

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PECTINOLÍTICOS A PARTIR DE RESÍDUOS PROVENIENTES DE AGROINDÚSTRIAS PARA PRODUÇÃO DE AROMAS FRUTAIS¹

Mariana UENOJO^{2,*}, Glaucia Maria PASTORE²

RESUMO

As pectinases são enzimas produzidas naturalmente por plantas, fungos, leveduras e bactérias. Estes microrganismos podem ser inoculados em meios contendo resíduos agroindustriais utilizados como fonte de carbono para a produção de compostos de maior valor agregado, como enzimas, etanol, proteínas, aminoácidos e compostos de aroma. Vários microrganismos foram isolados e selecionados quanto à produção de enzimas pectinolíticas pelo método da placa, através de zonas claras de degradação de pectina ao redor da colônia. De 104 linhagens testadas, 18 foram selecionadas para fermentarem em meio líquido, contendo pectina para a determinação de atividade de poligalacturonase (PG) e de pectina liase (PMGL), e em meio frutose/extrato de levedura para produção de aromas. As linhagens 2, 9, 20, 39, 70, 74 e 99 apresentaram unidades de atividade de PG superiores a 80 μmol de ácido galacturônico/mL/min, as linhagens 17, 18, 31, 37, 73, 74 e 125 apresentaram unidades de atividade de PMGL superiores a 1000 ηmol de produtos insaturados/mL/min e as linhagens 13, 70, 73, 74, 125 e 144 apresentaram os melhores descritores e as maiores intensidades de aromas percebidos por um painel não treinado de provadores.

Palavras-chave: pectina, fermentação, pectinase, poligalacturonase, pectina liase, aroma.

SUMMARY

SCREENING OF FRUIT FLAVORS PRODUCING PECTINOLITIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM AGROINDUSTRIAL RESIDUES. Pectinases are enzymes used in food industries, produced by plants, fungi, yeasts and bacteria. These microorganisms can be inoculated in a medium containing agro-industrial residues from processing agricultural products, used as a carbon source to produce value-added products such as enzymes, ethanol, proteins, amino acids and flavor compounds. Several microorganisms were isolated and selected due to their capacity to produce pectinolytic enzymes in clear halos around colonies by plate assay. From 104 strains, 18 were inoculated in a medium containing pectin as a carbon source and the pectinolytic activities of polygalacturonase (PG) and pectin lyase (PMGL) were determined. Strains 2, 9, 20, 39, 70, 74, and 99 showed activity units of PG higher than 80 μmol galacturonic acid/mL/minute. Strains 17, 18, 31, 37, 73, 74 and 125 showed activity units of PMGL higher than 1000 ηmol unsaturated products/mL/minute. Strains 13, 70, 73, 74, 125 and 144 showed good signs of flavor noticed in the fructose and yeast extract medium and the most intense flavor according to a non-trained board of tasters.

Keywords: pectin, fermentation, pectinolytic enzyme, polygalacturonase, pectin lyase, flavor.

1 - INTRODUÇÃO

Substâncias pécnicas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular, formadoras do maior componente da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores [2], compostas de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster [16, 19, 47]. São classificadas em protopectina, a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais, insolúvel em água e totalmente metoxilada; ácido pécnico, compostas de resíduos de ácido poligalacturônico coloidal completamente desmetoxilada, e pectina e ácido pécnico que possuem um grau variável de metoxilação e, em condições adequadas, são capazes de formar géis com ácidos e açúcares [20, 24, 38, 48].

Essas substâncias pécnicas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas produzidas naturalmente por plan-

tas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras [11, 45], muito utilizadas nas indústrias de alimentos para extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, para aumentar o rendimento e melhorar o processamento sem o aumento de custos [3, 7]. Sua classificação está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, preferência pelo substrato (pectina ou pectato), ação por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica ou terminal [16, 38, 49].

