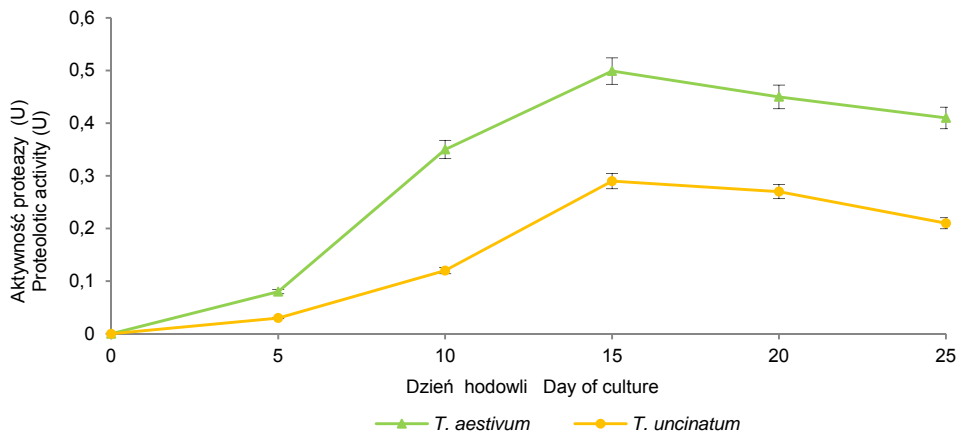
Rys. 1. Zmiany aktywności lakazy w hodowlach *T. aestivum* oraz *T. uncinatum*; źródło: wyniki własne

Fig. 1. Changes in the activity of laccase in cultures of *T. aestivum* and *T. uncinatum*; source: own study

W przypadku obu form trufli największą aktywność lakazy, wynoszącą $0,22 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ dla *T. aestivum* i $0,05 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ dla *T. uncinatum* zaobserwowano w 10. dniu hodowli. Duża aktywność lakazy utrzymywała się do 15. dnia hodowli, natomiast później, w 20. i 25. dniu, aktywność ta znacznie malała.

W hodowlach obu form grzybów zaobserwowano także aktywność proteolityczną. Poziom aktywności proteaz był niemal dwukrotnie wyższy w hodowli *T. aestivum* niż w hodowli *T. uncinatum*. Aktywność proteolityczna obu badanych form trufli stopniowo wzrastała w kolejnych dniach hodowli. W 5. dniu hodowli wykrywano jedynie niewielką aktywność, w 10. dniu hodowli poziom ten był już trzykrotnie wyższy, a najwyższy notowano w 15. dniu hodowli (rys. 2). Niewielkie zmniejszenie aktywności obserwowano w 20. dniu, natomiast w 25. dniu aktywność proteolityczna wynosiła jedynie ok. 40% jej największej wartości.

Badane szczepy grzybów produkowały także zewnątrzkomórkowe lipazy, zarówno gdy jako substrat zastosowano p-nitrofenol palmitynianu, jak i p-nitrofenol



Rys. 2. Zmiany aktywności proteolitycznej w hodowlach *T. aestivum* oraz *T. uncinatum*; źródło: wyniki własne

Fig. 2. Changes in proteolytic activity in cultures of *T. aestivum* and *T. uncinatum*; source: own study

octanu. Aktywność lipolityczną wykrywano jedynie w 15- i 20-dniowych hodowlach trufli (tab. 1). Aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych szczepu *T. aestivum* była większa w obecności palmitynianu p-nitrofenolu niż octanu p-nitrofenolu. Lipaza z hodowli *T. uncinatum* wykazała aktywność jedynie w obecności octanu p-nitrofenolu.

Tabela 1. Aktywność lipolityczna w 15. i 20. dniu hodowli trufli

Table 1. The lipolytic activity on 15th and 20th day of truffle culture

Forma trufli Form of truffle	Aktywność (U) w obecności palmitynianu p-nitrofenolu Activity (U) in the presence of p-nitrophenyl palmitate		Aktywność (U) w obecności octanu p-nitrofenolu Activity (U) in the presence of p-nitrophenyl acetate	
	15. dzień hodowli 15 th days of culture	20. dzień hodowli 20 th days of culture	15. dzień hodowli 15 th days of culture	20. dzień hodowli 20 th days of culture
<i>T. aestivum</i>	0,28	0,26	0,14	0,12
<i>T. uncinatum</i>	nie wykryto not detected	nie wykryto not detected	0,21	0,20

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

Śladową aktywność ksyłanazy i celulazy odnotowano tylko w 10. i 15. dniu hodowli (tab. 2).

