



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLY TERASSI BERSANETI

NISTOSE DE *Bacillus subtilis* natto:
ATIVIDADE PREBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE UM
REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA CONSERVAÇÃO DE
AMORA-PRETA

GABRIELLY TERASSI BERSANETI

NISTOSE DE *Bacillus subtilis* natto:
ATIVIDADE PREBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE UM
REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA CONSERVAÇÃO DE
AMORA-PRETA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito ao título de Doutorado em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Co-orientadora: Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B535 Bersaneti, Gabrielly Terassi.
Nistose de *Bacillus subtilis* natto: atividade prebiótica e desenvolvimento de um revestimento comestível para conservação de amora-preta / Gabrielly Terassi Bersaneti. - Londrina, 2020.
110 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.
Coorientador: Suzana Mali.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Fruto-oligossacarídeos; - Tese. 2. Filmes comestíveis; - Tese. 3. Probióticos, - Tese. 4. Teste de aceitação - Tese. I. Pedrine Colabone Celligoi, Maria Antonia . II. Mali, Suzana. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

GABRIELLY TERASSI BERSANETI

NISTOSE DE *Bacillus subtilis* natto:
ATIVIDADE PREBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE UM
REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA CONSERVAÇÃO DE AMORA-
PRETA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para o título de Doutorado em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia P.
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Profa. Dra. Sandra Helena Prudêncio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de março de 2020.

“E tudo o que pedires em oração, se creres, receberes”.

Mateus 21:22

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial a minha orientadora professora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, por toda a paciência, pelos conhecimentos transmitidos por todo esse período, pelas oportunidades e crescimento que me proporcionou e principalmente por ter depositado sua confiança em mim ao longo desses anos e pela amizade que sempre levarei comigo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

A minha co-orientadora professora Susana Mali de Oliveira pela grande ajuda e dedicação com relação à aplicação deste estudo. Obrigada por sempre estar presente.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, em especial ao técnico do laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, por todo auxílio e colaboração com essa pesquisa

As professoras Sandra Helena Prudêncio e Sandra Garcia por toda parceria e colaboração neste estudo.

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por me guiarem e por todas as bençãos ao longo desta caminhada.

Ao meu noivo, Derique por estar comigo nos dias difíceis e dar apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigado por tudo!

Aos meus pais, Valdirene e Valterney, e Irmãos Danielly, Geovana e Felipe por terem me incentivado a continuar lutando pelos meus sonhos.

Aos meus avós, Armelindo e Agenir, por todo amor e apoio durante esta caminhada.

As amigas e companheiras de laboratório que sentirei muitas saudades Reginara, Júlia, Janaína, Amanda, Victória e Talita por compartilharem preocupações, experiências e trabalho. Obrigada pelo companheirismo, amizade e parceria!

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu eterno agradecimento.

BERSANETI, Gabrielly Terassi. **Nistose de *Bacillus subtilis* natto**: atividade prebiótica e desenvolvimento de um revestimento comestível para conservação de amora-preta - 2020. 115 f. Defesa (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Pr.

RESUMO

Com a demanda por melhores condições de saúde e bem-estar, novos produtos funcionais são tendência no mercado atual. Assim, revestimentos comestíveis com adição de ingredientes como a nistose são alternativas, para o consumo diário de prebióticos, além de aumentar o prazo de validade dos produtos minimamente processados. A nistose é um fruto-oligossacarídeo sintetizado pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto com atividade prebiótica. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram sintetizar nistose e avaliar sua atividade prebiótica em revestimentos comestíveis de amido-nistose, bem como testar a ação do revestimento na qualidade pós-colheita em frutos de amoras-pretas. Os resultados demonstraram que os filmes exibiram função prebiótica, sendo a única fonte para o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Quando aplicados os revestimentos em frutos de amoras-pretas mantiveram a firmeza e o conteúdo de antocianina. As contagens para mesófilos, psicrotróficos, leveduras e bolores permaneceram em níveis aceitáveis durante 7 dias. A avaliação sensorial revelou que os frutos revestidos tiveram boa aceitação e intenção de compra. O revestimento de amido-nistose é um produto biotecnológico e mostrou potencial para a aplicação na indústria de alimentos, por conter propriedades funcionais e aumentar o prazo de validade dos frutos.

Palavras-chave: Fruto-oligossacarídeos. *Bacillus subtilis*. Filmes comestíveis. Probióticos. Teste de aceitação.

BERSANETI, Gabrielly Terassi. **Nystose of *Bacillus subtilis* natto**: prebiotic activity and development of an edible coating for blackberry conservation - 2020. 115 p. Defense (Doctorate in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Pr.

ABSTRACT

With the demand for better health and welfare, new functional products are a trend in the current market. Thus, edible coatings with the addition of ingredients such as nystose are alternatives for the daily consumption of prebiotics, in addition to increasing the validity of minimally processed products. Nystose is a fructooligosaccharide synthesized by the levansucrase of *Bacillus subtilis* natto with prebiotic activity. Thus, the objectives of this work were to synthesize nystose and evaluate its prebiotic activity in edible coatings starch-nystose, as well as to test the action of the coating on post-harvest quality in blackberry fruits. The results showed that the films exhibited prebiotic function, being the only source for the growth of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. When applied to blackberry fruit coatings, they maintained their firmness and anthocyanin content. The counts for mesophilic, psychrotrophic, yeasts and molds remained at acceptable levels for 7 days. The sensory evaluation revealed that the coated fruits had good acceptance and purchase intention. The starch-nystose coating is a biotechnological product and has shown potential for application in the food industry, as it contains functional properties and increases the fruit's shelf life.

Keywords: Fructooligosaccharides. *Bacillus subtilis*. Edible films. Probiotic. Acceptance test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação de fruto-oligossacarídeos e levana catalisados por levanasacarase (Fructosyl-LS refere-se ao intermediário frutosil-enzima)	16
Figura 2 – Reações enzimáticas catalisadas pela levanasacarase microbiana.....	21
Figura 3 – Estrutura química da (a) amilose e (b) amilopectina	24
Figura 4 – Formação de uma cobertura comestível: (a) imersão do fruto na solução filmogênica, (b) atração entre os compostos diluídos na solução filmogênica e a superfície dos frutos por adsorção, (c) fruto com a cobertura	29
Figura 5 – Etapas do processo: (A) síntese de nistose pela levanasacarase de <i>B.subtilis natto</i> ; (B) desenvolvimento de filmes de amido-nistose; (C) avaliação da atividade prebiótica; (D) revestimento das amoras-pretas, caracterização e análise sensorial.....	36
Figura 6 – Ficha de teste afetivo para frutos de amora-preta com e sem o revestimento comestível.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revestimentos comestíveis utilizados em frutas	29
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	13
3.2	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	15
3.2.1	Atividade Prebiótica Dos Fruto-oligossacarídeos E Benefícios Para Saúde	17
3.2.2	Fontes de Fruto-oligossacarídeos	19
3.2.3	Fruto-oligossacarídeos em Alimentos	21
3.3	REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS	23
3.3.1	Revestimentos em Alimentos	26
3.3.2	Aplicação em Frutas.....	28
3.3.2.1	Fruto de amora-preta.....	30
3.4	AVALIAÇÃO SENSORIAL	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MICROORGANISMO E PRESERVAÇÃO.....	36
4.1.1	Inóculo e Quantificação da Biomassa	37
4.2	SÍNTESE DE NISTOSE PELA LEVANASACARASE	37
4.2.1	Purificação e Quantificação da Nistose	38
4.3	DESENVOLVIMENTO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS	38
4.4	ATIVIDADE PREBIÓTICA DOS FILMES COMESTÍVEIS DE AMIDO-NISTOSE	39
4.4.1	Quantificação de Ácidos Orgânicos.....	40
4.5	APLICAÇÃO DOS REVESTIMENTOS AMIDO-NISTOSE EM AMORAS-PRETAS	41
4.5.1	Análises das Amoras-Pretas Durante o Armazenamento	41
4.5.1.1	Perda de massa (%).....	41
4.5.1.2	Firmeza	41
4.5.1.3	Sólidos solúveis.....	42

4.5.1.4	pH e acidez titulável	42
4.5.1.5	Conteúdo de antocianinas	42
4.5.1.6	Ensaio microbiológicos	42
4.6	AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS FRUTOS DE AMORA-PRETA	43
4.6.1	Teste de Aceitação	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	ARTIGO I	45
5.2	ARTIGO II	66
5.3	ARTIGO III	93
5.4	PATENTE I	94
5.5	PATENTE II	95
5.6	PATENTE III	96
5.7	CAPÍTULO DE LIVRO	97
	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS.....	99

1. INTRODUÇÃO

Os prebióticos são substratos seletivamente utilizados por microrganismos hospedeiros, conferindo benefícios à saúde, geralmente são carboidratos de baixa massa molecular que não são metabolizados por enzimas digestivas humanas e regulam positivamente a composição e a atividade da microbiota intestinal.

Dentre os prebióticos, os fruto-oligossacarídeos (1-cestose, nistose e frutofuranosil nistose, 6-cestose, neocestose e neonistose) podem ser sintetizados pela enzima levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto utilizando a sacarose como fonte de carbono. A nistose é um fruto-oligossacarídeo com propriedades prebióticas confirmadas e assim estimulam o crescimento da microbiota benéfica do cólon, predominantemente lactobacilos e as bifidobactérias, que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

Os filmes e revestimentos comestíveis causam uma atmosfera modificada no interior do fruto, além disso, são também uma alternativa para incorporação de ingredientes ativos, como aromas, vitaminas, antimicrobianos, antioxidantes e prebióticos em diferentes matrizes. Dentre os prebióticos, o fruto-oligossacarídeo nistose, tem se destacado pelo crescimento de probióticos, além de melhorar as propriedades mecânicas do revestimento ao qual está incorporado protegendo os alimentos, levando assim ao aumento da vida útil.

O mercado de alimentos, aponta por produtos saudáveis, que melhoram a qualidade de vida e proporcionam benefício à saúde. Deste modo as indústrias buscam por produtos naturais, com alto valor nutritivo e com maior vida útil. Assim, a associação de um prebiótico microbiano sustentável com um revestimento comestível de amido pode ser uma alternativa para os consumidores.

Considerando a tendência de mercado e a preocupação da população por alimentos mais saudáveis e com menores impactos ao meio ambiente, essa pesquisa desenvolveu um filme comestível, adicionado do prebiótico nistose, para revestir amoras-pretas, que além de adicionar um valor nutricional também proporciona um aumento da vida útil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade prebiótica *in vitro* da nistose sintetizada pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto em revestimentos comestíveis para aplicação na conservação de amoras-pretas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nistose pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto;
- Desenvolver e caracterizar os revestimentos comestíveis de amido-nistose;
- Avaliar a atividade prebiótica *in vitro* dos revestimentos amido-nistose pelo crescimento das linhagens probióticas;
- Revestir e caracterizar os frutos de amoras-pretas com o filme de amido-nistose por análises físicas, químicas e microbiológicas;
- Avaliar os atributos sensoriais dos frutos revestidos pelo teste de aceitação e intenção de compra.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A ideia de alimento funcional surgiu inicialmente em 1920 através da utilização do iodo como meio de prevenção e tratamento para o bócio, apresentando assim, uma ação fisiológica além da função de nutrir. No entanto, o conceito regulamentado de alimento funcional foi utilizado pela primeira vez no Japão no final da década de 1980 em virtude da crescente incidência das doenças crônicas não transmissíveis na população japonesa, principalmente entre os idosos (BIANCO, 2008; SANTOS, 2011).

A procura por alimentos considerados funcionais têm aumentado em consequência do conhecimento sobre a relação do alimento com a saúde, também pelo aumento das comprovações científicas sobre suas funcionalidades, da necessidade de prevenir doenças ao invés de curá-las (VIDAL et al., 2012; VIALTA, MADI, 2018). O interesse por uma alimentação saudável, que nutra e promova a saúde, têm a preferência dos consumidores, pois estes alimentos são ricos em nutrientes que fortalecem o organismo (SILVA, ORLANDELLI, 2019).

Esses alimentos auxiliam também no funcionamento fisiológico e metabólico, trazendo benefícios tanto para a saúde física quanto mental, além de prevenir o surgimento de doenças crônicas degenerativas, uma vez que apresentam em sua composição substâncias bioativas (HENRIQUE et al., 2018).

Para um alimento ser considerado funcional, ele deve obedecer alguns critérios: exercer ação metabólica ou fisiológica que contribua para a saúde física e para a diminuição de morbidades crônicas; integrar a alimentação usual; ter efeitos positivos em quantidades não tóxicas, perdurando mesmo após suspensão de sua ingestão. Os alimentos funcionais não são destinados ao tratamento ou à cura das doenças (BERNARDES et al., 2010).

As alegações funcionais e de saúde permitidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 1999, 2002) estão associadas à presença de: ácidos graxos (família do ômega 3), carotenoides (licopeno, luteína, zeaxantina), fibras alimentares (beta-glucana, dextrina resistente, goma

guar, inulina, lactulose, polidextrose, psillium, quitosana e fruto-oligossacarídeos), fitoesteróis, polióis (manitol, xilitol, sorbitol) e microrganismos probióticos.

A ANVISA define propriedade funcional e estabelece as diretrizes para sua utilização e as condições de registro para essas alegações (COSTA; ROSA, 2016). As diretrizes da resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999) são: a alegação é permitida em caráter opcional; o alimento ou ingrediente, além de funções básicas, quando se tratar de nutriente que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro sem supervisão médica. Para nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica, não é necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem; as alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde.

Os alimentos prebióticos definidos por Gibson e Roberfroid, em 1995, são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de certas bactérias do cólon, melhorando a saúde (COSTA; BORÉM, 2003). Pelas características os prebióticos têm sido empregados na elaboração de alimentos funcionais, proporcionando diversos benefícios para a saúde, como: redução dos níveis de lipídeos, triacilgliceróis, colesterol, insulina e glicose no sangue, diminuição da duração do trânsito gastrointestinal. As frutanas podem ser incorporadas aos alimentos pelas suas propriedades funcionais tecnológicas como emulsionantes, estabilizadores, agentes de geleificação, edulcorantes, entre outros (FIGUEROA ARRIAGA, 2017).

Os prebióticos têm sido utilizados pela indústria alimentícia como ingredientes em diferentes produtos (DÁVILA et al., 2019) como laticínios, confeitos, formulações alimentares para bebês, pães integrais, barras de cereais, chocolates (ASHWINI et al., 2019), filmes e revestimentos comestíveis (BERSANETI et al., 2019). Pelas aplicações industriais, o mercado mundial de prebióticos tende a crescer, em 2015 atingiu a marca de \$ 2,90 bilhões e a previsão para 2025 a expectativa é que atingirá U\$ 10,55 bilhões (MANO et al., 2017).

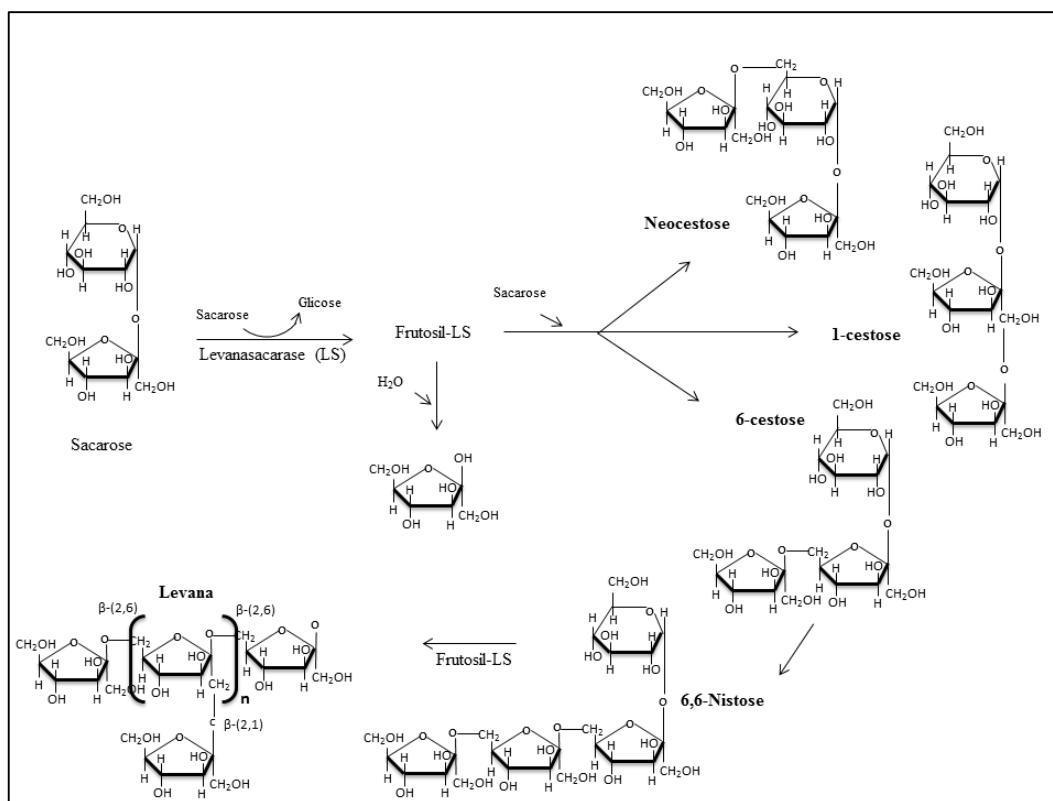
Esses alimentos estimulam a inserção de novas indústrias no mercado e a produção de alimentos com adição de ingredientes funcionais prebióticos empregam técnicas da biotecnologia, nanotecnologia e engenharia genética para melhorar a qualidade dos seus produtos (SOUSA et al., 2013).

3.2 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os fruto-oligossacarídeos são oligômeros da frutose, nos quais as unidades frutossil estão ligadas na posição β -(2→1) da sacarose, com uma molécula de glicose terminal o que diferencia de outros oligômeros (YUN, 1996). Os principais fruto-oligossacarídeos incluem 1-cestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1- β -frutofuranosil nistose (GF₄). Os ⁶F-FOS representam 6-cestose com unidades de frutose conectadas por uma ligação β -(2→6), e ⁶G-FOSs são classificados como neoFOSs (neocestose e neonistose) e apresentam ligação do tipo β -(2→6) entre a frutose e unidades glicosil de sacarose (GUIO et al., 2012; LINDE et al., 2012).

O intermediário 6,6-nistose é formado a partir de 6-cestose e usado como base para a formação de levana (SANTOS-MORIANO et al., 2015), esquema mostrado na Figura 1. A levana é uma frutana que consiste em resíduos de D-frutose unidos por ligações β -glicosídicas (2→6), podendo apresentar pontos de ramificações em β -(2→1) (SRIKANTH et al., 2015).

Figura 1 - Formação de fruto-oligossacarídeos e levana catalisados pela levanasacarase (Frutosil-LS refere-se ao intermediário frutosil-enzima)



Fonte: Bersaneti, Baldo, Celligoi (2019)

Estudos tem demonstrado que os fruto-oligossacarídeos atuam na redução de fosfolípidios, triacilglicerol e níveis de colesterol, ajudam na absorção de cálcio e magnésio no intestino e auxiliam no tratamento da obesidade (KORCZ, KERÉNYI, VARGA, 2018; NUNES, GARRIDO, 2018; ASHWINI et al., 2019). Os fruto-oligossacarídeos podem ser utilizados como substituto de açúcar em confeitos, gomas, bebidas, dentre outros, por não serem cariogênicos, não cristalizam, não precipitam e não deixam sabor residual, possuem baixo valor calórico, podendo ser consumidos por diabéticos (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; YUN, 1996).

São ingredientes não digeríveis, classificados como prebióticos por apresentar ação benéfica no organismo, estimulando o crescimento e a atividade das bactérias presentes no cólon, também são responsáveis por transformar a microbiota colônica em microbiota saudável, ainda são capazes de induzir

efeitos fisiológicos benéficos para a saúde, além de, serem metabolizados por bactérias nativas e benéficas no cólon (VIZZOTTO, KROLOW, TEIXEIRA, 2010).

Em função dos benefícios mencionados, os fruto-oligossacarídeos tem atraído atenção dos consumidores que buscam por alimentos com adição de moléculas bioativas como ingredientes funcionais que é tendência nos dias atuais para auxiliar na prevenção de doenças e causar efeitos benéficos na saúde do indivíduo.

3.2.1 Atividade Prebiótica dos Fruto-oligossacarídeos e Benefícios para Saúde

De acordo com a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), o termo prebiótico refere-se a um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde (GIBSON et al., 2017). Frequentemente, os prebióticos são carboidratos de baixa massa molecular, não são metabolizados por enzimas digestivas humanas, regulam positivamente a composição e a atividade da microbiota intestinal (MOHANTY et al., 2018).

Para um componente alimentar ser classificado como prebiótico, ao menos três critérios são requeridos: o substrato não pode ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou no intestino delgado; deve ser seletivo no crescimento de bactérias do intestino grosso, como as bifidobactérias, e a fermentação do substrato deve induzir efeitos benéficos na luz intestinal do hospedeiro (PARRACHO, McCARTENEY, GIBSON, 2007).

O consumo regular de prebióticos e probióticos pode ser empregado na profilaxia de uma série de condições patológicas principalmente na área da gastroenterologia (CHERMESH & ELIAKIM, 2006).

As bactérias probióticas são estimuladas pelo prebiótico fruto-oligossacarídeos que chegam intactos no intestino, desta maneira causam efeitos benéficos no hospedeiro. Ao fermentar os fruto-oligossacarídeos as bactérias benéficas são mais ativas do que as patogênicas. Com a fermentação dessa frutanas os microrganismos intestinais sintetizam ácidos graxos de cadeia curta como propionato, butirato e o acetato (ENDERS et al., 2015). Esses contribuem para formar combustível para o cólon e suas células epiteliais,

gerando assim energia para célula. Esse metabolismo favorece o não crescimento das células patogênicas, pela redução do pH de colonização e com isso fortalece o sistema imunológico (DAMIÃO et al., 2014), melhorando a síndrome do intestino irritável e doença de Crohn (ASHWINI et al., 2019). O butirato produzido pode ser um modulador da cromatina, atuando como inibidor da proliferação celular no músculo liso vascular, responsável por doenças vasculares, como a aterosclerose e hipertensão (RANGANNA et al., 2007).

Os prebióticos também proporcionam aumento do número de bactérias benéficas no intestino humano, predominantemente os lactobacilos e as bifidobactérias que aumentam sua atividade metabólica através do fornecimento desses substratos (BIELECKA et al., 2002). Essas bactérias ajudam no equilíbrio da microbiota intestinal, reduzindo os efeitos das doenças intestinais, inibindo a colonização por *Helicobacter pylori* que está associado à ocorrência de gastrite, úlcera hepática e câncer gástrico. Por apresentarem atividade anti-inflamatória, também estimulam a resposta imunológica e ajudam a reduzir os danos vasculares, evitando a formação de coágulos e de placas de ateroma (RAIZEL et al., 2011; VIDAL, 2012).

Alguns estudos avaliaram o potencial prebiótico de fruto-oligossacarídeos microbiano e comprovaram que essa biomolécula pode ser metabolizada por linhagens de *Lactobacillus*, demonstrando ter uma eficiente ação prebiótica (SILVA et al., 2016). Bersaneti et al. (2019; 2017) incorporaram a nistose um fruto-oligossacarídeo sintetizado pela levanasacarase de *B. subtilis*, em revestimentos de amido-nistose e comprovaram o crescimento de cinco linhagens de bactérias lácticas, com apenas essa fonte de carbono, atestando o efeito prebiótico desse filme com nistose.

Os fruto-oligossacarídeos também auxiliam na redução dos níveis de colesterol, minimizando os riscos de doenças cardiovasculares, diminuição na síntese de triacilglicerol no fígado (KORCZ, KERÉNYI, VARGA, 2018; DELZENNE, KOK, 1999). Influenciam na redução da obesidade, uma vez que regulam a expressão de hormônios anoréxicos intestinais, como o peptídeo glucagon-1 e leptina, também há uma diminuição dos níveis de hormônios que atuam na gênese da obesidade, como a grelina (FARIAS et al., 2019). Também

umentam a absorção de cálcio, melhorando assim a densidade dos ossos (COUDRAY et al., 2003).

3.2.2 Fontes de Fruto-oligossacarídeos

As principais fontes são vegetais e microbianas. Dentre os vegetais estão principalmente presente em aspargos, alhos, cebolas, bananas, alcachofra de Jerusalém e chicória, farelo e farinha de trigo, e cevada (ROBERFROID, 1993; GIBSON, WILLIS, VAN LOO, 1994)

Porém do ponto de vista industrial, a obtenção dos fruto-oligossacarídeos a partir de plantas ou por glicosilação química não é economicamente viável, devido aos baixos rendimentos e altos custos (SINGH, SINGH, KENNEDY, 2016). Sendo assim, a síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase fornece uma alternativa conveniente e rentável, pois as enzimas são naturais, não tóxicas e com alta especificidade, de fácil obtenção e com possibilidade de separação do produto, assim sua utilização elimina as dificuldades do metabolismo microbiano, durante a produção industrial (BERSANETI et al., 2017).

Nas indústrias, os fruto-oligossacarídeos são obtidos a partir da hidrólise enzimática da inulina ou por reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose, pela ação da enzima β -frutofuranosidase e os fruto-oligossacarídeos sintetizados contém grau de polimerização entre 2 a 4 unidades de frutossil unidas por ligações $\beta(2\rightarrow1)$ com resíduo de glicose terminal (SILVA et al., 2007).

A produção microbiana ocorre por diferentes cepas destacando *Bacillus circulans* (OSEGUERA; GUERECA; LOPEZ MUNGUIA, 1996), *Bacillus amyloliquefaciens* (TIAN; INTHANAVONG; KARBOUNE, 2011), *Bacillus sp.* (BELGHITH et al. 2012), *Geobacillus stearothermophilus* (INTHANAVONG et al., 2013) e o *B. subtilis* natto, que tem sido muito estudado pelo nosso grupo de pesquisa, por apresentar potencial na produção de fruto-oligossacarídeos e levana por fermentação. Bersaneti et al. (2017) avaliaram a síntese dos fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase de *B. subtilis* natto utilizando o substrato sacarose em 420 g/L atingiu uma produção de 69,8 g/L.

Silva, Borsato, Celligoi (2014b) otimizaram a síntese de fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase utilizando o delineamento composto central variando as concentrações de sacarose, pH e temperatura. A melhor produção foi de 54,86 g/L com 334 g/L de sacarose, pH 6,0 e 45,8 °C.

A levanasacarase (E.C. 2.4.1.10 Sacarose-2,6- β -D-Frutana-2,6- β -D-frutosiltransferase) utilizada por nosso grupo de pesquisa pertence à família 68 das hidrolases glicosídicas (GH) é capaz de sintetizar altas concentrações de fruto-oligossacarídeo e levana utilizando sacarose como substrato (BERSANETI et al., 2017).

De acordo com a classificação encontrada na base de dados (carbohydrate active enzymes) esta enzima possui três atividades (Figura 2): (1) hidrólise que utiliza água e libera glicose e frutose, (2) transfrutosilação que utiliza monossacarídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos como aceptores e (3) polimerização que utiliza a cadeia crescente de frutanas como acceptor e sintetiza a levana (LI et al., 2015).

A levanasacarase pode catalisar a formação dos prebióticos FOS e/ou levana transferindo resíduos frutosil de uma molécula doadora não ativada, como a sacarose, a uma molécula aceptora. A reação de transfrutosilação catalisada pela enzima, transfere resíduos frutosil a uma molécula aceptora, incluindo mono-, FOS (oligomerização) ou a uma cadeia crescente de frutana (polimerização) (MARTINEZ-FLEITES et al., 2005). A eficiência da levanasacarase pode ser prejudicada, quando a atividade hidrolítica for alta, resultando na liberação de glicose e frutose, podendo causar a produção de substâncias indesejáveis como monossacarídeos em vez de fruto-oligossacarídeos e levana. A eficiência catalítica da levanasacarase difere dependendo da fonte microbiana (HILL et al., 2019).

formulações de sorvetes, cremes e sobremesas (SPERANZA et al., 2018; VALENCIA et al., 2016), em barras de cereais e biscoitos para elevar o conteúdo de fibras alimentares (SILVA, CONTI-SILVA, 2018; CELLIGOI et al., 2014), em bebidas lácteas e leites fermentados (CELLIGOI et al. 2018; DELGADO-FERNANDEZ et al., 2019), além disso, podem ser incorporados em filmes e revestimentos comestíveis, a fim de, aumentar a vida de prateleira dos produtos (BERSANETI et al., 2019; BAMBACE, ALVAREZ, MOREIRA, 2019). Também podem ser empregados em produtos alimentares para animais (STRICKLING et al., 2000).

Segundo Xavier-Santos et al. (2019) os fruto-oligossacarídeos podem ser usados em produtos dietéticos como pudins, pois os prebióticos apresentam 34 % menos de calorias, além de melhorar a textura e propriedades sensoriais do produto.

Outros produtos também podem ter em sua composição moléculas prebióticas, como barras de cereais com adição de fruto-oligossacarídeos microbiano. Celligoi et al. (2014) desenvolveram uma barra de cereal acrescida de fruto-oligossacarídeos de *B. Subtilis* natto e demonstraram que as barras adicionadas de FOS quando comparadas com a barra sem o prebiótico não apresentaram diferenças significativas na análise sensorial, indicando que esta molécula não influenciou no grau de apreciação do produto e agregou um valor nutricional.

Vários produtos alimentícios à base de água, como laticínios, molhos e sobremesas congeladas podem ter a gordura substituída por oligossacarídeos ou inulina. Na maioria das vezes 1 g de gordura pode ser substituída por 0,35 g de fruto-oligossacarídeos ou inulina (KUMAR, SRIPADA, POORNACHANDRA, 2018).

Na fabricação de sorvetes quando os oligossacarídeos prebióticos foram adicionados, diminuíram significativamente a temperatura, o tempo de fusão e tempo descanso da formulação, também melhoraram a leveza e o tamanho dos cristais de gelo. Assim, a substituição da gordura do leite por moléculas prebióticas em sorvetes constitui uma opção para melhorar os aspectos nutricionais e também a desenvolver um alimento com propriedades funcionais (BALTHAZAR et al., 2017).

Os oligossacarídeos também são fortes inibidores da degradação do amido, o que os tornou úteis para a indústria de laticínios e panificação. Em produtos lácteos os oligossacarídeos melhoram o crescimento das bactérias benéficas presentes no intestino (NOBRE et al., 2015).

De acordo com Ahmadi et al. (2019) o consumo diário de produtos com oligossacarídeos como prebióticos, pode melhorar a intolerância à glicose, resistência à insulina, aumentar os níveis de ácidos graxos de cadeia curta no intestino e reduzir marcadores inflamatórios da mucosa e a hiper-permeabilidade intestinal.

3.3 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS

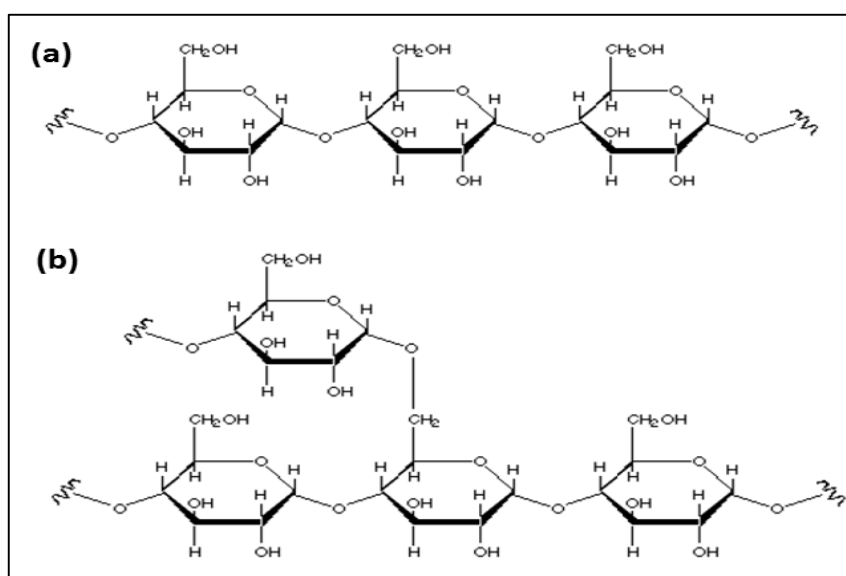
Filmes e revestimentos comestíveis são definidos como uma fina camada de material que proporciona uma barreira contra umidade, oxigênio e movimento de solutos para o alimento (GUILBERT, 1986), sendo utilizados na proteção dos alimentos a fim de aumentar sua vida útil.

Os revestimentos classificados como comestíveis são aplicados diretamente sobre a superfície do alimento a ser revestido, configurando membranas delgadas, imperceptíveis a olho nu e com diversas características estruturais, que são dependentes da formulação da solução filmogênica precursora (ASSIS; BRITTO, 2014). Como estas coberturas passam a fazer parte do alimento a ser consumido, os materiais empregados em sua formação devem ser considerados GRAS (*Generally Recognized as safe*), ou seja, seguros para o uso em alimentos (FDA, 2013).

Diversos polímeros biodegradáveis têm sido estudados no desenvolvimento de filmes comestíveis, entretanto o custo ainda é alto e a produção é baixa em relação ao dos polímeros convencionais. Neste contexto, o amido é o material mais estudado, principalmente por ser uma matéria-prima abundante e disponível em todo o mundo, apresentando muitas possibilidades de modificação química, física ou genética, originando filmes e revestimentos com diversas possibilidades de aplicação (GONTARD, GUILBERT, 1996; MALI et al., 2005).

Quimicamente, o amido é constituído de dois principais componentes macromoleculares: amilose e amilopectina (Figura 3). A amilose é um polímero de glicose linear, com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e possui excelente capacidade de formar revestimentos (CAMPOS, GERSCHENSON, FLORES 2011). Enquanto que a amilopectina é um polímero altamente ramificado, com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ramificações ligadas por ($\alpha 1 \rightarrow 6$) pontos estes que ocorrem a cada 25-30 unidades de glicose (DURRANI; DONALD 1995; LIU, 2005).

Figura 3 - Estrutura química da (a) amilose e (b) amilopectina.



Fonte: Jonhed (2006).

Revestimentos comestíveis ou biodegradáveis de amido podem ser obtidos por duas técnicas principais: *casting* com subsequente secagem (via úmida) ou por processamento termoplástico (via seca) (PAES et al., 2008). Dependendo do tipo de amido e sob altas temperaturas (65 e 100 °C), ocorre um processo irreversível de gelatinização, no qual os grânulos incham, dependendo da quantidade de água disponível, provocando a quebra das ligações de hidrogênio que ocorrem entre as cadeias de amilose e amilopectina (CARVALHO, 2008; ZHONG et al., 2009). Após o processo de gelatinização aditivos podem ser incluídos na mistura ou serem preparados de forma independente.

No geral, as propriedades funcionais dos revestimentos comestíveis dependem das suas características, destacando principalmente o potencial para transportar ingredientes ativos (PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005), como agentes antimicrobianos e antioxidantes a fim de melhorar em geral a proteção que o revestimento já fornece (JIMENÉZ et al., 2012). Também é possível aprimorar as propriedades sensoriais dos alimentos revestidos desde que, contenham vários componentes como aromatizantes, corantes, edulcorantes (BOURTOOM, 2008), e melhora-los pela adição de ingredientes funcionais como, por exemplo, prebióticos e/ou probióticos, pois trazem benefícios a saúde.

Dentre os prebióticos destacam-se os oligossacarídeos, que são solúveis em água, tais como fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos xilo-oligossacarídeos, oligossacarídeos de quitosana, oligossacarídeos de soja, e inulina (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012).

Os fruto-oligossacarídeos podem melhorar a taxa de dissolução de água no preparo dos revestimentos com matriz de amido, também podem afetar as propriedades mecânicas dos mesmos, além de agregar sua atividade prebiótica, utilizando baixas temperaturas (40-60 °C) (BERSANETI et al., 2019; 2016).

Filmes à base de amido de mandioca têm sido amplamente utilizados no revestimento de frutas. Contudo, é necessário incorporar outros polímeros ou compostos bioativos para melhorar suas propriedades mecânicas. Em estudo recente, a combinação de níveis mais altos de amido e quitosana foram responsáveis pela redução na saída do vapor de água dos filmes, uma propriedade interessante para o revestimento de frutas (SILVA et al., 2019).

Tang et al. (2015) prepararam revestimentos com adição de prebióticos (fruto-oligossacarídeo e inulina) e matriz de amido de milho. Os resultados mostraram atividade prebiótica *in vitro* presente nos revestimentos, indicando que o prebiótico não foi afetado pelo processo de preparação (*casting*).

Romano et al. (2014) estudaram viabilidade de bactérias lácticas em revestimentos com matriz de metilcelulose, adicionada de fruto-oligossacarídeos de origem comercial. Os autores relataram que com ausência dos FOS houve desidratação dos revestimentos, fato este que reduziu significativamente as bactérias viáveis.

Röble et al. (2011) aplicaram o revestimento comestível com matriz de alginato em maçãs minimamente processadas, contendo inulina e oligofrutose como prebióticos. Os impactos do revestimento sobre a qualidade e valor nutricional das maçãs foram ligeiramente afetados em relação à qualidade e ao aspecto sensorial, também resultaram vários efeitos benéficos tais como aumento na vida de prateleira, retenção de compostos bioativos e voláteis.

As indústrias de alimentos buscam filmes e revestimentos comestíveis que possam ser utilizados em áreas voltadas ao consumidor, com intuito de agregar valor aos seus produtos, enquanto aumentam a vida útil. Também há estudos voltados para os revestimentos comestíveis, afim de tentar solucionar problemas ligados à poluição causada por resíduos plásticos, assim a intenção é a substituição por materiais biodegradáveis (JIMENÉZ et al., 2012).

Revestimentos a base de amido são comercializados pela Novamont, uma empresa italiana, que desenvolveu o MaterBi®, um material a base de amido, disponível na forma granular que pode ser processado como material termoplástico, formando filmes ou sacos. Outros produtos disponíveis são Bio-P-TM®, comercializado por Bioenvelope (Japão) e BIOPAR® (Biop Biopolymer Technologies AG, Alemanha), são constituídos de materiais inteiramente biodegradáveis (JIMENÉZ et al., 2012).

3.3.1 Revestimentos em Alimentos

A aplicação comercial de revestimentos de amido ou de outras moléculas biológicas em alimentos depende de alguns fatores como custo, processo de produção e propriedades destes materiais (MELLINAS et al., 2016; MALI, GROSSMANN, YAMASHITA, 2010).

A eficácia de um revestimento comestível está na preservação da qualidade dos alimentos e prolongamento da vida útil, sendo intimamente relacionado com as suas propriedades de barreira à umidade, oxigênio e dióxido de carbono, que depende principalmente da composição química e da estrutura do material utilizado como revestimento, também das características do produto revestido, e as condições de armazenamento (LIN; ZHAO, 2007).

Aplicação de coberturas comestíveis protetoras é uma tecnologia alternativa cada vez mais divulgada, e avaliada como um procedimento viável, para elevar a vida útil de frutos e hortaliças, processadas ou não. Esses revestimentos não têm como objetivo substituir o uso dos materiais convencionais de embalagens ou mesmo elimina-los definitivamente do mercado, mas sim, de apresentar uma atuação funcional e coadjuvante, contribuindo para a preservação da textura e do valor nutricional do produto revestido, reduzindo assim, as trocas gasosas superficiais e a perda ou ganho excessivo de água (ASSIS, BRITTO, 2014).

Além disso, o revestimento pode prevenir a contaminação das frutas e hortaliças que leva à deterioração (como escurecimento, perda de sabor e textura, diminuição da qualidade das frutas e vegetais) apresentando riscos para os consumidores, devido à presença de microrganismos patogênicos (HARRIS et al., 2003).

O desenvolvimento de revestimentos comestíveis e/ou biodegradáveis, com permeabilidade seletiva aos gases, pode ser promissor no controle da respiração de frutas e hortaliças, funcionando como uma embalagem de atmosfera modificada. Como o ar contém, normalmente, 21 % de oxigênio e apenas 0,03 % de gás carbônico, a modificação na concentração destes gases pode prolongar o período de armazenamento dos produtos revestidos (YAMASHITA et al., 2005; 2006).

A técnica mais comum e que tem se mostrado mais eficiente na formação de coberturas é a imersão. Embora o uso de pincel (CHLEBOWSKA-SMIGIEL, GNIEWOSZ, SWINCZAK, 2007) e o spray também tenham sido utilizados para alguns casos (ANDRADE, SKURTYS, OSORIO, 2012), a imersão é o procedimento que garante que toda a superfície entre em contato com a solução filmogênica, e uma leve agitação permite o desprendimento de bolhas, possibilitando uma deposição mais homogênea.

Os revestimentos podem ser aplicados em diferentes frutas e hortaliças frescas que são altamente perecíveis. As perdas durante a colheita e pós-colheita são devido ao manuseio, transporte e armazenamento, também há perdas consideráveis devido a microrganismos, insetos, respiração e transpiração, podendo chegar em até 50 % dependendo do produtos (TIWARI,

2014).

Portanto, os revestimentos comestíveis desempenham um papel muito importante para minimizar estas situações (DHALL, 2013; YOUSSEF, ALI, EMAM, 2015). Dentre as frutas e hortaliças revestidas estão: laranja, maçã, uva, cereja, mamão, limão, morango, manga, pêssego, etc, podendo-se encontrar a maçã, pêssego e a pêra minimamente processados, dentre outros. E hortaliças como: tomate, pepino, pimentão, sendo cenoura, batata-doce e cebola, minimamente processados (RAGHV, ARGARWAL, SAINI, 2016).

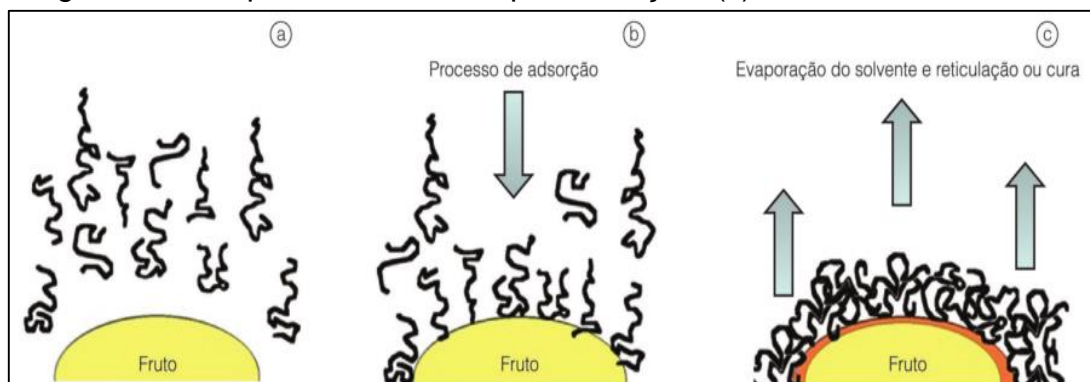
3.3.2 Aplicação em Frutas

A crescente demanda dos consumidores por frutas frescas com maior qualidade e valor nutritivo incentivou a indústria alimentar a desenvolver novos e melhores métodos para manter a qualidade dos alimentos aumentando sua vida útil (BARRY-RYAN et al., 2007). Há vários estudos recentes para tratamento pós-colheita, com o uso de revestimentos comestíveis, estes estão recebendo um crescente interesse pela indústria de alimentos (BAMBACE, ALVAREZ, MOREIRA, 2019; ALVAREZ, PONCE, MOREIRA, 2018; TURMANIDZE et al., 2016; FLORES-LÓPES et al., 2016).

Revestimentos comestíveis, a base de amido, permitem o controle de trocas gasosas em frutas e hortaliças, retardando sua senescência natural e prolongando a sua vida útil (VERSINO et al., 2016). O controle da umidade relativa (UR) e da temperatura de armazenamento também são importantes, pois estes fatores auxiliam na manutenção da qualidade do produto (FLORES-LÓPES et al., 2016). Contudo, a acumulação de CO₂ na atmosfera interna do fruto pode levar à fermentação anaeróbica e a produção de metabólitos fermentativos que contribuem para o desenvolvimento de odores e de gostos desagradáveis (LIN; ZHAO, 2007).

Ao imergir uma fruta em uma solução filmogênica como apresentado na Figura 4, forma-se uma cobertura pela deposição das espécies poliméricas dissolvidas no meio, estabelecendo ligações, fracas e fortes com a superfície da fruta (ASSIS; BRITTO, 2014).

Figura 4 - Formação de uma cobertura comestível: (a) imersão do fruto na solução filmogênica, (b) atração entre os compostos diluídos na solução filmogênica e a superfície dos frutos por adsorção, (c) fruto com a cobertura.



Fonte: Assis; Britto (2014).

A Tabela 1 descreve diferentes revestimentos comestíveis em frutas por diferentes autores. Esses dados demonstram a possibilidade de desenvolvimento desses novos materiais a serem empregados em frutas para a preservação da qualidade.

Tabela 1 - Revestimentos comestíveis utilizados em frutas

Frutas	Revestimento comestível	Autor
Mirtilo	Alginato, Inulina, oligofrutose	Bambace, Alvarez, Moreira (2019)
Maçã	Goma gelana e fibra de maçã	Bambace, Alvarez, Moreira (2018)
Manga	Quitossana	Silva et al. (2017)
Morango	<i>Aloe vera</i> e ácido ascórbico	Sogvar, Saba, Emamifar (2016)
Ameixa	Carboximetilcelulose, pectina	Panahirad et al. (2015)
Uva	Cera de carnaúba e FOS	Mira, Filho, Viola (2015)
Amora	Amido de mandioca	Pérez-Gallardo et al. (2014)
Pêssego	Pectina	Ayala-Zavala et al. (2013)
Papaia	Fécula de mandioca	Castricini et al. (2012)
Cereja	Alginato	Diaz-Mula et al. (2012)
Framboesa	Amido de milho e cera de abelha	Pérez-Gallardo et al. (2012)
Goiaba	Quitossana e amido	Soares et al., (2011)

A funcionalidade e o desempenho dos revestimentos comestíveis dependem principalmente do método de produção do revestimento e da capacidade deste aderir à superfície do alimento (DHANAPAL et al., 2012).

Assim, um parâmetro importante no revestimento é o teor de plastificante que pode causar efeitos nas propriedades funcionais dos revestimentos, dependendo da concentração utilizada e também do tipo de plastificante empregado como por exemplo o glicerol (CUQ et al., 1995; MALI et al., 2005).

A integridade do revestimento é um fator crítico que depende da flexibilidade, tensão superficial e adesão ao produto alimentar (VERSINO et al., 2016). Elevadas adições de plastificantes devem ser evitadas, as quais, muitas vezes, inviabilizam o uso da formulação protetora (COLZATO et al., 2011).

Revestimentos comestíveis podem melhorar as propriedades sensoriais dos produtos embalados, diminuir a perda de umidade e aumentar o valor nutricional dos mesmos (ZACTITI, KIECKBUSCH, 2006).

A maioria dos estudos sobre aplicações alimentares têm sido conduzidos em escala laboratorial, porém para produção em larga escala é necessário redução de custos e maior segurança, a fim de promover a viabilidade na comercialização de produtos biodegradáveis, sejam eles embalados ou revestidos (VERSINO et al., 2016).

3.3.2.1 Fruto de amora-preta

Os frutos da amoreira-preta apresentam vida útil relativamente curta, devido à sua estrutura frágil, alto metabolismo e ocorrência de doenças, perda de massa, alterações de firmeza e deterioração microbiológica, exigindo, portanto, cuidados na hora da colheita, manuseio, transporte e armazenamento (ANTUNES et al. 2003; 2014; MENEGUEL et al, 2008).

O armazenamento refrigerado é o método mais eficiente e o primeiro a ser utilizado quando se trata de manutenção da qualidade dos frutos, pois quando realizado de modo adequado, retarda os processos fisiológicos tais como a respiração, transpiração e produção de etileno, além de reduzir o desenvolvimento de podridões nos mesmos (SOUZA, 2013).

A refrigeração retarda a senescência do fruto, mas não retém com eficiência os compostos bioativos, fazendo-se necessários, outros tratamentos juntamente com a refrigeração para prolongar a vida útil dos frutos frescos de amoras-pretas (ANTUNES et al., 2014).

Neste sentido, pesquisas têm desenvolvido técnicas que permitam a manutenção da qualidade do fruto por mais tempo. Assim, associado à refrigeração, o armazenamento sob condição de atmosfera modificada ou controlada, quando utilizado adequadamente, resultam em benefícios adicionais quando destinados ao consumo *in natura*, a fim de preservar as características sensoriais e nutricionais da fruta até o seu consumo final (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009), reduzindo a atividade enzimática de degradação da parede celular da fruta, aumentando seu período de conservação e mantendo a aparência e a qualidade por maior tempo (ANTUNES et al., 2006).

Utilizando embalagens adequadas como filmes e revestimentos comestíveis se obtém atmosferas modificadas promissoras, pois promovem a redução da respiração e da produção de etileno, pela diminuição nos níveis de O₂ e aumento nos níveis de CO₂, contribuindo, assim, para retardar a senescência do fruto (KADER 2010; CORATO, 2019).

Oliveira et al. (2014) observaram em frutos de amora revestidos com matriz polimérica de quitosana, que quanto maior a temperatura de armazenamento, maior foi a perda de massa. Quando armazenados a 0 °C, a perda de massa foi de 4% em 18 dias, a 10 °C apresentaram uma perda de aproximadamente 22%. A adição dos revestimentos pode ser benéfica na manutenção da textura e qualidade dos frutos em baixas temperaturas.

Guerreiro et al. (2015) relataram que o teor de sólidos solúveis em morangos armazenados a 0.5 °C por 14 dias não foi significativamente afetado pelo uso de revestimento comestível à base de alginato e pectina. Indicando que os revestimentos não contribuem para redução dos sólidos solúveis, mas sim a variação de temperatura e a decomposição por microrganismos.

Os revestimentos possibilitam uma atmosfera modificada, isso reduz a atividade metabólica dos frutos, resultando em maiores teores de antocianinas (MENEHEL, BENASSI, YAMASHITA, 2008).

A amora é uma fruta pequena e caracteriza-se por proporcionar um alto retorno econômico, são reconhecidas como benéficas para a saúde humana, com propriedades ligadas à prevenção de doenças (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010). Seu fruto é altamente nutritivo, com 85 % de água, 10 % de carboidratos e elevado conteúdo de minerais, como cálcio e vitaminas A e B (ANTUNES, 2002), possuindo quantidades expressivas de compostos fenólicos e carotenoides, que podem auxiliar no combate a doenças degenerativas (FERREIRA et al. 2010).

As atividades biológicas das frutas vermelhas, incluindo a amora-preta, são parcialmente atribuídas ao elevado teor de fitoquímicos, como os flavonóides (antocianinas, flavonóis, e flavanóis), taninos (proantocianidinas, elagitaninos e galotaninos), estilbenóides (como o resveratrol), ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos) e lignanas (SEERAM, 2006).

A sua capacidade antioxidante é principalmente devido às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres, removendo o oxigênio ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os compostos presentes nos frutos também apresentam vários outros potenciais benefícios para saúde como redução do risco de doenças cardiovasculares (RENAUD; LORGERIL, 1992), melhora da visão (MATSUMOTO et al., 2003), têm propriedades antimicrobianas, anticarcinogênicas, vasodilatadoras e anticoagulantes (MULLEN et al., 2002; PAREDES-LÓPEZ et al., 2010; XIE et al., 2017).

Embora existam espécies nativas do gênero *Rubus* no Brasil, a amora só começou a ser estudada na década de 1970, e as primeiras variedades introduzidas no país foram da cultivar Brazos, Comanche e Cherokee, todas oriundas dos Estados Unidos, o maior produtor do mundo. Após um programa genético conduzido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), novas variedades brasileiras entraram no mercado, incluindo Tupy, lançada no final dos anos 80 (ANTUNES, 2002).

Tupy é a cultivar de amoreira-preta mais plantada no Brasil, ocupando posição de destaque também no México, onde é produzida principalmente para

exportação aos Estados Unidos (SILVA-MATOS, FURTADO, FARIAS, 2019; PEREIRA, 2008). É a cultivar mais plantada devido às características peculiares de suas frutas, pelo sabor equilibrado entre o açúcar e a acidez, pela sua rusticidade, hábito de crescimento ereto, alto vigor e desempenho produtivo (GONÇALVEZ et al., 2011), com frutos grandes de até 6 gramas, coloração preta e uniforme, consistente e firme, semente pequena e película resistente (SOUZA, 2013).

Além disso, apresenta frutos com boa aceitação no mercado *in natura*, devido ao seu tamanho, uniformidade, firmeza, coloração intensa e sabor. Outra característica que torna essa cultivar importante mundialmente é sua capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas e de manejo com baixo custo de produção (PALHARINI et al., 2015; ANTUNES et al., 2014).

Atualmente, esse setor busca por tecnologias que possibilitem expandir o período de armazenagem, com manutenção da qualidade da fruta sem alteração das características funcionais, permitindo um aumento da comercialização na forma *in natura*, possibilitando com isso maior retorno econômico ao produtor.

3.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nos últimos 20 anos, houve um importante progresso na ciência sensorial devido ao desenvolvimento de novas metodologias, incluindo testes rápidos para descrição de produtos e avanços no entendimento sobre as respostas de diferentes segmentos de consumidores (ALCANTARA, FREITAS-SÁ, 2018).

Os testes sensoriais são capazes de detectar particularidades dificilmente detectadas por outros procedimentos analíticos, e ainda avaliar se um produto é aceito pelo consumidor. Pode selecionar a matéria prima a ser utilizada em um novo produto, o efeito de processamento, a qualidade da textura, o sabor, a estabilidade de armazenamento, entre outros. Para alcançar o objetivo específico de cada análise, são elaborados métodos de avaliação diferenciados, visando à obtenção de respostas mais adequadas ao perfil pesquisado do produto (MUÑOZ et al., 1992; TEIXEIRA, 2009).

O instrumento de medida utilizado pela análise sensorial é o homem e, segundo Meilgaard et al. (1999), nenhum instrumento ou combinação de instrumentos poderia substituir os sentidos humanos, os quais são capazes de registrar uma expressão integral da complexidade de um alimento.

Os métodos de análise sensorial são divididos em discriminativos (testes de diferença: teste triangular, duo-trio; comparação múltipla, sensibilidade e ordenação), descritivos (perfil de sabor, perfil de textura, análise descritiva quantitativa, tempo e intensidade e avaliação de atributos) e os afetivos (teste de aceitação/preferência: preferência pareada, ordenação de preferência, escala hedônica) (STONE, SIDEL, 1993).

Os testes afetivos têm por objetivo avaliar a resposta dos indivíduos com relação à preferência e/ou aceitação de um produto de interesse, por um determinado grupo de potenciais consumidores. A opinião pode ser dada com relação ao produto de uma forma global ou pelas características específicas, tais como aparência, aroma, sabor e textura (CHAVES; SPROSSER, 2001). De acordo com ABNT, a aceitabilidade de um produto é definida como o grau de aceitação, por um indivíduo ou população, em termos de propriedades sensoriais, estas que são influenciadas diretamente pela composição química e propriedades físicas de um produto (ABNT, 1993).

No teste de aceitação, os produtos são apresentados e solicitado aos consumidores indicar o quanto gostaram ou desgostaram, por meio de uma escala, a mais utilizada é a escala híbrida e a escala hedônica de 9 pontos. E para determinar a aceitação de um produto são necessários pelo menos 100 consumidores, para ter um grau de confiabilidade adequado, uma vez que há uma grande subjetividade na avaliação sensorial (DRAKE, 2007). Lim (2011) relata que a principal razão da escala hedônica de 9 pontos ser a mais utilizada em testes de aceitação é que, comparada a outras escalas, apresenta um número limitado de categorias, sendo de fácil compreensão pelos consumidores, sem necessitar de um treinamento prévio.

Diversos produtos podem ser avaliados utilizando a ciência sensorial, incluindo alimentos com adição de prebióticos, pois tem maior influência na textura e aroma dos produtos, enquanto a adição de probióticos tem maior efeito no sabor e aroma. Quando adicionados nos produtos os ingredientes prebióticos

podem conferir e reforçar as interações já existentes entre diferentes componentes do alimento (CRUZ et al., 2010).

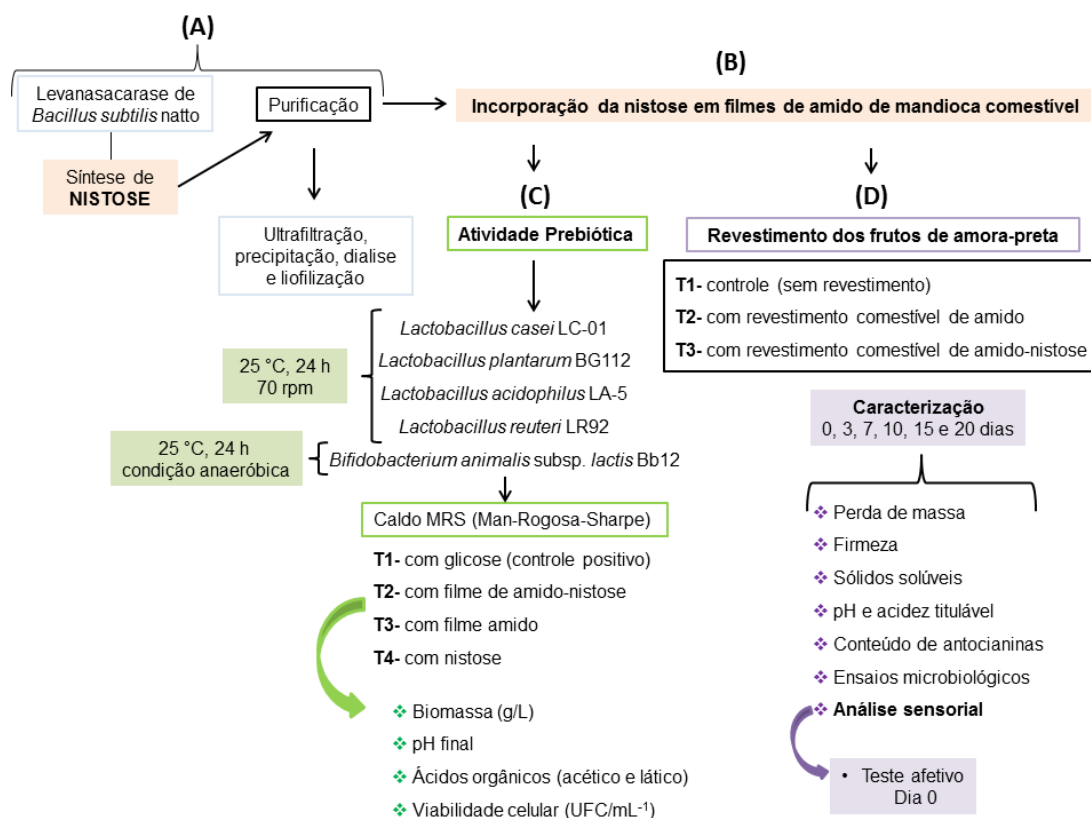
Alvarez, Ponce, Moreira (2018) estudaram parâmetros de qualidade sensorial e aceitabilidade de frutas minimamente processadas com adição de fibras de maçã e laranja, também inulina e oligofrutose em revestimento de quitosana para frutos de mirtilos. Após revestir os frutos a análise sensorial foi aplicada, e os resultados não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0.05$) entre os tratamentos. A adição de fibras prebióticas em revestimentos comestíveis também não exerceu alterações em nenhum dos atributos sensoriais estudados com mirtilos segundo Bambace, Alvarez, Moreira (2019). Os produtos obtiveram boa aceitação pelos potenciais consumidores indicando a possibilidade de um novo produto no mercado, já que não apresentou diferenças com a amostra considerada padrão.

O teste sensorial de aceitação é incluído também no controle de qualidade de alimentos por serem a única maneira de saber se os consumidores gostam ou não dos produtos. Estes testes são indispensáveis quando se deseja desenvolver produtos adicionados de probióticos e prebióticos ou com substitutos de açúcar, levando em consideração que estes teriam grande potencial de comercialização (CRUZ et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de desenvolvimento deste trabalho foram esquematizadas na Figura 5, sendo: (A) Síntese da nistose pela levanasacarase de *B. subtilis* natto e purificação; (B) Desenvolvimento dos filmes de amido-nistose; (C) Avaliação da atividade prebiótica em linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; (D) Revestimento das amoras-pretas com os filmes de amido-nistose, caracterização e análise sensorial.

Figura 5 – Etapas do processo: (A) síntese de nistose pela levanasacarase de *B. subtilis natto*; (B) desenvolvimento de filmes de amido-nistose; (C) avaliação da atividade prebiótica; (D) revestimento das amoras-pretas, caracterização e análise sensorial.



4.1 MICRORGANISMO E PRESERVAÇÃO

O microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis natto*, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – PR e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia - Campinas SP.

A cepa foi criopreservada a -80 °C com glicerol. Para a manutenção foi transferida para o meio contendo (g/L): peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20 a 37 °C, por 48 h e mantido a 4 °C em câmara refrigerada. O repique das células foi realizado a cada quarenta e cinco dias.

4.1.1 Inóculo e Quantificação da Biomassa

O meio de inóculo continha (g/L): sacarose comercial 100; extrato de levedura 2; KH_2PO_4 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ 0,5 (CALAZANS et al., 2000) e o inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 25 mL de meio e incubados em shaker orbital a 150 rpm, 24 h a 37 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (9000 x g, 15 min a 4 °C) e as células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9 %). A concentração de células foi determinada por turbidimetria a $\lambda = 400$ nm. Os valores obtidos foram correlacionados com a curva de biomassa em g/L. O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L para a produção da levanasacarase.

A curva de biomassa utilizando *B. subtilis* natto foi realizada por um cultivo em sacarose. A biomassa obtida após a centrifugação foi lavada com água destilada e ressuspensa em solução salina NaCl 0,9 %. Uma alíquota de 1 mL foi submetida a diluições seriadas para obter leituras de 0,1 a 0,7 de absorvância em $\lambda = 400$ nm. Paralelamente, 3 alíquotas de 1 mL foram distribuídas em cadinhos, previamente tarados e levados à estufa (70 °C), até atingir peso constante. Em seguida, os dados foram plotados relacionando absorvância (abs) X peso seco (g/L).

4.2 SÍNTESE DE NISTOSE PELA LEVANASACARASE

Na primeira etapa, a levanasacarase foi produzida por *B. subtilis* natto em 420,7 g/L de sacarose a 150 rpm por 24 h (BERSANETI et al., 2017). A fermentação foi interrompida por centrifugação a 9000 rpm por 15 min a 4 °C. E o sobrenadante foi considerado como extrato bruto (EB) onde foi determinada a atividade da levanasacarase por açúcares redutores, seguindo o método de Somogyi (1952) e Nelson (1944). Onde, uma unidade de atividade (U) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μg de açúcares redutores em 1 min (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999). O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para síntese de nistose, apresentando uma atividade de 23,9 U/mL.

Na segunda etapa foi realizada a síntese de nistose em meio com 200 mL de solução de sacarose (350 g/L) em tampão citrato (0,1 M), pH 6,0 a 35 °C por 36 h com adição de 50 mL da fonte de enzima (o sobrenadante com a enzima foi esterilizado em luz UV por 2 h, para evitar possíveis contaminações) (BERSANETI et al., 2017). A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 15 min. A produção de nistose foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.1 Purificação e Quantificação da Nistose

O sobrenadante da síntese enzimática foi submetido à ultrafiltração em membrana com porosidade de 3 kDa (Millipore Ultracel PL). Assim foram removidos os polissacarídeos (levana com massa molecular superior a 3 kDa) e separados os fruto-oligossacarídeos. Esses foram precipitados com etanol (90%) na proporção 3:1 (0,9 mL de etanol: 0,3 mL dos fruto-oligossacarídeos). O precipitado foi dialisado em água destilada, durante 24 h e liofilizado para ser incorporado nos filmes de amido de mandioca comestíveis.

Os fruto-oligossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu RID-10A), acoplado a um detector de índice de refração, utilizando a coluna de carboidratos Aminex HPX-87C (300 x 7,8 milímetros, Biorad). A fase móvel foi água Milli-Q a uma taxa de fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida constante a 80 °C. O sobrenadante (20 µl) foi filtrado em membrana 0.45 µm Millipore, e eluído com 0,6 mL de água Milli-Q. Os padrões utilizados foram sacarose, frutose, glicose, 1- nistose e 1-cestose (Sigma-Aldrich). Na condição estudada foi identificada apenas a síntese de nistose pela levanasacarase.

4.3 DESENVOLVIMENTO DOS REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS

Os revestimentos de amido de mandioca foram preparados com 10 g/% de nistose de acordo com Bersaneti et al. (2016), esta concentração foi escolhida pois a nistose exerceu efeito plastificante, também resultou em maior solubilidade e alongação na ruptura, e houve um decréscimo na permeabilidade

ao vapor de água dos mesmos. Os revestimentos de amido foram preparados empregando o método de *casting* (SIPOS et al., 2008), utilizando 3 g/100 g de solução filmogênica (sólidos, amido + nistose) e glicerol (20 g/100 g de sólidos) e adicionado a solução filmogênica 10 g/nistose/100 g de sólidos.

O amido, o glicerol e a água foram aquecidos a 95 °C com agitação constante (7 a 8 min) até a obtenção de uma solução homogênea, em seguida foi adicionado 10 % de nistose. Após a completa homogeneização as soluções foram colocadas em sonicador (Unique USC-1800) durante 10 min para completa eliminação das bolhas formadas no processo. Após, a solução filmogênica foi resfriada (40 a 50°C) e utilizada no revestimento de frutas.

Para a análise da atividade prebiótica a solução filmogênica foi colocada em placas de Petri de acrílico (30 g) para secagem em estufa de circulação de ar a 30 °C, por aproximadamente 20 h, até a formação dos revestimentos. Após a secagem os revestimentos foram selecionados e acondicionados em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio com 58 % de umidade relativa (UR) à 25 °C até o momento da realização das análises.

4.4 ATIVIDADE PREBIÓTICA DOS FILMES COMESTÍVEIS DE AMIDO-NISTOSE

A atividade prebiótica dos revestimentos foi realizada de acordo com Huebner, Wehling, Hutkins. (2007). As linhagens utilizadas foram gentilmente doadas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, incluindo: *Lactobacillus casei* LC-01 (Chr. Hansen®), *Lactobacillus plantarum* BG112 (Clerici-Sacco®), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen®), *Lactobacillus reuteri* LR92 (Clerici-Sacco®) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen®).

As linhagens foram ativadas em caldo Man-Rogosa-Sharpe-MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) contendo (g/L): peptona de soja 10; extrato de levedura 4; extrato de carne 8; glicose 20; K₂HPO₄ 2; CH₃COONa H₂O 2; citrato triamoniaco 2; MgSO₄.7(H₂O) 0,2; MnSO₄.4(H₂O) 0,05 (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960), para meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico.

Os filmes foram triturados e esterilizados em luz UV por 2 h, para evitar possíveis contaminações. Foram preparados quatro tratamentos (50 mL): caldo de MRS com 20 g/L de glicose (T1: controle positivo), caldo de MRS com filme de amido-nistose comestível com 20 g/L (T2), caldo MRS com filme amido comestível de 20 g/L (T3) e caldo MRS com 20 g/L de nistose (T4); sendo o inóculo 1 % (v/v).

As linhagens de *Lactobacillus* foram incubadas à 25 °C, 24 h, com 70 rpm para aumentar a solubilidade dos filmes e para a linhagem de *Bifidobacterium* foi à 25 °C, 24 h sob condições anaeróbicas. As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 6000 rpm por 15 min a 15 °C.

A atividade prebiótica foi avaliada pela produção de biomassa (g/L), pH final, ácidos orgânicos (acético e láctico) e viabilidade celular (UFC / mL⁻¹) expressa como unidades formadoras de colônias (UFC). Para determinar a viabilidade celular das linhagens de *Lactobacillus* spp., foram diluídos em série, plaqueados e incubados a 37 °C por 48 h. *Bifidobacterium* spp. foram incubados a 37 °C por 48 h em condições anaeróbicas, os testes foram realizados em triplicata. A atividade prebiótica foi determinada usando a Equação 1 (SILVA et al., 2016).

Atividade Prebiótica=

$$[\text{probiótico log CFU mL}^{-1} \text{ em } 24 \text{ h} - \text{probiótico log CFU mL}^{-1} \text{ em } 0 \text{ h}] \quad (\text{Eq. 1})$$

4.4.1 Quantificação de Ácidos Orgânicos

Os ácidos láctico e acético foram quantificados a partir das amostras dos sobrenadantes. Essas foram filtradas a 0,45 µm (Millipore) e 20 µl foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna de ácido orgânico HPX-87H Aminex 7,8 × 300 mm (Bio-Rad, CA, EUA) (Silva et al., 2016). A fase móvel foi uma solução de 0,005 mol L⁻¹ de H₂SO₄ com fluxo de 0,7 mL min⁻¹. A coluna foi mantida a 60 °C. O perfil do pico de eluição foi monitorado com um detector de UV no comprimento de onda de 210 nm (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

4.5 APLICAÇÃO DOS REVESTIMENTOS AMIDO-NISTOSE EM AMORAS-PRETAS

Os frutos foram higienizados em solução de ácido acético 125 ppm por 30 min e lavados em água corrente.

As amoras foram imersas em solução de revestimento em temperatura ambiente (25 °C) por 1 min. Os frutos foram mantidos em peneiras por 1 min para retirar o excesso do revestimento e secas com ventilação em temperatura ambiente por 3 h. Após, 100 g dos frutos foram colocados em bandejas de polipropileno (4 x 10 cm) com tampa articulada, e armazenadas a 4 ± 1 °C por 20 dias.

Os frutos foram submetidos a três tratamentos: (T1) controle frutos sem revestimento, (T2) frutos com revestimento comestível de amido e (T3) frutos com revestimento comestível de amido acrescido de nistose. As amostragens foram em 0, 3, 7, 10, 15 e 20 dias. Os frutos sem revestimento (controle) e as amostras revestidas foram testadas ao mesmo tempo.

4.5.1 Análises das Amoras-Pretas Durante o Armazenamento

4.5.1.1 Perda de massa (%)

Foram utilizados 100 g de frutas para esse teste. Os frutos foram pesados no início do experimento e seguidas pesagens até os 20 dias. Os resultados foram expressos como a perda de peso (%) comparado ao peso inicial. Duas repetições foram realizadas para cada tratamento.