As hidrolases (poligalacturonase, PG) hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico e as liases (pectina liase, PMGL), também chamadas de transeliminases, rompem ligações glicosídicas, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 [16].

Diversas espécies de microrganismos como *Bacillus*, *Erwinia*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Penicillium* e *Fusarium* são conhecidos como bons produtores de pectinases [10, 16, 38], podendo ser utilizados em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura. A síntese destas enzimas sofre influência dos componentes do meio, presença de indutores, pH e temperatura de cultivo [4].

¹Recebido para publicação em 10/11/2004. Aceito para publicação em 6/7/2006 (001434)

²Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), C. P. 6121, CEP 13083-862, Campinas (SP),

E-mail: mariu@fea.unicamp.br

* A quem a correspondência deve ser enviada

Resíduos agroindustriais como casca de café, casca e bagaço de frutas cítricas, farelo de trigo, bagaço de uva, bagaço de mandioca, bagaço de beterraba doce podem ser utilizados como substratos em bioprocessos para a produção de compostos de maior valor agregado como enzimas, etanol, proteínas, ácidos orgânicos e compostos de aroma, desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada [4, 7, 27, 42].

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais, encontrados em baixas concentrações. Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos [12, 22, 37] e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias [22]. Fungos do gênero *Ceratocystis* produzem uma grande quantidade de aromas de frutas ou de flores (pêssego, abacaxi, banana, citrus e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo. *Ceratocystis frimbiata* tem potencial para síntese de éster, cresce rapidamente e produz uma grande variedade de aromas [31, 41].

O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar microrganismos pectinolíticos para a posterior produção de aromas frutais em meios de cultura contendo resíduos agroindustriais.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados de grãos de café, água de lavagem de café, folhas de pé de café, terra de cafezal e de frutas (banana, mexerica, laranja, melão, mamão, goiaba, uva e damasco). As amostras foram semeadas em 10 mL de meio de enriquecimento estéril e mantidas em estufa a 30 °C por 24 h. A seguir, uma alçada do meio foi inoculada em placas de Petri contendo meio PDA e mantidas em estufa a 30 °C de 24 a 48 h e as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado.

2.2 - Seleção de microrganismos pectinolíticos

Os microrganismos pectinolíticos foram inoculados em meio sólido contendo 1,25% de pectina cítrica (Sigma), incubados em estufa a 30 °C por 2 a 4 dias, conforme o crescimento das colônias. A seguir, as placas foram reveladas com uma solução de vermelho rutênio 0,05% e lavadas com água destilada [26]. As linhagens que apresentaram halo de degradação vermelho púrpuro ao redor do halo de colônia foram consideradas produtoras de pectinases e foram selecionadas para determinação de atividade pectinolítica.

2.3 - Determinação de atividade pectinolítica

As linhagens pectinolíticas selecionadas foram inoculadas em meio líquido contendo 1% de pectina cítrica (Sigma) e incubadas em shaker rotatório a 30 °C, 100 rpm por até 96 h. Após cada período de 24 h de fermentação as amostras foram retiradas e centrifugadas e o sobrenadante utilizado para a medida de pH e determinação de atividade de PG e PMGL [46].

Substrato. Foram preparadas soluções de pectina cítrica (Sigma) 0,5% em tampão acetato pH 4,5 e em tampão citrato fosfato pH 5,5 para as atividades de PG e PMGL, respectivamente.

Atividade de PG. Determinada pela medida da liberação de grupos redutores utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) [28]. 500 µL de substrato e 500 µL de extrato enzimático foram incubados a 40 °C por 40 min e a reação paralisada com a adição de 1 mL de solução de DNS. A solução foi mantida em ebulição por 8 min, resfriados em banho de gelo e adicionados 8 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm contra o branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, segundo uma curva padrão do ácido α-D-galacturônico (Fluka Chemica) [46].

