

Nota de Investigación/Research Note

Influence of alkali treatment on agar from *Gracilariopsis longissima* and *Gracilaria vermiculophylla* from the Gulf of California, Mexico

Influencia del tratamiento alcalino en el agar de *Gracilariopsis longissima* y *Gracilaria vermiculophylla* del Golfo de California, México

J Orduña-Rojas^{1*}, R Suárez-Castro¹, ES López-Álvarez¹, R Ríosmena-Rodríguez², I Pacheco-Ruiz³,
JA Zertuche-González³, AE Meling-López⁴

¹ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave CP 81101, Sinaloa, México. * E-mail: jorduna@ipn.mx

² Programa de Investigación en Botánica Marina, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz CP 23080, BCS, México.

³ Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Apartado postal 453, Ensenada, CP 22800, Baja California, México.

⁴ Departamento de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Sonora, Rosales y Niños Héroes s/n, Hermosillo, CP 83000, Sonora, México.

Abstract

The effect of alkali treatment on agar yield, sulfate content, and 3,6 anhydrogalactose content from two agarophyte species (*Gracilariopsis longissima* and *Gracilaria vermiculophylla*) was analyzed. In addition, gel strength was measured in each agar extract as well as gelling and melting temperatures. Agar was extracted after pretreatment with different concentrations of NaOH (3%, 5%, 7%, and 9%). Pretreatment with alkali significantly reduced agar yield from *G. longissima* from 13.2% in non-treated agar (native agar) to 5.4% in 5% NaOH, whereas in *G. vermiculophylla* it diminished from 25.2% to 9.6% in 9% NaOH treatment. Statistically significant differences were observed for native and all alkali treatments in *G. longissima*, whereas in *G. vermiculophylla* significant differences were only found among native and high alkali treatments (7% and 9% NaOH, $P < 0.05$). Sulfate content from *G. longissima* diminished gradually with increasing alkali concentration, from high (3.9%) in native agar to low (3.1%) in 7% alkali treatment, and was negatively correlated with gel strength ($r = -0.92$). Sulfate content in *G. vermiculophylla* native agar was twice as high as that found in *G. longissima* (7.8%) and did not show statistically significant differences with low alkali treatments, but it did with high NaOH treatments. Higher contents of 3,6 anhydrogalactose were found with 9% NaOH treatment in *G. longissima* (40.9%) and *G. vermiculophylla* (43%), and they were significantly correlated with gel strength ($r = 0.89$ and $r = 0.91$, respectively).

Key words: agar, alkali treatment, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, Gulf of California.

Resumen

Se estudió el efecto del tratamiento alcalino en el rendimiento de agar, contenido de sulfatos y contenido de 3,6 anhidrogalaactosa en dos especies productoras de agar (*Gracilariopsis longissima* y *Gracilaria vermiculophylla*). Además, se midió la fuerza de gel, la temperatura de gelificación y temperatura de fusión de cada agar extraído. El agar se extrajo después de tratar el alga con diferentes concentraciones de NaOH (3%, 5%, 7% y 9%). El tratamiento alcalino redujo significativamente el rendimiento de agar en *G. longissima* de 13.2% para el agar no tratado (agar nativo) a 5.4% para el agar tratado con NaOH al 5%, mientras que en *G. vermiculophylla* el rendimiento se redujo de 25.2% a 9.6% con el tratamiento con NaOH al 9%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento entre el agar nativo y el posterior a todos los tratamientos alcalinos de *G. longissima*, mientras que para *G. vermiculophylla* sólo se encontraron diferencias significativas entre el agar nativo y los tratamientos más alcalinos (NaOH al 7% y 9 %, $P < 0.05$). El contenido de sulfatos en *G. longissima* disminuyó gradualmente conforme se incrementó el contenido de NaOH de 3.9% en el agar nativo hasta 3.1% en el tratamiento con 7% de NaOH, y estuvo negativamente correlacionado con la fuerza de gel ($r = -0.92$). El contenido de sulfatos en el agar nativo de *G. vermiculophylla* fue el doble (7.8%) del observado en *G. longissima*, y no se observaron diferencias estadísticas significativas con los tratamientos de baja alcalinidad, pero si las hubo con los tratamientos muy alcalinos. Los contenidos más altos de 3,6 anhidrogalaactosa se encontraron con el tratamiento con 9% de NaOH tanto en *G. longissima* (40.9%) como en *G. vermiculophylla* (43%), y estuvieron positivamente correlacionados con la fuerza de gel ($r = 0.89$ y $r = 0.91$, respectivamente).

Palabras clave: agar, Golfo de California, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, tratamiento alcalino.

Introduction

Agar is a commercially valuable phycocolloid extracted from members of the red algal genera *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, and *Gelidiella* (Armisen and Galatas 1987). *Gelidium* and *Gracilaria* are the main sources of seaweed for the worldwide agar industry. About 55,000 t dry weight of seaweed are extracted annually, producing 7,500 t of agar with a value of 132 million US dollars (McHugh 2002); 65% of this production is obtained from *Gracilaria* species.

Agar is a polysaccharide consisting of alternating β -1,3 and α -1,4 linked D and L galactose residues, respectively (Araki 1966), whose gelling properties are highly dependent on the amount and position of sulfate groups, as well as on the amount of 3,6 anhydrogalactose fraction of the phycocolloid (Duckworth and Yaphe 1971).

Gracilaria species are known to produce weak agars containing high sulfate contents, compared with agars obtained from *Gelidium* and *Pterocladia* species (Armisen and Galatas 1987). The strong influence of sodium hydroxide pretreatment on the physical and chemical properties of alkali-modified agars from *Gracilaria* and *Gracilariopsis* species has been previously shown (Craigie and Wen 1984, Bird and Hinson 1992, de Castro 1996, Rebello *et al.* 1997, Freile-Pelegrín and Robledo 1997). This treatment, which is also called sulfate alkaline hydrolysis, is applied to *Gracilaria* species to obtain as much desulfation as possible. Gel strength of agar can be improved by alkali treatment as long as sulfate residues are alkali labile; the greater the amount of nonalkali labile sulfate, the poorer the gel strength (Craigie and Wen 1984). According to Armisen (1995), treatment of *Gracilaria* with sodium hydroxide (NaOH) reduces the high sulfate content in these species mainly by inducing hydrolysis of l-galactose-6-sulfate to produce 3-6 anhydro-l-galactose. A consequence of this pretreatment is the reduction in agar yield, with an increase in gel strength, as well as in gelling and melting temperatures (de Castro 1996, Freile-Pelegrín and Robledo 1997, Rebello *et al.* 1997, Wilson and Critchley 1998). Since different *Gracilaria* species have agar with different concentration of sulfates, yield and agar characteristics of a single species will depend on alkali concentration, as well as on temperature and duration of the extraction process (Hurtado-Ponce 1992, Villanueva *et al.* 1997).