4.5.1.2 Firmeza

A força de compressão das amoras foi medida com um analisador de textura TA-TX2 Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra). Uma sonda cilíndrica (35 mm de diâmetro) comprimiu os frutos até 50% de sua altura com velocidade de 2,5 mm/s, e o parâmetro considerado foi a força máxima de compressão (N). Os frutos foram analisados no início do experimento e até 20 dias. Sete

repetições foram realizadas para cada tratamento (MENEGHEL, BENASSI, YAMASHITA, 2008).

4.5.1.3 Sólidos solúveis

Foram determinados seguindo AOAC (Official methods of analysis, 1995) utilizando um refratômetro Abbe (Carl Zeiss, modelo Abbe, Alemanha). As medidas foram expressas em °Brix. Três repetições foram realizadas para cada tratamento.

4.5.1.4 pH e acidez titulável

Os frutos foram macerados e homogeneizados para determinações de pH e acidez titulável, cinco frutos foram utilizados para cada teste, de acordo com o procedimento do Instituto Adolfo Lutz (1976). A acidez titulável foi expressa em g de ácido cítrico/100 g de amostra. Os frutos foram analisados no início do experimento até 20 dias. Três repetições foram realizadas para cada tratamento.

4.5.1.5 Conteúdo de antocianinas

Foi determinado pelo método espectrofotométrico diferencial de pH descrito por Fuleki e Francis (1968) e analisado em um espectrofotômetro Fento 482 (São Paulo, Brasil), em $\lambda = 510$ nm. O conteúdo antocianina total foi expresso em mg de antocianinas por 100 g de fruto. Os frutos foram analisados no início do experimento até 20 dias. Foram realizadas duas repetições para cada tratamento.

4.5.1.6 Ensaio microbiológicos

Microrganismos mesófilos e psicrótrópicos, leveduras e bolores foram determinados durante o armazenamento a 4 °C do fruto controle e com

revestidos. Para cada determinação, amostras de 25 g foram maceradas com 250 mL de água de peptona a 10 g/L. Diluições em série (10^{-1} a 10^{-6}) foram preparadas a partir do homogeneizado com água peptonada. Para as contagens dos microrganismos mesófilos e psicrótrópicos, foi plaqueado 1 mL de cada diluição em PCA (ágar de contagem de placas, Merck, Alemanha), as placas foram incubadas a 37 °C por 2 dias e a 10 °C por 10 dias, respectivamente. Para contagens de leveduras e bolores, foi plaqueado 1 mL de cada diluição em BDA (ágar batata dextrose, Merck, Alemanha), as placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. As contagens viáveis foram expressas como unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de fruto.

4.6 AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS FRUTOS DE AMORA-PRETA

Foi realizada um dia após os frutos serem revestidos. Um fruto (10 g) de cada tratamento foi servido para cada avaliador simultaneamente em pratos descartáveis de plástico, codificado com números de três dígitos em ordem aleatória em cabines individuais. Água potável foi utilizada em temperatura ambiente para limpar a boca, antes e entre as amostras.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP N ° 1.827.884, CAAE: 59936016.3.0000.5231). Os testes foram realizados em cabines individuais com luz branca no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Estadual de Londrina.

4.6.1 Teste de Aceitação

Foi aplicado para 100 avaliadores não treinados, os atributos analisados foram aparência, aroma, sabor, textura e aceitação global. Foi utilizada a escala hedônica estruturada de 9 pontos (9– gostei muitíssimo; 5– nem gostei, nem desgostei, 1– desgostei muitíssimo) (MEILGARD et al., 2007).

Paralelamente, foi requerido a cada avaliador indicar sua intenção de compra usando a escala de 5 pontos (5– certamente compraria, 1– certamente não compraria) (Figura 6) (MEILGARD et al., 2007).

Figura 6 - Ficha de teste afetivo para frutos de amora-preta com e sem o revestimento comestível.

Nome: _____

Você está recebendo três amostras de frutas (amoras). Por favor, avalie cada amostra codificada, da esquerda para a direita, e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada uma.

9- gostei muitíssimo
8- gostei muito
7- gostei moderadamente
6- gostei ligeiramente
5- nem gostei ,nem desgostei
4- desgostei ligeiramente
3- desgostei moderadamente
2- desgostei muito
1- desgostei muitíssimo

Amostras	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Geral
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

Use a escala abaixo para indicar sua intenção de compra

5- certamente compraria
4- provavelmente compraria
3- talvez comprasse, talvez não comprasse
2- provavelmente não compraria
1- certamente não compraria

Amostras	Intenção de compra
_____	_____
_____	_____
_____	_____

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada no Software Statistica 7.0. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigos científicos (3), patentes (3) e capítulo de livro (1).

5.1- Artigo I publicado:



Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose from *Bacillus subtilis* natto

Gabrielly Terassi Bersaneti^a, Sandra Garcia^b, Suzana Mali^a,
Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, Londrina State University, Paraná, Brazil
^b Department of Science and Food Technology, Centre of Agrarian Sciences, Londrina State University, Paraná, Brazil



Highlights:

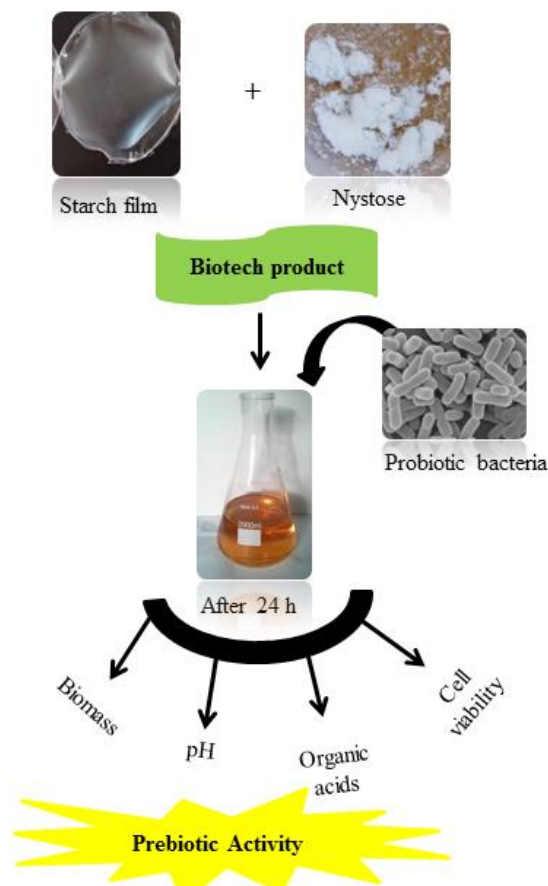
- *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were able to consume nystose as a carbon source.
- Acetic acid and lactic acid were produced by the probiotic strains using nystose.
- The addition of nystose increased the prebiotic potential of edible starch films.
- An edible starch-nystose film was able to retain the prebiotic activity of nystose.

Abstract

Edible films and coatings have attracted industrial interest due to the ability to increase the shelf life of food products and the ability to contain bioactive ingredients to improve the nutritional quality of food. In the current study, we evaluated the prebiotic activities of nystose synthesized by levansucrase from *Bacillus subtilis* and evaluated edible starch-nystose as the sole source of energy for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. The growth of the lactic acid bacteria and the formation of organic acids demonstrated that nystose and the edible starch-nystose film showed a prebiotic effect. The edible starch-nystose film may exhibit a prebiotic function in addition to the protective coating effect. This biotechnology product demonstrates potential functional applications for the food industry and may be used for coating fresh fruits and vegetables as well as for the addition of the prebiotic nystose.

Keywords: Prebiotic activity; Cell viability; Fructooligosaccharides; Levansucrase; Starch-nystose film.

Graphical abstract



1. Introduction

Prebiotics are classified as nondigestible molecules arriving intact in the intestine where they are fermented by the microbiota present in the colon; they stimulate the growth of beneficial bacteria, such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotics that affect the host by the growth of the bacteria producing the short-chain fatty acids, which improves the overall health of the individual (Mano et al., 2018; Hutkins et al., 2016; Gibson & Roberfroid, 1995). Silva, Garcia, Baldo, & Celligoi (2016) confirmed the prebiotic potential of FOS on the growth of probiotic bacteria (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum*).

FOS are oligosaccharides of fructose consisting of a glucose unit (G) connected to fructosyl units (F) at position β -(2 \rightarrow 1); the main FOS types include 1-kestose (GF2), nystose (GF3), 1- β -fructofuranosyl nystose (GF4), and neoFOS (neokestose and neonystose) (6G-FOS) with a β (2 \rightarrow 6) linkage between the fructose and sucrose glycosyl units (Guio et al., 2012; Linde et al., 2012). FOS can be synthesized by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with a high productivity, and FOS is an interesting functional ingredient to be used in the food industry (Bersaneti, Pan, Baldo, & Celligoi, 2017)

Considering the increasing demand of consumers for healthy food, the functional value of prebiotic sugars of FOS has gained attention, stimulating the incorporation of FOS into different food products, such as cereal bars (Celligoi et al., 2014), fruit juice beverages (Fonteles & Rodrigues, 2018), bakery products (Longoria-García et al., 2018), chocolates (Konar, Toker, Oba, & Sagdig 2016), dairy products (Costa et al., 2019) and confectionery products. More recently, several researchers have studied the addition of these oligosaccharides as functional ingredients with prebiotic activity in edible coatings and films based on different biopolymers, such as starch (Tang et al., 2015; Bersaneti, Mantovan, Magri, Mali, & Celligoi, 2016), alginate (Bambace, Alvarez, & Moreira 2019), hydroxypropyl methyl cellulose and other cellulose film formers (Schad & Van Ness, 2013; Romano et al., 2014), and whey protein (Ramesh & Siddalingaiya, 2006).

In addition to being edible, starch films are low-cost, biodegradable, odorless, tasteless, transparent and hydrophilic materials, which can act efficiently as polymeric matrices for the incorporation of water-soluble FOS (Tang et al., 2015; Bersaneti et al., 2016). However, one of the main challenges in the use of FOS as a functional ingredient in edible films and other food products is the maintenance of their prebiotic activity after being submitted to the different processing conditions, especially low pH and high

temperatures (Huebner, Wehling, Parkhurst, & Hutkins, 2008; Vega & Zuniga-Hansen, 2015; Tang et al., 2015; Fonteles & Rodrigues, 2018).

In a previous study, Bersaneti et al. (2016) produced FOS (nystose: 1-kestose 80:20) from a fermentation process by *Bacillus subtilis* natto and employed them as functional ingredients in edible starch films. They observed an increase in solubility and a decrease in water vapor permeability of the films with FOS addition, and they reported that FOS are promising ingredients for use in edible starch films.

The incorporation of a prebiotic, such as nystose in edible starch films, can be considered a cost-effective alternative to be used in several applications in the food industry because the polymeric matrix has a low cost, and this microbial FOS can be obtained with high productivity (Bersaneti et al., 2017; Silva et al., 2016; Santos et al., 2016), resulting in a higher added-value product.

The objective of this research was to evaluate the prebiotic activity of the nystose synthesized by the levansucrase of *Bacillus subtilis* natto and of the edible starch films with the addition of nystose to propose the development of a novel product with functional properties for use in food protection.

2. Materials and methods

2.1 Microorganisms and media

Bacillus subtilis natto was maintained at 4 °C on medium as follows: 50 g/L peptone, 30 g/L yeast extract and 20 g/L agar. The strain was isolated from fermented soybeans, a Japanese food called “natto” at the Department of Biochemistry and Biotechnology of the State University of Londrina (Brazil) and identified by Fundação André Tosello (Campinas- Brazil). *Lactobacillus casei* LC-01 (Chr. Hansen®),

Lactobacillus plantarum BG112 (Clerici-Sacco®), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen®), *Lactobacillus reuteri* LR92 (Clerici-Sacco®) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen®) were kindly donated by the Department of Food Science and Technology of State University of Londrina. Lyophilized probiotic strains were maintained under refrigeration.

2.2 Inoculum preparation

B. subtilis natto was prepared by batch fermentation in culture medium as follows: 100 g/L sucrose; 2 g/L yeast extract; 2 g/L KH₂PO₄; 1 g/L (NH₄)₂SO₄; and 0.5 g/L MgSO₄ (7H₂O) (Calazans, Lima & Franc, 2000), and the inoculum was 0.2 g/L. The biomass was determined by turbidimetry at $\lambda= 400$ nm.

Lactobacillus and *Bifidobacterium* were activated in Man-Rogosa-Sharpe-MRS broth (Man, Rogosa & Sharpe, 1960) with 20 g/L glucose at 37 °C. *Bifidobacterium* were incubated under anaerobic conditions. The cell growth was determined by turbidimetry at $\lambda= 600$ nm and was correlated to the biomass curve in g/L. The inoculum was 1% (v/v).

2.3 Synthesis of nystose by levansucrase

First, levansucrase was produced by *B. subtilis* natto in 420.7 g/L sucrose at 150 rpm for 24 h (Bersaneti et al., 2017). The levansucrase activity was assayed by estimating the reducing sugar as described by Ananthalakshmy & Gunasekaran (1999). The supernatant was used as the source of the enzyme with an activity of 23.9 U/mL.

The nystose production medium was 200 mL sucrose solution (350 g/L) in citrate buffer (0.1 M), pH 6.0 at 35 °C for 36 h with 50 mL of the enzyme source (sterilized UV/2 h) (Bersaneti et al., 2017). Nystose was evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC, RID-10A; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) coupled to a

refractive index detector with an Aminex Carbohydrate HPX-87C (300 mm x 7.8 mm Bio-Rad) column (Bersaneti et al., 2016).

2.3.1 Purification of nystose

Nystose was separated from the medium by 3 kDa membrane ultrafiltration (Millipore Ultracel PL). The filtrate was precipitated with three volumes of 90 % (v/v) cold ethanol, was dried at 70 °C, solubilized in distilled water, dialyzed for 24 h and lyophilized (Bersaneti et al., 2016), then nystose was added to the edible films formulations. Nystose accounted for 80 % of the lyophilized sample.

2.4 Edible starch film production

Edible films based on cassava starch were prepared by the *casting* method using cassava starch provided by Yoki® Alimentos S.A. (Paraná, Brazil), glycerol (plasticizer) and nystose as a functional ingredient. Cassava starch (3 g/100 g filmogenic solution) and glycerol (20 g/100 g solids) were directly mixed with distilled water and were maintained at 95 °C for 10 min with manual shaking. After gelatinization, the starch solution was cooled to approximately 50-60 °C and was mixed with the prebiotic powder, which was easily solubilized; at this low temperature, the prebiotic activity of nystose can be retained in the films. Nystose was added to the filmogenic solutions (10 g nystose/100 g solids), and this concentration was standardized by Bersaneti et al. (2016) An edible starch film (without nystose) was also produced employing the same conditions. Then, the filmogenic solutions were poured onto circular acrylic plates (0.47 g filmogenic solution/cm²), and they were dried (30 °C) in a ventilated oven (model TE-394-3; Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) to a constant weight (for approximately 20 h); this resulted in films that could be easily removed from the plates.

2.5 Prebiotic activity of nystose and edible starch-nystose films

The films were powdered and sterilized in UV light for 2 h. The four following treatments were prepared (50 mL): MRS broth with 20 g/L glucose (T1: positive control), MRS broth with 20 g/L edible starch-nystose film (T2), MRS with 20 g/L edible starch film (T3) and MRS with 20 g/L nystose (T4); each treatment was inoculated to a final concentration of 1% of each inoculum: the strains of *Lactobacillus* (25 °C, 24 h, 70 rpm, to increase the solubility of films) and *Bifidobacterium* (25 °C, 24 h under anaerobic conditions). The fermentations were interrupted by centrifugation at $2000 \times g$ for 15 min at 15 °C. The prebiotic activity of the supernatant was evaluated by the biomass production (g/L), final pH, organic acids (acetic and lactic) and cell viability (CFU/mL⁻¹). The experiments were run in triplicate.

After fermentation, serial dilution and subsequent plating in MRS-agar by the pour-plate method, the cell viability was expressed as defined colony forming units (CFU). *Lactobacillus* spp. were incubated at 37 °C for 48 h, and *Bifidobacterium* were incubated at 37 °C for 48 h in anaerobic conditions. The prebiotic activity was determined using Equation 1 (Silva et al., 2016).

Prebiotic activity=

$$[\text{probiotic log CFU mL}^{-1} \text{ at } 24 \text{ h} - \text{probiotic log CFU mL}^{-1} \text{ at } 0 \text{ h}] \quad (\text{Eq. 1})$$

2.5.1 Quantification of organic acids

For the quantification of lactic and acetic acids, samples of the treatment supernatants were filtered in a 0.45 µm filter (Millipore), and 20 µl was injected into a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with an HPX-87H organic acid column Aminex 7.8×300 mm (Bio-Rad, CA,

USA) (Silva et al., 2016). The mobile phase was 0.005 mol l⁻¹ H₂SO₄ solution pumped at a rate of 0.7 mL min⁻¹. The column was maintained at 60 °C. The peak elution profile was monitored with a UV detector at a wavelength of 210 nm (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.6 Statistical analysis

The statistical data analysis was performed using the Software Statistica 7.0. The mean was compared by Tukey's test at the 5 % probability level (p<0.05), using analysis of variance in order to verify the sample differences.

3. Results and discussion

The prebiotic activity of nystose and edible starch-nystose films was evaluated *in vitro* by investigating their growth promotion effects on the strains of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. through analysis of their biomass production (g/L), final pH of the fermentation media, the production of organic acids (acetic and lactic) and cell viability (CFU/mL⁻¹).

3.1 Biomass production

Prebiotic activity was evaluated by biomass production, and the results are presented in Table 1. The biomass values after 24 h of fermentation demonstrated that the tested strains were grown in all the treatments. The *Bifidobacterium* strain demonstrated a higher biomass production for edible starch-nystose films (T2) 0.38 g/L and nystose (T4) 0.39 g/L than that for glucose (T1) 0.12 g/L and edible starch film (T3) 0.13 g/L treatments (Table 1). Confirming that species of *Bifidobacterium* preferentially ferment

disaccharides as lactose or oligosaccharides in relation to monosaccharides such as glucose (Parche et al., 2006).

For *L. casei* and *L. acidophilus*, the biomass production reached 0.53 and 0.36 g/L and 0.94 and 0.51 g/L, respectively. These results are indicative of the prebiotic activity of nystose and edible starch-nystose films. Especially, *L. acidophilus* strain showed the highest biomass production for T1, T2 and T3 treatments (Table 1) being more significant by the Tukey's test ($p < 0.05$).

Lu, Yeung, & Yeung (2018) evaluated biomass production (24 h) in MRS broth supplemented with 2% fructooligosaccharides; *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. reached 0.94 and 0.22 g/L, respectively, and had a dextrose standard of 1.54 g/L for *Lactobacillus* spp. In this study glucose was used and we obtained better results with *L. plantarum*, the biomass more significant by the Tukey's test ($p < 0.05$) was 2.10 g/L, followed by *L. casei* 1.55 g/L and *L. reuteri* 1.42 g/L.

Table 1 – Biomass production (g/L) using probiotic *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains at 25 °C for 24 h. Treatments T1: glucose, T2: edible starch-nystose film, T3: edible starch film and T4: nystose.

	T1	T2	T3	T4
<i>Bifidobacterium BB12</i>	0.12±0.01 ^{bD}	0.38±0.03 ^{aC}	0.13±0.03 ^{bB}	0.39±0.01 ^{aB}
<i>L. acidophilus LA5</i>	0.31±0.03 ^{dC}	0.94±0.01 ^{aA}	0.70±0.08 ^{bA}	0.51±0.01 ^{cA}
<i>L. casei LC-01</i>	1.55±0.04 ^{aB}	0.53±0.01 ^{cB}	0.74±0.13 ^{bA}	0.36±0.02 ^{dB}
<i>L. plantarum BG112</i>	2.10±0.02 ^{aA}	0.28±0.02 ^{bD}	0.31±0.02 ^{bB}	0.19±0.02 ^{cD}
<i>L. reuteri LR92</i>	1.42±0.02 ^{aB}	0.27±0.01 ^{bD}	0.20±0.01 ^{dB}	0.23±0.01 ^{cC}

Values are represented as mean± standard deviation. Means followed by the same lowercase letter in the lines or capital letter in the columns do not differ by Tukey's test ($p > 0.05$)

The consumption of sugars was similar for all treatments (approximately 10%), except for *L. casei* and *L. reuteri* with glucose (T1), which had a consumption of approximately 34% of the substrate. Valdés-Varela, Ruas-Madiedo, & Gueimonde (2017) showed that six strains of *Bifidobacterium* spp. were able to consume commercial fructooligosaccharides and stay metabolically active. In our study, the probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were able to consume and grow in medium containing nystose synthesized by levansucrase from *B. subtilis* natto, which was also reported by Selak et al. (2016) in their work where the strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* that are associated with the intestinal mucosa prefer to consume fructose and oligofructose as substrates.

3.2 Final pH

The pH values were measured after 24 h of fermentation (Table 2). In broth with glucose (T1), the samples showed a significant reduction ($p < 0.05$) compared to that of the other treatments that also showed pH reductions, remaining below the initial pH of 7.5, this was also reported by Valdés-Varela et al. (2017), who stressed that the pH values in fermentation medium with fructooligosaccharides were higher than those with glucose as the carbon source.

The pH values (Table 2) can be directly related to microbial growth by probiotic strains, where in the treatment with glucose addition (T1) the strains *L. casei*, *L. plantarum* and *L. reuteri* produced more biomass were the same presented higher pH reduction reaching 4.46, 4.07 and 4.43 respectively. These strains grown better on glucose and consequently produced more compounds that acidified the culture medium.

In general, the strain that presented the high reduction in pH values for all treatments was *L. plantarum*, these results corroborate with those found in biomass production, with higher growth is capable of causing changes in pH values.

Tang et al. (2015) demonstrated that the prebiotic activity could have remained in the maize starch films because there were interactions between fructooligosaccharides and the starch matrix, so the prebiotics were not completely released. The results of the final pH values for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the MRS broth with the films (T2 and T3) were higher than those for the broth with nystose (T4). Lu et al. (2018) analyzed the final pH of the fermentations with *Lactobacillus* spp. in MRS broth using 2% dextrose and 2% fructooligosaccharides. With dextrose, the pH reached 4.0, and with fructooligosaccharides, it was 5.4; these results were similar to those obtained in our study, where the pH in T1 (glucose medium) using *Lactobacillus* spp. strains remained at approximately 4.5, and with nystose (T4), the pH value was approximately 6.5; this high pH value could be due to a low lactic acid production (Table 2).

Table 2 – Final pH values of the fermentations at 25 °C for 24 h. Treatment T1: glucose, T2: edible starch-nystose film, T3: edible starch film and T4: nystose

	T1	T2	T3	T4
<i>Bifidobacterium</i> BB12	6.64±0.11 ^{aB}	6.94±0.09 ^{bcB}	7.01±0.07 ^{cC}	6.74±0.14 ^{abA}
<i>L. acidophilus</i> LA5	6.36±0.09 ^{aB}	6.97±0.14 ^{cB}	6.64±0.08 ^{gbB}	7.12±0.08 ^{cB}
<i>L. casei</i> LC-01	4.46±0.28 ^{aA}	6.38±0.18 ^{bA}	6.69±0.15 ^{bB}	6.58±0.15 ^{bA}
<i>L. plantarum</i> BG112	4.07±0.03 ^{aA}	6.32±0.11 ^{bA}	6.28±0.15 ^{bA}	6.51±0.11 ^{bA}
<i>L. reuteri</i> LR92	4.43±0.11 ^{aA}	6.44±0.13 ^{bA}	6.45±0.09 ^{bAB}	6.63±0.13 ^{bA}

Values are represented as mean± standard deviation. Means followed by the same lowercase letter in the lines or capital letter in the columns do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$). Initial pH of the MRS broth: 7.5.