Atividade de PMGL. Baseada no aumento da absorbância devido à formação de produtos insaturados [1]. Um mL de substrato e 1,0 mL de extrato enzimático foram incubados a 40 °C por 1 h e a reação paralisada com a adição de 3,5 mL de HCl 0,5 M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 235 nm contra o branco. O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados $\epsilon_{235} = 5550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo de atividade $UA = (\Delta A/\epsilon_{235}) 10^9$ (ηmol/mL/min), onde ΔA é o aumento de absorbância por minuto [46].

2.4 - Seleção de linhagens produtoras de aromas frutais

Os microrganismos pectinolíticos produtores de aromas de frutas foram inoculados em meio frutose e extrato de levedura, incubados em shaker rotatório a 25 °C e 100 rpm por 72 h e selecionados por meio de um painel não treinado de 10 provadores. Solicitou-se aos provadores a descrição dos aromas e das intensidades percebidas em uma ficha sensorial apropriada contendo uma escala de intensidade de aroma (Tabela 1) [46].

TABELA 1 – Escala de intensidade de aroma.

Escala	Intensidade de aroma
+++++	aroma muito intenso
++++	aroma intenso
+++	intensidade moderada de aroma
++	aroma fraco
+	aroma muito fraco
-	nenhum aroma percebido

3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 - Seleção de microrganismos pectinolíticos

Foram testadas 104 linhagens, das quais 18 foram consideradas positivas, ou seja, apresentaram halo de degradação vermelho púrpuro além de halo de colônia. Apenas 5 microrganismos não cresceram neste meio e os 81 restantes cresceram, mas não apresentaram halo de degradação.

Os valores de diâmetro total (colônia mais halo), diâmetro de colônia e diâmetro de halo (diâmetro total menos o de colônia) das 18 linhagens ditas positivas são mostrados na *Tabela 2*.

TABELA 2 – Microrganismos pectinolíticos e correspondentes diâmetros de halos.

Linhagem	Halo total	Halo de colônia	Halo de pectinase
			(cm)
2	1,5	1,0	0,5
9	3,5	3,0	0,5
13	2,5	2,0	0,5
15	2,5	1,5	1,0
17	2,5	1,5	1,0
18	2,5	2,0	0,5
19	2,5	1,9	0,6
20	3,0	2,0	1,0
31	5,0	2,0	3,0
37	6,0	4,0	2,0
39	7,0	5,0	2,0
70	3,0	2,0	1,0
73	4,0	3,5	0,5
74	3,3	3,0	0,3
98	4,0	2,0	2,0
99	4,0	1,0	3,0
125	1,3	0,3	1,0
144	3,5	1,0	2,5

3.2 - Determinação de atividade pectinolítica

Os valores de pH e das atividades enzimáticas foram obtidos a partir do sobrenadante das fermentações com as linhagens pectinolíticas.

A *Figura 1* mostra a variação de pH das linhagens estudadas durante as 96 h de fermentação. Observa-se que, para a maioria das cepas, há um leve declínio do pH nas primeiras 24 h de fermentação e a partir de 48 h o pH volta a aumentar. Isso pode ser explicado pela liberação de ácido galacturônico no meio pela ação de enzimas pectinolíticas produzidas pelos microrganismos durante as primeiras horas de fermentação. Após 48 h de fermentação observa-se aumento do pH devido ao consumo da fonte de nitrogênio disponível no meio.

A *Figura 2* apresenta as atividades obtidas para PG. Observa-se que os microrganismos 2, 9, 20, 39, 70, 74 e 99 apresentaram unidades de atividade superiores à 80 μmol de ácido galacturônico/mL de extrato bruto enzimático/min. Alguns autores descrevem ter obtido unidades de atividade de poligalacturonase entre 2,7 e 3,5 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ após 48 h [40] e 15,72 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ após 30 h de fermentação [15] por cepas de *Bacillus* sp. *Aspergillus awamori* produziu 0,05 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ de atividade máxima após 7 dias de fermentação [4] e *Lentinus edodes* apresentou atividade entre 1,5 e 2,2 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ após 40 dias [49]. 43 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ foram obtidos por *Thermoascus aurantiacus* cultivados em meios contendo bagaço de laranja e farinha de trigo após 6 e 4 dias de fermentação, respectivamente [23].

