

Caracterización del carragenano de *Chondracanthus pectinatus*
(Rhodophyta: Gigartinales)

Characterization of the carrageenan of *Chondracanthus pectinatus*
(Rhodophyta: Gigartinales)

Lus Mercedes López-Acuña¹
Isaí Pacheco-Ruiz²
Enrique Hernández-Garibay³
José A. Zertuche-González^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Marinas

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Carretera Tijuana-Ensenada km. 107
Ensenada, CP 22860, Baja California, México
* E-mail: zertuche@uabc.mx

³ Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada
Instituto Nacional de la Pesca
Carretera Tijuana-Ensenada km. 97.5
Ensenada, CP 22800, Baja California, México

Recibido en marzo de 2002; aceptado en julio de 2002

Resumen

Se realizó la extracción y caracterización química y física del carragenano del alga roja *Chondracanthus pectinatus* (Dawson) L. Aguilar y R. Aguilar, en muestras de campo colectadas en tres estaciones del año y tres fases reproductivas. El mayor rendimiento de carragenano fue en invierno (72%) y el mínimo en verano (66%). Las plantas tetraspóricas presentaron los menores porcentajes de 3,6 anhidrogalactosa (9%) y el máximo correspondió a plantas estériles de primavera (26%); se observó una relación inversa en el contenido de sulfatos. El espectro de infrarrojo mostró que el carragenano de *C. pectinatus* en muestras carpospóricas y estériles corresponde al híbrido kappa-iota (κ - ι) y en tetraspóricas a carragenanos tipo lambda (λ).

Palabras clave: *Chondracanthus pectinatus*, endémica, carragenano, fases, reproducción, infrarrojo.

Abstract

The extraction as well as the chemical and physical characterization of the carrageenan of the red algae *Chondracanthus pectinatus* (Dawson) L. Aguilar and R. Aguilar was performed from field samples collected in three seasons of the year and three reproductive phases. The highest yield of carrageenan was in winter (72%) while the lowest was in summer (66%). Tetrasporic plants showed the lower percentages of 3,6 anhidrogalactose (9%), whereas the maximum was obtained from sterile spring plants (26%). An inverse relationship was observed in the sulfate content. The infrared spectrum showed that the carrageenan of *C. pectinatus* belongs to the hybrid kappa-iota (κ - ι) in carposporic and sterile samples but to lambda type (λ) in tetrasporic ones.

Key words: *Chondracanthus pectinatus*, endemic, carrageenan, phases, reproduction, infrared.

Introducción

Los carragenanos son polisacáridos comunes y abundantes de la pared celular de muchas algas rojas del orden Gigartinales (Craigie, 1990) y representan un espectro de estructuras formado por un esqueleto lineal de unidades alternantes de β -D-galactopiranosas unido glicosídicamente a través de las posiciones 1 y 3 y uno de α -D-galactopiranosas unido a través de las posiciones 1 y 4 (Painter, 1983); se

Introduction

Carrageenans are common and abundant polysaccharides in the cell wall of many red algae from the order Gigartinales (Craigie, 1990) and represent a structure spectrum formed by a linear skeleton of alternate units of β -D-galactopyranose joint by glucosidic bonds at positions 1 and 3, and the α -D-galactopyranose that joins by positions 1 and 4 (Painter, 1983). These are classified into families according to the degree and

clasifican en familias de acuerdo al grado y forma de sulfatación de las unidades de galactosa: la familia kappa, donde el residuo β -D-galactopiranososa está sulfatado en el C₄, compuesta por carragenanos kappa (κ), iota (ι), mu (μ) y nu (ν); la familia lambda donde los residuos β -D-galactopiranososa están sulfatados en el C₂, compuesta por carragenanos lambda (λ), xi (ξ), theta (θ) y pi (π); y la familia beta cuya característica es que los residuos de la β -D-galactopiranososa no se encuentran sulfatados, compuesta por los carragenanos beta (β) y gamma (γ), destacando en esta familia la presencia de carragenano omega (ω) y psi (ψ), donde la β -D-galactopiranososa siempre se encuentra sulfatada en el C₆ (Percival, 1978; McCandless y Craigie, 1979; Greer y Yaphe, 1984 a, b; Mollion *et al.*, 1986).

La naturaleza híbrida en los carragenanos se ha demostrado ampliamente (Bellion, 1979; Bellion *et al.*, 1981; Greer y Yaphe, 1984a, b; Correa-Díaz *et al.*, 1990), por lo que es posible que en Gigartinales en la naturaleza, no existan carragenanos formados por un solo tipo de disacárido repetitivo (Craigie, 1990). Respecto a las diferentes fases reproductoras en las Gigartinales, las plantas gametofitas haploides pueden contener predominantemente κ -carragenano y las tetrasporofitas diploides λ -carragenano (McCandless *et al.*, 1973, 1983). La hipótesis es que el tipo de carragenano de *Chondracanthus pectinatus* (Dawson) L. Aguilar y R. Aguilar puede coincidir con el patrón general expuesto por McCandless *et al.* (1983) para Gigartinales: en la fase tetrasporofita (2n) un λ -carragenano, mientras que en la gametofita (n) un híbrido κ/ι -carragenano.

En Gigartinales se reportan variaciones respecto al rendimiento y calidad del carragenano, en diferentes localidades y épocas del año (Doty y Santos, 1978; Dawes *et al.*, 1977a). Pickmere *et al.* (1973) encontraron pequeñas fluctuaciones en el rendimiento entre plantas femeninas, masculinas y tetraspóricas con niveles que van de 50 a 60%. Fuller y Mathieson (1972) reportan en *Chondrus crispus* Stackhouse máximos en verano (76%) y mínimos en invierno (62%); en *Mastocarpus papillatus* (C. Agardh) Kützing, del Pacífico, presentó un máximo en verano (68%) y un mínimo en invierno (58%) (Zizumbo-Alamilla, 1999) y en *Eucheuma uncinatum* (Dawson) del Golfo de California, el máximo fue en verano-otoño (42%) y el mínimo en invierno-primavera (32%) (Zertuche-González, 1988). Considerando que *C. pectinatus* es una alga endémica de la costa NW del Golfo de California, donde las condiciones oceanográficas son muy diferentes entre verano e invierno, e.g. temperaturas de 31°C vs 14°C; y nitratos de 13 μ M vs 4 μ M, respectivamente (Alvarez-Borrego *et al.*, 1978; Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992), la segunda hipótesis de este trabajo es que en *C. pectinatus* se puede presentar una amplia variación en el rendimiento de carragenano entre verano vs invierno.

A pesar del amplio conocimiento que se tiene hoy sobre las características químicas y físicas de los carragenanos, incluyendo el tipo presente por especie y fase reproductiva en Gigartinales, poco se conoce de *C. pectinatus*, hecho atribuible a que ésta es endémica del Golfo de California (Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 1999).

way of sulfation of galactose units. The kappa family is formed by kappa (κ), iota (ι), mu (μ) and nu (ν) carrageenans, where the residue β -D-galactopyranose is sulfated in the C₄. The lambda (λ) family is formed by carrageenans lambda (λ), xi (ξ), theta (θ) and pi (π), where the β -D-galactopyranose residues are sulfated in the C₂. The beta family is formed by beta (β) and gamma (γ) carrageenans and its characteristic is that β -D-galactopyranose residues are not sulfated, outstanding the presence of the omega (ω) and psi (ψ) carrageenans, where the β -D-galactopyranose is always sulfated in the C₆ (Percival, 1978; McCandless and Craigie, 1979; Greer and Yaphe, 1984a, b; Mollion *et al.*, 1986).

The hybrid nature of carrageenans has been widely demonstrated (Bellion, 1979; Bellion *et al.*, 1981; Greer and Yaphe, 1984a, b; Correa-Díaz *et al.*, 1990), therefore Gigartinales carrageenans formed by only one kind of repetitive disaccharide might not exist in nature (Craigie, 1990). About the different reproductive phases in Gigartinales, haploid gametophyte plants may have κ -carrageenan mainly, while diploid tetrasporophytes may have λ -carrageenan (McCandless *et al.*, 1983). Our hypothesis is that the kind of carrageenan in *Chondracanthus pectinatus* (Dawson) L. Aguilar and R. Aguilar may coincide with the general pattern suggested by McCandless *et al.* (1973) for Gigartinales: a λ -carrageenan in the tetrasporophyte (2n) phase and a hybrid κ/ι -carrageenan in the gametophyte one.

In Gigartinales, variations in respect of the yield and quality of the carrageenan are reported for different localities and seasons of the year (Doty and Santos, 1978; Dawes *et al.*, 1977). Pickmere *et al.* (1973) found small fluctuations in the yield among female, male and tetrasporic plants with levels from 50 to 60%. Fuller and Mathieson (1972), reported maximum levels (76%) in summer and minimum in winter (62%) for *Chondrus crispus* Stackhouse, while for *Mastocarpus papillatus* (C. Agardh) Kützing from the Pacific, Zizumbo-Alamilla (1999) reported maximum values during summer (68%) and minimum for winter (58%); finally, in *Eucheuma uncinatum* (Dawson) from the Gulf of California, maximum values have been reported for summer-autumn (42%) and minimum for winter-spring (32%) (Zertuche-González, 1988). Given that *C. Pectinatus* is an endemic alga in the NW coast of the Gulf of California, where oceanographic conditions are too different between summer and winter, i. e. temperatures of 31°C vs 14°C and nitrates of 13 vs 4 μ M, respectively (Álvarez-Borrego *et al.*, 1976; Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992), our second hypothesis is that a wide variation in the carrageenan yield of *C. pectinatus* will be found between summer and winter.

Despite the wide knowledge currently available about the chemical and physical characteristics of carrageenans, even the kind present by species and reproduction phase in Gigartinales, little is known on *C. pectinatus*, which might be due to the fact that it is an endemic species for the Gulf of California (Pacheco-Ruíz and Zertuche-González, 1999).

Thus the aim of this research is to provide information about the seasonal changes in the quantity and quality of the

El objetivo de esta investigación es proporcionar información sobre los cambios estacionales en la cantidad y calidad del carragenano nativo en las diferentes fases reproductivas de *C. pectinatus*, mediante espectroscopía de infrarrojo, e identificar el tipo de carragenano.

Materiales y métodos

Se recolectaron ápices de plantas de *C. pectinatus* sin distinguir fase sexual, entre los dos y los seis metros de profundidad con buceo autónomo en primavera, verano e invierno; en otoño no se localizó material *in situ* ya que la planta es anual (Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 1999). El material se recolectó en un manto situado en La Sílica en Bahía de los Angeles, Golfo de California, México (Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992). El material se secó al sol y se transportó al laboratorio donde se guardó para su análisis posterior. También en primavera se colectó, al azar e *in situ*, planta tetraspórica, femenina (carpospórica) y estéril. No se localizó planta masculina.

Para la extracción de carragenano se utilizó el método modificado de Craigie y Leigh (1978). Tres gramos de alga seca y molida se lavaron con acetona, etanol y éter etílico, para extraer pigmentos y sales. Un gramo del alga despigmentada se suspendió en 500 ml de NaHCO₃ (0.5M) y se extrajo el carragenano al calentarlo de 85 a 90°C por dos horas con agitación continua. El carragenano extraído se filtró al vacío a través de tierra de diatomeas y se precipitó con una solución acuosa de cloruro de cetilpiridina al 2%; posteriormente se purificó con agua destilada y con una solución de alcohol (al 95%) saturada de acetato de sodio, luego con un lavado de etanol al 70% y al final con uno de etanol concentrado. Posteriormente se secó en una estufa de vacío a 60°C hasta obtener peso constante.

La 3,6-anhidrogalactosa se determinó mediante el método de Yaphe y Arsenault (1965), con las modificaciones descritas por Craigie y Leigh (1978) empleando fructuosa como estándar y 1.087 como factor de corrección.

El contenido de sulfatos se obtuvo mediante una modificación del método turbidimétrico con BaCl₂ de Tabatabai (Craigie *et al.*, 1984), con sulfato de potasio como estándar. El grado de sulfatación (GS) se calculó a partir de la razón entre el número de moles de sulfato por moles de unidad disacárida con la siguiente fórmula (Peats, 1981):

$$GS = \frac{\%SO_4 / 96.06}{(100 - \%SO_4) / 289}$$

Los carbohidratos totales se determinaron por el método de Dubois *et al.* (1956), con la prueba del fenol ácido sulfúrico, utilizando galactosa como estándar.

Para el análisis de infrarrojo se prepararon películas empleando una solución de carragenano al 2%. De ésta se tomaron 2 ml y se depositaron en un recipiente de poliestireno, y se evaporó la solución a 60°C por 12 horas. Con las películas obtenidas se corrieron espectros de infrarrojo en un espectrofotómetro Perkin Elmer 1330.

native carrageenan in the different reproductive phases of *C. pectinatus*, besides performing the identification of the kind of carrageenan by means of infrared spectroscopy.

Materials and methods

Plants of *C. pectinatus* were collected between two and six meters depth by scuba diving during spring, summer and winter; there was not any plant material *in situ* during autumn since this is an annual plant (Pacheco-Ruíz and Zertuche-González, 1999). The material was collected from a bed located at La Sílica in Bahía de los Angeles, Gulf of California, Mexico (Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992). Collects were at random by cutting the edges of the plants without distinguishing the sexual phase. The material was dried to direct sunlight and transported to the laboratory where it was kept until analysis. In spring, tetrasporic, feminine (carposporic) and sterile plants were collected at random. Not any masculine plant was located.

For the extraction of carrageenan, the modified method by Craigie and Leigh (1978) was used, where three grams of dried and grounded alga were washed with acetone, ethanol and ethylic ether to extract pigments and salts. A gram of the depigmented alga was suspended in 500 ml of NaHCO₃ (0.5M) and the carrageenan was extracted by heating from 85 to 90°C for two hours with continuous stirring. The extracted carrageenan was vacuum filtered through diatomaceous earth, precipitated with an aqueous solution of 2% cetylpyridine chloride, and then it was purified with distilled water and a sodium-acetate-saturated solution of alcohol (95%). Once purified, it was dried in a vacuum stove at 60°C until constant weight.

The 3,6-anhydrogalactose was determined by the Yaphe and Arsenault method (1965), as well as the modifications described by Craigie and Leigh (1978) using fructose as standard and 1.087 as the correction factor.

Sulfate content was obtained by a modification to the turbidimetric method with BaCl₂ from Tatabai (Craigie *et al.*, 1984) using potassium sulfate as standard. The sulfation degree (GS) was calculated by the rate between the number of moles of sulfate per disaccharide unit moles with the following formula (Peats, 1981):

$$GS = \frac{\%SO_4 / 96.06}{(100 - \%SO_4) / 289}$$

Total carbohydrates were calculated by the Dubois *et al.* (1956) method with the Phenol-Sulfuric acid test, using galactose as standard.

For the infrared analysis, films were made using a 2% carrageenan solution. From this, 2 ml were taken and placed in a polystyrene censer. Afterwards, the solution was evaporated at 60°C for 12 hours. With the films obtained, infrared spectra were run in a Perkin Elmer 1330 spectrophotometer.

Results were tested with the Kruskal-Wallis non-parametric variance analysis. Then the non-parametric Wilcoxon-Mann-

Los resultados se probaron con análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis. Posteriormente se les aplicó la prueba de comparación múltiple no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney (Zar, 1984).

Resultados

El rendimiento de carragenano de las muestras estacionales fluctuó entre el 66 y 72%. Las diferentes fases reproductivas tuvieron un rendimiento de 68 a 70% (tabla 1). No se encontró diferencia significativa entre muestras estacionales; tampoco se encontró diferencia entre fases reproductivas (tabla 2).

El contenido máximo de 3,6-anhidrogalactosa se detectó en primavera (26%) y el mínimo en verano (23%), no se encontraron diferencias significativas entre estaciones. No se detectaron diferencias significativas en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa entre plantas femeninas vs estériles (25 vs 26%), pero se determinó una diferencia significativa respecto a las plantas tetraspóricas (9%) (tablas 1 y 2).

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de sulfato para las estaciones de primavera (17%) y verano (22%). Las plantas tetraspóricas con el 25% fueron significativamente diferentes de las femeninas y estériles con el 21%. El grado de sulfatación (GS) fue máximo en muestras tetraspóricas de 0.99 y en el resto de las muestras fluctuó de 0.60 a 0.86 (tablas 1 y 2).