Despite the large number of floristic studies performed using seaweeds of the Gulf of California, few studies have been conducted on agars from *Gracilaria* species from this area. In this study, the effect of alkali treatment on the physical and chemical properties of agar obtained from *Gracilariopsis longissima* (SG Gmelin) M Steentoft, LM Irvine and WF Farnham, and *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, two potential commercial seaweeds of the Gulf of California, was evaluated to determine their potential use in the agar industry.

Introducción

El agar es un ficocoloide de valor comercial extraído de las algas rojas de los géneros *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia* y *Gelidiella* (Armisen y Galatas 1987). Entre éstos, las especies de *Gelidium* y *Gracilaria* son las principales algas utilizadas en la industria del agar en el mundo. Aproximadamente 55,000 toneladas de algas en peso seco son utilizadas anualmente para producir 7,500 t de agar, con un valor de 132 millones de dólares de los EUA (McHugh 2002), de las cuales 65% son obtenidas a partir de especies del género *Gracilaria*.

El agar es un polisacárido que consiste de subunidades alternadas de D y L galactosa unidas por enlaces β -1,3 y α -1,4, respectivamente (Araki 1966), cuyas propiedades gelificantes son altamente dependientes de la cantidad y posición de los grupos sulfato, así como de la cantidad de 3,6 anhidrogalactosa presente en el ficocoloide (Duckworth y Yaphe 1971).

Se sabe que las especies de *Gracilaria* producen agares débiles que contienen grandes cantidades de sulfatos en comparación con agares obtenidos de especies de *Gelidium* y *Pterocladia* (Armisen y Galatas 1987). Ya se ha demostrado la influencia que tiene el tratamiento con hidróxido de sodio en las propiedades físicas y químicas del agar (agar tratado) de especies de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* (Craigie y Wen 1984, Bird y Hinson 1992, de Castro 1996, Rebello *et al.* 1997, Freile-Pelegrín y Robledo 1997). Este tratamiento, también conocido como hidrólisis alcalina de sulfatos, es aplicado a las especies de *Gracilaria* para obtener la mayor desulfatación posible. La fuerza de gel de un agar puede ser incrementada mediante un tratamiento alcalino del alga en tanto los residuos de sulfato se encuentren en una posición lábil; mientras mayor sea la cantidad de grupos sulfatos en posición no lábil, menor será la fuerza de gel obtenida (Craigie y Wen 1984). De acuerdo con Armisen (1995) el tratamiento de *Gracilaria* con hidróxido de sodio (NaOH) reduce el alto contenido de sulfatos en el agar de estas especies principalmente al inducir la hidrólisis de la l-galactosa-6-sulfato para producir 3-6 anhidro-l-galactosa. Como consecuencia de este tratamiento se ha observado la reducción del rendimiento en el agar y un incremento en la fuerza de gel, así como aumento de su temperatura de gelificación y fusión (de Castro 1996, Freile-Pelegrín y Robledo 1997, Rebello *et al.* 1997, Wilson y Critchley 1998). Debido a que las diferentes especies de *Gracilaria* poseen agar con diferente concentración de sulfatos, el rendimiento y las características del agar de una especie en particular dependerán de la concentración de álcali utilizada, así como de la temperatura y tiempo de duración del proceso de extracción (Hurtado-Ponce 1992, Villanueva *et al.* 1997).

A pesar del gran número de estudios florísticos realizados con macroalgas del Golfo de California, sólo unos pocos se han enfocado en el análisis del agar de las especies de *Gracilaria* de esta área. En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento alcalino sobre las propiedades físicas y químicas del agar obtenido de *Gracilariopsis longissima* (SG Gmelin) M Steentoft, LM Irvine y WF Farnham y *Gracilaria*

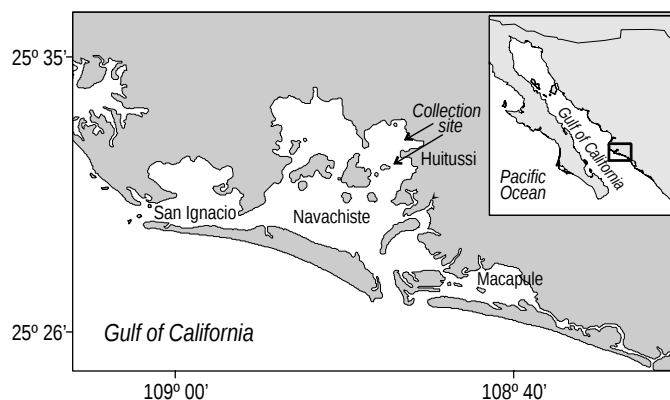


Figure 1. Map of the study area (Navachiste Bay, Gulf of California, Mexico) showing the location of sampling sites.

Figura 1. Mapa del área de estudio (Bahía de Navachiste, Golfo de California, México) mostrando la localización de los sitios de muestreo.

Material and methods

Gracilariopsis longissima and *Gracilaria vermiculophylla* plants were hand picked in May 2004 from natural populations in Navachiste Bay, southeast coast of the Gulf of California (fig. 1). Populations of *G. longissima* thrive well in shallow (1–1.5 m depth) sand-mud areas in the inner part of the bay. Plants were partially buried in the substrate attached to small rocks or mollusk shells. Frequently, collected plants were more than 1 m in length and no more than 3 mm in diameter. They presented abundant hairs and were dark green in color. In contrast, populations of *G. vermiculophylla* grow attached to rocks (from the shore to 3 m depth) around small islands located in the bay. Plants were from 0.3 to 0.5 m in size, green to purple in color, and bushy with long cartilaginous branches. Seaweeds were placed in plastic bags with seawater and immediately transported in insulated coolers to the laboratory. Upon arrival, plants were first rinsed with seawater to remove sediment particles and epiphytes, and then with tap water. Afterwards, plants were submerged in 10% formaldehyde for 24 h to prevent enzymatic hydrolysis of the agar (Freile-Pelegrín and Robledo 1997), rinsed with tap water, sun-dried for 8 h, and oven-dried at 70°C to constant weight. They were stored in sealed plastic bags at room temperature until the extraction process.