As atividades de PMGL obtidas são mostradas na *Figura 3*. As linhagens 17, 18, 31, 37, 73, 74 e 125 apresentaram unidades de atividade superiores a 1000 ηmol de produtos insaturados/mL de extrato bruto enzimático/minuto. Relatos em literatura demonstram a obtenção de 16 $\eta\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ de atividade de pectina liase por *Penicillium griseoroseum* após 48 h de fermentação [34] e *Aureobasidium pullulan*

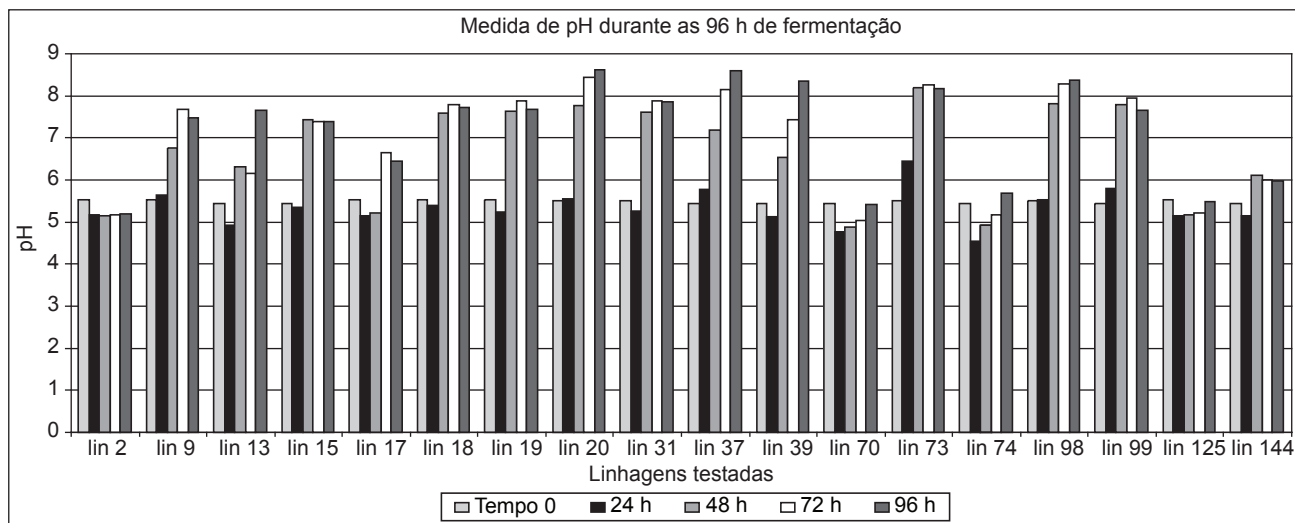


FIGURA 1 – Alteração de pH do meio durante 96 h de fermentação.

