



**ANA CATARINA
SOUSA RIBEIRO**

**EFEITO COMBINADO DA PRESSÃO E DA
TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE KEFIR**



**ANA CATARINA
SOUSA RIBEIRO**

**EFEITO COMBINADO DA PRESSÃO E DA
TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE KEFIR**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Ramo de Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar e da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, madrinhas e tio Fernando por tudo o apoio e ajuda ao longo destes anos

o júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar c/ Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (Orientador)
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Pereira Gomes (Arguente)
Professora Auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Agradecimentos

Agradeço a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Ao Doutor Jorge Saraiva pela disponibilidade, colaboração, conhecimentos transmitidos e capacidade de estímulo ao longo deste trabalho.

À Rita Lopes, à Maria João e à Rita Inácio por toda a disponibilidade, ajuda e todo o ensinamento.

Aos meus colegas de Mestrado, Álvaro e Patrícia pela disponibilidade em ajudar, apoio e partilha de conhecimentos.

Aos restantes colegas de laboratório, pela disponibilidade de ajudar, ensinar e conversar.

À minha família, por todo o apoio ao longo da minha vida, e sem o qual não seria possível realizar este trabalho.

Aos meus amigos, que me acompanharam nesta fase.

E finalmente, ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

Palavras-chave

Kefir, fermentação, alta pressão, temperatura, velocidade de fermentação, volume de ativação, energia de ativação, bactérias ácido-lácticas, leveduras.

Resumo

O kefir é uma bebida láctea levemente gaseificada, com baixo teor alcoólico e de consistência cremosa. Esta bebida é produzida a partir de grãos de kefir ou culturas starter que podem consistir numa mistura de bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras, caracterizando-se por apresentar um pH entre 4,2 - 4,6.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito combinado da pressão e da temperatura no processo de fermentação de kefir. Para isso, a fermentação foi realizada sob diferentes combinações de pressão e temperatura (7, 15, 30 e 50 MPa a ≈ 17 °C e a 15 e 50 MPa a 25 e 32 °C), sendo monitorizada a variação de pH, a acidez titulável, a concentração de açúcares redutores e a concentração de ácido láctico.

À temperatura ambiente (≈ 17 °C) os resultados revelaram que o aumento da pressão reduziu a velocidade fermentativa, uma vez que se verificou uma variação mais lenta do pH, da acidez titulável e da concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação, sendo que a 50 MPa quase não ocorreu fermentação. No entanto, quando a fermentação foi realizada a 7 e a 15 MPa foi possível atingir o pH característico de kefir. Observou-se ainda que a concentração de L-ácido láctico aumentou ao longo do tempo de fermentação, sendo que na fermentação a 7 MPa atingiram-se valores semelhantes aos obtidos na fermentação à pressão atmosférica.

Adicionalmente, quando se aumentou a temperatura de fermentação (25 e 32 °C), os resultados revelaram um aumento da velocidade fermentativa comparativamente com a fermentação realizada à temperatura ambiente. No que diz respeito à acidez titulável, concluiu-se que o aumento da temperatura provocou um aumento da velocidade de formação de produto (quantificada como acidez titulável, expressa em ácido láctico).

Pela análise cinética, concluiu-se que a pressão diminuiu a velocidade das reações envolvidas na fermentação de kefir. O aumento da temperatura de fermentação conduziu a uma diminuição do volume de ativação (V_a), indicando assim que o processo fermentativo ficou menos sensível à pressão. Por outro lado, o cálculo da energia de ativação (E_a) mostrou que, em geral, o aumento da pressão levou a que as reações de fermentação do kefir se tornassem mais sensíveis à temperatura (E_a maior).

Em conclusão, este estudo mostrou que o efeito combinado da pressão e da temperatura conduziu a alterações nos parâmetros cinéticos do processo fermentativo. Sob pressão a combinação de pressão/temperatura que resultou numa fermentação mais rápida e numa maior produção de ácido foi a 15 MPa/32 °C. Tanto quanto foi possível encontrar na literatura, este é o primeiro trabalho que estuda o efeito combinado da pressão e da temperatura no processo fermentativo.

Keywords

Kefir, fermentation, high pressure, temperature, fermentation rate, activation volume, activation energy, lactic acid bacteria, yeasts.

Abstract

Kefir is a lightly carbonated, low-alcohol and creamy consistency dairy beverage. It is produced from kefir grains or starter cultures that consist in a mixture of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts, characterized by having a pH between 4.2 - 4.6.

The main purpose of present study was to evaluate the combined effect of pressure and temperature on the fermentation process of kefir production. Thus, fermentation was performed under different pressure and temperature combinations (7, 15, 30 and 50 MPa at ≈ 17 °C, 15 and 50 MPa at 25 and 32 °C) and was monitored through variation of pH, titratable acidity, reducing sugars concentration and lactic acid concentration.

At room temperature (≈ 17 °C) the results revealed that the increase of pressure reduce the fermentative rate, since there was a slower variation of pH, titratable acidity and reducing sugars concentration during fermentation time and at 50 MPa there was almost no fermentation. However, when fermentation was carried out at 7 and 15 MPa it was possible to reach the kefir characteristic pH. Besides, it was observed that L-lactic acid concentration increased over fermentation time, and fermentation at 7 MPa reached similar values to those obtained in fermentation at atmospheric pressure.

Additionally, when fermentation temperature was increased (25 and 32 °C), occurred an increase in fermentative rate when compared to fermentation at room temperature. Concerning to titratable acidity, it was concluded that the temperature increase caused an raise in product production rate (quantified as titratable acidity, expressed as lactic acid).

Though kinetic analyses, it was concluded that pressure slowed down the reactions involved in kefir fermentation. The increase of fermentation temperature led a decreased in the activation volume (V_a), indicating that fermentative process was less sensitive to pressure. On the other hand, the determination of activation energy (E_a) showed that, in general, increase of pressure became the reactions more sensitive to temperature (higher E_a).

In conclusion, this study indicated that the combined effect of pressure and temperature led to changes in kinetics parameters of kefir fermentation. Under pressure the pressure/temperature combination that resulted in a faster fermentation and a higher acid production was 15 MPa/32 °C. As much as possible, in the literature, this is the first work to study the combined effect of pressure and temperature on the fermentation process.

Índice

Lista de Abreviaturas	V
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Tabelas	IX
I. Introdução.....	1
1. Produtos lácteos fermentados e kefir.....	1
1.1. Composição química e nutricional do kefir.....	2
1.2. Grão de kefir	4
1.3. Microrganismos do kefir: Caracterização e metabolismo	5
1.3.1. Composição microbiológica do kefir	5
1.3.2. Interação entre os microrganismos.....	6
1.3.3. Metabolismo dos hidratos de carbono	7
1.3.3.1. Bactérias ácido-láticas	7
1.3.3.2. Bactérias ácido-acéticas.....	8
1.3.3.3. Leveduras	9
1.3.4. Produção de exopolissacarídeos	10
1.4. Produção de kefir.....	11
1.4.1. Efeito da temperatura na produção de kefir	14
1.5. Propriedades terapêuticas.....	15
2. Alta pressão.....	16
2.1. Tecnologia.....	16
2.2. Aplicações	17
2.3. Efeito da alta pressão nos microrganismos	18
2.4. Efeito da alta pressão no processo fermentativo	20
3. Tecnologia de alta pressão aplicada ao kefir.....	24
II. Objetivo do Trabalho	27
III. Materiais e Métodos.....	29
1. Produção de kefir.....	29

1.1. Preparação da amostra	29
1.2. Fermentação sob pressão	29
2. Caracterização do kefir	30
2.1. pH e acidez titulável	30
2.2. Clarificação da amostra	31
2.3. Concentração de açúcares redutores	31
2.4. Concentração de ácido láctico	32
2.5. Concentração de etanol	33
2.6. Concentração de acetaldeído	33
2.7. Parâmetros cinéticos da fermentação	34
2.8. Cálculo do volume de ativação	34
2.9. Cálculo da energia de ativação	34
3. Análise estatística	35
IV. Resultados e Discussão	37
1. Efeito da alta pressão na produção de kefir	37
1.1. Produção de kefir à temperatura ambiente	37
1.1.1. Cálculo de parâmetros cinéticos da fermentação	43
1.1.2. Monitorização de outros parâmetros físico-químicos importantes na produção de kefir	45
1.1.2.1. Concentração de ácido láctico	45
1.1.2.2. Concentração de etanol	47
1.1.2.3. Concentração de acetaldeído	47
1.2. Produção de kefir a 25 e a 32 °C	48
1.2.1. Fermentação a 25 °C	48
1.2.2. Fermentação a 32 °C	50
1.3. Cálculo do volume de ativação	52
2. Efeito da temperatura na produção de kefir	57
2.1. Cálculo da energia de ativação	60
3. Efeito combinado da pressão e temperatura na produção de kefir	63
V. Conclusões	65
VI. Perspetivas Futuras	67

VII. Referências Bibliográficas	69
VIII. Anexos	79

Lista de Abreviaturas

ABB	Bactérias ácido-acéticas
ADH	Álcool desidrogenase
Al-DH	Aldeído desidrogenase
AP	Alta pressão
ATP	Trifosfato de adenosina
D-ALT	D-alanina aminotransferase
D-LDH	D-lactato desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
Ea	Energia de ativação (kJ/mol)
EPS	Exopolissacarídeos
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detetor por ionização de chama
KF	Fração <i>cell-free</i> de kefir
LAB	Bactérias ácido-lácticas
Lactose-PTS	Lactose-fosfotransferase
L-LDH	L-lactato desidrogenase
MPa	Megapascal
NADH/NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida/oxidada)
P/T	Pressão/temperatura
PA/PE	Poliamida/polietileno
UFC	Unidades formadoras de colónias
Va	Volume de ativação (cm ³ /mol)

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura macroscópica dos grãos kefir. Adaptado de Leite <i>et al.</i> (2013).	5
Figura 2. Vias metabólicas das bactérias ácido-lácticas. Adaptado de Anonymous (1994).8	
Figura 3. Oxidação do etanol na superfície exterior da membrana citoplasmática e no citoplasma. Adaptado de Mamlouk and Gullo (2013).	9
Figura 4. Vias metabólicas das leveduras para a produção de etanol. Adaptado de Wszolek <i>et al.</i> (2007).	10
Figura 5. Estrutura geral do kefirano. Retirado de Badel <i>et al.</i> (2011).	11
Figura 6. Diagrama de produção industrial de kefir. Adaptado de Wszolek <i>et al.</i> (2007). 13	
Figura 7. Evolução do número de máquinas industriais de alta pressão, produzidas entre 1990 e 2015. Cortesia de Hiperbaric.	17
Figura 8. Exemplos de efeitos da alta pressão nas células e componentes celulares dos microrganismos. A: lípidos das membranas; B: agrupamento de proteínas multiméricas; C: estrutura da proteína; D: motilidade celular; E: tradução de proteínas nos ribossomas. Adaptado de Oger and Jebbar (2010).	19
Figura 9. <i>Stress</i> microbiano, lesão, adaptação e resistência ao processamento. Adaptado de Lado and Yousef (2002).	21
Figura 10. Embalagem das culturas de kefir.	29
Figura 11. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).	38
Figura 12. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).	41
Figura 13. Variação da concentração de açúcares redutores (mg de açúcares redutores/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).	42

Figura 14. Variação da concentração de L-ácido láctico (mg de L-ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).	46
Figura 15. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 25°C	49
Figura 16. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 25°C	50
Figura 17. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 32°C	51
Figura 18. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 32°C	51
Figura 19. Constante de velocidade, (h^{-1}), para a concentração de H^+ , para a acidez titulável, para a concentração de açúcares redutores e para a concentração de L-ácido láctico, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), para cada uma das temperaturas testadas: a) 17°C , b) 25°C e c) 32°C	53
Figura 20. Volume de ativação, (cm^3/mol), para a concentração de H^+ e para a acidez titulável em função das temperaturas estudadas ($17, 25$ e 32°C).	56
Figura 21. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura ($17, 25$ e 32°C), para cada uma das pressões testadas: a) 0,1 MPa, b) 15 MPa e c) 50 MPa.	58
Figura 22. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura ($17, 25$ e 32°C), para cada uma das pressões testadas: a) 0,1 MPa, b) 15 MPa e c) 50 MPa.	59
Figura 23. Constante de velocidade (h^{-1}) para a concentração de H^+ e para a acidez titulável, sob diferentes condições de temperatura ($17, 25$ e 32°C), para cada uma das pressões testadas: a) 0,1 MPa, b) 15 MPa e c) 50 MPa.	61
Figura 24. Energia de ativação (kJ/mol), para a concentração de H^+ e para a acidez titulável em função das pressões estudadas (0,1, 15 e 50 MPa).	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição geral do kefir, segundo o <i>Codex Alimentarius</i> (2001). Adaptado de FAO/WHO (2011).	2
Tabela 2. Composição química e valores nutricionais do kefir. Adaptado de Liut Kevicius (2004), Sarkar (2007).	4
Tabela 3. Estudos do efeito da tecnologia de alta pressão (AP) na microflora do kefir, antes e após o processo de fermentação.	26
Tabela 4. Taxas de consumo de substrato, r_s (mg/g.h), para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) e os respetivos R^2	43
Tabela 5. Taxas de formação de produto, r_p (mg/g.h), para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) e os respetivos R^2	44
Tabela 6. Rendimento, $Y_{P/S}$ (mg de produto formado/mg de substrato consumido) da fermentação para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) e os respetivos R^2	44
Tabela 7. Volumes de ativação, (cm^3/mol), obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados nas fermentações realizadas à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^\circ\text{C}$), a 25 e a 32 $^\circ\text{C}$ e os respetivos R^2	54
Tabela 8. Taxa de formação de produto, r_p (mg/g.h), para cada uma das combinações de pressão (0,1 – 50 MPa) e temperatura (17, 25 e 32 $^\circ\text{C}$) e os respetivos R^2	60
Tabela 9. Energia de ativação, (kJ/mol), obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados nas fermentações realizadas a 0,1, 15 e 50 MPa e os respetivos R^2	62

I. Introdução

1. Produtos lácteos fermentados e kefir

Os produtos alimentares fermentados desempenham um papel importante na dieta humana, devido aos seus benefícios para a saúde (**Altay et al., 2013**). O processo de fermentação foi descoberto acidentalmente há milhares de anos, tendo-se tornado evidente que os alimentos fermentados apresentavam tempos de armazenamento mais longos, assim como valores nutricionais melhorados, quando comparados com os seus equivalentes não fermentados. Consequentemente, a fermentação tornou-se numa técnica popular de conservação de alimentos (**Farnworth, 2005**), que utiliza o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos para preservar e transformar as matrizes alimentares. Durante o processo fermentativo, o crescimento de microrganismos deteorativos e patogénicos é inibido pelos metabolitos produzidos pelos microrganismos fermentativos, aumentando assim o tempo de prateleira dos alimentos. Para além disso, a fermentação modifica o aroma, o sabor e a textura dos alimentos, e melhora o perfil nutricional dos alimentos (removendo fatores antinutricionais e toxinas) (**Terefe, 2016**).

As bebidas de leites fermentados são amplamente produzidas em todo o mundo, sendo muito populares devido às suas características organolépticas, aos benefícios para a saúde e ao prazo de validade prolongado (**Korbekandi, 2011**). Existem diversos tipos de leites fermentados, tais como: queijos fermentados, koumiss, gelado fermentado, leite de manteiga (**Mohammadi et al., 2012**) sendo o iogurte e o kefir alguns dos mais apreciados em todo o mundo (**Korbekandi, 2011**). O kefir é uma bebida láctea refrescante e levemente gaseificada, com um sabor ligeiramente ácido (pH entre 4,2 e 4,6), apresentando uma consistência cremosa e baixo teor alcoólico (**Kök-Taş et al., 2013, Marshall and Cole, 1985**). Esta bebida é originária das montanhas do Cáucaso (**Assadi et al., 2000**) e é consumida principalmente na Europa Ocidental, na Rússia e no Sudoeste da Ásia (**Wszolek et al., 2007**). Atualmente tem-se verificado um aumento do seu consumo em diferentes regiões, que se atribui principalmente às suas propriedades sensoriais únicas e aos seus efeitos benéficos para a saúde (**Farnworth, 2005, Otlés and Cagindi, 2003**). Estas propriedades sensoriais devem-se à produção de ácido láctico, acetaldeído, acetoína, etanol e outros sub-produtos durante a fermentação realizada pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir (**Guzel-Seydim et al., 2000**).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2011), o kefir é definido como uma “cultura-mãe preparada a partir de grãos de kefir, *Lactobacillus kefiri* e espécies dos géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* que crescem num forte relacionamento específico. Os grãos de kefir são, também, constituídos por leveduras que fermentam a lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e por leveduras que não fermentam a lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*)”. O kefir deve ainda apresentar uma quantidade mínima de 10^7 unidades formadoras de colónias (UFC) por grama de microorganismos totais e uma quantidade mínima de 10^4 UFC/g de leveduras.

1.1. Composição química e nutricional do kefir

A composição química do kefir não é uniforme (Zubillaga *et al.*, 2001), variando com diversos fatores, que podem afetar as propriedades sensoriais e químicas do produto final. Estes factores incluem o tipo e volume de leite, a composição dos grãos ou das culturas, a qualidade microbiana dos grãos, a proporção grão/leite, o tempo e temperatura de fermentação, bem como com as condições de saneamento e temperatura de armazenamento (Garrote, 1998, Guzel-Seydim, 2010, Wszolek *et al.*, 2001).

A composição geral do kefir de acordo com o *Codex Alimentarius* é apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Descrição geral do kefir, segundo o *Codex Alimentarius* (2001). Adaptado de FAO/WHO (2011).

Composição	Quantidade (% m/m)
Proteína do leite	min. 2,8
Gordura do leite	<10
Acidez titulável, expressa em % de ácido láctico	min. 0,6

Tipicamente, a composição do kefir inclui 89,0-90,0% de água, 6,0% de açúcar, 3,0% de proteína, 0,7% de cinzas, 0,2% de gordura, bem como 1,0% de ácido láctico (Sarkar, 2007), conforme apresentado na **Tabela 2**. Durante a fermentação, os produtos que maioritariamente se formam são o ácido láctico, o dióxido de carbono (1,98 g/L) e o etanol

(0,48%) (**Beshkova et al., 2002, Otles and Cagindi, 2003**). No caso do ácido láctico, a sua produção ocorre na forma de dois isómeros D(-) e L(+) e as suas quantidades relativas dependem da microflora fermentativa inicial (**Sarkar, 2007**). O isómero L(+) é o ácido orgânico mais abundante e deriva de, aproximadamente, 25% da lactose inicial do leite (**Alm, 1982**). Para além destes produtos, durante a fermentação também se forma ácido acético, ácido pirúvico, ácido hipúrico, ácido propiónico, ácido butírico, diacetilo e acetaldeído, todos eles com implicações no sabor e no aroma do kefir (**Beshkova et al., 2002, Guzel-Seydim et al., 2000**). Assim, este é o kefir que se encontra comercialmente, no qual ocorre apenas a primeira fermentação alcoólica, apresentando por isso pequenas quantidades de etanol e de dióxido de carbono.

No entanto, uma segunda fermentação alcoólica pode ocorrer, quando são utilizados grãos de kefir para a produção desta bebida. Neste caso, a fermentação láctica praticamente para com a diminuição do pH, mas algumas leveduras presentes nos grãos podem ainda continuar a fermentação, mesmo após o embalamento do produto, desde que as condições de temperatura sejam satisfeitas. Desta forma, esta segunda fermentação alcoólica pode ser um inconveniente para a comercialização de kefir produzido tradicionalmente, uma vez que esta tende a ocorrer na fase de distribuição, resultando em alterações substanciais no sabor e aroma devido à formação continuada de etanol e dióxido de carbono (**Kwak et al., 1996**).

A composição nutricional do kefir inclui ainda vitaminas, aminoácidos essenciais, minerais e também proteínas (**Tabela 2**), que são parcialmente digeridas durante a fermentação do leite, facilitando assim a digestão pelo corpo humano (**Otles and Cagindi, 2003**). Além disso há também a alteração do perfil de aminoácidos durante a fermentação, apresentando o kefir níveis mais elevados de treonina, serina, alanina e lisina (**Guzel-seydim et al., 2003**), contendo também valina, isoleucina, metionina, fenilalanina e triptofano (**Liut KeVICIUS, 2004**). No que diz respeito ao conteúdo em minerais, o kefir é uma boa fonte de magnésio, cálcio e fósforo (**Otles and Cagindi, 2003**).

Tabela 2. Composição química e valores nutricionais do kefir. Adaptado de **Liut KeVICIUS (2004), Sarkar (2007)**.

Componentes	Concentração	Componentes	Concentração
Água (%)	89,0 – 90,0	Açúcar (%)	6,0
Proteína (%)	3,0	Gordura (%)	0,2
Ácido Láctico (%)	1,0	Cinzas (%)	0,7
Vitaminas	(mg/Kg)	Macro-nutrientes	(%)
Vitamina B ₁	< 10	Potássio	1,65
Vitamina B ₂	< 5	Cálcio	0,86
Vitamina B ₅	3	Magnésio	1,45
Aminoácidos	(mg/Kg)	Fósforo	0,30
Treonina	1820	Micro-nutrientes	(mg/Kg)
Lisina	3760	Cobre	7,32
Valina	2200	Zinco	92,7
Isoleucina	2620	Ferro	20,3
Metionina	1370	Manganésio	13,0
Fenilalanina	2310	Cobalto	0,16
Triptofano	700	Molibdénio	0,33

1.2. Grão de kefir

Os grãos utilizados na produção de kefir são grãos gelatinosos que variam de tamanho, entre 0,3 e 3,0 cm de diâmetro (**Figura 1**), e apresentam uma superfície irregular e multilobular. A sua cor é ligeiramente variável (entre branco e branco amarelado) e caracterizam-se pela sua elasticidade e textura viscosa e firme (**Magalhães et al., 2011, Rea et al., 1996**). Os grãos de kefir consistem numa mistura de leveduras e bactérias, particularmente ácido-lácticas (LAB, do termo em inglês *lactic acid bacteria*) e ácido-acéticas (AAB, do termo em inglês *acetic acid bacteria*), agrupadas de forma organizada numa matriz de proteínas (caseínas) e exopolissacarídeos (EPS) (**Frengova et al., 2002, Irigoyen et al., 2005, Rimada and Abraham, 2001, Wszolek et al., 2007**). A composição microbiana dos grãos de kefir é heterogénea e depende de muitos fatores, especialmente da sua origem primária (**Garrote, 2001**).



Figura 1. Estrutura macroscópica dos grãos kefir. Adaptado de **Leite et al. (2013)**.

1.3. Microrganismos do kefir: Caracterização e metabolismo

1.3.1. Composição microbiológica do kefir

Em 1999, **Abraham and Antoni (1999)** reportaram que aproximadamente 0,9% do peso total do kefir húmido corresponde à sua microflora. As LAB encontradas nos grãos de kefir pertencem aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (**Gulitz et al., 2011, Magalhães et al., 2010**). Com base na sua morfologia, estes microrganismos podem ser classificados como cocos e bastonetes. Quanto às suas condições ótimas de crescimento, podem ser divididos em mesófilos e termófilos que podem crescer entre 20 – 30 °C ou 37 – 45 °C, respetivamente (**Tamime et al., 2006**). As LAB são responsáveis pela fermentação láctica (**Jensen, 1999**), (**Jensen, 1999**), convertendo a lactose em ácido láctico, o que resulta na diminuição do pH. Existem dois tipos de vias fermentativas pelas LAB. As LAB homofermentativas produzem apenas ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem ácido láctico e também dióxido de carbono (**Rattray and O’Connell, 2011**).

As AAB encontradas nos grãos de kefir são do género *Acetobacter* e utilizam etanol no seu metabolismo (**Garrote, 2001**). Estas bactérias desempenham um papel importante tanto na associação dos microrganismos, como nas características sensoriais do produto final (**Rea et al., 1996, Wszolek et al., 2007**). As AAB são Gram-negativas ou Gram-variáveis (quando é feita a coloração Gram, pode resultar em Gram-positiva ou Gram-negativa), aeróbias e as suas células apresentam forma de bastonete. O pH ótimo de crescimento é entre 5,0 – 6,5, podendo também crescer em meios com pH mais baixo, entre 3,0 – 4,0 (**Holt,**

1994). Relativamente à temperatura, estas são classificadas de bactérias mesófilas, tendo uma temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C (De Ley, 1984).

A microflora encontrada nos grãos de kefir inclui ainda leveduras dos géneros *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kazachstania*, *Lachancea* e *Yarrowia* (Witthuhn *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2009). Estas realizam a fermentação alcoólica (Walker, 1998) e, portanto, são as principais produtoras de etanol e dióxido de carbono (Magalhães *et al.*, 2011, Rattray and O'Connell, 2011). Estes microrganismos apresentam um papel essencial na produção de produtos lácteos fermentados, uma vez que fornecem os nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, tais como os aminoácidos e as vitaminas (Viljoen, 2001).

1.3.2. Interação entre os microrganismos

Os grãos de kefir proporcionam uma relação de simbiose microbiana complexa e dinâmica entre as LAB homofermentativas e heterofermentativas, as AAB e as leveduras fermentadoras e não fermentadoras de lactose (Magalhães *et al.*, 2011, Rattray and O'Connell, 2011). Desta forma, este pode ser considerado um bom exemplo de uma relação simbiótica entre microrganismos, uma vez que o crescimento e a sobrevivência das estirpes individuais está dependente da presença simultânea das diferentes espécies (Farnworth and Mainville, 2008). Farnworth and Mainville (2008) e Lang and Lang (1975) verificaram que, quando vários microrganismos do kefir foram isolados em culturas puras, ocorreu a diminuição da sua atividade fermentativa, podendo até levar à inibição do seu crescimento em leite. Adicionalmente, os autores verificaram que o crescimento de várias bactérias isoladas foi melhorado na presença de leveduras, indicando assim que estas são essenciais para a manutenção da integridade e da viabilidade da população microbiana, devido maioritariamente à produção de vitaminas, de aminoácidos e de outros fatores de crescimento essenciais para as bactérias. Por outro lado, os produtos finais do metabolismo bacteriano são utilizados como fonte de energia pelas leveduras.

1.3.3. Metabolismo dos hidratos de carbono

1.3.3.1. Bactérias ácido-lácticas

As LAB são as principais responsáveis por converter os hidratos de carbono presentes no leite em ácido láctico, produzindo assim a energia necessária para a síntese de biomassa (Jensen, 1999). Algumas das principais vias metabólicas das LAB estão esquematizadas na **Figura 2**. Quando estas bactérias utilizam a lactose presente no leite como fonte de energia, têm que a transportar para o interior da célula, podendo utilizar dois sistemas de transporte: o sistema lactose-fosfotransferase (lactose-PTS) e o sistema permease (Garrigues *et al.*, 1997). No sistema lactose-PTS a energia é proveniente do fosfoenolpiruvato e a lactose é transportada em forma de fosfato de lactose. No sistema permease, a energia provém do trifosfato de adenosina (ATP) e a lactose é transportada sem sofrer qualquer transformação (Farrow, 1980). Bactérias mesófilas, como as *Lactococcus* usam o sistema de transporte lactose-PTS, mas algumas estirpes de *Lactococcus lactis subsp. lactis* também podem conter o sistema permease (Farrow, 1980, Farrow and Garvie, 1979). No caso das bactérias termófilas, como as *Streptococcus* e *Lactobacillus*, o sistema permease é normalmente utilizado, no entanto a *Lactobacillus acidophilus* contém também o sistema lactose-PTS (Fisher *et al.*, 1985, Hickey *et al.*, 1986). Quando a lactose se encontra no interior da célula, é posteriormente hidrolisada pelas enzimas β -galactosidase (lactose) ou fosfo- β -galactosidase (fosfato de lactose). Enquanto a enzima β -galactosidase, hidrolisa a lactose em glucose e galactose, a enzima fosfo- β -galactosidase hidrolisa a lactose-fosfato em glucose e galactose-6-fosfato (Daryaei *et al.*, 2010). Seguidamente, a glucose sofre uma fosforilação, pela enzima glucocinase, originando glucose-6-fosfato, que por sua vez é catabolizada, pela via glicolítica (Daryaei *et al.*, 2010, Tamime *et al.*, 2006). Quanto à galactose, esta é fermentada na via de Leloir onde é transformada em galactose-1-fosfato, e a galactose-6-fosfato é fermentada pela via da tagatose que é metabolizada através de vários derivados da tagatose (estereoisómero da frutose) até gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato, sendo estes produtos posteriormente metabolizados através da via glicolítica, obtendo-se ácido láctico como produto final (Daryaei *et al.*, 2010).

De acordo com os produtos formados, podem distinguir-se dois tipos de fermentação: a homoláctica, na qual se produz ácido láctico e a heteroláctica, na qual se produzem quantidades iguais de ácido láctico, de etanol e de dióxido de carbono. Para além destes produtos, o piruvato formado pela via glicolítica pode ser redirecionado de modo a originar

acetato, acetaldeído e etanol, formados por meio de um intermediário comum, o acetil-CoA (Tamime *et al.*, 2006). A formação de etanol e acetaldeído é acoplada com a regeneração do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+) sob condições anaeróbicas, e quando o balanço redox é mantido por outras reações, a acetil-CoA é degradada e resulta na formação de acetato (Tamime *et al.*, 2006).

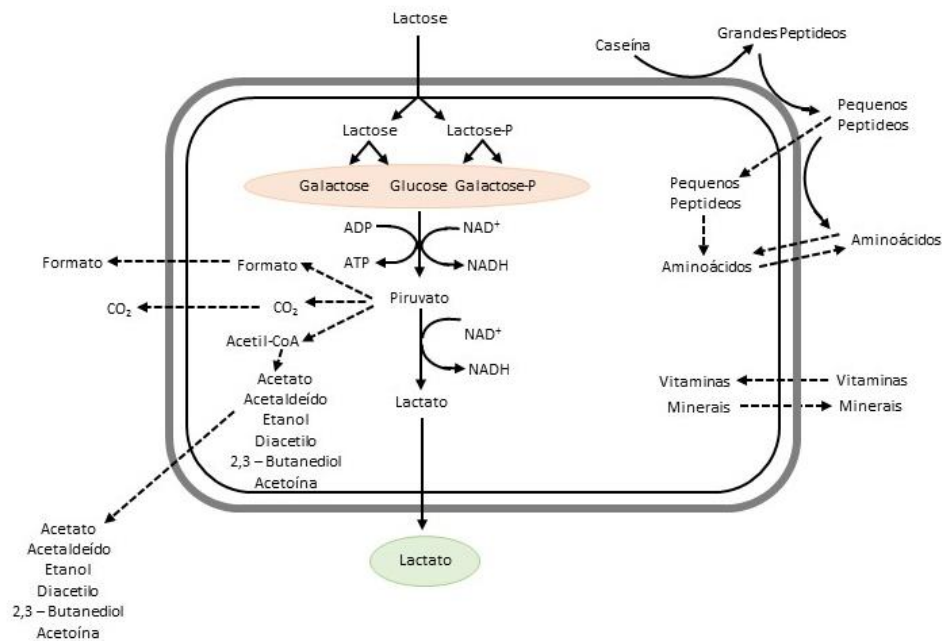


Figura 2. Vias metabólicas das bactérias ácido-lácticas. Adaptado de **Anonymous (1994)**.

1.3.3.2. Bactérias ácido-acéticas

As AAB têm a capacidade de oxidar açúcares e álcoois, resultando na acumulação de ácidos orgânicos, sendo o ácido acético um dos principais produtos do seu metabolismo (González *et al.*, 2005). Estas bactérias têm a capacidade de realizar a designada “fermentação oxidativa”, que corresponde a um processo de oxidação incompleto, no qual os substratos são oxidados por desidrogenases ligadas à membrana, e os produtos oxidados são libertados para o meio de cultura. Na produção de ácido acético a partir de etanol, as AAB oxidam parcialmente o etanol em duas etapas sucessivas, sendo que este também pode ser completamente oxidado no citoplasma como representado na **Figura 3 (Matsushita *et al.*, 1994)**. Inicialmente, o etanol é oxidado a acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase

ligada à membrana (ADH) e seguidamente, o acetaldeído é oxidado originando ácido acético, pela enzima aldeído desidrogenase (Al-DH). Estas duas enzimas transferem os eletrões para o oxigénio como último recetor de eletrões, ocorrendo assim a formação de H₂O e de uma força motriz de prótons, necessária à produção de energia. Por sua vez, o ácido acético formado acumula-se no meio de cultura (Matsushita *et al.*, 2004).

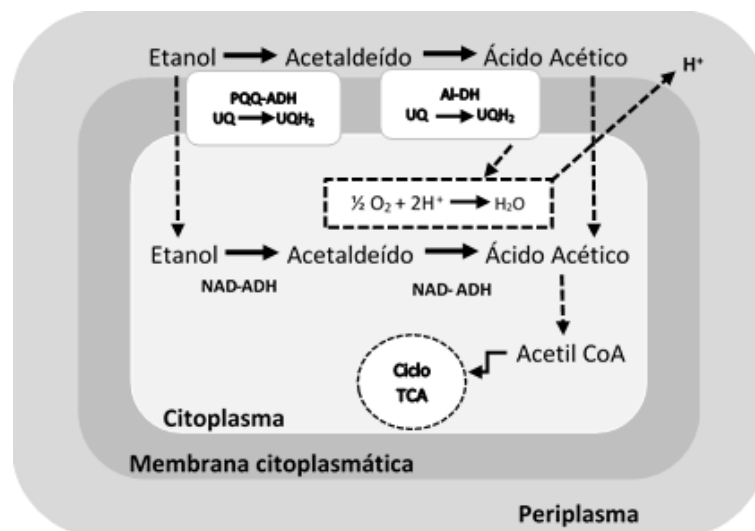


Figura 3. Oxidação do etanol na superfície exterior da membrana citoplasmática e no citoplasma. Adaptado de Mamlouk and Gullo (2013).