Aktywność celulaz w hodowli trufli *T. aestivum* była większa w 15. dniu hodowli, natomiast ksyłanaz – w 10. dniu. W hodowli *T. uncinatum* wykryto niewielką aktywność ksyłanazy i celulazy jedynie w 15. dniu ich hodowli.

Tabela 2. Aktywność celulozyczna i ksylanolityczna trufli w 15. i 20. dniu hodowli**Table 2.** Cellulolytic and xylanolytic activity on 15th and 20th day of truffle culture

Forma trufli Form of truffle	Aktywność (U) celulaz Cellulase activity (U)		Aktywność (U) ksylanaz Xylanase activity (U)	
	10. dzień hodowli 10 th days of culture	15. dzień hodowli 15 th days of culture	10. dzień hodowli 10 th days of culture	15. dzień hodowli 15 th days of culture
<i>T. aestivum</i>	0,12	0,14	0,14	0,11
<i>T. uncinatum</i>	nie wykryto not detected	0,09	nie wykryto not detected	0,10

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

DYSKUSJA

W warunkach doświadczenia dwie formy trufli letniej – *T. aestivum* i *T. uncinatum* – wytwarzały zewnątrzkomórkowe enzymy o aktywności: lakazy, lipazy, ksylanazy, celulazy i proteazy. Pomędzy tymi dwiema formami wystąpiły duże różnice w aktywności wydzielanych enzymów – forma *T. aestivum* była bardziej aktywna biochemicznie. Ciekawa jest zaobserwowana w badaniach zdolność uwalniania enzymów o aktywności lakazowej przez obydwie badane formy. Lakazy – enzymy z klasy oksydoreduktaz – są bardzo rozpowszechnione w świecie roślin i grzybów, katalizują utlenianie szerokiego spektrum związków organicznych i nieorganicznych [ARIAS i in. 2003; SUZUKI i in. 2003]. Dotychczas nie opisano szczegółowo tych enzymów u trufli, ale potwierdzono obecność sekwencji kodującej to białko enzymatyczne w genomie *Tuber magnatum* [ZAMPIERI i in. 2014]. Lakazy grzybowe, obok peroksydaz, należą do enzymów ligninolitycznych, biorących udział w naturalnych warunkach środowiskowych w rozkładzie ligninocelulozy, będącej trudno biodegradowalnym związkiem chemicznym [LI i in. 2008; THURSTON 1994]. W przypadku trufli podkreśla się także udział tych enzymów w oksydacji monofenoli i fenoli [ZAMPIERI i in. 2014]. Aktywność lakazy w stosunku do ABTS jako substratu obserwowano u innych grzybów, w tym *Ascomycota* sp. i *Cladosporium* sp. Prezentowane przez autorów wyniki badań przedstawiają podobną jak w naszych badaniach tendencję spadku aktywności po dłuższym czasie hodowli grzybów [LI i in. 2014].

Proteazy (peptydazy) są enzymami niezbędnymi w każdej żywej komórce, ponieważ przyczyniają się do utrzymania równowagi pomiędzy degradacją a syntezą białek [NYGREN i in. 2007]. Główną rolą zewnątrzkomórkowych proteaz wydzielanych przez szczepy *T. aestivum* i *T. uncinatum* może być udział w odżywianiu i wzroście grzybni. Wydzielanie proteaz jest dość powszechną cechą u grzybów. Hydrolazy te dobrze scharakteryzowano np. u *Pleurotus ostreatus* [PALMIERI i in. 2001] lub u różnych szczepów *Aspergillus* [MACCHIONE i in. 2008].