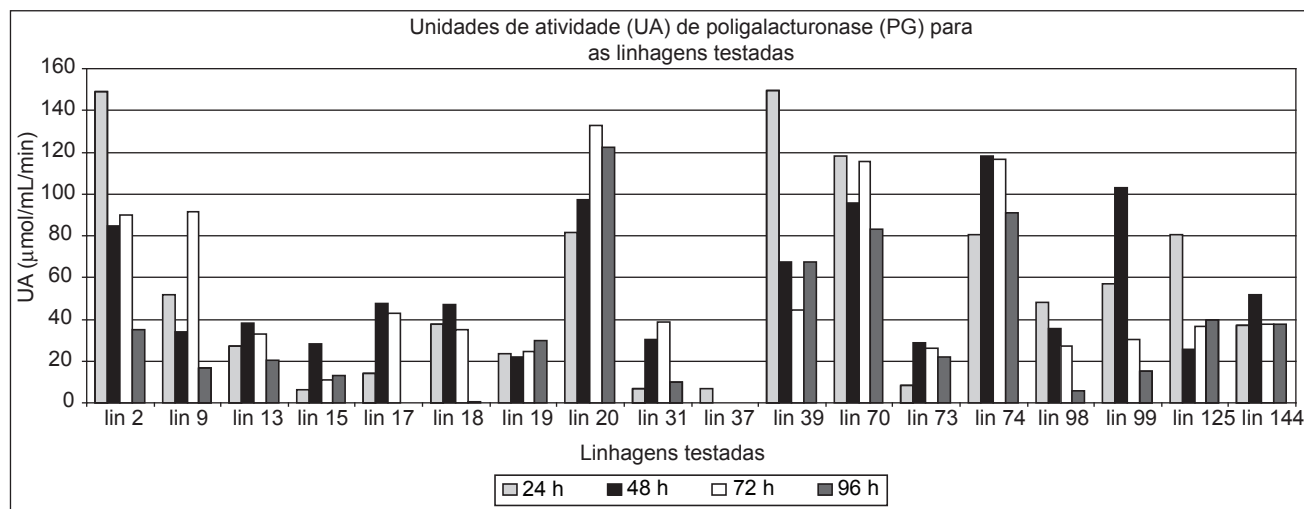


FIGURA 2 – Atividade de PG durante 96 h de fermentação.

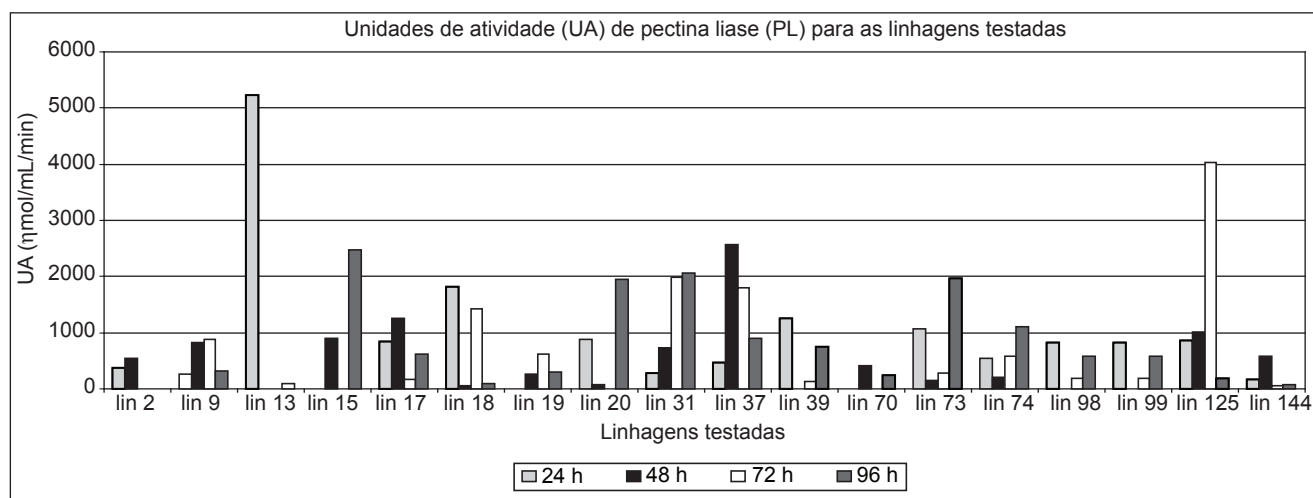


FIGURA 3 – Atividade de PMGL durante 96 h de fermentação.

apresentou 9 $\mu\text{mol/mL/min}$ de unidades de atividade após 4 dias de fermentação [21]. Cerca de 2500 $\mu\text{mol/mL/min}$ de atividade foram produzidos por *Aspergillus niger* quando cultivado em meio contendo 2% de milho por 6 dias [29] e *Thermoascus aurantiacus* cultivados em meios contendo bagaço de laranja e farinha de trigo apresentaram atividade de 19300 e 11600 $\mu\text{mol/g}$ matéria seca/min após 12 e 14 dias de fermentação, respectivamente [23].

