

**SCHIZOPHYLLUM COMMUNE ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ПРОДУЦЕНТ
ЕКЗОПОЛІГАЛАКТУРОНАЗИ**

Зубик П. Р., аспірант кафедри промислової біотехнології та біофармації

<https://orcid.org/0000-0003-0435-0254>

Клечак І. Р., к.т.н., доцент, доцент кафедри промислової біотехнології та біофармації

<https://orcid.org/0000-0002-7382-0259>

Ліновицька В. М., к.б.н., доцент кафедри промислової біотехнології та біофармації

<https://orcid.org/0000-0002-2755-9811>

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2025-25-09>

Предмет. Соки належать до поширених продуктів харчування, які мають харчову та комерційну цінність. Однак, для виробництва популярних у споживача освітлених соків, а також в ряді інших харчових виробництвах, необхідні додаткові технологічні етапи, в тому числі спрямовані на видалення пектинових сполук. Одним з сучасних методів, що для цього використовують є розкладання пектинів за допомогою препаратів на основі екзополігалактуронази. Серед потенційних продуцентів екзополігалактуроназ багатообіцяючими є базидієві макроміцети *Schizophyllum commune*, що має розвинену систему позаклітинних ферментів і здатний до розкладання компонентів клітинної стінки рослин, в тому числі її пектинової складової. **Мета.** Метою роботи було вивчення активності екзополігалактуронази штамами *S. commune* у глибинній культурі. **Методи.** Об'єктами досліджень виступали три штами *S. commune* (*S. commune* 335, *S. commune* 1759 і *S. commune* 1770), отримані з Колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Культивування здійснювали на глюкозо-пептоно-дріжджовому, синтетичному середовищах та модифікованому середовищі Норкранс в статичному режимі за температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$ упродовж 14 діб. В кінці культивування визначали рівень накопичення біомаси, кількість редукуючих речовин і білків спектрофотометрично та активність екзополігалактуронази. Статистичну обробку даних виконували за допомогою критерію Дункана. **Результати.** Найвищу активність продемонстрував штам *S. commune* 1759 на середовищі Норкранс ($494,4 \pm 72,9$ од/дм³), тоді як штами 335 і 1770 характеризувались нижчими показниками. Максимальну питому активність ($6,48 \pm 0,26$ од/г_{білка}) також виявлено у штаму 1759, а найбільшу продуктивність синтезу екзополігалактуронази – у штаму 335 на синтетичному середовищі ($1510,5 \pm 227,4$ од/г_{БМ}). На глюкозо-пептоно-дріжджовому середовищі спостерігались найнижчі значення активності, тоді як середовище Норкранс обумовлювало максимальні значення. **Сфера застосування результатів.** Отримані результати вказують на необхідність подальших досліджень активності екзополігалактуронази у штамах *S. commune* 335 і *S. commune* 1759 з метою оптимізації умов її отримання та перспективність розробки біотехнології виробництва ферментних препаратів для застосування у харчовій промисловості.

Ключові слова: базидієві макроміцети, *Schizophyllum*, пектинолітичні ферменти, ферментативна активність, полігалактуроназа, поверхневе культивування, рідкі живильні середовища

SCHIZOPHYLLUM COMMUNE AS A PROMISING EXO-POLY GALACTURONASE PRODUCER

Pavlo Zubyk, postgraduate

<https://orcid.org/0000-0003-0435-0254>

Inna Klechak, PhD, Engineering, Associate Professor, Associate Professor at the

<https://orcid.org/0000-0002-7382-0259>

Vita Linovytska, PhD, Associate Professor at the

<https://orcid.org/0000-0002-2755-9811>

National Technical University of Ukraine

«Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv, Ukraine

Subject. Juices are products with high nutritional and commercial value, but their production is complicated by the presence of pectic compounds. Exopolygalacturonases are often used to decompose such compounds. Among the potential producers of exopolygalacturonases, the basidiomycete *Schizophyllum commune* is promising, as it has a developed system of extracellular enzymes and is capable of degrading plant cell wall components. **Purpose.** The aim of the study was to investigate the synthesis of exopolygalacturonase by *S. commune* strains in submerged culture. **Methods.** The objects of research were three strains of *S. commune* (*S. commune* 335, *S. commune* 1759 and *S. commune* 1770), obtained from The Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine. Cultivation was carried out in glucose-peptone-yeast, synthetic media and modified Norcrans medium in static mode at a temperature of $28 \pm 1^\circ\text{C}$ for 14 days. At the end of cultivation, the biomass yield was determined gravimetrically; the amount of reducing substances and proteins was determined spectrophotometrically. Statistical data processing was performed using the Duncan test. **Results.** The highest activity was demonstrated by *S. commune* 1759 strain on Norcrans medium (494.4 ± 72.9 units/dm³), while strains 335 and 1770 were characterized by lower activity. The maximum specific activity (6.48 ± 0.26 units/g_{protein}) was also found in strain 1759, and the highest synthesis productivity was found in strain 335 on synthetic medium (1510.5 ± 227.4 units/g_{BM}). The lowest activity values were observed in glucose-peptone-yeast medium, while Norcrans medium caused the maximum values. **Scope of the results.** The results obtained indicate the need for further studies of strains *S. commune* 335 and *S. commune* 1759 to optimize the yield of exopolygalacturonase and its application in the food industry.

Key words: basidiomycetes, *Schizophyllum*, pectinolytic enzymes, enzymatic activity, polygalacturonase, surface cultivation, liquid nutrient media

Постановка проблеми. Соки є продуктами з високою харчовою та комерційною цінністю, однак їх виробництво супроводжується технологічними труднощами, пов'язаними з підвищеною в'язкістю та каламутністю через наявність пектинових речовин [1]. Використання пектинолітичних ферментів, дозволяє ефективно руйнувати полімери пектину, знижуючи в'язкість сировини та покращуючи якість кінцевого продукту [2].

Серед усіх пектолітичних ферментів полігалактуронази є найбільш вивченими та найчастіше застосовуються в промисловості завдяки їх високій специфічності у процесі деполімеризації. Ці ферменти каталізують розрив глікозидного зв'язку в присутності молекул води, що призводить до різкого зниження в'язкості розчину і збільшення кількості відновлювальних кінцевих груп [3, 4]. Відомо два основні типи полігалактуроназ: екзополігалактуроназа, яка атакує кінцеві залишки галактуронової кислоти, відщеплюючи їх і поступово скорочує довжину ланцюга та ендополігалактуроназа, що здійснює довільні розриви всередині ланцюга пектину [5]. Проте, більше промислове значення має саме екзофермент, оскільки він забезпечує поступове термінальне розщеплення пектинових ланцюгів з утворенням моносахаридів та олігосахаридів, що сприяє більш повному зниженню в'язкості та стабільному освітленню продуктів [6].

Переважає більшість промислових препаратів екзополігалактуроназ отримується з мікроміцетів родів *Aspergillus* чи *Penicillium* [7]. Однак їх використання має певні обмеження, зокрема ризик утворення мікотоксинів та необхідність жорсткого контролю умов культивування. У цьому контексті перспективними об'єктами вважаються базидієві макроміцети, зокрема *Schizophyllum commune*.

Завдяки розвиненій системі екзоклітинних ферментів *S. commune* здатний до розкладання не тільки целюлози, геміцелюлози, а й пектину, що зумовлює його потенціал як продуцента пектинолітичних ферментів. Дані про активність полігалактуроназ у цього виду є обмеженими, проте дослідження свідчать про наявність у нього таких ферментативних систем [8]. Також в ряді досліджень встановлено, що у геномі *S. commune* наявні гени сімейства GH, зокрема GH28, які кодують синтез полігалактуроназ, в тому числі екзополігалактуроназ [9, 10].

Отже, в наукових джерелах наявні результати досліджень присвячених вивченню *S. commune* як продуцента пектолітичних ферментів [11, 12]. Однак вони зосереджені на поверхневому культивуванні цього макроміцета, що дещо обмежує його промислове

застосування. Таким чином, є потреба у дослідженні синтезу екзополігалактуронази у глибинній культурі, яка дозволяє більш ефективно контролювати умови росту, підвищувати активність ферменту та легше масштабувати виробництво цього продукту.