Obydwie formy badanych trufli mają zdolność do uwalniania lipaz. Lipazy charakteryzują się zdolnością katalizy międzyfazowej, która polega na przeprowadzeniu reakcji w układach typu lipid-woda. Stanowią one bardzo różnorodną grupę enzymów katalizujących reakcje hydrolizy estrów i transestryfikacji gliceroli [MROZIK i in. 2008; ŪLKER i in. 2011]. Grzybowe lipazy, ze względu na swoją specyfikę i stabilność w zróżnicowanych warunkach chemicznych i fizycznych, odgrywają dużą rolę w przemyśle oraz biokonwersji cennych substancji [SUBASH i in. 2013]. Ich aktywność wykryto m.in. w hodowlach *Rhodospodium* sp. i *Candida* sp. [LI i in. 2014]. W literaturze jest niewiele szczegółowych informacji o tych enzymach pochodzenia grzybowego, co może być związane z rzadkim występowaniem ich w tych organizmach oraz trudnościami związanymi z wydzieleniem ich z komórek [ANTCZAK 2001], dlatego też duża wewnątrzkomórkowa aktywność lipolityczna u badanych form trufli letniej jest niezwykle ciekawa. Celulazy i ksylanazy to hydrolazy zdolne do rozkładu celulozy i ksylanu, polisacharydów obficie występujących w środowisku naturalnym. Ksyłan jest jednym z podstawowych składników hemiceluloz, które wraz z ligniną i celulożą wchodzi w skład kompleksu ligninocelulozowego w ścianach komórkowych roślin, będąc ważnym składnikiem drewna [TOKARZEWSKA-ZADORA i in. 2005]. Celulazy i ksylanazy to hydrolazy często występujące u grzybów, ich aktywność oznaczono m.in. u *Cerreana unicolor* [BELOWA i in. 2014] oraz u *Trichoderma reesei* [DESHPANDE i in. 2008].

PODSUMOWANIE

1. Badane formy trufli letniej – *T. aestivum* i *T. uncinatum* Vittad. wydzielają zewnątrzkomórkowe białka enzymatyczne o aktywnościach: lakazy, proteazy, lipazy oraz ksylanazy i celulazy.

2. Dużą aktywność enzymatyczną obserwowano pomiędzy 10. a 20. dniem hodowli trufli w płynnych pożywkach, przy czym większą aktywność wszystkich badanych enzymów wykryto u *T. aestivum*.

3. Ksylanazy i celulazy oraz lakazy wydzielane przez grzybnię obu form trufli letniej mogą brać udział w procesie zawiązywania symbiozy mykoryzowej.

4. Proteazy i lipazy mogą uczestniczyć w pozyskiwaniu składników energetycznych do wzrostu grzybni trufli.

5. Zaobserwowane znaczne różnice w poziomie i rodzaju aktywności enzymów mogą świadczyć o odmiennej aktywności metabolicznej badanych form trufli letniej.

LITERATURA

- ANTCZAK T. 2001. Lipazy grzybowe *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus*: otrzymywanie i katalityczne właściwości. Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej. Rozprawy Naukowe. Z. 298. ISSN 0137-4834 ss. 175.
- ARIAS M. E., ARENAS M., RODRIGUEZ J., SOLIVERI J., BALL A. S., HERNÁNDEZ M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69. Iss. 4 s. 1953–1958.
- BALIEY M. J., BIELY P., POUTANEN K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology. Vol. 23. Iss. 3 s. 257–270.
- BELOVA O., VLISOV A., VINOKUROVAN G., KOSTENEVICH A., ASAPUNOVA L., LOBANOK A.G., LEONTIEVSKY A.A. 2014. Xylanase and cellulase of fungus *Cerrera unicolor* VKM F-3196: Production, properties, and applications for the saccharification of plant material. Applied Biochemistry and Microbiology. Vol. 50. No. 2 s. 148–153.
- CSORBAINÉ A.G., EDVI G., GODÓ N., DIMÉNY J. 2009. Mycorrhization experiments with summer truffle (*Tuber aestivum* Vitt.). W: First Conference on the „European” Truffle *Tuber aestivum* *lunclunatum*. Vienna, 6–8.11.2009. Wiedeń. University of Vienna s. 6–7.
- DESHPANDE S.K., BHOTMANGE M.G., CHAKRABARTI T., SHASTRI P.N. 2008. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). Indian Journal of Chemical Technology. Vol. 15. Iss. 5 s. 449–456.
- FERNANDES L., LOGUERCIO-LEITE C., ESPOSITO E., REIS M. M. 2005. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. International Biodeterioration and Biodegradation. Vol. 55. Iss. 3 s. 187–193.
- HALL I.R., YUN W., AMICUCCI A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends in Biotechnology. Vol. 21. Iss. 10 s. 433–438.
- HILSZCZAŃSKA D. 2009. Propozycja mikoryzacji sadzonek drzew leśnych z udziałem trufli letniej (*Tuber aestivum*) w Polsce. Sylwan. R. 153. Z. 4 s. 281–286.
- JANKIEWICZ U., KILISZCZYK A., RUSSEL S. 2012. Charakterystyka właściwości proteolitycznych dwóch wybranych szczepów bakterii z rzędu *Myxococcales*. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 3. Z. 3 (39) s. 53–62.
- LI A., ZHU Y., XU L., ZHU W., TIAN X. 2008. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. African Journal of Biochemistry Research. Vol. 2. Iss. 8 s. 181–183.
- LI L., SINGH P., LIU Y., PAN S., WANG G. 2014. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. AMB Express. Vol. 4. Iss. 60 s. 1–11.
- MACCHIONE M. M., MERHEB C.W., GOMES E., DA SILVA R. 2008. Protease production by different thermophilic fungi. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 146. Iss. 1–3 s. 223–230.
- MILLER G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. Vol. 31. Iss. 3 s. 426–428.
- MROZIK A., HUPERT-KOCUREK H., NOWAK B., ŁABUZEK S. 2008. Microbial lipases and their significance in the protection of the environment. Postępy Microbiologii. T. 47. Z. 1 s. 43–50.
- NYGREN C. M., EDQVIST J., ELFSTRAND M., HELLER G., TAYLOR A. F. 2007. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza. Vol. 17. Z. 3 s. 241–248.
- PALMIERI G., BIANCO C., CENNAMO G., GIARDINA P., MARINO G., MONTI M., SANNIA G. 2001. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67. Iss. 6 s. 2754–2759.