Specimens were identified based on Norris (1985), Bellorin *et al.* (2004), and Gurgel *et al.* (2003). Voucher material is housed at the Phycological Herbarium of the Universidad Autónoma de Baja California Sur (FBCS).

Alkali pretreatment and agar extraction

Alga samples of 20 g dry weight ($n = 3$) were placed in 2-L Erlenmeyer flasks containing 400 mL of NaOH solution (3%, 5%, 7%, or 9% w/v) and soaked overnight at room temperature. Next, samples were heated in a water bath at 85°C during

vermiculophylla (Ohmi) Papenfuss, dos especies de macroalgas potencialmente explotables comercialmente del Golfo de California, a fin de determinar su posible utilización en la industria del agar.

Materiales y métodos

En mayo de 2004 se recolectaron a mano plantas de *Gracilariopsis longissima* y *Gracilaria vermiculophylla* de poblaciones naturales que se encuentran en la Bahía de Navachiste, en la costa suroeste del Golfo de California (fig. 1). Las poblaciones de *G. longissima* se desarrollan bien en áreas lodosas de poca profundidad (1 a 1.5 m de profundidad) en la parte interior de la bahía. Las plantas crecen parcialmente enterradas en el sustrato, fijas a rocas pequeñas o fragmentos de conchas de moluscos. La mayor parte de las plantas recolectadas sobrepasaron 1 m de longitud y su diámetro no fue mayor a los 3 mm. Las algas presentaban abundantes prolongaciones cortas y su coloración era verde oscuro. En contraste, las poblaciones de *G. vermiculophylla* crecen fijas a las rocas que se encuentran alrededor de las islas localizadas al interior de la bahía desde la zona intermareal baja hasta una profundidad de aproximadamente 3 m. Las plantas con abundantes ramificaciones son de consistencia cartilaginosa, de 0.3 a 0.5 m de longitud y color verde a púrpura. Las macroalgas recolectadas fueron colocadas dentro de bolsas de plástico con agua de mar y fueron transportadas de inmediato en hieleras de plástico al laboratorio. A su llegada al laboratorio las plantas fueron enjuagadas con agua de mar para eliminar partículas de sedimento y epífitas, y luego se enjuagaron con agua dulce; posteriormente se sumergieron en una solución de formaldehído al 10% por 24 h para prevenir la hidrólisis enzimática del agar (Freile-Pelegrín y Robledo 1997), se enjuagaron con agua de la llave, se secaron al sol por 8 h y posteriormente se colocaron en un horno a 70°C para su secado hasta obtener peso constante. Entonces, las algas se colocaron en bolsas de plástico selladas herméticamente y se mantuvieron a temperatura ambiente en el laboratorio hasta el inicio de la extracción.

Los especímenes recolectados fueron identificados con base en los trabajos de Norris (1985), Bellorin *et al.* (2004) y Gurgel *et al.* (2003). El material prensado se encuentra depositado en el Herbario Ficológico de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (FBCS).

Tratamiento alcalino y extracción del agar

Se colocaron muestras de alga de 20 g peso seco ($n = 3$) en frascos Erlenmeyer de 2 L de capacidad con 400 mL de solución de NaOH (3%, 5%, 7%, o 9% p/v) toda una noche a temperatura ambiente. Después las muestras se calentaron en baño María a 85°C durante 3 h, se enjuagaron con agua de la llave por 1 h para eliminar el exceso de NaOH y se drenaron. Para evaluar la posible pérdida de agar por difusión en la solución de NaOH, ésta fue drenada, neutralizada a pH 7 con ácido sulfúrico, y dejada a gelificar toda la noche. En ninguno de los

3 h and then rinsed with tap water for 1 h to remove excess NaOH and drained. To evaluate agar loss by diffusion into the NaOH solution, the water residue was neutralized to pH 7 with sulfuric acid and allowed to gel overnight. No diffusion was observed in any treatment. After alkali treatment and prior to extraction, alga samples were soaked in 400 mL of distilled water and the pH of the solution was adjusted to 6.2–6.5 with 0.5 M phosphoric acid. The extraction process was carried out by heating algae on a hot plate at 95°C for 1.5 h. Extracted alga samples were blended using a commercial blender and filtered using a stainless steel 1.5-L pressure filter. Filtrates were collected in plastic trays and allowed to gel at room temperature. They were then frozen overnight at –20°C, and thawed and dried at 70°C in a convection oven for 36 h. Finally, the agar obtained was cooled in a desiccator and its dry weight registered. Agar yield was calculated as the percentage of dry matter. Native agar extraction process was carried out as described above using distilled water instead of sodium hydroxide solution (0% NaOH). Dried agar samples were ground using a Thomas Wiley Mill and the powder screened through a 40 mesh (425 µm) to enhance their solubility in physical tests.

Physical and chemical analysis

A 1.5% (w/v) solution was prepared to test the gel strength as well as gelling and melting temperatures according to the methods described by Freile-Pelegrín and Robledo (1997). Sulfate and 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG) contents were determined by the turbidometric method described by Jackson and McCandless (1978) and the colorimetric method of Matsuihiro and Zanolungo (1983), respectively. All determinations were made in triplicate.

Analysis of variance (one-way ANOVA) and multiple range test (LSD) were used to assess statistical differences among treatments ($P < 0.05$). Correlation analyses were done to assess the results. ANOVA assumptions were previously verified.

Results

Mean agar yield in *G. longissima* ranged from 13.2% in native agar (0% NaOH) to 5.4% in 5% NaOH treatment. Significant differences (ANOVA test) were observed between native and all alkali treatments. No significant effect on yield (LSD test) was observed among the different alkali concentrations (fig. 2a).