3.3 Organic acid production

Lactic acid bacteria produce mainly lactic and acetic acids that can be accumulated in the fermentation medium depending on the uptake and rate of substrate consumption, nutrient privation or exposure to stress conditions (Rios-Covián et al., 2016; Sánchez et al., 2007).

Table 3 shows that lactic acid production is related to microbial growth and pH reduction (Table 2), which directly influences the acidity of MRS broth. Strains that showed little pH reduction consequently had lower lactic acid concentration and vice versa. The production of lactic acid for *L. acidophilus* strains in the treatment with nystose (T4) was 4.72 mmol / L (pH 7.12) and for *Bifidobacterium* of 4.37 mmol / L (pH 7.01) with starch film (T3). Reduction of pH values as in glucose treatment (T1) lactic acid yields were higher presenting significant differences ($p < 0.05$). The strains produced organic acids (Table 3) in medium with nystose (T4) and edible starch-nystose films (T2), demonstrating their prebiotic capacity. Moens, Verce, & Vuyst (2017) supplemented the MRS broth with inulin, and the fermentation was performed using a biculture of *L. paracasei* and *B. longum*. The results presented a higher production of acetic acid and values similar to the results using nystose in this work.

Acetic acid production was higher than the lactic acid production in nystose (T4) and the edible starch-nystose films (T2) (Table 3). This result was also found for Moens et al. (2017), and Shalini, Abinaya, Saranya, & Antony (2017) used prebiotics to describe that acetic acid is a main metabolic end product and that its production depends on the carbon source.

Researchers suggest that a metabolic change occurs for the production of acetate at the expense of lactate, and lactate fermentation extracts only 2 ATP per glucose, while mixed acid (acetate, formate and ethanol) fermentation produces 3 ATP per glucose,

allowing cells to gain extra ATP. The mixed acid fermentation leads to low growth rates and switches to lactate formation as the growth rate increases (Teusink & Molenaar, 2017).

The difference in the production of organic acids can also be related to the fermentability of each microbial strain as well as to the fructooligosaccharide chain length (Shalini et al., 2017). When organic acids are produced by probiotic bacteria, they can stimulate the growth of colorectal mucosal cells, can retard mucosal atrophy and can decrease the risk of a malignant transformation in the colon (Ningegowda & Gurudutt, 2012).

Table 3 – Concentration of organic acids (mmol/L) produced by probiotic strains in MRS broth in 24 h at 25 °C. Treatment T1: glucose, T2: edible starch-nystose film, T3: edible starch film and T4: nystose.

	Lactic acid (mmol/L)			
	T1	T2	T3	T4
<i>Bifidobacterium BB12</i>	4.67±0.11 ^{cd}	5.16±0.15 ^{bc}	4.37±0.17 ^c	8.55±0.12 ^{aA}
<i>L. acidophilus LA5</i>	3.53±0.24 ^{ce}	4.62±0.24 ^{bc}	6.55±0.39 ^{ab}	4.72±0.33 ^{bc}
<i>L. casei LC-01</i>	71.52±0.29 ^{ac}	9.52±0.33 ^{cb}	10.49±0.24 ^{ba}	9.14±0.14 ^{ca}
<i>L. plantarum BG112</i>	120.22±0.19 ^{aA}	11.40±0.15 ^{ba}	10.29±0.20 ^{ca}	8.45±0.34 ^{da}
<i>L. reuteri LR92</i>	78.72±0.13 ^{ab}	11.56±0.26 ^{ba}	10.63±0.20 ^{ca}	7.57±0.47 ^{db}
	Acetic acid (mmol/L)			
<i>Bifidobacterium BB12</i>	41.30±0.21 ^{dc}	54.53±0.23 ^{ba}	44.62±0.24 ^{cd}	61.62±0.28 ^{aA}
<i>L. acidophilus LA5</i>	30.61±0.24 ^{ce}	44.20±0.26 ^{bd}	55.74±0.20 ^{aA}	43.51±0.36 ^{bc}
<i>L. casei LC-01</i>	39.48±0.40 ^{bd}	35.59±0.30 ^{ce}	43.33±0.25 ^{ae}	33.62±0.30 ^{dd}
<i>L. plantarum BG112</i>	48.34±0.21 ^{ab}	46.66±0.17 ^{bc}	45.60±0.12 ^{cc}	45.23±0.33 ^{cb}
<i>L. reuteri LR92</i>	51.42±0.31 ^{ba}	52.26±0.30 ^{abB}	52.45±0.25 ^{ab}	43.61±0.46 ^{cc}

Values are represented as mean± standard deviation. Means followed by the same lowercase letter in the lines or capital letter in the columns do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$)

3.4 Cell viability

All bacteria tested were able to metabolize the nystose (T4) and edible starch-nystose films (T2), because the values of CFU mL⁻¹ presented in Table 4 were higher than the initial concentration that was approximately 3.00 CFU mL⁻¹ for all treatments, except for *Bifidobacterium* and *L. acidophilus* strains grown on glucose (T1) did not present good cell viability.

Treatment with nystose (T4) obtained better results according to Tukey's test ($p < 0.05$). The cell viability was superior for the *L. acidophilus* (8.07 CFU mL⁻¹), *L. reuteri* (10.87 CFU mL⁻¹) and *Bifidobacterium* (7.71 CFU mL⁻¹) strains using edible starch-nystose film (T2) being significant according to Tukey's test ($p < 0.05$) (Table 4), when compared to the cell viability with glucose (T1) reaching 3.02, 9.24 and 3.00 CFU mL⁻¹, respectively.

The cell viability of *L. casei*, *L. plantarum* and *L. reuteri* with glucose were similar to the cell viability of those with nystose (T4); similar results were described in a previous study carried out by our research group (Silva et al., 2016). The authors reported that fructooligosaccharides (nystose) produced by same strain of *Bacillus subtilis* were as good as glucose for the cell viability of probiotic strains, thus attesting their prebiotic potential. In addition to the probiotic strains, the authors also used an *Escherichia coli*, a pathogenic strain, and the results demonstrated that these enteric bacteria on FOS was significantly smaller ($p < 0.05$) compared to the growth on glucose.

Table 4 - Counts of lactic acid bacteria from the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains in 48 h incubation at 37 °C. Treatment: T1: glucose, T2: edible starch-nystose film, T3: edible starch film and T4: nystose.

	Counts [log (CFU mL ⁻¹)]			
	T1	T2	T3	T4
<i>Bifidobacterium Bb12</i>	3.00±0.00 ^{cD}	7.71±0.168 ^{aC}	5.26±0.10 ^{bD}	7.58±0.156 ^{aE}
<i>L. acidophilus LA5</i>	3.02±0.06 ^{dC}	8.07±0.07 ^{cC}	9.51±0.06 ^{bB}	10.93±0.04 ^{aA}
<i>L. casei LC-01</i>	9.69±0.03 ^{aB}	8.51±0.06 ^{cB}	8.76±0.08 ^{bC}	8.67±0.10 ^{bcD}
<i>L. plantarum BG112</i>	10.15±0.05 ^{aA}	8.79±0.02 ^{bB}	8.7±0.11 ^{bC}	10.11±0.01 ^{aC}
<i>L. reuteri LR92</i>	9.24±0.04 ^{bB}	10.87±0.24 ^{aA}	10.37±0.06 ^{aA}	10.38±0.06 ^{aA}

Values are represented as mean± standard deviation. Means followed by the same lowercase letter in the lines or capital letter in the columns do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$)

Valdés-Varela et al. (2017) studied the *Bifidobacterium Bb12* strain and obtained a high cell viability in glucose and fructooligosaccharide containing media, with no significant difference. In this study, higher *Bifidobacterium* cell viability was observed in T2 (7.71 CFU mL⁻¹) and T4 (7.58 CFU mL⁻¹), with an edible starch-nystose film and nystose as the carbon sources, respectively. In T1 with glucose and T3 with edible starch film, no good growth was observed, reaching 3.00 and 5.26 CFU mL⁻¹, respectively. *Bifidobacterium* spp. prefer to consume disaccharides like lactose or oligosaccharides instead of glucose (Parche et al., 2006); this can be observed by the high cellular viability in the T2 and T4 treatments in this research.

The influence of nystose was studied with the strains of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* and reached 7.75 and 5.31 CFU mL⁻¹, respectively, using a reactor ecosystem for 72 h (Gmeiner et al., 2000). In the present work, the prebiotic potential of nystose was demonstrated by the growing cells (T4) that reached 10.93 CFU mL⁻¹ and

was demonstrated by the cells in the edible starch-nystose film (T2) that reached 8.07 CFU mL⁻¹ of *L. acidophilus*. For *Bifidobacterium*, the cell counts were 7.58 CFU mL⁻¹ in nystose (T4) and 7.71 CFU mL⁻¹ in the edible starch-nystose film (T2). It is possible to affirm that the nystose and edible starch-nystose films were used as a carbon source for the growth of these probiotic bacteria, confirming their prebiotic potential and suggesting possible applications as additives in the food industry.

4. Conclusion

The nystose and starch-nystose film can be used as prebiotics. In this study, it was possible to demonstrate this by the cell growth of lactic acid bacteria and their organic acid production. The daily consumption of functional foods can help with the overall food consumption of the individual, and when ingested, it can improve the health and balance of the intestinal microbiota in the individual. The nystose incorporation in edible starch films can be considered a cost-effective alternative to be used in the food industry, resulting in a higher added-value product that may be used for coating fresh fruits and vegetables.

Acknowledgment

The authors would like to thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) by support.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Statement

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Ananthalakshmy, V. K., & Gunasekaran, P. (1999). Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *87*, 214–217.
- Bambace, M., Alvarez, M. V., & Moreira, R. (2019). Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Research International*, *122*, 653-660.
- Bersaneti, G. T., Mantovan, J., Magri, A., Mali, S., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 1132–1138.
- Bersaneti, G. T., Pan, N. C., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2017). Co-production of fructooligosaccharides and levan by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with potential application in the food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *184*, 838-851.
- Calazans, G. Lima, C., & Franc, F. P. De. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, *27*, 245–247.
- Celligoi, M. A. P. C., Santos, D. A., Silva, P. B., Garcia, S., Prudêncio, S. H., & Vignoli, J. A. (2014). Obtenção biotecnológica de fruto-oligossacarídeos (FOS): otimização de processo e aplicação em alimento. Pub. No.: BR1020140088270, INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

- Costa, M. F., Pimentel, T. C., Guimaraes, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2019). Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 105, 371–376.
- Fonteles, T. V., & Rodrigues, S. (2018). Prebiotic in fruit juice : processing challenges, advances, and perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 22, 55–61.
- Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Wouters, P. D., Nollet, L., & Verstrate. (2000). Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 219–223.
- Guio, F., Rugeles, L. D., Rojas, S. E., Palomino, M. P., Camargo, M. C., & Sánchez, O. F. (2012). Kinetic modeling of fructooligosaccharide production using *Aspergillus oryzae* N74. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 142–63.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, A., & Hutkins, R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18, 287–293.
- Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Jr, G. F., Goh, Y. J., Hamaker, B., Martens, E. C., Mills, D. A., Rastal, R. A., Vaughan, E., & Sanders, M. E. (2016). Prebiotics : why definitions matter. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 1–7.

- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S., & Sagdic, O. (2016). Improving functionality of chocolate : A review on probiotic, prebiotic and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 35–44.
- Linde, D., Rodríguez-Colinas, B., Estévez, M., Poveda, A., Plou, F. J., & Fernández Lobato, M. (2012). Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, 109, 123–130.
- Longoria-García, S., Cruz-Hernández, M. A., Flores-Verástegui, M. I. M., Contreras-Esquivel, J. C, Montañez-Sáenz, J. C., & Balmares-Cerda, R. E. (2018). Potential functional bakery products as delivery systems for prebiotics and probiotics health enhancers. *Journal Foods Science and Technology*, 55, 833–845.
- Lu, E., Yeung, M., & Yeung, C. K. (2018). Comparative Analysis of Lactulose and Fructooligosaccharide on Growth Kinetics, Fermentation, and Antioxidant Activity of Common Probiotics. *Food and Nutrition Sciences*, 9, 161-178.
- Man, J.C., Rogosa, A. M., & Sharpe, M., E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135.
- Mano, M. C. R., Neri-Numa, I. A., da Silva, J. B., Paulino, B. N., Pessoa, M. G., & Pastore, G. M. (2018). Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 17–37.
- Moens, F., Verce, M., & De Vuyst, L. (2017). Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 225–236.
- Ningegowda, M. A., & Gurudutt, P. S. (2012). In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194 : selectivity, viability and effect of metabolites

- on β -glucuronidase activity. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28, 901–908.
- Parche, S., Beleut, M., Rezzonico, E., Jacobs, D., Arigoni, F., Titgemeyer, F., & Jankovic, I. (2006). Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: glcP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. *Journal of Bacteriology*, 188, 1260–1265.
- Ramsesh, N., & Prapulla, S. G. (2006). Edible films and coatings based on fructooligosaccharides with probiotic properties. Pub. No.: WO2006/103698 A1.
- Rios-Covián, D., Sánchez, B., Cuesta, I., Díaz, S.C., Hernández-Barranco, A.M., Gueimonde, M., C.G., & de los Reyes-Gavilán. (2016). Glucolytic fingerprinting reveals metabolic groups within the genus *Bifidobacterium*: an exploratory study. *Beneficial Microbes*, 7, 265–273.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructooligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.
- Sánchez, B., Champomier-Verges, M.C., Collado, M.C., Anglade, P., Baraigen, F., Sanz, Y., De los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles A. and Zagorec, M. (2007). Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6450-6459.
- Santos, D. A., Baldo, C., Borsato, D., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Utilization of low-cost substrates for the production of nystose by *Bacillus subtilis* natto cct 7712. *Acta Scientiarum Technology*, 38, 391-397.
- Schad, B. A., & Van Ness, E. (2013). Patent Application Publication. Pub . No .: US 2013/0095141 A1, 1(19).

- Selak, M., Rivière, A., Moens, F., Abbeele, P.V., Geirnaert, A., Rogelj, I., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Inulin-type fructan fermentation by bifidobacteria depends on the strain rather than the species and region in the human intestine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 4097–4107.
- Shalini, R., Abinaya, G., Saranya, P., & Antony, U. (2017). Growth of selected probiotic bacterial strains with fructans from Nendran banana and garlic. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 68–78.
- Silva, P. B., Garcia, S., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Acta Alimentaria*, 46, 1-7.
- Tang, Y., Xie, F., Zhang, D., Zhu, M., Liu, L., Liu, P., & Gu, C. (2015). Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. *Starch - Stärke*, 67, 124–131.
- Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria : For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7–13.
- Valdés-varela, L., Ruas-madiedo, P., & Gueimonde, M. (2017). *In vitro* fermentation of different fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* strains for the selection of synbiotic combinations. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 19–23.
- Vega, R., & Zuniga-Hansen, M. E. (2015). The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. *Food Chemistry*, 173, 784–789.

5.2 ARTIGO II – SUBMETIDO “JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

New starch-nystose prebiotic edible coatings in the post-harvest conservation of minimally processed blackberries

Gabrielly Terassi Bersaneti¹, Sandra Helena Prudencio², Suzana Mali¹, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, ²Department of science and food technology, Centre of Agrarian Sciences, Londrina State University, Paraná-Brazil

Highlights

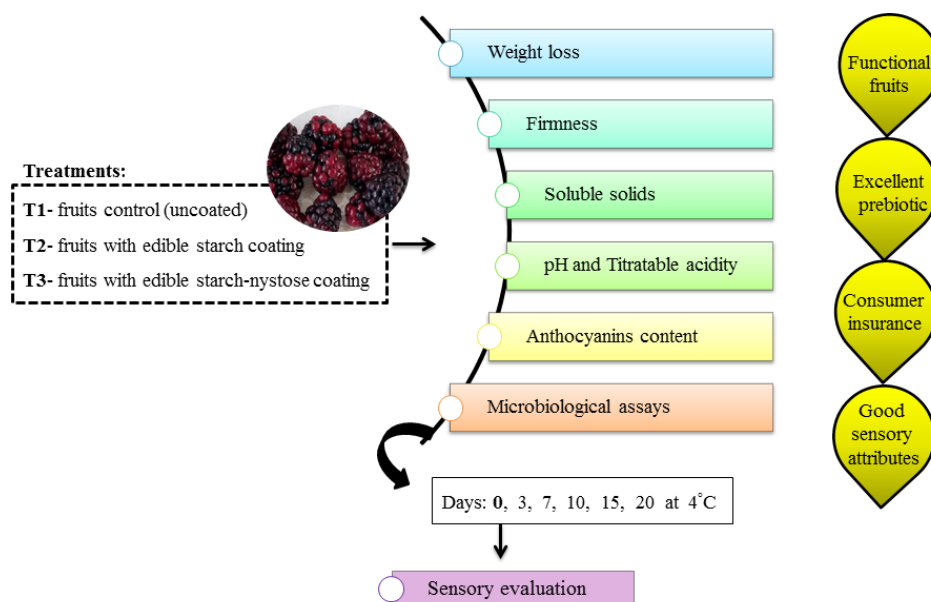
- Functional coating with protective effect for blackberry.
- Coating starch-nystose maintains the blackberry properties.
- Microbial count stayed in the range acceptable and safe for consumers.
- The functional coating presented acceptable sensory attributes.

Abstract

The use of fresh fruit coatings plays an important role in controlling the post-harvest shelf life in blackberry (*Rubus* spp.). Thus, this work aimed to produce edible coatings from cassava starch without and with the addition of nystose, a fructooligosaccharide with prebiotic action, to improve the post-harvest quality of minimally processed fruits. The physicochemical, microbiological and sensory aspects of the fruits at different storage times were evaluated. The use of a prebiotic incorporated into edible coatings increased the product shelf-life and enhanced the quality of blackberries stored for 20 days at 4 °C. The starch and starch-nystose coatings resulted in fruits with higher firmness and high anthocyanin contents, when compared to treatment without the coating, throughout storage. Until the 7th day, the fruits also presented lower counts of psychrotrophic microorganisms and yeasts and molds, the fruit starch-nystose coating was significantly lower compared to other treatments. Sensory evaluation by the hedonic test showed that the coated blackberries retained good acceptance and purchase intention. The prebiotic film had a protective effect on the fruit, with good stability in anthocyanin content, and could serve as an alternative for maintaining foods with a long shelf-life.

Keywords: Fruit; edible films; prebiotic; fructooligosaccharides; shelf-life.

Graphical abstract



1. Introduction

Edible films and coatings are fine layers of materials that provide a barrier against moisture, oxygen and solute movement and extend the shelf life of the coated product. These coatings can be applied to fruits and vegetables, where they are able to control respiration and senescence like modified atmospheres, reducing deterioration (Tanada & Grosso, 2005; Wilson et al., 2017).

Among the polymeric matrices used, cassava starch is a filmogenic material that is low cost, easy to process, and widely available and can be employed in the development of biodegradable films and coatings with various applications as a carrier for bioactive compounds in foods (Basiak, Lenart, & Debeaufort, 2018).

The addition of flavorings, colorings and sweeteners improves the sensory properties of films (Jiménez et al., 2012), and the incorporation of bioactive molecules as antimicrobials, antioxidants (Hamedi et al., 2017), probiotic and/or prebiotic actions (Bersaneti et al., 2016; Bambace, Alvarez, & Moreira, 2019) can improve functional the quality of the product.

Among the prebiotics, nystose is a tetrasaccharide formed by two fructose units linked at the β -(2 \rightarrow 1) position of sucrose and is easy to obtain at high yields (Belghith et al., 2012; Santos et al., 2016). In addition, when added to cassava starch films, it has been shown to improve mechanical properties and maintain prebiotic activity.

Studies using edible films and coatings apply in perishable products such as fruits, as quality and shelf life can be improved (Corato et al., 2019). The use of edible films and coatings supplemented with compounds with prebiotic action on minimally processed fruits has been reported only on apples (Röble et al. 2011) and blueberries (Alvarez, Ponce and Moreira, 2018; Bambace, Alvarez, and Moreira, 2019).

Blackberry is a highly perishable fruit, with a shelf life limited by mass loss, texture changes and microbiological deterioration, thus requiring careful post-harvest storage (Antunes, Duarte Filho, & Souza, 2003; Antunes et al., 2014). Post-harvest fruit decomposition can be controlled with fungicide application, but these products leave residues that can affect the fruits sensory quality, besides causing adverse effects on the consumer organism.

The use of prebiotic edible coatings on blackberry fruits can increase the shelf life and add new properties as prebiotic activity, and maintain the known as antioxidant, anticarcinogenic, vasodilatory and anticoagulant properties (Xie et al., 2017).

The use of techniques can increase fruit shelf life, without altering physical and sensory characteristics, while positively impacting their nutritional properties is of great importance in reducing post-harvest losses.

Researchers have developed edible coatings with other matrices to increase the protective effect on the fruits. Yang et al. (2019) have used gum arabic/roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) to coating blueberry. Robles-Flores et al. (2018) have used proteins and gums from *Cajanus cajan* seed to be applied to strawberries. Ferreira, Molina

and Pelissari (2019) with cassava starch and babassu flour to fruits of the Brazilian cerrado.

Our previous research (Bersaneti et al, 2016; 2019) showed that the film edible starch-nystose has prebiotic effect and can be used in coating fruits, adding functional effect, in addition to the protective effect that the film has.

Therefore, this work proposes to develop a cassava starch coating with nystose for minimally processed blackberry fruits to preserve post-harvest quality and to evaluate sensory and purchase intention tests.

2. Materials and methods

2.1 Fruit

Blackberries (*Rubus* spp.) cv. Tupy were collected at a local plantation, 2018 harvest (Londrina, Brazil, Latitude: Longitude: 23 ° 17 ' 34 " South; 51° 10' 24" West). As non-climateric fruit, it was harvested at the complete maturation stage, presenting firm pulp, reddish-black color and edible quality. The harvest was performed in the morning, fruits that were uniform in size, free from physical damage and fungal infection were selected. The fruits were sanitized in a solution of acetic acid 125 ppm for 30 min and washed in tap water.

2.2 Preparation of coating solutions

Coating solutions were prepared by the *casting* method using cassava starch provided by Yoki® Alimentos S.A. (Paraná, Brazil), glycerol (Synth – Brazil) as plasticizer and nystose as a functional ingredient. Nystose was produced by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto according to Bersaneti et al. (2017). Cassava starch (3 g/100

g filmogenic solution) and glycerol (20 g/100 g solids) were directly mixed with distilled water at 95 °C for 10 min with manual shaking. After gelatinization the starch solution was cooled to 50-60 °C and was mixed with the nystose powder; at this low temperature, the prebiotic activity of nystose was maintained in edible coatings (Bersaneti et al., 2019). Nystose was added to the filmogenic solutions (10 g nystose/100 g solids), and this concentration was standardized by Bersaneti et al. (2016). An edible starch film (without nystose) was also produced employing the same conditions.

2.3 Coating of the fruits

Blackberries were immersed into room temperature (25 °C) coating solution for 1 min. The excess of coating material was allowed to drip off for 1 min. Treated blackberries were air dried at room temperature for 3 h and 100 g of fruits were put in polypropylene trays (4 × 10 cm) with hinged lid, stored at 4 ± 1 °C for 20 days. The fruits were submitted to three treatments: (T1) fruits control (uncoated), (T2) fruits with edible starch coating and (T3) fruits with edible starch-nystose coating, were dried at room temperature with the aid of mechanical ventilation. At each sampling day (0, 3, 7, 10, 15 and 20) five trays of the three treatments were used for the analysis, the control samples (uncoated fruits) and coated samples were tested at same time.

2.4 Analysis of the fruits during storage

2.4.1 Weight loss (%)

A portion of 100 g of fruits was used to measure weight loss. The fruits were weighted at the beginning of the experiment up to 20 days. The results were expressed as percentage loss of initial weight. Two replicates were performed for each treatment.

2.4.2 Firmness

The compression force of blackberries was measured with a texture analyzer TA-TX2 Stable Micro Systems (Surrey, England). A cylindrical probe (35 mm of diameter) which compressed the fruit up to 50% of its height with a crosshead speed of 2,5 mm/s, and the parameter considered was the maximum peak force at compression (N). The fruits were analyzed at the beginning of the experiment up to 20 days. Seven replicates were performed for each treatment, using one fruit at a time (Meneghel, Benassi, & Yamashita, 2008).

2.4.3 Soluble solids

Soluble solids content was determined by AOAC (1995) procedure with an Abbe refractometer (Carl Zeiss, model Abbe, Germany). Measurements were expressed in °Brix. The fruits were analyzed up to 20 days. Three replicates were performed for each treatment.

2.4.4 pH and Titratable Acidity

The fruits were macerated to obtain homogenates for pH and titratable acidity determinations, five fruits were used for each test, according to the Institute Adolfo Lutz procedure (1976). Titratable acidity was expressed in g citric acid /100 g of sample. The fruits were analyzed at the beginning of the experiment up to 20 days. Three replicates were performed for each treatment.

2.4.5 Anthocyanins content

The anthocyanins content was determined by the spectrophotometric method of pH differential method according to the Fuleki & Francis (1968), and analyzed on a Fento

482 spectrophotometer (São Paulo, Brazil), at $\lambda= 510$ nm. Total anthocyanin content was expressed in mg of anthocyanins per 100 g of fruit. The fruits were analyzed at the beginning of the experiment up to 20 days. Two replicates were performed for each treatment.

2.4.6 Microbiological assays

Mesophilic and psychrotrophic microorganisms, yeasts and molds were determined during storage in control and coated samples. For each determination, samples of 25 g were macerated with 225 mL of 10 g/L peptone water. Serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were prepared from the homogenate with peptone water. For mesophilic and psychrotrophic microorganism counts, 1 mL of each dilution was plated in PCA (plate count agar, Merck, Germany), and the plates were incubated at 37 °C for 2 days and at 10 °C for 10 days respectively. For yeast and mold counts, 1 mL of each dilution was plated in PDA (potato dextrose agar, Merck, Germany), and the plates were incubated at 25 °C for 5 days. Viable counts were expressed as log colony-forming units (CFU) per gram of fruit.

2.5 Sensory evaluation

The sensorial analysis of the fruits was carried out one day after being coated, the fruits were prepared according to good food handling practices. For evaluation, one fruit (10 g) of each treatment was served in disposable white plastic dishes coded with random three-digit numbers. The samples were presented simultaneously and in random order to the evaluators. Drinking water was used at room temperature to clean the mouth, before and between the tests.

The project was approved by the Research Ethics Committee Involving Human beings by the State University of Londrina (CEP N° 1.827.884, CAAE: 59936016.3.0000.5231). The tests were performed in individual cabins with special daylight lighting in the Laboratory of Sensory Analysis at the State University of Londrina.

2.5.1 Acceptance test

Acceptance test was applied by 100 untrained evaluators, the analyzed attributes were appearance, aroma, flavor, texture, and global acceptance. It was used structured 9-point hedonic scale (from 9- extremely like; 5- neither like nor dislike, to 1- extremely dislike) (Meilgard et al., 2007).

In parallel, each evaluators was required to evaluate the purchase intention for the using the 5-point scale (5- certainly buy, 1- certainly would not buy) (Meilgard et al., 2007).

2.7 Statistical analysis

Data were analyzed using the Analysis of Variance (ANOVA) in Software Statistica 7.0. The significance of the differences among treatment and differences of treatment within each times, were tested by comparing means was detected by Tukey's test at the level of $p < 0.05$. Graphic presentation of the data was prepared by Microsoft Excel.

3. Results and Discussion

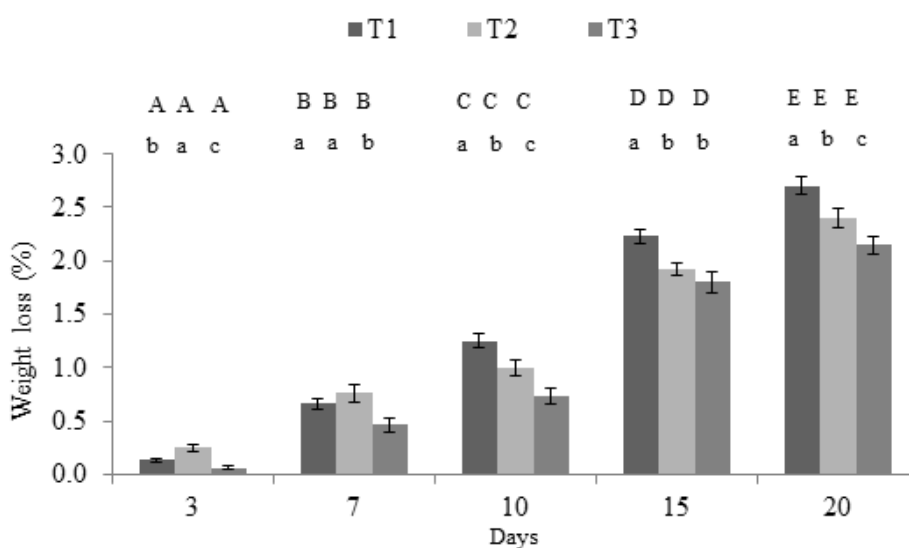
The attributes of post-harvest quality and sensory evaluation were studied in blackberry fruits without (control) and with starch and starch-nystose coatings to preserve

the texture and nutritional value of the fruit, increase the shelf life and verify the acceptance of the product by sensory tests.

3.1 Weight loss (%)

As shown in Figure 1, the weight losses were 2.70% (T1), 2.40% (T2) and 2.15% (T3) at 20 days of storage at 4 °C. Uncoated fruits showed significantly higher weight loss ($p \leq 0.05$) than coated fruits, indicating that coating prevented weight loss. This loss was smaller than that observed by Meneghel, Benassi, & Yamashita (2008), who used blackberry fruits (cultivar Comanche) coated with sodium alginate and sorbates and stored at 0 °C, where the loss was 14.0% after 18 days. Oliveira, Kwiatkowski, & Clemente (2013) observed weight loss values between 5 and 30% in blackberry fruits coated with polymeric cassava starch matrix and kefir grains stored at 10 °C for 12 days.

Figure 1. Effect of coating on weight loss of blackberries stored at 4 °C. Treatment T1: control (without coating), T2: with edible starch coating, T3: with edible starch-nystose coating.



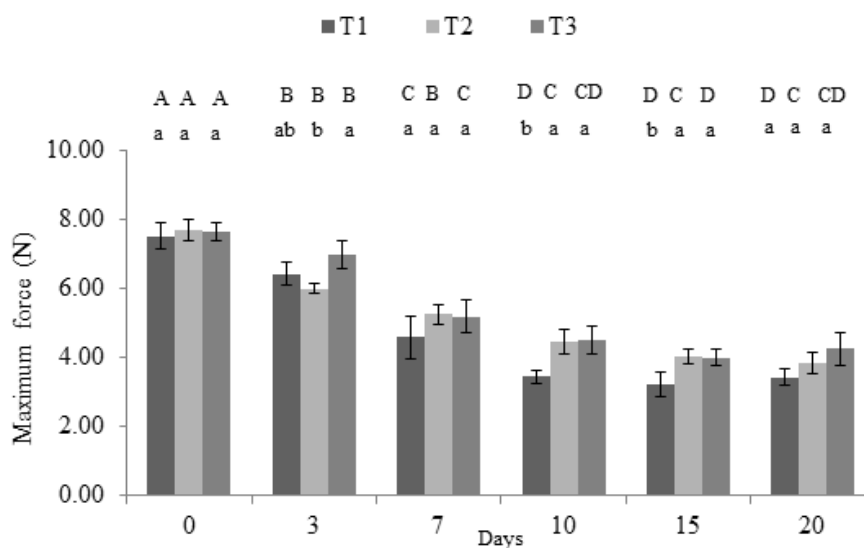
Different letters (lowercase: amongst different treatments for the same time; capital: amongst different times for the same treatment) indicate statistically significant differences by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Bars represent the mean standard error.

In blackberries coated with polymeric chitosan matrix, Oliveira et al. (2014) observed that the higher the storage temperature, the greater the weight loss. When stored at 0 °C, the weight loss was 4% in 18 days, and at 10 °C, the weight loss was approximately 22%. Pérez-Gallardo et al. (2015) observed that the weight loss of uncoated blackberries stored at 4 °C was 7.6%, while fruits coated with a starch-beeswax matrix presented higher values (9.72 – 11.55%), which was attributed to the stress caused to fruits by the coating application.

3.2 Firmness

The firmness of fruit at the beginning of the experiment it was approximately 7.5 N and decreased with storage time, reducing by 55% (3.4 N), 51% (3.8 N), and 45% (4.2 N) in T1, T2 and T3, respectively, at 20 days of storage. Notably, from the 7th day of storage, the coated fruits (T2 and T3) were firmer than the uncoated fruits, regardless of the addition of nystose, indicating that the addition of the prebiotic did not interfere with this fruit property when coated. It can be observed that uncoated blackberries showed a higher softening than coated ones, possibly indicating that the use of edible coatings affected the fruit senescence, reducing the respiration rate and other metabolic activities.

Figure 2. Effect of coating on firmness of blackberries stored at 4 °C. Treatment T1: control (without coating), T2: with edible starch coating, T3: with edible starch-nystose coating.



Different letters (lowercase: amongst different treatments for the same time; capital: amongst different times for the same treatment) indicate statistically significant differences by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Bars represent the mean standard error.

Meneghel, Benassi, and Yamashita (2008) observed that the use of alginate-sorbate coatings did not affect the firmness of blackberries stored at 0 °C for 18 days. Similarly, Oliveira et al. (2014) observed that the use of chitosan or starch coatings did not affect the firmness of blackberries, as the firmness of uncoated and coated fruits decreased along with the increase of days, reaching values close to 3.0 N after 18 days of storage at 10 °C, which has been reported as an inadequate value for consumption. In this study, the firmness values were higher after 20 days of storage, with values of 3.85 and 4.25 N for T2 and T3 coatings.

Bambace, Alvarez, and Moreira (2019) verified that the firmness of blueberries coated with sodium alginate plus inulin and oligofructose, known to be prebiotic compounds, was not affected using the coatings.

Blackberry fruits are fragile and can suffer mechanical damage from harvesting to processing (Meneghel, Benassi and Yamashita, 2008). Thus, the addition of coatings can be beneficial in maintaining fruit texture and quality, as shown in this paper.

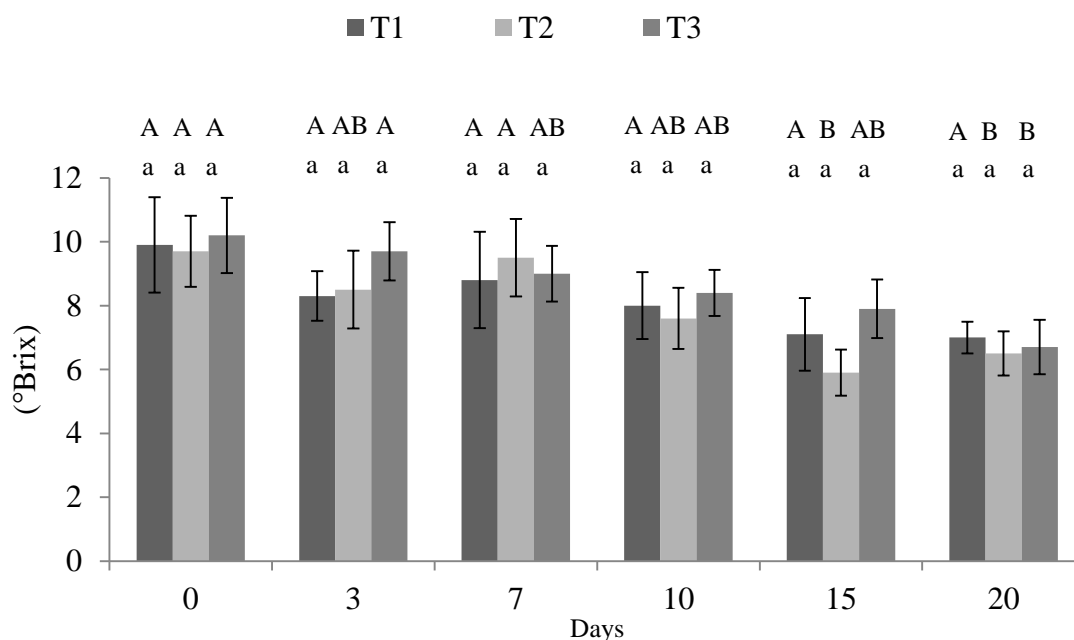
The texture loss that occurs during storage of fruits can be related to several factors, including dehydration and metabolic changes. Of the metabolic events that contribute to softening in fruits, the main factors in texture loss are the solubilization and depolymerization of the polysaccharides from cell wall, mainly pectin, hemicellulose and cellulose, which are responsible for the alteration of cell wall structure during ripening-related loss of firmness (Goulao and Oliveira, 2008; Mali and Grossmann, 2003).

3.3 Soluble solids

The Figure 3 shows that the average soluble solids contents for treatments T1, T2 and T3 were within an acceptable range, remaining between 7 and 10 °Brix (Antunes, 2002). Over time, a decrease in soluble solids values was observed, with the lowest values obtained after 10 days for coated blackberries and showing no significant differences ($p \geq 0.05$) throughout the storage period (Figure 3). This parameter is related to respiratory rate and reducing sugar content of fruits (Silva et al., 2017).

Meneghel, Benassi, and Yamashita (2008) observed that the use of alginate-sorbate coatings did not significantly affect the soluble solids content of blackberries stored at 0 °C; they reported mean values of 8.1 °Brix during the 18 days of storage, values close to those obtained in this work.

Figure 3. Effect of coating on soluble solids content of blackberries stored at 4 °C. Treatment T1: control (without coating), T2: with edible starch coating, T3: with edible starch-nystose coating.



Different letters (lowercase: amongst different treatments for the same time; capital: amongst different times for the same treatment) indicate statistically significant differences by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Bars represent the mean standard error.

Oliveira et al. (2014) studied blackberry fruits coated with cassava starch and chitosan film and observed that the soluble solids content was not affected by the presence of the coatings when the fruits were stored at 0 °C for 18 days, but in the fruits stored at 10 °C, the soluble solids content tended to decrease. This decrease in soluble solids content can be associated with increased storage temperature, which may have led to the degradation of some fruit carbohydrates or the growth of microorganisms capable of consuming free sugars.

Guerreiro et al. (2015) reported that the soluble solids content in strawberries stored at 0.5 °C for 14 days was not significantly affected by the use of alginate and pectin-based coatings, indicating that the coatings do not contribute to the reduction of

soluble solids, which are affected by temperature variations and decomposition by microorganisms.

3.4 pH and Titratable Acidity

The pH values of the fruits changed little during the 20 days of storage at 4 °C, remaining at 3.5 for all treatments. These values are consistent with the pH values observed for uncoated blackberries and those coated with biodegradable matrices starch or chitosan (Oliveira, Kwiatkowski, & Clemente 2013; Oliveira et al. 2014).

In turn, Antunes, Duarte Filho and Souza (2003) observed a tendency for pH to increase in blackberries coated with starch matrix and kefir grains during 12 days of storage at 10 °C, with values that changed from 3.59 to 4.09 for fruits of the Comanche cultivar. The authors attributed this pH increase to the fruit maturation process, which leads to a decrease in its acidity.

The titratable acidity was expressed in g of citric acid per 100 g of the fruit, reaching an average of 1 g of citric acid/100 g for all treatments. This value remained constant through 15 days of storage at 4 °C. However, after 15 days, there was a small increase in citric acid concentration, but there were no significant differences ($p \geq 0.05$) between T1 and T3, with only a difference for T2 on the 10th day of the experiment, and the final value was statistically equal with the start of the test.

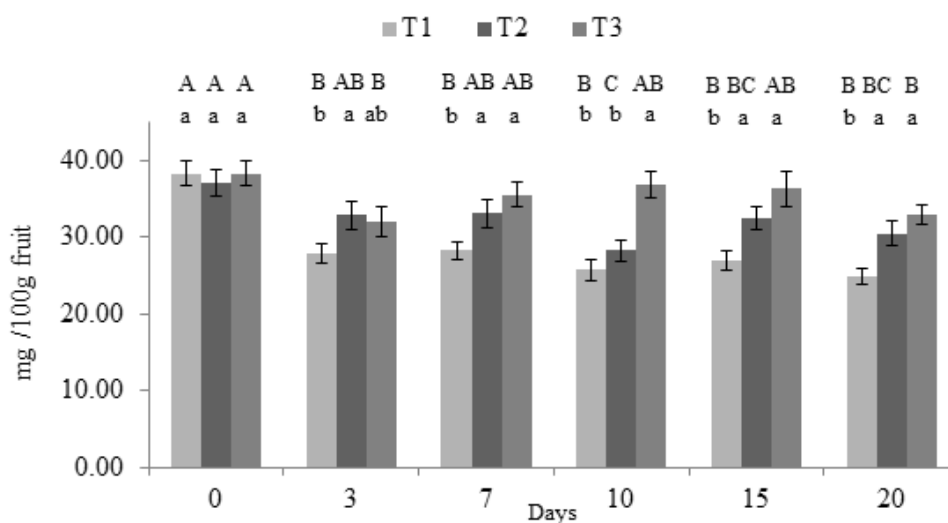
This behavior was also described by Antunes, Duarte Filho, & Souza (2003) in blackberry fruits (cultivar Comanche), where the concentration of citric acid increased at the end of storage. Similar results were described by CIA et al. (2003) using blackberry fruits from the Guarani and Caingangue cultivars.

3.5 Anthocyanin content

The initial anthocyanin content was approximately 38.0 mg/100 g of fruits for all treatments. Within 20 days of storage, the values reached 24.8 mg/100 g (T1), 30.4 mg/100 g (T2) and 32.9 mg/100 g (T3) (Figure 4). The decrease in anthocyanin content in coated blackberry fruits can be attributed to the stress caused to the fruits with the application of coatings (Pérez-Gallardo et al., 2015).

Uncoated fruits presented lower anthocyanin values ($p \leq 0.05$) than coated fruits from the 7th day of storage. The coatings must have reduced the metabolic activity of the fruits, resulting in higher anthocyanin contents (Meneghel, Benassi, and Yamashita, 2008). The anthocyanin values found in this study are in agreement with the results obtained from the literature (Meneghel, Benassi, and Yamashita, 2008; Jacques et al.; 2009; Oliveira et al., 2013; Souza et al., 2018).

Figure 4. Effect of coating on total anthocyanin content of blackberries stored at 4 °C. Treatment T1: control (without coating), T2: with edible starch coating, T3: with edible starch-nystose coating.



Different letters (lowercase: amongst different treatments for the same time; capital: amongst different times for the same treatment) indicate statistically significant differences by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Bars represent the mean standard error.

The use of coatings may cause decreased oxygen and increased CO₂ accumulation in fruits, which can result, respectively, in a decrease in anthocyanin synthesis and an increase in the oxidation of phenolic compounds by enzymatic reactions involving polyphenol oxidase and peroxidase (Pérez-Gallardo et al., 2015).

Several factors may contribute to the anthocyanin degradation in fruits, such as the presence of sugars that can accelerate the darkening process and the pH, which can result in greater stability if the pH is between 1.0 and 3.5 (Araújo, 2006), values close to those observed to the fruits in this study.

3.6 Microbiological assays

The mesophilic and psychrotrophic microorganism and yeast and mold counts in treatments T1, T2 and T3 over 20 days of storage are shown in Table 1. The mesophilic microorganism counts decreased significantly for all treatments during cold storage ($p \leq 0.05$), which was certainly linked to the fruit storage temperature.

After the 7th day of storage (Table 1), the counts of psychrotrophic microorganisms, yeasts and molds were lower for T3 (edible starch-nystose coating), but from the 15th day, the control fruits (T1) had significantly lower counts ($p \leq 0.05$) in relation to the coated fruits (T2 and T3).

Contamination was verified in all treatments, but the coated fruits (T2 and T3) were submitted to a larger number of steps until the final processing, which may have caused physiological stress, inducing damage to the product surface and removing the natural protections from the peel, such as waxes and antimicrobial compounds, rendering

the product more susceptible to microorganism development (Meneghel, Benassi, and Yamashita, 2008).

The microbial count determines the shelf life of fruits, with counts up to 10^6 UFC/g of fruit being acceptable, thus ensuring consumers of the fruits' microbiological safety (Legnani and Leoni, 2004; Nzfsa, 2005). The counts of psychrotrophic microorganisms, yeast and mold reached 10^5 UFC/g of fruit within 10 days of storage at 4 °C; after this period, the counts were 10^6 UFC/g of fruit. For mesophilic microorganisms, the count was 10^3 UFC/g of fruit in end of the experiment (Table 1); therefore, all treatments resulted in recommended microbial counts equal to or less than 10^6 UFC/g of fruit within 20 days.

Table 1. Mesophilic, psychrotrophic and yeast and mold count in fruit control of coated blackberries. Treatment T1: control (without coating), T2: with edible starch coating, T3: with edible starch-nystose coating.

Parameter	samples	storage time at 4 °C in days					
		0	3	7	10	15	20
mesophilic microorganisms (log CFU/g fruit)	T1	3.44±0.13 ^{abA}	3.85±0.03 ^{aAB}	3.16±0.07 ^{bcA}	2.63±0.30 ^{deB}	2.86±0.08 ^{cdB}	2.20±0.17 ^{eB}
	T2	3.48±0.06 ^{ba}	4.28±0.03 ^{aA}	3.10±0.05 ^{cA}	3.24±0.14 ^{cA}	3.64±0.06 ^{ba}	2.60±0.01 ^{dA}
	T3	3.41±0.06 ^{aA}	3.47±0.33 ^{aB}	2.02±0.03 ^{cB}	2.69±0.09 ^{bB}	2.46±0.15 ^{bcC}	2.40±0.17 ^{bcAB}
psychrotrophic microorganisms (log CFU/g fruit)	T1	4.64±0.01 ^{dA}	4.38±0.43 ^{dB}	6.37±0.04 ^{bA}	6.85±0.05 ^{bcB}	7.73±0.12 ^{aB}	7.22±0.11 ^{acC}
	T2	4.30±0.02 ^{eB}	5.18±0.03 ^{dA}	5.78±0.06 ^{eB}	6.90±0.01 ^{bAB}	8.44±0.03 ^{aA}	8.51±0.08 ^{aA}
	T3	4.21±0.03 ^{fC}	4.73±0.24 ^{eAB}	5.35±0.03 ^{dC}	6.96±0.04 ^{cA}	8.32±0.10 ^{aA}	7.89±0.14 ^{bB}
yeasts and molds (log CFU/g fruit)	T1	3.53±0.20 ^{fB}	4.64±0.02 ^{eB}	5.89±0.01 ^{dB}	7.31±0.04 ^{bA}	7.78±0.08 ^{aC}	6.75±0.27 ^{cB}
	T2	4.40±0.03 ^{fA}	5.28±0.06 ^{eA}	6.01±0.03 ^{dA}	7.16±0.02 ^{cB}	8.50±0.04 ^{aA}	7.49±0.10 ^{bA}
	T3	4.13±0.04 ^{fA}	4.52±0.03 ^{eC}	5.37±0.02 ^{dC}	7.28±0.05 ^{cA}	8.27±0.01 ^{aB}	7.69±0.27 ^{bA}

Values are represented as mean± standard deviation. Means followed by the same lowercase letter in the lines or capital letter in the columns do not differ by Tukey's test (p<0.05)

Other studies also verified microbial contamination in minimally processed fruits, and the results indicated high microbial counts for psychrotrophic microorganisms, yeast and mold when using edible coatings compared to control, with similar sampling times (Meneghel, Benassi, and Yamashita, 2008; Narsaiah et al., 2014; Guerreiro et al., 2015; Bambace, Alvarez, and Moreira, 2019).