Метою роботи було вивчення активності екзополігалактуронази штамми *S. commune* у глибинній культурі.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були 3 штами виду *Schizophyllum commune* Fr.: *S. commune* 335, *S. commune* 1759 та *S. commune* 1770, отримані з Колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) [13].

Дослідження активності екзополігалактуронази здійснювали на типових середовищах для культивування макроміцетів, що зустрічаються у роботах вітчизняних науковців, модифікованих під це дослідження шляхом встановлення однакового вмісту джерела глюкози з метою виключення впливу його концентрації на вихід ферментів [14]:

- глюкозо-пептоно-дріжджовому середовищі (ГПД), г/дм³: глюкоза – 10,0, пептон – 3,0, дріжджовий екстракт – 3,0, MgSO₄·7H₂O – 0,25;

- синтетичному середовищі (СС), г/дм³: глюкоза – 10,0, NH₄NO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, K₂HPO₄ – 1,0, MgSO₄·7H₂O – 0,25;

- модифікованому середовищі Норкранс (СН), г/дм³: глюкоза – 10,0, NH₄NO₃ – 1,0, KH₂PO₄ – 1,0, MgSO₄·7H₂O – 0,5, FeSO₄·7H₂O – 0,005, ZnSO₄·7H₂O – 0,0044, CaCl₂ – 0,0055.

Вихідне рН трьох середовищ встановлювали на рівні 6,8 ± 0,2 використовуючи 0,1 н розчини NaOH та HCl.

В кожену колбу вносили по три диски семиденної культури, попередньо вирощеної на агаризованому ячмінно-солодовому екстракті. Культивування здійснювали в статичному режимі (без перемішування) у колбах об'ємом 250 см³ із 50 см³ живильного середовища за температури (28 ± 1)°C упродовж 14 діб [15].

Після завершення культивування від культуральної рідини відділяли міцелії фільтруванням та висушували до сталої маси за (105 ± 5)°C для визначення вмісту абсолютно сухої біомаси (г/дм³) з метою подальшого розрахунку продуктивності накопичення ферменту. Вміст редуруючих речовин визначали дінитросаліциловим методом, спектрофотометрично (г/дм³, з використанням реактиву DNS за калібрувальним графіком за глюкозою) [16]. Концентрацію білків визначали методом Лоурі (г/дм³, за калібрувальним графіком за яєчним альбуміном) [17].

Для визначення активності екзополігалактуронази (ЕС3.2.1.82) в культуральній рідині використовували 1% розчин яблучного пектину. За одиницю пектинестеразної активності (ЕкзоПГА, од) приймали таку кількість ферменту, що каталізує утворення 1 мкмоль редууючх цукрів за хвилину [18].

Продуктивність синтезу екзополігалактуронази (ν, од/(г_{БМ})) знаходили за формулою [19]:

$$\nu = \frac{E_{\text{кзоПГА}}}{C(\text{біомаси})}, \quad (1)$$

Питому активність екзополігалактуронази (φ, од/(г_{білків})) знаходили за формулою [20]:

$$\varphi = \frac{E_{\text{кзоПГА}}}{C(\text{білків})}, \quad (2)$$

Статистичну обробку даних проводили, використовуючи критерій Дункана. Усі експерименти виконувалися в трьох повторностях, результати представлені у вигляді середнє значення ± стандартне відхилення, отриманих за трьома вимірюваннями. Результати вважалися статистично відмінними при значенні p-value < 0,05. Літери a, b, c, d... вказують на значні відмінності між штамми при p < 0,05 за критерієм Дункана.

Обробку даних і побудову графіків здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel (США).

Результати та обговорення. Дослідження активності екзополігалактуронази у трьох штамів *S. commune* показало залежність цього показника як від складу живильного середовища, так і від штаму (рис. 1).

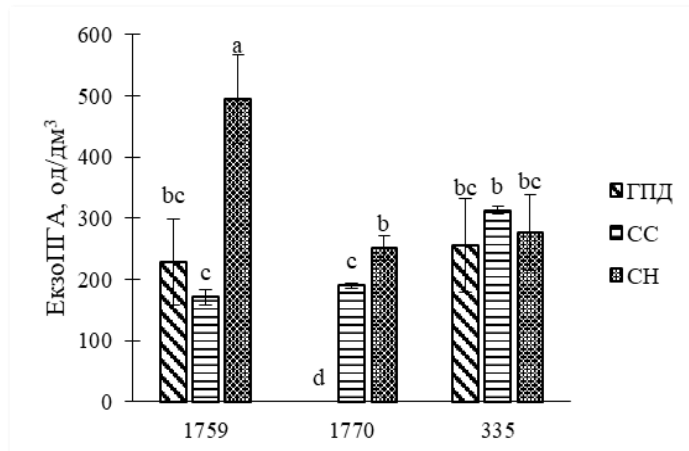


Рис. 1. Активність екзополігалактуронази штамів *S. commune* у культуральній рідині

майже всі штами показали максимальні значення серед усіх досліджуваних варіантів живильних середовищ. Найвищу активність екзополігалактуронази зафіксовано для штаму 1759 – $494,4 \pm 72,9$ од/дм³. Інші штами продемонстрували однаковий рівень активності ферменту, а саме $213,6$ – $338,9$ од/дм³. Слід зауважити, що усі досліджувані середовища однаковою мірою впливали на активність екзополігалактуронази штаму 335, про що свідчать значення статистичного аналізу (p -value > 0,05).

Питома активність ферменту значно варіювала серед досліджуваних штамів і живильних середовищ. Дані цього аналізу представлені на рисунку 2.

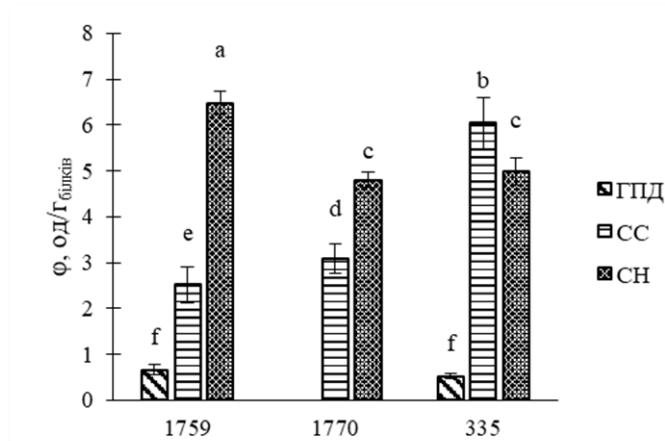


Рис. 2. Питома активність екзополігалактуронази штамів *S. commune*

При культивуванні штамів на середовищі ГПД спостерігалась помірна активність ферменту, яка була однаковою для штамів 1759 і 335 ($157,1$ – $331,4$ од/дм³), тоді як штам 1770 продемонстрував її відсутність. Нижчі значення – $170,7 \pm 12,5$ од/дм³ і $189,7 \pm 4,1$ од/дм³ для штамів 1759 і 1770 відповідно – зафіксовано на синтетичному середовищі. Водночас штам 335 демонструє більш, ніж на 65% вище значення активності.

Середовище Норкранс виявилось більш сприятливим для ферментативної активності досліджуваної пектинази –

Максимальна питома активність екзополігалактуронази спостерігалась для штамів 335 та 1770 – $6,04 \pm 0,56$ та $6,48 \pm 0,26$ од/г білка відповідно. Середовище Норкранс зумовлювало більші показники питомої активності ферменту (порівняно іншими досліджуваними живильними середовищами) для штамів 1759 і 1770, тоді як для штаму 335 найбільше значення цього показника спостерігалось на синтетичному середовищі іншого складу. Найнижчі розрахункові значення ϕ зафіксовані на середовищі ГПД. Перш за все це пояснюється більшою кількістю

залишкових білків пептону та дріжджового екстракту, які були присутні в живильному середовищі.