Agar yield from *G. vermiculophylla* was higher than from *G. longissima* and diminished gradually from 25.2% in native agar to 9.6% in 9% NaOH-treated agar. In contrast to *G. longissima*, yield in *G. vermiculophylla* did not show statistically significant differences between native and low (3% and 5%) alkali treatments. The LSD test showed statistically significant differences among high (7% and 9%), native, and low alkali treatments ($P < 0.05$).

tratamientos se observó difusión del agar. Después del tratamiento alcalino y antes de la extracción del agar, las muestras de alga se colocaron en 400 mL de agua destilada y el pH de la solución se ajustó a 6.2–6.5 con una solución de ácido fosfórico 0.5 M. El proceso de extracción se llevó a cabo calentando las algas en una placa a 95°C por 1.5 h. Después las algas se molieron utilizando una licuadora manual y el molido se pasó por un filtro a presión de acero inoxidable de 1.5 L de capacidad. El filtrado fue recolectado en charolas de plástico y se dejó gelificar a temperatura ambiente. El gel obtenido se congeló toda la noche a –20°C para posteriormente descongelarlo a temperatura ambiente dejando escurrir el agua. Finalmente, para su secado, el gel se colocó en un horno a 70°C por 36 h. El agar obtenido se dejó enfriar dentro de un desecador y posteriormente se pesó en una balanza analítica. El rendimiento de agar fue calculado como porcentaje de la materia seca utilizada. La extracción del agar nativo se realizó de modo similar al descrito anteriormente utilizando agua destilada en vez de solución de NaOH (0%). Las muestras de agar secas se molieron utilizando un molino Thomas Wiley y el polvo de agar fue tamizado a través de una malla número 40 (425 µm) para favorecer su solubilidad en las pruebas físicas realizadas.

Análisis físicos y químicos

La fuerza de gel, y las temperatura de fusión y de gelificación se determinaron siguiendo la metodología descrita por Freile-Pelegrín y Robledo (1997), utilizando soluciones de agar al 1.5% (p/v). Los contenidos de sulfatos y de 3,6 anhidrogalactosa (3,6 AG) se determinaron por el método turbidimétrico descrito por Jackson y McCandless (1978) y el método calorimétrico de Matsuihiro y Zanolungo (1983), respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para evaluar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos se emplearon un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de diferencias significativas mínimas ($P < 0.05$) de Fisher (prueba LSD), así como análisis de correlación. Los supuestos de la prueba de ANOVA fueron verificados previamente.

Resultados

El rendimiento de agar en *G. longissima* varió de 13.2% en el agar nativo (0% NaOH) a 5.4% en el tratamiento con 5% de NaOH. Se observaron diferencias significativas (prueba de ANOVA) entre el agar nativo y todos los tratamientos alcalinos. No se observó un efecto significativo en el rendimiento (prueba LSD) entre los diferentes tratamientos alcalinos (fig. 2a).

El rendimiento de agar en *G. vermiculophylla* fue mayor que el observado en *G. longissima* y disminuyó gradualmente de 25.2% para el agar nativo hasta 9.6% para el tratamiento con 9% de NaOH. A diferencia de *G. longissima*, el rendimiento de agar en *G. vermiculophylla* no mostró diferencias significativas entre el agar nativo y los tratamientos alcalinos

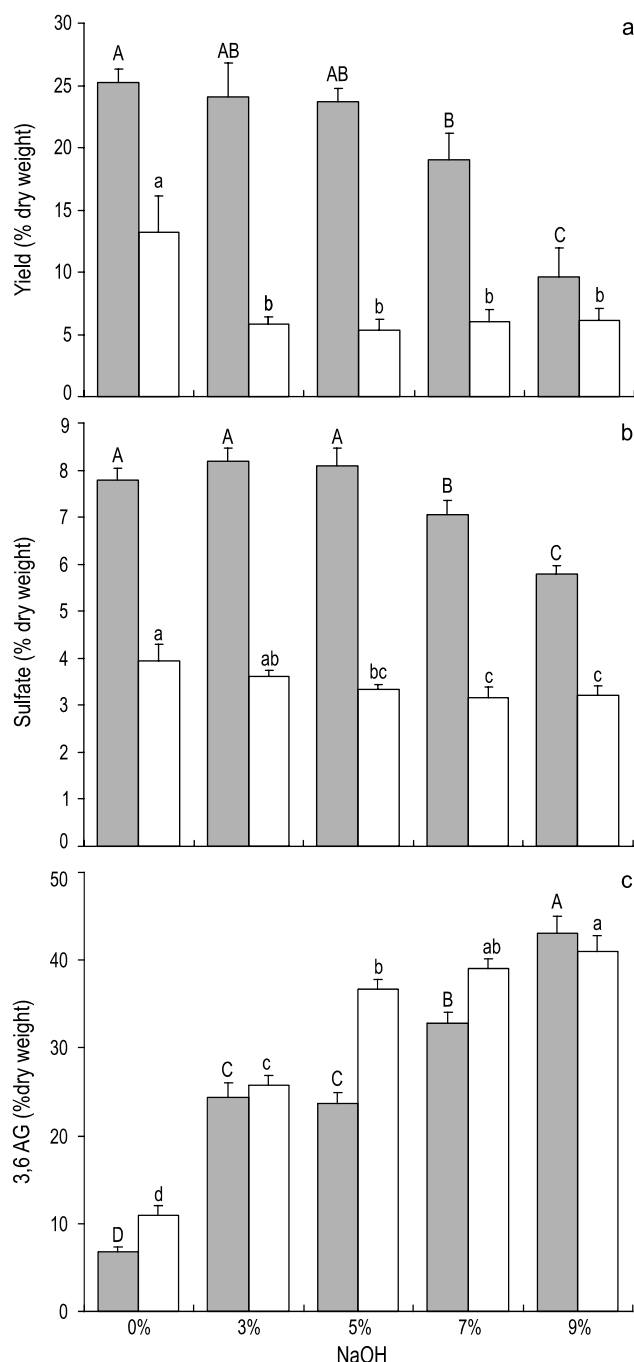


Figure 2. (a) Agar yield, (b) sulfate content, and (c) 3,6 anhydrogalactose content of agar from *Gracilaria vermiculophylla* (black bars) and *Gracilariopsis longissima* (white bars) before alkali treatment (0% NaOH) and after treatment with 3%, 5%, 7%, and 9% NaOH. Vertical lines represent the standard deviation. Letters over the bars represent the grouping in the LSD Fisher test; means with the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$).