1.3.3.3. Leveduras

Diversas espécies de leveduras têm sido identificadas no kefir e, de acordo com Walker (1998), estes microrganismos têm a capacidade de metabolizar uma larga gama de substratos orgânicos. A maioria das leveduras metaboliza os açúcares como principal fonte de carbono para a produção de energia sendo capazes de utilizar uma grande variedade de açúcares, tais como a glucose, a lactose, a galactose, a frutose e a melibiose (Walker, 1998, Wszolek *et al.*, 2007). No caso da *S. cerevisiae*, a glucose é metabolizada via glicólise, produzindo piruvato. Este, por sua vez, é convertido em acetaldeído, por ação da enzima piruvato descarboxilase que também origina a re-oxidação de NADH a NAD⁺. Por último, o acetaldeído é convertido em etanol, por catálise da enzima ADH, ocorrendo assim a fermentação alcoólica (Figura 4) (Walker, 1998). Por outro lado, certas leveduras conseguem metabolizar o piruvato na matriz mitocondrial, onde é descarboxilado

oxidativamente a acetil-coA, pela enzima piruvato desidrogenase. Assim, as leveduras podem realizar a fermentação anaeróbia ou ambas as fermentações (anaeróbia e aeróbia).

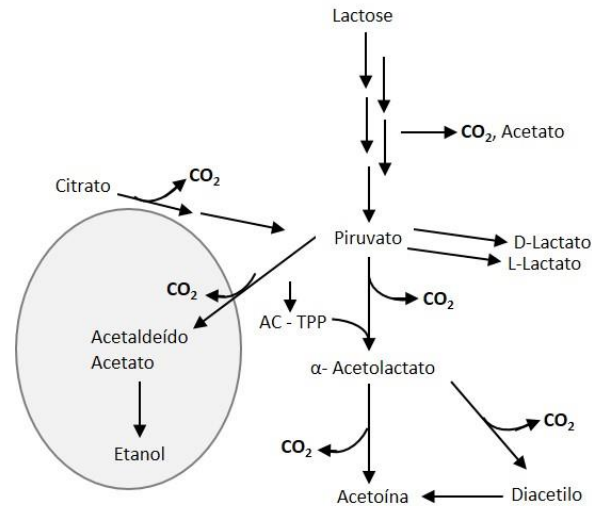


Figura 4. Vias metabólicas das leveduras para a produção de etanol. Adaptado de **Wszolek et al. (2007)**.

1.3.4. Produção de exopolissacarídeos

Os EPS são biomoléculas que têm sido amplamente estudadas devido ao seu grande interesse para a indústria alimentar, médica e farmacêutica (**Hamet et al., 2015**). No caso da indústria alimentar, os EPS poderão contribuir para a reologia, o paladar e a textura de leites fermentados (**Galle et al., 2012**). Assim, estas propriedades tornam-nos adequados para a utilização como aditivos, tais como estabilizadores, emulsionantes, agentes gelificantes assim como para melhorar a viscosidade (**Wang et al., 2008**).

Os EPS de diferentes estruturas e composições são produzidos por uma variedade de espécies de LAB, incluindo *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (**Ruas-Madiedo et al., 2002**), ou seja, bactérias frequentemente encontradas em leite e em produtos lácteos (**Dupont et al., 2000**). No entanto, as suas propriedades dependem dos microrganismos produtores, das condições de fermentação e da composição do meio de cultura (**Kim et al., 2008**). No caso específico dos grãos de kefir, os EPS (denominado kefirano) são produzidos por estirpes de *Lactobacillus kefiranofaciens* (**Cheirsilp et al.**), havendo um aumento da sua produção quando existe uma co-cultura de *L. kefiranofaciens* e *S. cerevisiae* (**Cheirsilp et al., 2003**). O kefirano é um polissacarídeo ramificado, solúvel em

água e contém quantidades iguais de D-glucose e D-galactose (Marshall and Cole, 1985), ligadas entre si por uma diversidade de ligações glicosídicas, tal como está representado na **Figura 5**. Recentemente, têm sido atribuídas algumas atividades biológicas ao kefirano, tais como atividade antimicrobiana (Rodrigues *et al.*, 2005), de imunestimulação e de proteção do epitélio (Medrano *et al.*, 2011, Vinderola *et al.*, 2006).

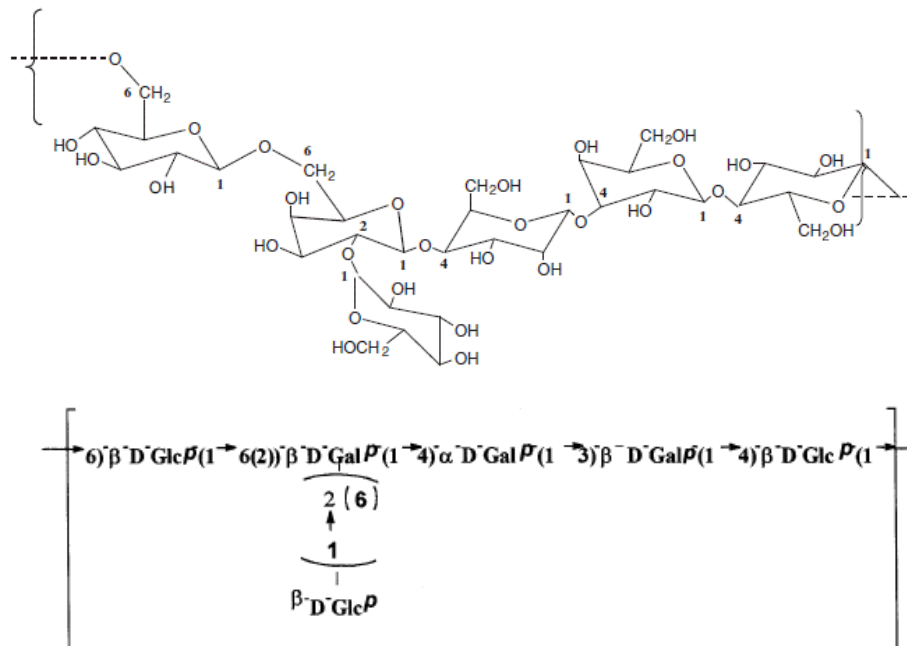


Figura 5. Estrutura geral do kefirano. Retirado de Badel *et al.* (2011).

1.4. Produção de kefir

O kefir pode ser produzido a partir de grãos de kefir (Magalhães *et al.*, 2011) ou culturas *starter* (Beshkova *et al.*, 2002). As culturas *starter* consistem numa variedade limitada de culturas puras de microrganismos (Kök-Taş *et al.*, 2013) e apresentam vantagens como sejam o facto de tornarem a produção menos trabalhosa e de assegurarem um tempo de prateleira mais prolongado (Wszolek *et al.*, 2007). O kefir pode também ser produzido a partir de diferentes tipos de leite (por exemplo, de vaca, de cabra e de ovelha) (Wszolek *et al.*, 2001), podendo este ser gordo ou desnatado, bem como pasteurizado ou não pasteurizado (Otlés and Cagindi, 2003). Para além disso, diversos ingredientes podem ser utilizados na produção de kefir, tais como bebida de coco, bebida de arroz (Otlés and Cagindi, 2003) e bebida de soja (Abraham and Antoni, 1999).

Quanto ao processo de produção de kefir, este pode ser dividido em duas categorias: método tradicional e método industrial (comercial) (Guzel-Seydim, 2010). No processo tradicional (Guzel-Seydim, 2010) os grãos são diretamente adicionados ao leite pasteurizado e, posteriormente, a mistura é incubada com agitação, aproximadamente durante 24 horas a 25 °C. Após a fermentação, os grãos são separados do leite e armazenados a frio para a próxima inoculação e o kefir produzido é, então, armazenado a 4 °C durante cerca de uma hora, estando, em seguida, pronto para consumo. Por outro lado, o processo de produção industrial de kefir (representado na **Figura 6**) (Wszolek *et al.*, 2007), inicia-se com o aquecimento do leite a ≈ 65 °C, seguido da sua homogeneização a ≈ 15 Megapascal (MPa), e tratamento térmico a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, o leite é arrefecido e inoculado com as culturas *starter*. Para a produção de *set-kefir* (**Figura 6, lado esquerdo**), o leite inoculado é embalado em frascos de vidro ou embalagens semi-rígidas, nas quais decorre a fermentação durante 10 – 12 horas a 21 °C. O kefir é, então, arrefecido até 9 °C e curado durante 1 – 3 dias, sendo depois arrefecido lentamente e armazenado a 6 °C. Por outro lado, o *stirred-kefir* (**Figura 6, lado direito**) é fermentado em tanques a 21 °C durante 10 – 12 horas, sendo depois arrefecido até 15 °C, embalado e curado a 9 °C durante 15 horas. Tal como o *set-kefir*, o produto final é armazenado a 6 °C.

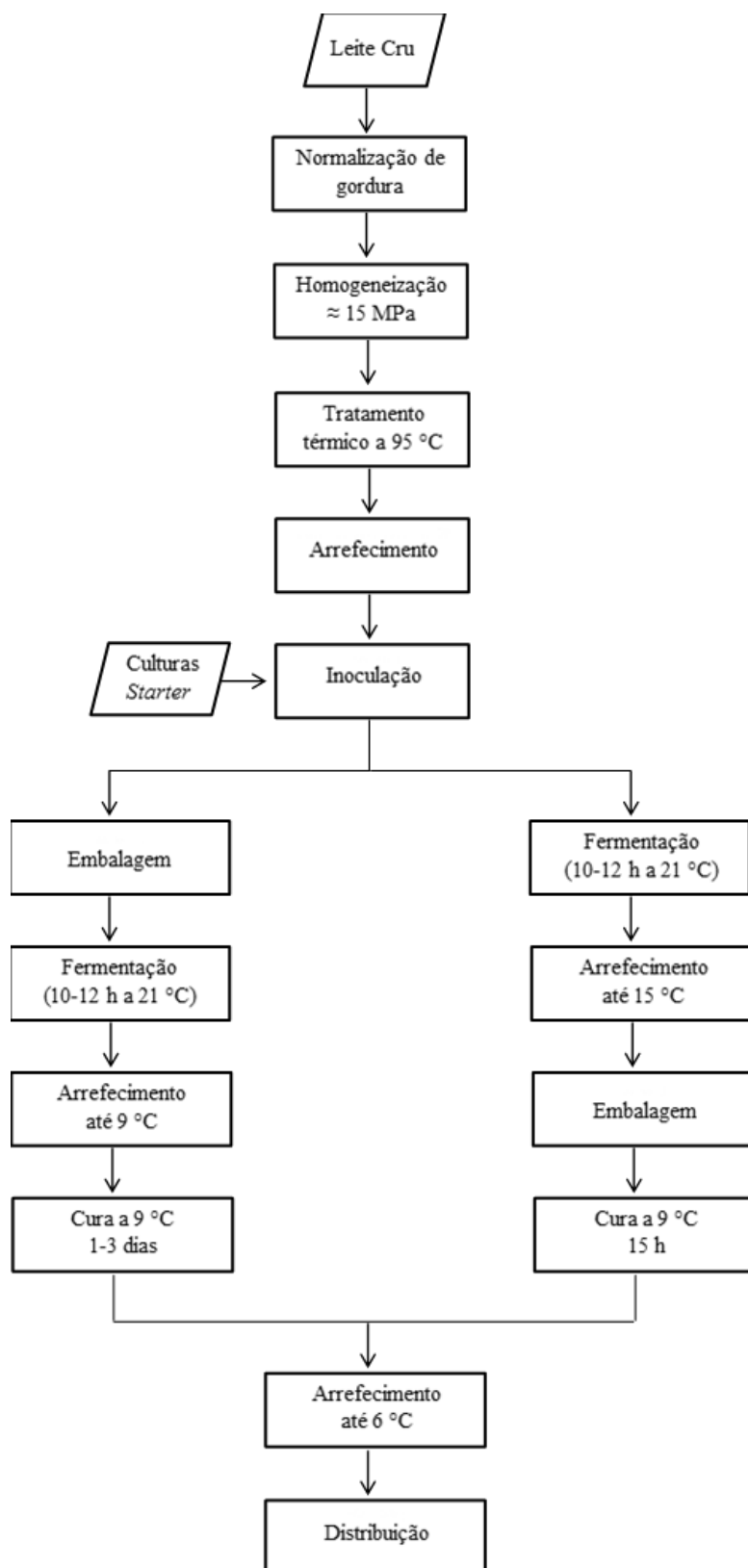


Figura 6. Diagrama de produção industrial de kefir. Adaptado de **Wszolek et al. (2007)**.

1.4.1. Efeito da temperatura na produção de kefir

A qualidade do kefir é afetada por diferentes parâmetros da fermentação, tais como o tipo de culturas de kefir, o rácio, o tempo e a temperatura de fermentação (**Kök-Taş et al., 2013**). No entanto, a temperatura de fermentação afeta a capacidade total de acidificação e a velocidade de produção de ácido (**Irigoyen et al., 2003**). Na literatura, **Schoevers and Britz (2003)** reportaram que para todas as temperaturas de fermentação testadas (18, 22, 25 e 30 °C), a acidez titulável, mostrou que, a elevadas temperaturas, ocorreram elevados valores de acidez, sendo que a fermentação na 22 e a 25 °C não resultaram diferenças significativas em termos de acidez titulável. Contudo, a 18 °C verificaram-se valores significativamente mais baixos. O mesmo comportamento foi observado por **Ismail et al. (2011)** quando estudaram temperaturas de fermentação numa gama de 15 – 50 °C, tendo-se observado que os valores máximos para a acidez titulável e para o ácido láctico foram obtidos a 35 °C. Um outro estudo observou que para a fermentação de kefir, a diminuição da temperatura levou à extensão do tempo necessário para atingir o pH de 4,4. Os resultados mostraram que o tempo de fermentação requerido foi maior a 20 °C do que a 25 °C ou 30 °C, sendo que a 30 °C foi a temperatura que exibiu o valor mais baixo (**Dimitreli and Antoniou, 2011**). Similarmente, outros autores observaram que, em fermentação de kefir utilizando soluções de soro de leite a 17, 27 e 37 °C, ocorreu uma vez mais o aumento da taxa de fermentação com o aumento da temperatura (**Apar et al., 2016**). Assim, estes resultados indicam que com a diminuição da temperatura ocorreu o aumento do tempo necessário para se produzir kefir, o que pode ser atribuído a uma redução da atividade metabólica das bactérias (**Haque et al., 2001**).

Foi ainda observado o mesmo comportamento para a fermentação de iogurte, tal como foi reportado por **Haque et al. (2001)** e **Nguyen et al. (2014)**. Os estudos mostraram que a redução da temperatura de fermentação, numa gama de temperaturas de 37 – 46 °C, causou um aumento do tempo requerido para atingir o pH de 4,5, o que pode ser explicado pela diminuição da atividade metabólica das bactérias ácido-lácticas tal como foi observado para a fermentação de kefir. No fim do tempo de fermentação não se verificaram diferenças significativas na acidez titulável entre os tratamentos (37, 40 e 43 °C), no entanto, com a diminuição da temperatura, foi necessário aumentar o tempo para atingir os mesmos valores de acidez titulável a todas as três temperaturas.

1.5. Propriedades terapêuticas

O consumo de kefir está associado a vários benefícios para a saúde, incluindo atividade antiviral e antioxidante, efeito hipocolesterolémico, entre outros (Liu *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2009). Chifiriuc *et al.* (2011) estudaram a atividade antimicrobiana do kefir através do seu efeito *in vitro* em diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados mostraram que o kefir fermentado durante 24 e 48 horas, fresco e após 7 dias de armazenamento, mostraram atividade antimicrobiana numa grande diversidade de espécies bacterianas, incluindo *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis*, com resultados similares aos antibióticos usados como controlo. Um dos mecanismos responsáveis por esta atividade poderá estar relacionado com a presença de algumas espécies de *Lactobacillus* que têm a capacidade de produzir uma larga gama de compostos antimicrobianos que incluem ácidos orgânicos (tais como, ácido láctico e ácido acético), peptídeos (bacteriocinas), dióxido de carbono, peróxido de hidrogénio, etanol e diacetilo. Os ácidos orgânicos penetram na membrana celular causando a acidificação do citoplasma e, por outro lado, o dióxido de carbono cria um ambiente anaeróbio que afeta negativamente as espécies aeróbias. Para além disso, a produção de peróxido de hidrogénio pode levar a um aumento da permeabilidade e da peroxidação lipídica da membrana, ocorrendo desta forma a inibição do crescimento das estirpes bacterianas (Farnworth, 2005).

Na literatura está também reportado que o kefir apresenta efeito anti-tumoral. Gao *et al.* (2013) observaram que a fração *cell-free* de kefir (KF) inibiu a proliferação das células humanas de cancro gástrico SGC7901, *in vitro*, tendo-se verificado que este efeito é dose-dependente. Este efeito pode dever-se à interrupção do ciclo celular, uma vez que esta fração de kefir impede a progressão das células para a fase S do ciclo celular, tendo assim, como alvos, eventos cruciais que estão envolvidos na transição da fase G1 para a fase S. Outro mecanismo de ação é a indução da apoptose das células cancerígenas, que é comprovado pela *up-regulation* do gene *bax* que codifica proteínas pro-apoptóticas, e a *down-regulation* do gene *bcl-2*, que é um inibidor da apoptose.

Assim, é possível concluir que o kefir atua como antimicrobiano contra alguns tipos de bactérias, devendo-se este efeito a alguns dos produtos formados durante a fermentação, bem como o facto de o KF ter atividade anti-tumoral, sendo a indução da apoptose um dos mecanismos possíveis.

2. Alta pressão

2.1. Tecnologia

A pressão é um importante parâmetro termodinâmico com bastante influência nos sistemas moleculares (Aertsen *et al.*, 2009). A pressão foi introduzida no campo da Biologia no final do século XIX (Rivalain *et al.*, 2010), sendo que, na biosfera, varia de 0,1 MPa (pressão atmosférica) ao nível do mar, até mais de 110 MPa nas profundidades do oceano. Em consequência, a capacidade de adaptação às alterações de pressão é uma característica da vida, que tem influenciado a evolução e a distribuição dos micro e macrorganismos (Bartlett, 2002, Somero, 1990).

A alta pressão (AP) é uma tecnologia emergente que tem suscitado bastante atenção em diversas áreas, incluindo a área alimentar e as biociências, entre outras (Aertsen *et al.*, 2009). Esta tecnologia tem como base da sua ação o princípio de Le Châtelier (qualquer fenómeno que é acompanhado por uma diminuição do volume, é favorecido com o aumento da pressão e vice-versa) e o princípio isostático (a pressão é transmitida de forma instantânea e uniforme) (Ramaswamy HS, 1999). De acordo com o princípio de Le Châtelier, a aplicação de pressão afeta qualquer fenómeno (por exemplo, a transição de fase, a reatividade química, a mudança de configuração molecular, as reações químicas), deslocando o equilíbrio no sentido do estado que ocupa um menor volume (Cheftel, 1995). Tal como referido pelo princípio isostático, a pressão é transmitida rapidamente e de forma uniforme em todas as direções do produto (Olsson, 1995). Como tal, o produto em questão é comprimido independentemente do seu tamanho, geometria e composição (Farkas and Hoover, 2000).

Para além destes dois princípios, é necessário ter também em consideração o aquecimento adiabático que ocorre durante a compressão, visto que este conduz à alteração da temperatura no produto (Georget *et al.*, 2015). Geralmente, a aplicação de pressão induz um aumento de aproximadamente 3 °C por cada aumento de 100 MPa (Rasanayagam *et al.*, 2003). No entanto, o aumento da temperatura depende das propriedades do material, tais como a sua compressibilidade e o seu calor específico (Georget *et al.*, 2015).

2.2. Aplicações

Nos últimos anos, tem-se verificado uma maior preferência dos consumidores por alimentos minimamente processados, sem aditivos e com um tempo de prateleira prolongado, o que desencadeou a procura por métodos de conservação alternativos (Yaldagard *et al.*, 2008). A AP foi testada pela primeira vez como método de conservação por Hite (1899) há mais de um século tendo demonstrado produzir um aumento do tempo de prateleira do leite processado por AP. Atualmente esta tecnologia é conhecida como uma técnica de pasteurização não-térmica (aplicação de pressões entre 300 e 600 MPa durante curtos períodos de tempo) (Yordanov and Angelova, 2010), que tem como principal objetivo produzir alimentos com tempo de prateleira mais longo, sem afetar substancialmente as características nutricionais, funcionais e organoléticas dos alimentos (Mota *et al.*, 2013).

Comercialmente a AP teve a sua origem no Japão em 1990 quando foi comercializada a primeira geleia processada por esta tecnologia. Posteriormente, a tecnologia surgiu também nos Estado Unidos da América e, mais recentemente, na Europa (Norton and Sun, 2008, Patterson, 2014). Atualmente, estão disponíveis no mercado diferentes produtos processados por AP, tais como: sumos de fruta, geleias, presunto, marisco (Rivalain *et al.*, 2010), preparados de fruta, bolos de arroz, lulas e guacamole (Hugas *et al.*, 2002). Na Figura 7 é apresentado o número de equipamentos de AP a operar entre 1990 e 2015, na indústria.

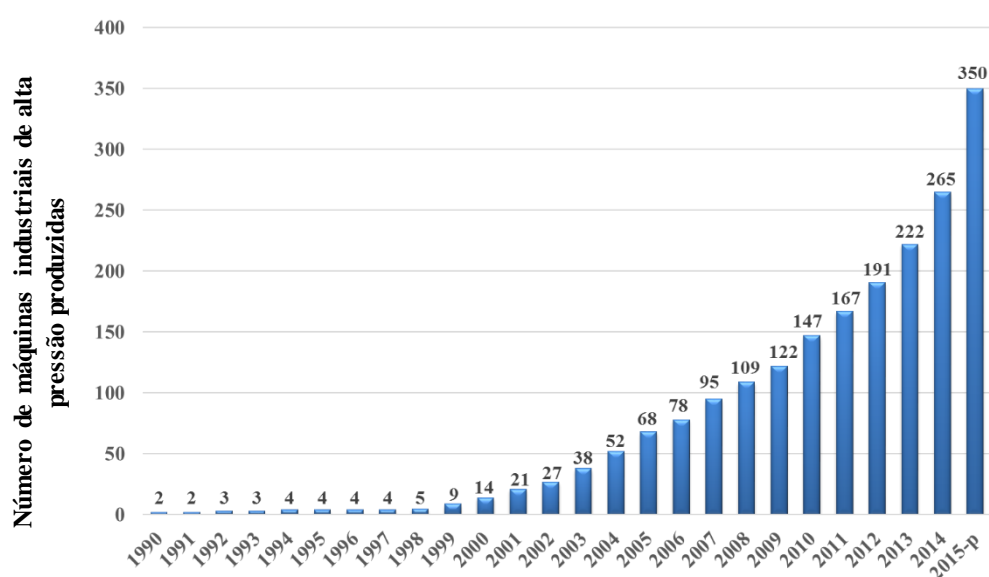


Figura 7. Evolução do número de máquinas industriais de alta pressão, produzidas entre 1990 e 2015. Cortesia de Hiperbaric.

Recentemente têm surgido outras aplicações para a AP na área alimentar, incluindo a modulação da atividade enzimática (**Verlent et al., 2006**), a homogeneização por alta pressão (**Diels et al., 2003**) e o aumento da digestibilidade de proteínas alimentares (**Zeece et al., 2008**). Para além disso, a AP tem sido também utilizada na modulação da fermentação microbiana, uma aplicação promissora mas ainda pouco explorada (**Bothun et al., 2004**, **Kato et al., 2007**, **Mota et al., 2015**, **Picard et al., 2007**).

Além das aplicações na área alimentar, têm surgido novas possibilidades na área farmacêutica (por exemplo, a utilização da AP no contexto do desenvolvimento de vacinas para alguns agentes infecciosos, tais como o vírus da febre-amarela (**Gaspar et al., 2008**)), e na biomedicina (por exemplo, a criopreservação assistida por pressão (**Pribenszky et al., 2007**) ou a desinfecção de biomateriais artificiais ou naturais (**Gollwitzer et al., 2009**)), entre outros.

2.3. Efeito da alta pressão nos microrganismos

A AP exerce diversos efeitos nos organismos vivos, afetando a organização das suas estruturas celulares, bem como os seus processos metabólicos (**Bartlett, 2002**). No entanto, o efeito letal da AP nos microrganismos resulta de danos que ocorrem simultaneamente em diferentes estruturas e funções celulares (**Patterson, 2014**). Em geral, todos os efeitos da pressão resultam da redução do volume do sistema biológico favorecendo assim a aquisição de formas estruturais mais compactas e perturbando, também, o equilíbrio das reações (bio)químicas (**Mentré et al., 1999**). Com o aumento da pressão, todas as funções celulares são sucessivamente comprometidas, tornando-se impossível sobreviver nessas condições hostis, o que leva à perda de viabilidade celular (**Mota et al., 2013**). Na **Figura 8** estão representados exemplos de alguns dos efeitos da AP nas células e em certos componentes celulares.

A membrana celular é o primeiro alvo do aumento da pressão pois é uma das estruturas biológicas mais sensíveis à pressão (**Winter and Jeworrek, 2009**). A pressão induz danos na membrana celular e na sua estrutura, levando a que os mecanismos de absorção de nutrientes e libertação de metabolitos sejam afetados causando, assim, alterações nas vias metabólicas dos microrganismos (**Torres and Velazquez, 2005**). Quanto aos lípidos que constituem a membrana, estes adaptam-se à restrição do volume modificando a sua conformação e empacotamento (**Winter and Jeworrek, 2009**).

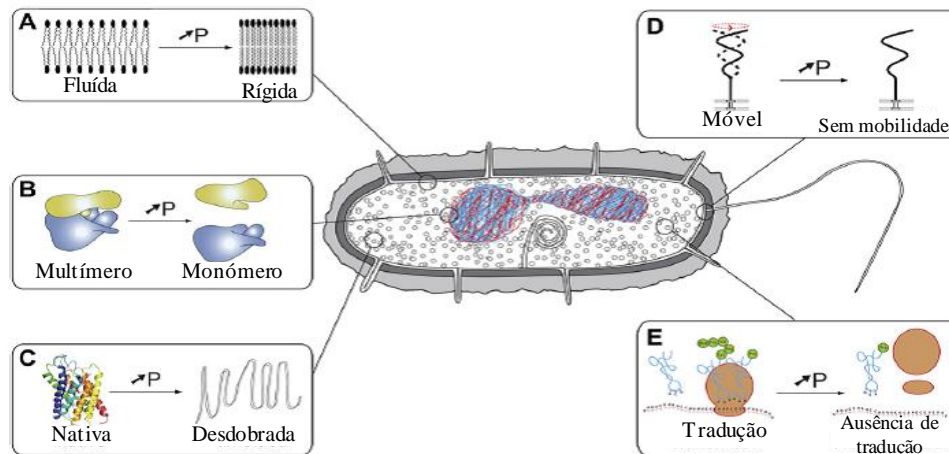


Figura 8. Exemplos de efeitos da alta pressão nas células e componentes celulares dos microrganismos. A: lípidos das membranas; B: agrupamento de proteínas multiméricas; C: estrutura da proteína; D: motilidade celular; E: tradução de proteínas nos ribossomas. Adaptado de **Oger and Jebbar (2010)**.

As proteínas são também bastante sensíveis à pressão, adaptando-se à diminuição do volume através da alteração da sua conformação (**Oger and Jebbar, 2010**). A AP pode causar uma variedade de efeitos nestas biomoléculas incluindo modificações estruturais reversíveis (100 – 300 MPa) ou irreversíveis (> 300 MPa) levando à desnaturação, agregação ou formação de géis (**Thakur and Nelson, 1998, Yaldagard et al., 2008**). O efeito da pressão nas proteínas está relacionado com a rutura das ligações não-covalentes que são essenciais para a manutenção da estrutura e da função das proteínas. Em geral, a pressão não afeta as ligações covalentes que compõem a estrutura primária e tem pouco efeito na estrutura secundária. No entanto tem efeitos significativos nas estruturas terciária e quaternária que são compostas por ligações não-covalentes (**Knorr, 1999**).

A pressão provoca ainda a desintegração multimérica e, por isso, os ribossomas são também afetados pela AP que promove a dissociação dos mesmos nas suas subunidades (70S → 30S + 50S). Este efeito parece ser um dos principais fatores responsáveis pela morte celular por AP uma vez que as células bacterianas não sobrevivem quando o número de ribossomas funcionais diminui abaixo de um determinado nível (**Niven et al., 1999**).

No caso das moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), a AP estabiliza as pontes de hidrogénio aí presentes, causando um aumento da temperatura de transição de cadeia dupla para cadeia simples. Através da estabilização do DNA, a AP dificulta a transição de cadeia dupla para cadeia simples, essencial aos processos celulares de replicação, de transcrição e de tradução (**Macgregor Jr, 2002**).

Em relação à extensão dos danos provocados por AP nos microrganismos, esta depende da estirpe e da fase do ciclo de crescimento do microrganismo, da intensidade e da duração do tratamento, bem como da temperatura, do pH, da atividade da água e da composição dos alimentos ou dos meios de suspensão (Tewari *et al.*, 1999). Em geral, as bactérias Gram-positivas são mais resistentes à pressão do que as bactérias Gram-negativas, bolores e leveduras, contudo os esporos são as estruturas mais resistentes (Yordanov and Angelova, 2010). Quanto aos níveis de pressão aplicados, o crescimento microbiano é inibido numa gama de pressões entre 20 e 130 MPa, enquanto pressões acima de 130 MPa podem resultar na morte celular. Embora os efeitos da AP possam conduzir à morte celular em alguns casos, existem vários microrganismos capazes de resistir a essas condições hostis, apesar do efeito da pressão nas suas funções e estruturas celulares (Abee and Wouters, 1999).

2.4. Efeito da alta pressão no processo fermentativo

Como referido anteriormente, o tratamento por AP pode ter diferentes níveis de efeitos nos microrganismos, podendo causar danos ao nível molecular e celular ou, em casos mais extremos, levar à morte microbiana. Contudo, existem níveis de pressão que provocam *stress* nos microrganismos, não causando no entanto a sua morte (Huang *et al.*, 2014). Por exemplo, os microrganismos mesófilos estão adaptados para viver à pressão atmosférica e progressivamente param de crescer a 40 – 50 MPa. Por outro lado existem microrganismos que estão adaptados para crescerem e proliferarem a pressões de 100 MPa ou superiores, os chamados microrganismos piezófilos, existentes no fundo do mar e no subsolo de habitats terrestres (Lauro and Bartlett, 2008, Simonato *et al.*, 2006). A descoberta destes microrganismos impulsionou a investigação sobre uma nova aplicação da AP relacionada com a utilização de pressão em níveis sub-letais (5 – 100 MPa) (Figura 9) (Bothun *et al.*, 2004, Kato *et al.*, 2007, Mota *et al.*, 2013, Mota *et al.*, 2015, Picard *et al.*, 2007) que inclui a realização de processos fermentativos/crescimento microbiano sob pressão.

Deste modo, os microrganismos extremófilos fornecem conhecimentos importantes sobre as adaptações estruturais necessárias para sobreviver e crescer sob AP (Abe and Horikoshi, 2001, Aertsen *et al.*, 2009). Em consequência, quando os microrganismos estão sob níveis de pressão sub-letais, podem desenvolver mecanismos de resposta específicos ao *stress*, tais como a modulação metabólica, ou seja, pode haver a supressão/redução de

algumas vias metabólicas e/ou utilização de outras vias (Mota *et al.*, 2015) e/ou modulação da expressão de genes (Bravim *et al.*, 2013, Iwahashi *et al.*, 2005).

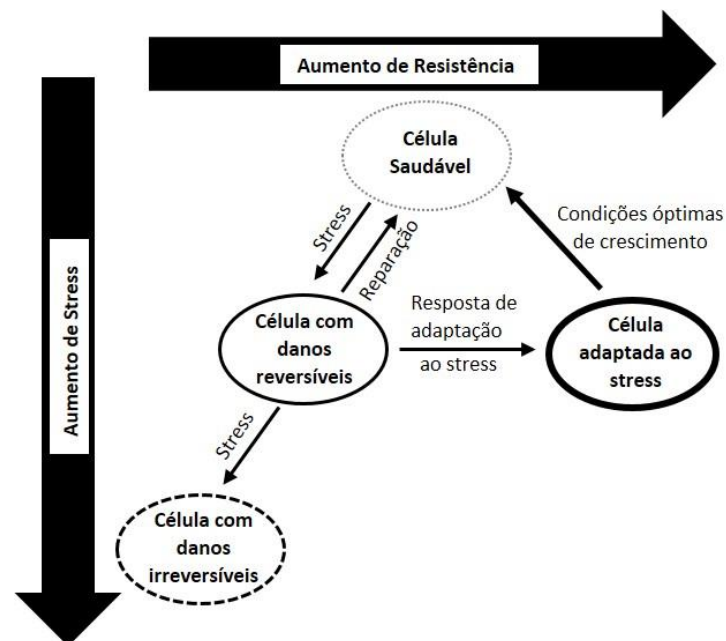


Figura 9. Stress microbiano, lesão, adaptação e resistência ao processamento. Adaptado de Lado and Yousef (2002).

Está reportado na literatura, por exemplo, que a levedura *S. cerevisiae* consegue crescer num gama de pressões entre 15 – 25 MPa mas, no entanto, pressões acima de 50 MPa inibem o seu crescimento (Abe, 2007). Quando esta levedura foi exposta a pressões em níveis sub-letais (25 e 30 MPa) ocorreu uma *up-regulation* de algumas proteínas de choque térmico (Iwahashi *et al.*, 2005, Miura *et al.*, 2006). Contudo, na exposição a 30 MPa também se verificou a ativação de genes que controlam a estrutura da membrana, bem como a indução de genes envolvidos no metabolismo de proteínas e da membrana (Iwahashi *et al.*, 2005). Deste modo, os autores verificaram que estas leveduras têm diferentes respostas de acordo com o nível de pressão aplicado, visto que quando foram submetidas a condições letais (200 MPa durante 30 minutos), ocorreu maioritariamente uma *up-regulation* de genes envolvidos na defesa e no metabolismo de hidratos de carbono (Fernandes *et al.*, 2004). Bravim *et al.* (2013) demonstraram que existe um aumento da produção de etanol quando esta levedura foi sujeita a um tratamento de 50 MPa, e uma *up-regulation* de genes relacionadas com transportadores de hexoses e genes que codificam enzimas glicolíticas. Segundo os autores, o aumento da produção de etanol pode estar relacionado com um esforço

das células para estabelecer um equilíbrio redox, transformando acetaldeído em etanol e NAD^+ , via fermentação (**Bakker et al., 2001**).