Показники продуктивності синтезу екзополігалактуронази у штамів *S. commune* показали дещо інші закономірності (рис. 3). Так, найбільші значення продуктивності було зафіксовано для штаму 1759, що культивували на середовищі Норкранс і штаму 335, який культивували на синтетичному середовищі – $1458,88 \pm 182,4$ і $1510,5 \pm 227,4$ од/г_{БМ} відповідно. На середовищі ГПД спостерігалась низька продуктивність синтезу ферменту у штамів 1759 і 335 (рис. 3). Штами *S. commune* 1759 і 335 продемонстрували близькі значення продуктивності ($40,5$ – $201,8$ од/г_{БМ}). На синтетичному середовищі рівень продуктивності

синтезу екзополігалактуронази значно зростає: у 8 разів для штаму 1759 тоді як для 335 майже у 18 разів. Середовище Норкранс виявилось найбільш сприятливим для штаму 1759. Водночас для штамів 1770 і 335 у цьому середовищі зафіксовано істотно нижчі показники – $332,1 \pm 22,9$ та $555,3 \pm 72,2$ од/ГБМ відповідно, що у 3–4 рази менше порівняно з їхніми значеннями на середовищі СС і з 1759 на СН.

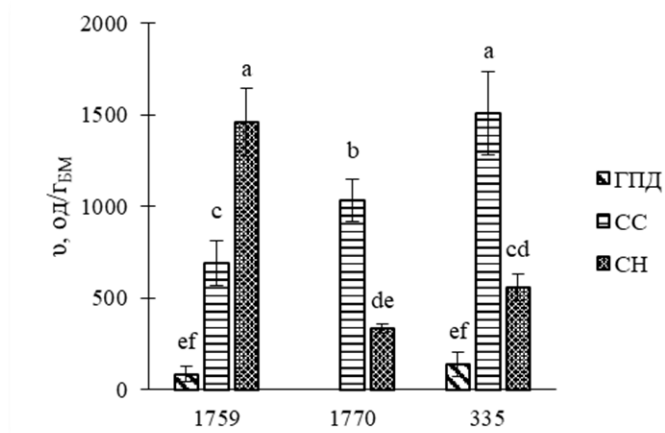


Рис. 3. Продуктивність синтезу екзополігалактуронази штамами *S. commune*

Дані цього дослідження підтверджують, що синтез екзополігалактуронази у досліджуваних штамів *S. commune* визначається як штамовою специфічністю, так і складом живильного середовища. Отримані результати узгоджуються з численними дослідженнями, які показують вплив компонентів живильного середовища на індукцію та рівень синтезу пектолітичних ферментів у грибів [21–23].

Низька активність екзополігалактуронази при культивуванні штамів *S. commune* на ГПД, ймовірно,

зумовлені комбінацією кількох факторів: легкодоступні органічні джерела азоту (пептон та дріжджовий екстракт), збільшена кількість загального білка в культуральній рідині і, відповідно, знижена питома активність. При цьому, за даними ряду наукових публікацій, вищу активність пектолітичних ферментів, порівняно з середовищами з пептоном, частіше зумовлювали неорганічні джерела азоту (зокрема солі амонію). Такий ефект було продемонстровано для пектолітичних ферментів *A. niger* [24, 25]. Встановлені високі активності штаму 1759 при культивуванні на середовищі Норкранс підтверджує можливу позитивну роль саме амонійних джерел азоту (NH_4NO_3) [25]. Крім того, це живильне середовище містить вдвічі більшу кількість магній сульфату (порівняно з ГПД і СС), а також додаткові компоненти (сульфати феруму, цинку і хлорид кальцію), що додатково може інтенсифікувати вихід екзополігалактуронази. Здатність йонів Mg^{2+} і Fe^{2+} підвищувати активність пектолітичних ферментів показана в наукових роботах для *A. niger* [26, 27]. В той же час, в публікації В. Р. Khatri з співробітниками повідомляється про зниження активності пектолітичних ферментів у присутності йонів Zn^{2+} та Ca^{2+} [26]. Це підтверджує відмінності ферментативних систем аскоміцетів та базидієвих макроміцетів. Проте, є необхідність подальшого вивчення впливу окремих факторів на синтез пектолітичних ферментів перспективними штамами *S. commune*.