3.3 - Seleção de linhagens produtoras de aromas frutais

Das linhagens selecionadas anteriormente, apenas as linhagens 2 e 37 não cresceram no meio contendo frutose e extrato de levedura. As demais produziram aromas frutais agradáveis, de intensidades variáveis, de acordo com análise sensorial realizada por um painel não treinado de

providores. Algumas das descrições de aromas citadas foram: frutal, abacaxi, pêra, banana, pêssego, laranja, doce, fermento e solvente.

As linhagens 13, 70, 73, 74, 125 e 144 foram as que apresentaram as maiores intensidades de aromas frutais, recebendo atribuição ++++ (“aroma intenso”) a +++++ (“aroma muito intenso”) de acordo com a escala de intensidade de aromas (Tabela 3).

Observando-se os dados de atividade de PG e de PMGL, verificou-se que as linhagens 70, 73, 74 e 144 apresentaram boa atividade pectinolítica e também produziram aromas de frutas agradáveis durante a fermentação em meio frutose e extrato de levedura, sendo selecionadas para prosseguirem com as fermentações em meios de cultura contendo resíduos agroindustriais para a produção de aromas frutais, cujos resultados serão apresentados em trabalho posterior.

TABELA 3 – Descrições sensoriais dos aromas percebidos em meio frutose/extrato de levedura.

Linagem	Descrição do aroma	Intensidade
13	frutal	++++
	abacaxi	+++
70	frutal	++++
	abacaxi, pêra	++++
	fermentado	+++
73	frutal	+++++
	banana, abacaxi, framboesa	++++
	solvente	+++
74	frutal	++++
	banana	++++
125	chocolate	++
	frutal	++++
	solvente	+++
144	fermento	++++
	frutal	+++++
	solvente	+++
	doce	+++

4 - CONCLUSÕES

De acordo com a capacidade de produção de pectinases e de produção de aromas frutais, as linhagens 70, 73, 74 e 144 foram as que apresentaram os melhores e mais agradáveis aromas de frutas durante a fermentação em meio frutose/extrato de levedura, sendo selecionadas para prosseguirem com as fermentações em meios de cultura constituídos de resíduos agroindustriais contendo pectina.

Estas linhagens foram posteriormente cultivadas em meios de cultura contendo resíduos agroindustriais, como casca de café, bagaço de uva, laranja e limão, para a produção de aromas frutais, visando-se o aproveitamento destes materiais que são gerados em grandes quantidades durante o processamento das respectivas matérias-primas. Os microrganismos foram capazes de se desenvolver nestes meios e de produzir aromas frutais, cujos resultados serão apresentados em trabalho posterior.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIN, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v. 8 – Complex Carbohydrates, p. 628-631, 1966.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochem.**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- BHAT, M. K. Cellulases related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochem.**, v. 37, n. 5, p. 497-503, 2001.
- BONNIN, E.; Le GOFF, A.; KOIMER, R.; Van ALEBEEK, G.-J. W. M.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; VORAGEN, A. G. J.; ROEPSTORFF, P.; CAPRARI, C.; TRIBAULT, J.-F. Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*. **Biochim. Biophys. Acta – General Subjects**, v. 1526, n. 3, p. 301-309, 2001.
- BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, n. 1-2, p. 127-133, 2000.
- BRAVO, C. E. C.; de CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, edição especial, p. 137-152, 2000.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.**, v. 71, n. 1, p. 45-50, 2000.
- CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grow on agroindustrial solid wastes. **Bioresour. Technol.**, v. 71, n. 3, p. 211-215, 2000.
- De GREGORIO, A.; MANDALANI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; Lo CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresour. Technol.**, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.
- GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, 1994.
- GÓMEZ, E.; LAENCINA, J.; MARTINEZ, A. Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. **J. Food Sci.**, v. 59, n. 2, p. 406-409, 1994.
- HART, H. E.; PARISH, M. E.; BURNS, J. K.; WICKER, L. Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. **J. Food Sci.**, v. 56, n. 2, 1991.
- HENNIES, P. T. **Produção de pectinase de Penicillium italicum através de fermentação em meio semi-sólido**. Campinas, 1996. 68 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from *Bacillus* sp. DT7. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.
- KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.
- LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, n. 4, p. 366-375, 2000.
- LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopolygalacturonase II from *A. niger*.

- Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, p. 293-307, 2000a.
- [19] LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *A. niger*. **Carbohydr. Res.**, v. 327, n. 3, p. 321-332, 2000b.
- [20] MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido**. São Paulo, 1990. 262 p. Tese (Doutor em Engenharia Química), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (USP).
- [21] MANACHINI, P. L.; PARINI, C.; FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aerobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 10, n. 11, p. 682-685, 1988.
- [22] MARQUES, D. B. **Produção e caracterização de aromas de frutas por Pichia membranaefaciens**. Campinas, 1998. 136 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [23] MARTINS, E. S.; SILVA, D.; da SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochem.**, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.
- [24] McCREADY, R. M. Pectin. In: JOSELYN, M. A. **Methods in food analysis**. Academic Press, 1970, 2nd edition, cap. XIX, p. 565-599.
- [25] McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Anal. Chem.**, v. 24, n. 12, p. 1986-1988, 1952.
- [26] McKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 56, n. 3, p. 355-358, 1988.
- [27] MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochem. Eng. J.**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 2000.
- [28] MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- [29] NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Performance of pectolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, n. 1-2, p. 116-124, 1999.
- [30] OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends Biotechnol.**, v. 18, n. 2, p. 356-360, 2000.
- [31] PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem.**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000a.
- [32] PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; RUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. **Biochem. Eng. J.**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000b.
- [33] PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000c.
- [34] PICCOLI-VALLE, R. H.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2001.
- [35] RHA, E.; PARK, H. J.; KIM, M. O.; CHUNG, Y. R.; LEE, C.-W.; KIM, J. W. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, n. 1, p. 105-109, 2001.
- [36] RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por Penicillium italicum IZ 1584 e Aspergillus niger NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado**. Campinas, 1999. 89 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [37] ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. **J. Chromatogr., A**, v. 847, n. 1-2, p. 155-159, 1999.
- [38] SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 39, p. 213-294, 1993.
- [39] SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000.
- [40] SOARES, M. M. C. N.; da SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains or pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 299-303, 1999.
- [41] SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Fruit flavor production by *Ceratocystis frimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochem.**, v. 35, n. 8, p. 857-861, 2000.
- [42] SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.
- [43] TAKAYANAGI, T.; UCHIBORI, T.; YOKUTSUKA, K. Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins. **Am. J. Enology and Viticulture**, v. 52, n. 1, p. 41-44, 2001.
- [44] TARAGANO, V. M.; PILOSO, A. M. R. Application of Dohrlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 25, n. 3-5, p. 411-419, 1999.
- [45] TSUYUMU, S.; ISHII, S.; NAKAMURA, M. Plate assay for differentiation of different pectinases. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, n. 9, p. 2509-2511, 1989.
- [46] UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. Campinas, 2003.

- 124 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [47] VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J. F.; HOURS, R. A.; CASCONI, O. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 26, n. 2, p. 107-110, 1993.
- [48] WHITAKER, J. R. Pectic enzymes. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 2nd edition, New York, p. 425-436, 1994.
- [49] ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochem.**, v. 35, n. 8, p. 825-830, 2000.

6 - AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida.