

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NATA (CELULOSE BACTERIANA) POR FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE¹

Eliane Dalva Godoy DANESI², Gilvan WOSIACKI²

RESUMO

A nata de coco, alimento glicídico obtido por fermentação em superfície promovida por *Acetobacter xylinum*, é bastante difundida em alguns países asiáticos, principalmente nas Filipinas. Como meio de cultivo são utilizadas a água ou o leite de coco, produtos de baixo valor econômico e resíduos de processamento da fruta; há indicativos na literatura, entretanto, de que outros resíduos agro-industriais como soro de leite ou mesmo suco de frutas podem ser utilizados. A fim de avaliar a produção de nata para posteriores estudos visando o uso de meios alternativos, foi utilizado um meio de composição definida com o qual foi possível definir as condições de pH, de inóculo e de incubação, assim como observar a influência de açúcares e de ácidos no processo. Foram delineados experimentos usando-se ácido acético e glucose como variáveis de entrada visando a otimização do processo. As condições de fermentação incluíram correção do pH para 4, adição de 10% (v/v) de inóculo ao meio e incubação a 28°C por 10 dias. As condições encontradas como ótimas em relação às concentrações iniciais dos nutrientes considerados foram 0,65 moles/l de ácido acético e 67,4 g/l de glucose, com o que se produz 7,107 g de nata por 250 ml de meio .

Palavras chaves: Nata, fermentação em superfície, otimização, *Acetobacter xylinum*.

SUMMARY

OPTIMIZATION OF "NATA" [BACTERIAL CELLULOSE] PRODUCTION BY SURFACE FERMENTATION. "Nata", a glycidic food obtained by surface fermentation with *Acetobacter xylinum*, is well-known in some Asiatic countries, mainly the Philippines. Coconut milk or water, low economical value by-products of coconut processing, are employed as culture media; the literature on the subject indicates that other agricultural residues such as milk whey and even fruit juices may also be used. To evaluate the production of "nata" aiming further studies concerning alternative culture media, a synthetic medium was employed, what enabled the determination of the conditions concerning pH, inoculum and incubation, as well as the observation of the influence of the presence of sucrose and acids on the process. To optimize the process, it was designed a set of experiments with acetic acid and glucose as variables. The

defined conditions were pH correction to 4, the addition of 10% (v/v) of inoculum to the medium and incubation at 28°C for 10 days. The optimum initial concentrations of the considered nutrients were 0,65 moles/l of acetic acid and 67,4 g/l of glucose in which were produced 7,107 g of "nata"/250 ml of medium.

Key words: "Nata", surface fermentation, optimization, *Acetobacter xylinum*.

1 - INTRODUÇÃO

A sabedoria popular promoveu, nas Filipinas, o desenvolvimento de tecnologia de aproveitamento do resíduo agro-industrial água de coco para a obtenção de um produto alimentar considerado como fina iguaria de mesa, a nata de coco. Este alimento nativo, já produzido em larga escala, vem sendo apresentado ao mercado consumidor ocidental em exposições de produtos alimentícios como o Salão Internacional de Alimentos - SIAL em Paris, em 1995 (20), a Exposição de Alimentos na Reunião Anual do Instituto de Tecnologistas de Alimentos em Atlanta, 1996 (11), assim como ao meio científico em eventos como a Semana Internacional de Sucos de Frutas em Karlsruhe, em 1996 (19). O Estado da Arte desta atividade agro-industrial, compreendendo aspectos da cultura do coco, dos resíduos gerados, dos procedimentos habituais da produção caseira da nata e sua qualidade, e das perspectivas de comercialização, foi publicado recentemente (22).

Nata de coco é uma sobremesa gelatinosa e delicada, que é conservada em calda e freqüentemente servida com frutas, bebidas, cremes ou sorvetes (13,14). Este produto, de natureza celulósica, é sintetizado por bactérias da flora da água de coco, em especial o *Acetobacter xylinum* (5). O termo nata é de origem latina (*natare* significando flotar), e se refere à massa sobrenadante formada na superfície da água de coco ou de outros meios de cultura como sucos de frutas; produtos similares obtidos a partir de abacaxi, soro de leite e outros têm ensejado o aparecimento de termos como nata de pinha ou de abacaxi e nata de soro, por exemplo (7,10).

O processo de produção de nata é rudimentar. Para a produção doméstica, a água de coco é filtrada, aquecida à ebulição, resfriada até a temperatura ambiente, e a 12 copos desta matéria-prima adicionam-se 2 copos do licor-mãe (líquido fermentado em processo anterior), 1/4 de copo de ácido acético glacial e 1 copo de açúcar comum, misturando-se muito bem todos estes ingredientes até a formação de uma suspensão homogênea. Os recipientes, contendo o meio de cultura assim preparado, são deixados em repouso à temperatura ambiente ou o mais próximo possível de 28°C a fim de que ocorra fermentação. A camada polissacarídica formada em torno de 14 dias, de aproximadamente 25 mm de espessura, é retirada e constitui a nata bruta, pronta para ser beneficiada e o meio de cultura residual constitui-se no licor-mãe,

apto para ser usado como inoculante de próximas produções (21,22).

O beneficiamento da nata compreende o corte, em tamanhos apropriados com facas ou moldadores específicos, contemplando o uso previsto, o tratamento térmico até a ebulição visando a estabilização do produto, a lavagem ou rinsagem com água corrente para eliminação total do sabor ácido e a drenagem. Para cada parte de nata acrescenta-se uma parte de açúcar e opcionalmente, corantes, podendo ser adicionados sabores e aromas adequados. Em seqüência, os cubos de nata de coco são acondicionados com xarope de sacarose ou glucose em frascos ou latas e, após fechamento hermético, esterilizados.

Para a utilização de outros meios de cultura para a produção de nata, tais como resíduos agro-industriais ou mesmo sucos de frutas conforme preconiza a literatura especializada, são necessárias investigações mais detalhadas sobre o processo de produção, verificando-se a influência de nutrientes como açúcares e ácidos, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo. No presente trabalho procurou-se estabelecer as melhores condições de produção de nata em meio de composição definida visando-se otimizar o processo de fermentação em superfície para obtenção de celulose bacteriana para fins alimentares, favorecendo estudos posteriores de aproveitamento de novos meios de cultura.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Material

A cultura de microrganismos produtores de nata de coco, oriunda de um produto não pasteurizado proveniente das Filipinas contendo *Acetobacter aceti* variedade *xylinum* e utilizada nos experimentos, foi doada pelo Prof. Armim Feiden, do Departamento de Zootecnia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os produtos químicos utilizados na elaboração de reagentes e de meios de cultura foram de qualidade P.A.

Métodos

Nos experimentos de produção de nata foi utilizado o meio de composição definida recomendado por ALABAN (1), contendo 100 g/l de sacarose, 5 g/l de fosfato ácido de potássio, 2,5 g/l de extrato de levedura, 0,6 g/l de sulfato de amônio e 0,2 g/l de sulfato de magnésio heptahidratado, preparado por dissolução dos componentes em água deionizada e que, após tratamento térmico de 20 minutos a 121°C, teve seu pH corrigido para 4 com ácido acético glacial diluído 1:2 (v/v), sob condições assépticas. O meio de cultura estéril, num volume de 250 ml, foi distribuído em Becker de 500 ml, previamente aquecidos a 121°C durante 20 minutos e cobertos com tampão de algodão, que corresponde à altura média de 6 cm do líquido a ser fermentado e à razão superfície/volume de 0,07 aproximadamente. A inoculação dos meios foi feita com a fase líquida de uma cultura de microrganismo a uma proporção de 10% (v/v), e a incubação, em repouso a 30°C em estufa por um período de 10 a 14 dias (1,17,18,21). Após o período determinado pelo

experimento, a nata é recuperada para desidratação ou beneficiamento enquanto que o meio líquido é reservado para análises ou inoculações posteriores. A cultura de microrganismo foi mantida por repicagem, de forma semelhante, semanalmente.

No caso dos estudos cinéticos, amostras do meio de cultura foram coletadas de 2 em 2 dias, e nos demais experimentos os meios de cultura foram analisados ao final do processo, após 10 ou 14 dias de fermentação. As análises efetuadas com o meio de cultura foram a determinação do pH com um pHmetro, de acidez total por titulometria (9), e de teores de açúcares residuais pelos métodos de fenol-sulfúrico, Somogyi-Nelson e Fehling (4,9). A nata produzida foi quantificada tanto por medidas de espessura com paquímetro quanto de peso seco após desidratação em estufa a 40°C, até peso constante (1).

O efeito do pH no processo fermentativo foi verificado na faixa de 3 a 5, com variações de 0,25 unidades, em tampão acetato, buscando-se determinar o pH ótimo. A influência da quantidade de inóculo foi verificada utilizando-se volumes que variaram de 10 a 25% do volume total do meio de cultivo. O efeito da presença ou ausência de sacarose foi observado comparando-se os processos conduzidos simultaneamente em dois frascos, um deles sem sacarose. A influência dos teores de ácido acético foi avaliada adicionando-se ao meio 1, 3 e 5 g/100 ml de acetato de sódio, corrigindo-se para pH 4, e conduzindo-se o processo na presença de sacarose. Experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio, para verificar a influência da presença de outros ácidos orgânicos, como cítrico, málico, láctico e tartárico, sendo mantido ácido acético como referencial, e o processo de fermentação foi desenvolvido tanto na presença quanto na ausência de sacarose, com o pH corrigido para 4. Estes ensaios foram feitos em triplicata.

Para serem determinadas as melhores condições de produção de nata foi investigada a influência dos teores de ácido acético e glucose através de um delineamento experimental de segunda ordem, denominado delineamento composto central rotacional com precisão uniforme, conforme descrito por COCHRAN & COX (3). Este delineamento subdivide-se em três parcelas: a primeira, de quatro pontos (-1; -1), (1; -1), (-1; 1) e (1;1), constitui um fatorial 2^2 , a segunda, de quatro pontos axiais (-2; 0), (2; 0), (0; -2) e (0;2), constitui os pontos adicionais incluídos para formar o delineamento composto central, e a última, de cinco pontos, corresponde à repetição dos experimentos no ponto central a fim de estabelecer a precisão para a estimativa de resposta (2,15,16).

Com base neste delineamento, foram feitas combinações apropriadas de duas variáveis ou fatores independentes (X_1 = ácido acético, em moles/l e X_2 = glucose, em g/100 ml), em cinco diferentes níveis de variação. Os resultados foram analisados por regressão de superfície de resposta, cujo modelo matemático é:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + I$$

onde Y é uma variável aleatória, (b_0), (b_1 ; b_2) e (b_{11} ; b_{22} ; b_{12}) são os coeficientes de ordem zero, um e dois, respectivamente, e x_1 (= X_1 - valor do nível 0 / distância entre o nível 0 e 1) e x_2 (= X_2 - valor do nível 0 / distância entre o nível 0 e 1) são as variáveis

codificadas, e I é o erro experimental, suposto normalmente distribuído com média zero e variância σ^2 . Como os parâmetros deste polinômio quadrático devem ser estimados, a equação da superfície de resposta a ajustar é da forma:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

A seguir, são apresentados os dados relativos ao planejamento experimental utilizado para os experimentos elaborados. No primeiro conjunto são apresentados a codificação das variáveis independentes e seus níveis de variação, e no segundo, a composição dos ensaios do experimento.

Variáveis independentes e níveis de variação

Variáveis independentes	Código	Níveis				
		-2	-1,0	0	+1,0	+2
Ácido Acético (M)	X ₁	0,012	0,025	0,05	0,075	0,097
Glucose (g/100 ml)	X ₂	1,465	2,500	2,50	7,500	8,535
Ácido Acético (M)	X ₁	0,150	0,250	0,50	0,750	0,850
Glucose (g/100 ml))	X ₂	3,000	5,000	10,0	15,00	17,00

Composição dos ensaios do experimento

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis originais			
	x ₁	x ₂	Planejamento 1		Planejamento 2	
			X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
01	-1	-1	0,025	2,500	0,25	5,0
02	+1	-1	0,075	2,500	0,75	5,0
03	-1	+1	0,025	7,500	0,25	15,0
04	+1	+1	0,075	7,500	0,75	15,0
05	-2	0	0,012	5,000	0,15	10,0
06		0	0,097	5,000	0,85	10,0
07	0	-2	0,055	1,465	0,50	3,0
08		0	0,055	8,535	0,50	17,0
09	0	0	0,055	5,000	0,50	10,0
10	0	0	0,055	5,000	0,50	10,0
11	0	0	0,055	5,000	0,50	10,0
12	0	0	0,055	5,000	0,50	10,0
13	0	0	0,055	5,000	0,50	10,0

As variáveis de saída (Y_i) utilizadas para o acompanhamento do processo de produção nestes experimentos foram Y₁ = pH, Y₂ = acidez em ácido acético (g/100ml), Y₃ = açúcar consumido (g) e Y₄ = peso da nata seca (g), todas medidas no início e ao final dos

ensaios, sendo então calculada a variação ocorrida no período de fermentação. Os dados obtidos foram analisados por regressão em superfície de resposta (RSREG -Response Surface Regression) no sistema de análise estatística (SAS -Statistical Analysis System), obtendo-se as equações preditivas, cuja validade foi avaliada.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características do processo de produção de nata por fermentação em superfície estão apresentadas na [Tabela 1](#), compreendendo os valores de pH, da espessura da nata formada e do teor do açúcar residual observados durante 14 dias. O valor médio de pH foi 4,13, com desvio padrão de 0,28 e coeficiente de variação da ordem de 6%, indicando a estabilidade deste parâmetro no período de experimentação. A espessura da nata apresentou valor médio de 4,74 mm com desvio padrão de 1,48 e coeficiente de variação da ordem de 30% indicando a formação da película, gradativa e estável a partir do 6º dia. O teor médio do açúcar remanescente foi 12,96 g/100 ml com coeficiente de variação da ordem de 15%, sugerindo pequeno consumo.

TABELA 1. Características do processo de produção de nata por fermentação em superfície.

Tempo (dias)	pH	Espessura (mm)	Açúcar residual (g/100 ml)
0	4,00	0,00	14,01
2	3,88	1,50	13,66
4	3,86	4,00	13,30
6	3,94	5,90	13,92
8	4,04	5,80	12,76
10	4,18	6,00	13,22
12	4,45	5,00	15,12
14	4,55	5,00	8,80
Média	4,13	4,74	12,96
Desvio	0,28	1,48	1,98
C.V.%	0,06	0,31	0,15

A [Figura 1](#) ilustra as alterações dos parâmetros investigados no período de 14 dias de fermentação.

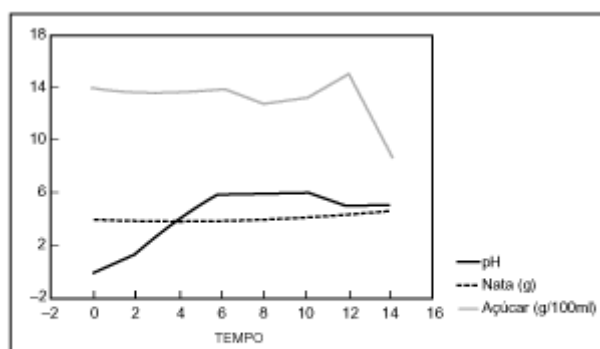


FIGURA 1. Características do processo de produção de nata por fermentação em superfície.

Os resultados evidenciam que houve pequeno aumento do pH, sugerindo baixa alteração dos teores de ácido, franco aumento da espessura da película com estabilização entre 5-6 mm após 7 dias, e pequeno consumo de açúcar, após 2 semanas de fermentação.

A influência do pH no processo fermentativo foi estudada na faixa de 3 a 5, em experimentos que apresentaram resultados médios, com coeficientes de variação da ordem de 10%, aceitáveis em termos práticos. Os resultados, expressos na [Tabela 2](#), mostram produção da película em todos os ensaios, embora tenha ocorrido uma produção pequena nos pH 3 e 3,5, assim como em pH 5,0, e um pico de produção nos pH 4,25 e 4,75, indicando a existência de uma faixa de pH mais adequada à produção de nata.

TABELA 2. Influência do pH na produção de nata.

pH	Espessura da nata (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de variação
3,00	1,577	1,141	0,109
3,25	1,639	0,109	0,066
3,50	1,666	0,174	0,104
3,75	2,470	0,067	0,027
4,00	2,719	0,560	0,134
4,25	4,382	0,838	0,191
4,50	5,068	0,293	0,057
4,75	4,191	0,254	0,060
5,00	2,260	0,019	0,008

O gráfico apresentado na [Figura 2](#) ilustra a influência deste parâmetro na produção de nata.

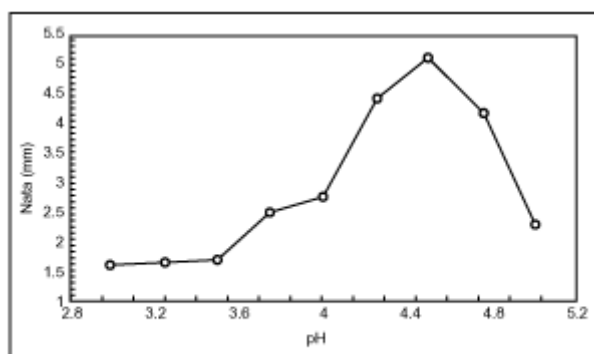


FIGURA 2. Influência do pH na produção de nata.

Os resultados indicam uma faixa de pH ótimo entre 4 e 5, com maior valor de produção em pH 4,5 o que está em concordância com os valores encontrados na literatura que, entretanto, recomenda o pH 4,0 para o processo rudimentar (1,6,17,21). Para concordância com a literatura, os ensaios subseqüentes foram feitos com este valor.

Os resultados do experimento realizado para investigar o efeito da quantidade de inóculo no processo de obtenção da nata, efetuado com porcentagens de inóculo que variaram de 10 a 25% do meio de fermentação (v/v), apresentaram valores médios que variaram de 2,5 g a 3,7 g/100 ml para quantidades crescentes de inóculo, sendo que os coeficientes de variação dos ensaios foram da ordem de 5%, indicando a sua repetibilidade.

Estes resultados, expressos na [Tabela 3](#), embora sugiram que exista uma proporcionalidade entre o volume do inóculo e a produção de nata, não são suficientes para determinar qual é o melhor valor para a quantidade de inóculo. Aparentemente, o melhor valor seria 20%, entretanto, se for considerada a produção relativa ao volume do inóculo, podem ser observados valores decrescentes, que vão de 0,246 a 0,130, e que indicam a influência negativa do aumento do volume do inóculo na produção de nata, demonstrando que neste experimento o melhor resultado ocorreu com o inóculo de 10%.

TABELA 3. Influência da quantidade de inóculo na produção de nata.

Inóculo (ml/100 ml)	Nata seca (g/100 ml)	Desvio- padrão	Coefficiente de variação	Produção relativa
10	2,463	0,060	0,0243	0,246
15	3,107	0,194	0,0624	0,207
20	3,701	0,158	0,0420	0,183
25	3,249	0,148	0,0455	0,130

Observe-se que o aumento da proporção do inóculo acarreta o aumento do volume de um meio exaurido e diminui a quantidade do meio rico de fermentação, condição que passa a promover

resultados de produção inferior de nata no período estipulado. Por outro lado, volumes menores de inóculo, embora signifiquem maior volume relativo de meio rico em nutrientes, contêm menor quantidade de microrganismos.

Desta forma pode ser concluído que o mais adequado volume de inóculo, neste experimento, foi de 10% e por isto os experimentos subseqüentes foram feitos com esta proporção em relação ao meio de fermentação, compatibilizando os resultados com aqueles encontrados na literatura (1,21).

Com o objetivo de verificar o consumo de sacarose pelo microrganismo no processo de produção de nata, sugerido anteriormente, foi elaborado um experimento com o meio de composição definida adicionado de 10% de sacarose (p/v), e outro, controle, sem adição de açúcar, analisado ao longo de 14 dias, ambos a pH 4 e com 10% de inóculo. Os resultados obtidos, expressos na [Tabela 4](#), mostraram que a espessura da nata produzida variou de valores próximos a 1,00 mm, tanto no experimento com quanto no sem sacarose, até valores de 10,40 mm no final do período. As análises demonstraram também que não ocorreram quedas nos teores de açúcar, que apresentaram valores médios de 11 g/100ml; o pH e a acidez, também determinados, apresentaram variações - o pH aumentou para 5,5 e a acidez, inicialmente de 1,3 g/100 ml, chegou a atingir 0,65 g/100 ml.

TABELA 4. Influência da presença da sacarose nas características do processo.

Tempo (dias)	Espessura (mm)		Acidez (g/100 ml)		pH		Açúcar (g %)
	c/sac	s/sac	c/sac	s/sac	c/sac	s/sac	c/sac
0	0	0	1,41	1,11	4,00	4,00	10,00
2	1,00	1,00	1,32	1,05	3,86	4,01	11,14
4	4,00	3,50	1,12	0,91	3,88	4,11	10,40
6	5,90	5,00	1,16	0,74	3,94	4,22	11,75
8	6,70	6,80	1,04	0,67	4,04	4,28	10,10
10	8,50	8,30	0,95	0,60	4,18	4,47	11,86
12	9,00	9,60	0,89	0,53	4,45	5,32	11,30
14	10,60	10,30	0,83	0,48	4,55	6,33	11,12
Média	5,71	5,56	1,10	-0,76	4,11	4,60	10,95
Desvio	3,26	3,38	0,21	0,23	0,26	0,82	0,71
C.V. %	0,57	0,60	0,20	0,30	0,06	0,18	0,06

Estes resultados foram confirmados pelos valores médios de espessura da nata, de 5,71 mm com sacarose e 5,56 mm sem sacarose, ambos com desvios padrões de 3,30 e coeficientes de variação da ordem de 50%. Isto indica que não ocorreram diferenças significativas na produção de nata, considerando a adição ou não de sacarose, embora tenha ocorrido aumento gradativo da espessura no decorrer do experimento. Os desvios padrão da acidez de 0,21 e 0,23 e os coeficientes de variação de 0,20 e 0,30 com e sem sacarose, respectivamente, mostram a

variação ocorrida; quanto ao pH, os coeficientes de variação, da ordem de 10%, sugerem variações mais discretas. Com relação ao açúcar, o coeficiente de variação foi da ordem de 5%, comprovando o baixo consumo deste componente. Foi possível observar que, se não houve diferença na produção de nata nas duas condições testadas, houve diferença em termos de acidez e de pH; os teores de sacarose foram constantes indicando que, se houve, consumo de açúcar, este foi muito baixo.

Estes dados mostram que o microrganismo utiliza pequenas quantidades de açúcar para produção da película, sugerindo que o remanescente no líquido utilizado como inóculo pode ser suficiente para o processo. Como a literatura, entretanto, recomenda a adição de açúcar e correção do pH, julgou-se necessário averiguar mais a fundo esta questão, com experimentos específicos.

A influência do ácido acético utilizado para a correção do pH sobre o processo foi investigada e os resultados alcançados estão expressos na [Tabela 5](#). Em termos de espessura da película produzida ao longo de 10 dias, foram observados valores, após 2 dias de fermentação, de 3,79 mm para 1 g de acetato de sódio adicionado, e chegaram a atingir, ao final do experimento, 12,17 mm para 5 g de acetato de sódio adicionado. Foi observado que a diferença de pH no decorrer do experimento foi pequena, mantendo-se próximo ao valor inicial, os coeficientes de variação da ordem de 5% e os desvios padrão também pequenos confirmam este fato. A acidez titulável apresentou quedas gradativas em todos os casos, resultado também confirmado pelos coeficientes de variação da ordem de 20%. Foi possível constatar a influência do teor do acetato na formação de películas, que se apresentaram mais espessas na presença de concentrações mais elevadas.

TABELA 5. Produção de nata com diferentes concentrações de acetato de sódio.

Tempo (dias)	pH			Espessura (mm)			Acidez (g/100 ml)		
	1*	3*	5*	1*	3*	5*	1*	3*	5*
2	4,72	4,01	4,15	3,79	4,99	6,08	2,22	1,70	1,50
4	4,46	4,12	4,07	4,14	5,68	9,18	2,20	1,50	1,40
6	4,68	4,62	4,44	4,59	6,58	10,42	2,00	1,00	1,40
8	4,84	4,26	4,14	4,64	8,10	11,47	1,80	1,40	1,00
10	4,57	4,83	4,34	6,18	9,18	12,17	1,20	1,00	1,00
Média	4,65	4,37	4,23	4,67	6,90	9,86	1,88	1,32	1,26
Desvio	0,14	0,34	0,15	0,91	1,72	2,40	0,42	0,31	0,24
C.V. %	0,03	0,07	0,03	0,20	0,24	0,24	0,22	0,23	0,20

*Os números 1, 3 e 5 referem-se às concentrações de acetato de sódio, em g/100 ml.

Enfim, como foi evidente a influência do acetato no processo fermentativo, fica confirmada a necessidade da adição de ácido nos meios de fermentação.

Constatada a influência positiva do ácido acético na produção de nata, foi avaliado o efeito de outros ácidos orgânicos, devido ao fato da literatura relatar a possibilidade de utilização de suco de frutas como meio de cultura para o microrganismo (10). Com este

objetivo, o meio de composição definida, sem adição ou adicionado de 10% de sacarose, teve seu pH corrigido para 4 com os ácidos acético, cítrico, málico, tartárico e láctico, em tubos de ensaio. Ao final de 10 dias de fermentação, foram obtidos os resultados, em peso de nata seca, expressos na [Tabela 6](#), os quais indicam que com o ácido cítrico ocorreu a produção de 0,147 g em meio sem sacarose e um aumento para 0,577 g em meio com sacarose. Com o ácido láctico o aumento foi de 0,180 g para 0,405 g, com o málico o aumento foi mais discreto, de 0,111 g para 0,150 g, com o tartárico foi de 0,067 g para 0,158 g, e para o acético, de 0,155 g para 0,235 g. Os resultados obtidos neste experimento confirmam a influência dos ácidos orgânicos no processo fermentativo e sugerem a viabilidade de utilização de diferentes meios de cultura para a produção de nata, como, por exemplo, suco de frutas e soro de leite, considerando os resultados apresentados com os ácidos normalmente encontrados em frutas e no soro de leite, respectivamente. Como foram alcançados maiores rendimentos em termos de peso de nata seca com a utilização de ácido cítrico, é pertinente a possibilidade do uso de suco de frutas cítricas como a laranja para produção de nata; da mesma forma, como os resultados com ácido láctico encontram-se em uma faixa aceitável, o uso de resíduos de laticínios, como o soro de leite, passa a ser uma hipótese atraente.

TABELA 6. Influência de ácidos na produção de nata.

	cítrico	láctico	málico	tartárico	acético
Ausente	0,147	0,180	0,111	0,067	0,155
Presente	0,577	0,405	0,150	0,158	0,235

Para todos os ensaios a produção de nata foi maior com a adição de sacarose, e entre os ácidos, o melhor desempenho foi com ácido cítrico.

Definidas as condições de pH e de inóculo, tempo e temperatura de incubação de acordo com a literatura (1,21), e observada a influência de açúcares e ácidos na produção de nata, foram delineados experimentos usando diferentes concentrações de ácido acético e glucose, visando a otimização do processo. O ácido acético foi escolhido tendo em vista a sua utilização no processo agro-industrial (1,21) enquanto que a glucose, por apresentar melhores resultados do que a sacarose na produção de celulose bacteriana (5). Os experimentos conduzidos com a intenção de verificar a influência das concentrações de ácido acético e de glucose nas características do processo fermentativo foram úteis na obtenção de dados a respeito das alterações ocorridas nos valores de pH e de acidez total titulável, de concentração de açúcar e de produção de nata. O domínio do primeiro experimento, exploratório, assim como os resultados em termos de variáveis de saída estão expressos na [Tabela 7](#), a seguir.

TABELA 7. Planejamento experimental 1.

Ensaio	Variáveis de entrada		Variáveis de saída			
	X1	X2	Y1	Y2	Y3	Y4
01	0,025	2,500	0,99	3,99	1,55	0,609
02	0,075	2,500	0,87	1,16	1,16	1,385
03	0,025	7,500	0,97	4,91	1,39	1,985
04	0,075	7,500	0,85	1,37	1,56	3,302
05	0,012	5,000	1,04	6,85	2,01	1,187
06	0,097	5,000	0,84	2,49	1,40	1,666
07	0,055	1,465	0,79	0,33	0,42	0,565
08	0,055	8,535	0,88	1,34	0,60	2,081
09	0,055	5,000	0,95	2,88	2,87	1,267
10	0,055	5,000	0,98	2,99	3,04	1,795
11	0,055	5,000	0,98	2,99	3,04	1,131
12	0,055	5,000	0,93	2,67	0,86	0,845
13	0,055	5,000	1,01	1,02	1,02	1,660

A avaliação dos resultados com relação à alteração dos valores do pH do meio de fermentação, entretanto, levou à observação de que esta alteração foi pequena, tendo sido mantido o pH em torno do valor 4,0, já estabelecido como adequado ao processo fermentativo. Assim, conquanto a equação estabelecida em função das variáveis de entrada tenha sido de alguma significância, capaz de explicar acima de 86% da variância, esta variável de saída foi desconsiderada. De semelhante forma, foram avaliados os resultados encontrados com relação à alteração da acidez titulável do meio, e desconsideradas as equações que a relacionavam aos teores iniciais de ácido acético e de glucose. Neste caso, o modelo quadrático chegou a justificar 99,45% da variância explicável, que era de 99,57%, ou seja, trata-se de um modelo bom em termos estatísticos mas sem aplicação prática. Com relação à modificação dos teores de açúcar, com indicação do seu consumo, uma variável de maior interesse, os resultados encontrados não foram efetivos em demonstrar um modelo capaz de explicar as variações, com uma regressão tanto linear quanto quadrática não significativas e com clara falta de ajuste. Assim, houve um consumo, porém sem a constatação de um padrão de aproveitamento do açúcar e esta variável de saída, visto não contribuir para o entendimento do processo fermentativo, foi desconsiderada no contexto deste trabalho.

Os resultados observados com relação à produção de nata demonstraram equações capazes de explicar 74% (linear) e 77% (quadrática) da variação observada no sistema, o máximo de explicação da variância sendo de 90% em ambos os casos. A observação da equação linear permite inferir que a variável ácido acético é menos importante do que a variável glucose, e que ambas influem diretamente na produção de nata. A observação da equação quadrática, por outro lado, permite concluir que os efeitos quadráticos e de interação são igualmente pouco importantes para contribuir com a melhoria do modelo. A seguir, as equações obtidas (Equação [1], linear e Equação [2], quadrática) e as respectivas análises de variância ([Tabela 8](#), [Tabela 9](#)).

$$Y = 14983 + 0,3463 x_1 + 0,6797 x_2$$

$\pm 0,092$ $\pm 0,115$ $\pm 0,115$

(1)

TABELA 8. Análise de variância – Planejamento 1 – Linear.

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	Teste F	Fc/Ft	
Regressão	4,6546	2	2,3273			
Resíduos	1,7043	10	0,1704	13,65	0,704	ns
F.Ajuste	1,1008	6	0,1835			
Erro puro	0,6035	4	0,1509	1,216	0,268	ns
Total	6,3589	12				
Variância explicada 73,19%			Variância explicável 90,51%			

$$Y = 1,339 + 0,3463 x_1 + 0,6797 x_2 + 0,1549 x_1^2 + 0,1031 x_2^2 + 0,1531 x_1 x_2$$

$$\pm 0,168 \quad \pm 0,130 \quad \pm 0,130 \quad \pm 0,140 \quad \pm 0,140 \quad \pm 0,180$$

(2)

TABELA 9. Análise de variância – Planejamento 1 – Quadrático.

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	Teste F	Fc/Ft	
Regressão	4,9433	5	0,9887	4,889	1,001	ns
Resíduos	1,4156	7	0,2022			
F.Ajuste	0,8121	3	0,2707	1,795	0,307	ns
Erro puro	0,6035	4	0,1509			
Total	6,3589	12				
Variância explicada 77,73%			Variância explicável 90,51%			

Em atenção ao fato de que ambos os modelos não são adequados estatisticamente e, como o modelo linear apresenta mais facilidade de manipulação e entendimento, foi utilizado para a análise gráfica e algébrica da tendência a fim de delimitar nova área de experimentação, uma vez que na área estudada não foi verificada a existência de um ponto estacionário máximo, conforme o esperado.

Ao se considerar os coeficientes da variável ácido acético e da variável glucose, é possível fazer uma projeção, ao longo dos dois eixos, com relação à produção de nata, embora sem muita acuracidade; foi utilizada a equação linear e a variação da concentração de glucose foi considerada como unitária até um nível cinco vezes superior ao do planejamento experimental exploratório. Os valores podem ser observados na [Tabela 10](#).

TABELA 10. Previsão da produção segundo modelo linear.

Ácido acético (M)	Glucose (g/100ml)	Produção de nata (g)
0	0	1,498
0,509	1	2,350
1,018	2	3,210
1,527	3	4,066
2,036	4	4,922
2,545	5	5,778

Os resultados indicam que uma área de experimentação compreendendo um centro com valores das variáveis de entrada x_1 duas vezes superiores e x_2 cinco vezes superiores, aparentemente, deverá indicar melhores resultados na otimização do sistema. Como, todavia, estes valores conduzirão a uma área de experimentação de difícil acesso prático, pelo excessivo teor de açúcar, optou-se por uma área mais abrangente em termos de ácido acético e menos abrangente em termos de glucose.

Os resultados do experimento conduzido nesta nova área de experimentação foram pesquisados em termos das mesmas variáveis de saída anteriormente registradas; o domínio do experimento e os resultados estão expressos na [Tabela 11](#).

TABELA 11. Planejamento experimental 2 -.

Ensaio	Variáveis de entrada		Variáveis de saída			
	X1	X2	Y1	Y2	Y3	Y4
01	0,25	5,0	1,01	0,08	1,10	4,07
02	0,70	5,0	0,94	0,11	1,50	7,84
03	0,25	15,0	0,36	0,11	0,90	1,30
04	0,75	15,0	0,37	0,02	1,00	0,11
05	0,15	10,0	0,62	0,12	0,80	3,14
06	0,85	10,0	0,57	0,09	1,15	4,89
07	0,50	3,0	1,09	0,13	3,53	4,36
08	0,50	17,0	0,35	0,03	0,22	1,28
09	0,50	10,0	0,61	0,09	0,09	6,00
10	0,50	10,0	0,61	0,11	0,25	5,23
11	0,50	10,0	0,63	0,06	0,09	6,56
12	0,50	10,0	0,62	0,02	0,40	6,15
13	0,50	10,0	0,59	0,12	0,41	5,94

Os resultados observados com relação às alterações do pH do meio foram ainda mais significativos, mas, uma vez que o sistema encontrava-se mais fortemente tamponado, a variação foi ainda menor, tornando esta variável de saída ainda menos interessante enquanto parâmetro de controle.

As variações foram igualmente pequenas no que diz respeito à acidez total titulável, o modelo não apresentou significância e nem ajuste em nível de 95% de probabilidade, justificando a manutenção de seu descarte. No ambiente com maior teor de glucose, o consumo de açúcar foi ainda menor do que o

anteriormente observado, e os resultados das análises de variância do modelo foram insatisfatórios.

Embora a equação quadrática apresentasse melhor explicação da variância (77,57%) do que a linear (37,1258%), ambas apresentaram falta de ajuste. Assim, desconsideraram-se novamente estas variáveis de saída como eventuais parâmetros de controle do processo.

Os resultados do experimento no que se relaciona à produção de nata, entretanto, foram bem mais consistentes e levaram à obtenção de um modelo estatisticamente mais significativo. Apesar da equação linear ser insuficiente para explicar mais do que 47,4595% da variância explicável (98,566%), seus coeficientes indicam a influência preponderante da variável glucose sobre a variável ácido acético. A equação quadrática, por seu lado, eleva o grau de explicação da variância para 91,2685% e esclarece a importância dos coeficientes quadráticos e de interação, todos maiores do que o da variável ácido acético porém de sinal contrário.

As equações [3] linear e [4] quadrática e suas análises de variância são apresentadas a seguir, na [Tabela 12](#) para o modelo linear, e na [Tabela 13](#) para o modelo quadrático.

$$Y = 4,3746 + 0,6319 x_1 - 18572 x_2 \quad (3)$$

$\pm 0,512 \quad \pm 0,640 \quad \pm 0,640$

TABELA 12. Análise de variância - Planejamento 2 - Linear.

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	Teste F	Fc/Ft	
Regressão	30,7825	2	15,3912			
Resíduos	34,0780	10	3,4078	4,517	0,233	ns
F.Ajuste	33,1483	6	5,5247			
Erro puro	0,9297	4	0,2324	23,77	5,247	s
Total	64,8605	12				

Variância explicada 47,4595% Variância explicável 98,5666%

$$Y = 5,9760 + 0,6319 x_1 - 18572 x_2 - 10025 x_1^2 - 16002 x_2^2 - 12400 x_1 x_2 \quad (4)$$

$\pm 0,400 \quad \pm 0,318 \quad \pm 0,318 \quad \pm 0,340 \quad \pm 0,340 \quad \pm 0,449$

TABELA 13. Análise de variância - Planejamento 2 -Quadrático.

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	Teste F	Fc/Ft	
Regressão	59,1972	11,8394				
Resíduos	5,6633	7	0,8090	14,63	2,998	s
F.Ajuste	4,7336	3	1,5779			
Erro puro	0,9297	4	0,2324	6,79	0,744	ns
Total	64,8605	12				

Com os dados satisfatórios de significância da regressão e de ajuste, o modelo quadrático pode ser empregado para explicar o processo fermentativo de produção de nata nesta área de experimentação, e os resultados da modelagem são mostrados na [Tabela 14](#), com o respectivo gráfico na [Figura 6](#).

TABELA 14. Resultados da modelagem para produção de nata do Planejamento 2.

Ensaio	Resposta obtida	Resposta prevista	Resíduo
1	4,070	3,3586	0,71139
2	7,840	7,1024	0,73757
3	1,300	2,1243	-0,82427
4	0,110	0,9081	-0,79809
5	0,140	3,0781	0,06188
6	4,890	4,8652	0,02485
7	4,360	5,4027	-1,04267
8	1,280	0,1506	1,12940
9	6,000	5,9760	0,02399
10	5,230	5,9760	-0,74601
11	6,560	5,9760	0,58399
12	6,150	5,9760	0,17399
13	5,940	5,9760	-0,03601

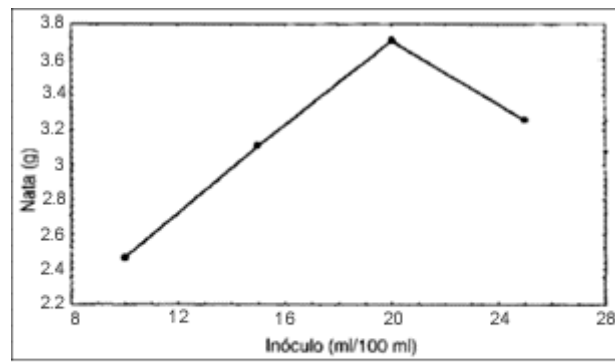


FIGURA 3. Influência da quantidade de inóculo na produção de nata.

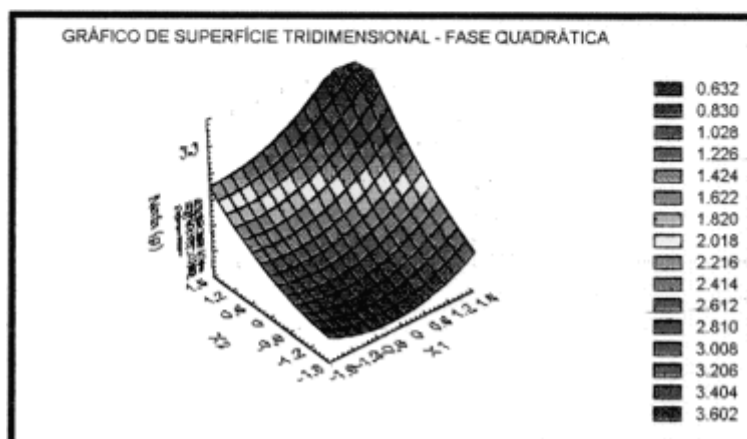
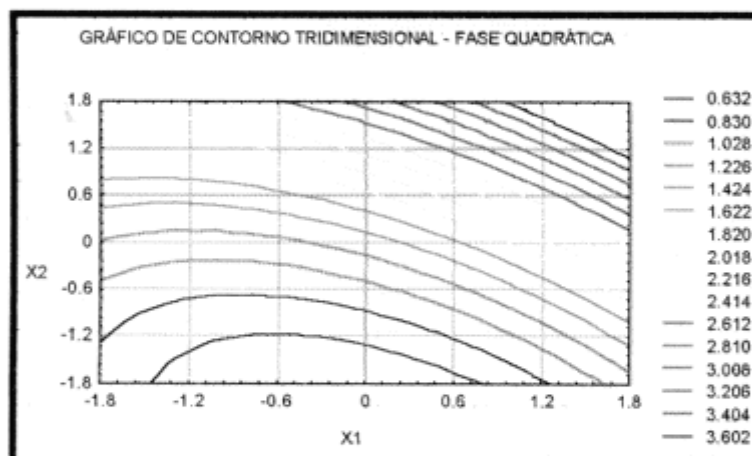
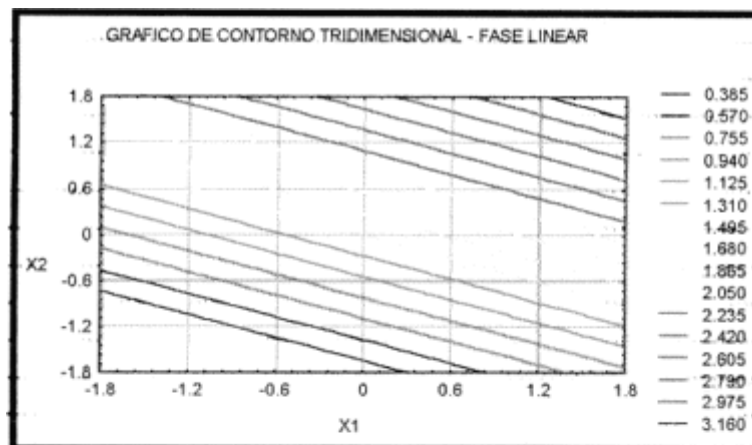


FIGURA 5. Influência da concentração de ácido acético e glucose na produção de nata evidenciada pelas equações preditivas.

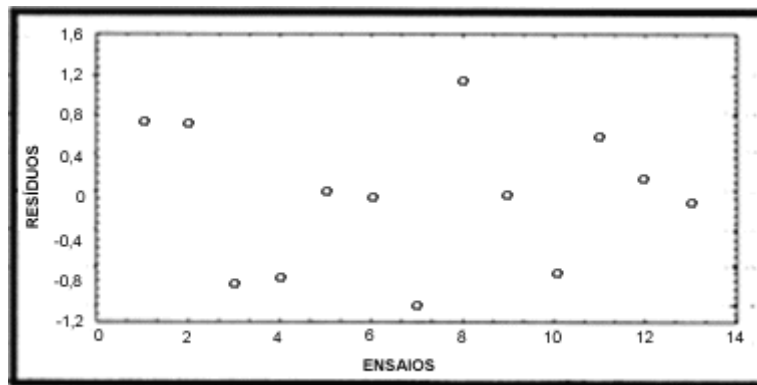


FIGURA 6. Distribuição dos resíduos nos ensaios.

A observação do gráfico de dispersão dos erros ao longo das respostas da variável de saída permite inferir que não existe propriamente uma tendência relativa aos erros, os quais podem, portanto, ser atribuídos inteiramente ao acaso.

O modelo, tal como se apresenta, permite agora a definição dos perfis topográficos da produção de nata na faixa de concentrações de ácido acético e de glucose pesquisadas, que são apresentados na [Figura 7](#), indicando a existência de um ponto estacionário de coordenadas definidas.

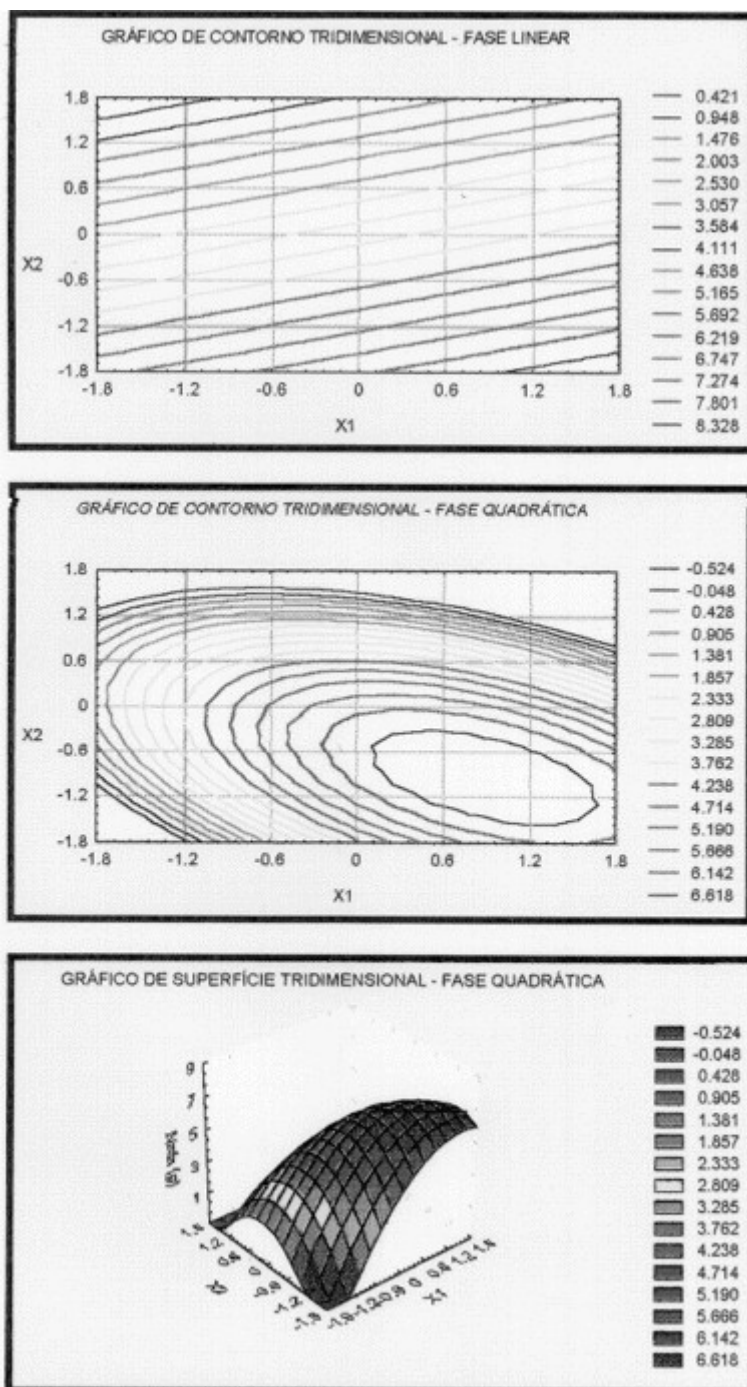


FIGURA 7. Influência da concentração de ácido acético e glucose na produção de nata de acordo com as equações preditivas.