- ROSA-GRUSZECKA A., HILSZCZAŃSKA D., SZMIDLA H. 2014. Warunki środowiskowe sprzyjające występowaniu trufli (*Tuber* spp.) na historycznych stanowiskach w Polsce. Leśne Prace Badawcze. Vol. 75. Iss. 1 s. 5–11.
- STREIBLOVÁ E., GRYNDLEROVÁ H., VALDA S., GRYNDLER M. 2010. *Tuber aestivum* – hypogeous fungus neglected in the Czech Republic. A review. Czech Mycology. Vol. 61. Iss. 2 s. 163–167.
- SUBASH C.B., PERIASAMY A., LAKSHMIPRIYA T., AZARIACH H. 2013. Strategies of characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. Biomed Research International. Vol. 2013. Z. 1 s. 1–10.
- SUZUKI T., ENDO K., ITO M., TSUJIBO H., MIYAMOTO K., INAMORI Y. 2003. Thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 67. Iss. 10 s. 2167–2175.
- THURSTON CH.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. Vol. 140 s. 19–26.
- TOKARZEWSKA-ZADORA J., ROGALSKI J., SZCZODRAK J. 2005. Enzymy rozkładające ksylian – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii. BioTechnologia. T. 2 (69) s. 163–182.
- ÜLKER S., ÖZEL A., ÇOLAK A., KARAOĞLU S. 2011. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. Turkish Journal of Biology. Vol. 35 s. 543–550.
- WILLERDING A. L., OLIVEIRA L. A., MOREIRA F. W., GERMANO M. G., CHAGAS A. F. 2011. Lipase activity among bacteria Isolated from amazonian soils. Enzyme Research. Vol. 2011 s. 1–5.
- ZAMPIERI E., GUZZO F., COMMISSO M., MELLO A., BONFANTE P., BALESTRINI R. 2014. Gene expression and metabolite changes during *Tuber magnatum* fruiting body storage. Current Genetic. Vol. 60 s. 285–294.

Urszula JANKIEWICZ, Stefan RUSSEL, Ewa BAGIŃSKA, Dorota HILSZCZAŃSKA

METABOLIC ACTIVITY OF *Tuber aestivum*/*Tuber uncinatum* Vittad. MYCELLIUM

Key words: cellulase, laccase, lipase, protease, *Tuber aestivum/uncinatum*, xylanase

S u m m a r y

Truffle have long been appreciated for their culinary value. However, knowledge about their biochemical activity is still insufficient. Therefore, the aim of this study was to preliminarily assess the enzymatic activity of two forms of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.). The results showed that studied fungi of the genus truffle (*Tuber* spp.) – *T. aestivum* and *T. uncinatum* secrete extracellular enzymatic proteins with activities of: laccase, protease lipase, cellulase and xylanase. The high activity of the enzyme was observed between 10th and 20th day of truffle cultivation in liquid culture. Higher activity of all tested enzymes was detected in the culture of *T. aestivum*. Significant differences observed in the level and kind of enzymatic activity might indicate different metabolic activity of studied forms of summer truffle.

Adres do korespondencji: dr U. Jankiewicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Biochemii, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; tel. + 48 22 593-25-58, e-mail: Urszula_Jankiewicz@sggw.pl