Figura 2. Rendimiento medio de agar (a), contenido de sulfatos (b) y contenido de 3,6 anhidrogalaactosa (c) en el agar de *G. vermiculophylla* (barra negra) y *G. longissima* (barra blanca) antes del tratamiento alcalino (0% NaOH) y después del tratamiento con 3%, 5%, 7% y 9% de NaOH. Las líneas verticales en las barras representan la desviación estándar de la media. Las letras en las barras representan agrupamientos de acuerdo a la prueba LSD; medias con la misma letra no son significativamente distintas ($\alpha = 0.05$).

de menor concentración (3% y 5%). La prueba de LSD mostró diferencias significativas entre los tratamientos alcalinos de concentración alta (7% y 9%), el agar nativo y los tratamientos de concentración baja ($P < 0.05$).

El contenido de sulfatos en *G. longissima* decreció al incrementarse la concentración de NaOH. El contenido de sulfatos varió de 3.9% para el agar nativo a 3.1% para el agar tratado con 7% de NaOH (fig. 2b). El contenido de sulfatos en el agar nativo de *G. vermiculophylla* fue el doble (7.8 %) del observado en *G. longissima* y disminuyó hasta 5.8% con el tratamiento con mayor concentración de NaOH. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD) entre el agar nativo y los agares modificados por el tratamiento alcalino con alta concentración de NaOH ($P < 0.05$).

Los menores contenidos de 3,6 AG en *G. longissima* y *G. vermiculophylla* se obtuvieron de sus agares nativos (10.9% y 6.7 %, respectivamente), en tanto que las muestras tratadas con NaOH mostraron los contenidos más altos (40.9% y 43.0%, respectivamente). A mayor concentración de NaOH en el tratamiento alcalino, mayor el incremento en el contenido de 3,6 AG (fig. 2c).

Las mayores fuerza de gel, y temperaturas de fusión y de gelificación se obtuvieron en el agar obtenido de los tratamientos con mayor concentración de álcali, en tanto que los valores más bajos de esos parámetros se registraron en los agares nativos (tabla 1). No fue posible determinar la fuerza de gel para los agares nativos de ambas especies ni para el agar obtenido de *G. longissima* tratada con 3% de NaOH. El contenido de sulfatos mostró una correlación negativa con la fuerza de gel en *G. longissima* ($r = -0.92$), en tanto que el contenido de 3,6 AG se correlacionó positivamente con la fuerza de gel en *G. longissima* ($r = 0.89$) y *G. vermiculophylla* ($r = 0.91$).

Discusión

Las variaciones en la concentración del álcali utilizado para eliminar los residuos de sulfato del agar nativo y así mejorar sus propiedades físicas tienen una gran influencia en las propiedades de los agares de *G. longissima* y *G. vermiculophylla*. Se ha demostrado que, en otras especies de *Gracilaria*, el rendimiento del agar disminuye después de aplicarles un tratamiento alcalino (Aponte-Díaz y Lemus-Castro 1989, de Castro 1996, Wakibia *et al.* 2001). Según lo esperado el rendimiento del agar extraído de *G. longissima* y *G. vermiculophylla* disminuyó después de aplicar el tratamiento alcalino pero de modo distinto en cada especie. El rendimiento de agar de *G. longissima* se redujo significativamente con el tratamiento con NaOH al 3%, comparado con el rendimiento obtenido en el agar nativo (13.3% a 5.8%), pero no se registraron diferencias significativas en el rendimiento con ningún otro de los tratamientos. Esto podría indicar que bajo las condiciones experimentales utilizadas no existe un efecto adicional de las concentraciones más altas de NaOH en el rendimiento de agar en esta especie. Además, los rendimientos de agar obtenidos de los tratamientos alcalinos en *G. longissima* fueron siempre

Table 1. Gel strength, and gelling and melting temperatures in native and alkali-modified agar from two alga species from the Gulf of California (ng = non-gelling). Data based on three replicates are shown with the standard deviation from the mean ($\pm$). Asterisks indicate non-significant differences ($P < 0.05$) among NaOH treatments.

Tabla 1. Fuerza de gel, temperatura de fusión y de gelificación, del agar nativo y del tratado con álcali de dos diferentes especies de algas productoras de agar del Golfo de California, México. Los datos mostrados representan la media de tres réplicas con su desviación estándar ($\pm$). El asterisco indica la no existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de distintos tratamientos con NaOH.

	0% NaOH	3% NaOH	5% NaOH	7% NaOH	9% NaOH
<i>Gracilariopsis longissima</i>					
Gel strength (g cm ⁻²)	ng	ng	176.5 (4.5)	244.0 (1.5)	280.0 (2.5)
Melting temperature (°C)	ng	ng	80.7 (1.0)*	79.9 (1.2)*	85.5 (0.8)
Gelling temperature (°C)	ng	ng	40.6 (1.8)*	37.5 (2.0)*	37.9 (3.2)*
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>					
Gel strength (g cm ⁻²)	ng	51.8 (5.5)	88.6 (4.7)	158.0 (1.5)	177.5 (5.6)
Melting temperature (°C)	ng	69.0 (1.0)	77.8 (1.8)*	81.4 (2.7)*	82.4 (3.3)*
Gelling temperature (°C)	ng	34.8 (2.5)*	40.0 (2.0)*	41.8 (3.6)*	39.0 (3.4)*

Sulfate content in *G. longissima* decreased as the NaOH concentration increased. Sulfate content ranged from 3.9% in native agar to 3.1% in 7% NaOH treatment (fig. 2b). Native agar sulfate content in *G. vermiculophylla* was twice as high (7.8%) as in *G. longissima* and decreased to 5.8% when treated with high NaOH concentrations. Statistically significant differences (LSD test) were observed between native and alkali modified agars ($P < 0.05$).

The lowest 3,6 AG content in *G. longissima* and *G. vermiculophylla* was obtained from native agars (10.9% and 6.7%, respectively), whereas NaOH pretreated samples showed the highest 3,6 AG contents (40.9% and 43.0%, respectively). The higher the NaOH percentage of the treatment, the higher the increment in 3,6 AG content (fig. 2c).

High gel strength as well as melting and gelling temperatures were recorded for high alkali modified agars, whereas low values were found for native agars (table 1). No detectable gel strength was observed for native agar and 3% NaOH treatment in *G. longissima* and for native agar in *G. vermiculophylla*. Sulfate content was negatively correlated with gel strength in *G. longissima* ($r = -0.92$), whereas 3,6 AG was positively correlated with gel strength in *G. longissima* ($r = 0.89$) and *G. vermiculophylla* ($r = 0.91$).

Discussion

Variations in the concentration of alkali used to remove sulfate residues from native agar to improve their physical properties exert a strong influence on the properties of agar extracted from *G. longissima* and *G. vermiculophylla*. It has been shown that in other *Gracilaria* species, agar yield decreases after alkali treatment (Aponte-Díaz and Lemus-Castro 1989, de Castro 1996, Wakibia *et al.* 2001). As expected, agar yield extracted from *G. longissima* and *G. vermiculophylla* decreased after alkali treatment but in a different way. Agar yield extracted from *G. longissima* was significantly reduced in 3%

menores al 8%, el cual es el porcentaje mínimo requerido por la industria (Armisen 1995), lo que resulta de importante consideración en caso de una eventual explotación comercial de esta especie.

Por otro lado, el rendimiento de agar de *G. vermiculophylla* disminuyó ligeramente conforme se incrementó la concentración de álcali en los tratamientos, y sólo se observó una reducción significativa en el rendimiento (en comparación con el agar nativo) en los tratamientos con mayor concentración de NaOH. Asimismo, el rendimiento obtenido para el agar nativo y con tratamiento alcalino de *G. vermiculophylla* fue similar al reportado para *Gracilaria cervicornis*, *Gracilaria domingensis* y *G. verrucosa*, las cuales presentaron rendimientos de agar cercanos a 15% (Aponte-Díaz y Lemus-Castro 1989), a los de *Gracilariopsis lemaneiformis* y seis especies de *Gracilaria* con rendimientos entre 13.4% y 39.5% (Rebello *et al.* 1997), los de *Gracilariopsis* sp. y *Gracilaria gracilis* de 15% a 27% (Wakibia *et al.* 2001), y los obtenidos de *G. crassissima* de 13.1% y *G. blodgettii* de 26.2% (Freile-Pelegrín y Murano 2005). En este sentido, el agar de *G. longissima* parece ser más sensible al tratamiento alcalino que el de *G. vermiculophylla*.

El contenido de sulfatos en *G. longissima* (3.1–3.6%) y *G. vermiculophylla* (5.8–8.2%) obtenido en este trabajo fue mayor al reportado en otras especies de *Gracilaria*, como *Gracilaria heteroclada* (1.4%–2.29%, de Castro 1996), *Gracilaria cornea* (1.54%–1.9%, Freile-Pelegrín y Robledo 1997), y seis especies de *Gracilaria* (1.1 a 2.8%) reportadas por Rebello *et al.* (1997). Se ha señalado que las plantas que crecen a mayor temperatura rinden agar con más sulfatos y menos 3,6 AG que el agar producido por plantas que se desarrollan a temperaturas bajas (Craigie y Wen 1984, Macchiavello *et al.* 1999). Estos últimos señalamientos coinciden con los resultados encontrados en este trabajo y reflejan la naturaleza tropical de las plantas de la costa suroeste del Golfo de California.

Por otra parte, se ha sugerido que el pretratamiento de las algas con soluciones alcalinas puede mejorar la fuerza de gel

NaOH treatment as compared with native agar (13.3–5.8%) and no differences were observed with any other alkali treatment. This fact could indicate that under these experimental conditions there is no further effect of the highest alkali conditions on yield. Furthermore, alkali treated yields from *G. longissima* were always lower than 8%, which is the minimum percentage required by the industry (Armisen 1995). This is an important point that needs to be considered for an eventual exploitation of this species.

On the other hand, agar yield from *G. vermiculophylla* diminished slightly as the concentrations of alkali treatment increased, and only a significant reduction in yield (compared with native agar) was observed for the high alkaline treatments. Furthermore, yields of native and alkali-treated agars from *G. vermiculophylla* were similar to those reported for *Gracilaria cervicornis*, *Gracilaria domingensis*, and *G. verrucosa*, which presented a 15% agar yield (Aponte-Díaz and Lemus-Castro 1989); for *Gracilariopsis lemaneiformis* and six *Gracilaria* species, with 13.4–39.5% (Rebello *et al.* 1997); for *Gracilariopsis* sp. and *Gracilaria gracilis*, with 15–27% (Wakibia *et al.* 2001); and for *G. crassissima*, with 13.1%, and *G. blodgettii*, with 26.2% (Freile-Pelegrián and Murano 2005). In this regard, agar from *G. longissima* appears to be more sensitive to alkali treatment than *G. vermiculophylla*.

The sulfate content values obtained in this study for *G. longissima* (3.1–3.6%) and *G. vermiculophylla* (5.8–8.2%) were higher than those reported for other *Gracilaria* species, such as *G. heteroclada* (1.4–2.29%, de Castro 1996), *G. cornea* (1.54–1.9%, Freile-Pelegrián and Robledo 1997), and six *Gracilaria* species (1.1–2.8%) reported by Rebello *et al.* (1997). It has been reported that plants grown at high temperatures contain more sulfates and less 3,6 AG than agars produced at lower temperatures (Craigie and Wen 1984, Macchiavello *et al.* 1999). These facts agree with our results and reflect the tropical nature of plants from the southeast coast of the Gulf of California.

Moreover, it has been suggested that alkali pretreatment can improve agar gel strength by causing the removal of sulfate residues from the agar molecule. However, not all sulfate residues are alkali-labile sulfates, so the greater the amount of nonalkali-labile sulfates, the poorer the gel strength of the resulting agar (Craigie and Wen 1984). In this study, the sulfate content from *G. vermiculophylla* could only be removed in the high alkali treatments (7% and 9% NaOH); nevertheless, the remnant amount of sulfates present in the agar extract was too high to substantially improve gel strength as occurs in other *Gracilaria* species. On the contrary, a significant reduction in sulfate content was detected in the extract obtained from *G. longissima* treated with 5% NaOH, and no further decrease was observed after increasing the alkali percentage (as shown by the LSD test). This suggests that the remnant sulfate in the agar extracts was probably less susceptible to removal by high alkali treatments due to its nonlabile position.

del agar obtenido por la acción que éste tiene en la eliminación de los residuos de sulfato de la molécula de agar. No obstante, no todos los residuos de sulfato pudieran ser residuos lábiles; por tanto, mientras mayor sea la cantidad de residuos no lábiles al tratamiento alcalino, menor será la fuerza de gel del agar resultante (Craigie y Wen 1984). En este trabajo se observó que el contenido de sulfatos en *G. vermiculophylla* pudo ser reducido sólo en los tratamientos con mayor contenido alcalino (7% y 9% de NaOH); a pesar de ello, la cantidad remanente de sulfatos presente en el agar extraído fue demasiado alta para mejorar sustancialmente la fuerza de gel, como ocurre en otras especies de *Gracilaria*. Por el contrario, para *G. longissima* se observó una reducción significativa en el contenido de sulfatos en el agar obtenido del tratamiento con 5% de NaOH, y no se observó ninguna disminución significativa (prueba LSD) al aumentar la concentración de álcali. Esto sugiere que los residuos de sulfato que persisten en el agar de esta especie son menos susceptibles de ser eliminados aun por los tratamientos alcalinos de mayor concentración debido probablemente a su posición no lábil.

El contenido de 3,6 AG se incrementó de 6.7% a 43% y de 10.9% a 40.9% después del tratamiento alcalino al 9% en *G. vermiculophylla* y *G. longissima*, respectivamente. Los datos obtenidos tras los tratamientos con concentraciones altas de NaOH se asemejan a los reportados por Wakibia *et al.* (2001), Freile-Pelegrián y Robledo (1997) y Bird y Hinson (1992) para otras especies de agarofitas tratadas con álcali (28–42%). Por otra parte, los tratamientos con concentraciones bajas de NaOH produjeron porcentajes bajos de 3,6 AG, lo cual aunado a la baja fuerza de gel derivada de estos tratamientos pudiera explicar el alto porcentaje de sulfatos encontrado.

La fuerza de gel en *G. longissima* y *G. vermiculophylla* se incrementó sólo ligeramente después de aplicar los tratamientos alcalinos de mayor concentración (0 a 280 g cm⁻² y 0 a 177.5 g cm⁻², respectivamente) en comparación con los resultados obtenidos por Bird y Hinson (1992) con *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Gracilaria tikvahiae* y *G. blodgettii* (ca. 1063, 426 y 1176 g cm⁻², respectivamente), por Rebello *et al.* (1996) con *Gracilaria gracilis* (860 g cm⁻²), de Castro (1996) con *G. heteroclada* (274–662 g cm⁻²), Freile-Pelegrián y Robledo (1997) con *Gracilaria cornea* (974–1758 g cm⁻²), Wakibia *et al.* (2001) en *G. gracilis* y *Gracilariopsis* sp. (612 g cm⁻²), y por Espinoza-Avalos *et al.* (2003) en *G. cornea* y *Gracilaria crassissima* (1020 y 1266 g cm⁻²).

Se ha mencionado que la presencia de residuos estables al tratamiento alcalino de D-galactosa-6-sulfato, y parcialmente de 4-O-metil- α -L-galactosa, fue la responsables de la extremadamente pobre capacidad de gelificación y baja fuerza de gel (< 50 g cm⁻²) en el agar nativo y agar tratado de *Gracilaria cervicornis* (Freile-Pelegrián y Murano 2005). Además, la presencia de esteres de sulfato estables al tratamiento con álcali y la de acetal piruvatos disminuyen la fuerza de gel (Wilson y Critchley 1998). De modo similar se ha mencionado que el tratamiento alcalino puede causar un rompimiento de la cadena de agar, dando como resultado una fuerza de gel baja (Murano *et*

After the 9% alkali treatment, the 3,6 AG content increased from 6.7% to 43% and from 10.9% to 40.9% in *G. vermiculophylla* and *G. longissima*, respectively. The data obtained from the high NaOH treatments compare well with those reported by Wakibia *et al.* (2001), Freile-Pelegrin and Robledo (1997), and Bird and Hinson (1992) for other alkali-pretreated agarophytes (28–42%). On the other hand, the low percentage NaOH treatments produced low 3,6 AG percentages and could help explain, in addition to high sulfate contents, the low gel strength obtained in these treatments.

Gel strength in *G. longissima* and *G. vermiculophylla* increased only slightly even after high alkali treatment (from 0 to 280 g cm⁻² and from 0 to 177.5 g cm⁻², respectively), compared with the results obtained by Bird and Hinson (1992) for *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Gracilaria tikvahiae*, and *G. blodgettii* (ca. 1063, 426, and 1176 g cm⁻², respectively); by Rebello *et al.* (1996) for *Gracilaria gracilis* (860 g cm⁻²); by de Castro (1996) for *Gracilaria heteroclada* (274–662 g cm⁻²); by Freile-Pelegrin and Robledo (1997) for *Gracilaria cornea* (974–1758 g cm⁻²); by Wakibia *et al.* (2001) for *Gracilaria gracilis* and *Gracilariopsis* sp. (612 g cm⁻²); and by Espinoza-Avalos *et al.* (2003) for *Gracilaria cornea* and *G. crassissima* (1020 and 1266 g cm⁻²).

It has been mentioned that the presence of alkali-stable D-galactose-6-sulfate residues and, partially, of 4-O-methyl- α -L-galactose is responsible for the extremely poor gelling ability and low gel strength (<50 g cm⁻²) in *Gracilaria cervicornis* native and alkali-treated agars (Freile-Pelegrin and Murano 2005). Furthermore, the presence of alkali-stable sulfate esters and pyruvate ketals decreases gel strength (Wilson and Critchley 1998). Similarly, alkali pretreatment can cause chain breakage, resulting in lower gel strengths (Murano *et al.* 1992). This could indicate that the low gel strength observed in agar extracted from plants from the Gulf of California could be due to a high content of alkali-stable sulfate residues present in the agar even after treatment with high NaOH solutions, suggesting a possible breakage of agar after high alkaline treatments.

According to Macchiavello *et al.* (1999), warm water species of *Gracilaria* have a lower content of 3,6 AG and a higher sulfate content than agars from temperate water species, which is an indication of agars of low commercial value. This fact seems to be in agreement with our results. High seawater temperatures occurring in the Gulf of California could be responsible for the high sulfate content and low gel strength observed in agar extracts from these plants. Even when the alkali pretreatment resulted in an increase in 3,6 AG content, a partial decrease in sulfate content and the increase in gel strength were not enough to improve the agar quality to fit the standards required for the international food market for 1.5% gel (gel strength >750 g cm⁻², sulfate content <4%; Armisen 1995). These agars would therefore be classified as agaroids (Craigie 1990), and would not be suitable for use as a source of bacteriological grade agar. Nevertheless, *G. vermiculophylla* and *G. longissima* native and alkali treated agars could be used in blends with other agars.

al. 1992). Esto podría indicar que la baja fuerza de gel observada en el agar extraído de las plantas del Golfo de California podría ser debida a un alto contenido de residuos de sulfato estables al tratamiento alcalino aún después de aplicar soluciones con alto contenido de NaOH, lo que también sugiere un posible rompimiento del agar después del tratamiento con alta concentración alcalina.