Висновки. Штам *S. commune* 1759 характеризується найвищою активністю екзополігалактуронази у середовищі Норкранс ($494,4 \pm 72,9$ од/дм³), високою питомою активністю ($6,48 \pm 0,26$ од/Гбілка) та продуктивністю синтезу ферменту ($1458,9 \pm 182,4$ од/ГБМ). Штам *S. commune* 335 також відзначається високою питомою активністю та максимальною продуктивністю на синтетичному середовищі, проте нижчою загальною активністю у культуральній рідині.

Отримані результати підтверджують як значний вплив складу живильного середовища на рівень синтезу екзополігалактуронази, так і суттєві штамові відмінності у продуктивності *S. commune*. Штами 1759 і 335 можна розглядати як перспективні продуценти пектолітичних ферментів, що робить актуальним проведення подальших досліджень активності екзополігалактуронази з метою оптимізації умов її отримання та перспективність розробки біотехнології виробництва ферментних препаратів для застосування у харчовій промисловості.

Бібліографія

1. Sharma H. P., Patel H., Sugandha. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016. Vol. 57, № 6. P. 1215–1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>.
2. Mosaad Khattab A. The microbial degradation. Pectins – The New-Old Polysaccharides. 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100247>.
3. Biochemical prospects of various microbial pectinase and pectin: An approachable concept in pharmaceutical bioprocessing / S. Satapathy et al. *Frontiers in Nutrition*. 2020. Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>.
4. Production of an endo-polygalacturonase from *Fusarium proliferatum* isolated from agro-industrial waste / A. Neves Junior et al. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021. Vol. 38. P. 102199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102199>.
5. Nighojkar A., Patidar M. K., Nighojkar S. Pectinases: production and applications for fruit juice beverages. *Processing and Sustainability of Beverages*. 2019. P. 235–273. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2>.
6. Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii* / F. Amin et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics*. 2020. Vol. 1868, № 5. P. 140379. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140379>.
7. Partial purification and characterization of exo-polygalacturonase produced by *Penicillium oxalicum* AUMC 4153 / S. A. Almowallad et al. *Life*. 2022. Vol. 12, № 2. P. 284. <https://doi.org/10.3390/life12020284>.
8. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system / N. Zhu et al. *Biotechnology for Biofuels*. 2016. Vol. 9, no. 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0461-x>.
9. Park Y.-J., Jeong Y.-U., Kong W.-S. Genome sequencing and carbohydrate-active enzyme (CAZyme) repertoire of the white rot fungus *Flammulina elastica*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 8. P. 2379. <https://doi.org/10.3390/ijms19082379>.
10. Genomic analysis enlightens agaricales lifestyle evolution and increasing peroxidase diversity / F. J. Ruiz-Dueñas et al. *Molecular Biology and Evolution*. 2020. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa301>.
11. Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exo-polygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification / F. Amin et al. *International Journal of Food Engineering*. 2017. Vol. 13, № 2. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0256>.
12. Optimization of cultural parameters for pectin methylesterase and polygalacturonase production from *Schizophyllum commune* in solid state fermentation / T. Mehmood et al. *Bangladesh Journal of Botany*. 2019. Vol. 48, № 1. P. 65–74. <https://doi.org/10.3329/bjb.v48i1.47417>.
13. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany / N. Bisko et al. M.G. Kholodny Institute of Botany; 2020. <https://doi.org/10.15468/dzdsqu>.
14. Bukhalo A.S. Higher edible basidiomycetes in pure culture. Kyiv: Naukova Dumka, 1988, 144 p.
15. The antibacterial activity of culture filtrates and mycelia of selected strains of macromycetes from the genus *Hericium* / M. Lomberg et al. *Botanica Serbica*. 2023. Vol. 47, 2. P. 241–249. <https://doi.org/10.2298/botserb2302241l>.
16. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay / I. P. Wood et al. *Biomass and Bioenergy*. 2012. Vol. 44. P. 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>.
17. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry et al. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
18. Purification of an exopolygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 produced in submerged fermentation / E. Gomes et al. *International Journal of Microbiology*. 2009. Vol. 2009. P. 1–8. <https://doi.org/10.1155/2009/631942>.
19. Dagbagli S., Goksungur Y. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 11, № 4. <https://doi.org/10.2225/vol11-issue4-fulltext-12>.
20. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*. 2014. Vol. 1, № 1–6. P. 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>.

21. Sethi B. K., Nanda P. K., Sahoo S. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. 3 Biotech. 2016. Vol. 6, № 1. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0353-y>.
22. Boakye, S. O., Zakpaa, H. D. Bioprocess optimization for pectinase enzymes synthesized from fungal species under solid-state fermentation conditions. 2025. <https://doi.org/10.20944/preprints202501.1905.v2>.
23. Mukhopadhyay, D., Bhattacharyya, R., Bhattacharya, S., Alnafisi, B. K. (2024). Valorisation of Citrus limetta peel for *Aspergillus terreus* FP6 mediated pectinase fermentation and application in grape juice clarification / D. Mukhopadhyay. Journal of King Saud University-Science, 2024. Vol. 36, no. 10. 103454. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103454>.
24. Genotype-dependent in vitro regeneration assessment from decapitated embryonal axis and stem-node explants among selected pigeonpea varieties / V. Kashyap et al. Biosciences Biotechnology Research Asia. 2020. Vol. 17, № 03. P. 429–411. <https://doi.org/10.13005/bbra/2847/bbra>.
25. Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation / M. T. Mat Jalil et al. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2023. Vol. 21, № 1. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00510-z>.
26. Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal / B. P. Khatri et al. SpringerPlus. 2015. Vol. 4, № 1. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1286-y>.
27. Mat Jalil M. T., Ibrahim D. Partial purification and characterisation of pectinase produced by *Aspergillus niger* LFP-1 grown on pomelo peels as a substrate. Tropical Life Sciences Research. 2021. Vol. 32, no. 1. P. 1–22. <https://doi.org/10.21315/tlsr2021.32.1.1>.

References

1. Sharma, H. P., Patel, H., Sugandha. (2017). Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices – A review. Critical reviews in food science and nutrition, 57 (6), 1215–1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>.
2. Mosaad Khattab, A. (2022). The Microbial Degradation. Pectins: the new-old polysaccharides, 83. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100247>.
3. Satapathy, S., Rout, J. R., Kerry, R. G., Thatoi, H., Sahoo, S. L. (2020). Biochemical prospects of various microbial pectinase and pectin: an approachable concept in pharmaceutical bioprocessing. Frontiers in Nutrition, 7, 117. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>.
4. Junior, A. N., Mansoldo, F. R. P., Godoy, M. G., Firpo, R. M., Cedrola, S. M. L., Vermelho, A. B. (2021). Production of an endo-polygalacturonase from *Fusarium proliferatum* isolated from agro-industrial waste. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 38, 102199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102199>.
5. Nighojkar, A., Patidar, M. K., Nighojkar, S. (2019). Pectinases: production and applications for fruit juice beverages. Processing and sustainability of beverages (pp. 235–273). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815259-1.00008-2>.
6. Amin, F., Mohsin, A., Bhatti, H. N., Bilal, M. (2020). Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1868 (5), 140379. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140379>.
7. Almowallad, S. A., Alshammari, G. M., Alsayadi, M. M., Aljafer, N., Al-Sanea, E. A., Yahya, M. A., Al-Harbi, L. N. (2022). Partial purification and characterization of exo-polygalacturonase produced by *Penicillium oxalicum* AUMC 4153. Life, 12 (2), 284. <https://doi.org/10.3390/life12020284>.
8. Zhu, N., Liu, J., Yang, J., Lin, Y., Yang, Y., Ji, L., Li, M., Yuan, H. (2016). Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. Biotechnology for biofuels, 9 (1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0461-x>.
9. Park, Y. J., Jeong, Y. U., Kong, W. S. (2018). Genome sequencing and carbohydrate-active enzyme (CAZyme) repertoire of the white rot fungus *Flammulina elastica*. International journal of molecular sciences, 19 (8), 2379. <https://doi.org/10.3390/ijms19082379>.
10. Ruiz-Dueñas, F. J., Barrasa, J. M., Sánchez-García, M., Camarero, S., Miyauchi, S., Serrano, A., Linde, D., Babiker, R., Drula, E., Ayuso-Fernández, I., Pacheco, R., Padilla, G., Ferreira, P., Barriuso, J., Kellner, H., Castanera, R., Alfaro, M., Ramírez, L., Pisabarro, A. G., Riley, R., Kuo, A., Andreopoulos, W., LaButti, K., Pangilinan, J., Tritt, A., Lipzen, A., He, G., Yan, M., Ng, V., Grigoriev, I. V., Cullen, D.,

Martin, F., Rosso, M.-N., Henrissat, B., Hibbett, D., Martínez, A.T. (2021). Genomic analysis enlightens Agaricales lifestyle evolution and increasing peroxidase diversity. *Molecular biology and evolution*, 38 (4), 1428–1446. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa301>.

11. Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., Asgher, M. (2017). Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exo-polygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification. *International Journal of Food Engineering*, 13 (2), 20160256. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0256>.

12. Mehmood, T., Saman, T., Asgher, M., Irfan, M., Anwar, Z., Nadeem, F., & Siddiq, A. (2019). Optimization of cultural parameters for pectin methylesterase and polygalacturonase production from *Schizophyllum commune* in solid state fermentation. *Bangladesh Journal of Botany*, 48 (1), 65–74. <https://doi.org/10.3329/bjb.v48i1.47417>.

13. Bisko, N., Lomberg, M., Mykchaylova, O., Mytropolska, N. (2020). IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mu-shroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany. M. G. Kholodny Institute of Botany. <https://doi.org/10.15468/dzdsqu>.

14. Bukhalo A. S. (1988) Higher edible basidiomycetes in pure culture. Kyiv: Naukova Dumka, 144.

15. Lomberg, M., Krupodorova, T., Krasinko, V., Mykchaylova, O. (2023). The antibacterial activity of culture filtrates and mycelia of selected strains of macromycetes from the genus *Hericium*. *Botanica Serbica*, 47 (2), 241–249. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2302241L>.

16. Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>.

17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. 193 (1). 265–275.

18. Gomes, E., Leite, R. S. R., Da Silva, R., Silva, D. (2009). Purification of an exopolygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 produced in submerged fermentation. *International journal of microbiology*, 2009 (1), 631942. <https://doi.org/10.1155/2009/631942>.

19. Dagbagli, S., Goksungur, Y. (2008). Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11 (4). <https://doi.org/10.2225/vol11/issue4-fulltext-12>.

20. Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1 (1–6), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>.

21. Sethi, B. K., Nanda, P. K., Sahoo, S. (2016). Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. *3 Biotech*, 6 (1), 36. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0353-y>.

22. Boakye, S. O., Zakpaa, H. D. (2025). Bioprocess optimization for pectinase enzymes synthesized from fungal species under solid-state fermentation conditions. <https://doi.org/10.20944/preprints202501.1905.v2>.

23. Mukhopadhyay, D., Bhattacharyya, R., Bhattacharya, S., Alnafisi, B. K. (2024). Valorisation of Citrus limetta peel for *Aspergillus terreus* FP6 mediated pectinase fermentation and application in grape juice clarification. *Journal of King Saud University-Science*, 36 (10), 103454. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103454>.

24. Begum, G., Munjam, S. (2021). Carbon and nitrogen sources effect on pectinase synthesis by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18 (1), 185–195. <http://doi.org/10.13005/bbra/2906>.

25. Mat Jalil, M. T., Zakaria, N. A., Salikin, N. H., & Ibrahim, D. (2023). Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21 (1), 45. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00510-z>.

26. Khatri, B. P., Bhattarai, T., Shrestha, S., Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. *Springer Plus*, 4 (1), 488. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1286-y>.

27. Jalil, M. T. M., Ibrahim, D. (2021). Partial purification and characterisation of pectinase produced by *Aspergillus niger* LFP-1 grown on pomelo peels as a substrate. *Tropical life sciences research*, 32 (1), 1. <https://doi.org/10.21315/tlsr2021.32.1.1>.