



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Reaproveitamento de resíduos agroindustriais: processo biosustentável para produção do exopolissacarídeo succinoglucana

TIELES CARINA DE OLIVEIRA DELANI

Maringá

2022

TIELES CARINA DE OLIVEIRA DELANI

Reaproveitamento de resíduos agroindustriais: processo biosustentável para produção do exopolissacarídeo succinoglucana.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

D337r

Delani, Tiele Carina de Oliveira

Reaproveitamento de resíduos agroindustriais : processo biosustentável para produção do exopolissacarídeo succinoglucana / Tiele Carina de Oliveira Delani. -- Maringá, PR, 2022.
68 f.igs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Graciette Matioli.

Coorientadora: Profa. Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

1. Succinoglucana. 2. Reaproveitamento de resíduos. 3. Soro de leite. 4. Rhizobium radiobacter. 5. Propriedades reológicas. I. Matioli, Graciette , orient. II. Herrig, Suelen Pereira Ruiz, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 23.ed. 631.4

TIELES CARINA DE OLIVEIRA DELANI

**“REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: PROCESSO
BIOSUSTENTÁVEL PARA PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO
SUCCINOGLUCANA”**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós- graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.



Prof. Dr. Anderson Reginaldo Sampaio



Profa. Dra. Gislaíne Franco de Moura Costa



Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho



Profa. Dra. Camila Sampaio Mangolim

GRACIETTE

MATIOLI:60668989904

Assinado de forma digital por

GRACIETTE MATIOLI:60668989904

Dados: 2022.09.27 13:23:31 -03'00'

Profa. Dra. Graciette Matioli
ORIENTADORA

Maringá – 2022

Orientadora:

Profa. Dra. Graciette Matioli

Coorientadora:

Profa. Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig

BIOGRAFIA

Tieles Carina de Oliveira Delani nasceu no dia 26 de maio de 1983, na cidade de Ampére, Paraná, Brasil. Possui graduação em Farmácia Industrial pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Tem experiência na área da docência no ensino superior, nas disciplinas de química e análise de alimentos, controle e gestão da qualidade de medicamentos. Também já atuou como farmacêutica responsável em farmácias de dispensação e atualmente é supervisora da gestão da qualidade e professora da disciplina de bromatologia EAD Unicesumar.

Dedico este trabalho
Aos meus filhos João Pedro e Leticia, meus amores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais e meus filhos, pelo amor, compreensão, paciência, conselhos e incentivos, e acima de tudo pelo apoio e esforços empregados para que fosse possível a realização deste estudo.

À minha orientadora professora Dra Graciette Matioli, agradeço à oportunidade concedida, por todo o conhecimento transmitido, apoio, compreensão, paciência, orientação e amizade que possibilitaram o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À professora Dra. Suelen Ruiz Pereira pela orientação, conhecimento transmitido, apoio, compreensão, paciência e amizade.

Ao professor Dr. Anderson Reginaldo Sampaio, obrigada pelo desenvolvimento das análises, discussões e resultados, orientação, confiança, paciência, amizade e por todo o conhecimento transmitido.

À professora Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz e ao Luis Henrique Reichembach da UFPR, obrigada pelo desenvolvimento das análises e resultados, orientação e por todo o conhecimento transmitido.

À professora Dra. Francielle Sato e a sua aluna Raquel pelo apoio, incentivos, desenvolvimento das análises e discussões sobre os resultados obtidos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Enzimática Marília, Nathália, Cecília, Hâmara, Juliana, Thamara, Vanderson, Carolina, Camila, e Richard por todo carinho, amizade, auxílio e incentivos.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos membros titulares e suplentes da banca pela disponibilidade e contribuição para a melhoria deste trabalho. Enfim, a todos aqueles que auxiliaram na realização deste trabalho, o meu sincero obrigada!

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado é apresentada na forma de um artigo de revisão a ser publicado como capítulo de livro e um artigo científico, descritos a seguir:

1. Tieleles Carina de Oliveira Delani, Cecilia Valente Rodrigues Truite, Hâmara Milanese de Souza, Anderson Reginaldo Sampaio, Suelen Pereira Ruiz. **Processos biotecnológicos sustentáveis para obtenção de succinoglucanas**. Artigo publicado como capítulo de livro eletrônico “Segurança Alimentar e Nutricional” pela Editora Atena, a ser divulgado em outubro de 2022.
2. Tieleles Carina de Oliveira Delani, Marília Gimenez Nascimento, Juliana Harumi Miyoshi, Anderson Reginaldo Sampaio, Raquel da Silva Palácios, Francielle Sato, Luis Henrique Reichembach, Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, Suelen Pereira Ruiz e Graciette Matioli. **Rheological and structural characterization of succinoglycan obtained by bioconversion of the agroindustrial residue deproteinized whey**. Artigo científico submetido ao periódico Rheological Acta. Fator de impacto: 3,069, com classificação A3, no Qualis Único-Capes.

RESUMO GERAL

Introdução: Atualmente são gerados uma quantidade considerável de resíduos agroindustriais e, desta forma, descobrir novos processos tecnológicos que promovam o seu beneficiamento pode levar a obtenção de produtos comercializáveis de menor custo e que impactam positivamente na preservação do meio ambiente. O reaproveitamento de resíduos agroindustriais para o desenvolvimento de processos biosustentáveis na produção de exopolissacarídeos bacterianos tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos, com o objetivo de produzir biomateriais mais baratos, com maior rendimento e melhor aplicabilidade tecnológica. Estes exopolissacarídeos bacterianos, são estruturas químicas complexas e apresentam grande variabilidade estrutural e funcional, o que possibilita sua aplicação em diversos ramos industriais como alimentício, farmacêutico, cosmético e químico. Suas principais propriedades tecnológicas são: agentes espessantes, emulsificantes e gelificantes. É um exopolissacarídeo ácido, solúvel em água, que tem ganhado interesse industrial, pois apresenta propriedades tecnológicas superiores na promoção da viscosidade, além de, estabilidade frente aos diversos processos industriais. A viscosidade é afetada pelo tamanho da cadeia polissacarídica e pela presença e quantidade de substituintes não sacarídicos. A succinoglucana é composta por resíduos de galactose e glicose, unidos por ligações do tipo β numa proporção molar de 1:7, apresentando, também, alguns substituintes não-sacarídeos como piruvato, succinato e acetato. A aplicabilidade tecnológica da succinoglucana pode ser afetada, uma vez que a mesma sofre variações em sua estrutura química de acordo com a fonte de carbono e cepa bacteriana utilizada para sua produção. Desta forma, resíduos agroindustriais como novas fontes de carbono são importantes na pesquisa para produção de succinoglucana. Uma boa sugestão é o soro de leite, pois é um resíduo agroindustrial de baixo custo, que possui em sua composição características nutricionais que favorecem o crescimento de microrganismos, possibilitando seu uso em processos fermentativos de bioconversão.

Objetivos: O objetivo desse trabalho foi delinear a importância do reaproveitamento de resíduos agroindústrias para o desenvolvimento de processos fermentativos biosustentáveis na produção de exopolissarídeos, em especial a succinoglucana. Para tanto, foi realizada uma revisão, no qual foi realizado um estudo comparativo entre quatro diferentes fontes de carbono biosustentáveis utilizadas na produção de succinoglucanas: casca de arroz, xarope de tâmara, melaço de cana-de-açúcar e de beterraba. Também foi avaliada a capacidade de bioconversão do substrato, a estrutura química da molécula e seu perfil reológico. Um segundo estudo, o qual resultou num artigo científico, foi delineado para avaliar a produção de succinoglucana por *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720 utilizando como fonte de carbono o soro de leite integral e desproteínado. A interferência dos íons nitrogênio, potássio e magnésio na bioconversão deste substrato foi verificada. As características estruturais e as propriedades reológicas da succinoglucana produzida também foram analisadas.

Materiais e métodos: Um levantamento bibliográfico sobre as principais características das succinoglucanas e um estudo comparativo do reaproveitamento de quatro fontes de

carbono biosustentáveis em sua produção foi realizado nesta revisão, avaliando como estas fontes afetam as características estruturais e reológicas desta molécula. No segundo artigo, foi avaliado o reaproveitamento do resíduo agroindustrial soro de leite integral e desproteínado como fonte de carbono na produção de succinoglucana. Oito meios de cultura foram elaborados com diferentes íons para bioconversão do soro do leite, utilizando o microrganismo *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. Para todas as formulações elaboradas, a fermentação foi conduzida em pH neutro, com 30 mg do microrganismo liofilizado, à 30 °C, com agitação orbital de 180 rpm, durante 8 dias consecutivos. No tempo zero e a cada 48 horas foram coletados 1 mL de amostra e realizada a quantificação da succinoglucana produzida por gravimetria. Ao final da fermentação foi quantificado o total produzido da succinoglucana, e esta foi liofilizada. Visando geração mínima de resíduos, somente a succinoglucana proveniente da formulação que apresentou melhor produção foi escolhida para ser utilizada nos ensaios de caracterização estrutural e reológica. Para elucidação estrutural foram realizadas as técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) acoplada ATR e Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman). Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando as amostras em pó. A determinação da composição de monossacarídeos foi realizada por cromatografia em fase gasosa (CG). Na determinação do peso molecular da succinoglucana foi utilizado a técnica de cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz laser de multiângulos e detector diferencial de índice de refração (HPSEC-MALLS/RI). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN foi utilizada para confirmação estrutural e quantificação dos substituintes não sacarídeos succinato, piruvato e acetato. Para estudar as características reológicas foi utilizado reômetro avançado HAAKE MARS II com controle de tensão, deformação e taxa de cisalhamento, por meio de ensaios rotacionais e oscilatórios. Nos ensaios rotacionais relativos ao comportamento reológico, a viscosidade aparente das amostras com concentrações variando de 0,25-2,0% foram determinadas, aumentando-se progressivamente a taxa de cisalhamento. As propriedades viscoelásticas, módulo de armazenamento elástico (G') e módulo de perda viscosa (G'') foram determinados por meio de varreduras oscilatórias em solução aquosa de 2,0%. Varreduras dinâmicas de temperatura foram realizadas em solução aquosa de 2,0% entre 5,0 °C e 75,0 °C, no ciclo de aquecimento e subsequente resfriamento, a uma taxa de $\pm 2,0$ °C.

Resultados e discussão: Dentre os quatro processos tecnológicos biosustentáveis estudados nesta revisão, o emprego da casca de arroz hidrolisada apresentou melhor resultado e possibilitou a produção de 69,0 g/L de succinoglucana. Em relação as propriedades reológicas, o xarope de tâmara favoreceu a produção de uma succinoglucana de alta viscosidade, devido à alta massa molecular e índice de consistência (k). Para todas as succinoglucanas analisadas, o FTIR apresentou espectros com bandas típicas e similares as já estudadas, e o RMN possibilitou a identificação dos grupos não sacarídeos como o succinato, acetato e piruvato. Com o resultado deste estudo comparativo é possível alegar que a escolha da fonte de carbono e as condições operacionais do processo fermentativo influenciam nas características estruturais finais das succinoglucanas,

tornando-as ideais ou não para aplicação em processos industriais. No segundo artigo, o soro de leite foi bioconvertido em succinoglucana pelo *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. A formulação composta por soro de leite desproteínado, fosfato de potássio monobásico e sulfato de magnésio possibilitou a produção de $13,7 \pm 0,43$ g/L de succinoglucana. Verificou-se que a suplementação do meio com magnésio e potássio são importantes para o processo de fermentação. As análises de FTIR e FT-Raman apresentaram espectros com bandas típicas e similares à succinoglucana comercial. A massa molar aparente da succinoglucana foi estimada em $9,033 \times 10^5$ g/mol e o índice de polidispersidade foi de 1,044, representando a homogeneidade da amostra. A composição sacarídica glicose e galactose para a succinoglucana produzida foi de 6,6:1,0. A análise de ^1H RMN revelou o teor substituintes não-sacarídeos de 1,2%, 3,0% e 8,1% para acetato, succinato e piruvato, respectivamente. Os resultados reológicos mostraram que a viscosidade aparente das soluções de succinoglucana foi diretamente proporcional à concentração, e a solução apresentou comportamento pseudoplástico. Os ensaios dinâmicos de varredura de frequência identificaram que a concentração de 2,0% de succinoglucana é necessária para formação do sistema gel. A temperatura influenciou no comportamento viscoelástico da succinoglucana e revelou o ponto de fusão e a reversibilidade do gel.

Conclusão: No artigo de revisão, ao avaliar as diferentes características estruturais e funcionais da succinoglucana obtida pelo reaproveitamento de quatro fontes de carbono biosustentáveis, ficou evidente que desenvolver novos métodos para a produção destas biomoléculas é um grande desafio, uma vez que, a fonte de carbono e a cepa bacteriana utilizada, afetam a molécula de succinoglucana sintetizada. O sucesso no desenvolvimento de um novo método biosustentável pode tornar viável a industrialização da succinoglucana, por reduzir o custo produtivo e possibilitar a obtenção de novas moléculas com características reológicas adequadas. Além disso, a reutilização de resíduos agroindustriais estimula a síntese verde e impacta positivamente na preservação do meio ambiente. No segundo artigo, o resíduo agroindustrial soro de leite foi bioconvertido em succinoglucana pelo *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. Uma melhor produção da succinoglucana ocorreu na ausência das proteínas do soro de leite e na presença de íons magnésio e potássio. Os estudos reológicos avançados das soluções de succinoglucanas revelaram comportamento não newtoniano e pseudoplástico. A viscosidade aparente das soluções avaliadas diminuiu significativamente com o aumento da taxa de cisalhamento, característica reológica importante, pois demonstra que a succinoglucana obtida pode ser aplicada nos processamentos industriais. De acordo com os resultados obtidos, a succinoglucana produzida apresenta potencial para ser utilizada como espessante e agente modificador de viscosidade em alimentos e outros produtos. O soro de leite mostrou ser uma fonte de carbono promissora e viável no processo de fermentação, o que possibilita o manejo e descarte correto deste resíduo, impactando positivamente na preservação do meio ambiente.

Palavras-chave: succinoglucana, soro de leite, propriedades reológicas, processos biosustentáveis, preservação do meio ambiente, reaproveitamento de resíduos, *Rhizobium radiobacter*.

GENERAL SUMMARY

Introduction: A considerable amount of agro-industrial residues are currently being generated and, thus, discovering new technological processes that promote their improvement can lead to obtaining marketable products at lower cost and that positively impact the preservation of the environment. The reuse of agro-industrial waste for the development of biosustainable processes in the production of bacterial exopolysaccharides has been the target of research in recent years, aiming to produce cheaper biomaterials, with higher yield and better technological applicability. These bacterial exopolysaccharides, are complex chemical structures and show great structural and functional variability, which enables their application in various industries such as food, pharmaceutical, cosmetics and chemicals. Its main technological properties are: thickening, emulsifying, and gelling agents. Succinoglycan is an acidic exopolysaccharide, soluble in water, and has been gaining industrial interest because it presents superior technological properties in promoting viscosity, in addition to stability in several industrial processes. The viscosity is affected by the size of the polysaccharide chain as well as the presence and amount of non-saccharide substituents. Succinoglycan is composed of galactose and glucose residues joined by β -links in a molar ratio of 1:7, and it also has some non-saccharide substituents such as pyruvate, succinate, and acetate. The technological applicability of succinoglycan can be affected, since it suffers variations in its chemical structure according to the carbon source and the bacterial strain used for its production. Thus, agro-industrial residues as new carbon sources are important in the research for succinoglycan production. A suitable suggestion is the whey, because it is a low-cost agroindustrial waste, which has in its composition nutritional characteristics that favor the growth of microorganisms, enabling its use in fermentative processes of bioconversion.

Objectives: The objective of this work was to outline the importance of the reuse of agro-industrial wastes for the development of biosustainable fermentative processes in the production of exopolysaccharides, in particular succinoglycan. To this end, a review was conducted, in which succinoglycans were specifically addressed. A comparative study between four different biosustainable carbon sources used in the production of succinoglycans was performed in this review: rice husk, date syrup, sugar cane and beet molasses. The bioconversion capacity of the substrate, the chemical structure of the molecule and its rheological profile were also evaluated. A second study, which resulted in a scientific article, was designed to evaluate the production of succinoglycan by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720 using whole and deproteinized whey as carbon source. The interference of nitrogen, potassium and magnesium ions on the bioconversion of this substrate was tested. Structural characteristics and rheological properties of produce succinoglycan were also analyzed.

Materials and methods: A bibliographical survey on the main characteristics of succinoglycans and a comparative study of the reuse of four biosustainable carbon sources in their production was carried out in this review, evaluating how these sources

affect the structural and rheological characteristics of this molecule. In the second article, the reuse of whole and deproteinized agro-industrial whey as a carbon source in the production of succinoglycan was evaluated. Eight culture media were prepared with different ions for whey bioconversion, using the microorganism *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. For all formulations prepared, fermentation was conducted at neutral pH, with 30 mg of the lyophilized microorganism, at 30 °C, with orbital agitation of 180 rpm, for 8 consecutive days. At the start time and every 48 hours, 1 mL of sample was collected and the quantification of the succinoglycan produced was performed by gravimetry. At the end of fermentation, the total amount of succinoglycan produced was quantified, and it was lyophilized. Aiming at minimum waste generation, only the succinoglycan resulting from the formulation that presented the best production was chosen to be used in the structural and rheological characterization tests. For structural elucidation, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) coupled with ATR and Fourier Transform Raman Spectroscopy (FT-Raman) were performed. The infrared spectra were obtained using the powdered samples. The determination of the monosaccharide composition was performed by gas chromatography (GC). For the determination of succinoglycan molecular mass, it was used the technique of steric exclusion chromatography coupled with a multi-angle laser light scattering detector and a differential refractive index detector (HPSEC-MALLS/RI). And NMR nuclear magnetic resonance spectroscopy was used for structural confirmation and quantification of the non-saccharide substituents succinate, pyruvate, and acetate. To study the rheological characteristics, an advanced rheometer HAAKE MARS II with stress, strain and shear rate control was used through rotational and oscillatory tests. In the rotational tests concerning the rheological behavior, the apparent viscosity of the samples with concentrations ranging from 0.25-2.0% were determined by progressively increasing the shear rate. The viscoelastic properties, elastic storage modulus (G') and viscous perch modulus (G'') were determined by means of oscillatory sweeps in 2.0% aqueous solution. Dynamic temperature sweeps were performed in 2.0% aqueous solution between 5.0 °C and 75.0 °C, in the heating and subsequent cooling cycle, at a rate of ± 2.0 °C

Results and discussion: Among the four technological biosustainable processes studied in this review, the use of hydrolyzed rice husk presented the best result and allowed the production of 69.0 g/L of succinoglycan. Regarding the rheological properties, the date syrup favored the production of a succinoglycan with high viscosity, due to its high molecular mass and consistency index (k). For all the succinoglycans analyzed, the FTIR showed spectra with typical bands similar to those already studied, and the NMR allowed the identification of non-saccharide groups such as succinate, acetate, and pyruvate. With the result of this comparative study, it is possible to affirm that the choice of the carbon source and the operational conditions of the fermentative process influence the final structural characteristics of succinoglycans, making them ideal or not for application in industrial processes. In the second article, whey was bioconverted into succinoglycan by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. The formulation consisting of deproteinized whey, monobasic potassium phosphate and magnesium sulfate allowed the production of 13.7 ± 0.43 g/L of succinoglycan. Supplementing the medium with magnesium and potassium

was found to be important for the fermentation process. The FTIR and FT-Raman analysis showed spectra with typical bands similar to standard succinoglycan. The apparent molar mass of succinoglycan was estimated to be 9.033×10^5 g/mol and the polydispersity index was 1.044, representing the homogeneity of the sample. The saccharide composition of glucose and galactose for the succinoglycan produced was of 6.6:1.0. The ^1H NMR analysis revealed the non-saccharide substituent content of 1.2%, 3.0% and 8.1% for acetate, succinate and pyruvate, respectively. Rheological results showed that the apparent viscosity of succinoglycan solutions was directly proportional to the concentration, and the solution exhibited pseudoplastic behavior. Dynamic frequency scanning tests identified that a concentration of 2.0% of succinoglycan is required for formation of the gel system. Temperature influenced the viscoelastic behavior of succinoglycan and revealed the melting point and reversibility of the gel.

Conclusion: In the review article, by evaluating the different structural and functional characteristics of succinoglycan obtained by the reuse of four biosustainable carbon sources, it became evident that developing new methods for the production of these biomolecules is a great challenge, since the carbon source and the bacterial strain used affect the synthesized succinoglycan molecule. The success in the development of a new biosustainable method can make the industrialization of succinoglycan viable, by reducing the production cost and allowing the obtainment of new molecules with adequate rheological characteristics. Moreover, the reuse of agro-industrial residues stimulates the green synthesis and positively impacts the preservation of the environment. In the second article, the agro-industrial whey waste was bioconverted into succinoglycan by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. An improved succinoglycan production occurred in the absence of whey proteins and in the presence of magnesium and potassium ions. The advanced rheological studies of the succinoglycan solutions revealed non-Newtonian and pseudoplastic behavior. The apparent viscosity of the evaluated solutions decreased significantly with increasing shear rate, an important rheological characteristic, as it demonstrates that the obtained succinoglycan can be applied in industrial processing. According to the results obtained, the succinoglycan produced has the potential to be used as a thickener and viscosity modifier agent in food and other products. Whey proved to be a promising and viable carbon source in the fermentation process, which enables the correct management and disposal of this waste, positively impacting the preservation of the environment.

Keywords: succinoglycan, whey, rheological properties, biosustainable processes, environmental preservation, waste reuse, *Rhizobium radiobacter*.

Processos biotecnológicos sustentáveis para obtenção de Succinoglucanas

Tieles Carina de Oliveira Delani¹, Cecilia Valente Rodrigues Truite¹, Hâmara Milaneze de Souza¹, Anderson Reginaldo Sampaio², Suelen Pereira Ruiz³, Graciette Mاتيoli⁴.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil.

²Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação Aplicada a Agricultura, Unipar, 4282, Umuarama-PR, Brasil.

⁴Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil.

Resumo

Succinoglucana é um exopolissacarídeo bacteriano com propriedades tecnológicas promissoras para indústria alimentícia, química e farmacêutica, entretanto, seu uso ainda é restrito devido sua baixa produtividade. Nesta revisão foi abordado as características das succinoglucanas e apresentado um estudo comparativo entre succinoglucanas obtidas por quatro diferentes fontes de carbono biosustentáveis: casca de arroz, xarope de tâmara, melaço de cana-de-açúcar e de beterraba. Também foi avaliada a capacidade de bioconversão do substrato, a estrutura química da molécula e seu perfil reológico. Dentre os processos tecnológicos biosustentáveis, o emprego da casca de arroz hidrolisada possibilitou a maior produção de 69,0 g/L de succinoglucana. Em relação as propriedades reológicas, o xarope de tâmara favoreceu a produção de uma succinoglucana de alta viscosidade, devido à alta massa molecular e índice de consistência (k). Para todas as succinoglucanas analisadas, o FTIR apresentou espectros com bandas típicas e similares as já estudadas, e o RMN possibilitou a identificação dos grupos não sacarídeos como o succinato, acetato e piruvato. Com o resultado deste estudo comparativo é possível alegar que a escolha da fonte de carbono e as condições operacionais do processo fermentativo influenciam nas características finais das succinoglucanas, tornando-as ideais ou não para aplicação em processos industriais. Desta forma, encontrar novas fontes de carbono biosustentáveis para produção destas biomoléculas é um desafio. O sucesso no desenvolvimento de um novo método biosustentável pode tornar viável a sua industrialização, por reduzir o custo produtivo e possibilitar a obtenção de novas moléculas com características reológicas mais adequadas. Além disso, a reutilização de resíduos industriais estimula a síntese verde e impacta positivamente na preservação do meio ambiente.

Palavras-chave: succinoglucana, reologia, processos biosustentáveis, preservação do meio ambiente, reaproveitamento de resíduos.

Introdução

O potencial biotecnológico de novas fontes de carbono sustentáveis para produção de exopolissacarídeos bacterianos tem sido investigado nos últimos anos com o objetivo de produzir biomateriais de menor impacto ambiental, maior rendimento e melhor aplicabilidade tecnológica (Pedroso et al., 2019). Estes exopolissacarídeos bacterianos, conhecidos também como gomas, são estruturas químicas complexas e apresentam grande variabilidade estrutural e funcional (Gao et al., 2021), o que possibilita sua aplicação em diversos ramos industriais como alimentício, farmacêutico, cosmético e químico (Halder, Banerjee, & Bandopadhyay, 2017). Suas principais propriedades tecnológicas são: agentes espessantes, emulsificantes e gelificantes (Andhare et al., 2017).

Recentes descobertas das propriedades medicinais dos exopolissacarídeos, em especial da succinoglucana, tornaram estas moléculas ainda mais relevantes. Pesquisas apontam propriedades antioxidante, antitumoral, imunomodulatórias e prebióticas (Angelin & Kavitha, 2020; Moscovici, 2015; Yang et al., 2021; Yildiz & Karatas, 2018). Outras funções também conferem o uso como agente de tratamento para áreas poluídas e estabilizante na síntese verde de nanopartículas metálicas (Halder et al., 2017).

O sucesso da aplicação destes exopolissacarídeos nos processos industriais depende de suas propriedades funcionais e das características reológicas, a qual é influenciada, principalmente, pela composição química da molécula. Estudos do comportamento reológico de exopolissacarídeos demonstraram que a fonte de carbono, a cepa bacteriana e as condições ambientais do processo de fermentação interferem na sua capacidade de formar soluções viscosas, pois originam biomoléculas com diferentes composições estruturais (Kaneda & Onodera, 2009; Kavitate, Delattre, et al., 2019; Simsek, Mert, Campanella, & Reuhs, 2009; Sutherland, 1994).

Comparado ao mercado de produção de gomas de origem vegetal, a produção de exopolissacarídeos de origem microbiana é mais vantajosa, pois sua produção ocorre independente de condições climáticas e não compete com as terras destinadas ao plantio de alimentos (Freitas, Torres, & Reis, 2017). As matérias-primas utilizadas na produção destes exopolissacarídeos são simples, podem ser utilizados produtos de resíduos industriais e, além disso, o espaço necessário para o processo produtivo é relativamente pequeno, proporcionando menor custo e maior viabilidade. Outra vantagem do processo de produção é que as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em

suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do microrganismo e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura (McKellar, Van Geest, & Cui, 2003; Nwodo, Green, & Okoh, 2012; Schmid, 2018).

Glicose e sacarose são as fontes de carbono comumente usadas para cultivo microbiano e produção de exopolissacarídeos. Considerando que as fontes de carbono representam até 30% dos custos totais dos processos de fermentação, os pesquisadores tem intensificado a busca por substratos mais baratos (Freitas et al., 2017). A utilização de substratos alternativos de baixo custo em processos fermentativos, tais como resíduos agroindustriais, permite a redução dos custos de produção, minimizando problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos. Algumas fontes de carbono alternativas têm sido sugeridas para a produção de exopolissacarídeos, tais como melaço de cana-de-açúcar e beterraba, casca de arroz, cacau, soro de leite e resíduos de soja, (Bakhtiyari, Moosavi-Nasab, & Askari, 2015; Canuto, 2006; De M. Diniz, Druzian, & Audibert, 2012; Nitschke, Rodrigues, & Schinatto, 2001; Pedroso et al., 2019; Ruiz et al., 2015; Zhou et al., 2014).

Entretanto, pesquisas que apresentam fontes de carbono alternativas para a produção de succinoglucana ainda são poucas. Até o momento, os estudos que avaliam a produção de succinoglucana buscam inovações produtivas aliadas a engenharia genética na tentativa de encontrar cepas mutantes de alto rendimento (Andhare, Delattre, et al., 2017; Bakhtiyari et al., 2015; Gao et al., 2021; Kavitate, Delattre, et al., 2019) e novas fontes de carbono para processos biosustentáveis (Bakhtiyari et al., 2015; Moosavi-Nasab, Taherian, Bakhtiyari, Farahnaky, & Askari, 2012; Pedroso et al., 2019; Ruiz et al., 2015). Com base neste contexto, esta revisão tem por objetivo fazer um relato sobre exopolissacarídeos e apresentar um estudo comparativo entre succinoglucanas obtidas por quatro diferentes fontes de carbono biosustentáveis, além da avaliação da capacidade de bioconversão do substrato, a estrutura química da molécula e seu perfil reológico.

Exopolissacarídeos

Os polissacarídeos, popularmente chamados de gomas, são substâncias poliméricas com capacidade de formar dispersões com alto grau de viscosidade na presença de um solvente apropriado. Quimicamente, a maioria destas moléculas é

carboidrato complexo de alto peso molecular, podendo ser do tipo homopolissacarídeo ou heteropolissacarídeo (Hussain et al., 2017; Nwodo et al., 2012; Schmid, 2018). Até a década de 1950, as gomas utilizadas pela indústria eram produzidas a partir de plantas. Entretanto, devido as adversidades climáticas que podem afetar a produtividade desses compostos, surgiu a necessidade de buscar novas fontes que suprissem esta produção. A partir de então, nasceu uma nova geração desses produtos, os exopolissacarídeos de origem microbiana, produzidos sob condições controladas de fermentação, o que os tornam mais estáveis e sem problemas relacionados às variações climáticas (Costa, Nucci, & Oliveira-Jr, 2014).

Extremamente versáteis, os exopolissacarídeos microbianos fazem parte de uma classe de biopolímeros hidrossolúveis, e suas diversidades químicas e estruturais permitem que sejam aplicados em vários seguimentos industriais como químico, alimentício, farmacêutico, petrolífero, entre outros. Suas principais propriedades tecnológicas são agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, texturizantes e gelificantes (Canuto, 2006; Nampoothiri, Singhanian, Sabarinath, & Pandey, 2003).

Foram descobertos pelos cientistas do Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois, Estados Unidos, em meados dos anos 50, os quais procuravam por microrganismos capazes de sintetizar gomas hidrossolúveis de elevada importância comercial. Neste período, os Estados Unidos precisavam complementar ou substituir o mercado de gomas vegetais, uma vez que estas têm sua produção e disponibilidades afetadas por variações sazonais e adversidades climáticas, ficando sua oferta bastante vulnerável (Borges & Vendruscolo, 2008).

Apesar da diversidade de exopolissacarídeos com propriedades físico-químicas industrialmente promissoras já descobertos nas últimas décadas, poucos biopolímeros se tornaram de importância comercial e são autorizados para uso como aditivos em alimentos (Freitas, Alves, & Reis, 2011). A xantana é um dos biopolímeros mais comercializados no mundo, e já é utilizada como aditivo alimentar (Diniz, Druzian, & Audibert, 2012; Donot, Fontana, Baccou, & Schorr-Galindo, 2012). A succinoglucana é um exopolissacarídeo que vem ganhando recentemente importância comercial e interesse científico, pois apresenta características físico-químicas superiores ao da xantana. A Figura 1 apresenta alguns dos exopolissacarídeos de importância comercial e sua função (Freitas et al., 2011, 2017; Rana & Upadhyay, 2020).

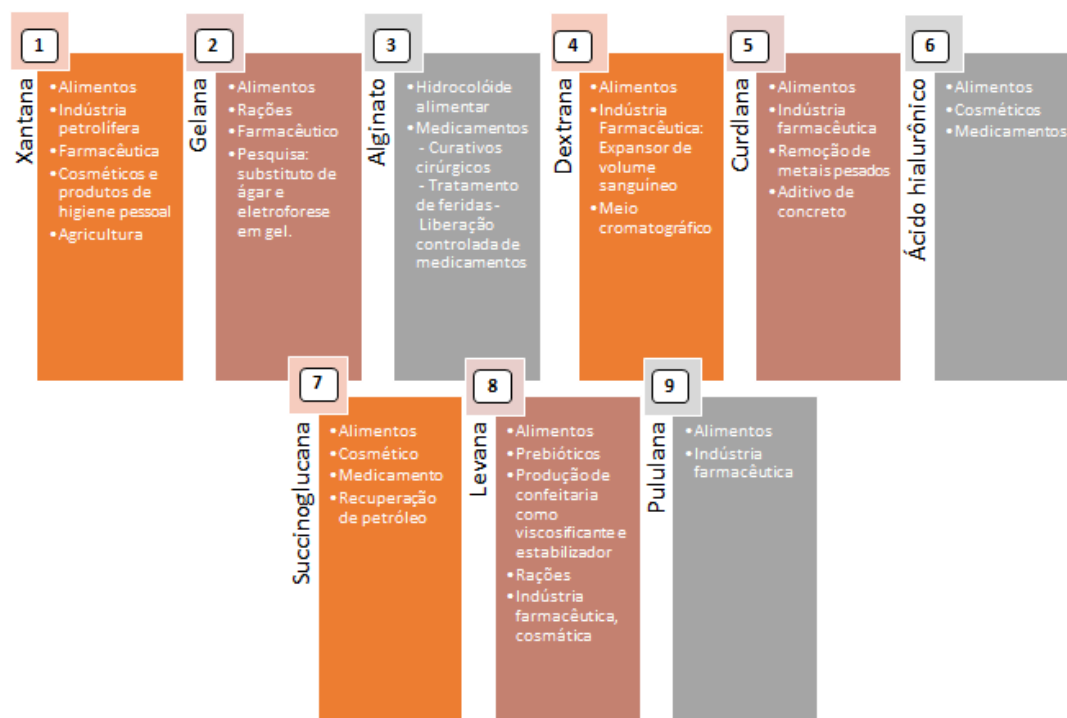


Figura 1: Principais exopolissacarídeos microbianos de importância comercial. Adaptado (Freitas et al., 2011, 2017; Rana & Upadhyay, 2020).

Succinoglucana

A succinoglucana é um exopolissacarídeo aniônico ácido, solúvel em água, identificada por Tokuya Harada em 1965. Produzido pela primeira vez por um microrganismo isolado do solo o *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, entretanto, outras espécies podem produzir a succinoglucana como *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* ou *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium meliloti*, e algumas espécies de *Pseudomonas* spp. (Bakhtiyari et al., 2015; Ruiz et al., 2015; Zevenhuizen, 1997), *Sinorhizobium meliloti* e *Ensifer meliloti* (Halder et al., 2017).

Cepas mutantes com alta capacidade de produção de succinoglucana também tem sido recentemente alvo de pesquisas (Gao et al., 2021). A tabela 1 apresenta as características do processo produtivo de succinoglucanas com diferentes cepas e seu rendimento.

Acreditava-se, inicialmente, que a succinoglucana era um homopolissacarídeo constituída apenas por resíduos de glicose e ácido succínico, entretanto, mais tarde, identificou-se que sua estrutura química é composta por resíduos de galactose e glicose, unidos por ligações do tipo β numa proporção molar de 1:7, apresentando também alguns substituintes não sacarídeos, tais como, piruvato, succinato e acetato, o que a classifica atualmente como um heteropolissacarídeo (Amemura, Mouri, & Harada, 1974; Halder et al., 2017; Harada, 1965, 1984; Harada & Yoshimura, 1964; Hisamatsu, Abe, Amemura, & Harada, 1980, 1978; Hisamatsu, Sano, Amemura, & Harada, 1978).

Tabela 1. Características do processo produtivo de succinoglucanas obtidas por diferentes fontes biosustentáveis.

Cepa	Fonte de carbono biosustentável (g)	Rendimento Máximo	Tempo de Produção	Referência
<i>Agrobacterium radiobacter</i> NBRC 12665	Melaço de cana-de-açúcar 7,5%	14,0 g/L	8 dias	(Ruiz et al., 2015)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> PTCC 1654	Melaço de beterraba 9,8 °Brix	22,7 g/L	~5 dias	(Bakhtiyari et al., 2015)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> PTCC 1654	Xarope de tâmara	~20 g/L	6 dias	(Moosavi-Nasab et al., 2012)
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 4720	Casca de arroz hidrolisada	69 g/L	3 dias	(Pedroso et al., 2019)

Dependendo das espécies microbianas envolvidas na sua produção, as succinoglucanas podem apresentar variações em sua estrutura química, principalmente na proporção de succinato e piruvato e, desta forma, podem apresentar propriedades reológicas diferentes (Nery, Brandão, Esperidião, & Druzian, 2008). Além disso, também ocorre variações no tamanho da cadeia, podendo ser produzidas succinoglucanas de alto peso molecular, maior que 100.000 Da ou baixo peso molecular, menor que 5000 Da (Ruiz et al., 2015).

As succinoglucanas são moléculas atrativas para industriais de alimento, química, farmacêutica e cosmética, pois apresentam boa estabilidade operacional sob diferentes condições, tais como, alta temperatura e pressão, pH extremo e altas taxas de cisalhamento (Simsek et al., 2009). Do ponto de vista industrial, a succinoglucana possui propriedades reológicas similares às da xantana, entretanto, em relação aos processos operacionais da indústria, a succinoglucana é operacionalmente mais estável (Jofré, Liaudat, Medeot, & Becker, 2018).

As propriedades tecnológicas das succinoglucanas que as tornam interessantes para uso nas indústrias em geral são: atividade espessante ou viscosificante, propriedades de emulsificação, atividade pseudoplastificante, propriedade de ligação cruzada, agente estabilizador de síntese de nanopartículas.

A atividade viscosificante, a qual consiste na alta viscosidade em soluções aquosas, é uma das principais características do succinoglucana. A viscosidade elevada é devido, principalmente, à presença de cerca de 10% de ácido succínico (Halder et al., 2017; Jeong, Kim, Hu, & Jung, 2022).

A succinoglucana também é usada para estabilizar emulsões de óleo em água em pH neutro. Pequenas concentrações de succinoglucana produzem grandes aumentos na estabilidade. Em algumas situações, em que proteínas estão envolvidas no sistema emulsificante, verificou que a adição de Ca^{2+} na presença de succinoglucana melhorou a estabilidade da emulsão, diminuindo a separação de fases (Halder et al., 2017; Jeong et al., 2022).

Na pesquisa realizada por (Kavitake, Marchawala, et al., 2019) as propriedades funcionais emulsificantes da succinoglucana produzida a partir da cepa *R. radiobacter* CAS foram avaliadas. O biopolímero formou eficientemente emulsões com vários óleos de qualidade alimentar sob condições de estresse e foi altamente tolerante a pH extremo, salinidade, concentração de sais inorgânicos e tratamentos térmicos.

Outra propriedade da succinoglucana é a atividade pseudoplastificante. A solução aquosa de succinoglucana é reversivelmente pseudoplástica por natureza sob aquecimento e resfriamento contínuos. Foi observado que a remoção dos grupos succinil melhora a pseudoplasticidade da solução; enquanto a remoção de grupos acetil leva a uma diminuição na natureza pseudoplástica (Halder et al., 2017).

O gel de succinoglucana é capaz de interagir com cátions metálicos polivalentes solúveis em água por meio da propriedade de ligação cruzada. A Pfizer International Corporation é a empresa líder no uso de succinoglucana bacteriana como um agente de reticulação industrial. Além disso, a propriedade de quelação de ferro (II) é relatada no caso de succinoglucana de baixa massa molecular, fator importante para a nodulação das raízes de plantas (Halder et al., 2017).

A succinoglucana também foi estudada como agente estabilizante no processo de síntese de nanopartículas. A succinoglucana de *Sinorhizobium meliloti* foi usado para reduzir a prata e estabilizar as nanopartículas de prata (AgNPs). O processo de redução do metal pode ser induzido pela oxidação do grupo aldeído do açúcar redutor da

succinoglucana reduzido a Ag^+ a Ag (AgNPs). Os grupos hidroxila abundantes na succinoglucana podem estimular a formação da matriz complexa ao redor das AgNPs para estabilizá-las mesmo sem a adição de qualquer agente redutor (Jeong et al., 2022).

A succinoglucana está comercialmente disponível sob o nome comercial Rheozan® SH e a empresa Solvay Novecare é o único produtor e fornecedor de succinoglucana bacteriana em todo o mundo. A empresa relatou produção de succinoglucana por fermentação de *Agrobacterium tumefaciens* e purificação por precipitação com isopropanol, seguida de secagem e moagem (Halder et al., 2017).

Métodos biosustentáveis para produção de succinoglucana

Nos últimos anos a comunidade científica tem buscado alternativas biosustentáveis no desenvolvimento de processos fermentativos ou industriais, com finalidade de impactar positivamente a preservação do meio ambiente (Pedroso et al., 2019). A reutilização de resíduos industriais é uma alternativa viável, diminuindo custos de produção e de descartes ou tratamento de sobras residuais do processamento industrial (Gao et al., 2021).

A succinoglucana é um exopolissacarídeo com grande potencial de aplicação em processos industriais (Halder et al., 2017). Encontrar fontes de carbono de baixo impacto ambiental e custos operacionais reduzidos no processo de produção deste exopolissacarídeo possibilita a obtenção de um produto de baixo custo, melhorando sua disponibilidade comercial (Kavitake, Delattre, et al., 2019; Nitschke et al., 2001).

As fontes biosustentáveis reaproveitáveis de resíduos indústrias utilizadas com sucesso na produção de succinoglucanas até o momento descritas na literatura são poucas. Entre elas tem-se o melaço de cana-de-açúcar (Ruiz et al., 2015), melaço de beterraba (Bakhtiyari et al., 2015), xarope de tâmara (Bakhtiyari et al., 2015), casca de arroz hidrolisada (Pedroso et al., 2019).

Dentre as fontes de carbonos citadas, a melhor produção de succinoglucana foi obtida com a casca de arroz hidrolisada (69,0 g/L) em 72 horas. Nesta pesquisa Pedroso e colaboradores (2019) obtiveram 16,1 g/L de monossacarídeos fermentáveis da celulose e hemicelulose a partir da casca de arroz, um resíduo agroindustrial, possibilitando sua utilização como fonte de carbono para síntese de succinoglucana. O processo de fermentação foi otimizado utilizando pH neutro, agitação orbital de 100 rpm, temperatura

de 30 °C, e meio de produção composto por hidrolisado de casca de arroz 16,1 g/L, fosfato de potássio monobásico 0,5 g/L e extrato de levedura 9,0 g/L. Entretanto, apesar de um alto rendimento, a succinoglucana apresentou baixo peso molecular e, conseqüentemente, uma capacidade viscosificante baixa. Portanto, muitos processos fermentativos têm apresentado uma produtividade interessante, porém o produto obtido tem baixa aplicabilidade.

Em segundo lugar, a melhor produção, foi obtida com uso de melaço de beterraba, com 22,7 g/L de succinoglucana produzida em 5 dias. Neste estudo, Bakhtiyari e colaboradores (2015), utilizaram o melaço de beterraba como fonte de carbono por apresentar de 47-48% de açúcar em composição. Neste processo de fermentação a concentração de açúcar utilizada foi de 10 °Brix, pH neutro, 120 horas de incubação à 28 °C, com taxa de agitação progressiva de 200-300 rpm. O meio de fermentação contendo melaço apresentou uma produção duas vezes maior em comparação com o meio contendo sacarose (10,3 g/L). Além disso, os autores evidenciaram que a succinoglucana produzida a partir da sacarose apresentou menor grau de succinilação e acetilação do que a produzida a partir do melaço de beterraba e, desta forma, o comportamento reológico dos exopolissacarídeos foram diferentes. A viscosidade da succinoglucana de melaço de beterraba foi maior do que da sacarose. Este resultado corrobora com o estudo de McKellar e colaboradores (2003) que descreveram a influência da composição do meio de cultura no comportamento reológico do exopolissacarídeo.

Na pesquisa conduzida por Moosavi-Nasab e colaboradores (2012), a utilização do xarope de tâmara como fonte de carbono renovável para obtenção de succinoglucana possibilitou uma produção de 20 g/L em 6 dias. A fruta foi escolhida como fonte de carbono porque é rica em carboidratos e outros componentes nutricionais importantes para o desenvolvimento dos microrganismos. As condições do estudo foram: xarope de tâmara (10 °Brix), KH_2PO_4 (1 g/L); MgSO_4 (0,25 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1 g/L); solução de oligoelementos (10 mL) em pH 7,0 a 28 °C. A succinoglucana produzida foi caracterizada por FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) e a análise reológica demonstrou que a viscosidade e a pseudoplasticidade foi proporcional ao aumento das concentrações da solução. A succinoglucana obtida mostrou-se adequada para aplicação em processos industriais, considerado agente espessante e construtor de viscosidade em alimentos.

No estudo de Ruiz e colaboradores (2015), o melaço de cana-de-açúcar foi utilizado como fonte de energia para produção de succinoglucana. O melaço da cana-de-

açúcar é um resíduo industrial vantajoso e pode ser usado como fonte de carbono devido ao seu alto teor de açúcar fermentável (48-60%). O meio de produção foi composto por fonte de carbono (2,5%- 7,5%), KH_2PO_4 (1 g/L), MgSO_4 (0,25 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1 g/L), e 10 mL de solução de oligoelementos, em pH 7,0. O melhor resultado nesta pesquisa foi obtido utilizando 7,5% de melaço de cana-de-açúcar, com produção de 14,0 g/L de succinoglucana. A succinoglucana produzida foi caracterizada por FTIR e a massa molar média foi de $2,326 \times 10^6$ g/mol. Os dados da reologia demonstraram que a succinoglucana obtida com melaço de cana-de-açúcar exibiu comportamento pseudoplástico e a viscosidade aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração da succinoglucana em solução.

O uso destas fontes alternativas de carbono demonstrou produção maior de succinoglucana em comparação as fontes convencionais, como a sacarose. A produção de succinoglucana a partir de xarope de tâmara foi duas vezes maior do que a sacarose após seis dias, com melaço de cana-de-açúcar a produção também foi maior em todas as concentrações testadas (2,5%, 5,0% e 7,5%) em relação a sacarose (Moosavi-Nasab et al., 2012; Ruiz et al., 2015).

Desta forma, o resultado destas quatro pesquisas demonstra a influência da escolha do substrato como fator relevante na capacidade de bioconversão pelo microrganismo. É importante ressaltar que, de acordo com a cepa bacteriana e disponibilidade de nutrientes, a bactéria apresenta tempo de produção e capacidade produtiva diferente. Além disso, a escolha do substrato fermentativo impacta diretamente nas características reológicas e estruturais da succinoglucana e, conseqüentemente, na aplicabilidade industrial desta biomolécula. Portanto, apesar das diferenças, observa-se que as fontes de carbono reaproveitáveis são alternativas viáveis no desenvolvimento de bioprocessos e impactam positivamente na preservação do meio ambiente, estimulando a síntese verde nos processos industriais.

Análise estrutural das succinoglucanas produzidas pelos processos biosustentáveis

A elucidação estrutural da succinoglucana é realizada principalmente por técnicas de FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) (Halder et al., 2017). Nos trabalhos analisados foi possível verificar, por meio da análise de FTIR das succinoglucanas obtidas por diferentes fontes de carbono, um padrão de sinais na identificação deste exopolissacarídeo. As

bandas espectrais (sinais de alta, moderada e baixa intensidade) estão presentes nas faixas aproximadas de 3400 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} e 630 cm^{-1} para a succinoglucana (tabela 2) (Moosavi-Nasab et al., 2012).

Tabela 2. Regiões de absorção FTIR e atribuições as bandas espectrométricas de succinoglucana.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição de banda
~3400-3600	Alongamento dos grupos –OH
~2900	Alongamento –CH dos grupos CH ₂ e CH ₃
~1640	COO– alongamento assimétrico de grupos carboxílicos
~1400	COO– alongamento simétrico de grupos carboxílicos Isso é possivelmente devido à tendência de flexão de simetria dos grupos CH ₃ dentro dos substituintes acetato e piruvato.
~1100	Vibração de alongamento C–C ou C–O

As quatro succinoglucanas obtidas apresentaram espectros semelhantes, confirmando a natureza estrutural da molécula. As bandas espectrométricas típicas encontradas nestes estudos para as succinoglucanas também foram evidenciadas por outros autores (Andhare, Delattre, et al., 2017; Evans, Linker, & Impallomeni, 2000; Gao et al., 2021; Halder et al., 2017).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN) também possibilitou a caracterização estrutural das succinoglucanas obtidas por casca de arroz e melaço de beterraba. As duas moléculas apresentaram os substituintes não sacarídeos em proporções diferentes. Para o melaço de beterraba, a molécula apresentou uma razão molar dos substituintes não sacarídeos de 1,38:2,37:~1,70 para piruvato, acetato e succinato.

A caracterização dos substituintes não sacarídeos é importante, pois à presença de grupos carregados como piruvato, acetato ou succinato interferem nas propriedades viscoelásticas das succinoglucanas, além disso, a presença do grupo succinato tem uma influência positiva maior na capacidade viscosificante da succinoglucana de acordo com Simsek e colaboradores (2009). Já para a succinoglucana obtida por meio da fermentação da casca de arroz, a molécula apresentou uma razão molar dos substituintes de 0,51:1,0:2,84, para succinato, acetato e piruvato. Também Simsek e colaboradores (2009)

descreveram que, de fato, diferentes cepas bacterianas (por exemplo, *S. meliloti* e *R. radiobacter*) e diferentes meios de cultivo levam a uma substituição de quantidades diferentes grupos não sacarídeos, principalmente como succinato e piruvato.

Características reológicas das succinoglucanas

A avaliação do comportamento reológico das succinoglucanas permite predizer se estas moléculas serão capazes de oferecer viscosidade ou apresentar propriedades gelificantes adequadas. Demonstram, também, a estabilidade da molécula frente aos processos industriais, à presença de íons ou à outras substâncias químicas e armazenamento (Zhou et al., 2014).

As características reológicas das biomoléculas em solução aquosa são avaliadas pelos parâmetros índice de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (k). Estes valores são obtidos em função da concentração e taxa de cisalhamento do exopolissacarídeo (Schramm, 2006). As succinoglucanas estudadas até o momento apresentam um padrão de características reológicas, tais como, fluido não newtoniano e comportamento pseudoplástico (Halder et al., 2017).

Os parâmetros reológicos das succinoglucanas obtidas com as fontes alternativas é demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros reológicos (índice de fluxo e consistência) de succinoglucanas obtidas por fontes de carbono biosustentáveis.

Fontes de Carbono	Concentração	Índice de fluxo (n)	Índice de consistência (k)	Comportamento reológico	Referências
Melaço de cana-de-açúcar	2,0%	0,43	0,70 PA	Pseudoplástico Não newtoniano	(Ruiz et al., 2015)
Melaço de beterraba	2,0%	0,18	7,06 PA	Pseudoplástico Não newtoniano	(Bakhtiyari et al., 2015)
Xarope de tâmara	2,0 %	0,29	3444,0 PA	Pseudoplástico Não newtoniano	(Moosavi-Nasab et al., 2012)
Casca de arroz hidrolisada	-	-	-	Pseudoplástico Não newtoniano	(Pedroso et al., 2019)

O índice de comportamento de fluxo (n) é um parâmetro que avalia se um líquido que apresenta certa viscosidade tem comportamento newtoniano ou não-newtoniano. Nos

líquidos com comportamento newtoniano sua viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento, como exemplos temos a água, óleo mineral, entre outros. Para estes fluidos ideais, o índice de comportamento de fluxo fica próximo ou igual a 1,0. Líquidos não-newtonianos sofrem alteração na sua viscosidade em função da taxa de cisalhamento, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Quanto mais o índice se afasta de 1,0, mais este fluido irá apresentar características não-newtonianas (Schramm, 2006). Já o índice de consistência (k) é um parâmetro que avalia a capacidade espessante da amostra analisada em função de uma determinada força, e é proporcional a concentração da amostra (Bakhtiyari et al., 2015; Ruiz et al., 2015).

A avaliação do índice de fluxo auxilia na classificação do fluido. Os fluidos não-newtonianos apresentam uma viscosidade aparente ou pseudoplástica, e este fenômeno também é conhecido como tixotropia. A pseudoplasticidade é uma propriedade exibida por alguns materiais nos quais a viscosidade diminui com o aumento da tensão de cisalhamento. Ao interromper a força que causa a tensão de cisalhamento, o material em repouso tende a voltar a sua viscosidade inicial. Esta capacidade reológica de mudar sua viscosidade em função de uma determinada pressão ao qual é submetido é vantajoso, principalmente em questões de escoamento de fluidos nas indústrias, pois com aumento da força aplicada o líquido diminui sua viscosidade, fluindo com maior facilidade pelos equipamentos, facilitando, por exemplo, as etapas de envase (Andhare, Goswami, et al., 2017; Castellane, Lemos, & Lemos, 2014; Zhou et al., 2014).

O fenômeno da pseudoplasticidade é uma característica exibida pela succinoglucana e foi uma das primeiras propriedades exploradas, pois contribui aumentando a estabilidade do polímero, mesmo sob condições operacionais drásticas, tais como alta temperatura e pressão, alta concentração salina, valores extremos de pH ou altas taxas de cisalhamento, o que a tornou adequada para uma das suas principais utilização: a extração e recuperação do petróleo (Nwodo et al., 2012; Souza & Garcia-Cruz, 2004).

As soluções aquosas de succinoglucana apresentam comportamento não-newtoniano com diminuição da viscosidade aparente consequente ao aumento da taxa de cisalhamento sob uma faixa de temperatura de 25 a 55 °C. Aumentando as concentrações da solução, a viscosidade e a pseudoplasticidade aumentam proporcionalmente; enquanto que, o aumento da temperatura diminui a viscosidade e pseudoplasticidade (Halder et al., 2017), ou seja, sua capacidade pseudoplástica e sua viscosidade aparente dependente da

concentração, das taxas de cisalhamento da amostra e da temperatura (Andhare, Goswami, et al., 2017; Castellane et al., 2014; Ruiz et al., 2015; Zhou et al., 2014).

É importante ressaltar que as propriedades reológicas são diretamente afetadas pelo tamanho da cadeia carbônica da succinoglucana e pela presença dos substituintes não sacarídeos, e estas características definem a aplicabilidade em um alimento (Simsek et al., 2009).

As succinoglucanas, de acordo com a fonte de carbono utilizada (tabela 3), apresentaram comportamentos reológicos diferentes. O maior índice de consistência (k) foi o apresentado pela succinoglucana obtida pelo xarope de tâmara. Comparando as diferentes succinoglucanas, pode-se sugerir que o tipo de fonte de carbono interfere no tamanho da molécula produzida e, conseqüentemente, na aplicabilidade destas moléculas.

O alto grau de viscosidade da succinoglucana obtida pelo xarope de tâmara deve-se, provavelmente, a uma molécula de grande massa molecular. Já a succinoglucana obtida pela fonte de casca de arroz hidrolisada apresentou uma cadeia molecular pequena, classificada por Pedroso et al. (2019) como um oligossacarídeo e, conseqüentemente, não teve capacidade de formar gel ou aumentar viscosidade da solução. Embora o método ter alta capacidade de produção (69,0 g/L), a succinoglucana produzida não foi funcional. O sucesso no desenvolvimento de novos processos biotecnológicos para obtenção de exopolissacarídeos dependem tanto da capacidade produtiva, bem como da aplicabilidade da molécula produzida. As succinoglucanas obtidas pelo melaço de beterraba e de cana-de-açúcar apresentaram viscosidades menores, entretanto a massa molecular da succinoglucana obtida pelo melaço de cana-de-açúcar foi superior ao da obtida pela casca de arroz hidrolisada (tabela 4).

Tabela 4. Massa molecular das succinoglucanas obtidas por diferentes fontes

Fontes de Carbono	Massa molecular	Referencias
Melaço de cana-de-açúcar	$2,326 \times 10^6$ g/mol	(Ruiz et al., 2015)
Melaço de beterraba	Não demonstrado	(Bakhtiyari et al., 2015)
Xarope de tâmara	Não demonstrado	(Moosavi-Nasab et al., 2012)
Casca de arroz hidrolisada	1368 g/mol	(Pedroso et al., 2019)

Além do tamanho da molécula influenciar no comportamento reológico, deve ser considerado também a presença de substituintes não sacarídeos como acetato, piruvato e succinato, que provocarão alterações conformacionais na molécula (Zhou et al., 2014).

Geralmente a viscosidade de uma solução é resultado das forças intermoleculares e das interações água-soluto que restringem o movimento molecular. O aumento da viscosidade com o aumento da concentração é devido ao maior teor de sólidos solúveis totais resultante, principalmente da limitação do movimento molecular (Bakhtiyari et al., 2015).

Para formar uma rede tridimensional com aprisionamento das moléculas de água, deve ocorrer interações intermoleculares das succinoglucanas dispersas. Os pontos de interações químicas podem ocorrer por meio dos substituintes não sacarídeos e dos grupos funcionais hidroxilas do polissacarídeo. Desta forma, as interações intermoleculares são afetadas diretamente pela temperatura, taxas de cisalhamento e pH da solução (Moosavi-Nasab et al., 2012).

A temperatura afeta a viscosidade ao diminuir as forças de interações químicas entre as moléculas do polímero em solução, ou seja, interações se tornam mais fracas em temperaturas mais altas. À medida que a temperatura aumenta, a energia térmica das moléculas também aumenta e, conseqüentemente, as distâncias intermoleculares, como resultado da expansão térmica a viscosidade diminui (Moosavi-Nasab et al., 2012).

A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa cisalhamento é resultado de um efeito de orientação. A alta viscosidade em baixa taxa de cisalhamento está relacionada a pequenas forças hidrodinâmicas que são incapazes de reorientar as moléculas. Com o aumento da taxa de cisalhamento, as forças hidrodinâmicas irão dominar e as moléculas se alinharão resultando na redução da viscosidade (Genovese & Lozano, 2006; Taherian, Fustier, & Ramaswamy, 2007). A capacidade de a solução diminuir a viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento é uma propriedade importante, porque significa que embora a viscosidade seja alta, a solução irá fluir facilmente quando despejada de um recipiente (Zhou et al., 2014). Outra característica relevante sobre a medição da viscosidade em baixa taxa de cisalhamento é que este resultado permite a apreciação da consistência do produto ao paladar, e o aprimoramento da consistência tem um papel importante na melhoria da aceitabilidade (Azarikia & Abbasi, 2010).

Outra forma de evidenciar que as interações intermoleculares entre os substituintes não sacarídeos e a estrutura dos carboidratos influenciam na formação de soluções viscosas, é por meio das análises reológicas em função do pH. No trabalho realizado por Moosavi-Nasab et al. (2012) com xarope de tâmara, os pesquisadores observaram que com o aumento do pH da solução, de 2,5 para 7, a pseudoplasticidade e

o coeficiente de consistência da succinoglucana aumentaram. Mudanças nas faixas de pH possibilitam alterações eletrônicas na estrutura química da molécula de succinoglucana. Quando a molécula fica levemente carregada com cargas negativas, alguns pontos de repulsão eletrostática pelos grupos funcionais permitem que a molécula assuma uma forma mais estendida e produzam soluções mais viscosas. Em faixas de pH onde o grau de ionização diminui, as cadeias não ficam totalmente estendidas e o índice de consistência diminui (Moosavi-Nasab et al., 2012).

Conclusão

Com esta revisão demonstrou-se que os exopolissacarídeos, em especial as succinoglucanas, são moléculas com alto potencial tecnológico de aplicação industrial e médica. A característica apresentada pela molécula de succinoglucana que melhor define o seu potencial é a sua alta viscosidade em solução aquosa, associada à sua propriedade pseudoplástica, a qual faz com que a succinoglucana seja estável frente aos diversos processos industriais. Entretanto, encontrar métodos fermentativos que atendam a demanda de produção de succinoglucana é um desafio, pois a síntese dessa molécula é influenciada pelo tipo de substrato e cepa bacteriana utilizada na fermentação. Além disso, outro desafio é aliar ao processo fermentativo o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, para promoção de metodologias biosustentáveis e que possibilitem a produção de succinoglucanas de baixo custo. Portanto, por meio da análise comparativa dos estudos apresentados, utilizando quatro diferentes fontes carbono, o uso do xarope de tâmara possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia com produção de aproximadamente 22,0 g/L de succinoglucana de alta viscosidade, com potencial adequado para aplicação em processos industriais. Este resultado comparativo permite concluir que, o êxito no desenvolvimento de um método de produção de exopolissacarídeos depende não somente da quantidade produzida, mas também da efetiva capacidade tecnológica da molécula, devendo existir um equilíbrio entre estes parâmetros. O tamanho da molécula e a presença dos substituintes não sacarídeos influenciam na sua viscosidade, e o tipo de fonte de carbono utilizada na bioconversão afeta diretamente a estrutura química das mesmas.

Referências bibliográficas

- Amemura, A., Moori, K., & Harada, T. (1974). Purification and properties of a specific, inducible beta-glucanase, succinoglucan depolymerase from flavobacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 334, 398–409.
- Andhare, P., Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., & Pathak, H. (2017). Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. *Food Hydrocolloids*, 64, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.008>
- Andhare, P., Goswami, D., Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., & Pathak, H. (2017). Edifying the strategy for the finest extraction of succinoglycan from *Rhizobium radiobacter* strain CAS. *Applied Biological Chemistry*, 60(3), 339–348.
<https://doi.org/10.1007/s13765-017-0286-8>
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020, November 1). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Azarikia, F., & Abbasi, S. (2010). On the stabilization mechanism of Doogh (Iranian yoghurt drink) by gum tragacanth. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 358–363.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.001>
- Bakhtiyari, M., Moosavi-Nasab, M., & Askari, H. (2015). Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by agrobacterium radiobacter grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. *Food Hydrocolloids*, 45, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.002>
- Borges, C., & Vendruscolo, C. (2008). Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. *Semina: Ciências Biológicas e Da Saúde*, 29(2), 171–188.
- Canuto, A. P. (2006). Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. *Dissertação*, 1–105.
- Castellane, T. C. L., Lemos, M. V. F., & Lemos, E. G. D. M. (2014). Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. *Carbohydrate Polymers*, 111, 191–197.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.066>
- Costa, M. R. M. F. da, Nucci, E. R., & Oliveira-Jr, E. N. (2014). Produção de goma

- xantana a partir de soro de leite. *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 1–8.
- De M. Diniz, D., Druzian, J. I., & Audibert, S. (2012). Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. *Polimeros*, 22(3), 278–281. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000032>
- Diniz, D. de M., Druzian, J. I., & Audibert, S. (2012). Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. *Polímeros*, 22(3), 278–281. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000032>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>
- Evans, L. R., Linker, A., & Impallomeni, G. (2000). Structure of succinoglycan from an infectious strain of *Agrobacterium radiobacter*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(5), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00131-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00131-8)
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Freitas, F., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245(PartB), 1674–1683. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.05.092>
- Gao, H., Yang, L., Tian, J., Huang, L., Huang, D., Zhang, W., ... Jiang, D. (2021). Characterization and rheological properties analysis of the succinoglycan produced by a high-yield mutant of *Rhizobium radiobacter* ATCC 19358. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 61–70. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.087>
- Genovese, D. B., & Lozano, J. E. (2006). Contribution of colloidal forces to the viscosity and stability of cloudy apple juice. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.003>
- Halder, U., Banerjee, A., & Bandopadhyay, R. (2017). Structural and Functional Properties, Biosynthesis, and Patenting Trends of Bacterial Succinoglycan: A Review. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), 278–284.

- <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0655-3>
- Harada, T. (1965). Succinoglucan 10C3: A new acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 112(1), 65–69.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90010-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90010-X)
- Harada, T. (1984). Progress in industrial microbiology. *Trends in Biotechnology*, 2(4), 111–112.
- Harada, T., & Yoshimura, T. (1964). Production of a new acidic polysaccharide containing succinic acid by a soil bacterium. *BBA - Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 83(3), 374–376.
[https://doi.org/10.1016/0926-6526\(64\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0926-6526(64)90023-0)
- Hisamatsu, M., Abe, J., Amemura, A., & Harada, T. (1978). Formation of an oligosaccharide, the repeating unit of succinoglucan, by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogènes*. *Carbohydrate Research*, 66(1), 289–294.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83259-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83259-0)
- Hisamatsu, M., Abe, J., Amemura, A., & Harada, T. (1980). Structural elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special beta-d-glycanases and methylation analysis. *Agric. Biol. Chem.*, 44(5), 1049–1055.
- Hisamatsu, M., Sano, K., Amemura, A., & Harada, T. (1978). Acidic polysaccharides containing succinic acid in various strains of *Agrobacterium*. *Carbohydrate Research*, 61, 89–96.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10–27.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>
- Jeong, J. P., Kim, Y., Hu, Y., & Jung, S. (2022). Bacterial Succinoglycans: Structure, Physical Properties, and Applications. *Polymers*, 14(2), 1–21.
<https://doi.org/10.3390/polym14020276>
- Jofré, E., Liaudat, J. P., Medeot, D., & Becker, A. (2018). Monitoring succinoglycan production in single *Sinorhizobium meliloti* cells by Calcofluor white M2R staining and time-lapse microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 181(November), 918–922. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.059>
- Kaneda, I., & Onodera, Y. (2009). Consistency change of succinoglycan aqueous sodium chloride solution during cooling process. *Nihon Reoroji Gakkaishi*, 37(3),

- 167–172. <https://doi.org/10.1678/rheology.37.167>
- Kavitake, D., Delattre, C., Devi, P. B., Pierre, G., Michaud, P., Shetty, P. H., & Andhare, P. (2019). Physical and functional characterization of succinoglycan exopolysaccharide produced by *Rhizobium radiobacter* CAS from curd sample. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.050>
- Kavitake, D., Marchawala, F. Z., Delattre, C., Shetty, P. H., Pathak, H., & Andhare, P. (2019). Biotechnological potential of exopolysaccharide as a bioemulsifier produced by *Rhizobium radiobacter* CAS isolated from curd. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 20(November 2018), 100202. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100202>
- McKellar, R. C., Van Geest, J., & Cui, W. (2003). Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter*. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 429–437. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00030-4)
- Moosavi-Nasab, M., Taherian, A. R., Bakhtiyari, M., Farahnaky, A., & Askari, H. (2012). Structural and Rheological Properties of Succinoglycan Biogums Made from Low-Quality Date Syrup or Sucrose Using *Agrobacterium radiobacter* Inoculation. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 638–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0407-4>
- Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012>
- Nampoothiri, K. M., Singhania, R. R., Sabarinath, C., & Pandey, A. (2003). Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, 38(11), 1513–1519. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00321-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00321-7)
- Nery, T. B. R., Brandão, L. V., Esperidião, M. C. A., & Druzian, J. I. (2008). Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: Rendimento e viscosidade. *Química Nova*, 31(8), 1937–1941. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800004>
- Nitschke, M., Rodrigues, V., & Schinatto, L. F. (2001). Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L1. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(1), 82–85. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612001000100018>

- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- Pedroso, G. B., Silva, L. O., Araujo, R. B., Saldanha, L. F., Denardi, L., & Martins, A. F. (2019). An innovative approach for the biotechnological production of succinoglycan from rice husks. *Industrial Crops and Products*, 137(December 2018), 615–627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.052>
- Rana, S., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577–583. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.04.084>
- Ruiz, S. P., Martinez, C. O., Noce, A. S., Sampaio, A. R., Baesso, M. L., & Matioli, G. (2015). Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.016>
- Schmid, J. (2018). Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Current Opinion in Biotechnology*, 53(Figure 2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.005>
- Schramm, G. (2006). *Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos*.
- Simsek, S., Mert, B., Campanella, O. H., & Reuhs, B. (2009). Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.033>
- Souza, D. M. de, & Garcia-Cruz, C. H. (2004). Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(4), 331. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2004v25n4p331>
- Sutherland, I. W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 12(2), 393–448. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(94)90018-3)
- Taherian, A. R., Fustier, P., & Ramaswamy, H. S. (2007). Effects of added weighting agent and xanthan gum on stability and rheological properties of beverage cloud emulsions formulated using modified starch. *Journal of Food Process Engineering*, 30(2), 204–224. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00109.x>

- Yang, Y., Sun, X., Zhao, Y., Ge, W., Ding, Z., Liu, J., ... Zhang, J. (2021). Anti-tumor activity and immunogenicity of a succinoglycan riclin. *Carbohydrate Polymers*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117370>
- Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41–46. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.06.009>
- Zevenhuizen, L. P. T. M. (1997). Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers*, 33(2–3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00054-4)
- Zhou, F., Wu, Z., Chen, C., Han, J., Ai, L., & Guo, B. (2014). Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.016>

***Rheological and structural characterization of succinoglycan obtained by
bioconversion of the agroindustrial residue whey***

Tieles Carina de Oliveira Delani¹, Marília Gimenez Nascimento¹, Juliana Harumi Miyoshi⁵, Anderson Reginaldo Sampaio², Raquel da Silva Palácios², Francielle Sato², Luis Henrique Reichembach³, Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz³, Suelen Pereira Ruiz⁴ and Graciette Matioli^{1,5*}

¹Postgraduate Program in Food Science, State University of Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil

²Department of Physics, State University of Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brazil

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Parana, PO Box 19046, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil

⁴Postgraduate Program in Biotechnology Applied to Agriculture, Unipar, 4282, 87502-210, Umuarama - PR, Brazil

⁵Department Pharmacy, State University of Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil

*Corresponding author: gmatioli@uem.br

*Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-2531-2567>

Highlights

Whole and deproteinized whey was bioconverted into succinoglycan by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720.

Supplementing the medium with magnesium and potassium is important for the fermentation process.

Dynamic frequency scanning tests identified a 2.0% concentration of succinoglycan for gel formation.

The temperature influenced the viscoelastic behavior of the succinoglycan studied and revealed the melting point and reversibility of the gel.

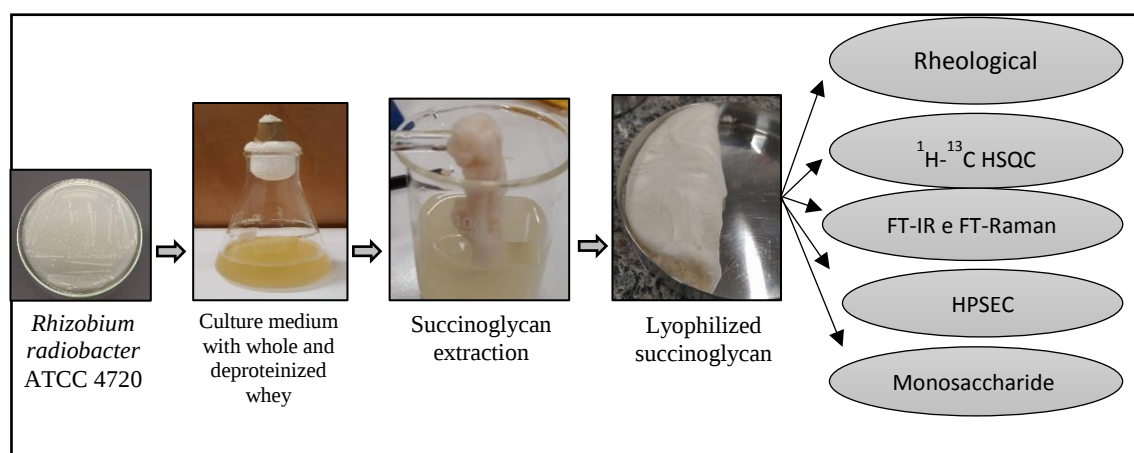
The amount of succinate and pyruvate substituents in the exopolysaccharide was estimated by NMR: 3.0% and 8.1%, respectively.

Abstract

Succinoglycan is a bacterial exopolysaccharide with thickening, gelling, stabilizing and emulsifying properties. In this study succinoglycan was produced from whey (deproteinized or not) and its rheological and structural characteristics were elucidated. Eight culture media were prepared with different ions for bioconversion of wheys into succinoglycan. The formulation composed of deproteinized whey, monobasic potassium phosphate and magnesium sulfate allowed the production of 13.7 ± 0.43 g/L of succinoglycan. The rheological results showed that the apparent viscosity of the succinoglycan solutions was directly proportional to the concentration, and the solution showed pseudoplastic behavior. Dynamic frequency sweep tests identified that a concentration of 2.0% of succinoglycan is required for formation of the gel system. Temperature influenced the viscoelastic behavior of succinoglycan and revealed the melting point and reversibility of the gel. The apparent molar mass of succinoglycan was estimated to be 9.033×10^5 g/mol and the polydispersity index was 1.044, representing the homogeneity of the sample. The monosaccharide composition of glucose and galactose for the succinoglycan produced was 6.6:1.0. The ^1H RMN analysis revealed the non-saccharide substituent content of 1.2%, 3.0% and 8.1% for acetyl, succinate and pyruvate, respectively. Deproteinized whey was shown to be a promising carbon source for the production of succinoglycan with thickening and texture modifying potential

Keywords: Succinoglycan, whey powder, rheological properties, *Rhizobium radiobacter*.

Graphical summary



Introduction

Exopolysaccharides are macromolecules produced and secreted around bacterial cells that exhibit a wide variety of chemical and structural combinations (Halder, Banerjee, & Bandopadhyay, 2017). Its functional properties as thickeners, gelling agents, stabilizers or emulsifiers provide high technological application potential for food processing, pharmaceuticals, medical products, cosmetics (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Moscovici, 2015), oil extraction and nanoparticle synthesis (Halder et al., 2017). Yang et

al. (2021) demonstrated that their applicabilities go beyond, and that many have medicinal properties, such as prebiotics, control and reduction of blood cholesterol, ability to stimulate the immune system, and antitumor activity (Gao et al., 2021; Moscovici, 2015; Yang et al., 2021).

Succinoglycan is an acidic, water-soluble exopolysaccharide first isolated from a soil microorganism called *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (Harada, 1965). Other species can produce succinoglycan such as *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, *Rhizobium meliloti*, and some species of *Pseudomonas* spp. (Bakhtiyari, Moosavi-Nasab, & Askari, 2015; Ruiz et al., 2015; Zevenhuizen, 1997), *Sinorhizobium meliloti* and *Ensifer meliloti* (Halder et al., 2017). This molecule is composed of galactose and glucose residues, joined by β -links in a molar ratio of 1:7, and also has some non-saccharide substituents such as pyruvate, succinate, and acetate (Amemura, Mouri, & Harada, 1974; Halder et al., 2017; Harada, 1984; Hisamatsu, Abe, Amemura, & Harada, 1980; Hisamatsu, Sano, Amemura, & Harada, 1978).

Unique characteristics give the succinoglycan molecule a high potential for industrial application, with chemical stability under drastic operating conditions, such as high temperature and pressure, extreme salinity and pH values, or high shear rates (Halder et al., 2017). The rheological properties of succinoglycan solutions are determined by the chemical composition of the exopolysaccharide, mainly by the amount and type of non-saccharide substituents. The rheological behavior of succinoglycan is non-Newtonian of the pseudoplastic type (Gao et al., 2021; Kavitate et al., 2019; Ruiz et al., 2015; Simsek, Mert, Campanella, & Reuhs, 2009; Zhou et al., 2014). They have a high thickening capacity in aqueous solutions due to the high molar mass and the presence of different substituents in the chemical structure of the molecule (Gao et al., 2021).

Due to the potential applicability of exopolysaccharides, especially succinoglycan, in recent years several renewable carbon sources have been investigated for the production of bacterial biopolymers, aiming to produce biomaterials with lower environmental impact, higher performance, better applicability and lower production cost (Andhare, Delattre, Pierre, Michaud, & Pathak, 2017). Among the sources already studied with promising results in the bioconversion of exopolysaccharides, it can be highlighted sugar cane molasses (Ruiz et al., 2015) and sugar beet (Bakhtiyari et al., 2015), soybean waste (Oliveira, Michelon, & Burkert, 2020), cassava and malt (Canuto, 2006), whey (Nitschke, Rodrigues, & Schinatto, 2001; Zhou et al., 2014), cocoa husk (De M. Diniz,

Druzian, & Audibert, 2012), rice husk (Pedroso et al., 2019) and low-quality date syrup (Moosavi-Nasab, Taherian, Bakhtiyari, Farahnaky, & Askari, 2012).

Aiming at the use of industrial residues and the reduction of production costs of exopolysaccharides, the whey, resulting from the manufacture of cheese, has been studied. It has in its composition lactose (70~80%), soluble proteins (8~14%), minerals (12~15%), lactic acid (0.8~12%) and lipids (1~7%), corresponding to 90% of the milk volume and, due to the high carbohydrate content, it can be considered a rich and easy to obtain culture medium (Li, Ding, Chen, Shi, & Wang, 2020). World whey production is estimated at more than 108 tons per year (Húngaro, Calil, Ferreira, Chandel, & Da Silva, 2013). According to Embrapa, in 2020, the cheese industry in Brazil absorbed approximately 8.7 billion liters of milk (Embrapa, 2021). However, only 15% of the available whey is reused by the industries, and a large part is still discarded as wastewater into the environment (Húngaro et al., 2013). In addition, Brazil produces approximately 8 billion liters of whey per year, which can supply the production demand (Embrapa, 2019).

To the best of the authors' knowledge, to date, there are no descriptions in the literature of the use of deproteinized whey powder for succinoglycan production and whether whey proteins interfere in the bioconversion process. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the production of succinoglycan by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720 using deproteinized whey powder as carbon source, and the interference of nitrogen, potassium and magnesium ions on the bioconversion of this substrate. The structural characteristics and rheological properties of succinoglycan were also evaluated.

Materials and methods

Materials

Rhizobium radiobacter ATCC 4720 was acquired by Fundação André Tosello - Tropical Culture Collection (Campinas, SP). All chemical reagents used in the study were of analytical grade. The whey powder was donated by Alibra Ingredientes Ltda (Marechal Cândido Rondon, PR) and the commercial succinoglycan (Rheozan®) was donated by Rhodia Solvay Group (São Paulo, Brazil).

Microorganism and cultivation conditions

Rhizobium radiobacter ATCC 4720 was reactivated in growth medium according to the supplier's specifications: meat extract 3 g/L; polypeptone 5 g/L; pH 7.0 and incubated at 30 °C for 24 h. After cultivation at 30 °C for 24 h, 3 to 5 colonies were collected and transferred to a test tube containing 5 mL of the growth medium, which was kept for another 24 h at 30 °C. The content of the tube was added to an Erlenmeyer flask containing 50 mL of the growth medium and placed in an incubator with 180 rpm agitation for 24 h. Subsequently, a 100 µL aliquot was inoculated in solid medium, and incubated for 24 h at 30 °C. After growth, the colonies were removed and transferred to a saline solution 0.9% (NaCl), freeze-dried and stored in a freezer for their use in fermentation processes.

Whey deproteinization treatment

The deproteinization of the whey powder solution was performed to avoid possible interactions of milk proteins during the bioconversion process. The methodology was conducted according to Húngaro et al. (2013). A 1 L aqueous solution was prepared with 68 g of whey powder and it was treated with pure HCl (PA) until it reached pH 4.3. Subsequently, it was boiled to precipitate the proteins. The material was cooled to room temperature and filtered with cotton to remove the precipitated proteins. This solution was stored in flasks for sterilization (121 °C, 1 atm, 20 min).

Determination of lactose in deproteinized whey

The lactose concentration was determined using the DNS (3,5 dinitrosalicylic acid) method of Miller (1959). Deproteinized whey presented 49.3 ± 1.2 g/L of lactose and was used as carbon source. The result was used to adjust the concentration in the succinoglycan production medium to 5% lactose.

Succinoglycan production

The methodology for succinoglycan production was developed with modifications according to Moosavi-Nasab et al. (2012) and Ruiz et al. (2015). For reactivation of the stocked microbial cells, 30 mg of the freeze-dried microorganism was

transferred to 100 mL of liquid growth medium and kept in an orbital shaking incubator at 180 rpm for 24 h and 30 °C. Then, the medium was centrifuged at 9072 x g for 10 min at 4 °C for microbial cell separation. The cell pellet was transferred to Erlenmeyer flask containing 100 mL of production medium and incubated at 30 °C for 8 days at 180 rpm. A sample was collected every 48 h to evaluate the production of succinoglycan (g/L).

According to Table 1, eight formulations were developed to verify the capacity of succinoglycan production by the microorganism, four of them with whole milk whey and the other four with deproteinized whey as carbon source, and their concentrations adjusted to a 5% lactose solution. The trace elements solution was composed of 100 mL of 0.1 N HCl containing FeSO₄.7H₂O (0,5 g) MnSO₄.H₂O (0,2 g), ZnCl₂ (0,1 g), CoCl₂.6H₂O (0,1 g). During the entire production process, the pH values of the solutions were corrected with sterile HCl 0.1 M or NaOH 0.1 M and kept at pH 7.0.

Table 1 Composition of media for succinoglycan production by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720.

Compounds	F1	F2	F3	F4
Lactose carbon source (g/L)	50.0	50.0	50.0	50.0
Monobasic potassium phosphate (g/L)	1.0	1.0	1.0	1.0
Magnesium sulfate (g/L)	0.25	0.25	0.25	-
Ammonium phosphate dibasic (g/L)	1.0	-	-	-
Trace elements solution (mL)	10.0	10.0	-	-

Extraction and evaluation of succinoglycan production

The succinoglycan production medium was centrifuged at 9072 × g, 4 °C for 30 min in order to separate the microbial cells. From the resulting supernatant, cold absolute ethanol was added at a ratio of 1:2.5 (v/v) to precipitate the succinoglycan. The precipitate obtained was redissolved in distilled water and precipitated twice more with cold absolute ethanol to remove impurities, proteins and free monosaccharides. The pellet obtained was redissolved in distilled water and dialyzed in membranes for 72 h with constant exchanges of the dialysis solution four times a day. At the end, the material obtained was lyophilized and stored for analysis of rheological and structural characterization.

To evaluate the production of succinoglycan, 1 mL samples were taken every 48 h until the eighth day of production. The material was dried in an oven at 50 °C and quantification was performed by gravimetry and expressed in g/L. The assays were conducted in triplicate.

Structural analysis by FTIR-ATR e FT-Raman

Infrared spectra were obtained using the powdered samples in a spectrometer with ATR accessory (Bruker, Model Vertex 70V). The material was packed in a diamond sample holder and the final spectrum was an average of 256 scans, in the region between 400 and 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} . Raman spectra of the samples were obtained using a Raman spectrometer (Bruker, Model Vertex 70V) coupled with a Raman module (RAM II, Bruker) equipped with a germanium detector cooled in liquid nitrogen, and a Nd:YAG excitation laser with a wavelength of 1064 nm. Nominal power was of 500 mW. The succinoglycan was packed in a sample holder and the final spectrum was an average of 256 scans with a resolution of 4 cm^{-1} in spectral range from 400 to 4000 cm^{-1} .

Determination of monosaccharide composition by gas chromatography (GC)

The analysis was performed on a THERMO Trace GC Ultra chromatograph equipped with a flame ionization detector, Ross injector and DB-225 capillary column [30 m $\times$ 0.25 mm (i.d.)], with a film thickness of 0.25 μm . The detector and injector temperature were 300 °C and 250 °C, respectively. The oven temperature was programmed from 100 to 220 °C at a rate of 60 °C/min. A mixture of helium and nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The alditol acetates were identified by retention times compared to standards. For this assay, the sample was hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid for 2 h in an autoclave. At the end of hydrolysis, the excess acid was removed by evaporation (Biermann, 1989). After total acid hydrolysis, the monosaccharides were solubilized in distilled water and reduced by adding about 10 mg of sodium borohydride for 16 h at 4 °C (Wolfrom & Thompson, 1963b). Subsequently, a strongly acidic cation resin was added to remove the Na^+ ions. The solutions were filtered and the solvent evaporated under vacuum. It was added 1 mL of methanol to remove the boric acid, and the methyl borate formed was evaporated under vacuum. This process was

repeated three times. The alditols formed were acetylated by adding 0.5 mL of acetic anhydride and 0.5 mL of pyridine in sealed tubes and left for 12 h at room temperature (Wolfrom & Thompson, 1963a). The reaction was interrupted by the addition of ice, and the extraction of the alditol acetates was conducted by adding chloroform and then eliminating pyridine in subsequent treatments with 5% copper sulfate and distilled water. After evaporation of the solvent, the alditol acetates formed were analyzed by gas chromatography.

Determination of the molecular weight by exclusion chromatography

For this analysis, it was used the technique of steric exclusion chromatography coupled with a multi-angle laser light scattering detector and a differential refractive index detector (HPSEC-MALLS/RI). The analysis were performed on an equipment consisting of an HPLC pump (Waters 515), injector, 4 Ultrahydrogel columns - 120, 250, 500 and 2000 - with exclusion limits of 5×10^3 , 8×10^4 , 4×10^5 and 7×10^6 g/mol respectively, DAWN DSP Light Scattering (Wyatt Technology) and a differential refractive index detector model 2410 (Waters). The eluent used was a 0.1 M NaNO_2 solution containing 200 ppm NaN_3 . The samples were solubilized at a concentration of 1 mg/mL in the eluent solution. Before analysis, the samples were filtered on cellulose acetate membranes with a pore size of 0.22 μm . The average molar mass was determined by the scattered light method. The differential refractive index increment (dn/dc), necessary to calculate the molar mass by light scattering, was determined using succinoglycan concentrations of 0.2 to 1.0 mg/mL. The calculations were carried out using the ASTRA program.

Determination of the substituents by NMR

Proton NMR (^1H) and single heteronuclear quantum coherence (HSQC) spectra of the succinoglycan solution (40 mg/mL in D_2O) were conducted at 70 °C in a Bruker DRX 400 Avance spectrometer (Bruker, Germany). Acetone was used as internal standard ($\delta = 30.2$ for ^{13}C and $\delta = 2.22$ for ^1H). TopSpin software version 4.0.9 (Bruker, Germany) was used for data analysis. Analysis of the substituents was performed by quantifying the acetyl groups of succinoglycan by the methodology described by Hestrin, (1949). The reaction of the acetyl functional group with hydroxylamine was measured at

540 nm and penta-O-acetyl- β -D-galactopyranose was used as a standard. The other substituents were estimated by comparing the areas of the ^1H NMR peaks of acetyl versus succinate and pyruvate.

Rheological properties

Rheological studies were performed in an advanced rheometer HAAKE MARS II with stress and strain control (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), by using rotational and oscillatory tests. The geometry used was cone and plate (diameter 35 mm and cone angle 2°). In this configuration the minimum spacing between cone and plate is $100\ \mu\text{m}$.

In the rotational tests concerning the rheological behavior, the apparent viscosity of the samples (η_{ap}) was determined by progressively increasing the shear rate ($\dot{\gamma}$) in the range between 0.01s^{-1} and $1000\ \text{s}^{-1}$ at $25.0\ ^\circ\text{C}$. All viscosity curves were modeled using the Williamson equation,

$$\eta = \frac{\eta_o}{(1 + (k\dot{\gamma})^n)} \quad (1)$$

where k is the consistency index and η is the flow index, and η_o is the zero shear viscosity. Before each dynamic oscillatory experiment, the linear viscoelastic region was evaluated at $1\ \text{Hz}$ by strain sweep experiments, with 8% strain within the linear region for all samples. The viscoelastic properties, elastic recovery modulus (G') and viscous dissipation modulus (G'') were determined by using small amplitude oscillatory sweeps with frequency control, in the range between $0.01\ \text{Hz}$ and $10\ \text{Hz}$ at $25.0\ ^\circ\text{C}$.

Dynamic temperature sweeps were performed at $0.1\ \text{Hz}$ between $5.0\ ^\circ\text{C}$ and $75.0\ ^\circ\text{C}$ in the heating and subsequent cooling cycle, at a rate of $\pm 2.0\ ^\circ\text{C}$. A thin layer of low-viscosity mineral oil was used to cover the sample and prevent evaporation during the thermal tests. All rheological tests were conducted in triplicate.

Statistical Analysis

All tests were performed in triplicate and the results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Scott-knott test at 5% significance using the SISVAR program. For rheological and structural analysis, the Origin Pro 8 software was used.

Results and Discussion

Evaluation of culture medium for succinoglycan production

Since whey is rich in nutrients and already has proteins in its composition (Nitschke et al., 2001; Smithers, 2008), in this study we investigated whether whey proteins could prevent or decrease the bioconversion of this substrate into succinoglycan. In addition, it was also evaluated whether the presence of nitrogen, potassium, magnesium ions could influence the production of succinoglycan in the formulations with whole and deproteinized whey. Thus, to evaluate the production of succinoglycan, eight formulations of culture medium were prepared using whole whey and deproteinized whey as carbon sources. The results of succinoglycan production from these formulations are shown in Fig. 1.

Among the different culture media studied, the highest bioconversion was found in the deproteinized whey substrate in formulation F3, which produced 13.7 g/L of succinoglycan on the eighth day, with statistically significant difference ($p < 0.05$) from the other formulations (Fig. 1a). Formulation F4 had a succinoglycan yield of 10.9 g/L, followed by formulations F1 and F2, which showed no statistical differences ($p < 0.05$). For whole whey powder (Fig. 1b), formulations F1, F2, F4 did not show statistical differences. Formulation F3, for whole whey, was also the one that showed the best production, with biosynthesis of 10.8 g/L of succinoglycan, when compared with the other formulations using whole whey.

According to the results obtained with the eight formulations it was possible to observe that whey proteins interfere in the production of succinoglycan, since the best production occurred in the fermentative medium composed only of deproteinized whey, magnesium and potassium (F3) followed by the formulation of deproteinized whey and potassium ion (F4).

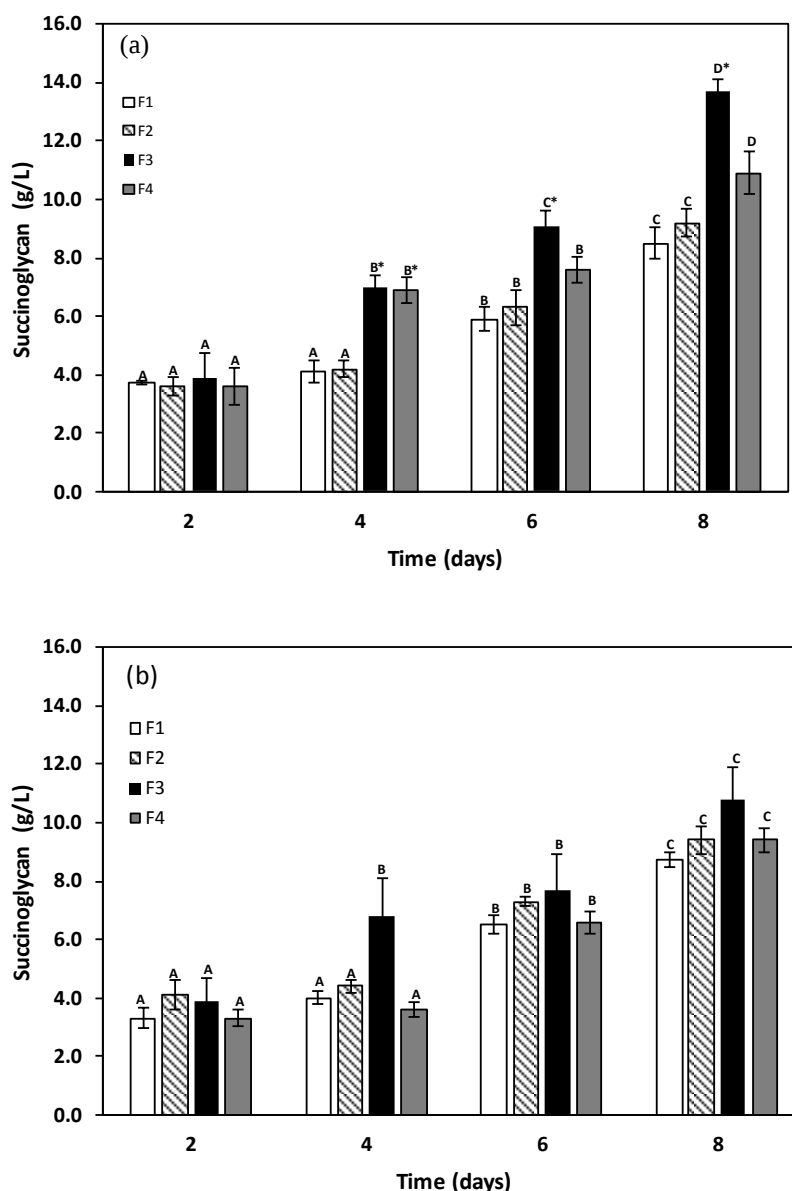


Fig. 1 Succinoglycan production (g/L) by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720 for 8 consecutive days at pH 7 from deproteinized whey (a) and whole whey (b) substrate in different media formulations F1; F2; F3 and F4. The letters and letters* represent statistical comparisons between the eight formulations on the different production days ($p < 0.05$) by ANOVA test followed by the Scott-Knott test.

Whey proteins are direct sources of nitrogen, an essential physiological supplement for the multiplication of bacteria. However, to obtain a good microbial growth curve it is essential that the culture medium provides carbon as a source of energy and nitrogen for cell multiplication and protein synthesis. Still, the production of exopolysaccharides only occurs when there is exhaustion of the nitrogen source (Liang et al., 2017). Since in this study a reactivation of the bacteria in growth medium is first performed for 24 h, the second step consisting of the carbon source, demonstrated that

whey proteins interfere with production and are not necessary for bioconversion into succinoglycan.

According to Sutherland, (1982, 1994, 2001), the carbon/nitrogen ratio in the culture medium decisively influences the production of an exopolysaccharide. At the beginning of the fermentation process, a higher nitrogen requirement is needed for rapid cell growth, however, when the nitrogen concentration in the culture medium is too high, it can reduce the exopolysaccharide production and influence the chemical structure and rheological properties. Fermentation media containing high carbon and low nitrogen sources favor biopolymer accumulation (Nitschke et al., 2001).

Nitschke et al. (2001) using the microorganism *Xanthomonas campestris* C₇L, demonstrated that the capacity of whey bioconversion into xanthan gum was also dependent on the carbon/nitrogen ratio in the culture medium, and thus proposed a two-step combined fermentative system, using whole whey in the first step and filtered (deproteinized) whey in the second. In the combined fermentative system, the whole whey presented 0.35% protein and the filtered whey (deproteinized) showed 0.18% protein. This strategy increased the yield and final concentration of xanthan, with 13 g/kg of xanthan being obtained in the first phase and 28 g/kg of xanthan after 30 hours of production in the second phase.

In formulation F3, composed of deproteinized whey, potassium and magnesium, an improved succinoglycan production was obtained when compared to the absence of magnesium in the fermentation medium. Thus, in addition to the influence of carbon and nitrogen supplementation on the bioconversion of whey into succinoglycan, it is suggested that the production yield is affected when there are changes in the supply of some ions.

Pedroso et al. (2019) evaluated the ability of *R. radiobacter* ATCC 4720 to use sugars from rice husk hydrolysis as carbon source in the synthesis of exopolysaccharide. From the experimental design with different formulations, they found that besides the carbon source, only supplementation with yeast extract and KH₂PO₄ were necessary.

They also observed that the presence of FeSO₄.H₂O did not contribute to a significant consumption of sugars in the fermentation process. Based on these results, it was evidenced that the concentrations of yeast extract and KH₂PO₄ significantly interfered with the bacterial metabolism. The best results were a consumption of 62.5% total sugars of the broth with rice husk extract, using 9.0 g/L of yeast extract and 0.5 g/L of KH₂PO₄.

Also according to Pedroso et al. (2019), the addition of phosphorus, potassium and some metal cations can assist in the secondary metabolism of the microorganism, while controlling the formation of lipids and carbohydrates, also acting as enzyme cofactors in the production of exopolysaccharides.

Sutherland (2001) described that the proportion of an exopolysaccharide produced is higher when phosphorus or nitrogen deficiency occurs, is lower when sulfur deficiency occurs, and is even lower for when potassium deficiency occurs. The inability of a bacterium to maximally produce exopolysaccharides under potassium-limiting conditions is probably due to inhibition of nutrient absorption from the fermentation medium. These ions are necessary in the fermentation process because they act in the uptake of substrate or as cofactors in the biosynthesis of exopolysaccharides. The production of exopolysaccharide by *Enterobacter aerogenes* was stimulated by the presence of Mg^{2+} , K^+ and Ca^{2+} , *Chromobacterium violaceum* had higher exopolysaccharide production in the presence of a reduced Fe^{3+} concentration and a higher Ca^{2+} concentration. Nitrogen-limiting conditions in the presence of a higher carbohydrate concentration always results in higher exopolysaccharide yield in *Rhizobium meliloti* cultures (Sutherland, 1982).

Important changes in the structure and chemical composition of an exopolysaccharide can also be caused by cultivation conditions. According to McKellar, Van Geest, & Cui. (2003), when microorganisms were grown in medium containing yeast extract, they produced an exopolysaccharide composed of mannose, glucose, and galactose, whereas when yeast extract was removed from the medium, the exopolysaccharide produced was composed mainly of glucose and galactose. Therefore, knowing the physiological needs of the microorganism used can ensure the successful production of an exopolysaccharide, resulting in good yield and attractive rheological characteristics for industrial application.

Reducing production cost by replacing sucrose from the conventional fermentation process with agroindustrial residues is a viable alternative to stimulate the synthesis of new exopolysaccharides and increase their applicability. Furthermore, the use of reusable sources contributes to a better destination of this waste, reflecting in care for the environment (Li et al., 2020).

In the study using hydrolyzed rice husk as a substitute for the conventional sucrose source, Pedroso et al. (2019) obtained a production of 69 g/L of succinoglycan on the third day of fermentation. In order to do so, the rice husk glycosidic units were released

from an ozonation process and pressurized acid hydrolysis, providing the use of this carbon source by the microorganism.

Studies using alternative carbon sources, such as beet molasses and sugarcane, obtained significant succinoglycan production, i.e. 22.7 g/L and 14 g/L, respectively (Bakhtiyari et al., 2015; Ruiz et al., 2015). The production of an exopolysaccharide was also evaluated from whey powder with isolated Kefir microorganism, in which the maximum productivity reached was approximately 2.8 g/L on the third day and then started to gradually decrease (Zhou et al., 2014). Evaluating the results already obtained by other research groups, it can be emphasized that, according to the carbon source and the strain used, there is a variation in the yield of the exopolysaccharide produced.

However, in the present research, using deproteinized whey powder containing 5% of lactose in the composition as carbon source, it was possible to obtain a yield of 13.7 g/L of succinoglycan on the eighth day of production. Thus, the exopolysaccharide obtained from the formulation with the best yield was selected to perform the chemical and rheological characterization studies.

Structural analysis by FTIR-ATR e FT-Raman

Fig. 2 illustrates the FTIR/ATR (a) and FT-Raman (b) infrared spectra for commercial succinoglycan and succinoglycan obtained from deproteinized whey powder. The infrared spectra were similar in band positions, so it was not possible to compare intensity (Fig. 2a). The spectra show that the commercial sample and the succinoglycan produced with deproteinized whey powder substrate are similar, both showed the bands related to the identification of the exopolysaccharide succinoglycan in the bonding regions of the OH groups, to the bands referring to the vibrations and deformations of the CH structures of the carbohydrates, as reported in studies by Andhare et al. (2017) and Bakhtiyari et al. (2015).

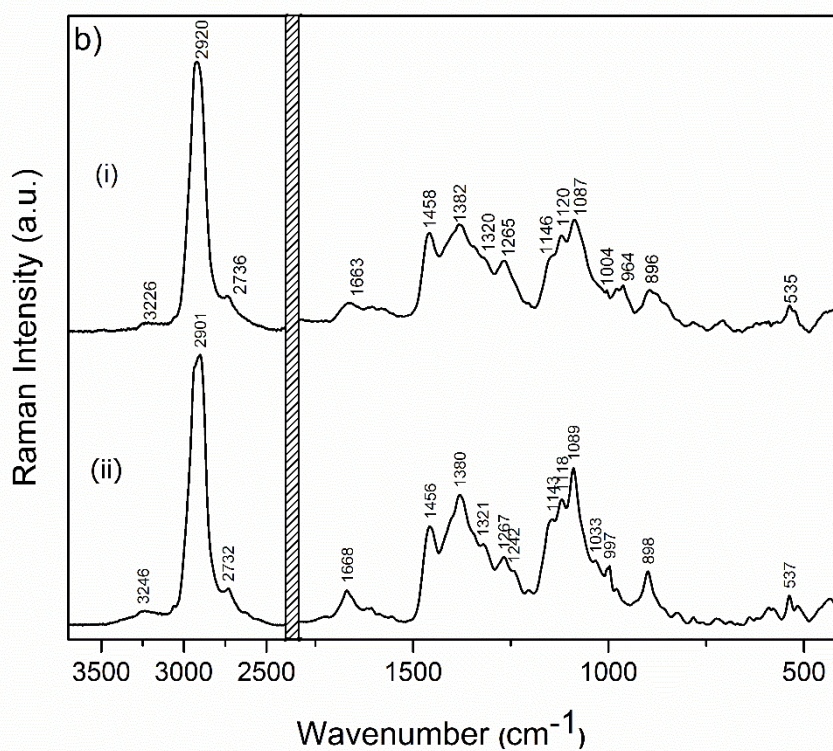
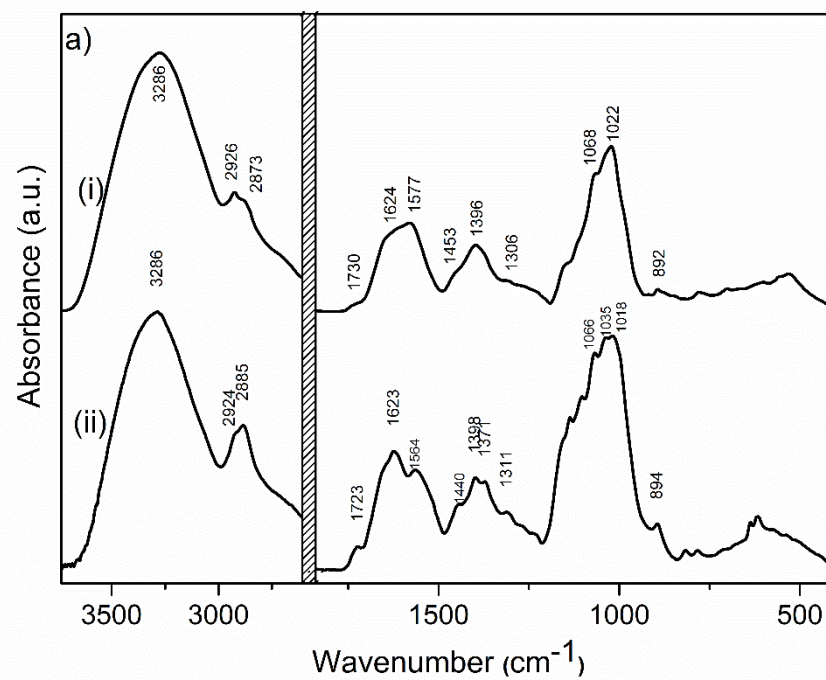


Fig. 2 FTIR/ATR (a) and FT-Raman (b) spectra of succinoglycan samples. (i) Succinoglycan produced from deproteinized whey and (ii) commercial succinoglycan.

The spectra showed a broad band near 3286 cm^{-1} , associated with the vibration of OH groups. The bands near 2900 cm^{-1} are assigned to the axial deformation of the CH bond in the carbohydrate structure, the bands at 2873 and 2885 cm^{-1} can be related to symmetric C-H stretching referring to the CH_3 group.

The bands near 1400 cm^{-1} can be associated with symmetric COO^- stretching (Najbjerg et al., 2011; Naumann, 2006; Ruiz et al., 2015; Wiercigroch et al., 2017). The band at 1066 and 1068 cm^{-1} can be associated with C-C or C-O stretching vibrations (Najbjerg et al., 2011), whereas the band at 1035 cm^{-1} , present in the standard sample, can be related to C-O-C bonding of the glucose ring (Mangolim et al., 2017). The band at 1018 and 1022 cm^{-1} indicate the presence of ester (C-O) bands (Ruiz et al., 2015). The bands at 894 and 892 cm^{-1} for standard and succinoglycan, respectively, may indicate the presence of β -type glycosidic bonds in both samples (Monteiro et al., 2012).

Therefore, the FTIR/ATR spectra of the succinoglycan sample obtained with deproteinized whey powder substrate show characteristics of carbohydrate and carboxyl groups similar to the spectrum of the commercial succinoglycan sample.

The Raman spectra (Fig. 2b) show that bands of the commercial succinoglycan and the produced exopolysaccharide were more similar in intensity and shape when compared to the FTIR/ATR spectra, and both techniques show that the structures of the samples are analogous. The bands at 3246 and 3226 cm^{-1} can be related to OH bonds, the bands at 2901 , 2732 and 2920 , 2736 cm^{-1} observed for the standard succinoglycan and the succinoglycan produced from deproteinized whey powder, respectively, can be related to the C-H stretching of CH_2 (Irudayaraj, 2007; Synytsya, Čopíková, Matějka, & Machovič, 2003).

The band present at approximately 1380 cm^{-1} can be attributed to CH_2 angular deformation and/or C-O-H deformation (Irudayaraj, 2007). The band at 1267 and 1265 cm^{-1} for commercial succinoglycan and succinoglycan produced from deproteinized whey, respectively, can be related to the side chain vibrational modes of the glycoses of CH_2OH (Boyaci et al., 2015; Mangolim et al., 2017).

The bands at 1118 , 1120 cm^{-1} and 1089 , 1087 cm^{-1} can be attributed to the symmetric and asymmetric C-O-C stretching of the glycosidic bonds (Irudayaraj, 2007; Mangolim et al., 2017), the band at 1033 cm^{-1} present in the standard sample can be related to the stretching of the C-C and C-OH bonds of the molecule, and the $\sim 890\text{ cm}^{-1}$ band, as well as in the infrared, indicates the C-H deformation of the β -type glycosidic bonds in both samples (Monteiro et al., 2012).

Therefore, it was possible to observe in both techniques that the samples are similar, suggesting that obtaining succinoglycan polysaccharide with whey powder substrate is a viable and affordable option.

Determination of monosaccharide composition, homogeneity and molar mass

The determination of the monosaccharide composition was performed by gas chromatography analysis after total acid hydrolysis followed by derivatization to alditol acetates. The polysaccharide had glucose and galactose in an average ratio of 6.6:1.0. Similar values were found by Gao et al. (2021) for succinoglycans produced by a high-yielding mutant strain (glucose:galactose molar ratio of 6.65:1.00 and 6.86:1.00). The succinoglycan monomer is an octasaccharide consisting of seven glucose residues and one galactose residue, with non-saccharide substituents such as acetate, succinate and pyruvate. Thus, the results confirmed that exopolysaccharide isolated in the present study is a succinoglycan. The elution profile of the succinoglycan sample obtained by HPSEC using multi angle laser light scattering (MALLS) and refractive index (RI) detectors are shown in Fig. 3.

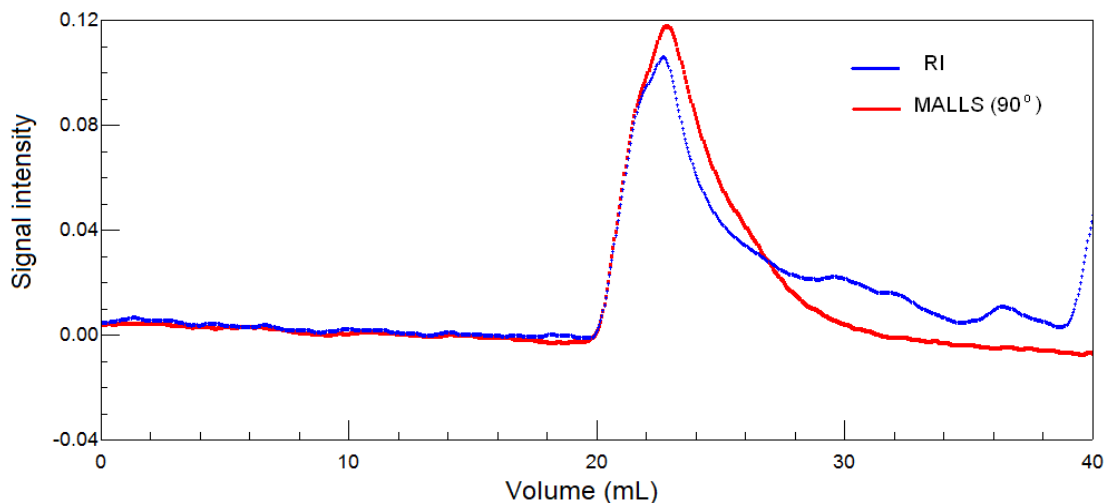


Fig. 3 Elution profile of the succinoglycan sample by (HPSEC-MALLS). In red light scattering (MALLS) detector (90° is shown); in blue refractive index (RI) detector.

The polysaccharide eluted in a single peak, detected by both, the light scattering detector and the refractive index detector, indicating the presence of a high molar mass polymer. Values of differential refractive index increment (dn/dc) and molar mass (M_w) found for the succinoglycan studied are presented in Table 2.

Table 2. Determination of the differential refractive index increment (dn/dc), molar mass (M_w) and polydispersity index (M_w/M_n) of succinoglycan using the HPSEC-MALLS methodology.

	Succinoglycan
dn/dc	0.1455
M_w	9.033×10^5 g/mol
M_w/M_n	1.044 ± 0.012

The molar mass was calculated to be 9.033×10^5 g/mol. The polydispersity index, which is related with the homogeneity of the sample, was low, similar to the value (1.06) reported by Kavitate et al. (2019).

It has been pointed out that the molar mass of exopolysaccharides, particularly succinoglycan, can range from low molecular weight ($< 5.00 \times 10^3$ Da) to high molecular weight ($> 1.00 \times 10^6$ Da) depending on the culture conditions, especially the carbon source used (Halder et al., 2017; Kwon, Lee, & Jung, 2011). The molar mass of the succinoglycan produced with deproteinized whey in the present study was slightly lower than the values of 1.55×10^7 Da and 1.26×10^6 Da, found by Gao et al. (2021) and 2.326×10^6 g/mol and 2.734×10^6 g/mol, reported by Ruiz et al. (2015) for succinoglycans produced by *Rhizobium radiobacter* ATCC 19358 and *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665, respectively. Zhou et al., (2014) reported molar mass values between 1.55 and 5.30×10^6 Da for succinoglycan, depending on the culture conditions. Kavitate et al., (2019) also found a M_w in this range (4.05×10^6 g/mol) for a succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* CAS from curd sample.

NMR spectroscopy was used to investigate the presence of substituents in the polysaccharide.

Determination of the substituents by NMR

Fig. 4 shows the proton NMR and heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of the succinoglycan solution (40 mg/mL in D₂O).

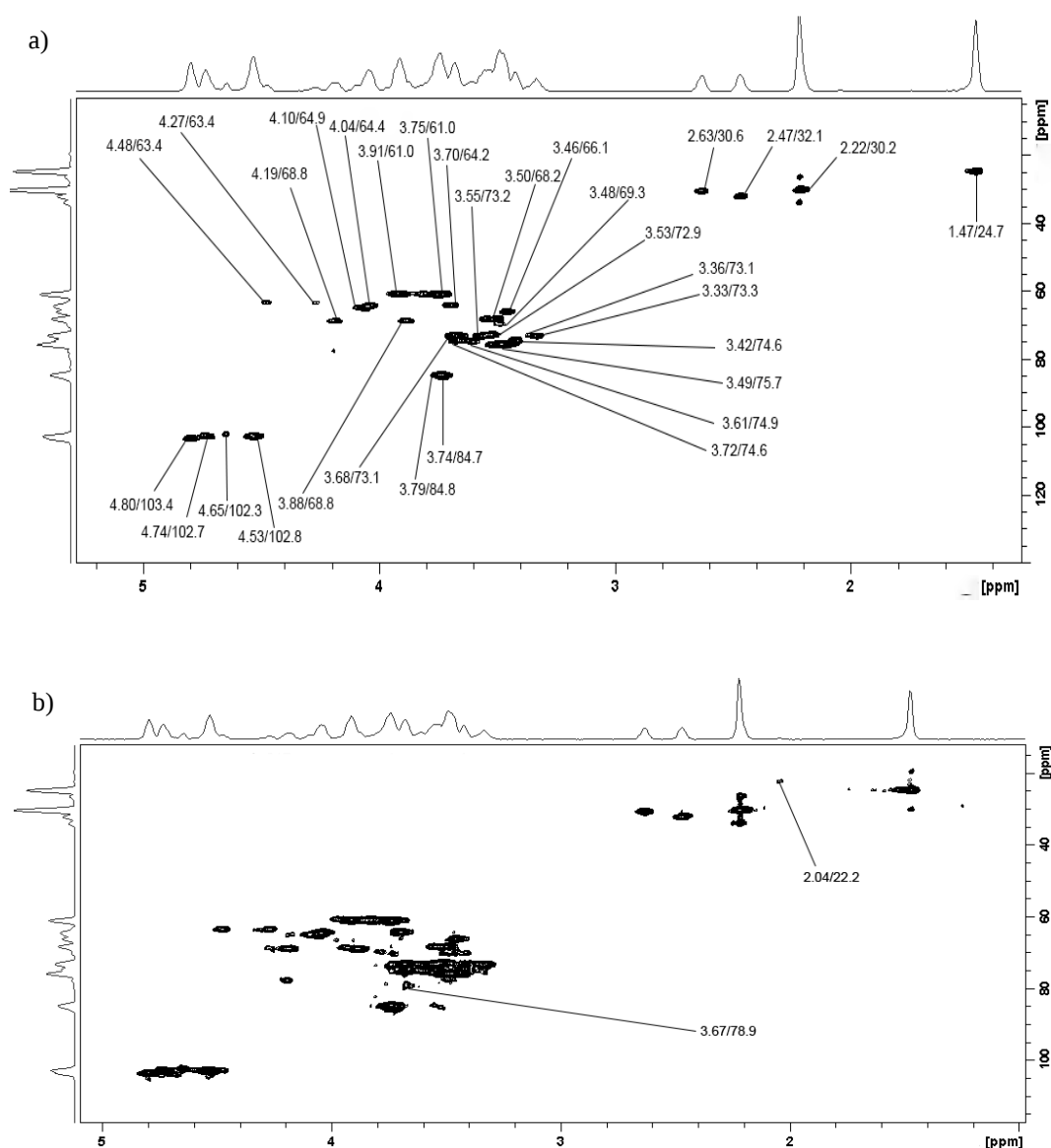


Fig. 4 Heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of the succinoglycan solution (40mg/mL in D₂O). The spectrum at the top presents the signals at a lower intensity for better definition (a). The same spectrum is presented at the bottom with higher intensity to show the signals of O-acetyl (δ 2.04/22.2) and [b-c] β -D-Glc H4/C4 (δ 3.67/78.9) (b).

^1H - ^{13}C HSQC NMR was performed and typical succinoglycan signals were observed (Fig. 4a). Succinate substituent was evidenced by methylene signals at chemical shifts (δ) 2.63/30.6 ppm and 2.47/32.1 ppm. The presence of the pyruvate substituent was denoted by the methyl group signal at δ 1.47/24.7, while the O-acetyl signal was found at δ 2.04/22.2 (Fig. 4b) (Yang et al., 2021).

Signals belonging to [a] β -D-Gal were found for H1/C1, H3/C3, H4/C4, H5/C5 and H6/C6 respectively at δ 4.65/102.3, δ 3.79/84.8, δ 4.19/68.8, δ 3.72/74.6 and δ 3.75/61.0.

Chemical shifts of [b] β -D-Glc were found for H1/C1 (δ 4.74/102.7), H2/C2 (δ 3.42/74.6), H4/C4 (δ 3.67/78.9), H5/C5 (δ 3.61/74.9), and H6/C6 (δ 3.91/61.0). For [c] β -D-Glc, correlations were observed for H1/C1 (δ 4.53/102.8), H2/C2 (δ 3.36/73.1), H4/C4 (δ 3.67/78.9), H5/C5 (δ 3.61/74.9) and H6/C6 (δ 4.04/64.4). Signals of [d] β -D-Glc were found H1/C1 (δ 4.53/102.8), H2/C2 (δ 3.33/73.3), H4/C4 (δ 3.46/66.1), H5/C5 (δ 3.68/73.1) and H6/C6 (δ 3.88/68.8). For [e] β -D-Glc, correlations were found in H1/C1 (δ 4.53/102.8), H2/C2 (δ 3.33/73.3), H4/C4 (δ 3.48/69.3), H5/C5 (δ 3.61/74.9) and H6/C6 (δ 3.88/68.8). Chemical shifts at δ 4.53/102.8, δ 3.74/84.7, δ 3.50/68.2, δ 3.49/75.7 and δ 3.91/61.0 were assigned for H1/C1, H3/C3, H4/C4, H5/C5 and H6/C6 of [f] β -D-Glc. Signals of H1/C1, H2/C2, H3/C3, H4/C4, H5/C5 and H6/C6 for [g] β -D-Glc were respectively found to be δ 4.74/102.7, δ 3.53/72.9, δ 3.74/84.7, δ 3.48/69.3, δ 3.49/75.7 and δ 3.91/61.0. When succinic acid was attached to O-6 of [g] β -D-Glc, the signals for H1/C1 and H3/C3 remained the same, however, for H2/C2, H5/C5 and H6/C6 were found to be δ 3.53/72.9, δ 3.68/73.1 and δ 4.27/63.4 - 4.48/63.4. Corresponding signals for H1/C1, H2/C2 and H6/C6 for [h] β -D-Glc were at δ 4.80/103.4, δ 3.42/74.6 and δ 3.70/64.2 - 4.10/64.9. The chemical shift values for monosaccharide units were assigned as previously reported by Evans, Linker, & Impallomeni, (2000).

Fig. 5 shows the ^1H NMR spectrogram of succinoglycan with the identification of succinate, acetyl and pyruvate substituents.

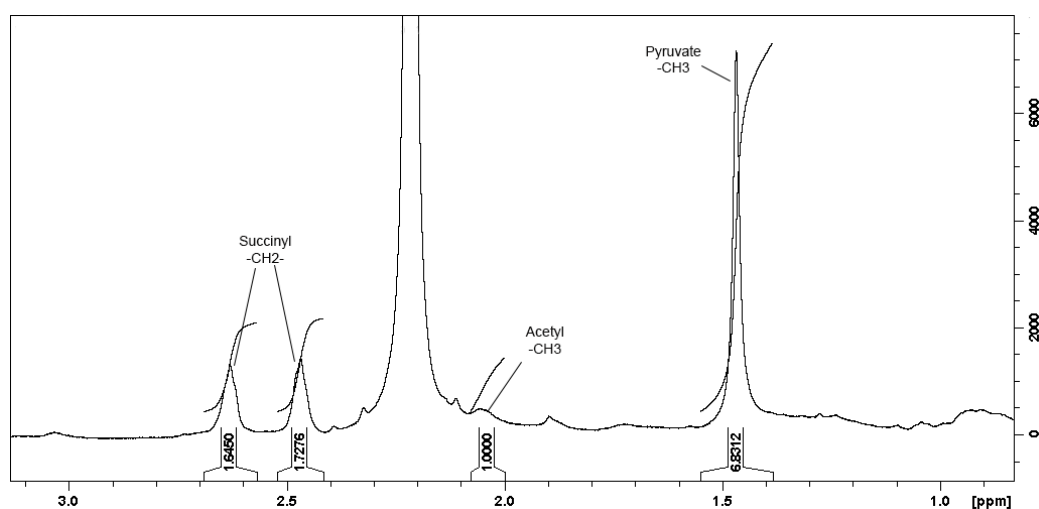


Fig. 5 Spectrogram obtained by ^1H NMR with identification of succinate, acetyl and pyruvate substituents of succinoglycan obtained with deproteinated whey.

The acetyl content of succinoglycan obtained by the colorimetric method was $1.2\% \pm 0.1\%$. By integration of the succinate and pyruvate peaks obtained by ^1H NMR

and in comparison with the acetyl peak area (Fig. 5), it was possible to estimate the total amount of succinate and pyruvate substituents in succinoglycan, being respectively 3.0% and 8.1%. These values are close to those found for a succinoglycan from *Agrobacterium radiobacter*, of 3.4% and 6.2% for succinate and pyruvate (Evans et al., (2000).

Rheological Analysis

Flow behavior

Fig. 6 illustrates the effect of shear rate on apparent viscosity at the different concentrations of succinoglycan solutions studied at 25 °C.

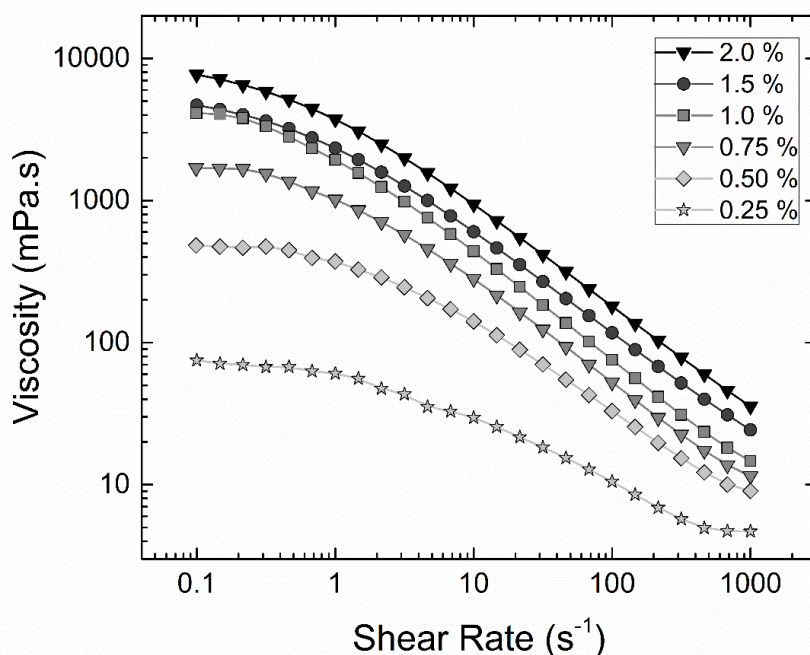


Fig. 6 Viscosity curves of succinoglycan solutions at 25.0 °C. The symbols represent the concentrations (w/v).

The results showed that the apparent viscosity was directly proportional to the concentration of succinoglycan, and the solution showed pseudoplastic behavior with increasing shear rate. Ruiz et al., (2015) and Moosavi-Nasab et al., (2012) also observed the same behavior. Despite the lower molar mass, at the same concentration the succinoglycan isolated in the present study had much higher viscosity than those obtained by Gao et al. (2021).

The apparent viscosity of all solutions evaluated decreased significantly with increasing shear rate (up to 1000 s^{-1}). This shear thinning is caused by the stretching of succinoglycan molecules during the shear. It is an important rheological characteristic, and is related to several applications involving industrial processing. The results indicate that solutions containing succinoglycan will flow easily when poured from a container or during various operations, such as pumping, spray drying, and agitation, despite their high initial viscosity (zero shear viscosity - η_o) (Nindo, Tang, Powers, & Singh, 2005). Table 3 shows the rheological parameters related to the concentration of the succinoglycan solutions obtained by numerical fitting of the data in Fig. 6 and from equation 1.

Table 3 Rheological parameters (η_o , k e n) of succinoglycan solutions as a function of concentration in distilled water at a room temperature of 25 °C.

Concentration (%)	η_o (mPa.s)	k (Pa.s ^{n})	n	R^2
0.25	83.5	0.266	0.603	0.996
0.50	530.9	0.359	0.794	0.998
0.75	1977.0	0.905	0.845	0.997
1.00	5246.4	1.779	0.858	0.998
1.50	5966.7	1.78	0.757	0.999
2.00	9913.9	1.95	0.759	0.999

The flow behavior (n) was lower than 1.00 for all succinoglycan concentrations, ranging from 0.603 to 0.858. This result confirms the pseudoplastic flow behavior shown by the solutions.

Regarding the zero shear viscosity, an increase in the values was noticed with small increments in succinoglycan concentration. This behavior has been reported for other exopolysaccharides, such as xanthan and gellan (Choppe, Puaud, Nicolai, & Benyahia, 2010; García-Iriepa & Valiente, 2014).

Several factors can influence the rheological behavior of succinoglycan solutions, such as non-saccharide substituents (Ruiz et al., 2015). According to Simsek et al., (2009), a small amount of the succinate grouping in the succinoglycan molecule significantly modified the consistency index and decreased the flow index, obtaining a better shear thinning.

Viscoelastic behavior

The results of the dynamic frequency sweep tests for the different concentrations of succinoglycan solutions (w/v) are illustrated in Fig. 7.

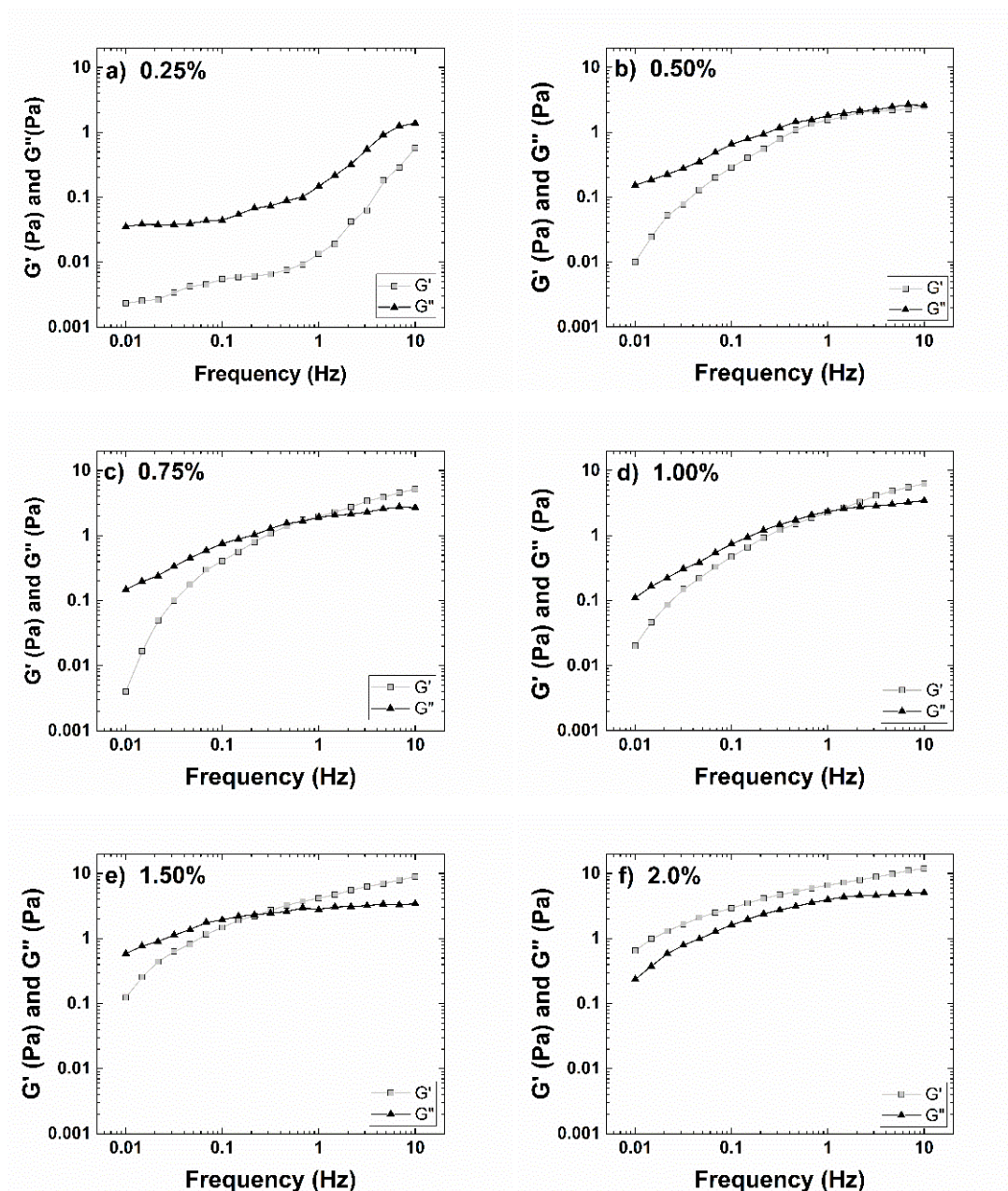


Fig. 7 Mechanical spectrum of succinoglycan solutions at different concentrations at 25.0 °C: (a) 0.25%, (b) 0.50%, (c) 0.75%, (d) 1.00%, (e) 1.50% and (f) 2.00% (w/v).

At low concentrations of succinoglycan (0.25%) the rheological behavior of the solutions exhibited properties typical of a viscous fluid with the viscous dissipation

modulus (G'') greater than the elastic recovery modulus (G') throughout the frequency spectrum explored (Fig. 7). For higher concentrations (0.50%, 0.75%, 1.00% and 1.50% w/v), both the G'' and G' modulus grew with increasing frequency (Fig. 7a, b, c, d and e), but the G' modulus grew faster than the G'' modulus. As a result, the G' modulus curve intersects the G'' modulus curve at the crossover point (*crossover point* – f_c). From this frequency on, the values of the G' modulus are predominantly larger than those of the modulus G'' . Succinoglycan solutions transitioned from a fluid-like to a gel-like structure. For concentrations of 2.0% w/v (Fig. 7f), the G' values exceeded the G'' values throughout the explored frequency spectrum, and a frequency dependence was observed, which indicated the presence of an apparent gel network in the system. Frequency dependence is a typical characteristic of a weak gel (Ikeda & Nishinari, 2001). In a typical strong gel, the modulus G' is one or two orders of magnitude larger than its modulus G'' with frequency independence (Balaghi, Mohammadifar, Zargaraan, Gavlighi, & Mohammadi, 2011; Tzoumaki, Moschakis, & Biliaderis, 2011). Similar results were presented by Zhou et al. (2014) on solutions of exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey, which reported that increasing a concentration from 0.5% to 1.0% (w/v) of the exopolysaccharide solution strengthened the intermolecular interactions, stabilizing the gel system.

The influence of temperature on the viscoelastic behavior of succinoglycan solutions was also studied (Fig.8).

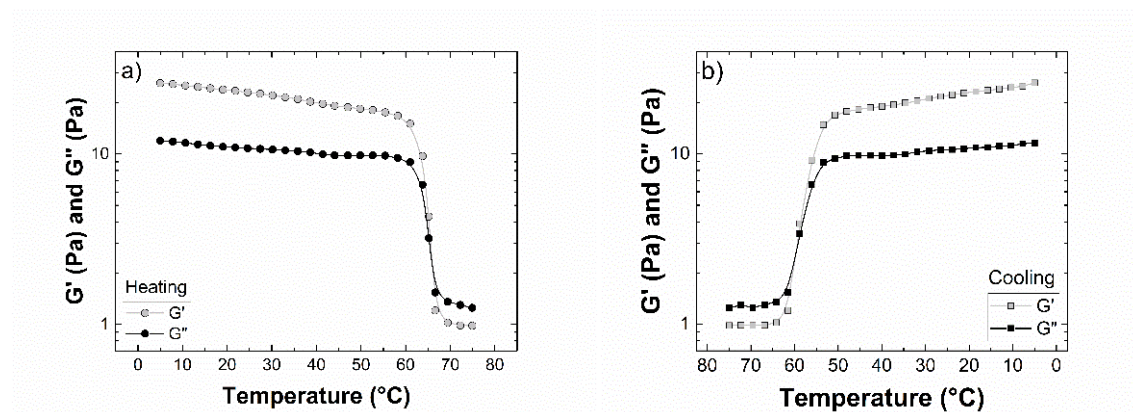


Fig. 8 Changes in elastic recovery modulus G' and viscous loss modulus G'' during the heating cycle (a) if subsequent cooling cycle (b) in the range from 5.0 °C to 75.0 °C at a rate of ± 2.0 °C/min exhibited by the 2.0 % (w/v) succinoglycan solution.

According to Hebbar et al. (1992), the most important effect of temperature on exopolysaccharide solutions, except for degradation in some exceptional cases, is an "order-disorder" conformational change, easily followed by optical rotation

measurements. The heating/cooling curves of moduli G' and G'' of the 2.0% w/v aqueous solution of succinoglycan are illustrated in Fig. 8. They were obtained at a heating/cooling rate of ± 2.0 °C/ min at a constant frequency of 0.1 Hz.

At the beginning of the heating cycle, in the range from 5.0 °C to 60.0 °C, moduli G' and G'' exhibited little dependence with temperature (Fig. 8a). In this domain, the prevalence of G' over G'' was observed (Fig. 8a). Between 64.0 °C and 66.0 °C both moduli decreased dramatically, and the two curves intersected, indicating that the gel system began to melt. Therefore, the melting point of the gel was reached at 65.0 °C. The moduli remained practically constant between 66.0 °C and 75.0 °C, with G'' prevailing over G' . In the cooling cycle (Fig. 8b), the G' and G'' curves were approximately reversible compared to the heating curves, with the gelling point occurring at approximately 60.0 °C. This result indicates a thermal hysteresis regarding the melting point around 5.0 °C. At the end of the procedure, both moduli almost returned to the original levels, indicating that heating and cooling did not influence the gelling ability of succinoglycan, and that the gel formed is thermally reversible. Compared to gels formed by other polysaccharides such as carrageenan, gellan and linseed gum, the succinoglycan gel has higher gelling and melting temperatures, indicating that the gel system is very stable. (Hebbar et al., 1992; Ikeda & Nishinari, 2001; Zhou et al., 2014).

Conclusion

Agroindustrial whey waste was bioconverted into succinoglycan by *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. A better production of succinoglycan occurred in the absence of whey proteins and in the presence of magnesium and potassium ions. The chemical characterization tests showed that the monosaccharide composition of glucose and galactose for the produced succinoglycan was 6.6:1.0 and revealed the content of non-saccharide substituents for acetate, succinate and pyruvate of 1.2%, 3.0% and 8.1%. The advanced rheological studies of the succinoglycan solutions revealed non-Newtonian and pseudoplastic behavior. The apparent viscosity of the evaluated solutions decreased significantly with increasing shear rate, an important rheological characteristic, as it demonstrates that the obtained succinoglycan can be applied in industrial processing. At the end of the heating cycle both moduli almost returned to the original levels, indicating that heating and cooling did not influence the gelling ability of succinoglycan, and that the gel formed is thermally reversible. According to the results obtained, the

succinoglycan produced has the potential to be used as a thickener and viscosity modifier in food and other products. Whey has shown to be a promising and viable carbon source in the fermentation process, which enables the correct management and disposal of this waste, positively impacting the preservation of the environment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and Fundação Araucária (FA) for financially supporting this study.

Author Contribution

TCOD, JHM and MGN finished the experiment. TCO, JHM, MGN, ARS, RSP, and LHR interpreted the results. TCO wrote the manuscript. GM as corresponding author supervised the experiment and the manuscript. SRP, ARS, CLOP and FS supervised the reviewed the manuscript.

Availability of Data and Materials

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethical Approval Ethics: approval was not required for this research.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

References

- Amemura, A., Moori, K., & Harada, T. (1974). Purification and properties of a specific, inducible beta-glucanase, succinoglucan depolymerase from flavobacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 334, 398–409.
- Andhare, P., Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., & Pathak, H. (2017). Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. *Food Hydrocolloids*, 64, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.008>
- Bakhtiyari, M., Moosavi-Nasab, M., & Askari, H. (2015). Optimization of

- succinoglycan hydrocolloid production by *Agrobacterium radiobacter* grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. *Food Hydrocolloids*, 45, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.002>
- Balaghi, S., Mohammadifar, M. A., Zargaraan, A., Gavligi, H. A., & Mohammadi, M. (2011). Compositional analysis and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of *Iranian astragalus*. *Food Hydrocolloids*, 25(7), 1775–1784. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.003>
- Biermann, C. J. (1989). *Introduction to Analysis of Carbohydrates by Gas-Liquid Chromatography (GLC). W: Analysis of Carbohydrates by GLC and MS.*
- Boyaci, I. H., Temiz, H. T., Geniş, H. E., Soykut, E. A., Yazgan, N. N., Güven, B., ... Şeker, F. C. D. (2015). Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c4ra12463d>
- Canuto, A. P. (2006). Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. *Dissertação*, 1–105.
- Choppe, E., Puaud, F., Nicolai, T., & Benyahia, L. (2010). Rheology of xanthan solutions as a function of temperature, concentration and ionic strength. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1228–1235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.056>
- Diniz, D., Druzian, J. I., & Audibert, S. (2012). Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. *Polimeros*, 22(3), 278–281. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000032>
- Embrapa. (2019). Anuário leite. *Embrapa Gado de Leite*, 1, 104.
- Embrapa. (2021). Anuário do leite 2021: saúde única e total. *Embrapa Gado de Leite*, 102. Retrieved from <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>
- Evans, L. R., Linker, A., & Impallomeni, G. (2000). Structure of succinoglycan from an infectious strain of *Agrobacterium radiobacter*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(5), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00131-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00131-8)
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Gao, H., Yang, L., Tian, J., Huang, L., Huang, D., Zhang, W., ... Jiang, D. (2021). Characterization and rheological properties analysis of the succinoglycan produced by a high-yield mutant of *Rhizobium radiobacter* ATCC 19358. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 61–70. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.087>
- García-Iriepa, C., & Valiente, M. (2014). Effect of branched alcohols on phase behavior and rheology of nonionic surfactant systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 59(8), 2634–2641. <https://doi.org/10.1021/je5004109>
- Halder, U., Banerjee, A., & Bandopadhyay, R. (2017). Structural and Functional Properties, Biosynthesis, and Patenting Trends of Bacterial Succinoglycan: A Review. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), 278–284. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0655-3>
- Harada, T. (1965). Succinoglucan 10C3: A New Acidic Polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 112(4), 65–69.
- Harada, T. (1984). Progress in industrial microbiology. *Trends in Biotechnology*, 2(4), 111–112.
- Hebbbar, K. P., Gueniot, B., Heyraud, A., Colin-Morel, P., Heulin, T., Balandreau, J., &

- Rinaudo, M. (1992). Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 248–253. <https://doi.org/10.1007/BF00174477>
- Hisamatsu, M., Abe, J., Amemura, A., & Harada, T. (1980). Structural elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special beta-d-glycanases and methylation analysis. *Agric. Biol. Chem.*, 44(5), 1049–1055.
- Hisamatsu, M., Sano, K., Amemura, A., & Harada, T. (1978). Acidic polysaccharides containing succinic acid in various strains of *Agrobacterium*. *Carbohydrate Research*, 61, 89–96.
- Húngaro, H. M., Calil, N. O., Ferreira, A. S., Chandel, A. K., & Da Silva, S. S. (2013). Fermentative production of ribonucleotides from whey by *Kluyveromyces marxianus*: Effect of temperature and pH. *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 958–964. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0408-y>
- Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). “Weak gel”-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated κ -carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4436–4441. <https://doi.org/10.1021/jf0103065>
- Irudayaraj, J. K. R. (2007). Rapid evaluation and discrimination of γ -irradiated carbohydrates using FT-Raman spectroscopy and canonical discriminant analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1244–1251. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2830>
- Kavitake, D., Delattre, C., Devi, P. B., Pierre, G., Michaud, P., Shetty, P. H., & Andhare, P. (2019). Physical and functional characterization of succinoglycan exopolysaccharide produced by *Rhizobium radiobacter* CAS from curd sample. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.050>
- Kwon, C., Lee, S., & Jung, S. (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric behavior of succinoglycan monomers, dimers, and trimers isolated from *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Carbohydrate Research*, 346(14), 2308–2314. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.07.023>
- Li, C., Ding, J., Chen, D., Shi, Z., & Wang, L. (2020). Bioconversion of cheese whey into a hetero-exopolysaccharide via a one-step bioprocess and its applications. *Biochemical Engineering Journal*, 161, 107701. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2020.107701>
- Liang, Y., Zhu, L., Ding, H., Gao, M., Zheng, Z., Wu, J., & Zhan, X. (2017). Enhanced production of curdlan by coupled fermentation system of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and *Trichoderma harzianum* GIM 3.442. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1687–1694. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.055>
- Mangolim, C. S., da Silva, T. T., Fenelon, V. C., do Nascimento, A., Sato, F., & Matioli, G. (2017). Use of FT-IR, FT-Raman and thermal analysis to evaluate the gel formation of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and determination of its rheological properties with food applicability. *Food Chemistry*, 232, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.031>
- McKellar, R. C., Van Geest, J., & Cui, W. (2003). Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter*. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 429–437. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00030-4)
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Monteiro, N. K., Aranda-Selverio, G., Exposti, D. T. D., De Lourdes Corradi Da Silva, M., Lemos, E. G. M., Campanharo, J. C., & Silveira, J. L. M. (2012). Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. *Quimica Nova*, 35(4), 705–708. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000400009>
- Moosavi-Nasab, M., Taherian, A. R., Bakhtiyari, M., Farahnaky, A., & Askari, H. (2012). Structural and Rheological Properties of Succinoglycan Biogums Made from Low-Quality Date Syrup or Sucrose Using *Agrobacterium radiobacter* Inoculation. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 638–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0407-4>
- Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012>
- Najbjerg, H., Afseth, N. K., Young, J. F., Bertram, H. C., Pedersen, M. E., Grimmer, S., ... Kohler, A. (2011). Monitoring cellular responses upon fatty acid exposure by Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. *Analyst*, 136(8), 1649–1658. <https://doi.org/10.1039/c0an00916d>
- Naumann, D. (2006). Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–29. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
- Nindo, C. I., Tang, J., Powers, J. R., & Singh, P. (2005). Viscosity of blueberry and raspberry juices for processing applications. *Journal of Food Engineering*, 69(3), 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.08.025>
- Nitschke, M., Rodrigues, V., & Schinatto, L. F. (2001). Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L1. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(1), 82–85. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612001000100018>
- Oliveira, J. M. de, Michelon, M., & Burkert, C. A. V. (2020). Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25(April). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101609>
- Pedroso, G. B., Silva, L. O., Araujo, R. B., Saldanha, L. F., Denardi, L., & Martins, A. F. (2019). An innovative approach for the biotechnological production of succinoglycan from rice husks. *Industrial Crops and Products*, 137(December 2018), 615–627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.052>
- Ruiz, S. P., Martinez, C. O., Noce, A. S., Sampaio, A. R., Baesso, M. L., & Matioli, G. (2015). Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.016>
- Simsek, S., Mert, B., Campanella, O. H., & Reuhs, B. (2009). Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.033>
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2008.03.008>
- Sutherland, I. W. (1982). Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 23(C), 79–150. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60336-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60336-7)
- Sutherland, Ian W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 12(2), 393–448.

- [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(94)90018-3)
- Sutherland, Ian W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663–674. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00112-1)
- Synytsya, A., Čopíková, J., Matějka, P., & Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9)
- Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2011). Mixed aqueous chitin nanocrystal-whey protein dispersions: Microstructure and rheological behaviour. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.004>
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., ... Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317–335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Acetylation. *Methods Carbohydr. Chem*, 2, 211–215.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Reduction with sodium borohydride. *Methods Carbohydr. Chem.*, 2, 65–68.
- Yang, Y., Sun, X., Zhao, Y., Ge, W., Ding, Z., Liu, J., ... Zhang, J. (2021). Anti-tumor activity and immunogenicity of a succinoglycan riclin. *Carbohydrate Polymers*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117370>
- Zevenhuizen, L. P. T. M. (1997). Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers*, 33(2–3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00054-4)
- Zhou, F., Wu, Z., Chen, C., Han, J., Ai, L., & Guo, B. (2014). Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.016>