3.7 Sensory evaluation

The hedonic notes attributed to the appearance, aroma, flavor and texture for the three treatments (T1, T2 and T3) did not show significant differences ($p \geq 0.05$) (Table 2), indicating that the edible films with starch and starch-nystose did not influence the degree of appreciation of these attributes in the fruit. In terms of global acceptance, the averages were approximately 7.0 on a scale from 0 to 9, which were approved by the judges, indicating that the coated fruits were well accepted.

The judges were also asked whether they would buy the products with edible coatings. The average scores are shown in Table 2; the coated fruits showed no significant differences ($p \geq 0.05$) when compared to control fruits without coating.

Alvarez, Ponce, & Moreira (2018) studied the parameters of sensory quality and acceptability of minimally processed fruits with the addition of apple and orange fibers, inulin and oligofructose in a chitosan coating for blueberry fruits. After coating the fruits, the sensory analysis was applied, and the results also showed no significant differences ($p \geq 0.05$) between the treatments. According to Bambace, Alvarez, & Moreira (2019), the addition of prebiotic fibers in edible coatings in blueberries also did not affect any of the sensory attributes studied.

Table 2. Acceptability and purchase intention coated blackberry fruits stored at room temperature at the beginning of the experiment. Treatment T1: control (without coating), T2: with edible starch film, T3: with edible starch-nystose film.

Attributes	Treatments		
	T1	T2	T3
¹ Appearance	7.7±1.4 ^a	7.5±1.3 ^a	7.5±1.5 ^a
¹ Aroma	6.6±1.5 ^a	6.7±1.4 ^a	6.7±1.5 ^a
¹ Flavor	6.9±1.7 ^a	6.6±1.9 ^a	6.7±1.9 ^a
¹ Texture	7.3±1.5 ^a	7.0±1.8 ^a	7.0±1.8 ^a
¹ Global Acceptance	7.2±1.3 ^a	7.0±1.5 ^a	7.0±1.5 ^a
² Purchase intention	4.0±1.0 ^a	3.6±1.1 ^a	3.7±1.1 ^a

Values are represented as mean± standard deviation. Means followed by the same lowercase letter in the lines do not differ by Tukey's test ($p > 0.05$)

¹hedonic scale: 9= liked extremely and 1 = disliked extremely; ²scale: 5 = certainly buy and 1 = certainly would not buy.

The coating described here with the addition of nystose can be classified as a functional food, being new biotechnological product that carries prebiotic properties, showing promise in a market where consumers seek health and well-being. In this research, in addition to the protective effect, the starch-nystose coating added the prebiotic property described by Bersaneti et al. (2019).

4. Conclusion

Considering the overall quality analysis presented here, starch-nystose films may be a viable alternative for blackberry fruit coating. Minimally processed fruit and fruit ready for consumption with the addition of coatings showed no significant differences in sensory acceptability compared to uncoated controls. The use of starch and starch-nystose

coatings resulted in fruits with greater firmness and higher anthocyanin contents over 20 days of storage. Thus, blackberries coated with starch films plus nystose may be a viable and promising alternative for consuming bioactive compounds, which improve the health of consumers who are currently looking for multifunctional products.

Acknowledgment

The authors would like to thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – Brazil), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) by support and department of science and food technology from Londrina State University. And to local furnisher Strassberg, for donating fruit for this study.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Alvarez, M. V; Ponce, A. G; Moreira, M. R. (2018). Influence of polysaccharide-based edible coatings as carriers of prebiotic fibers on quality attributes of ready-to-eat fresh blueberries. *Journal of the science of food and agriculture*, 98, 2587-2597.

Antunes, L. E. C., Duarte Filho, J., & Souza, C. M. (2003). Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 413-419.

Antunes, L. E. C (2002). Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural*, 32, 151-158.

Antunes, L. E. C., Pereira, I. S., Picolotto, L., Vignolo, G. K., & Gonçalves, M. A. (2014). Produção de amoreira-preta no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 100-111

AOAC. (1995). *Official methods of analysis of AOAC international*, (16th ed), Association of Official Analytical Chemistry: Arlington, TX, vol. 2.

Araújo, J. M. A. (2006). *Química de alimentos: Teoria e prática*. (3th ed). Lavras, Editora UFV, p. 478.

Bambace, M. F., Alvarez, M. V., & Moreira, M. R. (2019). Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Research International*, 122, 653-660.

Basiak, E., Lenart, A., & Debeaufort, F. (2018). How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers*, 10, 412-430.

Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 451–458.

Bersaneti, G. T., Mantovan, J., Magri, A., Mali, S., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydrate Polymers*, 151, 1132–1138.

Bersaneti, G. T., Pan, N. C., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2017). Co-production of fructooligosaccharides and levan by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with potential application in the food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 838-851.

Bersaneti, G. T., Garcia, S., Mali, M., & Celligoi, M. A. P. C. (2019). Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose

from *Bacillus subtilis* natto. *LWT - Food Science and Technology*, 116,

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108502>

Cia, P., Bron, I. U., de Toledo Valentini, S. R., Pio, R., & Chagas, E. A. (2007). Modified atmosphere and refrigeration for the postharvest conservation of blackberry. *Bioscience Journal*, 23, 11-16.

Corato, U. De. (2019). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry : A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 1–36.

<http://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>

Ferreira, D. C. M., Molina, G., & Pelissari. (2019). Effect of Coating from cassava starch and babaçu flour (*Orbignya phalerata*) on Brazilian cerrado fruits quality. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02366-z>

Fuleki, T., & Francis, J. F. (1968). Quantitative methods for anthocyanins 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33, 78-83.

Goulao, L. F., & Oliveira, C. M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Food Science & Technology*, 19, 4–25.

<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.002>

Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., & Antunes, M. D. C. (2015). The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 51–60.

Hamed, H., Kargozari, M., Shotorbani, P. M., Mogadam, N. B., & Fahimdanesh, M. (2017). A novel bioactive edible coating based on sodium alginate

and galbanum gum incorporated with essential oil of *Ziziphora persica*: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food model. *Food hydrocolloids*, 72, 35-46.

Instituto Adolfo Lutz. (1976). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, (2th ed), São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, vol. 1.

Jacques, A. C., Pertuzzati, P. B., Barcia, M. T., & Zambiasi, R. C. (2009). Compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal Food and Technology*, 12, 123–127.

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2058–2076.

Legnani, P. P., & Leoni, E. (2004). Effect of processing and storage conditions on the microbiological quality of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 1061-1068.

Lin, M. G., Lasekan, O., Saari, N., & Khairunniza-Bejo, S. (2018). Effect of chitosan and carrageenan-based edible coatings on post-harvested longan (*Dimocarpus longan*) fruits. *CyTA - Journal of Food*, 16, 490–497.

<http://doi.org/10.1080/19476337.2017.1414078>

Mali, S., & Grossmann, M. V. E. (2003). Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7005-7011.

Meilgaard, M., Civille, G.V., & Carr, B.T. (2007) *Sensory Evaluation Techniques*, (4 th ed) London: CCR Press, 488p.

Meneghel, R. F. A., Benassi, M. T., & Yamashita, F. (2008). Revestimento comestível de alginato de sódio para frutos de amora-preta (*Rubus ulmifolius*). *Semina: Ciências Agrárias*, 29, 609-618.

Moreira, M. R., Tomadoni, B., Martín-Belloso, Soliva-Fortuny, R. (2015). Preservation of fresh-cut apple quality attributes by pulsed light in combination with gellan gum-based prebiotic edible coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1130–1137. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.002>

Mullen, W., McGinn, J., Lean, M. E. J., MacLean, M. R., Gardner, P., & Duthie, G. G. (2002). Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5191–5196.

Narsaiah, K., Wilson, R. A., Gokul, K., Mandge, H. M., Jha, S. N., Bhadwal, S., Anurag, R. K., Malik, R. K., & Vij, S. (2014). Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 100, 212-218.

Nzfsa, (2005). *A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods: Information Booklet for the Food Industry*. New Zealand Food Safety Authority, Wellington, New Zealand, p. 17.

Oliveira, D. M., Rosa, C. I. L. F., Kwiatkowski, A., & Clemente, E. (2013). Biodegradable coatings on the postharvest of blackberry stored under refrigeration. *Revista Ciência Agronômica*, 44, 302-309.

Oliveira, D. M., Kwiatkowski, A., Rosa, C. I. L. F., & Clemente, E. (2014) Refrigeration and edible coatings in blackberry (*Rubus* spp.) conservation. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2120-2126.

Röble, C., Brunton, B., Gormley, R. T., Wouters, R., & Butler, F. (2011). Alginate coating as carrier of oligofructose and inulin and to maintain the quality of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 76, 19-29.

Robles-Flores, G. C., Abud-Archila, M., Ventura-Canseco, L. M. C., Meza-Gordillo, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., Gutiérrez-Miceli, F. A. (2018). Development and Evaluation of a Film and Edible Coating Obtained from the *Cajanus cajan* Seed Applied to Fresh Strawberry Fruit. *Food and Bioprocess Technology*, v. 11, pp. 2172–2181. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2175-5>

Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.

Sánchez, L. C. A., Real, C. P. V., & Perez, Y. B. (2014). Effect of an edible crosslinked coating and two types of packaging on antioxidant capacity of castilla blackberries. *Food Science and Technology*, 34, 281–286. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/fst.2014.0047>

Santos, D. A., Baldo, C., Borsato, D., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Utilization of low-cost substrates for the production of nystose by *Bacillus subtilis* natto cct 7712. *Acta Scientiarum Technology*, 38, 391-397.

Silva, G. M. C., Silva, W. B., Medeiros, D. B., Salvador, A. R., Cordeiro, M. H. M., da Silva, N. M., Santana, D. B., & Mizobutsi, G. P. (2017). The chitosan affects severely the carbon metabolism in mango (*Mangifera indica* L. cv. Palmer) fruit during storage. *Food chemistry*, 237, 372-378.

Souza, A. V., Vieites, R. L., Gomes, E. P., & Vieira, M. R. S. (2018). Biochemical characterization of blackberry fruit (*Rubus* sp) and jellies. *Australian Journal of Science*, 12, 624-630.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Perez, M., & Hernandez-Perez, T. (2010). Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life – A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 299–308.

Pérez-Gallardo, A., García-Almendárez, B., Barbosa-Cánovas, G., Pimentel-González, D., Reyes-González, L. R., & Regalado, C. (2015). Effect of starch-beeswax coatings on quality parameters of blackberries (*Rubus spp.*), 52, 5601–5610.

<http://doi.org/10.1007/s13197-014-1665-3>

Tanada, S.P., & Grosso, C. (2005). Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria anassa* quality). *Postharvest Biology and Technology*, 36,199-208.

Tang, Y., Xie, F., Zhang, D., Zhu, M., Liu, L., Liu, P., & Gu, C. (2015). Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. *Starch - Stärke*, 67, 124–131.

Wilson, M. D., Stanley, R. A., Eyles, A., & Ross, T. (2019). Innovative processes and technologies for modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut fruits and vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59, 411-422.

Xie, P., Zhang, Y., Wang, X., Wei, J., & Kang, W. (2013). Antithrombotic effect and mechanism of *Rubus spp.* Blackberry. *Food & Function*, 8, 2000-2012.

5.3 ARTIGO DE REVISÃO III

Título: Immobilization of levansucrase: strategies and biotechnological applications.

Autores: Gabrielly Terassi Bersaneti, Cristiani Baldo e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Publicado em: Journal of the Chilean Chemical Society, 2019.

DOI: 10.4067/s0717-97072019000104377

Link: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071797072019000104377

Resumo: Immobilization is an excellent tool for enzymatic stabilization, improving the biocatalytic processes, allowing the reuse of the enzyme and promoting an easier separation of the molecule of interest. Currently, new enzymatic bonding processes are arising on solid supports, based on classical immobilization methods. Amongst the supports used, chitosan is a polysaccharide that offers a unique set of characteristics, as biocompatibility, biodegradability, non-toxicity and antibacterial properties. Thus, many enzymes has being immobilized on this support, including levansucrase, that is able to synthesize levan and fructooligosaccharides, two important biomolecules which have beneficial health properties. These review present different methods of immobilization (physical adsorption, entrapment, crosslinking and covalent bonding) for fructosyltransferases, as well as different immobilization matrices that can be applied in biotechnological processes. However, studies are still needed in order to adopt efficient immobilization techniques, in which the biocatalyst remains more stable, in order to become the process attractive to the industrial sector.

Key words: Applications, enzymatic immobilization, levansucrase, supports.

5.4 PATENTE I

Título: “Síntese de fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase de *Bacillus subtilis natto* imobilizada em quitosana”

Autores: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Gabrielly Terassi Bersaneti, Nicole Caldas Pan, Marcos Roberto de Oliveira.

Protocolada em: 09/ 08/ 2017 (processo **BR 10 2017 017067 5**)

Resumo: A presente invenção refere-se à imobilização da levanasacarase de *Bacillus subtilis natto* para síntese de fruto-oligossacarídeos, classificado como prebiótico e que podem ser incorporados em alimentos. Esta invenção apresenta elevada importância industrial, pois, utilizando enzimas imobilizadas, há redução de tempo e custos devido à reutilização do suporte. Apresenta-se um processo relevante, principalmente no setor alimentício, visando o desenvolvimento de produtos promissores a saúde humana como os fruto-oligossacarídeos, que apresentam alto valor nutricional, além de contribuir na melhoria da qualidade de vida da população que busca por alimentos mais saudáveis.

5.5 PATENTE II

Título: “Processo de produção enzimática de exopolissacarídeos de *Bacillus subtilis natto* com propriedades cosmetológica”

Autores: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Gabrielly Terassi Bersaneti.

Protocolada em: 03/ 04/ 2019 (processo **BR 10 2019 006739 0**)

Resumo: A presente invenção descreve o processo de produção dos exopolissacarídeos por síntese enzimática, usando a levanasacarase de *Bacillus subtilis natto*. Esse microrganismo é reconhecido como seguro a saúde humana e animal (*GRAS*). Os exopolissacarídeos foram sintetizados em meio de sacarose comercial, separados por precipitação com etanol, dialisados e liofilizados. Depois foram testados quanto às suas propriedades cosmetológicas de atividade antioxidante e de hidratação. A produção do exopolissacarídeo foi elevada, atingindo $101,4 \text{ gL}^{-1}$, esse foi caracterizado como frutana (composto por unidades de frutose). Apresentou propriedade antioxidante com valor de 29,7%, na menor concentração de exopolissacarídeo testado (0,05 mg/mL) e a capacidade de retenção de umidade (hidratação) foi de 97,7%. Os exopolissacarídeos sintetizados pela levanasacarase apresentaram altas produções e excelentes propriedades cosmetológicas. Com esses resultados é possível concluir, que essa biomolécula, pode ser promissora no segmento da indústria de cosmético, melhorando a saúde da pele, pela prevenção do envelhecimento e apresentando um alto poder de hidratação.

5.6 PATENTE III

Título: “Biocosmético facial com propriedades antioxidantes pela adição de levana produzida pela levanasacarase de uma espécie de Bacillus”

Autores: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Audrey Alessandra Stinghen Garcia Lonni, Gabrielly Terassi Bersaneti, Júlia Klarosk Helenas, Raquel Emi Suwa, Isabela Pontes de Andrade.

Protocolada em: 25/ 09/ 2018 (processo **BR 10 2018 069609 2**)

Resumo: A presente invenção destaca o desenvolvimento de uma formulação biocosmética facial, com incorporação da levana sintetizada pela enzima levanasacarase, de uma espécie de Bacillus, este é um polissacarídeo reconhecido como seguro a saúde humana (GRAS). A levana foi sintetizada por via enzimática em meio de sacarose e separada pela precipitação com etanol, dialisada e liofilizada para ser aplicada nas formulações cosméticas. Foram desenvolvidas 3 (três) formulações, a base, padrão e com levana. A formulação cosmética com a adição de levana apresentou alta atividade antioxidante, sendo 3,6 vezes maior do que a atividade da formulação base. O biocosmético permaneceu estável por 15 dias e a espalhabilidade do produto aumentou com a adição de levana. Assim, este produto pode ser promissor no segmento da indústria de cosmético por ter ação antioxidante comprovada, prevenindo o envelhecimento e melhorando a saúde da pele.

5.7 CAPÍTULO DE LIVRO

Título do livro: A produção do conhecimento nas ciências biológicas

Título do capítulo: Produção de levana e sua aplicação em cosméticos

Autores: Reginara Teixeira da Silva, Gabrielly Terassi Bersaneti, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Publicado em: Atena Editora, 2019.

DOI: 10.22533/at.ed.7911925044

Link: <https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2019/04/E-book-A-Producao-do-Conhecimento-nas-Ciencias-Biologicas.pdf>

Resumo: Atualmente, o Brasil ocupa a 4^a posição no ranking mundial no consumo de cosméticos o que demonstra a grande procura por produtos principalmente os formulados com ingredientes bioativos, que não tragam danos ao meio ambiente e que confirmam efeitos benéficos à saúde da pele dos consumidores. Com o surgimento de novas matérias-primas a levana é uma biomolécula que tem sido estudada, por apresentar propriedades industrialmente importantes, como capacidade de retenção de água, atividade antioxidante, anti-inflamatória, além de poder ser aplicada como estabilizante e espessante, o que a torna gradativamente competitiva quando comparada com moléculas sintéticas. A levana é um exopolissacarídeo de frutose produzida com substratos de baixo custo e apresenta aplicações industriais nos setores de cosméticos, farmacêutico, nanotecnologia, alimentos, entre outros. Sendo assim, o objetivo desta revisão é descrever a produção microbiana do polissacarídeo levana e a inovação de aplicação em cosméticos.

CONCLUSÕES

- A melhor produção de nistose foi de 58,2 g/L por síntese enzimática com a levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto.
- O revestimento comestível foi desenvolvido com 10% de nistose, pois esta concentração melhorou as suas propriedades mecânicas.
- O revestimento amido-nistose apresentou efeito prebiótico comprovado pelo crescimento dos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e bem como a formação de ácidos orgânicos láctico e acético.
- Os frutos de amora-preta revestidos com filmes de amido-nistose apresentaram menor perda de peso, maior firmeza e mantiveram altos teores de antocianinas em aproximadamente 15 dias de armazenamento.
- Até o 7º dia os frutos revestidos apresentaram menor contagem de mesófilos, psicrotrofos, bolores e leveduras.
- A avaliação sensorial demonstrou que as amoras-pretas revestidas não apresentaram diferenças significativas com o controle (sem revestimento) e obtiveram boa aceitação e intenção de compra pelos avaliadores.
- O desenvolvimento de um produto biotecnológico, como o revestimento de amido-nistose apresenta propriedades funcionais e pode ser aplicado na indústria de alimentos por aumentar a validade do produto além de agregar propriedades funcionais como ação prebiótica.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-MONTOYA, Ó. et al. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schtdl.) during three edible maturity stages. **Food Chemistry**, v.119, p.1497-1501, 2010.

AHMADI, S.; NAGPAL, R.; WANG, S.; GAGLIANO, J.; KITZMAN, D. W.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; READ, R.; YADAV, H. Prebiotics from a corn and sago prevent high-fat diet-induced insulin resistance via microbiome-gut-brain axis modulation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 67, p. 1-13, 2019.

ALCANTARA, M. De; FREITAS-SÁ, D. D. G. C. Metodologias sensoriais descritivas mais rápidas e versáteis, uma atualidade na ciência sensorial. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 21, p. 1-12, 2018.

ALVAREZ, M. V; PONCE, A. G; MOREIRA, M. R. Influence of polysaccharide-based edible coatings as carriers of prebiotic fibers on quality attributes of ready-to-eat fresh blueberries. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 98, p. 2587-2597, 2018.

ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 214–217, 1999.

ANDRADE, R. D.; SKURTYS, O.; OSORIO, F. A. Atomizing spray systems for application of edible coatings. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 3, p. 323-337, 2012.

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

ANTUNES. L. E. C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C. M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 413-419, 2003.

ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R. Alterações de compostos fenólicos e pectina em pós-colheita de frutos de amora-preta. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n.1, p. 57-61, 2006.

ANTUNES, L. E. C.; PEREIRA, I. S.; PICOLOTTO, L.; VIGNOLO, G. K.; GONÇALVES, M. A. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 100-111 2014.

AOAC. (1995). **Official methods of analysis of AOAC international**, (16th ed), Association of Official Analytical Chemistry: Arlington, TX, vol. 2.

ASHWINI, A.; RAMYA, H. N.; RAMKUMAR, C.; REDDY, K. R.; KULKARNI, R. V.; ABINAYA, V.; NEVEEN, S.; RAGHU, A. V. Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health: Review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 159, p. 128–137, 2019.

ASSIS, O. B. G., BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Thechnology**. v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. Análise sensorial de alimentos e bebidas – terminologia - NBR12806. São Paulo, 1993.

AYALA-ZAVALA, J.F.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; LEYVA, J. M.; ORTEGA-RA-MÍREZ, L. A.; CARRAZCO-LUGO, D. K.; PÉREZ-CARLÓN, J. J.; MELGAREJO-FLORES, B. G.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; MIRANDA, M. R. A. Pectin–cinnamon leaf oil coatings add antioxidant and antibacterial properties to fresh-cut peach. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 1, p. 39-45, 2013.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; VIEIRA, A. H.; NETO, R. P. C.; CAPPATO, L. P.; COIMBRA, P. T.; MORAES, J.; ANDRADE, M. M.; CALADO, V. M. A.; GRANATO, D.; FREITAS, M. Q.; TAVARES, M. I. B.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. **Food Research International**, v. 91, p. 38-46, 2017.

BAMBACE, M. F.; ALVAREZ, M. V.; MOREIRA, M. R. Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. **Food Research International**, v. 122, p. 653-660, 2019.

BAMBACE, M. S.; ALVAREZ, M. V.; MOREIRA, M. R. Prebiotic edible coatings with biopreservatives: Quality and safety of fresh apple cubes. **Journal of food process engineering**, v. 42, p. 12961-12971, 2018.

BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A.; RICO, D.; BARAT, J. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables—a review. **Trends Food Science and Technology**, v. 18, p. 373–386, 2007.

BASHOLLI-SALIHU, M.; KRYEZIU, T. L.; NEBIJA, D.; SALAR-BEHZADI, S.; VIERNSTEIN, H.; MUELLER, M. Prebióticos como excipientes para melhorar a estabilidade e a funcionalidade de *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* com potencial aplicação como simbióticos em alimentos e produtos farmacêuticos. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 326-333, 2019.

BELGHITH, K. S.; DAHECH, I.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 50, p. 451–458, 2012.

BERNARDES, N. R.; PESSANHA, F. F.; OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. **Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**. Barretos, v.6, n.2, p. 11-19, 2010.

BERSANETI, G. T., MANTOVAN, J., MAGRI, A., MALI, S., CELLIGOI, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, 151, 1132–1138, 2016.

BERSANETI, G. T.; PAN, N. C.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Co-production of fructooligosaccharides and levan by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with potential application in the food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 838-851, 2017.

BERSANETI, G. T.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Immobilization of levansucrase: strategies and biotechnological applications. **Journal of the Chilean Chemistry Society**, v. 64, n. 1, p. 4377-4381, 2019.