A análise canônica permite identificar o ponto estacionário como um ponto de máximo, de coordenadas $[0,627; -0,651]$, que correspondem a 0,6568 moles/l de ácido acético e 6,745 g/100 ml de glucose; nestas condições, a produção previsível máxima de nata é de 7,107 g em 250 ml de meio.

4 - CONCLUSÕES

A faixa ótima de pH para o processo fermentativo é de 4 a 5, com valor máximo em pH 5,0 e a melhor porcentagem de inóculo a ser utilizada no meio de fermentação é 10%. O microrganismo utiliza pequena quantidade do açúcar adicionado ao meio para produção de nata e a presença de ácido neste meio influencia de forma positiva o processo. A produção de nata com sacarose e adição de ácido cítrico ao meio de composição definida foi maior do que com adição dos ácidos málico, tartárico, láctico e acético. Através dos experimentos com o meio de composição definida contendo ácidos acético e glucose em diferentes concentrações, foram definidas as condições ótimas para produção de nata, que são 0,6568 moles/l de ácido acético e 6,745 g/100 ml de glucose.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ALABAN, C. A. Studies on the optimum conditions for "nata de coco" bacterium or "nata" formation in coconut water. **Philippine Agriculturist**, Manila. v.45, p. 490-516, 1962. [[Links](#)]
- (2) BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995.300 p. (Série Manuais). [[Links](#)]
- (3) COCHRAN, W. G.; COX, C. M. **Experimental designs**. 2 ed. New York: J. Wiley, 1957. (Wiley Series in Probability and Mathematics Statistics). [[Links](#)]
- (4) DUBOIS, M. M. Colorimetric methods for determination of sugars and related compounds. **Analytical Chemistry**, Washi.ngton, v.3, n.28,. p.350-6,1956. [[Links](#)]
- (5) EMBUSCADO, M. E.; MARKS, J.; BeMILLER, J.N. Bacterial cefiulose. 1. Factors affecting the production of cellulose by **Acetobacte xylinum**. **Food Hydrocolloids**, USA, v.8, n.5, p. 407-418, 1994a. [[Links](#)]
- (6) EMBUSCADO, M.E.; MARKS, J.S.; BeMILLER, J.N. Bacterial cellulose. II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response suxface methodology. **Food hydrocolloids**, USA, v. 8, n. 5, p.419-430,1994b. [[Links](#)]
- (7) GOMEZ, I.V.; MOMONGAN, L.D.; ALMAZAN, E.N.; LAWAS, F. R. **"Nata" - a fermented product from coconut from whey**. Laguna: College, 1986.2 p. [[Links](#)]
- (8) GOMEZ, I.V.; MOMONGAN, L.D.; ALMAZAN, E.N.; LAWAS, F.R. Possibilities of using whey for nata making in Philippines, **Philip.j.Veter. & Animal**, Manila, v.3, n.4, p.35,1987. [[Links](#)]
- (9) INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. 2. ed. São Paulo: IAL, 1976. v. 1. p. 176. [[Links](#)]

- (10) LACADIN, A. L.; MILLAN, E. T. Relative effectiveness of coconut, dalanghita and citrus variety, pineapple and tomato as media for producing nata (philippine delicacy). TCA **Research - Journal**. Philippines, v.2, n.3, p. 235-245,1980. [[Links](#)]
- (11) NATA DE COCO from the Philippines. Philippines : Departnment of Trade and Industry, [199?]. [[Links](#)]
- (12) OKIYAMA, A.; SHIRAE, H.; KANO, H.; YAMANAKA, S. Bacterial cellulose. 1. Two - stage fermentation process for cellulose production by **Acetobacter aceti**. **Food Hydrocolloids**, Japan, v.6, n.5, p. 471-477,1992. [[Links](#)]
- (13) OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; YAMANAKA, S. Bacterial cellulose. III. Development of a new form of cellulose. **Food hydrocolloids**, Japan, v. 6, n. 6, p.503-511,1993 a. [[Links](#)]
- (14) OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; YAMANAKA, S. Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. **Food hydrocolloids**, Japan, v. 6, n. 6, p.503- 511,1993 b. [[Links](#)]
- (15) OLIVEIRA, A.S; SILVA, R.S.S.F. **Otimização das condições de temperatura e pH na ação da celulose sobre o substrato mandioca: uma análise pela metodologia de superfície de resposta**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1993. p. 557-566. [[Links](#)]
- (16) SADO, G., SADO, M. C. **Les plans d'expériences**. Paris: AFNOR, 1991. 261 p. [[Links](#)] SAS/ STAT. User's Guide, Version 6 4. ed (s.l.) SAS Institute, 1990. v. 2. Cap. 36, p. 1351, 1990. [[Links](#)]
- (17) SATURNINO-DIMAGUILA, L. A. The "nata de coco" 1. Characterization and identity of the causal organism. **Philippine Agriculturist**, Manila, v.5, p.462-474,1967 a. [[Links](#)]
- (18) SATURNINO-DIMAGUILA, L. A. The "nata de coco" 2. Chemical nature and properties of nata. **Philippine agriculturist**, Manila, v. 51, p. 475-485,1967b. [[Links](#)]
- (19) SHEU, M.J. "Nata de coco" – a high-fiber fruit-dessert combination. 36th INTERNATIONAL FRUIT JUICE WEEK, 96. Karlsruhe, 1996. [[Links](#)]
- (20) THE MYRIAD applications of nata de coco. Philippines: Department of Trade and Industry, [199?]. [[Links](#)]
- (21) UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION - UNIDO. **Coconut Processing Technology Information Documents**. V. Domestic Coconut Food Processes. Wien: UNIDO, 1980.194 p. [[Links](#)]
- (22) WOSIACKI, G., DEMIATE, I.M.; MELLO, F. A nata de coco - O Estado da Arte. Bol/Rev.SBCTA, Campinas, **in press**. [[Links](#)]

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio técnico recebido de Dra. Ieda Spacino Scarmínio (QUI/UEL), de Heliete Garcia e Vera Lúcia Igassawara (CPD/UEL), das bolsistas de iniciação científica Loreci Fátima Verdi e Débora Kwiatovski (DEZOO/UEPG), de Maria Etelvina Madalozzo Ramos (BC/UEPG) assim como o apoio financeiro recebido do CNPQ, RHAÉ, CNPQ-PIBIC e CAPES.

¹ *Recebido para publicação em 31/10/96. Aceito para publicação em 21/11/97.*

² *Departamento de Zootecnia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa PR. Caixa Postal 992/993 CEP 84010-330.*