De acuerdo con Macchiavello *et al.* (1999) las especies de *Gracilaria* que habitan en aguas cálidas tienen un agar con menor contenido de 3,6 AG y un mayor contenido de sulfatos que las especies de aguas templadas, lo cual las hace fuentes de un agar de menor valor comercial. Esto concuerda con los resultados de este trabajo. Las altas temperaturas que se presentan en las aguas del Golfo de California pudieran ser responsables del alto contenido de sulfatos y la baja fuerza de gel observada en el agar extraído de estas algas. Aun cuando el tratamiento alcalino aplicado a las algas tuvo como resultado un incremento en el contenido de 3,6 AG, una reducción parcial de la cantidad de sulfatos y un incremento en la fuerza de gel, éstos no fueron suficientes para mejorar la calidad del agar obtenido de manera que se satisfagan los estándares requeridos por el mercado internacional para el agar alimenticio que establece, para un gel al 1.5% de concentración, una fuerza de gel > 750 g cm⁻² y una contenido de sulfatos <4% (Armisen 1995). De aquí que estos agares deberían ser clasificados como agaroides (Craigie 1990), los cuales no son convenientes para ser utilizados como fuente de agar de grado bacteriológico. No obstante, el agar nativo y el agar tratado de *G. vermiculophylla* y *G. longissima* podrían ser utilizados en mezclas con otros agares.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado económicamente por la CGPI proyecto 2004 0268 y el CECyT-Sinaloa. J. O-R agradece el apoyo económico otorgado por la COFAA y la SIP-IPN.

Acknowledgements

This study was supported by CGPI Grant 2004 0268 and CECyT-Sinaloa. The first author acknowledges financial support from COFAA and SIP-IPN.

References

- Aponte-Díaz M, Lemus-Castro AL. 1989. Comparative study of the agar obtained from three species of *Gracilaria* feasible for culture in Venezuela. In: de Oliveira EC, Kautsky N (eds.), Cultivation of Seaweeds in Latin America. USP/IFS, Brazil, pp. 117–119.
- Araki C. 1966. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. Proc. Int. Seaweed Symp. 5: 3–19.
- Armisen R. 1995. World-wide use and importance of *Gracilaria*. J. Appl. Phycol. 7: 231–243.
- Armisen R, Galatas F. 1987. Production, properties and uses of agar. In: McHugh DJ (ed.), Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. 288: 1–44.

- Bellorin AM, Oliveira MC, Oliveira EC. 2004. *Gracilaria vermiculophylla*: A western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. *Phycol. Res.* 52: 69–79.
- Bird KT, Hinson TK. 1992. Seasonal variations in agar yields and quality from North Carolina agarophytes. *Bot. Mar.* 35: 291–295.
- Craigie JS. 1990. Cell walls. In: Cole KM, Sheat RG (eds.), *Biology of the Red Algae*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 221–257.
- Craigie JS, Wen ZC. 1984. Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). *Can. J. Bot.* 62: 1665–1670.
- de Castro TR. 1996. Agar yield, gel strength and sulfate content in *Gracilariopsis heteroclada* farmed in brackishwater canals. *Isr. J. Aquacult./Bamidgeh* 48: 94–98.
- Duckworth M, Yaphe W. 1971. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 16: 359–366.
- Espinoza-Avalos J, Hernández-Garibay E, Zertuche-González JA, Meave del Castillo ME. 2003. Agar from two coexisting species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) from the Mexican Caribbean. *Cienc. Mar.* 29: 211–228.
- Freile-Pelegrín Y, Robledo D. 1997. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatán, Mexico. *J. Appl. Phycol.* 9: 533–539.
- Freile-Pelegrín Y, Murano E. 2005. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Biores. Technol.* 96: 295–302.
- Gurgel CFD, Liao LM, Fredericq S, Hommersand MH. 2003. Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on rbcL sequence analyses and morphological evidence. *J. Phycol.* 39: 154–167.
- Hurtado-Ponce AQ. 1992. Influence of extraction time on the rheological properties of agar from some *Gracilaria* species from the Philippines. *Bot. Mar.* 35: 441–445.
- Jackson GS, McCandless LE. 1978. Simple, rapid turbidimetric determination of inorganic sulfate and/or protein. *Anal. Biochem.* 90: 802–808.
- Macchiavello J, Saito R, Garófalo G, Oliveira EC. 1999. A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown *in vitro*. *Hydrobiologia* 398/399: 397–400.
- Matsuhiro B, Zanlungo A. 1983. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharide from red seaweeds. *Carbohydr. Res.* 188: 276–279.
- McHugh DJ. 2002. Prospects for seaweed production in developing countries. *FAO Fish. Circ.* 968: 1–28.
- Murano E, Toffanin R, Zanetti F, Knutsen SH, Paoletti S, Rizzo R. 1992. Chemical and macromolecular characterization of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Polym.* 18: 171–178.
- Norris JN. 1985. Studies on *Gracilaria* Grev. (Gracilariaceae, Rhodophyta) from the Gulf of California, Mexico. In: Abbott IA, Norris JN (eds.), *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College Program, California, I, pp. 123–135.
- Rebello J, Ohno M, Ukeda H, Sawamura M. 1997. Agar quality of commercial agarophytes from different geographical origins. I. Physical and rheological properties. *J. Appl. Phycol.* 8: 517–521.
- Villanueva RD, Pagba CV, Montañó NE. 1997. Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. *Bot. Mar.* 40: 369–372.
- Wakibia JG, Anderson RJ, Keats DW. 2001. Growth rates and agar properties of three gracilarioids in suspended open-water cultivation in St. Helena Bay, South Africa. *J. Appl. Phycol.* 13: 195–207.
- Wilson AJ, Critchley AT. 1998. Studies on *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Irvine and Farnham and *Gracilaria aculeata* (Hering) Papenfuss from southern Africa. II. Agar production. *S. Afr. J. Bot.* 64: 110–122.

*Recibido en febrero de 2008;
aceptado en septiembre de 2008.*