BERSANETI, G. T.; GARCIA, S.; MALI, M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose from *Bacillus subtilis* natto. **LWT - Food Science and Technology**, 116, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108502>

BIANCO, A. L. A. **Construção das Alegações de Saúde para Alimentos Funcionais**. Brasília: Embrapa, 113, 2008.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A.; JUSKIEWICZ, J.; WRÓBLEWSKA, M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosytem in rats. **Food Reserch International**, v. 35, p. 139-144, 2002.

BOURTOOM, T. Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties, **International Food Research Journal**, v.15, p.237–248, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 2, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Brasília, DF, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999**. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de Alimentos. Brasília, DF, 1999.

CALAZANS, G.; LIMA, C.; FRANC, F. P. De. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245–247, 2000.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849–875, 2011.

CARVALHO, A. J. F. Starch: major sources, properties and applications as thermoplastic materials. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.), *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. p. 321–342, 2008.

CASTRICINI, A.; CONEGLIAN, R. C. C.; DELIZA, R. Starch edible coating of papaya: effect on sensory characteristics. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 84-92, 2012.

CELLIGOI, M. A. P. C.; SANTOS, D. A.; SILVA, P. B.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H.; VIGNOLI, J. A. Obtenção Biotecnológica de Fruto-oligossacarídeos (FOS): Otimização de Processos e aplicação em alimentos.. 2014, Brasil. **Patente: Privilégio de Inovação**. Número do registro: BR1020140088270.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion Biotechnology**, v. 23, p. 187–191, 2012.

CHERMESH, I.; ELIAKIM, R. Probiotics and the gastrointestinal tract: where are we in 2005?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 6, p. 853-857, 2006.

CHLEBOWSKA-SMIGIEL, A.; GNIEWOSZ, M.; SWINCZAK, E. An attempt to apply a pullulan and pullulan-protein coatings to prolong apples shelf-life stability. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 6, n. 1, p. 49-56, 2007.

CHAUHAN, S.; GUPTA, K. C.; AGRAWAL, M. Efficacy of chitosan and calcium chloride on postharvest storage period of Mango with the application of Hurdle **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 731-740, 2014.

CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas. **Viçosa: UFV**, p. 81, 2001.

COLZATO, M.; SCRAMIN, J. A.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. H NMR Investigation of oil oxidation in macadamia nuts coated with zein-based films. **Journal of Food Processing and Preservation, Westport**, v. 35, n. 6, p. 790-796, 2011.

CORATO, U. De. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry : A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 7, 1–36, 2019.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.

COSTA, N. M. B.; BORÉM, A. **Biotecnologia e nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. São Paulo: Nobel, 2003.

COUDRAY, C.; TRESSOL, J. C.; GUEUX, E.; RAYSSIGUIER, Y. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. **European Journal Nutrition**, v. 42, p. 91–98, 2003.

COURI, S.; PARK, Y.; PASTORE, G.; DOMINGOS, A. Em ref. 5, cap. 7. 7.

CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; WALTER, E.H.M.; MORTAZAVIAN, A.M.; GRANATO, D.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory analysis: relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n.4, p. 358-373, 2010.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1369-1374, 1995.

DAMIÃO, A. O. in: NÓBREGA, F. J. **O que você quer saber sobre Nutrição: Perguntas e respostas comentadas**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2014. cap. 50, p. 827-843.

DÁVILA, I.; GULLON, B.; ALONSO, J. L.; LABIDI, J.; GULLON, P. Vine shoots as new source for the manufacture of prebiotic oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 34–43, 2019.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmico**, v. 5, p. 33 – 40, 2004.

DELGADO-FERNANDEZ, P.; CORZO, N.; OLANO, A.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; MORENO, F. J. Effect of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 89, p. 77–85, 2019.

DELZENNE, N.M.; KOK, N.N. Biochemical basis of oligofructose induced hypolipidaemia in animal models. **Journal Nutrition**, v. 129, p.1467–1470, 1999.

DIAZ-MULA, H. M.; SERRANO, M.; VALERO, D. Alginate Coatings Preserve Fruit Quality and Bioactive Compounds during Storage of Sweet Cherry Fruit. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 8, p. 2990-2997, 2012.

DHANAPAL, A.; SASIKALA, P.; RAJAMANI, L.; KAVITHA, V.; YAZHINI, G.; BANU, M. S. Edible films from polysaccharides. **Food Science and Quality Management**, v. 3, p. 9–18, 2012.

DHALL, R., K. Advance in edible coating for fresh fruits and vegetables: A review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 53, pp. 435-450, 2013.

DRAKE, M. A. Invited review: Sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**. v.90, n.11, p.4925–4937, 2007.

DURRANI, C. M.; DONALD, A. M. Physical characterization of amylopectin gels. **Polymer Gels and Networks**, v. 3, p. 1–27, 1995.

ENDERS, G. **O discreto charme do intestino**: Tudo sobre um órgão maravilhoso. São Paulo: Le Livros, 2015. 228 p.

FARIAS, D. P.; ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. P. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 23-35, 2019.

FERREIRA, D. S. et al. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 664-674, 2010.

FIGUEROA ARRIAGA, I. C. **Obtención de un producto de panificación enriquecido con fructanos de *Agave angustifolia* Haw y su evaluación en ratones en crecimiento**. 2017. 96 f. Tesis (Maestría em Ciências em Desenvolvimento de Produtos Bióticos) – Centro de Desenvolvimento de Produtos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Morelos, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FAD. **Generally recognized as safe (GRAS)**. Silver Spring. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>.

FLORES-LÓPEZ, M. L.; CERQUEIRA, M. A.; RODRÍGUEZ, D. J.; VICENTE, A. A. Perspectives on Utilization of Edible Coatings and Nano-laminate Coatings for Extension of Postharvest Storage of Fruits and Vegetables, **Food Engineering Reviews**, v. 8, p. 292–305, 2016.

FLOROWSKA, A.; KRYGIER, K.; FLOROWSKI, T.; DŁUŻEWSKA, E. Prebiotics as functional food ingredients preventing diet-related diseases. **Food & Function**, v. 7, p. 2147–55, 2016.

- FULEKI, T.; FRANCIS, J. F. Quantitative methods for anthocyanins 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 78-83, 1978.
- GIBSON, G.; ROBERFROID, M. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401–1412, 1995.
- GIBSON, G. R.; WILLIS, C. L.; VAN LOO, J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria – implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 381- 387, 1994.
- GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K.S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 491, 2017.
- GONÇALVES, B. C. M.; MANTOVAN, J.; RIBEIRO, M. L. L.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 1, 1–8, 2013.
- GONÇALVES, E.D. et al. **Implantação, manejo e póscolheita da amoreira-preta**. EPAMIG, 5p. (Circular Técnica, 140), 2011.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim SBCTA**, v. 30, n. 1, p. 3-15, 1996.
- GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M. L.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. C.; ANTUNES, M. D. C. The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 51–60, 2015.
- GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In MATHLOUTHI, M. (Ed.), **Food packaging and preservation**, p. 371–394, 1986.
- GUIO, F.; RUGELES, L. D.; ROJAS, S. E.; PALOMINO, M. P.; CAMARGO, M. C.; SÁNCHEZ, O. F. Kinetic modeling of fructooligosaccharides production using *Aspergillus oryzae* N74. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 142–163, 2012.
- HARRIS, L., J. FARBER, J., N. BEUCHAT, L., R. PARIS, M., E. SUSLOW, T., V. GARRETT, E., H. BUSTER, F., F. Outbreak association with fresh produce.

Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety (Supplement), 2, pp. 78-141, 2003.

HENRIQUE, V. A.; NUNES, C. R.; AZEVEDO, F. T.; PEREIRA, S. M. F.; BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V. Alimentos funcionais: aspectos nutricionais na qualidade de vida. **Aracaju, 1° Ed, IFS**, 57p., 2018.

HILL, A.; CHEN, L.; MARIAGE, A.; PETIT, J. L.; DE BERARDINIS, V. E.; KARBOUNE, S. Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic activity to produce levan and fructooligosaccharides. **Catalysis Science & Technology** , v. 9, p. 2931-2944, 2019.

HUEBNER, J.; WEHLING, R. L.; PARKHURST, A.; HUTKINS, R. W. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 287–293, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1976). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, (2th ed), São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, vol. 1.

INTHANAVONG, L.; TIAN, F.; KHODADADI, M.; KARBOUNE, S. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 1405–15, 2013.

JAVANMARD, M. Shelf-life of apples coated with whey protein concentrate-gellan gum edible coatings. **Journal of Food Biosciences and Technology**, v. 1, n. 1, p. 55-62, 2011.

JIMENÉZ, A. FABRA, M., J. TALENS, P. CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food and Bioprocess Technology**, 5, 2058–2076, 2012.

JONHED, A. **Properties of modified starches and their use in the surface treatment of paper**. 2006. 89p. Dissertação apresentada a Faculty of Technology and Science Chemical Engineering, Karlstad University Studies, Sweden, 2006.

KADER, A. A. Future of modified atmosphere research. **Acta Horticulturae, Wageningen**, v. 857, n. 1, p. 213-218, 2010.

KORCZ, E.; KERÉNYI, Z.; VARGA, L.; Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & Function**, p. 1-10, 2018.

KUMAR, G. C.; SRIPADA, S.; POORNACHANDRA, Y. Status e perspectivas futuras de fruto-oligossacarídeos como nutracêuticos. In: **Papel da Ciência dos Materiais na Bioengenharia de Alimentos** . Academic Press, p. 451-503, 2018.

LI, W.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Recent novel applications of levansucrases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 6959-6969, 2015.

LIN, D.; ZHAO, Y. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, p. 60–75, 2007.

LIM, J. Hedonic scaling: A review of methods and theory. **Food Quality and Preference**, v.22, n.8, p.733-747, 2011.

LINDE, D.; RODRÍGUEZ-COLINAS, B.; ESTÉVEZ, M.; POVEDA, A.; PLOU, F. J.; FERNÁNDEZ LOBATO, M. Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, 109, 123–130, 2012.

LIU, Z. Edible films and coatings from starch. In: HAN, J. H. (Ed.), **Innovations in food packaging**, p. 318–332, 2005.

MAIORANO, A. E.; PICCOLI, R. M.; DA SILVA, E. S.; DE ANDRADE RODRIGUES, M. F. Microbial Production of Fructosyltransferases for Synthesis of Pre-Biotics. **Biotechnology Letters**. V. 30, p. 1867-77, 2008.

MAN, J.C.; ROGOSA, A. M.; SHARPE, M., E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130–135, 1960.

MANO, M. C. R.; NERI-NUMA, I. A.; SILVA, J. B. DA.; PAULINO, B. N.; PESSOA, M. G.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide biotechnology: An approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 17–37, 2017.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. M. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido : produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, V. 31, n. 1, 137–156, 2010.

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., GARCÍA, M. A., MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 157-164, 2005.

MARTINEZ-FLEITES, CARLOS; ORTIZ-LOMBARDÍA, MIGUEL; PONS, TIRSO; TARBOURIECH, NICOLAS; TAYLOR, EDWARD J., G. ARRIETA;

HERNÁNDES, LÁZARO; DAVIES, GIDEON J. Cristal structure of levansucrase from the Gram- negative bacterium *Gluconocetobacter diazotrophicus*. **Biochemistry Journal**, p. 19- 27, 2005.

MATSUMOTO, H. et al. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3560–3563, 2003.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3 rd ed. **Boca Raton: CRC Press**, 1999. 281p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. (2007) **Sensory Evaluation Techniques**, (4 th ed) London: CCR Press, 488p.

MELLINAS, C.; VALDÉS, A.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; GARRIGOS, M. D. C.; JIMÉNEZ, A. Active edible films: Current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133, 2016.

MENEGHEL, R. F. A; BENASSI, M; YAMASHITA, F. Revestimento comestível de alginato de sódio para frutos de amora-preta (*Rubus ulmifolius*). **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.3, p.609-618, 2008.

MIRA, I.; FILHO, C. D. C.; VIOLA, D. N. Composição ideal da solução filmogênica adicionada de prebiótico, aplicada em uvas ‘Thompson’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 308-317, 2015.

MOHANTY, D.; MISRA, S.; MOHAPATRA, S.; SAHU, P. S. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, 26, 152–160, 2018.

MULLEN, W.; MCGINN, J.; LEAN, M. E. J.; MACLEAN, M. R.; GARDNER, P.; DUTHIE, G. G. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5191–5196, 2002.

MUÑOZ, A.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation in quality control. **New York: Van Nostrand Reinhold**, 1992. 240p.

MURPHY, O. Non-polyol low digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 47–53, 2001.

MUSSATTO, S., I. MANCILHA, I., M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, 68, 587–597, 2007.

NOBRE, C.; CERQUEIRA, M. Â.; RODRIGUES, L. R.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Production and extraction of polysaccharides and oligosaccharides and their use as new food additives. In: **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**, p. 653–679, 2015

NUNES, M. L.; GARRIDO, M. P. The obesity and the action of prebiotics, probiotics and symbiotics in intestinal microbiota. **Nutrição Brasil**, v. 17, p. 189-196, 2018.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira-preta. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.585-589, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; KWIATKOWSKI, A.; ROSA, C. I. L. F.; CLEMENTE, E. Refrigeration and edible coatings in blackberry (*Rubus* spp.) conservation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 2120-2126, 2014.

OSEGUERA, M. A. P.; GUERECA, L.; LOPEZ MUNGUÍA, A. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 465–471, 1996.

PAES, S. S.; YAKIMETS, I.; MITCHELL, J. R. Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 788–797, 2008.

PANAHIRAD, S.; NASSER, M.; HASSANI, R. N.; GHANBARZADEH, B.; NAHANDI, F. Z. Plum shelf life enhancement by edible coating based on pectin and Carboxymethyl cellulose. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, p. 423-430, 2015.

PALHARINI, D. A.; CECÍLIA, M.; FISCHER, H.; VEGIAN, C.; FILETI, D. S.; MONTES, N. M.; MARIA, S. Efeito da temperatura de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45, p.413-419, 2015.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PEREZ, M.; HERNANDEZ-PEREZ, T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life – A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 299–308, 2010.

PARRACHO, H.; McCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 66, p. 405-411, 2007.

PEREIRA, I. S. **Adubação de pré-plantio no crescimento, produção e qualidade da amoreira-preta (*Rubus* sp.).** Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação, Universidade Federal de Pelotas, 148p, 2008.

PRANOTO, Y.; SALOKHE, V.; RAKSHIT, K. S. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, v. 38, p. 267-272, 2005.

PRAPULLA, S. G.; SUBHAPRADA, V.; KARANTH, N. G. Microbial production of oligosaccharides: A Review. In A. L. LASKIN, J. W.; BENNET, G. GADD,

Advances in Applied Microbiology, v. 47, p. 299–337, 2000.

PÉREZ-GALLARDO, A.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.; REYES-GONZÁLEZ, L. R.; REGALADO, C. Effect of starch-beeswax coatings on quality parameters of blackberries (*Rubus* spp.). **Journal of Food Science and Technology**, V. 52, n. 9, p. 5601-5610, 2014.

PEREZ-GALLARDO, A.; MATTINSON, S. D.; LAZCANO-PERALTA, A.; FELLMAN, J. K.; BARBOSA-CANOVAS, G.; GARCIA-ALMENDAREZ., B.; REGALADO, C. Effect of native and acetylated-cross-linked waxy corn starch-beeswax coatings on quality attributes of raspberries during storage. **Starke**, v. 64, n. 8, p. 665-673, 2012.

RAGHV, P., K. ARGARWAL, N. SAINI, M. Edible coating of fruits and vegetables: a review. **International Journal of Scientific Research and Modern Education**, v. 1, p. 188-204, 2016.

RASTALL, R. A. Functional oligosaccharides: Application and manufacture, **Annual Review of Food Science and Technology**, v.1, p. 305–339, 2010.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M., FILHO, A. D. R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**. Porto Alegre, v.4, p.66-74, 2011.

RANGANNA, K.; MATHEW, O. P.; YATSU, F. M.; YOUSEFIPOUR, Z.; HAYES, B. E.; MILTON, S. G. Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 5962–5978, 2007

RENAUD, S.; LORGERIL, M. D. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523–1526, 1992.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-148, 1993.

RÖBLE, C.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R. T.; WOUTERS, R.; BUTLER, F. Alginate coating as carrier of oligofructose and inulin and to maintain the quality of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, v. 76, p.19–29, 2011.

ROMANO, N.; TAVERA-QUIROZ, M. J.; BERTOLA, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 560–566, 2014.

- SANTOS, F. L. Os alimentos funcionais na mídia: quem paga a conta. In: PORTO, C. M.; BROTAS, A. M. P.; BORTOLIERO, S. T. **Diálogos entre ciência e divulgação científica: leituras contemporâneas**. Salvador: EDUFBA, p. 199-210, 2011.
- SANTOS-MORIANO, P.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 119, 18–25, 2015.
- SCHAKER, P. D. C.; ANTONIOLLI, L. R. Aspectos econômicos e tecnológicos em pós-colheita de amoras-pretas (*Rubus* spp). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.15, n.1-4, p.11-15, 2009.
- SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D., Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9329-9339, 2006.
- SILVA, R. T. **APLICAÇÃO DE LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto EM FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS**. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina, 2020.
- SILVA, O. A.; PELLÁ, M. G.; PELLÁ, M. G.; CAETANO, J.; SIMÕES, M. R.; BITTENCOURT, P. R. S.; DRAGUNSKI, D. C. Synthesis and characterization of a low solubility edible film based on native cassava starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 290-296, 2019.
- SILVA, V. S.; ORLANDELLI, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 182-194, 2019.
- SILVA, T. F. DA.; CONTI-SILVA, A. C. Potentiality of gluten-free chocolate cookies with added inulin/oligofructose: Chemical, physical and sensory characterization. **LWT- Food Science and Technology**, v. 90, p.172–179, 2018.
- SILVA, G. M. C.; SILVA, W. B.; MEDEIROS, D. B.; SALVADOR, A. R.; CORDEIRO, M. H. M.; DA SILVA, N. M.; MIZOBUTSI, G. P. The chitosan affects severely the carbon metabolism in mango (*Mangifera indica* L. cv. Palmer) fruit during storage. **Food chemistry**, v. 237, p. 372-378, 2017.
- SILVA, P. B.; GARCIA, S.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Acta**

Alimentaria, An International Journal of Food Science,
<http://doi.org/10.1556/066.2016.0004>, 2016.

SILVA, P. B.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization of High Production of fructooligosaccharides by sucrose fermentation of *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **American Journal of Food Technology**, v. 9, p. 144-150, 2014a.

SILVA, P. B.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. High production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 2734–2740, 2014b.

SILVA, A. S. S.; HAAS, P.; SARTORI, N. T.; ANTON, A. A.; FRANCISCO, A. Frutoligosacarídeos: fibras alimentares ativas. **Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n 2, p. 295–304, 2007.

SILVA-MATOS, R., R., S da.; FURTADO, M. B.; FARIAS, M. F de. Tecnologia de Produção em Fruticultura. Ed Atena, 2019.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 565–572, 2016.

SOARES, N. F. F.; SILVA, D. F. P.; CAMILLOTO, G. P.; OLIVEIRA, C. P.; PINHEIRO, N. M.; MEDEIROS, E. A. A. Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 281-289, 2011.

SOGVAR, O. B.; SABA, M. K.; EMAMIFAR, A. Os revestimentos de aloe vera e ácido ascórbico mantêm a qualidade pós-colheita e reduzem a carga microbiana dos frutos de morango. **Biologia e Tecnologia Pós-colheita**, v. 114, p. 29-35, 2016.

SRIKANTH, R.; REDDY, C. H. S.; SIDDARTHA, G.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, p. 102–114, 2015.

SOUZA, A. V. D. E. **Pós-colheita e processamento de amora-preta ‘Tupy’**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, 98p, 2013.

SOUSA, R. C. P. et al. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. **Revista Agroambiente On-line**, v. 7, n. 3, p. 366-372, 2013.

SPERANZA, B.; CAMPANIELLO, D.; MONACIS, N.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Functional cream cheese supplemented with *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* DSM 10140 and *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 and prebiotics. **Food Microbiology**, v. 72, p. 16–22, 2018.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory evaluation practices. 2 ed th. **Florida: Academic Press**, Inc. 1993. 338 p.

STRICKLING, J.A. Evaluation of oligosaccharides addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.205-219, 2000.

TANG, Y.; XIE, F.; ZHANG, D.; ZHU, M.; LIU, L.; LIU, P.; GU, C. Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. **Starch - Stärke**, v. 67, p.124–131, 2015.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 12-21, 2009.

TIAN, F.; INTHANAVONG, L.; KARBOUNE, S. Purification and characterization of levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in intra- and extracellular forms useful for the synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, p. 1929–1938, 2011.

TIWARI, R. **Post-harvest diseases of fruits and vegetables and their management by biocontrol agents**, Department of Botany, University of Lucknow, Lucknow-226007, 2014.

TORRES, P.; BASTISTA-VIEIRA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n.3-4, p. 230-235, 2012.

TURMANIDZEA, T.; GULUAA, L.; JGENTIA, M.; WICKER, L. Effect of Calcium Chloride Treatments on Quality Characteristics of Blackberry Fruit During Storage. **International Journal of Food and Allied Sciences**, v. 2, p. 36-41, 2016.

VALENCIA, M. S.; SALGADO, S. M.; ANDRADE, S. A. C.; PADILHA, V. M.; LIVERA, A. V. S.; STAMFORD, T. L. M. Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* LBC 81. **LWT- Food Science and Technology**, v. 69, p. 104–109, 2016.

VERSINO, F.; LOPEZ, O. V, GARCIA, GARCIA, M. A.; ZARITZKY, N. E. Starch-based films and food coatings : An overview. **Starch/Stärke**, v. 68, p. 1–12, 2016.

VIALTA, A. M.; MADI, L. F. C. O workshop ingredientes, alimentos processados funcionais e saúde no âmbito das atividades do Agropolo Campinas-Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 21, 2018.

VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S. M.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M. S.; CORREIA, M. G. S. Ingestão de alimentos funcionais

e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Ciências Biológicas e da saúde**. Aracaju, v.1, n. 15, p.43-52, 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; TEIXEIRA, F. C. Alimentos funcionais: conceitos básicos. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, 1Ed, 20p., 2010.

XAVIER-SANTOS, D.; BEDANI, R.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; SAAD, S. M. *L. acidophilus* La-5, fructo-oligosaccharides and inulin may improve sensory acceptance and texture profile of a synbiotic diet mousse. **LWT- Food Science & Technology**, v. 105, p. 329–335, 2019.

YAMASHITA, F.; NAKAGAWA, A.; VEIGA, G. F.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Filmes biodegradáveis para aplicação em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food Technology (ITAL)**, v. 8, n. 3, p. 335-343, 2005.

YAMASHITA, F.; NAKAGAWA, A.; VEIGA, G. F.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Embalagem ativa para frutos de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology (ITAL)**, v. 9, n. 4, p. 95-100, 2006.

YOUSSEF, A., R., M. ALI, E., A., A. EMAM, H., E. Influence of postharvest application of some edible coating on storage life and quality attributes of novel Orange fruits during cold storage, **Int. Journal of Chemistry Tech. Research**, pp. 2189-2200, 2015.

YOSSEF, M. A. Composition of different edible coating material for improvement of quality and shelf life of perishable fruits. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v.4, n. 2, p. 416-424, 2014.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.

XIE, P.; ZHANG, Y.; WANG, X.; WEI, J.; KANG, W. Antithrombotic effect and mechanism of *Rubus* spp. Blackberry. **Food & Function**, v. 8, p. 2000-2012, 2017.

ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 462–467, 2006.

ZHONG, F.; LI, Y.; IBANZ, A. M.; OH, M. H.; MCKENZIE, K. S.; SHOEMAKER, C. The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological properties of rice starch pastes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 406–414, 2009.