A bactéria *Lactobacillus sanfranciscensis* foi exposta a uma gama de pressões entre 0,1 – 120 MPa, o que levou a um aumento da resistência desta bactéria à AP quando aplicada em níveis letais (300 MPa, 30 minutos) (**Scheyhing et al., 2004**). Por outro lado, a posterior exposição a 50 MPa, revelou que esta estirpe mutante apresentava um crescimento mais rápido durante a exposição a AP e uma alteração no padrão de resistência a antibióticos, quando comparado com o *wild type* (**Pavlovic et al., 2008**). Para além disso, a exposição a 45 MPa durante 30 minutos (**Pavlovic et al., 2005**), induziu a expressão de genes que codificam proteínas ribossomais e proteínas de choque térmico, sendo que a 80 MPa (**Hörmann et al., 2006**) também se verificou um aumento da síntese de proteínas de choque térmico.

Em relação à bactéria láctica *Lactobacillus rhamnosus*, a literatura reporta a indução da resistência ao calor quando estas foram sujeitas a pressões sub-letais (100 MPa, 10 minutos) (**Ananta and Knorr, 2004**). Segundo os autores, as células tratadas com pressão apresentavam uma maior taxa de sobrevivência comparativamente com as células não tratadas, quando posteriormente expostas a 60 °C. Assim, concluiu-se que esta maior resistência à temperatura nas células pré-tratadas com pressão se deveu à indução da síntese de proteínas com efeito preventivo contra a degradação térmica da célula.

No que diz respeito ao efeito da AP nos processos fermentativos existem ainda poucos estudos publicados. **Bothun et al. (2004)** investigaram o comportamento de culturas de *Clostridium thermocellum*, que utilizam material celulósico para a produção de etanol, durante o processo fermentativo sob pressões de 7,0 e 17,3 MPa. Os resultados obtidos indicaram uma redução do crescimento celular das culturas pressurizadas de aproximadamente 40% e 60%, respetivamente, comparativamente com as culturas controlo (fermentação à pressão atmosférica). Porém, verificaram que o rácio etanol: acetato era mais elevado nas culturas pressurizadas (**Bothun et al., 2004**) o que poderá ser de grande interesse para a produção industrial de etanol por fermentação microbiana, uma vez que, neste processo, se produziu menos contaminantes, em particular o acetato (**Aertsen et al., 2009**).

Kato et al. (2007) estudaram a capacidade de síntese de celulose por *Gluconacetobacter xylinus* sob AP (30, 60 e 100 MPa, a 25 °C). Os resultados mostraram

que, mesmo a 100 MPa, não só existiam células viáveis de *G. xylinus*, mas também que estas retinham a capacidade de sintetizar celulose. No entanto, a esta pressão, ocorreu uma diminuição acentuada do número de células viáveis, levando por isso a uma diminuição da quantidade de celulose sintetizada. Quanto à morfologia da celulose produzida, verificaram que a 30 e 60 MPa as fibras de celulose eram significativamente mais densas do que as produzidas à pressão atmosférica. Assim, a celulose produzida sob pressão apresentava diferentes características, possivelmente com melhor qualidade para aplicações terapêuticas e industriais.

Picard et al. (2007) monitorizaram a fermentação alcoólica realizada pela levedura *S. cerevisiae* sob AP, numa gama de pressões de 5 a 100 MPa, a 30 °C. Com o aumento da pressão até 10 MPa, verificaram um aumento da velocidade fermentativa e da produção de etanol tendo ocorrido uma produção máxima de etanol a 5 MPa. No entanto, acima de 20 MPa, o processo fermentativo abrandou com o aumento da pressão e estimou-se que a 87 ± 7 MPa a fermentação alcoólica tivesse sido interrompida. Os autores concluíram que acima de 10 MPa as enzimas envolvidas na via glicolítica são progressivamente inibidas com o aumento da pressão, sendo que a literatura reporta que a enzima fosfofrutocinase é inibida devido ao facto de a pressão induzir a acidificação a aproximadamente 50 MPa (**Abe and Horikoshi, 1995, Abe and Horikoshi, 1997**). Os resultados sugerem assim que pressões entre 5 e 10 MPa melhoraram a atividade catabólica, podendo vários fenómenos serem responsáveis por este aumento da atividade fermentativa. Desta forma, estes resultados poderão ser de grande interesse para a indústria, uma vez que o processo fermentativo responsável pela produção de etanol pode ser significativamente melhorado por aplicação de pressões sub-letais ao processo.

Mais recentemente, **Mota et al. (2015)** investigaram a produção de iogurte probiótico sob pressão, a 5, 15, 30, 50, 75 e 100 MPa, a 43 °C. Os resultados mostraram que a AP teve um efeito inibitório na fermentação ácido-láctica uma vez que, quanto maior a pressão aplicada, menor o consumo de substrato e a formação de produto. A 100 MPa não ocorreu fermentação, indicando que as LAB tinham sido inibidas e/ou inativadas a esta pressão. No entanto, quando a fermentação foi realizada a 5 MPa, a viabilidade das estirpes bacterianas não foi comprometida, bem como a sua capacidade de produzir iogurte. Para além destes resultados, os autores verificaram que, após um tratamento com pressões de 75 ou 100 MPa durante 180 minutos, as estirpes mantiveram-se viáveis e iniciaram o processo fermentativo

quando posteriormente foram submetidas à pressão atmosférica. Estes resultados indicam que, apesar de a fermentação ter sido inibida a 75 e a 100 MPa, não ocorreu a inativação das estirpes nestas condições. Desta forma, pode abrir-se a possibilidade de utilização da pressão como um interruptor *on/off* da fermentação láctica, similar ao que acontece durante a refrigeração.

Em consequência, pode ser possível isolar estirpes com grande potencial e interesse para a indústria, quer devido a um aumento da resistência às várias condições de processamento, quer devido a um maior rendimento do produto isto para além de outras possibilidades (Mota *et al.*, 2013). Também os estudos publicados até à data nesta área sugerem que é possível conduzir o processo fermentativo sob pressão e obter produtos e processos com diferentes características e funcionalidades (Mota *et al.*, 2015) o que poderá, no futuro, vir a ser de grande interesse para a indústria.

3. Tecnologia de alta pressão aplicada ao kefir

Nos últimos anos, alguns estudos têm sido realizados com o intuito de investigar o efeito da tecnologia de AP na microflora dos grãos de kefir, bem como na população bacteriana das culturas *starter* liofilizadas (Tabela 3). Também tem sido estudada a aplicação da AP após a fermentação, tendo como principal objetivo aumentar o tempo de prateleira do kefir (Sarkar, 2008) que normalmente varia entre 8 e 10 dias quando armazenado a 3–4 °C (Koroleva, 1988). Mainville *et al.* (2001) reportaram que tratamentos de AP em kefir de 200 MPa, 2 ciclos durante 1,5 segundos e 300 MPa, 3 ciclos durante 1,5 segundos levaram a uma diminuição da população microbiana (nomeadamente, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e leveduras) do produto. Todavia no tratamento a 400 MPa 5 e 30 minutos ocorreu a inativação completa dos microrganismos. Após os tratamentos a integridade das proteínas parecia não ter sido afetada e o produto continuou homogéneo tornando-se visivelmente mais espesso (Mainville *et al.*, 2001). Num outro estudo verificou-se que a exposição do kefir a pressões entre 200–1000 MPa durante 15 minutos, o número de microrganismos viáveis diminuiu, sendo esta diminuição mais acentuada com o aumento da pressão aplicada, tendo a perda de viabilidade ocorrido mais rapidamente para *Lactobacillus* do que para *Streptococcus* (Krzyżewska *et al.*, 2002). Já os tratamentos entre 400–800 MPa durante 15 minutos induziram a inativação completa das leveduras. Para além disto, o prolongamento do tempo de pressurização para 180 minutos a 400 MPa não

causou a inativação completa das bactérias acidificantes. Neste caso, observou-se até um pequeno aumento da acidez do kefir após o processamento, que foi mais acentuado com o aumento da pressão aplicada (**Reps *et al.*, 2002**).

Também têm sido reportados na literatura estudos sobre o efeito desta tecnologia antes do processo fermentativo quando aplicada aos microrganismos responsáveis pela fermentação. **Reps *et al.* (2002)** mostraram que, com o aumento da pressão aplicada à microflora do kefir (400 – 800 MPa durante 30 minutos), a sua atividade de acidificação do leite diminuiu gradualmente. Em culturas *starter* de kefir, a aplicação de AP (500 MPa durante 15 minutos) promoveu uma diminuição da carga de *Lactococcus* e *Lactobacillus*, sendo estas últimas mais sensíveis à pressão. Verificou-se ainda que os microrganismos isolados (*Lactococcus* e *Lactobacillus*) perderam a atividade antibacteriana tendo também ocorrido uma diminuição da capacidade de utilização de lactose por *Lactobacillus* (**Jankowska *et al.*, 2003**).

Assim, uma vez que ocorreu a perda de viabilidade das estirpes fermentativas, bem como de atividade antibacteriana do produto, o seu valor probiótico e terapêutico terá sido reduzido e, portanto, a aplicação do tratamento de AP em kefir teria que ser otimizada, de modo a prolongar o tempo de prateleira do produto sem comprometer as características do produto final.

Tabela 3. Estudos do efeito da tecnologia de alta pressão (AP) na microflora do kefir, antes e após o processo de fermentação.

Objetivo	Condições	Resultados	Referências
Efeito da AP na microflora do kefir, após a fermentação	200 MPa/ 2ciclos/ 1,5 s, 300 MPa/ 3 ciclos/ 1,5 s 400 MPa/ 5 e 30 min	Redução da população bacteriana Ausência de população microbiana	Mainville <i>et al.</i> (2001)
Efeito de AP na microflora do kefir, antes e após a fermentação	400 – 800 MPa/ 30 min (Antes) 400 – 800 MPa/15 min (Após)	Aumento da pressão, diminuição da atividade de acidificação Redução considerável da população microbiana; Ausência de leveduras; Aumento da pressão, aumento do pH	Reps <i>et al.</i> (2002)
Efeito da AP nos grãos de kefir, após a fermentação	200 – 1000 MPa /15 min	Aumento da pressão, redução da população microbiana; Ausência de leveduras; pH inalterável a partir de 600 MPa	Krzyżewska <i>et al.</i> (2002)
Efeito da AP em culturas <i>starter</i> de kefir, antes da fermentação	500 MPa/15 min	Redução da população de <i>Lactococcus e Lactobacillus</i> ; Aumento do pH; Diminuição da acidez titulável; Diminuição da produção de aroma; Diminuição da atividade antibacteriana	Jankowska <i>et al.</i> (2003)

II. Objetivo do Trabalho

Devido à inexistência de estudos na literatura relativos ao efeito combinado da pressão e da temperatura em qualquer processo fermentativo, o principal objetivo deste trabalho teve por base o estudo do efeito combinado da pressão (em níveis sub-letais) e da temperatura durante a fermentação de kefir, principalmente ao nível da cinética de fermentação.

Para alcançar os objetivos pretendidos, a fermentação foi realizada a várias combinações de pressão e de temperatura, para deste modo verificar o efeito na cinética de produção de kefir. Para monitorizar o processo fermentativo, foram medidos vários parâmetros ao longo do tempo, tais como: o pH, a acidez titulável e a concentração de açúcares redutores. Quantificou-se ainda a concentração dos isómeros D e L do ácido láctico, do etanol e do acetaldeído do produto. Por último, foram calculados vários parâmetros cinéticos, tais como, a taxa de consumo de substrato (r_s), a taxa de formação de produto (r_p), o rendimento ($Y_{P/S}$), o volume de ativação (V_a) e a energia de ativação (E_a), com o intuito de determinar o efeito da pressão e da temperatura na velocidade do processo fermentativo de kefir.

III. Materiais e Métodos

1. Produção de kefir

1.1. Preparação da amostra

Para a produção de kefir utilizou-se leite gordo em pó, instantâneo comercial (Nestlé, Portugal) reconstituído a 10% e posteriormente pasteurizado a 90 °C, durante 20 minutos. Seguidamente, o leite foi inoculado com as culturas de kefir liofilizadas (Vital-Fermente – Kefir, A. Vogel, Suíça, Distribuído por Natiris, Portugal) (**Figura 10**) numa proporção de 0,7 g para 1 L de leite, conforme indicado no rótulo. De acordo com o fornecedor, este inóculo é composto por uma mistura de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremosis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremosis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* e *Saccharomyces unisporus*.



Figura 10. Embalagem das culturas de kefir liofilizadas.

Após a inoculação em assepsia, a amostra foi homogeneizada e embalada em sacos de poliamida/polietileno (PA/PE – Albipack-Packaging Solutions, Portugal), previamente esterilizados por irradiação com luz UV durante 15 minutos. Os sacos foram selados manualmente de modo a retirar, tanto quanto possível, o ar do interior dos mesmos. Cada dois sacos, contendo leite inoculado, foram depois inseridos num segundo saco que foi selado sob vácuo. Todo o processo foi realizado numa câmara de fluxo laminar (BioSafety Cabinet Telstar Bio II Advance, Espanha) em condições de assepsia.

1.2. Fermentação sob pressão

A fermentação foi realizada à temperatura ambiente (16,10 – 18,00 °C) (ver Anexo I) durante 28 horas, sob diferentes condições de pressão (7, 15, 30 e 50 MPa). As experiências foram efetuadas no equipamento SFP FPG13900 (Stansted Fluid Power Ltd, Essex, UK). Este equipamento é constituído por 3 vasos, cada vaso de pressão com 37 mm de diâmetro e 52 cm de altura, utilizando como fluido de pressurização uma mistura de propilenoglicol e

água (40:60). Mais tarde, realizaram-se novos ensaios, nos quais a fermentação foi realizada a 25 e a 32 °C (15 e 50 MPa) durante 72 e 32 horas, respetivamente. Estes ensaios foram realizados no equipamento High pressure system U33 (Institute of High Pressure Physics, Polónia). Este equipamento possui um vaso de pressão com 35 mm de diâmetro e 100 mm de altura, rodeado por uma camisa de termostatização externa, ligada a um banho termostático (Huber Compatible Control CC1, USA) utilizando também, como fluido de pressurização, a mistura de propilenoglicol e água (40:60). Como controlo, a fermentação foi realizada à pressão atmosférica (0,1 MPa) e os sacos foram imersos no mesmo fluido de pressurização, à temperatura correspondente, com ausência de luz, de forma a mimetizar as condições da fermentação realizada sob pressão. Durante o processo de fermentação, foram retiradas várias amostras ao longo do tempo, tendo sido posteriormente congeladas a -20 °C, de modo a parar a fermentação. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

2. Caracterização do kefir

2.1. pH e acidez titulável

O pH é um parâmetro que determina o ponto final do processo fermentativo e por isso, é um parâmetro importante para a produção de kefir (**Chandan *et al.*, 2006**). Deste modo, o valor de pH do kefir produzido foi medido a $\pm 22,3$ °C utilizando um eléctrodo de vidro (pH electrode 50 14, Crison Instruments, S. A., Espanha), calibrado com tampões, a pH 4,01 e pH 7,00. As leituras foram efetuadas em quadruplicado para cada amostra, submergindo diretamente o eléctrodo na amostra de kefir homogeneizada.

A acidez titulável é outro parâmetro importante a ter em conta durante a produção de leites fermentados (**Chandan *et al.*, 2006**), nomeadamente na produção de kefir. Este é um parâmetro adicional ao pH, uma vez que quantifica os ácidos produzidos durante a fermentação e é expresso em ácido láctico. Para a sua quantificação as amostras de kefir foram analisadas utilizando um Titromatic 1S (Crison Instruments, S. A., Espanha), de acordo com **Chandan *et al.* (2006)** com algumas modificações, titulando 12 mL de kefir diluído (1,50 mL de kefir em 10,5 mL de água destilada). As amostras foram tituladas com uma solução de hidróxido de sódio de 0,1 N até ao pH de 8,9. As leituras foram efetuadas em duplicado para cada amostra e os resultados obtidos foram expressos em mg de ácido láctico/g de kefir.

2.2. Clarificação da amostra

De forma a não haver interferências das partículas do kefir nas análises físico-químicas que envolvem a quantificação de densidades óticas, procedeu-se à clarificação das amostras, tal como é descrito a seguir. Pesou-se aproximadamente 1 g de kefir, para um frasco contendo 60 mL de água destilada, que foi colocado num banho a 50 °C durante 15 minutos. Posteriormente transferiu-se essa mistura para um balão volumétrico de 100 mL, ao qual se adicionou as seguintes soluções tendo-se misturado após cada adição: 2 mL de solução de Carrez I (3,60 g de hexacianoferrato de potássio (II) ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) em 100 mL de água destilada), 2 mL de solução de Carrez II (7,20 g de sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) em 100 mL de água destilada) e 4 mL de solução de NaOH (100 mM). Ajustou-se o volume até aos 100 mL com água destilada homogeneizou-se e efetuou-se uma filtração, recorrendo a filtros Whatman, No1.

2.3. Concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores é um dos parâmetros que ajuda na monitorização da fermentação uma vez que nos indica o consumo de substrato durante o processo fermentativo. A análise da concentração de açúcares redutores presentes no kefir foi realizada aplicando o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) descrito por **Miller (1959)**.

Para a preparação do reagente de DNS, pesaram-se 10 g de DNS e dissolveram-se em 200 mL de uma solução de NaOH de 2 N, com aquecimento e agitação intensa. Simultaneamente, preparou-se uma solução de 300 g de tartarato de potássio em 500 mL de água destilada, com aquecimento e agitação intensa. Por fim, misturam-se as duas soluções com agitação e adicionou-se água destilada até perfazer 1 L.

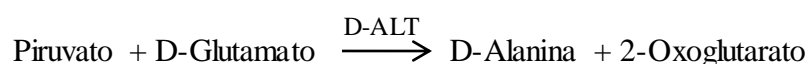
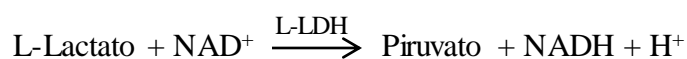
Para a determinação da concentração de açúcares redutores, 1,0 mL de reagente de DNS foi adicionado a 1,0 mL de amostra clarificada, agitado no vortex e colocado num banho de água a ferver durante 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi colocada em gelo (para terminar a reação) e diluída com 10 mL de água destilada. Por último, efetuou-se a leitura da absorvância a 540 nm, em quadruplicado para cada um dos tempos de fermentação, no espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). A concentração de açúcares redutores foi calculada utilizando uma curva de

calibração (ver Anexo II) preparada previamente com soluções entre 0,0 – 1,0 g/L (**Equação 1**) e os resultados foram expressos em mg de açúcares redutores/g de kefir.

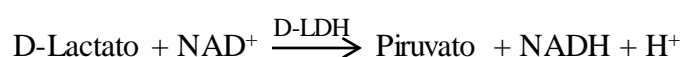
$$\text{Abs (540 nm)} = 0,524 (\text{Glucose}) - 0,027 \quad R^2 = 0,997 \quad \text{Equação 1}$$

2.4. Concentração de ácido láctico

A concentração de ácido láctico foi medida utilizando o kit enzimático D-/L-ácido láctico (AK00141) da NZYTech, Lda – Genes and Enzymes, Portugal, de acordo com as instruções do fabricante e adaptado para uso em microplacas. O princípio do método para a determinação de L-ácido láctico é descrito pelas seguintes reações (NZYTech, 2016).



Assim, a quantidade de NADH foi medida a 340 nm através da ação combinada das enzimas L-lactato desidrogenase (L-LDH) e D-alanina aminotransferase (D-ALT). Já a determinação de D-ácido láctico requer um conjunto semelhante de reações, no entanto, a oxidação do NAD^+ é catalisada pela D-lactato desidrogenase (D-LDH), como se segue [137]:



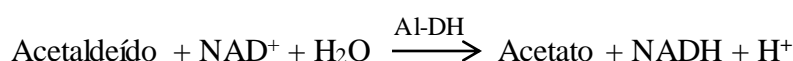
As concentrações de L-ácido láctico (**Equação 2**) e de D-ácido láctico (**Equação 3**) foram calculadas utilizando as respetivas curvas de calibração (ver Anexo II) preparadas previamente com soluções entre 0,0 – 0,3 g/L, usando a solução padrão incluída no kit e os resultados foram expressos em mg de L-ácido láctico ou D-ácido láctico/g de kefir.

$$\text{Abs (340 nm)} = 1,813 (\text{L-ácido láctico}) - 0,007 \quad R^2 = 0,999 \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Abs (340 nm)} = 1,713 (\text{D-ácido láctico}) - 0,020 \quad R^2 = 0,993 \quad \text{Equação 3}$$

2.5. Concentração de etanol

A concentração de etanol foi medida utilizando o kit enzimático Etanol (AK00061) da NZYTech, Lda – Genes and Enzymes, Portugal, de acordo com as instruções do fabricante e adaptado para uso em microplacas. O princípio do método para a determinação de etanol é descrito pelas seguintes reações (NZYTech, 2016):



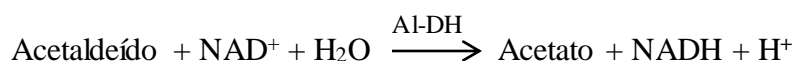
A quantidade de NADH formada através da ação combinada das enzimas ADH e Al-DH foi medida a 340 nm, uma vez que é o dobro da quantidade de etanol na amostra (NZYTech, 2016).

A concentração de etanol foi calculada utilizando uma curva de calibração (ver Anexo II) preparada previamente com soluções entre 0,00 – 0,12 g/L (**Equação 4**), usando a solução padrão incluída no kit e os resultados foram expressos em mg de etanol/g de kefir.

$$\text{Abs (340 nm)} = 2,079 (\text{Etanol}) - 0,217 \quad R^2 = 0,986 \quad \text{Equação 4}$$

2.6. Concentração de acetaldeído

A concentração de acetaldeído foi medida utilizando o kit enzimático Acetaldeído (AK00051) da NZYTech, Lda – Genes and Enzymes, Portugal, de acordo com as instruções do fabricante e adaptado para uso em microplacas. O princípio do método para a determinação do acetaldeído é descrito pela seguinte reação (NZYTech, 2016):



A quantidade de NADH formada através da ação da enzima Al-DH foi medida a 340 nm, uma vez que é diretamente proporcional à quantidade de acetaldeído na amostra (NZYTech, 2016).

A concentração de acetaldeído foi calculada utilizando uma curva de calibração (ver Anexo II) preparada previamente com soluções entre 0,0 – 0,4 g/L (**Equação 5**), usando a solução padrão incluída no kit e os resultados foram expressos em mg de acetaldeído/g de kefir.

$$\text{Abs (340 nm)} = 0,847 (\text{Acetaldeído}) - 0,010 \quad R^2 = 0,998 \quad \text{Equação 5}$$

2.7. Parâmetros cinéticos da fermentação

Os parâmetros cinéticos da fermentação determinados foram a taxa de consumo de substrato, r_s , (mg/g.h), a taxa de formação de produto, r_p , (mg/g.h) e o rendimento da fermentação, $Y_{P/S}$, (mg de produto formado/mg de substrato consumido), conforme descrito por (**Shuler and Kargil, 2002**), sendo o procedimento usado apresentado com mais detalhe em anexo (ver Anexo IV).

2.8. Cálculo do volume de ativação

As constantes de velocidade (k) para a diminuição do pH e da concentração de açúcares redutores e para o aumento da acidez titulável e da concentração de L-ácido láctico, ao longo do tempo, foram calculadas para os diferentes valores de pressão, utilizando 5 pontos, sendo o procedimento descrito mais detalhadamente em anexo (ver Anexo V). Estes valores foram usados para estimar o volume de ativação (V_a) utilizando a forma linear da Lei de Eyring de acordo com a **Equação 6**:

$$\ln(k) = \ln(A) - V_a \times \frac{p}{R \times T} \quad \text{Equação 6}$$

onde k é a constante de velocidade (h^{-1}), A é uma constante, V_a é o volume de ativação ($\text{cm}^3/\text{mol}^{-1}$), p é a pressão (MPa), R é a constante universal dos gases ($8.314 \text{ cm}^3 \cdot \text{MPa}/\text{K} \cdot \text{mol}$) e T é a temperatura absoluta (K).

2.9. Cálculo da energia de ativação

As constantes de velocidade (k) para a diminuição do pH e para o aumento da acidez titulável, ao longo do tempo, foram calculadas para os diferentes valores de temperatura,

utilizando 3 pontos, sendo o procedimento descrito mais detalhadamente em anexo (ver Anexo VI). Estes valores foram usados para estimar a energia de ativação (E_a) utilizando a forma linear da Equação de Arrhenius de acordo com a **Equação 7**:

$$\ln(k) = \ln(A) - E_a \times \frac{1}{R \times T} \quad \text{Equação 7}$$

onde k é a constante de velocidade (h^{-1}), A é uma constante, E_a é a energia de ativação (kJ/mol), R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J/K.mol}$) e T é a temperatura absoluta (K).

3. Análise estatística

Recorrendo ao software Statistica 7, as diferenças entre os resultados obtidos para as diferentes condições de pressão em cada um dos tempos de fermentação, foram testadas a um nível de significância de 5%. Os efeitos do nível de pressão foram testados com uma análise unidirecional de variância (ANOVA), seguida por um teste de comparações múltiplas (Tukey HSD) para identificar as diferenças entre amostras com o mesmo tempo de fermentação a diferentes pressões.

IV. Resultados e Discussão

1. Efeito da alta pressão na produção de kefir

1.1. Produção de kefir à temperatura ambiente

Na primeira parte deste trabalho, analisou-se a fermentação sob diferentes condições de pressão (7, 15, 30 e 50 MPa), através da monitorização de parâmetros físico-químicos, como o pH, a acidez titulável e a concentração de açúcares redutores. Em todos os ensaios realizados utilizou-se uma amostra controlo, ou seja, uma amostra fermentada à pressão atmosférica (0,1 MPa) e os resultados apresentados como "0,1 MPa" foram obtidos a partir do cálculo da média de todos os controlos realizados (ver em Anexo I). A análise estatística foi efetuada para os resultados obtidos a diferentes condições de pressão, de forma a verificar a significância das diferenças entre as amostras fermentadas a diferentes pressões. Os resultados obtidos são apresentados no Anexo III – secção 1a.

O pH é um parâmetro que está diretamente relacionado com a produção de ácidos durante o processo de fermentação que resulta na diminuição do pH ao longo do processo de produção de kefir até valores entre $\approx 4,2$ e $4,6$ (Ogles and Cagindi, 2003). Na produção industrial de kefir o processo de fermentação ocorre mais rapidamente (10 – 12 horas) e as temperaturas utilizada são mais elevadas ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Wszolek *et al.*, 2007), comparativamente com o presente estudo ($\approx 17,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 horas).

A **Figura 11** apresenta os resultados obtidos para a variação de pH em função do tempo de fermentação para as diferentes condições de pressão testadas (0,1, 7, 15, 30 e 50 MPa), durante 28 horas à temperatura ambiente. À pressão atmosférica (0,1 MPa) verificou-se uma diminuição gradual do pH ao longo do tempo, sendo esta diminuição mais acentuada comparativamente com as restantes pressões testadas. À pressão atmosférica, o valor de pH característico do kefir ($\text{pH } 4,41 \pm 0,03$) foi atingido ao fim de 24 horas de fermentação. A partir das 24 horas, o valor de pH começou a estabilizar, sofrendo apenas uma pequena variação ($4,35 \pm 0,04$).

Na **Figura 11**, observa-se ainda que, com o aumento da pressão, ocorreu uma variação de pH mais lenta, ou seja, uma menor velocidade de fermentação, o que vai de encontro aos resultados obtidos por Mota *et al.* (2015) no estudo de produção de iogurte probiótico sob pressão. No entanto, um outro estudo (Picard *et al.*, 2007) revela que a fermentação realizada pela levedura *S. cerevisiae* sob pressão, a 5 e 10 MPa, promoveu o aumento da velocidade de fermentação e do rendimento da reação, relativamente ao observado à pressão

atmosférica. Porém, o mesmo comportamento não se verificou neste estudo em particular, o que provavelmente se deveu à utilização de diferentes estirpes de leveduras, bem como à presença de outros microrganismos no inóculo, como as bactérias ácido-láticas.

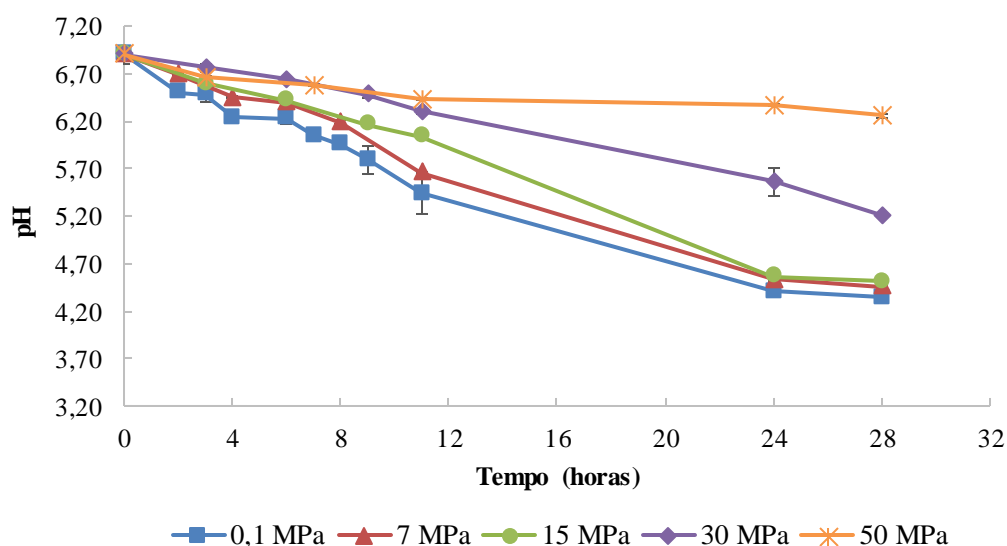


Figura 11. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

Os resultados obtidos mostraram que na fermentação a 7 e a 15 MPa, a variação de pH foi ligeiramente mais baixa do que a 0,1 MPa, sendo, no entanto, possível produzir-se kefir igualmente ao fim de 24 horas de fermentação. Comparando as amostras fermentadas a 7 e 15 MPa, observou-se que durante as primeiras 9 horas de fermentação não ocorreram grandes diferenças na variação de pH, no entanto, a 7 MPa ao fim de 11 horas o pH foi significativamente mais baixo ($p < 0,05$). Para além disso, a fermentação sob estas condições de pressão permitiu a produção de kefir após 24 horas, não se tendo verificado diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de pH a 7 MPa ($\text{pH} = 4,53 \pm 0,02$) e a 15 MPa ($\text{pH} = 4,57 \pm 0,03$). No entanto, estes valores de pH são ambos significativamente mais elevados ($p < 0,05$) do que o observado a 0,1 MPa ($\text{pH} = 4,41 \pm 0,03$). Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por **Bothun et al. (2004)**, uma vez que os autores também observaram que *Clostridium thermocellum* conseguiu utilizar material celulósico para a produção de etanol quando a fermentação foi realizada a 7 MPa. Todavia, no estudo da produção de iogurte (**Mota et al., 2015**) conseguiram produzir iogurte a 5 MPa, tendo, no entanto, sido necessário aumentar o tempo de fermentação, comparativamente com a fermentação a 0,1 MPa. Assim,

é importante salientar que neste trabalho, para se produzir kefir a 7 e a 15 MPa, não foi necessário estender o tempo de fermentação, o que poderá ser explicado pela utilização de um inóculo com uma variedade de microrganismos, que no seu conjunto responderam de maneira diferente à pressão, ou pelo menos conseguiram minimizar o efeito da pressão na velocidade de fermentação.

Na fermentação a 30 e a 50 MPa (**Figura 11**), verificou-se que a variação de pH foi bastante mais lenta do que a 0,1 MPa. A estas pressões observou-se um pH final mais elevado comparativamente com as outras pressões testadas (0,1, 7 e 15 MPa) o que indica que a AP reduziu a velocidade de fermentação sendo esta redução maior quanto maior a pressão aplicada. Além disso, durante as primeiras 11 horas de fermentação, a estas duas pressões, não se verificaram diferenças significativas nos valores de pH ($p > 0,05$), podendo estes resultados sugerir que ao fim de 11 horas os microrganismos não teriam ainda conseguido adaptar-se à pressão a que estavam sujeitos. No entanto, às 24 e 28 horas de fermentação, o pH a 30 MPa ($\text{pH} = 5,57 \pm 0,15$ e $\text{pH} = 5,21 \pm 0,01$) foi significativamente mais baixo do que a 50 MPa ($\text{pH} = 6,37 \pm 0,01$ e $\text{pH} = 6,26 \pm 0,02$), não se tendo verificado a produção de kefir a ambas as pressões. Contudo, provavelmente seria possível produzir kefir a estas duas pressões se se tivesse aumentado o tempo de fermentação. Mais uma vez estes resultados estão de acordo com os obtidos por **Mota et al. (2015)** sendo que, para o iogurte, a diminuição da velocidade de fermentação parece não ter sido tão acentuada como a observada para o kefir, o que poderá dever-se à diferente composição do inóculo. Relativamente à fermentação a 30 MPa, o facto de ter ocorrido alguma fermentação a esta pressão poderá eventualmente dever-se a uma possível adaptação pelas leveduras presentes no inóculo, tal como foi reportado por **Iwahashi et al. (2005)**, que observaram que quando a levedura *S. cerevisiae* foi exposta a uma pressão de 30 MPa ocorreu uma *up-regulation* de genes envolvidos na categoria de resposta ao *stress* e no metabolismo dos hidratos de carbono (**Iwahashi et al., 2005**). No caso da fermentação a 50 MPa, a diminuição da velocidade de fermentação poderá ser explicada pelo facto de a atividade das enzimas envolvidas na via glicolítica serem progressivamente inibidas com o aumento da pressão. Em particular a enzima fosfofrutocinase (uma enzima chave na glicólise e sensível ao pH) é inibida devido ao facto de a pressão causar a acidificação a aproximadamente 50 MPa (**Abe and Horikoshi, 1995, Abe and Horikoshi, 1997, Hofmann and Kopperschlager, 1982**),

podendo eventualmente esta acidificação ser um fator de inibição na fermentação de kefir a 50 MPa.

Assim sendo, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com o reportado na literatura sobre o efeito da AP nos microrganismos, uma vez que pressões entre 20 – 130 MPa poderão causar a inibição do crescimento dos microrganismos (Abee and Wouters, 1999). Neste caso em concreto, verificou-se que a 7 e a 15 MPa ocorreu a fermentação, culminando com a produção de kefir ao fim de 24 horas. No entanto a 30 MPa apesar de ter ocorrido uma diminuição da velocidade de fermentação, o efeito inibitório poderá ter sido menor do que o efeito de adaptação, e desta forma os microrganismos poderão ainda ter uma boa capacidade fermentativa. Por sua vez, a pressão de 50 MPa poderá ser muito alta e os microrganismos poderão não se conseguir adaptar.

A acidez titulável é um outro parâmetro de interesse no processo de fermentação de kefir que traduz a quantidade total de ácidos produzidos durante o processo de fermentação. A variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação sob diferentes condições de pressão está representado na **Figura 12** e foi expressa em concentração de ácido láctico (mg ácido láctico/g de kefir).

Os resultados obtidos para este parâmetro estão em consonância com os resultados apresentados anteriormente para a variação de pH (**Figura 11**), com exceção dos resultados obtidos para as amostras fermentadas a 15 MPa. Analisando a fermentação a 0,1 MPa observa-se um aumento da concentração de ácido durante as primeiras 28 horas de fermentação, variando de $3,308 \text{ mg/g} \pm 0,088$ para $8,014 \text{ mg/g} \pm 0,417$. A fermentação realizada a 7 MPa exibe um perfil semelhante ao observado a 0,1 MPa durante as primeiras 11 horas de fermentação. Ao fim de 24 horas a 7 MPa ($8,079 \text{ mg/g} \pm 0,108$) ocorreu um ligeiro aumento da concentração de ácido comparativamente com a fermentação à pressão atmosférica ($7,530 \text{ mg/g} \pm 0,390$), não representando, no entanto, uma diferença significativa ($p > 0,05$) entre ambas as amostras.

Por um lado, comparando a fermentação controlo com as fermentações a 7, a 15 e a 30 MPa, foi possível concluir que durante as primeiras 6 horas de fermentação não se verificaram diferenças significativas na concentração de ácido ($p > 0,05$). Por outro lado, com o aumento da pressão de 15 para 50 MPa verificou-se uma diminuição da produção de ácido. Apesar de o pH a 15 MPa (**Figura 11**) se ter mostrado significativamente mais baixo do que a 30 MPa, o mesmo não se verifica para a concentração de ácido, uma vez que as

fermentações a estas pressões apresentaram um perfil semelhante. Uma possível explicação para estes resultados poderá ser o facto de a 15 MPa, eventualmente, se terem produzido ácidos cujos pKas poderão ser superiores ao pH final do kefir, conduzindo assim a esta diferença nos resultados obtidos para o pH (**Figura 11**) e para a acidez titulável.

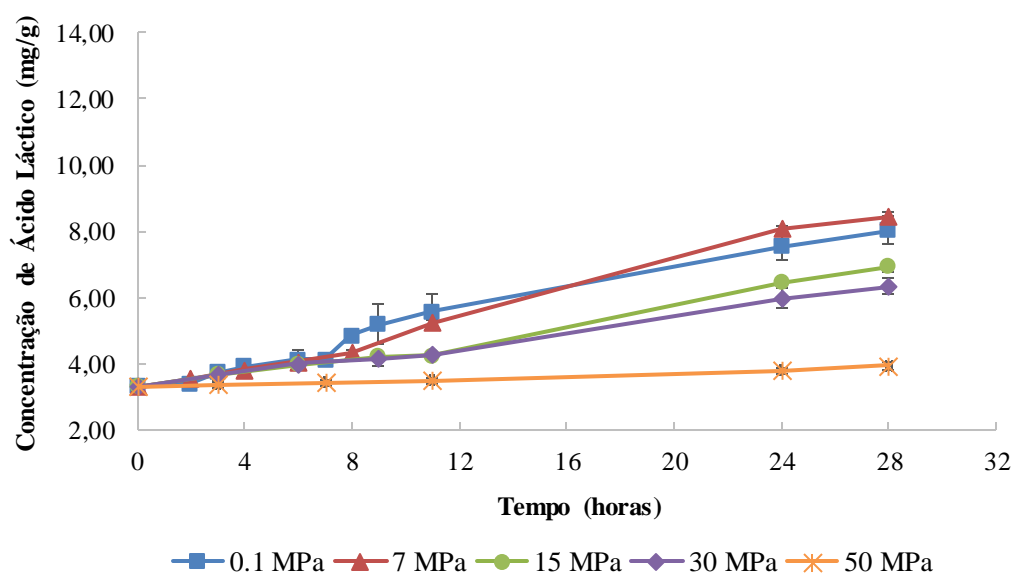


Figura 12. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

Na fermentação a 50 MPa a concentração de ácido pouco variou ao longo do tempo (de $3,308 \text{ mg/g} \pm 0,103$ a $3,925 \text{ mg/g} \pm 0,095$), tendo-se observado um ligeiro aumento da concentração de ácido ao fim das 28 horas de fermentação. Estes resultados suportam os resultados obtidos para a variação de pH (**Figura 11**), o que confirma que a esta pressão ocorreu uma diminuição da velocidade de fermentação. Resultados semelhantes foram obtidos para a produção de iogurte probiótico (**Mota et al., 2015**) contudo, no presente estudo observou-se menor variação da concentração de ácido com o aumento da pressão.

Para além dos parâmetros anteriormente discutidos, quantificou-se também a concentração de açúcares redutores, que é indicativa do consumo de substrato ao longo do processo fermentativo e foi expressa em mg de açúcares redutores/g de kefir.

Analisando a **Figura 13**, observa-se que durante as primeiras 7 horas de fermentação não existiram diferenças significativas ($p > 0,05$) na concentração de açúcares redutores entre as amostras fermentadas a diferentes pressões. Além disso, observa-se que com o aumento

da pressão, foi menor o consumo de substrato ao fim de 28 horas de fermentação, indicando assim que o aumento da pressão levou a uma diminuição da taxa de fermentação.

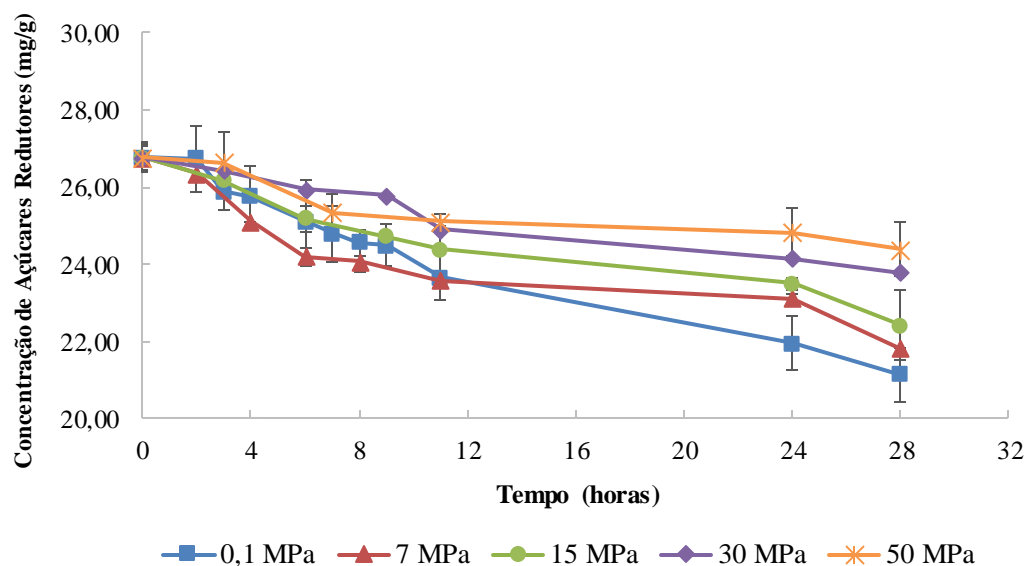


Figura 13. Variação da concentração de açúcares redutores (mg de açúcares redutores/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

No caso da fermentação a 7 MPa (**Figura 13**), ocorreu um maior consumo de substrato nas primeiras horas de fermentação comparativamente com a fermentação controlo, contudo esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$). A partir das 11 horas de fermentação, observou-se um maior consumo de substrato na fermentação controlo, relativamente à fermentação a 7 MPa. Ao fim de 28 horas de fermentação não se verificaram diferenças ($p > 0,05$) entre as amostras a 0,1 MPa ($21,135 \text{ mg/g} \pm 0,712$) e a 7 MPa ($21,826 \text{ mg/g} \pm 0,336$), estando este resultado de acordo com os obtidos anteriormente para a formação de produto (**Figura 12**). Nas primeiras horas de fermentação, o consumo de substrato a 15 MPa foi menos acentuado do que a 7 MPa, no entanto, a partir das 11 horas de fermentação não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$) sob estas condições de pressão (7 e 15 MPa). Contudo, nas últimas horas o perfil de consumo de açúcares a 15 MPa assemelhou-se ao observado para a fermentação a 7 MPa.

As fermentações realizadas a 30 e a 50 MPa foram, respetivamente, as que apresentaram um menor consumo de substrato o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente para o pH (**Figura 11**) e para a acidez titulável (**Figura 12**). A análise estatística, permitiu verificar que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) no consumo

de substrato a ambas as pressões. Como referido anteriormente, a 50 MPa verificou-se que a concentração de ácido (**Figura 12**) pouco variou, mas, por outro lado, houve maior variação da concentração de açúcares redutores, indicando que estes açúcares poderão estar a ser utilizados em diferentes processos metabólicos (não envolvidos na fermentação ácido-láctica). Assim, os microrganismos poderão estar a consumir os açúcares redutores, como uma tentativa de adaptação à pressão, nomeadamente para produção de moléculas de resposta ao *stress*. Este aspeto poderá estar de acordo com os resultados obtidos por **Bravim et al. (2013)** que verificaram que, quando a *S. cerevisiae* foi sujeita um tratamento de 50 MPa, ocorreu uma *up-regulation* de genes relacionadas com transportadores de hexoses e genes que codificam enzimas glicolíticas.

1.1.1. Cálculo de parâmetros cinéticos da fermentação

Para uma análise mais completa do efeito da pressão na fermentação, efetuou-se o cálculo dos seguintes parâmetros cinéticos: taxa de consumo de substrato (r_s), taxa de formação de produto (r_p) e rendimento ($Y_{P/S}$) (ver Anexo IV).

A **Tabela 4** apresenta as taxas de consumo de substrato calculadas para cada uma das condições de fermentação (0,1, 7, 15, 30 e 50 MPa).

Tabela 4. Taxas de consumo de substrato, r_s (mg/g.h), para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) e os respetivos R^2 .

Pressão (MPa)	$C_{\text{substrato}}$ vs. Tempo	
	$ m = r_s$ (mg/g.h)	R^2
0,1	0,291	0,97
7	0,311	0,92
15	0,222	0,98
30	0,105	0,95
50	0,077	0,81

Analisando a **Tabela 4** observa-se que, com o aumento da pressão para 15, 30 e 50 MPa, ocorreu uma diminuição do consumo de substrato. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente (**Figuras 11 e 13**), uma vez que a aplicação destes níveis de pressão promoveu um menor consumo do substrato disponível. No entanto, a 7 MPa verificou-se que o consumo de substrato foi ligeiramente maior do que à pressão atmosférica,

uma vez que o efeito inibitório parece ser menor do que o efeito de adaptação e por isso quando se aumentou a pressão até 7 MPa, os microrganismos conseguiram realizar a fermentação.

Na **Tabela 5** são apresentadas as taxas de produção de produto para cada uma das fermentações (0,1, 7, 15, 30 e 50 MPa).

Tabela 5. Taxas de formação de produto, r_p (mg/g.h), para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) e os respetivos R^2 .

Pressão (MPa)	$C_{\text{produto vs. Tempo}}$	
	$ m = r_p$ (mg/g.h)	R^2
0,1	0,177	0,98
7	0,197	0,99
15	0,133	0,98
30	0,111	0,99
50	0,021	0,98

Examinando a **Tabela 5** observa-se que tal como para a taxa de consumo de substrato (**Tabela 4**), a taxa de formação de produto diminuiu com o aumento da pressão de 15 para 50 MPa. Por outro lado, na fermentação a 7 MPa a taxa de formação de produto foi a maior comparativamente com as restantes pressões, o que está de acordo com o obtido para a taxa de consumo de substrato.

A **Tabela 6** apresenta o rendimento calculado para cada uma das condições de fermentação (0,1, 7, 15 e 30 MPa).

Tabela 6. Rendimento, $Y_{P/S}$ (mg de produto formado/mg de substrato consumido) da fermentação para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) e os respetivos R^2 .

Pressão (MPa)	$C_{\text{produto vs. } C_{\text{substrato}}}$	
	$ m = Y_{P/S}$ (mg de produto formado/mg de substrato consumido)	R^2
0,1	0,874	0,97
7	1,066	0,75
15	0,877	0,87
30	0,969	0,91
50	0,217	0,73

Observando a **Tabela 6** é possível verificar que a fermentação que apresentou o maior rendimento foi a fermentação realizada a 7 MPa, no entanto, esta determinação poderá estar afetada de um erro superior, dado apresentar um R^2 mais pequeno (0,75), logo poderá haver uma maior incerteza na sua determinação. Para além disso, a fermentação a 0,1 MPa foi a que apresentou o menor rendimento relativamente às pressões de 7, 15 e 30 MPa. O aumento do rendimento sob AP (7, 15 e 30 MPa), pode corresponder a um mecanismo de adaptação à pressão pelos microrganismos. Por último, a 50 MPa foi a pressão à qual se obteve um rendimento mais baixo, o que está de acordo com os resultados obtidos, uma vez que a esta pressão se observou um maior consumo de substrato, comparativamente com a quantidade de produto produzida.

1.1.2. Monitorização de outros parâmetros físico-químicos importantes na produção de kefir

De forma a compreender melhor os efeitos da AP no processo de produção de kefir foram também analisados outros parâmetros físico-químicos, de modo a quantificar alguns compostos relevantes resultantes do processo de fermentação, tais como o ácido láctico, o etanol e o acetaldeído. Utilizou-se em todos os ensaios a amostra fermentada a 0,1 MPa, como controlo. Os resultados apresentados como "0,1 MPa" foram obtidos a partir do cálculo da média das amostras recolhidas nos vários ensaios. A análise estatística foi efetuada para os resultados obtidos a diferentes condições de pressão, de forma a verificar a significância das diferenças entre as amostras fermentadas a diferentes pressões. Os resultados obtidos são apresentados no Anexo III – secção 1a.

1.1.2.1. Concentração de ácido láctico

O ácido láctico é um dos principais produtos formados durante o processo de fermentação, podendo ser produzido na forma de dois isómeros, o L(+) e o D(-). No kefir, o isómero L(+) do ácido láctico é o ácido orgânico mais abundante, (Alm, 1982, Tamime and Marshall, 1997).

Na **Figura 14** é apresentado o aumento da concentração do L-ácido láctico ao longo do tempo de fermentação.

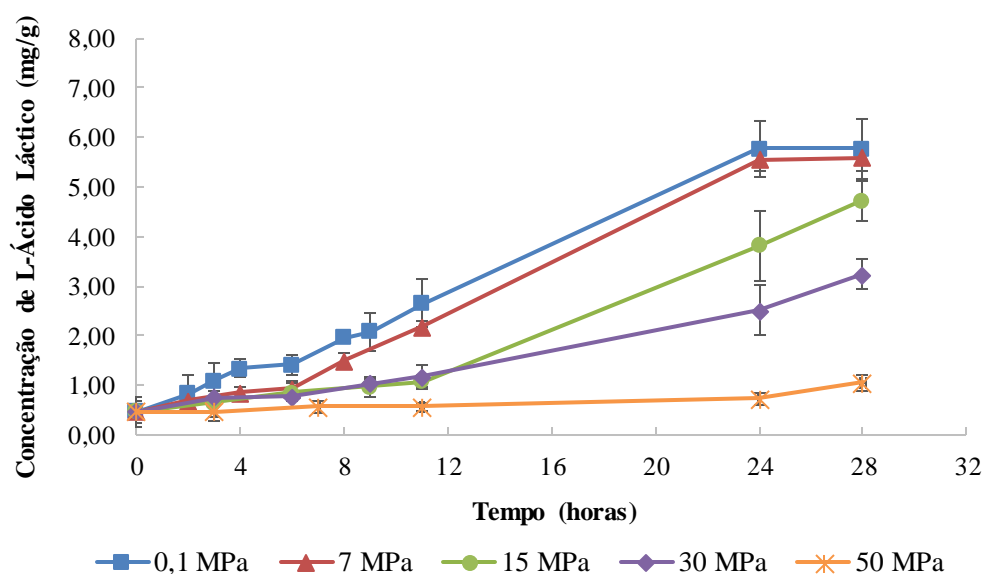


Figura 14. Variação da concentração de L-ácido láctico (mg de L-ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa) à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

Tal como esperado, na fermentação à pressão atmosférica a concentração de L-ácido láctico aumentou ao longo do tempo (de $0,461\text{ mg/g} \pm 0,224$ para $5,777\text{ mg/g} \pm 0,600\text{ mg/g}$). Analisando a **Figura 14**, verifica-se que ocorreu uma maior produção deste isómero durante as primeiras 24 horas de fermentação, o que corresponde ao período de tempo em que ocorreu um superior decréscimo do pH. A partir das 24 horas, a concentração manteve-se constante, estando de acordo com os resultados obtidos anteriormente para o pH (**Figura 11**), nos quais se verificou apenas uma pequena diminuição. No caso da fermentação a 7 MPa verificou-se um comportamento semelhante ao observado na fermentação ocorrida à pressão atmosférica durante as 28 horas de fermentação. Durante as primeiras 24 horas observou-se um aumento da concentração de L-ácido láctico (de $0,461\text{ mg/g} \pm 0,108$ para $5,600\text{ mg/g} \pm 0,293$), sendo que a partir deste ponto de amostragem a concentração estabilizou. Estes resultados estão em consonância com obtidos para o pH e para a acidez titulável (**Figuras 11 e 12**, respetivamente).

No que diz respeito às fermentações a 15 MPa e a 30 MPa, observaram-se concentrações de L-ácido láctico similares entre si ($p > 0,05$) durante as primeiras 11 horas de fermentação. A partir das 11 horas, as concentrações deste isómero aumentaram para ambas as condições testadas, porém, no final da fermentação, as concentrações de L-ácido láctico eram significativamente diferentes a 15 MPa ($4,731\text{ mg/g} \pm 0,407$) e a 30 MPa ($3,244$

mg/g \pm 0,290) ($p < 0,05$). Por último, a concentração de L-ácido láctico a 50 MPa aumentou ligeiramente ao longo do tempo, verificando-se uma maior produção deste ácido entre as 24 e as 28 horas, o que vai no mesmo sentido dos resultados obtidos para o pH e para a acidez titulável (**Figuras 11 e 12**).

Relativamente à outra forma de isómero do ácido láctico, isómero D(-), os resultados obtidos mostraram que as concentrações deste isómero se encontravam abaixo do limite de deteção do método utilizado neste estudo (214 μ g/g) e, portanto, não foi possível determinar a concentração deste ácido.

1.1.2.2. Concentração de etanol

O etanol é outro produto formado durante a fermentação de kefir, particularmente devido ao metabolismo fermentativo das leveduras, no entanto em pequenas quantidades durante a primeira fermentação alcoólica. Uma vez que a fermentação sob pressão pode originar alterações nas vias metabólicas, tal como foi observado anteriormente por **Picard et al. (2007)**, considerou-se que seria interessante quantificar a produção de etanol.

Contudo, não foi possível quantificar o etanol presente nas amostras de kefir, uma vez que as concentrações se encontravam abaixo do limite de deteção do método (93 μ g/g), pois as quantidades deste produto que se formam durante a fermentação (a primeira fermentação alcoólica) são muito baixas.

1.1.2.3. Concentração de acetaldeído

O acetaldeído é normalmente produzido durante a fermentação de kefir e é um dos produtos responsáveis por conferir o sabor e o aroma característicos desta bebida (**Guzel-Seydim et al., 2000**). De modo a verificar se a pressão utilizada causou alterações no processo fermentativo, podendo afetar a produção de acetaldeído pelas bactérias fermentativas, a concentração deste produto foi analisada nas diferentes amostras.

Os resultados obtidos para esta análise mostraram que não foi possível detetar e quantificar o acetaldeído, uma vez que a sua concentração nas amostras se encontrava abaixo do limite de deteção do método (176 μ g/g). No entanto, a literatura reporta estudos nos quais se determinou a concentração deste composto, recorrendo a métodos mais sensíveis, como

por exemplo, a cromatografia em fase gasosa com detetor por ionização de chama (GC-FID) (Beshkova *et al.*, 2003). Com este método determinou-se uma concentração de acetaldéido no kefir (produzido a partir de culturas *starter*) de 18,3 µg/g, sendo que este valor se encontra abaixo do limite de deteção do método utilizado neste trabalho.

1.2. Produção de kefir a 25 e a 32 °C

Após o estudo da cinética de fermentação à temperatura ambiente, decidiu-se estudar o efeito da pressão a diferentes temperaturas de fermentação. Para efetuar este estudo, foram selecionadas duas temperaturas diferentes – 25 e 32 °C – ambas acima da normalmente aplicada na produção industrial de kefir (21 °C), pois temperaturas abaixo da ambiente resultariam num processo fermentativo mais lento, pelo menos à pressão atmosférica, resultando assim em experiências mais longas. Quanto às pressões, foram também selecionadas duas – 15 MPa (pressão na qual não se verificou muito efeito, relativamente à pressão atmosférica) e 50 MPa (pressão que apresentou um maior efeito, comparativamente com a pressão atmosférica).

Assim, estudou-se a fermentação sob diferentes combinações de pressão e temperatura (15 e 50 MPa, a 25 e 32 °C), através da monitorização do pH e da acidez titulável. Em todos os ensaios realizados utilizou-se uma amostra controlo, ou seja, uma amostra fermentada à pressão atmosférica (0,1 MPa) e à respetiva temperatura, sendo que os resultados apresentados como "0,1 MPa" foram obtidos a partir do cálculo da média de todos os controlos realizados àquela temperatura. A análise estatística foi efetuada para os resultados obtidos a diferentes condições de pressão, de forma a verificar se as diferenças entre as amostras fermentadas a diferentes pressões seriam ou não significativas. Os resultados obtidos são apresentados no Anexo III – secção 1b.

1.2.1. Fermentação a 25 °C

Na **Figura 15** estão apresentados os resultados obtidos para a variação de pH em função do tempo de fermentação a 25 °C, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), durante 72 horas. O tempo de fermentação foi aumentado visto, que se previa um aumento do tempo de fermentação para a fermentação a 50 MPa.

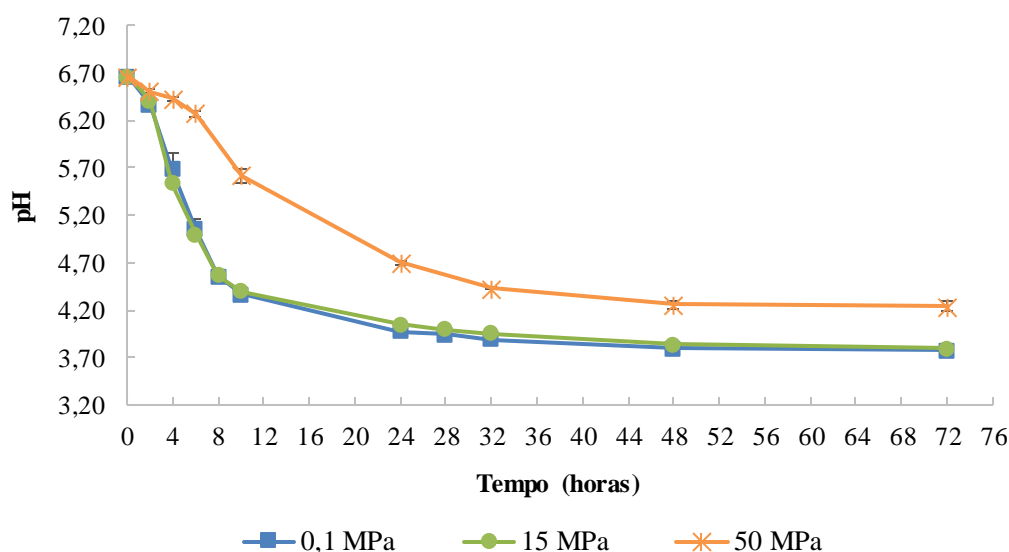


Figura 15. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 25 °C.

Analisando a **Figura 15** é possível observar que as fermentações a 0,1 e 15 MPa apresentaram o mesmo perfil de diminuição do pH, durante as 72 horas de fermentação, sendo que a 50 MPa a diminuição de pH foi mais lenta. À pressão atmosférica e a 15 MPa o kefir foi produzido (pH 4,2 – 4,6) (Otles and Cagindi, 2003) ao fim de 8 horas de fermentação, apresentando valores de pH de $4,55 \pm 0,03$ a 0,1 MPa e de $4,57 \pm 0,02$ a 15 MPa, não havendo diferenças significativas entre as duas pressões ($p > 0,05$). Aumentando a pressão para 50 MPa, foi necessário estender o tempo de fermentação para 32 horas, atingindo um pH de $4,43 \pm 0,01$. Mais uma vez esta diminuição da velocidade de fermentação a 50 MPa poderá dever-se à progressiva inibição das enzimas glicolíticas com o aumento da pressão (Hofmann and Kopperschlager, 1982).

A variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação a 0,1, 15 e 50 MPa está representada na **Figura 16**. Os resultados obtidos para a acidez titulável estão de acordo com os obtidos para a variação de pH (**Figura 15**). A 0,1 MPa, a concentração de ácido aumentou ao longo do tempo de fermentação, tendo aumentado de $3,397 \text{ mg/g} \pm 0,165$ para $10,313 \text{ mg/g} \pm 0,136$. Para a fermentação a 15 MPa observou-se um perfil de produção de ácido semelhante, tendo a concentração variado de $3,397 \text{ mg/g} \pm 0,147$ para $10,542 \text{ mg/g} \pm 0,190$, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) comparativamente com a fermentação a 0,1 MPa. A 50 MPa, a concentração de ácido variou de $3,397 \text{ mg/g} \pm 0,092$

para $8,974 \text{ mg/g} \pm 0,195$, não atingindo, no entanto, valores semelhantes ($p < 0,05$) aos da fermentação a 0,1 e a 15 MPa.

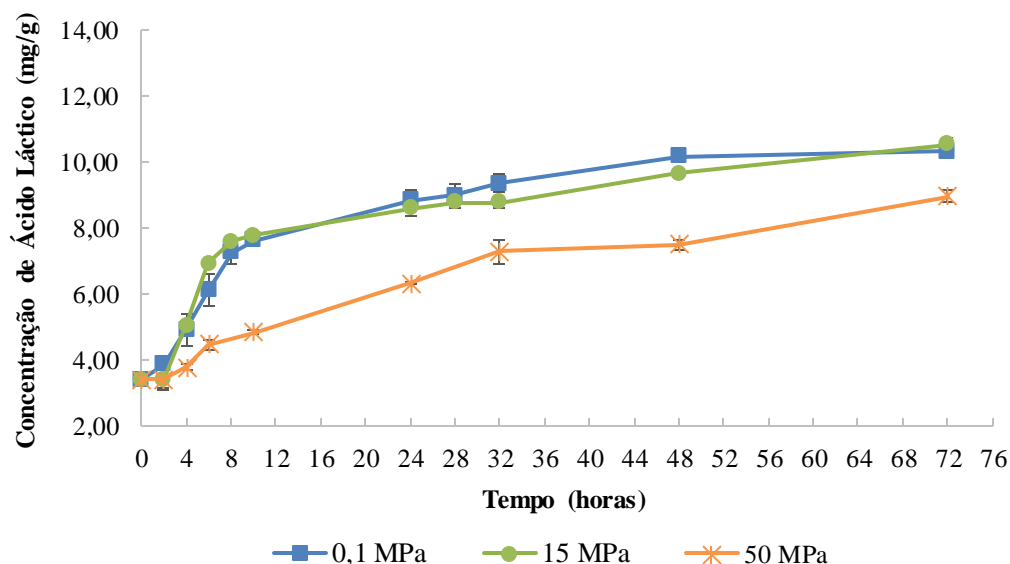


Figura 16. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 25 °C.

1.2.2. Fermentação a 32 °C

Na **Figura 17** são apresentados os resultados obtidos para a variação de pH em função do tempo de fermentação a 32 °C, sob pressões de 0,1, 15 e 50 MPa. Neste caso, o processo foi monitorizado durante 32 horas, porque uma vez mais se previa um aumento do tempo de fermentação a 50 MPa, mas inferior a 72 horas devido aos resultados obtidos anteriormente para a fermentação a 25 °C.

Através da análise da **Figura 17** pode observar-se que aparentemente, as fermentações a 0,1 e a 15 MPa apresentam um perfil de diminuição de pH semelhante, no entanto, a análise estatística confirmou que, a partir das 3 horas de fermentação, os valores de pH a 15 MPa foram significativamente ($p < 0,05$) mais elevados. Por outro lado, a fermentação a 50 MPa revelou um pH significativamente mais elevado ($p < 0,05$) relativamente à pressão atmosférica, durante todo o tempo de fermentação. Na fermentação à pressão atmosférica, produziu-se kefir (pH 4,2 – 4,6) (Otles and Cagindi, 2003) após 6 horas de fermentação (pH = $4,56 \pm 0,05$), no entanto, a 15 MPa foram necessárias 8 horas (pH = $4,42 \pm 0,01$).

Aumentando a pressão até 50 MPa, o tempo necessário para a produzir kefir foi relativamente mais elevado, cerca de 24 horas atingindo um pH de $4,17 \pm 0,01$.

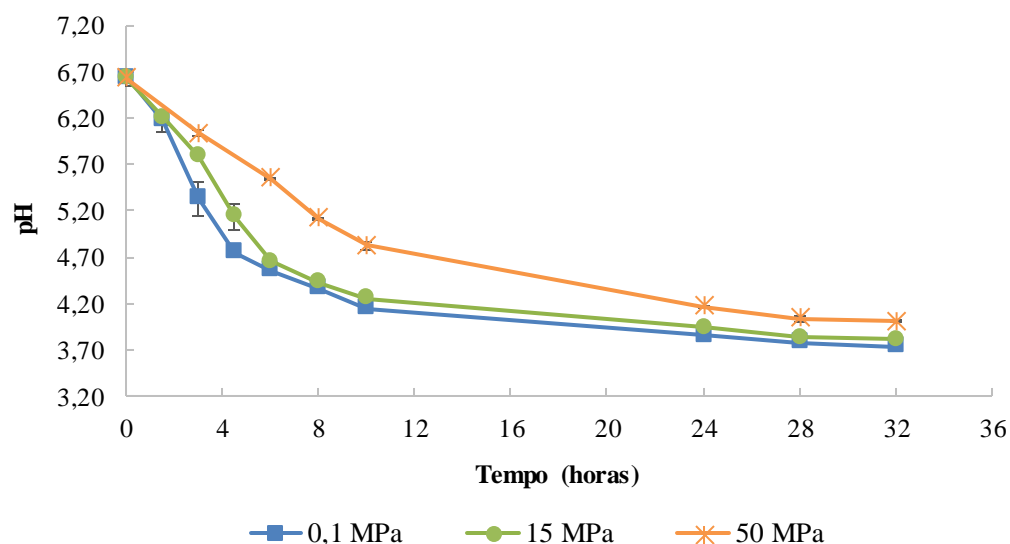


Figura 17. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 32 °C.

A variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação a 0,1, 15 e 50 MPa está representada na **Figura 18**.

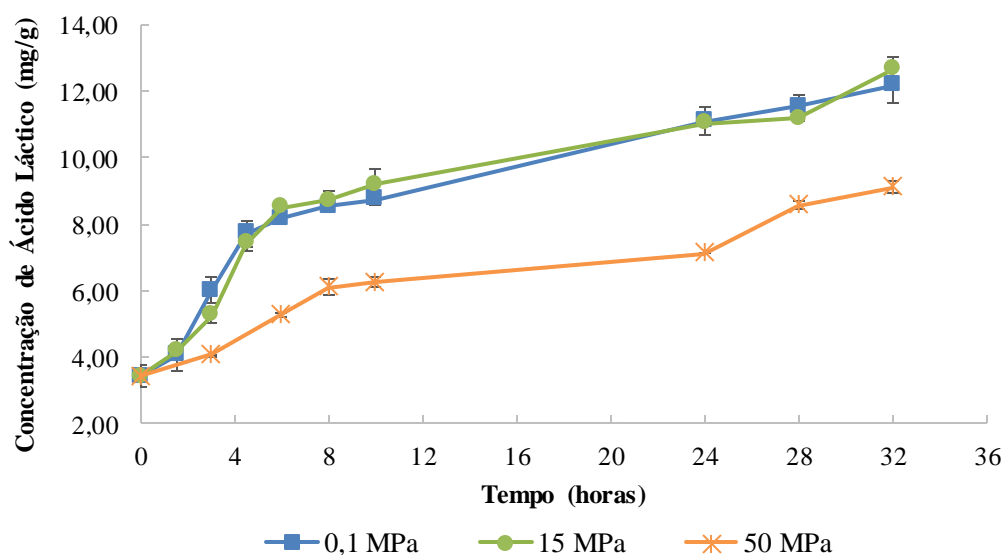


Figura 18. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1, 15 e 50 MPa), a 32 °C.

Analisando a **Figura 18**, observa-se que as fermentações a 0,1 MPa e a 15 MPa apresentaram um perfil de produção de ácido semelhante ao observado para a variação do pH (**Figura 17**). A 0,1 MPa a concentração de ácido aumentou de $3,436 \text{ mg/g} \pm 0,340$ para $12,175 \text{ mg/g} \pm 0,506$. Já na fermentação a 15 MPa a concentração variou entre $3,436 \text{ mg/g} \pm 0,167$ e $12,667 \text{ mg/g} \pm 0,368$, sendo que no final estas duas pressões apresentaram uma concentração de ácido semelhante ($p > 0,05$). A fermentação a 50 MPa apresentou concentrações de ácido significativamente mais baixas ($p < 0,05$) comparativamente com as outras pressões estudadas, tendo a concentração aumentado de $3,436 \text{ mg/g} \pm 0,075$ para $9,113 \text{ mg/g} \pm 0,191$.

1.3. Cálculo do volume de ativação

A partir dos resultados apresentados anteriormente foi possível estimar os volumes de ativação para alguns dos parâmetros analisados neste trabalho. O V_a fornece informação acerca do efeito da pressão na velocidade das reações, isto é: um V_a positivo indica a desaceleração do processo pela pressão, ao passo que um V_a negativo indica a aceleração do processo. Do mesmo modo quanto maior é o valor de V_a , maior o efeito da pressão na reação.

Neste trabalho, o V_a foi calculado com base nos resultados das constantes de velocidade (ver Anexo V) para a concentração de H^+ (calculada a partir dos valores de pH), para a acidez titulável, para a concentração de açúcares redutores e para a concentração de L-ácido láctico. O cálculo do V_a foi baseado na Lei de Eyring (ver Anexo V) e na **Tabela 7** são apresentados os valores de V_a para a fermentação à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$), a 25°C e a 32°C , obtidos para os diferentes parâmetros analisados.

Os cálculos das constantes de velocidade (**Figura 19**) mostraram que o parâmetro que exibiu valores de k mais elevados foi a concentração de H^+ . Com o aumento da pressão menor foi a diferença entre os valores de k para os diferentes parâmetros estudados.

No que diz respeito ao parâmetro da concentração de H^+ , para todas as temperaturas, o aumento da pressão induziu a diminuição das constantes de velocidade. O mesmo foi observado para os parâmetros da acidez titulável e da concentração de L-ácido láctico, na fermentação a 17°C (**Figura 19a**). No entanto para a acidez titulável, a temperaturas mais altas (25°C e 32°C) o aumento da pressão de 0,1 para 15 MPa conduziu a um aumento da

constante de velocidade, sendo que esse aumento foi maior a 25 do que a 32 °C. A 25 °C (**Figura 19b**), este comportamento pode ser justificado pelo facto de para o cálculo da constante de velocidade serem apenas utilizados os pontos de amostragem onde se verificou a fase de produção máxima de ácido. Tal como se pode observar no gráfico da acidez titulável em função o tempo (**Figura 16**), a fermentação a 15 MPa apresentou valores mais elevados comparativamente com a fermentação à pressão atmosférica, levando assim a uma maior constante de velocidade. Por outro lado, a 32 °C (**Figura 19c**) a diferença entre as constantes de velocidade a 15 e a 0,1 MPa foi mínima. Estes resultados podem ser justificados pelo facto de na fase de produção máxima (ver **Figura 18**), alguns pontos de amostragem na fermentação a 15 MPa terem sido um pouco mais baixos do que na fermentação a 0,1 MPa, mas outros pontos ligeiramente mais altos, o que poderá ter levado a este ligeiro aumento da constante de velocidade a 15 MPa.

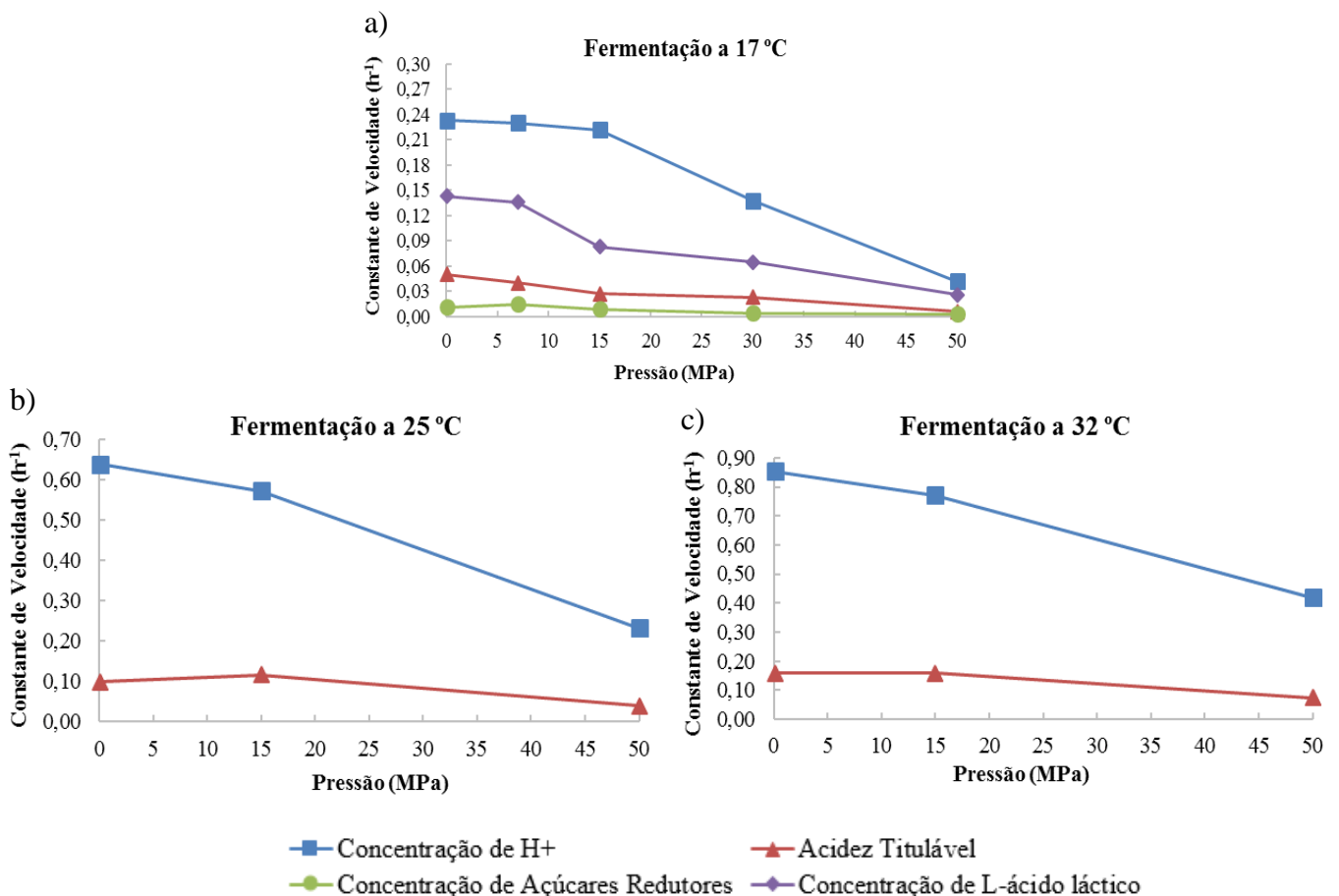


Figura 19. Constante de velocidade, (h^{-1}), para a concentração de H^+ , para a acidez titulável, para a concentração de açúcares redutores e para a concentração de L-ácido láctico, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), para cada uma das temperaturas testadas: a) 17 °C, b) 25 °C e c) 32 °C.

Relativamente à concentração de açúcares redutores (17 °C) (**Figura 19a**) as constantes de velocidade revelaram que o aumento da pressão de 15 para 50 MPa provocou uma diminuição na velocidade de consumo de substrato. No entanto, a fermentação a 7 MPa também apresentou um ligeiro aumento do valor de k , indicando assim, que a 7 MPa o consumo de açúcares foi mais rápido do que na fermentação a 0,1 MPa. Este comportamento pode ser justificado pelo facto de para o cálculo da constante de velocidade serem apenas utilizados os pontos de amostragem onde se verificou a fase de consumo máximo de substrato. Tal como se pode observar no gráfico da concentração de açúcares redutores em função do tempo (**Figura 13**), a fermentação a 7 MPa apresentou um maior consumo de substrato comparativamente com a fermentação à pressão atmosférica, levando assim a uma maior constante de velocidade.

Analisando a **Tabela 7**, é possível verificar que os V_a são positivos para todos os parâmetros físico-químicos, indicando que a pressão causou uma desaceleração das reações envolvidas na fermentação de kefir, o que está de acordo com os resultados obtidos para a produção de iogurte probiótico (**Mota et al., 2015**).

Tabela 7. Volumes de ativação, (cm^3/mol), obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados nas fermentações realizadas à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ °C}$), a 25 e a 32 °C e os respetivos R^2 .

Temperatura (°C)	Parâmetro Físico-químico	Volume de ativação (cm^3/mol)	R^2
17	Concentração de açúcares redutores	77,72	0,88
	Concentração de L-ácido láctico	82,52	0,97
	Concentração de H^+	83,86	0,89
	Acidez titulável	96,88	0,94
25	Concentração de H^+	52,46	0,96
	Acidez titulável	50,45	0,82
32	Concentração de H^+	37,76	0,97
	Acidez titulável	42,32	0,91

Para a fermentação à temperatura ambiente, a concentração de açúcares redutores (consumo de substrato) foi o parâmetro que apresentou um valor de V_a mais baixo (77,72 cm^3/mol), ou seja, as reações envolvidas no consumo de substrato foram as menos afetadas

pela pressão. A acidez titulável (formação de produto) foi a que apresentou um valor de V_a mais elevado (96,88 cm^3/mol), ou seja, foi o parâmetro mais sensível à pressão. Assim, os resultados sugerem que a formação de produto foi mais inibida pela pressão do que o consumo de substrato, indicando que os açúcares redutores poderão estar a ser utilizados para uma possível adaptação à pressão, relacionada com alterações metabólicas. Comparando com os V_a obtidos para a produção de iogurte probiótico (Mota *et al.*, 2015), verifica-se que os resultados são diferentes (V_a para a concentração de açúcares redutores de 64,0 cm^3/mol e para a acidez titulável de 37,4 cm^3/mol), o que poderá dever-se ao diferente inóculo utilizado neste trabalho, mais complexo, ou seja, com uma maior variedade de microrganismos, nomeadamente bactérias ácido-láticas e leveduras, que poderão responder de maneira diferente à pressão. A concentração de L-ácido láctico (82,52 cm^3/mol) foi o segundo parâmetro menos afetado pela pressão, sendo que o valor do V_a se mostrou muito próximo do obtido para a concentração de H^+ (83,86 cm^3/mol), o que poderá indicar que a diminuição do pH adveio maioritariamente da produção de L-ácido láctico. Para além disso, sob pressão a variação da acidez titulável foi maior do que a variação de pH. Uma possível explicação para esta diferença é que, possivelmente durante a fermentação sob pressão, se formaram diferentes proporções de ácidos orgânicos, com diferentes valores de pKa, devido ao efeito da AP no metabolismo microbiano (Mota *et al.*, 2015).

A 25 °C, a concentração de H^+ foi o parâmetro que apresentou um valor de V_a mais elevado (52,46 cm^3/mol), ou seja, foi o parâmetro mais sensível à pressão, o que está de acordo com os resultados obtidos por Mota *et al.* (2015), em iogurte probiótico. No entanto, apesar de a acidez titulável apresentar um valor de V_a menor (50,45 cm^3/mol), este não difere muito do V_a obtido para a concentração de H^+ (52,46 cm^3/mol), o que indica que o efeito da pressão nestes dois parâmetros foi semelhante. Estes resultados podem sugerir que, neste caso em particular, o aumento da concentração de ácido se traduziu diretamente numa diminuição do pH.

A 32 °C, os resultados mostraram que a pressão afetou mais fortemente a concentração de ácido (42,32 cm^3/mol) do que o pH (37,76 cm^3/mol), o que vai ao encontro aos resultados obtidos a 17 °C. Desta forma, este maior efeito da pressão na acidez titulável pode uma vez mais dever-se a uma possível produção de diferentes proporções de ácidos orgânicos, com diferentes valores de de pKa, durante a fermentação (Mota *et al.*, 2015).

Comparando os valores de V_a correspondentes à concentração de H^+ obtidos para o kefir com os obtidos para o iogurte probiótico ($54,1 \text{ cm}^3/\text{mol}$), concluiu-se que o aumento de temperatura conduziu à diminuição dos valores de V_a e por isso estes apresentaram-se mais baixos relativamente aos observados para o iogurte, exeto à temperatura ambiente. Contrariamente, para a acidez titulável, o V_a para o kefir exibiu valores mais altos quando comparados com os do iogurte probiótico ($37,4 \text{ cm}^3/\text{mol}$). Desta forma, apesar de se ter aumentado a temperatura para uma mais próxima da empregue na produção de iogurte probiótico ($43 \text{ }^\circ\text{C}$), o efeito da pressão foi diferente, o que se deve essencialmente às diferentes composições dos inóculos utilizados.

Na **Figura 20**, está representado o volume de ativação, para a concentração de H^+ e para a acidez titulável, em função de cada uma das temperaturas estudadas.

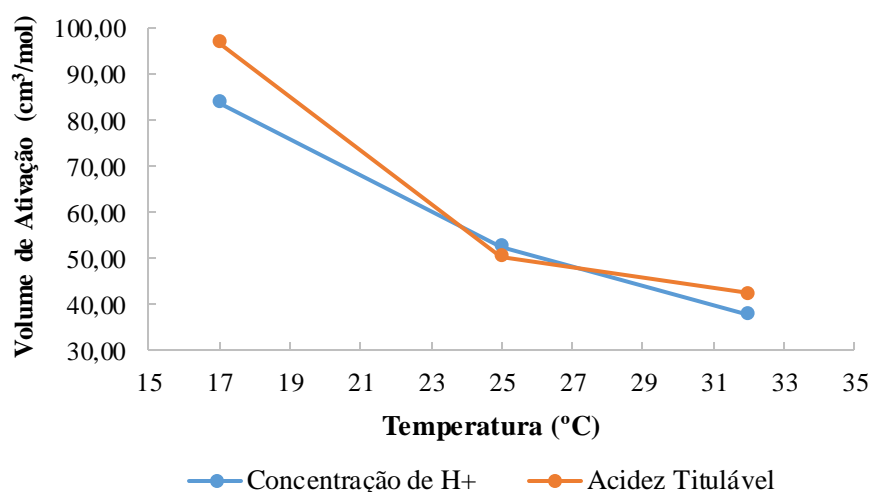


Figura 20. Volume de ativação, (cm^3/mol), para a concentração de H^+ e para a acidez titulável em função das temperaturas estudadas (17, 25 e $32 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pela análise da **Figura 20** observa-se que, em geral, a acidez titulável foi o parâmetro mais afetado pela pressão. Para ambos os parâmetros analisados o aumento da temperatura induziu uma diminuição dos valores do V_a , indicando que a pressão não afetou tão fortemente as reações envolvidas na fermentação de kefir. No entanto esta diminuição foi mais acentuada quando a temperatura aumentou de 17 para $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo que o V_a da acidez titulável foi o que exibiu a maior diminuição. Assim, é possível concluir que o aumento da temperatura apresentou um efeito positivo, indicando que a temperatura atenuou o efeito inibitório da pressão nas reações de fermentação de kefir, sugerindo que os microrganismos

terão conseguido adaptar-se mais facilmente à pressão quando submetidos a temperaturas mais altas. Este efeito pode estar relacionado com a produção de proteínas de choque térmico, uma vez que **Aertsen et al. (2004)** reportaram que em *Escherichia coli* ocorreu a indução de vários genes de choque térmico após a exposição a pressões em níveis sub-letais. Os autores concluíram que as proteínas de choque térmico provavelmente poderão desempenhar um importante papel na prevenção de danos ao nível celular e assim, o mesmo poderá ter ocorrido quando se realizou a fermentação às diferentes combinações.

2. Efeito da temperatura na produção de kefir

Na segunda parte deste trabalho, analisou-se a fermentação sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), através da monitorização do pH e da acidez titulável. Os resultados apresentados nesta secção são os mesmos apresentados anteriormente, no entanto, são apresentados de forma diferente de forma a facilitar a visualização do efeito da temperatura na produção de kefir. Na fermentação à pressão atmosférica (**Figura 21a**), os resultados mostraram que o aumento da temperatura de 17 °C para 25 °C e para 32 °C conduziu a um aumento da velocidade de fermentação. Consequentemente, o tempo necessário para que o pH atingisse um valor entre 4,2 – 4,6 foi mais elevado a 17 °C do que a 25 e a 32 °C. Em relação à fermentação a 15 MPa (**Figura 21b**), o aumento da temperatura de 17 °C para 25 °C e de 17°C para 32 °C levou a uma diminuição do tempo necessário para a produção de kefir (pH 4,2 – 4,6), de 24 horas para 8 horas, em ambos os casos. Porém, o aumento da temperatura de 25 para 32 °C pareceu afetar pouco o tempo de fermentação, uma vez que para ambas as temperaturas foram necessárias 8 horas de fermentação para a produção de kefir (pH = $4,57 \pm 0,02$ e pH = $4,42 \pm 0,01$, a 25 °C e 32 °C, respetivamente). Contudo, a 25 e a 32 °C o tempo necessário para atingirem um valor de pH de 4,4 foi de 10 e 8 horas, respetivamente, concluindo-se assim que houve um ligeiro aumento da velocidade de fermentação na fermentação realizada a 32 °C. Por último, na fermentação a 50 MPa (**Figura 21c**) observou-se que a 17 °C não foi possível produzir kefir após 28 horas de fermentação e por isso seria necessário estender o tempo de fermentação. Quando se aumentou a temperatura para os 25 °C a fermentação ocorreu mais rapidamente, obtendo-se kefir ao fim de 32 horas (pH = $4,43 \pm 0,01$). A 32 °C a redução do tempo de fermentação foi maior, para cerca de 24 horas, exibindo um pH de $4,17 \pm 0,01$, no entanto, se tivesse sido

recolhida uma amostra entre as 10 e as 24 horas de fermentação a 32 °C, possivelmente verificar-se-ia a produção de kefir mais cedo.

Assim, estes resultados estão de acordo com os obtidos por **Apar *et al.* (2016)** e **Dimitreli and Antoniou (2011)**, que demonstraram que o aumento da temperatura conduziu à diminuição do tempo de fermentação. Além disso, **Dimitreli and Antoniou (2011)** mostraram que a fermentação a 30 °C foi a que exibiu um menor tempo de fermentação, temperatura essa que se encontra próxima da temperatura mais elevada usada no presente estudo (32 °C), para as três pressões estudadas. De acordo com **Haque *et al.* (2001)**, este aumento do tempo necessário para obter o pH do kefir, provocado pela diminuição da temperatura de fermentação, pode ser atribuída a uma redução da atividade metabólica dos microrganismos.

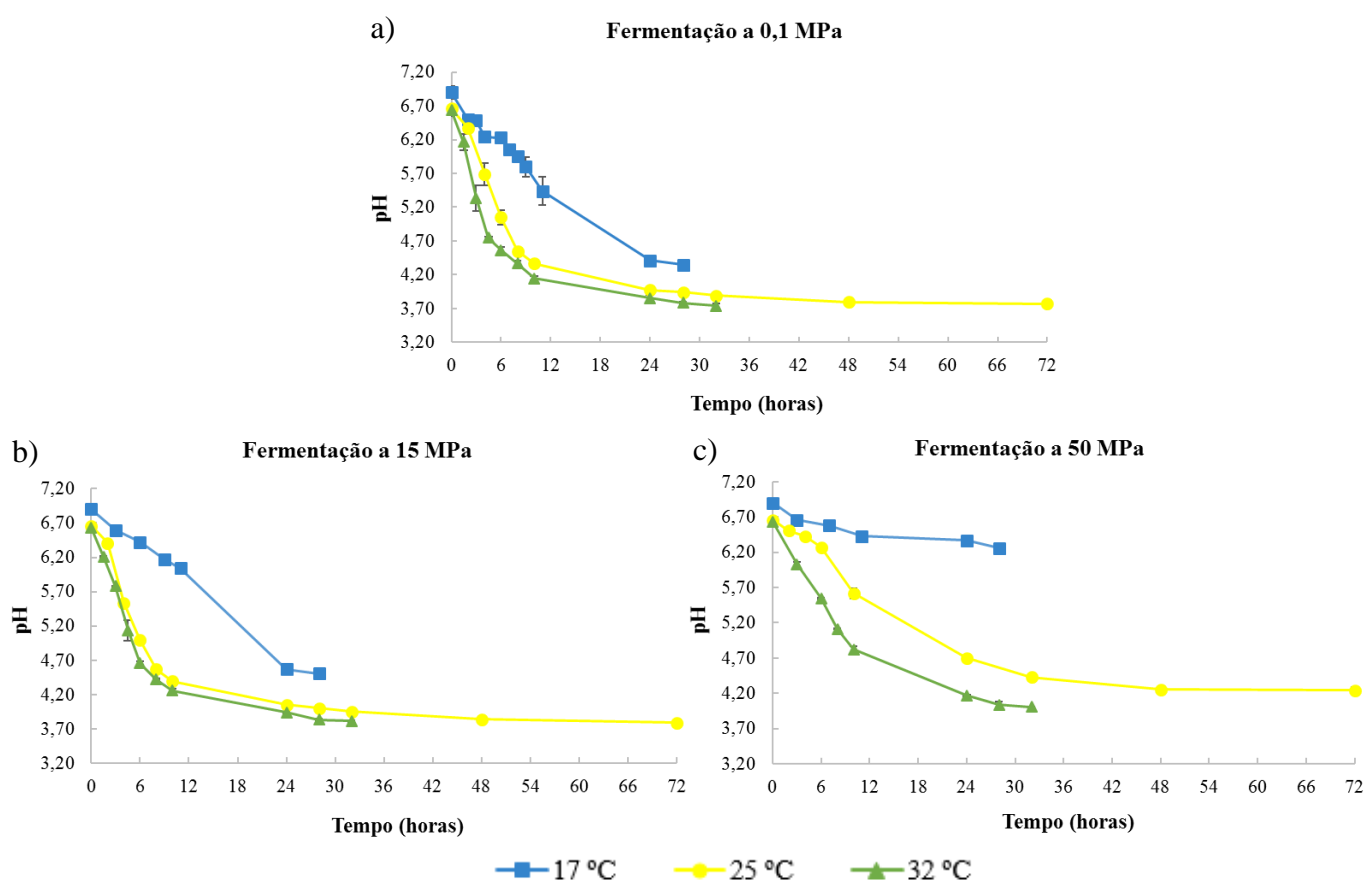


Figura 21. Variação de pH ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), para cada uma das pressões testadas: a) 0,1 MPa, b) 15 MPa e c) 50 MPa.

Em relação à acidez titulável (**Figura 22**), comparando a concentração de ácido produzido a 17, a 25 e a 32 °C, para todas as pressões estudadas, foi possível concluir que o aumento da temperatura levou a um aumento da velocidade de produção de ácido, tal como foi reportado por **Irigoyen et al. (2003)**, bem como ao aumento da concentração de produto formado, atingindo o valor máximo a 32 °C, em todos os casos. Estes resultados são corroborados por **Schoevers and Britz (2003)** que reportam que os valores para a acidez titulável a 18 °C foram significativamente mais baixos do que a 25 °C, tal como se observou no presente estudo para todas as fermentações. Além disso, os resultados também estão de acordo com os obtidos por **Ismail et al. (2011)**, que mostraram que numa gama de temperaturas entre 15 e 50 °C, à pressão atmosférica, a produção máxima de ácido láctico ocorreu a 35 °C, temperatura essa que se encontra próxima da obtida neste estudo para a produção máxima de ácido (32 °C).

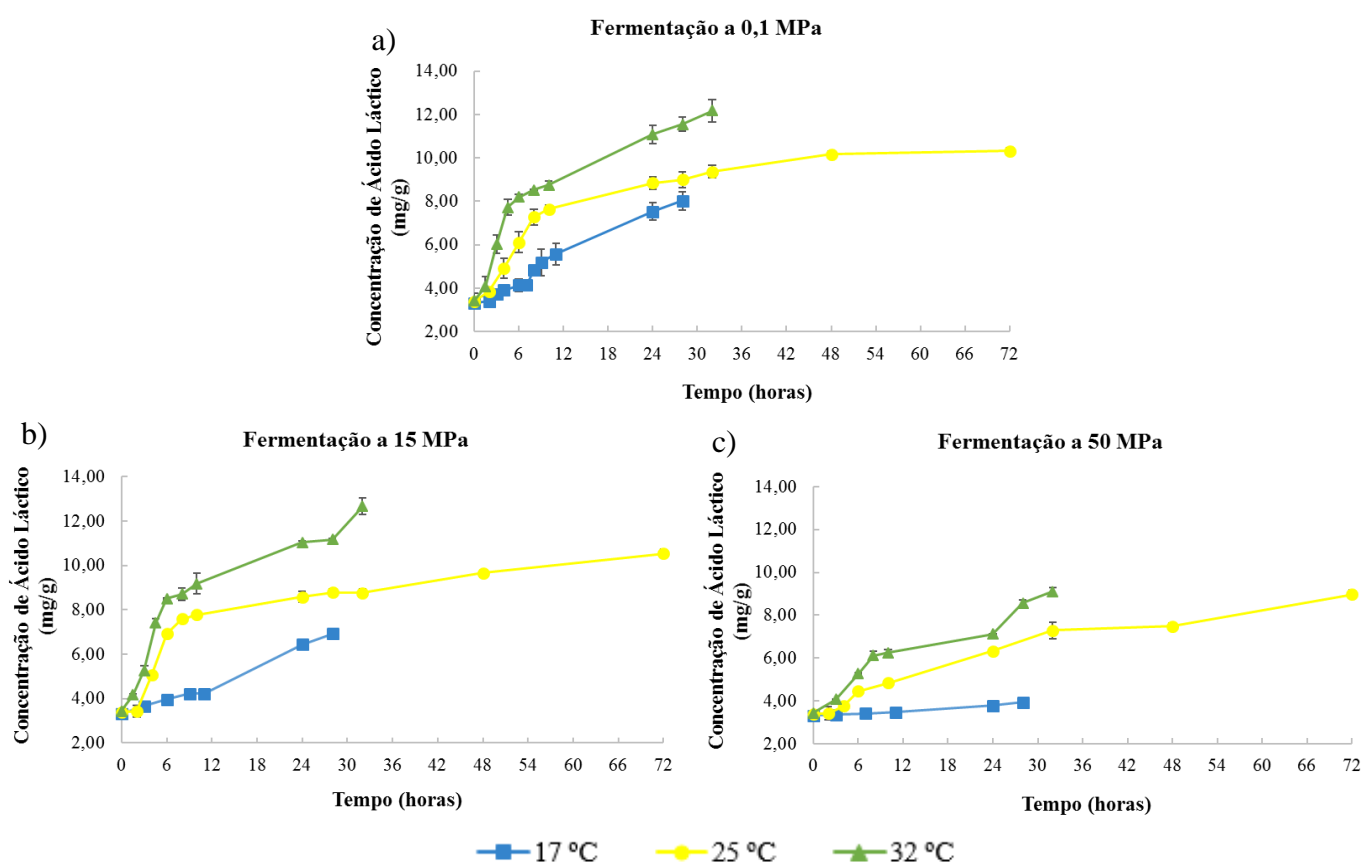


Figura 22. Variação da concentração de ácido láctico (mg de ácido láctico/g de kefir) ao longo do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), para cada uma das pressões testadas: a) 0,1 MPa, b) 15 MPa e c) 50 MPa.

Consequentemente, este aumento da velocidade fermentativa levou a um aumento da taxa de formação de produto (**Tabela 8**). Na fermentação à pressão atmosférica, a taxa de formação de produto variou entre 0,213 mg/g.h (a 17 °C) e 0,986 mg/g.h (a 32 °C) e foi a pressão à qual se observou um maior aumento da taxa de formação de produto, com o aumento da temperatura. Por outro lado, o aumento da pressão conduziu a uma menor taxa de formação de produto com o aumento da temperatura. Na fermentação a 15 MPa, a taxa de formação de produto aumentou de 0,133 (a 17 °C) para 0,518 (a 25 °C) e finalmente para 0,892 mg/g.h (a 32 °C), exibindo um maior aumento quando a temperatura subiu de 17 °C para 25 °C. Finalmente, na fermentação a 50 MPa o aumento da taxa de formação de produto foi de 0,021 para 0,123 e por fim para 0,309 mg/g.h, com o aumento da temperatura. Neste caso, a temperatura teve um efeito notório, uma vez que a concentração de produto formado a 17 °C foi muito baixa, comparativamente com a concentração formada a 32 °C.

Tabela 8. Taxa de formação de produto, r_p (mg/g.h), para cada uma das combinações de pressão (0,1 – 50 MPa) e temperatura (17, 25 e 32 °C) e os respetivos R^2 .

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Taxa de formação de produto, (r_p) (mg/g.h)	R^2
0,1	17	0,213	0,93
	25	0,466	0,98
	32	0,986	0,96
15	17	0,133	0,98
	25	0,518	0,93
	32	0,892	0,97
50	17	0,021	0,98
	25	0,123	0,98
	32	0,309	0,97

2.1. Cálculo da energia de ativação

A partir dos resultados apresentados anteriormente foi possível estimar as energias de ativação para alguns dos parâmetros analisados neste trabalho. A E_a fornece informação sobre o efeito da temperatura na velocidade das reações, assim como o V_a para o efeito da pressão. Desta forma, quanto maior o valor da E_a , mais sensíveis são as reações à temperatura.

Neste trabalho, a E_a foi calculada com base nos resultados das constantes de velocidade (ver Anexo VI) para a concentração de H^+ (calculada a partir dos valores de pH)

e para a acidez titulável. O cálculo da E_a foi baseado na Lei de Arrhenius (ver Anexo VI) e na **Tabela 9** são apresentados os valores da E_a obtidos para os parâmetros analisados.

Relativamente às constantes de velocidade (**Figura 23**), os resultados mostraram que, tanto para a concentração de H^+ como para a acidez titulável, ocorreu um aumento da velocidade fermentativa com o aumento da temperatura até 32 °C. Estes resultados comprovam uma vez mais o efeito positivo do aumento da temperatura na velocidade de fermentação de kefir, tal como já foi referido anteriormente. Para ambos os parâmetros verificou-se que, em geral, o maior aumento da constante de velocidade ocorreu quando a temperatura aumentou de 17 para 25 °C. Além disso, os resultados mostraram, que o parâmetro que apresentou valores das constantes de velocidade mais elevados foi a concentração de H^+ , sendo que com o aumento da temperatura observou-se um aumento da diferença entre os dois parâmetros.

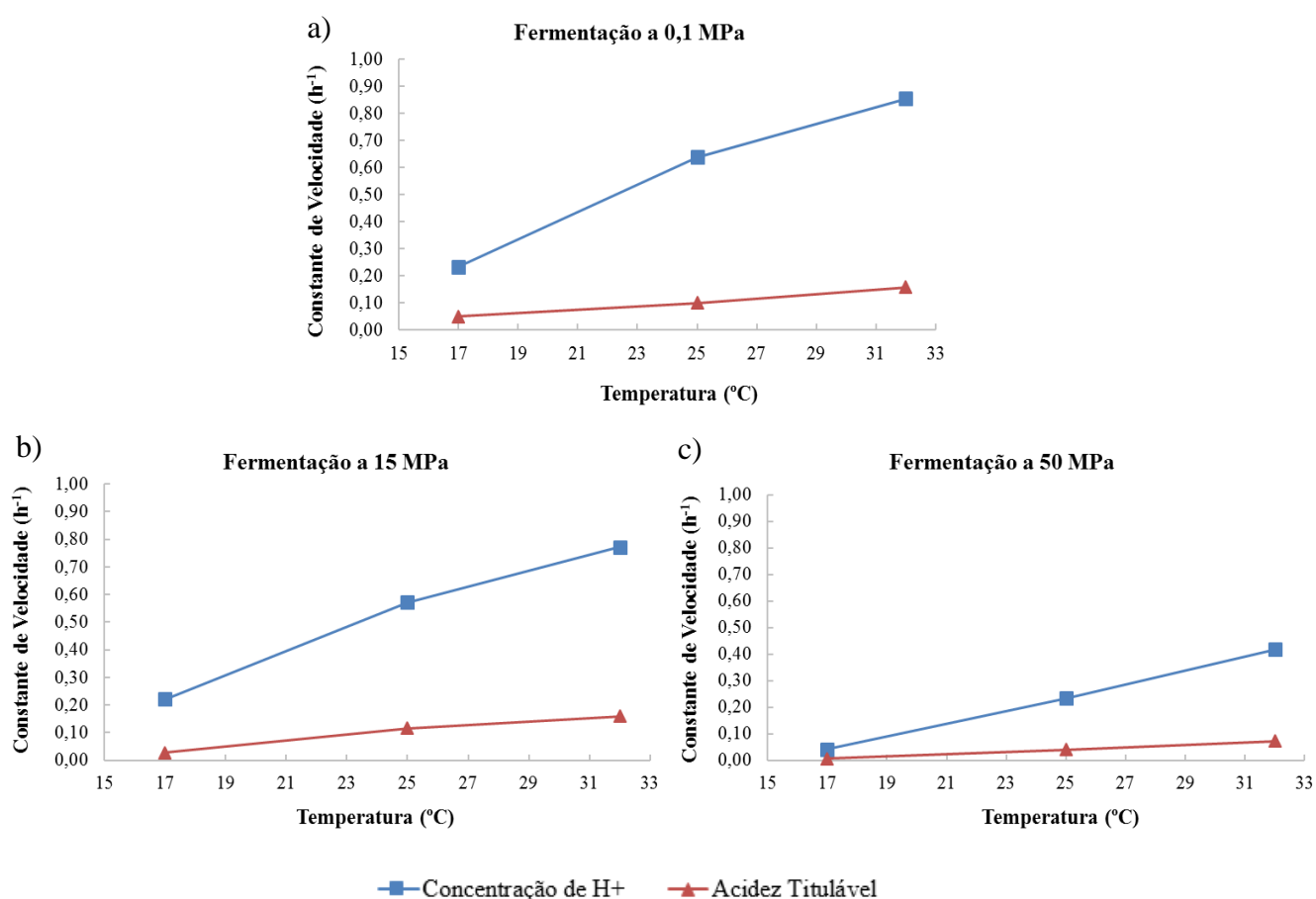


Figura 23. Constante de velocidade (h^{-1}) para a concentração de H^+ e para a acidez titulável, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 $^{\circ}C$), para cada uma das pressões testadas: a) 0,1 MPa, b) 15 MPa e c) 50 MPa.

Analisando a **Tabela 9**, verificou-se que à pressão atmosférica, a concentração de H^+ exibiu um valor de E_a de 64,63 kJ/mol, ao passo que o da acidez titulável foi de 56,63 kJ/mol, o que indica que a concentração de H^+ se apresentou mais sensível à temperatura. A 15 MPa os resultados mostraram que o parâmetro mais sensível à temperatura foi a concentração de ácido (88,48 kJ/mol), ao contrário o que se verificou à pressão atmosférica, sendo que a E_a para o pH foi de 61,90 kJ/mol. Por último, na fermentação a 50 MPa verificou-se que a acidez titulável (124,22 kJ/mol) apresentou um valor de E_a mais elevado comparativamente com o obtido para concentração de H^+ (114,14 kJ/mol), tal como o observado a 15 MPa. No entanto, a esta pressão a diferença entre as E_a para a concentração de H^+ e para a acidez titulável não foi tão evidente. Assim, os resultados mostraram que, quando a fermentação foi realizada sob pressão a acidez titulável foi o parâmetro mais sensível à temperatura.

Tabela 9. Energia de ativação, (kJ/mol), obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados nas fermentações realizadas a 0,1, 15 e 50 MPa e os respetivos R^2 .

Pressão (MPa)	Parâmetro Físico-químico	Energia de ativação (kJ/mol)	R^2
0,1	Concentração de H^+	64,63	0,94
	Acidez titulável	56,63	0,99
15	Concentração de H^+	61,90	0,94
	Acidez titulável	88,48	0,91
50	Concentração de H^+	114,14	0,95
	Acidez titulável	124,22	0,94

Na **Figura 24**, está representada a energia de ativação, para a concentração de H^+ e para a acidez titulável, em função de cada uma das pressões estudadas. Pela análise da **Figura 24** verifica-se que, em geral, o parâmetro mais sensível à temperatura foi a acidez titulável. Para este parâmetro verificou-se que o aumento da pressão de 0,1 para 50 MPa se traduziu no aumento da E_a , indicando que este se tornou mais sensível à temperatura com o aumento da pressão. Para a concentração de H^+ , o aumento da pressão até 15 MPa levou a uma ligeira diminuição do valor de E_a , o que comprova que a 15 MPa foi a pressão à qual este parâmetro se apresentou menos sensível à temperatura. No entanto, o aumento da

pressão até 50 MPa, para ambos os parâmetros, levou a um aumento considerável no valor da E_a , sendo a pressão à qual a fermentação de kefir se mostrou mais sensível à temperatura. Assim, é possível concluir, que de forma geral, com o aumento da pressão, as reações envolvidas na fermentação de kefir se tornaram mais sensíveis à temperatura.

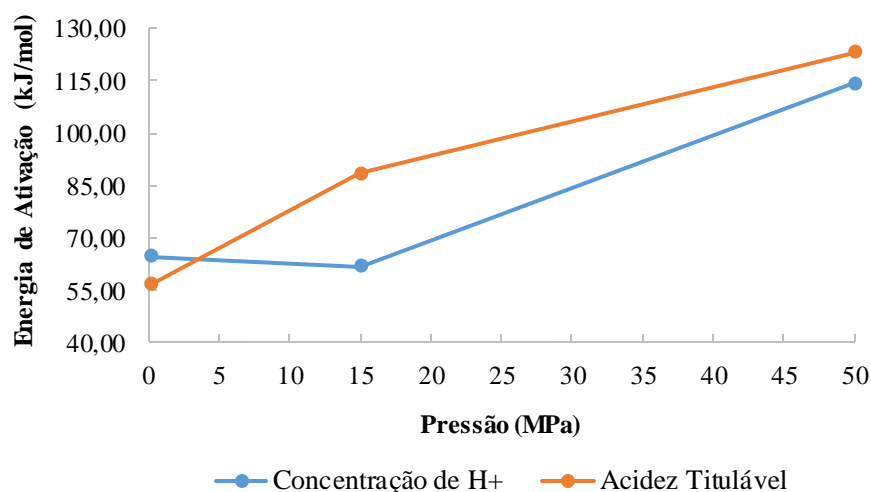


Figura 24. Energia de ativação (kJ/mol), para a concentração de H⁺ e para a acidez titulável em função das pressões estudadas (0,1, 15 e 50 MPa).

3. Efeito combinado da pressão e da temperatura na produção de kefir

Após o estudo do efeito da pressão e da temperatura separadamente, é possível afirmar que ambos os parâmetros afetaram o processo de fermentação de kefir, sendo assim verificou-se que estas duas variáveis têm um papel importante no processo fermentativo. Em particular, o aumento da pressão afetou negativamente a velocidade do processo fermentativo, enquanto que o aumento da temperatura exibiu um efeito positivo na velocidade fermentativa e de produção de ácido.

A variação simultânea da pressão e da temperatura (P/T) afetou a cinética do processo fermentativo, conduzindo a diferentes velocidades fermentativas, que em geral, aumentaram com o aumento da temperatura e com a diminuição da pressão. A fermentação sob pressão (15 e 50 MPa) mostrou uma notável diferença nos parâmetros cinéticos quando a temperatura do processo aumentou de 17 para 25 ou 32 °C, mostrando que o efeito da pressão depende fortemente da temperatura. A combinação P/T revelou que o aumento da temperatura levou a um menor efeito da pressão na velocidade de fermentação (menores valores de volume de ativação), mas por sua vez, o aumento da pressão conduziu a uma

maior sensibilidade das reações à temperatura (maiores valores de energia de ativação). Assim, confirmou-se que os efeitos inibitórios da pressão foram atenuados pela temperatura, uma vez que os microrganismos pareceram capazes de se adaptar mais facilmente à pressão.

O processo industrial de produção de kefir utiliza temperaturas de 21 °C, e, portanto, era esperado que a fermentação a 15 MPa/25 °C fosse a melhor combinação P/T, uma vez que sob pressão a velocidade de produção de ácido foi mais elevada. No entanto, a combinação P/T de 15 MPa/32 °C resultou numa fermentação mais rápida, bem como numa maior produção de ácido. Apesar desta combinação ter apresentado um comportamento semelhante ao respetivo controlo (32 °C a 0,1 MPa), verificou-se um ligeiro aumento da velocidade de produção de ácido. Portanto, de todas as combinações P/T estudadas, com base nas análises efetuadas, estas condições são as mais adequadas para a produção de kefir sob pressão, uma vez que apresentaram uma elevada velocidade de fermentação que, por conseguinte, conduziu a uma diminuição do tempo de fermentação. Para além disso, é possível que a utilização de diferentes combinações P/T promovam alterações nas características nutricionais e sensoriais do produto final, o que poderá apresentar interesse para a indústria alimentar, no contexto do desenvolvimento de um produto lácteo com diferentes propriedades.

V. Conclusões

Tanto quanto foi possível ver na literatura, não existem estudos acerca do efeito da AP no processo fermentativo de kefir, bem como do efeito combinado da pressão e da temperatura. Assim, este processo foi estudado em detalhe no presente trabalho, efetuando-se uma análise cinética, de forma a perceber o efeito destas duas variáveis no processo de produção de kefir.

À temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^\circ\text{C}$), o aumento da pressão teve um efeito negativo na taxa de fermentação de kefir, sendo que a 50 MPa quase não ocorreu fermentação. No entanto, a 7 e a 15 MPa foi possível produzir kefir (pH 4,2 – 4,6), apesar da sua produção ter ocorrido a uma menor velocidade comparativamente com a fermentação à pressão atmosférica. Comparando ainda as fermentações a 7 MPa e à pressão atmosférica, ambas apresentaram um perfil fermentativo semelhante no que respeita à produção de ácido e consumo de substrato, apesar da fermentação sob pressão ter demonstrado um maior rendimento. Por outro lado, apesar de se ter produzido kefir a 15 MPa, o perfil de produção de ácido foi distinto do observado na fermentação à pressão atmosférica, o que poderá indicar alterações ao nível do perfil metabólico, que por sua vez poderá ter levado a alterações nas características do produto final.

Quanto ao efeito combinado da pressão e da temperatura, verificou-se que o aumento da temperatura de fermentação até $32\text{ }^\circ\text{C}$ levou a um aumento da velocidade fermentativa para todas as pressões testadas, e, por conseguinte, levou a uma diminuição do tempo necessário para a produção de kefir. No que diz respeito à pressão, verificou-se que a fermentação a 15 MPa apresentou um perfil semelhante ao da fermentação controlo. O aumento da pressão para 50 MPa, a todas as temperaturas, provocou uma redução na velocidade de fermentação, no entanto, a $25\text{ }^\circ\text{C}$ e a $32\text{ }^\circ\text{C}$ foi ainda possível produzir kefir, o que não se verificou à temperatura ambiente.

A análise cinética destes resultados confirmou que a pressão desacelerou as reações envolvidas na fermentação de kefir, contrariamente à temperatura que as acelerou. Os volumes de ativação, a $\approx 17\text{ }^\circ\text{C}$, sugerem que a acidez titulável (produção de ácido) foi o parâmetro mais afetado pela pressão, ao contrário da concentração de açúcares redutores (consumo de açúcares), que foi o menos afetado, podendo assim indicar que os açúcares podem estar a ser consumidos como uma possível forma de adaptação à pressão por parte dos microrganismos. Em geral, a acidez titulável foi o parâmetro mais afetado pela pressão,

no entanto, o aumento da temperatura conduziu à diminuição dos volumes de ativação, o que sugere que a temperatura atenuou o efeito da pressão na produção de kefir. Quanto às energias de ativação, verificou-se que, em geral, o parâmetro mais sensível à temperatura foi a acidez titulável e que o aumento da pressão conduziu ao aumento da sensibilidade das reações à temperatura.

Em jeito de conclusão, o aumento da pressão afetou negativamente o processo fermentativo, ao invés, o aumento da temperatura exerceu um efeito positivo. O efeito combinado da pressão e da temperatura conduziu a alterações na velocidade do processo fermentativo envolvido na produção de kefir, sendo que a combinação destas duas variáveis levou a que os efeitos da pressão fossem atenuados. Consequentemente, a combinação P/T que resultou numa fermentação mais rápida, bem como numa maior produção de ácido, foi a 15 MPa/32 °C, sendo por isso, as condições mais adequadas para a produção de kefir sob pressão. Estes resultados sugerem assim a possibilidade de combinar a pressão e a temperatura para o controlo da atividade metabólica dos microrganismos utilizados na produção de kefir. Para além da pressão e da temperatura afetarem a velocidade fermentativa, é bastante provável que os microrganismos tenham utilizado diferentes mecanismos de adaptação, para conseguirem crescer e fermentar sob as diferentes condições, mais propriamente sob pressão. Estes possíveis mecanismos de adaptação poderão ter levado a modificações metabólicas e consequentemente, à produção de diferentes compostos. Estas modificações poderão afetar importantes propriedades do produto final, como por exemplo alterações no sabor, aroma e textura, bem como nas propriedades nutricionais. Portanto, para além do interesse deste trabalho ao nível fundamental, os resultados obtidos abrem novas possibilidades para a produção de kefir, uma vez que a fermentação de kefir sob diferentes condições poderá ser relevante no contexto do desenvolvimento de novas características num produto alimentar já existente, podendo eventualmente culminar com o desenvolvimento de um novo produto, o que por sua vez poderá ter interesse para a indústria alimentar.

VI. Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram uma análise detalhada dos efeitos da pressão e da temperatura no processo fermentativo, no entanto, poderiam ainda testar-se novas combinações de pressão e temperatura de forma a realizar-se uma análise cinética mais completa. Numa próxima fase, será também necessário realizar-se uma caracterização mais completa do efeito destes dois parâmetros na produção de kefir. Para isso, será relevante realizar-se análises microbiológicas ao longo do processo de fermentação para melhor compreender o efeito da pressão e da temperatura nas culturas *starter* de kefir. Posteriormente, será adequado realizar-se um estudo do metaboloma de forma a compreender os efeitos da AP, uma vez que os microrganismos poderão utilizar diferentes vias metabólicas na tentativa de se adaptarem à pressão, produzindo diferentes metabolitos durante o processo. Estas possíveis alterações no perfil metabólico das estirpes fermentativas, por sua vez, irão ter impacto nas características sensoriais do kefir, de modo que será importante efetuar-se análises sensoriais ao produto final, uma vez que a aceitação dos consumidores está dependente das características sensoriais.

Além disso, as propriedades reológicas do kefir deverão ser avaliadas, uma vez que estas apresentam grande importância para a qualidade do produto final, bem como na sua aceitação pelos consumidores. Na literatura está reportado que um dos fatores que mais afeta estas propriedades é a temperatura de fermentação (**Dimitreli and Antoniou, 2011**), desta forma, o estudo do efeito combinado da pressão e da temperatura de fermentação na reologia do kefir é de grande interesse.

Tendo em conta os benefícios para a saúde do kefir, uma outra via de interesse seria a investigação das atividades biológicas do kefir, como, por exemplo, a atividade antimicrobiana do kefir produzido sob diferentes condições. Como complemento desse estudo poderá também ser efetuado o estudo do perfil de peptídeos do produto final, uma vez que estes têm um papel importante em algumas atividades biológicas. Para além disso, esta análise fornece informação para uma melhor compreensão da atividade peptidolítica das bactérias lácticas no kefir.

VII. Referências Bibliográficas

- Abe F. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: Perspectives from piezophysiology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(10):2347–57.
- Abe F, Horikoshi K. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;130(2–3):307–12.
- Abe F, Horikoshi K. Vacuolar acidification in *Saccharomyces cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure is transient and is mediated by vacuolar H⁺ – ATPase. *Extremophiles*. 1997;1(2):89–93.
- Abe F, Horikoshi K. The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnology*. 2001;19(3):102–8.
- Abee T, Wouters JA. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*. 1999;50(1–2):65–91.
- Abraham AG, Antoni GLd. Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*. 1999;66(2):327–33.
- Aertsen A, Meersman F, Hendrickx MEG, Vogel RF, Michiels CW. Biotechnology under high pressure: Applications and implications. *Trends in Biotechnology*. 2009;27(7):434–41.
- Aertsen A, Vanoirbeek K, De Spiegeleer P, Sermon J, Hauben K, Farewell A, *et al*. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(5):2660–6.
- Alm L. Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. *Journal of Dairy Science*. 1982;65(4):515–20.
- Altay F, Karbancıoğlu-Güler F, Daskaya-Dikmen C, Heperkan D. A review on traditional turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;167(1):44–56.
- Ananta E, Knorr D. Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;96(3):307–13.
- Anonymous. Lactic acid bacteria. *Danone World Newsletter N° 5*. 1994.
- Apar DK, Demirhan E, Özel B, Özbek B. Kefir grain biomass production: Influence of different culturing conditions and examination of growth kinetic models. *Journal of Food Process Engineering*. 2016:1-9.
- Assadi MM, Pourahmad R, Moazami N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 2000;16(6):541–3.
- Badel S, Bernardi T, Michaud P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 2011;29(1):54–66.
- Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJA, Kötter P, Luttik MAH, van Dijken JP, *et al*. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001;25(1):15–37.
- Bartlett DH. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002;1595(1–2):367–81.
- Beshkova DM, Simova ED, Frengova GI, Simov ZI, Dimitrov ZP. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*. 2003;13(7):529–35.

- Beshkova DM, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov ZN. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*. 2002;19(5):537–44.
- Bothun GD, Knutson BL, Berberich JA, Strobel HJ, Nokes SE. Metabolic selectivity and growth of *Clostridium thermocellum* in continuous culture under elevated hydrostatic pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;65(2):149–57.
- Bravim F, Lippman SI, da Silva LF, Souza DT, Fernandes AAR, Masuda CA, *et al.* High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(5):2093–107.
- Chandan RC. Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. 1st ed. Chandan RC, White CH, Kilara A, Hui YH., editor. USA: Blackwell Publishing; 2006. 364 p.
- Cheffel JC. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*. 1995;1(2–3):75–90.
- Cheirsilp B, Shimizu H, Shioya S. Modelling and optimization of environmental conditions for kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;57(5):639–46.
- Cheirsilp B, Shimizu H, Shioya S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 2003;100(1):43–53.
- Chifiriuc MC, Cioaca AB, Lazar V. In vitro assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe*. 2011;17(6):433–5.
- Daryaei H, Coventry J, Versteeg C, Sherkat F. Effects of high pressure treatment on glycolytic enzymes of *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010;11(2):245–9.
- De Ley J, Gillis M, Swings, J. Family VI acetobacteraceae. In: Krieg NR, Holt, JG, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 4th ed. USA: Williams & Wilkins; 1984. p. 267–8.
- Diels AMJ, Wuytack EY, Michiels CW. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;87(1–2):55–62.
- Dimitreli G, Antoniou KD. Effect of incubation temperature and caseinates on the rheological behaviour of kefir. *Procedia Food Science*. 2011;1:583–8.
- Dupont I, Roy D, Lapointe G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 2000;24(4):251–5.
- FAO/WHO. Milk and milk products. CODEX STAN 243-2003. 2011.
- Farkas DF, Hoover DG. High pressure processing. *Journal of Food Science*. 2000;65(s8):47–64.
- Farnworth ER. Kefir – A complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*. 2005;2(1):1–17.
- Farnworth ER, Mainville I. Kefir – A fermented milk product. In: Farnworth ER, editor. *Handbook of Fermented Functional Foods*. 2nd ed. USA: CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC; 2008. p. 89–127.

- Farrow JAE. Lactose hydrolysing enzymes in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* and also in some other species of streptococci. *Journal of Applied Bacteriology*. 1980;49(3):493–503.
- Farrow JAE, Garvie EI. Strains of *Streptococcus lactis* which contain β -galactosidase. *Journal of Dairy Research*. 1979;46(1):121–5.
- Fernandes PMB, Domitrovic T, Kao CM, Kurtenbach E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Letters*. 2004;556(1–3):153–60.
- Fisher K, Johnson MC, Ray B. Lactose hydrolyzing enzymes in *Lactobacillus acidophilus* strains. *Food Microbiology*. 1985;2(1):23–9.
- Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM, Simov ZI. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 2002;57(9–10):805–10.
- Galle S, Schwab C, Dal Bello F, Coffey A, Gänzle MG, Arendt EK. Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;155(3):105–12.
- Gao J, Gu F, Ruan H, Chen Q, He J, He G. Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell-free fraction of Tibetan kefir. *International Dairy Journal*. 2013;30(1):14–8.
- Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND, Cocaign-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *Journal of Bacteriology*. 1997;197(17):5282–7.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Characteristics of kefir prepared with different grain[ratio]milk ratios. *Journal of Dairy Research*. 1998;65(1):149–54.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 2001;68(4):639–52.
- Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AMY, Almeida LFC, Caride E, Gonçalves RB, *et al.* Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: Implications for vaccine development. *Journal of Virological Methods*. 2008;150(1–2):57–62.
- Georget E, Sevenich R, Reineke K, Mathys A, Heinz V, Callanan M, *et al.* Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2015;27:1–14.
- Gollwitzer H, Mittelmeier W, Brendle M, Weber P, Miethke T, Hofmann GO, *et al.* High hydrostatic pressure for disinfection of bone grafts and biomaterials: An experimental study. *The Open Orthopaedics Journal*. 2009;3:1–7.
- González Á, Hierro N, Poblet M, Mas A, Guillamón JM. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;102(3):295–304.
- Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*. 2011;151(3):284–8.
- Guzel-Seydim Z, Kök-Taş T, Greene AK. Kefir and koumiss: Microbiology and technology. In: Yildiz F, editor. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. 1st ed. USA: CRC Press/Taylor & Francis Group; 2010. p. 143–63.

- Guzel-Seydim Z, Seydim AC, Greene AK. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal of Dairy Science*. 2000;83(2):275–7.
- Guzel-seydim ZB, Seydim AC, Greene AK. Comparison of amino acid profiles of milk, yogurt and turkish kefir. *Milchwissenschaft*. 2003;58(3–4):3.
- Hamet MF, Piermaria JA, Abraham AG. Selection of EPS-producing lactobacillus strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;63(1):129–35.
- Haque A, Richardson RK, Morris ER. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*. 2001;15(4–6):593–602.
- Hickey MW, Hillier AJ, Jago GR. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986;51(4):825–31.
- Hite BH. The effect of pressure in the preservation of milk – A preliminary report. *West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin* 1899;58:15–35.
- Hofmann E, Kopperschläger G. Phosphofruktokinase from yeast. In: Willis AW, editor. *Methods in Enzymology*. 1st ed. USA: Academic Press; 1982. p. 49–60.
- Holt JM, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JY, Williams ST. Genus acetobacter and gluconobacter. In: Holt JG, editor. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. USA: Williams & Wilkens; 1994. p. 71–84.
- Hörmann S, Scheyhing C, Behr J, Pavlovic M, Ehrmann M, Vogel RF. Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T. *Proteomics*. 2006;6(6):1878–85.
- Huang HW, Lung HM, Yang BB, Wang CY. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*. 2014;40(1):250–9.
- Hugas M, Garriga M, Monfort JM. New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Science*. 2002;62(3):359–71.
- Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez FC. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*. 2005;90(4):613–20.
- Irigoyen A, Ortigosa M, Torre P, Ibanez F. Influence of different technological parameters in the evolution of pH during fermentation of kefir. *Milk Science International*. 2003;58(11–12):631–3.
- Ismaiel AA, Ghaly MF, El-Naggar AK. Some physicochemical analyses of kefir produced under different fermentation conditions. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2011;70(5):365–72.
- Iwahashi H, Odani M, Ishidou E, Kitagawa E. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS Letters*. 2005;579(13):2847–52.
- Jankowska A, Rejs A, Proszek A, Krasowska M, Porowski S, Szczepek J. Influence of high pressure on some biochemical properties of kefir microflora (effect of HPP on kefir microflora). *High Pressure Research*. 2003;23(1–2):87–92.
- Jensen NB. Influence of Oxygen on Growth and Products Formation in Lactic Acid Bacteria [PhD]. Denmark: Technical University of Denmark; 1999.
- Kato N, Sato T, Kato C, Yajima M, Sugiyama J, Kanda T, et al. Viability and cellulose synthesizing ability of *Gluconacetobacter xylinus* cells under high-hydrostatic pressure. *Extremophiles*. 2007;11(5):693–8.

- Kim Y, Kim JU, Oh S, Kim YJ, Kim M, Kim SH. Technical optimization of culture conditions for the production of exopolysaccharide (EPS) by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. *Food Science and Biotechnology*. 2008;17(3):587–93.
- Knorr D. Novel approaches in food-processing technology: New technologies for preserving foods and modifying function. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999;10(5):485–91.
- Kök-Taş T, Seydim AC, Özer B, Guzel-Seydim ZB. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(2):780–9.
- Korbekandi H, Mortazavian AM, Irvani S. Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: Shah NP, da Cruz AG, Faria JAF, editors. *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the Human Health*. 1st ed. USA: Nova Science Publishers, Inc; 2011. p. 131–67.
- Koroleva NS. Technology of kefir and kumys. *Bulletin International Dairy Federation*. 1988;227:96–100.
- Krzyżewska A, Rejs A, Proszek A, Krasowska M, Warمیńska-Radyko I. Effect of high pressures on microflora of commercial kefir culture. In: Rikimaru H, editor. *Progress in Biotechnology*. 1st ed. Japan: Elsevier; 2002. p. 497–503.
- Kwak HS, Park SK, Kim DS. Biostabilization of kefir with a nonlactose – fermenting yeast. *Journal of Dairy Science*. 1996;79(6):937–42.
- Lado BH, Yousef AE. Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*. 2002;4(4):433–40.
- Lang F, Lang A. Acidophilus milk products: Little known cultured milks of great potential. *Milk Industry*. 1975;77(3):4–6.
- Lauro F, Bartlett D. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. *Extremophiles*. 2008;12(1):15–25.
- Leite AMD, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VMF. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44(2):341–9.
- Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk – Kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(7):2467–74.
- Liutkevicius A, Sarkinas A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – As a food and forage biomass. *Veterinarija ir Zootechnika*. 2004;25(47):64–70.
- Macgregor Jr RB. The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002;1595(1–2):266–76.
- Magalhães K, de M Pereira GV, Dias DR, Schwan RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26(7):1241–50.
- Magalhães KT, de Melo Pereira GV, Campos CR, Dragone G, Schwan RF. Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(2):693–702.
- Mainville I, Montpetit D, Durand N, Farnworth ER. Deactivating the bacteria and yeast in kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. *International Dairy Journal*. 2001;11(1–2):45–9.

- Mamlouk D, Gullo M. Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*. 2013;53(4):377–84.
- Marshall VM, Cole WM. Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *Journal of Dairy Research*. 1985;52(3):451–6.
- Matsushita K, Toyama H, Adachi O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 1994;36(1):247–301.
- Matsushita K, Toyama H, Adachi O. Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane bound periplasmic sugar and alcohol respirations. In: Zannoni D, editor. *Respiration in Archaea and Bacteria*. 1st ed. Netherlands: Springer Netherlands; 2004. p. 81–99.
- Medrano M, Racedo SM, Rolny IS, Abraham AG, Pérez PF. Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(10):5299–304.
- Mentré P, Hamraoui L, Hui Bon Hoa G, Debey P. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*. 1999;45(3):353–62.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–8.
- Miura T, Minegishi H, Usami R, Abe F. Systematic analysis of HSP gene expression and effects on cell growth and survival at high hydrostatic pressure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles*. 2006;10(4):279–84.
- Mohammadi R, Sohrabvandi S, Mortazavian AM. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering in Life Sciences*. 2012;12(4):399–409.
- Mota MJ, Lopes RP, Delgadillo I, Saraiva JA. Microorganisms under high pressure – Adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnology Advances*. 2013;31(8):1426–34.
- Mota MJ, Lopes RP, Delgadillo I, Saraiva JA. Probiotic yogurt production under high pressure and the possible use of pressure as an on/off switch to stop/start fermentation. *Process Biochemistry*. 2015;50(6):906–11.
- Nguyen HTH, Ong L, Kentish SE, Gras SL. The effect of fermentation temperature on the microstructure, physicochemical and rheological properties of probiotic buffalo yoghurt. *Food and Bioprocess Technology*. 2014;7(9):2538–48.
- Niven GW, Miles CA, Mackey BM. The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: An in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*. 1999;145(2):419–25.
- Norton T, Sun DW. Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*. 2008;1(1):2–34.
- NZYTech. Acetaldehyde, UV method. 2016; Available from: https://www.nzytech.com/files/brochures/AK0005_Acetaldehyde,%20UV%20method.pdf?76255a.
- NZYTech. D-/L-Lactic acid, UV method. 2016; Available from: https://www.nzytech.com/files/brochures/AK0014_D,L-Lactic%20acid,%20UV%20method.pdf?2f184a.

- NZYTech. Ethanol, UV method. 2016; Available from: https://www.nzytech.com/files/brochures/AK0006_Ethanol,%20UV%20method.pdf?d539dd.
- Oger PM, Jebbar M. The many ways of coping with pressure. *Research in Microbiology*. 2010;161(10):799–809.
- Olsson S. Production equipment for commercial use. In: Ledward DA, Johnston DE, Earnshaw RG, Hasting APM, editor. *High Pressure Processing of Foods*. 1st ed. UK: Nottingham University Press; 1996. p. 167–80.
- Otles S, Cagindi O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2003;2(2):54–9.
- Patterson M. High-pressure treatment of foods. In: Tortorello CABL, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. UK: Academic Press; 2014. p. 206–12.
- Pavlovic M, Hörmann S, Vogel RF, Ehrmann MA. Transcriptional response reveals translation machinery as target for high pressure in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Archives of Microbiology*. 2005;184(1):11–7.
- Pavlovic M, Hörmann S, Vogel RF, Ehrmann MA. Characterisation of a piezotolerant mutant of *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 2008;63(6):791–7.
- Picard A, Daniel I, Montagnac G, Oger P. In situ monitoring by quantitative Raman spectroscopy of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure. *Extremophiles*. 2007;11(3):445–52.
- Pribenszky C, Molnár M, Horváth A, Kútvölgyi G, Harnos A, Szenci O, *et al.* Improved post-thaw motility, viability, and fertility are achieved by hydrostatic pressure-treated bull semen. *Reproduction, Fertility and Development*. 2007;19(1):181–2.
- Ramaswamy HS, Chen C, Marcotte M. Novel processing technologies in food preservation. In: Barrett DM, Somogyi LP, Ramaswamy HS, editor. *Processing Fruits: Science and Technology*. 2nd ed. USA: CRC Press/Taylor & Francis Group; 1999. p. 201–20.
- Rasanayagam V, Balasubramaniam VM, Ting E, Sizer CE, Bush C, Anderson C. Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*. 2003;68(1):254–9.
- Ratray FP, O’Connell MJ. Fermented milks | Kefir. In: Fuquay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. USA: Academic Press; 2011. p. 518–24.
- Rea MC, Lennartsson T, Dillon P, Drinan FD, Reville WJ, Heapes M, *et al.* Irish kefir-like grains: Their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*. 1996;81(1):83–94.
- Reps A, Krzyżewska A, Łaniewska-Moroz Ł, Iwańczak M, Krasowska M. Effect of high pressure on mikroflora of kefir. In: Rikimaru H, editor. *Progress in Biotechnology*. 1st ed. Japan: Elsevier; 2002. p. 505–10.
- Rimada PS, Abraham AG. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*. 2001;68(4):653–61.
- Rivalain N, Roquain J, Demazeau G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances*. 2010;28(6):659–72.

- Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005;25(5):404–8.
- Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2002;12(2–3):163–71.
- Sarkar S. Potential of kefir as a dietetic beverage – A review. *British Food Journal*. 2007;109(4):280–90.
- Sarkar S. Biotechnological innovations in kefir production: A review. *British Food Journal*. 2008;110(3):283–95.
- Scheyhing CH, Hörmann S, Ehrmann MA, Vogel RF. Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T. *Letters in Applied Microbiology*. 2004;39(3):284–9.
- Schoevers A, Britz TJ. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *International Journal of Dairy Technology*. 2003;56(3):183–7.
- Shuler MN, Kargil F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. 2nd ed. USA: Prentice Hall; 2002. 553 p.
- Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, Vezzi A, D’Angelo M, Vitulo N, et al. Piezophilic adaptation: A genomic point of view. *Journal of Biotechnology*. 2006;126(1):11–25.
- Somero GN. Life at low volume change: Hydrostatic pressure as a selective factor in the aquatic environment. *American Zoologist*. 1990;30(1):123–35.
- Tamime AY, Marshall VME. Microbiology and technology of fermented milks. In: Law BA, editor. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. 2nd ed. USA: Springer USA; 1997. p. 57–152.
- Tamime AY, Skriver A, Nilsson LE. Starter cultures. In: Tamime AY, editor. *Fermented Milks*. 1st ed. UK: Blackwell Publishing Ltd; 2006. p. 11–52.
- Terefe NS. Food fermentation. *Reference Module in Food Science*. 2016:1–3.
- Tewari G, Jayas D, Holley R. High pressure processing of foods: An overview. *Sciences des aliments*. 1999;19(6):619–61.
- Thakur BR, Nelson PE. High-pressure processing and preservation of food. *Food Reviews International*. 1998;14(4):427–47.
- Torres JA, Velazquez G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*. 2005;67(1–2):95–112.
- Verlent I, Hendrickx M, Rovere P, Moldenaers P, Loey AV. Rheological properties of tomato-based products after thermal and high-pressure treatment. *Journal of Food Science*. 2006;71(3):S243–S8.
- Viljoen BC. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;69(1–2):37–44.
- Vinderola G, Perdígón G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoformans* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*. 2006;36(5–6):254–60.
- Walker GM. *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1st ed. UK: John Wiley & Sons; 1998. 203–64 p.

- Wang Y, Ahmed Z, Feng W, Li C, Song S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008;43(3):283–8.
- Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;84(2):341–7.
- Winter R, Jeworrek C. Effect of pressure on membranes. *Soft Matter*. 2009;5(17):3157–73.
- Witthuhn RC, Schoeman T, Britz TJ. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*. 2004;57(1):33–7.
- Wszolek M, Kupiec-Teahan B, Guldager HS, Tamime AY. Production of kefir, koumiss and other related products. In: Tamime AY editor. *Fermented Milks*. 1st ed. UK: Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 174–216.
- Wszolek M, Tamime AY, Muir DD, Barclay MNI. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *LWT - Food Science and Technology*. 2001;34(4):251–61.
- Yaldagard M, Mortazavi SA, Tabatabaie F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(16):2739–67.
- Yordanov DG, Angelova GV. High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010;24(3):1940–5.
- Zeece M, Huppertz T, Kelly A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2008;9(1):62–9.
- Zhou J, Liu X, Jiang H, Dong M. Analysis of the microflora in tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 2009;26(8):770–5.
- Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R, Boccio J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*. 2001;21(3):569–79.

VIII. Anexos

Anexo I – Dados da fermentação realizada à temperatura ambiente.....	80
Anexo II – Curvas de calibração.....	82
Anexo III – Análise estatística.....	84
Anexo IV – Cálculo de parâmetros cinéticos da fermentação	87
Anexo V – Análise cinética: Volume de ativação.....	90
Anexo VI – Análise cinética: Energia de ativação	102

Anexo I – Dados da fermentação realizada à temperatura ambiente

A **Tabela I** apresenta o registo das temperaturas registadas durante os ensaios realizados à temperatura ambiente.

Tabela I. Registo de temperaturas dos ensaios realizados à temperatura ambiente.

Temperatura (°C)	Média	Desvio padrão
17,1		
18,0		
18,0		
18,0		
18,0		
18,0		
18,0		
18,0		
18,0		
18,0		
15,8		
16,0		
16,2	17,0	1,0
16,2		
15,2		
14,7		
16,9		
16,6		
17,0		
16,9		
17,1		
16,9		
17,0		
17,1		
17,5		

Para cada um dos ensaios à temperatura ambiente foi efetuado um controlo, ou seja, uma amostra fermentada à pressão atmosférica (0,1 MPa) e na **Figura I** está representado o pH de cada um dos controlos realizados.

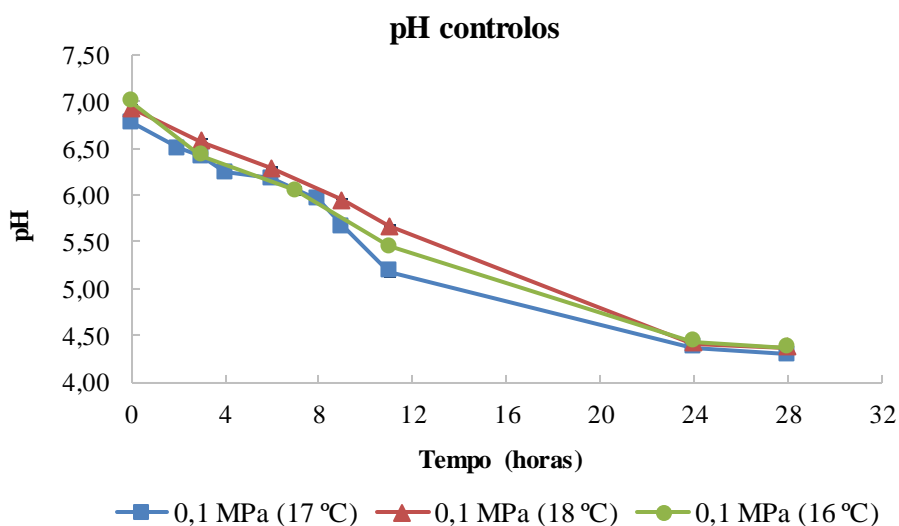


Figura I. Variação do pH ao longo do tempo de fermentação, à pressão atmosférica (0,1 MPa), a 16, 17 e 18 °C.

Anexo II – Curvas de calibração

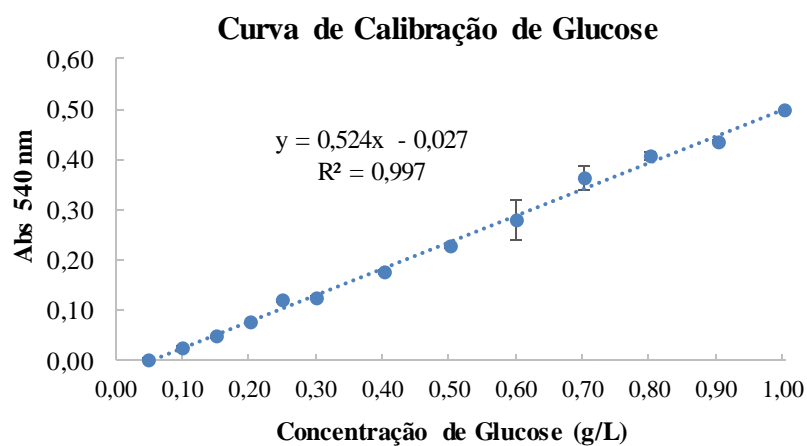


Figura II. Curva de calibração da concentração de glucose (g/L) pelo método do ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS), com as respetivas barras de erro.

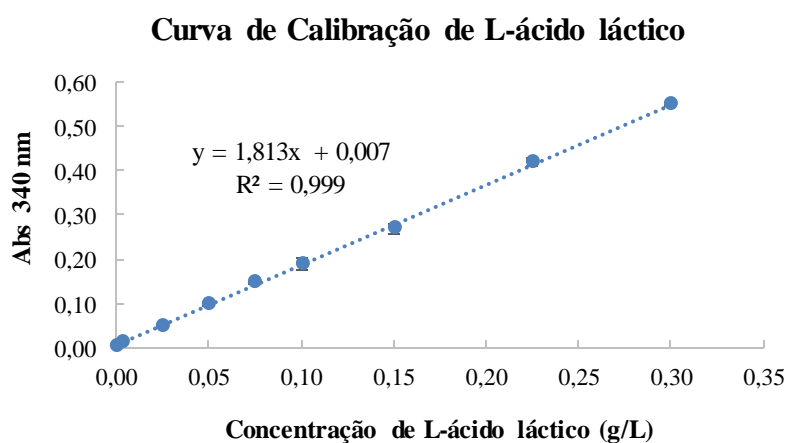


Figura III. Curva de calibração da concentração de L-ácido láctico (g/L) pelo kit enzimático D-/L-ácido láctico, com as respetivas barras de erro.

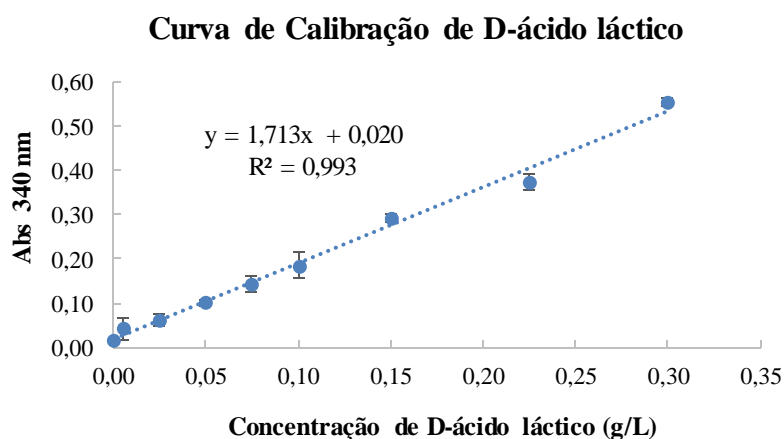


Figura IV. Curva de calibração da concentração de D-ácido láctico (g/L) pelo kit enzimático D-/L-ácido láctico, com as respectivas barras de erro.

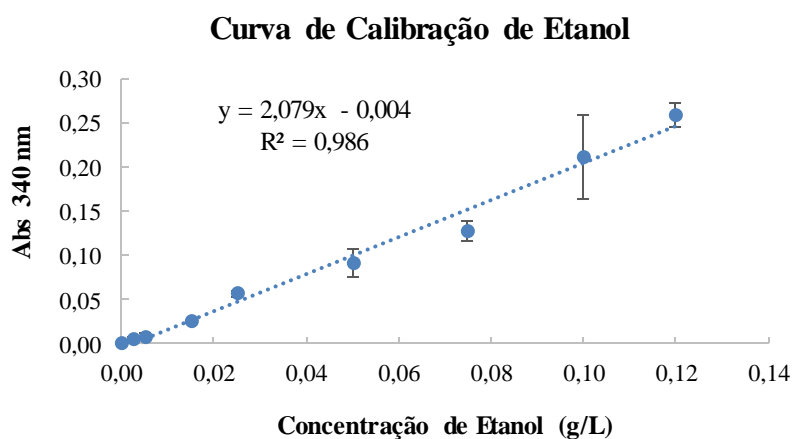


Figura V. Curva de calibração da concentração de etanol (g/L) pelo kit enzimático Etanol, com as respectivas barras de erro.

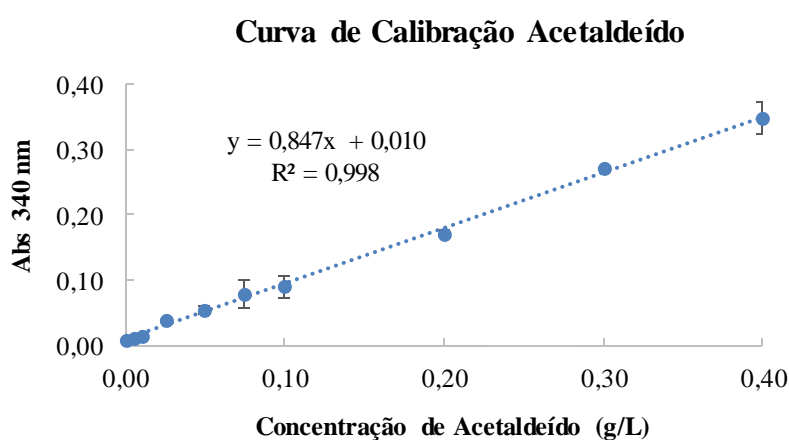


Figura VI. Curva de calibração da concentração de acetaldeído (g/L) pelo kit enzimático Acetaldeído, com as respectivas barras de erro.

Anexo III – Análise estatística

A análise estatística foi realizada para as diferentes secções do trabalho e em baixo são apresentadas as tabelas dos resultados obtidos. Deste modo, foram determinadas as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação. Nas tabelas, as células a cinza correspondem a situações em que as condições necessárias para a realização da análise estatística não foram satisfeitas.

1. Efeito da alta pressão na produção de kefir

a) Produção de kefir á temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^\circ\text{C}$)

Tabela II. Análise estatística efectuada para os valores de pH, na fermentação à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^\circ\text{C}$), em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)									
		2	3	4	6	7	8	9	11	24	28
Pressão (MPa)	0,1	b	c	b	b	b	b	c	c	d	d
	7	a		a	b		a		c	c	c
	15		b		b			b	b	c	c
	30		a		a			a	ab	b	b
	50		ab			a			a	a	a

Tabela III. Análise estatística efectuada para a acidez titulável, expressa em ácido láctico, na fermentação à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^\circ\text{C}$), em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)									
		2	3	4	6	7	8	9	11	24	28
Pressão (MPa)	0,1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	7	a		a	a		b		ab	a	a
	15		a		a			a	bc	b	b
	30		a		a			a	bc	b	b
	50		a			b			c	c	c

Tabela IV. Análise estatística efetuada para a concentração de açúcares redutores, na fermentação à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$), em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)									
		2	3	4	6	7	8	9	11	24	28
Pressão (MPa)	0,1	a	a	a	a	a	a	b	b	c	d
	7	a		a	a		b		b	b	cd
	15		a		a			b	ab	b	bc
	30		a		a			a	a	ab	ab
	50		a			a			a	a	a

Tabela V. Análise estatística efetuada para a concentração de L-ácido láctico, na fermentação à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$), em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)									
		2	3	4	6	7	8	9	11	24	28
Pressão (MPa)	0,1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	7	a		b	b		b		a	a	ab
	15		ab		b			b	b	b	b
	30		ab		b			b	b	c	c
	50		b			b			b	d	d

b) Produção de kefir a 25 e 32 °C

i. Fermentação a 25 °C

Tabela VI. Análise estatística efetuada para os valores de pH, na fermentação a 25 °C, em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)									
		2	4	6	8	10	24	28	32	48	72
Pressão (MPa)	0,1	c	b	b	a	b	c	b	c	b	b
	15	b	b	b	a	b	b	a	b	b	b
	50	a	a	a		a	a		a	a	a

Tabela VII. Análise estatística efetuada para a acidez titulável, expressa em ácido láctico, na fermentação a 25 °C, em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)									
		2	4	6	8	10	24	28	32	48	72
Pressão (MPa)	0,1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	15	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a
	50	a	b	b		b	b		b	c	b

ii. Fermentação a 32 °C

Tabela VIII. Análise estatística efetuada para os valores de pH, na fermentação a 32 °C, em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)								
		1,5	3	4,5	6	8	10	24	28	32
Pressão (MPa)	0,1	a	b	b	c	c	c	c	c	c
	15	a	a	a	b	b	b	b	b	b
	50		a		a	a	a	a	a	a

Tabela IX. Análise estatística efetuada para a acidez titulável, expressa em ácido láctico na fermentação a 32 °C, em que diferentes letras denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes amostras, para o mesmo tempo de fermentação (a-d).

		Tempo (horas)								
		1,5	3	4,5	6	8	10	24	28	32
Pressão (MPa)	0,1	a	a	a	b	a	a	a	a	a
	15	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	50		b		c	b	b	b	b	b

Anexo IV – Cálculo de parâmetros cinéticos da fermentação

1. Taxas de consumo de substrato

Para se efetuar o cálculo das taxas de consumo de substrato, selecionaram-se os valores da concentração de açúcares redutores, que traduzem a concentração de substrato, ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). Desta forma, pelo declive da reta foi possível determinar a taxa de consumo de substrato (mg/g.h) (**Figura VII**).

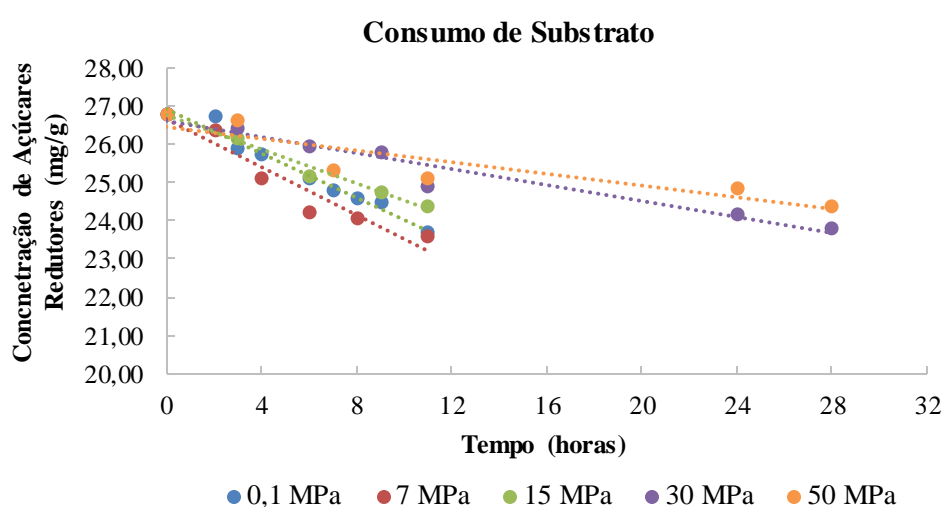


Figura VII. Concentração de açúcares redutores (mg/g) em função do tempo, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

2. Taxas de formação de produto

Para se efetuar o cálculo das taxas de formação de produto, selecionaram-se os valores da concentração de ácido láctico, que traduzem a concentração de produto, ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). Desta forma, pelo declive da reta foi possível determinar a taxa de formação de produto (mg/g.h), às diferentes temperaturas (**Figuras VIII, IX e X**).

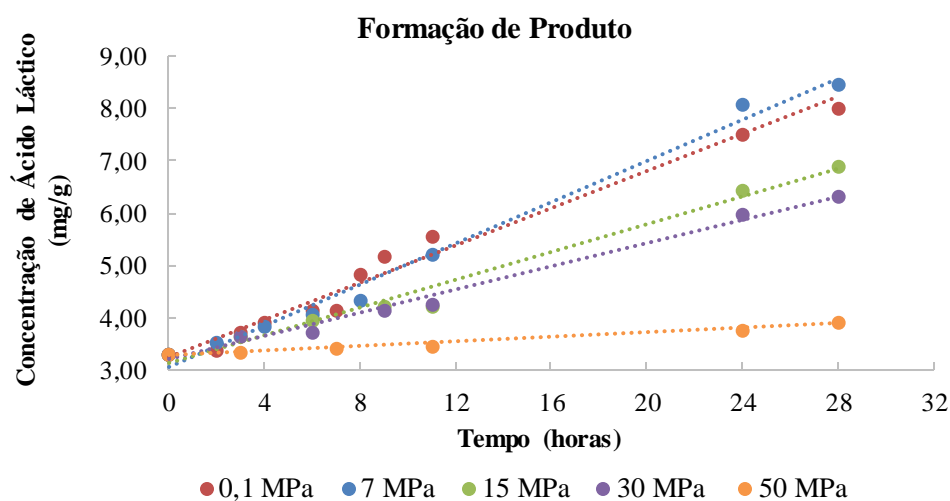


Figura VIII. Concentração de ácido láctico (mg/g) em função do tempo, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente (≈ 17 °C).

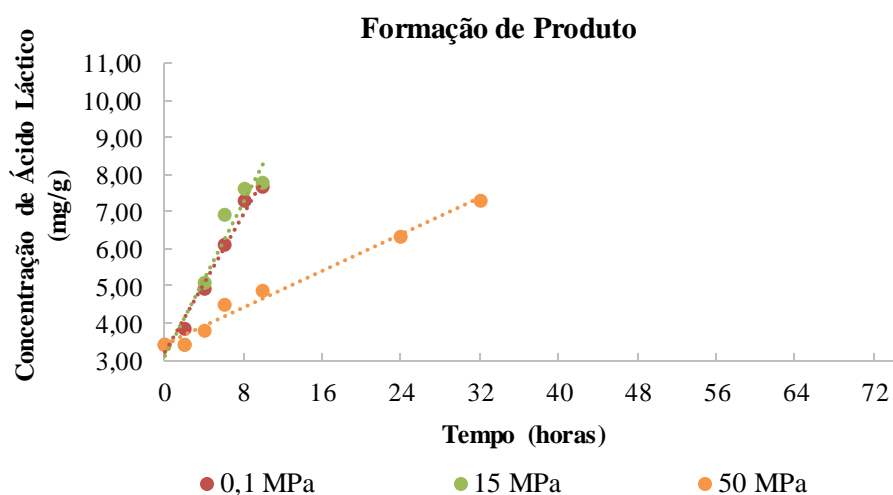


Figura IX. Concentração de ácido láctico (mg/g) em função do tempo, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 25 °C.

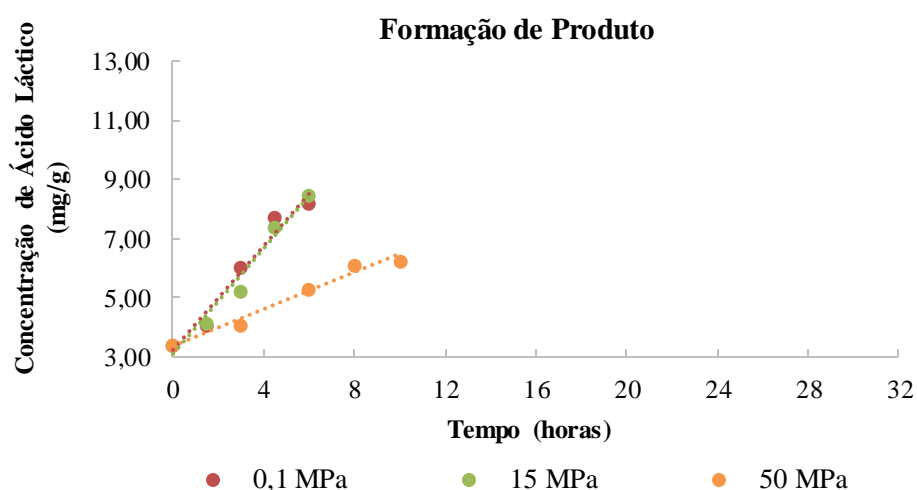


Figura X. Concentração de ácido láctico (mg/g) em função do tempo, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 32 °C.

3. Rendimento da fermentação

Para se efetuar o cálculo do rendimento da fermentação, selecionaram-se os valores da concentração de ácido láctico em função da concentração de açúcares redutores, para as diferentes condições de pressão e pelo declive da reta foi possível obter o rendimento da fermentação (mg de produto formado/mg de substrato consumido) (**Figura XI**).

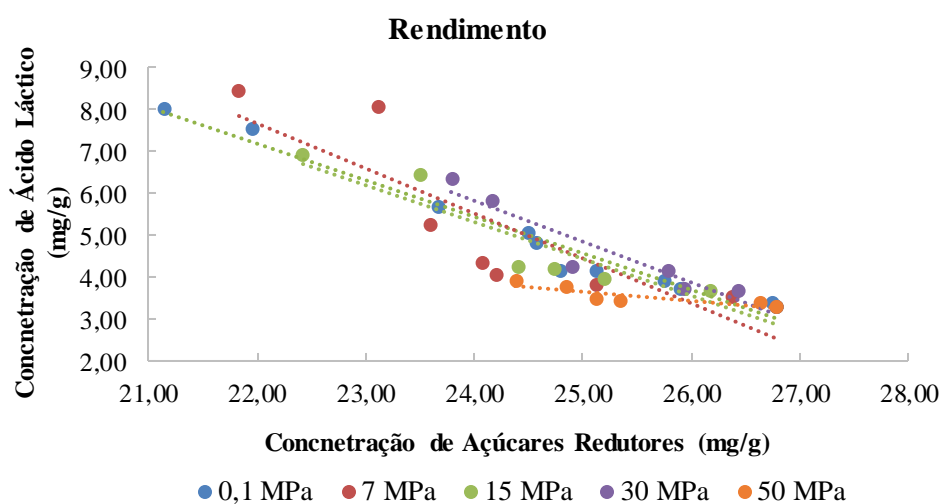


Figura XI. Concentração de ácido láctico (mg/g) em função da concentração de açúcares redutores (mg/g), sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente (≈ 17 °C).

Anexo V – Análise cinética: Volume de ativação

1. Efeito da alta pressão na produção de kefir à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$)

a) Concentração de H^+

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação de pH ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores de pH foi possível determinar a concentração de H^+ e calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XII**).

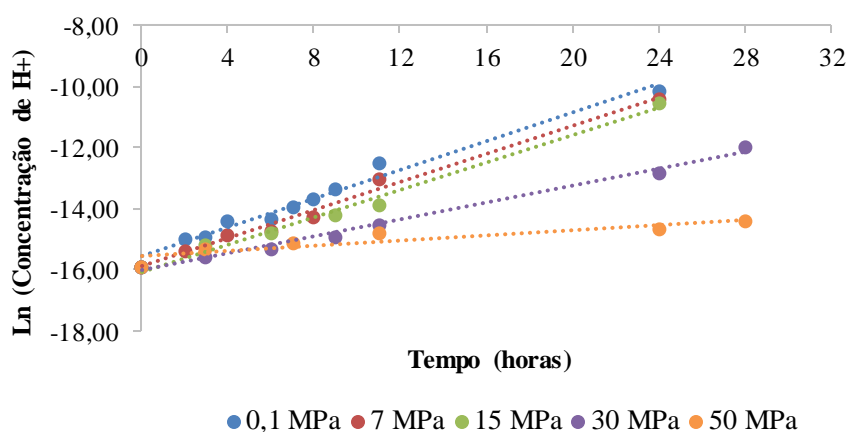


Figura XII. Logaritmo neperiano da concentração de H^+ em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Na **Tabela X** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XII**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314\text{ (cm}^3\cdot\text{MPa)} / (\text{K}\cdot\text{mol})$ e $T = 290,15\text{ K}$.

Tabela X. Constante de velocidade, $k\text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de H^+ e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Pressão (MPa)	-Pressão/($R\cdot T$)	Ln(Concentração de H^+) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
0,1	-4,15E-05	0,233	0,98	-1,457
7	-2,90 E-03	0,230	0,99	-1,470
15	-6,22 E-03	0,222	0,99	-1,505
30	-1,24 E-02	0,138	0,99	-1,978
50	-2,07 E-02	0,042	0,84	-3,170

Com os valores exibidos na **Tabela X**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XIII**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a concentração de H^+ ($83,86 \text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

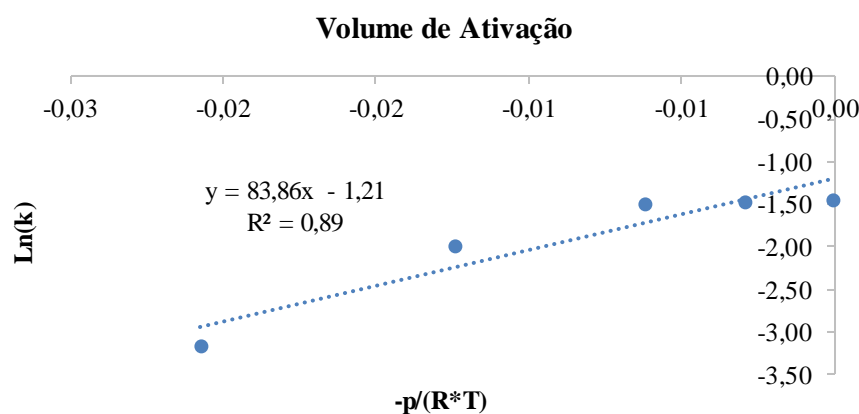


Figura XIII. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de H^+ durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

b) Acidez titulável

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores da acidez titulável, expressa em concentração de ácido láctico, foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XIV**).

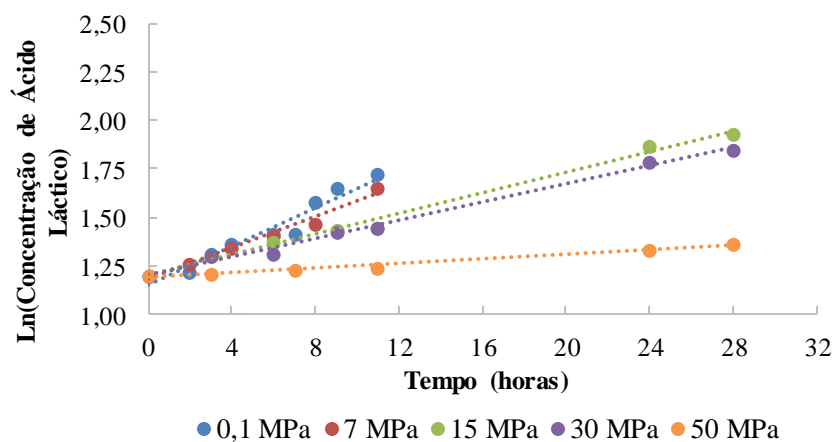


Figura XIV. Logaritmo neperiano da concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

Na **Tabela XI** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XIV**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314 \text{ (cm}^3 \cdot \text{MPa)/(K} \cdot \text{mol)}$ e $T = 290,15 \text{ K}$.

Tabela XI. Constante de velocidade, $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Acidez Titulável) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
0,1	-4,15E-05	0,050	0,95	-2,996
7	-2,90 E-03	0,040	0,98	-3,219
15	-6,22 E-03	0,027	0,99	-3,612
30	-1,24 E-02	0,023	0,99	-3,772
50	-2,07 E-02	0,006	0,99	-5,116

Com os valores exibidos na **Tabela XI**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XV**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a acidez titulável ($96,88 \text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

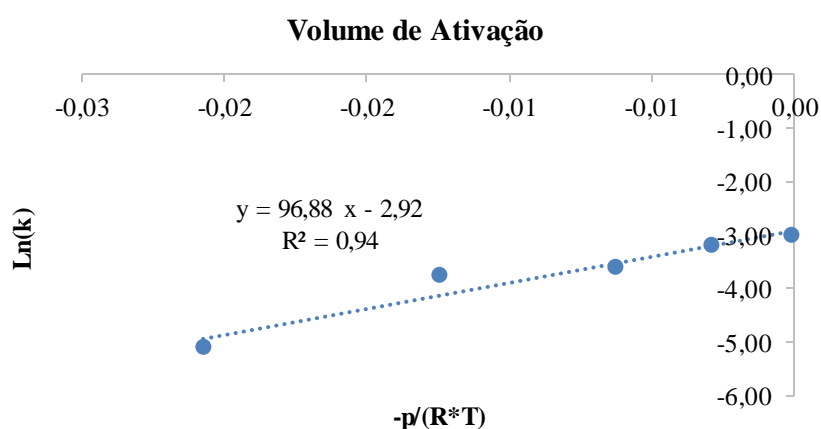


Figura XV. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de ácido láctico durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, à temperatura ambiente ($\approx 17 \text{ }^\circ\text{C}$).

c) Concentração de açúcares redutores

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores da

concentração de açúcares redutores foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (Figura XVI).

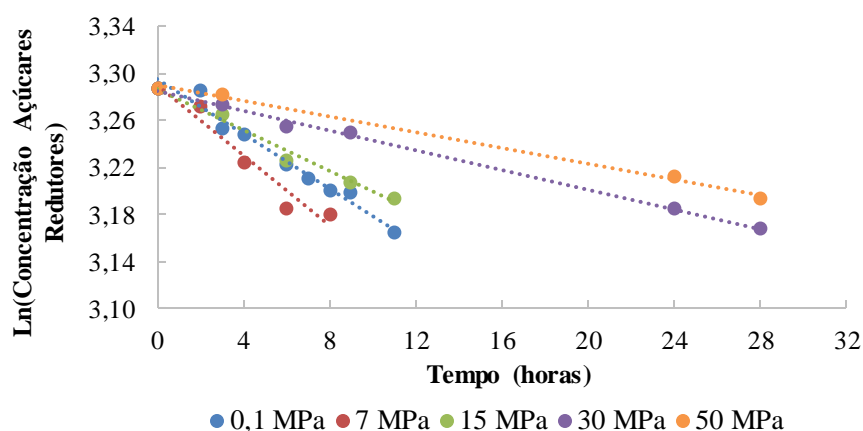


Figura XVI. Logaritmo neperiano da concentração de açúcares redutores em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Na **Tabela XII** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XVI**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314\text{ (cm}^3\cdot\text{MPa)} / (\text{K}\cdot\text{mol})$ e $T = 290,15\text{ K}$.

Tabela XII. Constante de velocidade, $k\text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de açúcares redutores e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Concentração de Açúcares Redutores) vs. Tempo		
		m = k	R ²	ln(k)
0,1	-4,15E-05	0,011	0,97	-4,510
7	-2,90 E-03	0,015	0,95	-4,200
15	-6,22 E-03	0,009	0,98	-4,711
30	-1,24 E-02	0,004	1,00	-5,521
50	-2,07 E-02	0,003	1,00	-5,809

Com os valores exibidos na **Tabela XII**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XVII**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a concentração de açúcares redutores ($77,72\text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

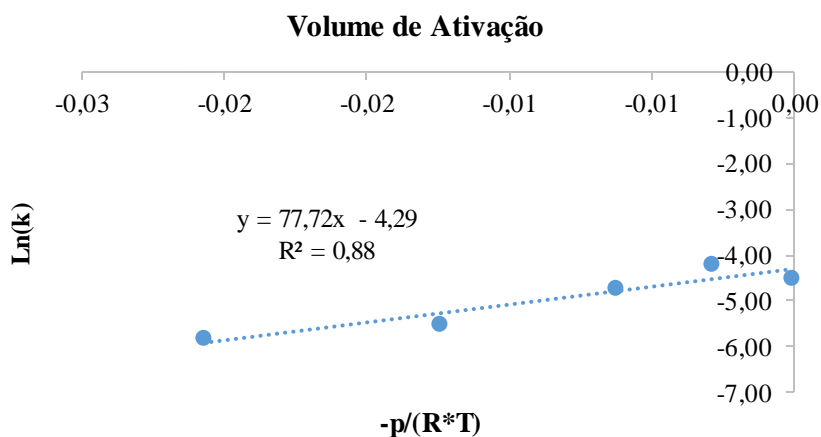


Figura XVII. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de açúcares redutores durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

d) Concentração de L-ácido láctico

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação da concentração de L-ácido láctico ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores da concentração de L-ácido láctico foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XVIII**).

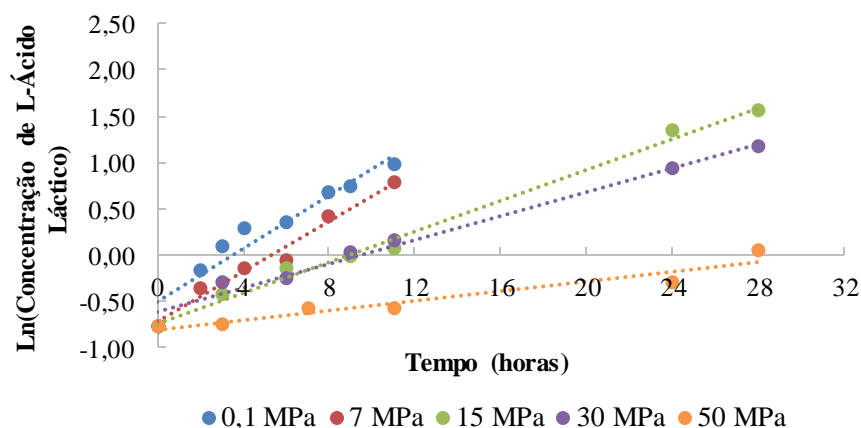


Figura XVIII. Logaritmo neperiano da concentração de L-ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17^\circ\text{C}$).

Na **Tabela XIII** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XVIII**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314 \text{ (cm}^3 \cdot \text{MPa)/(K} \cdot \text{mol)}$ e $T = 290,15 \text{ K}$.

Tabela XIII. Constante de velocidade, $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de L-ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), à temperatura ambiente ($\approx 17 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Concentração de L-ácido láctico) vs. Tempo		
		m = k	R ²	ln(k)
0,1	-4,15E-05	0,143	0,93	-1,945
7	-2,90 E-03	0,136	0,98	-1,995
15	-6,22 E-03	0,083	0,99	-2,489
30	-1,24 E-02	0,065	0,98	-2,733
50	-2,07 E-02	0,026	0,92	-3,650

Com os valores exibidos na **Tabela XIII**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XIX**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a concentração de L-ácido láctico ($82,52 \text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

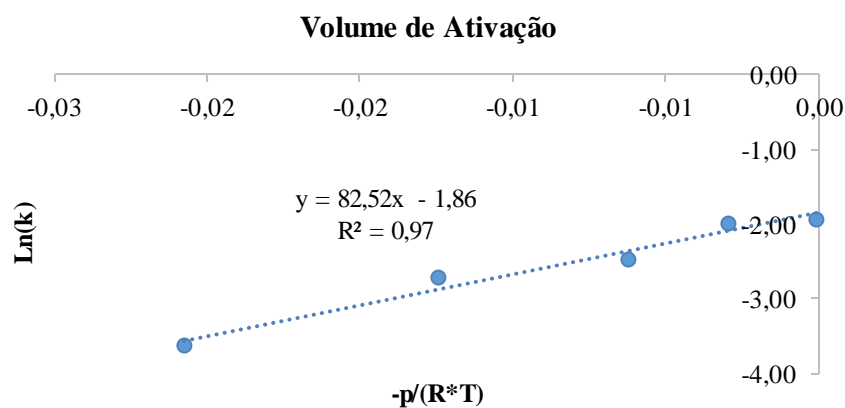


Figura XIX. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de L-ácido láctico durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, à temperatura ambiente ($\approx 17 \text{ }^\circ\text{C}$).

2. Efeito da alta pressão na produção de kefir a 25 e a 32 °C

2.1. Fermentação a 25 °C

a) Concentração de H⁺

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação de pH ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores de pH foi possível determinar a concentração de H⁺ e calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XX**).

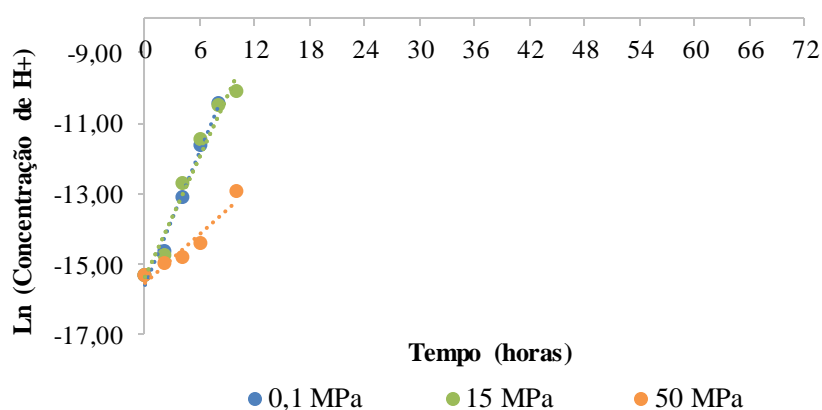


Figura XX. Logaritmo neperiano da concentração de H⁺ em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 25 °C.

Na **Tabela XIV** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XX**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314 \text{ (cm}^3 \cdot \text{MPa)/(K} \cdot \text{mol)}$ e $T = 298,15 \text{ K}$.

Tabela XIV. Constante de velocidade, $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de H⁺ e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 25 °C.

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Concentração de H ⁺) vs. Tempo		
		m = k	R ²	ln(k)
0,1	-4,03E-05	0,638	0,99	-0,449
15	-6,05E-03	0,572	0,96	-0,559
50	-2,02E-02	0,233	0,93	-1,457

Com os valores exibidos na **Tabela XIV**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XXI**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a concentração de H^+ ($52,46 \text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

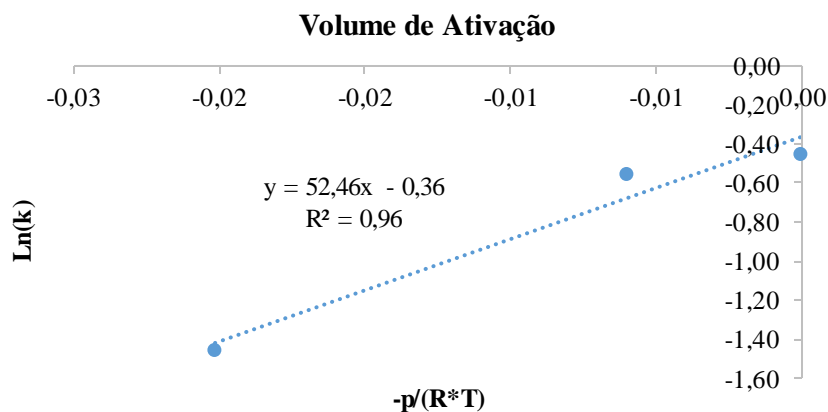


Figura XXI. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de H^+ durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, a 25°C .

b) Acidez titulável

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores da acidez titulável, expressa em concentração de ácido láctico, foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXII**).

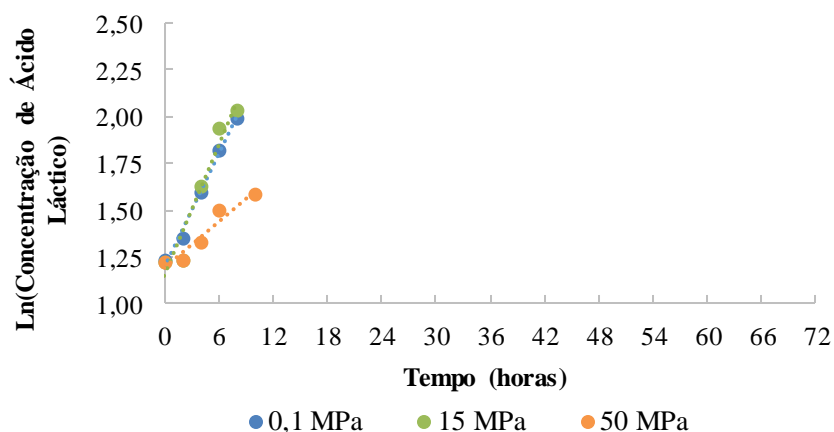


Figura XXII. Logaritmo neperiano da concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 25°C .

Na **Tabela XV** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXII**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314 \text{ (cm}^3 \cdot \text{MPa)} / (\text{K} \cdot \text{mol})$ e $T = 298,15 \text{ K}$.

Tabela XV. Constante de velocidade, $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Acidez Titulável) vs. Tempo		
		m = k	R ²	ln(k)
0,1	-4,03E-05	0,099	0,99	-2,313
15	-6,05E-03	0,116	0,93	-2,154
50	-2,02E-02	0,040	0,93	-3,219

Com os valores exibidos na **Tabela XV**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XXIII**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a acidez titulável ($50,45 \text{ cm}^3/\text{mol}$) que corresponde ao declive da reta.

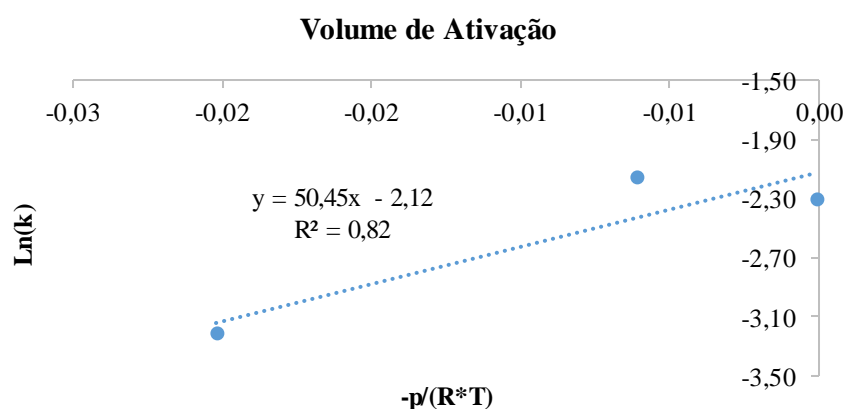


Figura XXIII. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de ácido láctico durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Fermentação a $32 \text{ }^\circ\text{C}$

a) Concentração de H^+

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação de pH ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores de pH foi possível determinar a concentração de H^+ e calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXIV**).

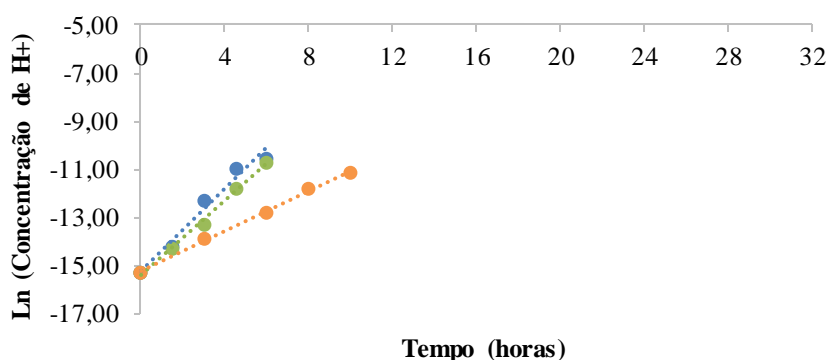


Figura XXIV. Logaritmo neperiano da concentração de H^+ em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 32°C.

Na **Tabela XVI** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXIV**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314 \text{ (cm}^3 \cdot \text{MPa)/(K} \cdot \text{mol)}$ e $T = 305,15 \text{ K}$.

Tabela XVI. Constante de velocidade, $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$, para a concentração de H^+ e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 32 °C.

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Concentração de H^+) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
0,1	-3,94E-05	0,854	0,97	-0,158
15	-5,91E-03	0,771	0,99	-0,260
50	-1,97E-02	0,418	1,00	-0,872

Com os valores exibidos na **Tabela XVI**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XXV**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a concentração de H^+ ($37,76 \text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

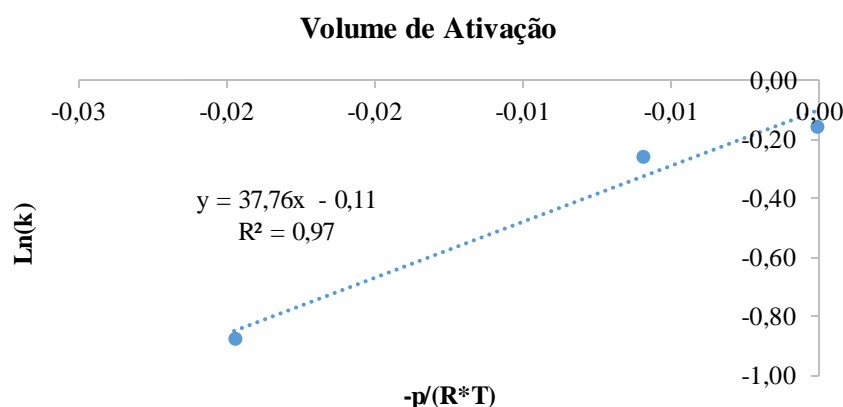


Figura XXV. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de H^+ durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, a $32\text{ }^\circ\text{C}$.

b) Acidez titulável

Para se efetuar o cálculo do volume de ativação, selecionaram-se valores da variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de pressão). A partir dos valores da acidez titulável, expressa em concentração de ácido láctico, foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXVI**).

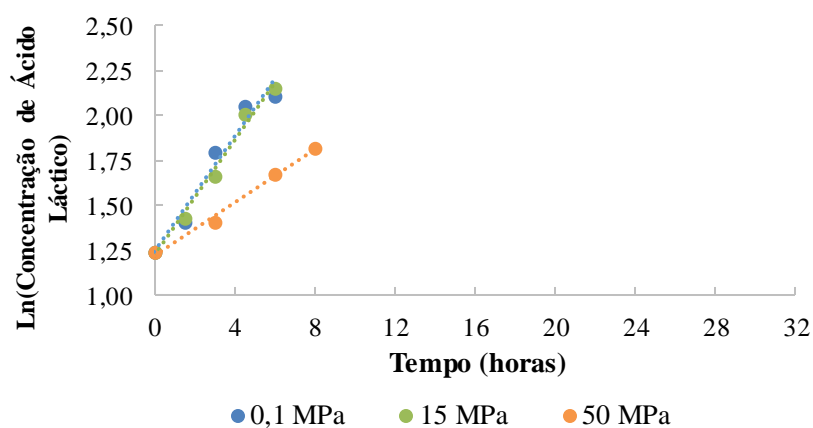


Figura XXVI. Logaritmo neperiano da concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a $32\text{ }^\circ\text{C}$.

Na **Tabela XVII** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXVI**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314\text{ (cm}^3\cdot\text{MPa)/(K}\cdot\text{mol)}$ e $T = 305,15\text{ K}$.

Tabela XVII. Constante de velocidade, k (h^{-1}), para a concentração de ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de pressão (0,1 – 50 MPa), a 32 °C.

Pressão (MPa)	-Pressão/(R*T)	Ln(Acidez Titulável) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
0,1	-3,94E-05	0,158	0,95	-1,845
15	-5,91E-03	0,159	0,99	-1,839
50	-1,97E-02	0,073	0,99	-2,617

Com os valores exibidos na **Tabela XVII**, calculou-se a relação linear presente na **Figura XXVII**, a partir da qual se determinou o volume de ativação para a acidez titulável ($42,32 \text{ cm}^3/\text{mol}$), que corresponde ao declive da reta.

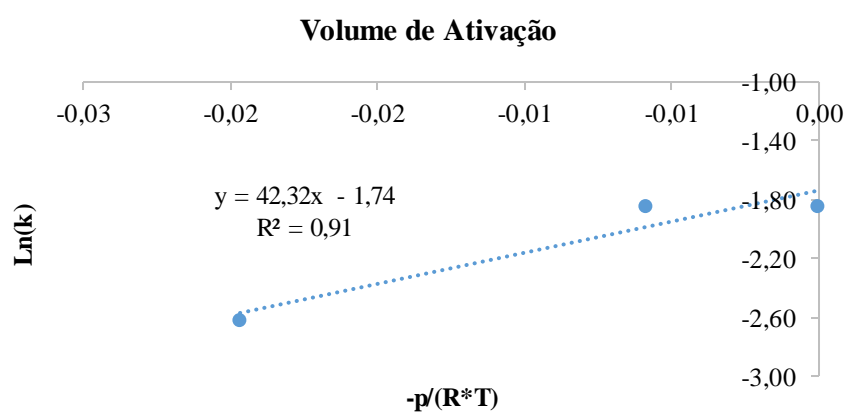


Figura XXVII. Cálculo do volume de ativação, (V_a), em cm^3/mol , para a concentração de ácido láctico durante a fermentação, sob diferentes condições de pressão, correspondente ao declive da reta, a 32 °C

Anexo VI – Análise cinética: Energia de ativação

1. Fermentação à pressão atmosférica (0,1 MPa)

a) Concentração de H⁺

Para se efetuar o cálculo da energia de ativação, selecionaram-se valores da variação de pH ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de temperatura). A partir dos valores de pH foi possível determinar a concentração de H⁺ e calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXVIII**).

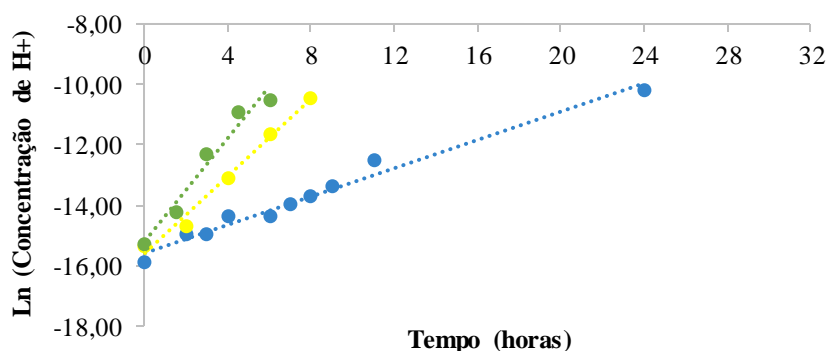


Figura XXVIII. Logaritmo neperiano da concentração de H⁺ em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 0,1 MPa.

Na **Tabela XVIII** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXVIII**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314$ (J/K.mol).

Tabela XVIII. Constante de velocidade, k (h⁻¹), para a concentração de H⁺ e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 0,1 MPa.

Temperatura (°C)	$-1/(R \cdot T)$	Ln(Concentração de H ⁺) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
17	-4,15E-01	0,233	0,98	-1,457
25	-4,03E-01	0,638	0,99	-0,449
32	-3,94E-01	0,854	0,97	-0,158

Com os valores exibidos na **Tabela XVIII** calculou-se a relação linear presente na **Figura XXIX**, a partir da qual se determinou a energia de ativação para a concentração de H^+ (64,63 kJ/mol), que corresponde ao declive da reta.

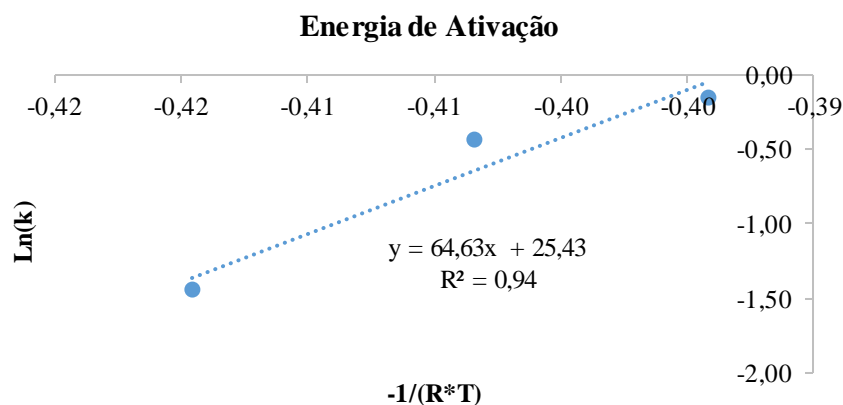


Figura XXIX. Cálculo da energia de ativação, (E_a), em kJ/mol, para a concentração de H^+ durante a fermentação, sob diferentes condições de temperatura, correspondente ao declive da reta, a 0,1 MPa.

b) Acidez titulável

Para se efetuar o cálculo da energia de ativação, selecionaram-se valores da variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de temperatura). A partir dos valores da acidez titulável, expressa em concentração de ácido láctico, foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXX**).

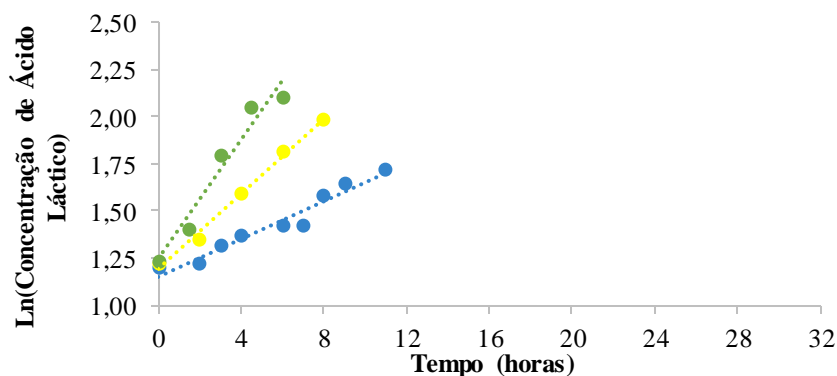


Figura XXX. Logaritmo neperiano da concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 0,1 MPa.

Na **Tabela XIX** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXX**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314$ (J/K.mol).

Tabela XIX. Constante de velocidade, k (h^{-1}), para a concentração de ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 0,1 MPa.

Temperatura (°C)	$-1/(R*T)$	Ln(Acidez Titulável) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
17	-4,15E-01	0,050	0,95	-2,996
25	-4,03E-01	0,099	0,99	-2,313
32	-3,94E-01	0,158	0,95	-1,845

Com os valores exibidos na **Tabela XIX** calculou-se a relação linear presente na **Figura XXXI**, a partir da qual se determinou a energia de ativação para a acidez titulável (56,63 kJ/mol), que corresponde ao declive da reta.

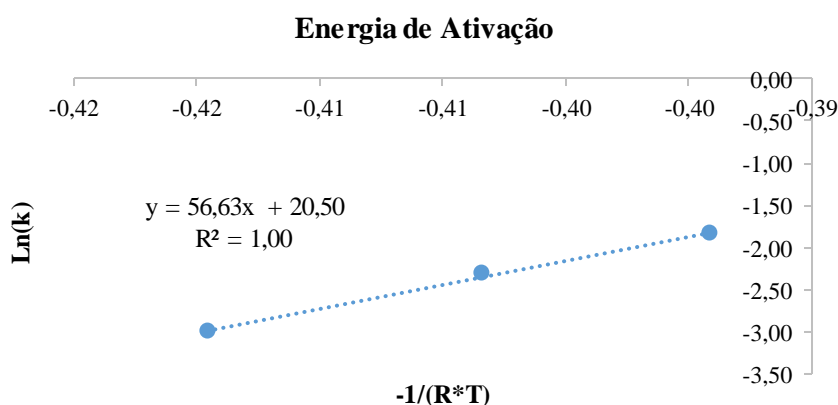


Figura XXXI. Cálculo da energia de ativação, (E_a), em kJ/mol, para a concentração de ácido láctico durante a fermentação, sob diferentes condições de temperatura, correspondente ao declive da reta, a 0,1 MPa.

2. Fermentação a 15 MPa

a) Concentração de H^+

Para se efetuar o cálculo da energia de ativação, selecionaram-se valores da variação de pH ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de temperatura). A partir dos valores de pH foi possível determinar a concentração de H^+ e calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXXII**).

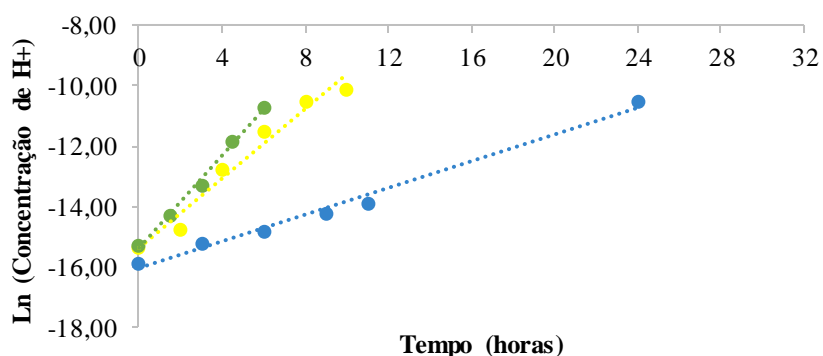


Figura XXXII. Logaritmo neperiano da concentração de H^+ em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 15 MPa.

Na **Tabela XX** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXXII**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314$ (J/K.mol).

Tabela XX. Constante de velocidade, k (h^{-1}), para a concentração de H^+ e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 15 MPa.

Temperatura (°C)	$-1/(R \cdot T)$	Ln(Concentração de H^+) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
17	-4,15E-01	0,222	0,99	-1,505
25	-4,03E-01	0,572	0,96	-0,559
32	-3,94E-01	0,771	0,99	-0,260

Com os valores exibidos na **Tabela XX** calculou-se a relação linear presente na **Figura XXXIII**, a partir da qual se determinou a energia de ativação para a concentração de H^+ (61,90 kJ/mol), que corresponde ao declive da reta.

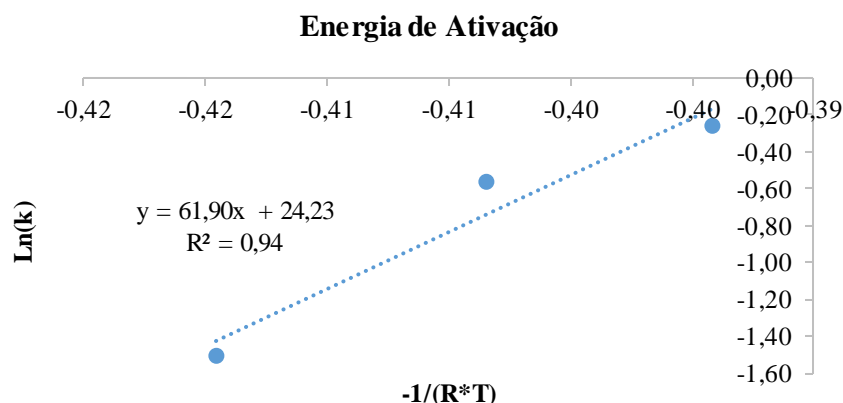


Figura XXXIII. Cálculo da energia de ativação, (E_a), em kJ/mol, para a concentração de H^+ durante a fermentação sob diferentes condições de temperatura, correspondente ao declive da reta, a 15 MPa.

b) Acidez titulável

Para se efetuar o cálculo da energia de ativação, selecionaram-se valores da variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de temperatura). A partir dos valores da acidez titulável, expressa em concentração de ácido láctico, foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXXIV**).

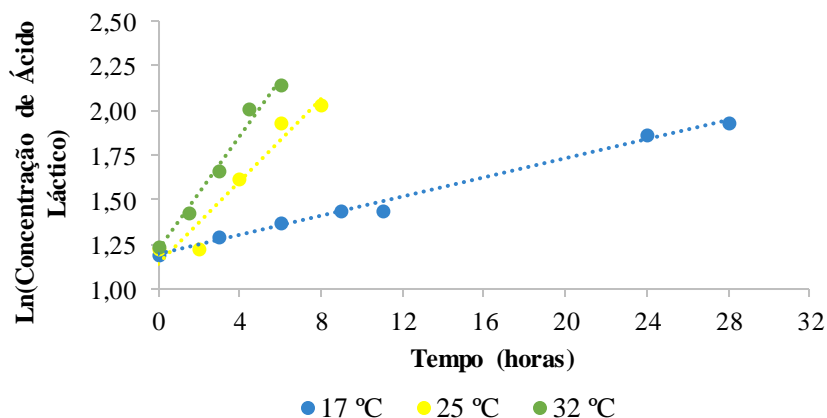


Figura XXXIV. Logaritmo neperiano da concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 15 MPa.

Na **Tabela XXI** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXXIV**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314$ (J/K.mol).

Tabela XXI. Constante de velocidade, k (h^{-1}), para a concentração de ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 15 MPa.

Temperatura (°C)	$-1/(R \cdot T)$	Ln(Acidez Titulável) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
17	-4,15E-01	0,027	0,99	-3,612
25	-4,03E-01	0,116	0,93	-2,154
32	-3,94E-01	0,159	0,99	-1,839

Com os valores exibidos na **Tabela XXI** calculou-se a relação linear presente na **Figura XXXV**, a partir da qual se determinou a energia de ativação para a acidez titulável (88,48 kJ/mol), que corresponde ao declive da reta.

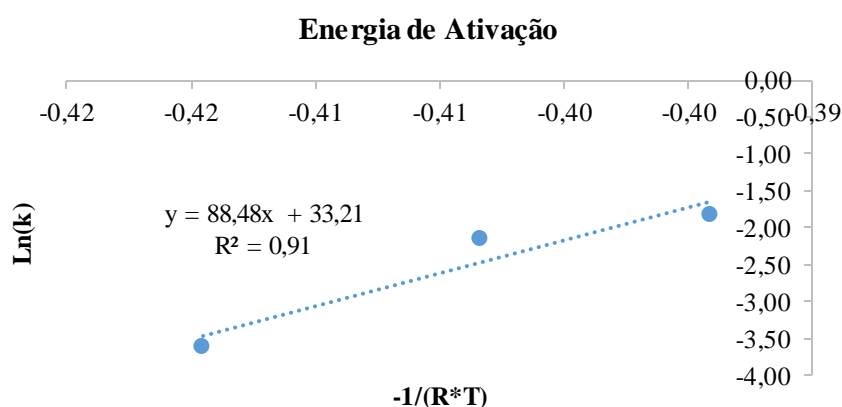


Figura XXXV. Cálculo da energia de ativação, (E_a), em kJ/mol, para a concentração de ácido láctico durante a fermentação sob diferentes condições de temperatura, correspondente ao declive da reta, a 15 MPa.

3. Fermentação a 50 MPa

a) Concentração de H^+

Para se efetuar o cálculo da energia de ativação, selecionaram-se valores da variação de pH ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de temperatura). A partir dos valores de pH foi possível determinar a concentração de H^+ e calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXXVI**).

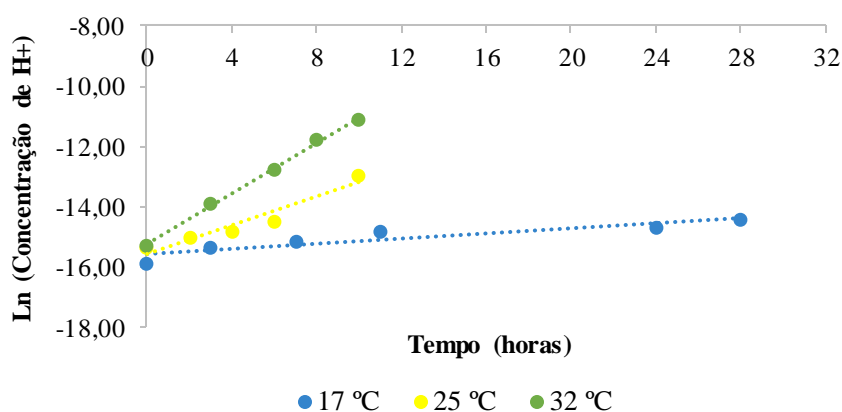


Figura XXXVI. Logaritmo neperiano da concentração de H^+ em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 50 MPa.

Na **Tabela XXII** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXXVI**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314$ (J/K.mol).

Tabela XXII. Constante de velocidade, k (h^{-1}), para a concentração de H^+ e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 50 MPa.

Temperatura (°C)	$-1/(R \cdot T)$	Ln(Concentração de H^+) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
17	-4,15E-01	0,042	0,84	-3,170
25	-4,03E-01	0,233	0,93	-1,457
32	-3,94E-01	0,418	1,00	-0,872

Com os valores exibidos na **Tabela XXII** calculou-se a relação linear presente na **Figura XXXVII**, a partir da qual se determinou a energia de ativação para a concentração de H^+ (114,14 kJ/mol^{-1}), que corresponde ao declive da reta.

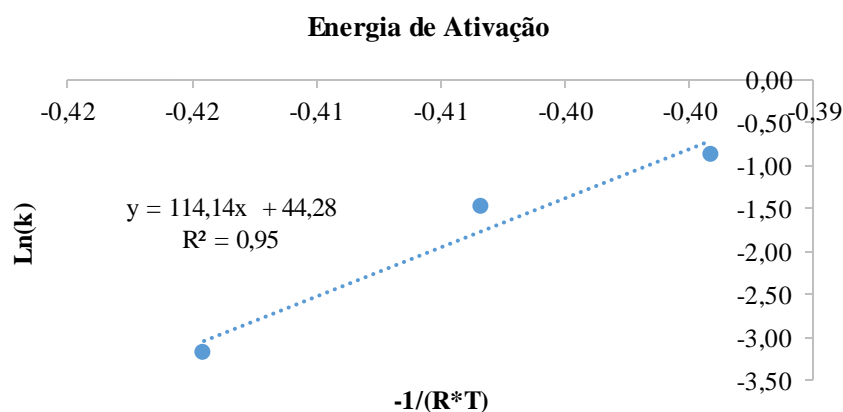


Figura XXXVII. Cálculo da energia de ativação, (E_a), em kJ/mol, para a concentração de H^+ durante a fermentação sob diferentes condições de temperatura, correspondente ao declive da reta, a 50 MPa.

b) Acidez titulável

Para se efetuar o cálculo da energia de ativação, selecionaram-se valores da variação da acidez titulável ao longo do tempo de fermentação, com um comportamento linear (a diferentes condições de temperatura). A partir dos valores da acidez titulável, expressa em concentração de ácido láctico, foi possível calcular o respetivo logaritmo neperiano (**Figura XXXVIII**).

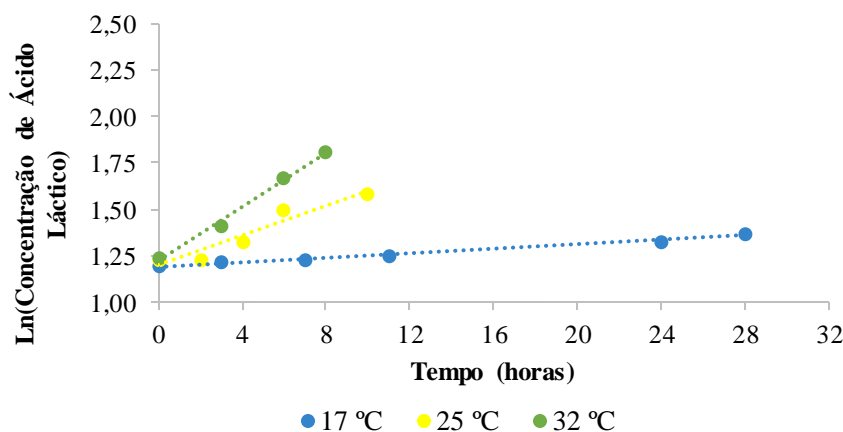


Figura XXXVIII. Logaritmo neperiano da concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação, sob diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 50 MPa.

Na **Tabela XXIII** são apresentados os declives de cada uma das séries representadas na **Figura XXXVIII**, sendo denominada de constante de velocidade (k), com o respetivo R^2 . Assumindo $R = 8,314$ (J/K.mol).

Tabela XXIII. Constante de velocidade, k (h^{-1}), para a concentração de ácido láctico e o cálculo do logaritmo neperiano, para as diferentes condições de temperatura (17, 25 e 32 °C), a 50 MPa.

Temperatura (°C)	$-1/(R \cdot T)$	Ln(Acidez Titulável) vs. Tempo		
		$ m = k$	R^2	$\ln(k)$
17	-4,15E-01	0,006	0,99	-5,116
25	-4,03E-01	0,040	0,93	-3,219
32	-3,94E-01	0,073	0,99	-2,617

Com os valores exibidos na **Tabela XXIII** calculou-se a relação linear presente na **Figura XXXIX**, a partir da qual se determinou a energia de ativação para a acidez titulável (124,22 kJ/mol), que corresponde ao declive da reta.

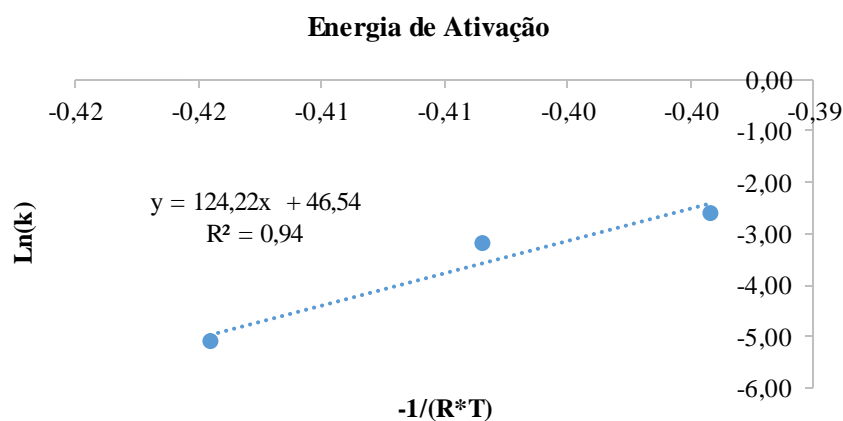


Figura XXXIX. Cálculo da energia de ativação, (E_a), em kJ/mol, para a concentração de ácido láctico durante a fermentação sob diferentes condições de temperatura, correspondente ao declive da reta, a 50 MPa.