Las muestras estacionales de carbohidratos totales no fueron significativamente diferentes. Los valores obtenidos fueron 77% en invierno, 76% en primavera y 72% en verano. Las fases reproductivas no fueron significativamente distintas en el contenido de carbohidratos totales, las plantas femeninas (carpospóricas) y estériles presentaron 70% y las tetraspóricas 68% (tablas 1 y 2).

Los espectros de infrarrojo en carragenanos de muestras estacionales femeninas (carpospóricas) y estériles, mostraron señales características de un κ/ι -carragenano, con bandas fuertes a 845 cm^{-1} (β -D-galactosa-4-SO₄) y a 930 cm^{-1} (3,6-

Whitney test of multiple comparisons was applied (Zar, 1984).

Results

The yield of carrageenan from seasonal samples fluctuated between 66 and 72%. Different reproductive phases had a yield of 68 to 70% (table 1). There were not any significant differences among seasonal samples neither among reproductive phases (table 2).

The maximum content of 3,6-anhydrogalactose belonged to spring (26%) while the minimum was for summer (23%) and no significant differences were found among seasons. There were no significant differences in the content of 3,6-anhydrogalactose between feminine vs sterile plants (25 vs 26%), but there were in respect of tetrasporic ones (9%) (tables 1 and 2).

Significant differences were found in the sulfate content for spring (17%) and summer (22%). Tetrasporic plants were significantly different from feminine and sterile plants (25 and 21%, respectively). The sulfation degree (GS) was maximum in tetrasporic plants (0.99) and in the rest of the samples it fluctuated between 0.60 and 0.86 (tables 1 and 2).

Total carbohydrates from seasonal samples were not significantly different. The values obtained were 77% in winter, 76% in spring and 72% in summer. Reproductive phases were not significantly different in the content of total carbohydrates, showing the feminine (carposporics) and sterile plants a 70% whereas tetrasporic showed 68% (tables 1 and 2).

Infrared spectra in carrageenans from seasonal feminine (carposporic) and sterile plant samples, showed signals of a κ/ι -carrageenan, with strong bands at 845 cm^{-1} (β -D-galactose-4-SO₄) and at 930 cm^{-1} (3,6-anhydro- α -D-galactose). Moreover, weak signals appeared at 805 cm^{-1} (α -3,6-anhydro-D-galactose-2-sulfate) and 970 cm^{-1} . The tetrasporic phase showed signals of a λ -carrageenan with a broad band between 820 and 830 cm^{-1} (α -D-galactose-6-sulfate and D-galactose-2-sulfate) besides a weak signal at 930 cm^{-1} (3,6-anhydro- α -D-

Tabla 1. Rendimiento y análisis sobre la composición química del carragenano de *C. pectinatus*, basado en el peso seco del alga. Muestras de primavera (P), verano (V) e invierno (I); fases reproductivas tetrasporofita (T), femeninas(F) y estéril (E). AG = anhidrogalactosa, GS = grado de sulfatación del carragenano, n = 3, \pm = error estandar.

Table 1. Yield and chemical composition analysis of the *C. pectinatus* carrageenan, based on the dry weight of the alga. Spring (P), summer (V) and winter (I) samples; reproductive phases, tetrasporophyte (T), feminine (F) and sterile (E). AG = anhydrogalactose; GS = sulfonation degree, n = 3, \pm = standard error.

Muestra	Rendimiento (%)	3,6-AG (%)	Sulfatos (%)	GS	Carbohidratos (%)
P	68 \pm 1.36	26 \pm 0.40	17 \pm 0.38	0.60	76 \pm 3.60
V	66 \pm 1.90	23 \pm 0.50	22 \pm 0.92	0.86	72 \pm 1.53
I	72 \pm 1.60	25 \pm 0.09	20 \pm 1.18	0.77	77 \pm 0.97
T	68 \pm 0.59	9 \pm 0.22	25 \pm 0.24	0.99	68 \pm 1.26
F	70 \pm 0.25	25 \pm 0.44	21 \pm 0.14	0.79	70 \pm 0.25
E	70 \pm 0.72	26 \pm 0.63	21 \pm 0.63	0.81	70 \pm 0.33

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de Kruskal-Wallis y comparación de medias no paramétrico de Tukey para el rendimiento de carragenano y los componentes químicos, 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG), sulfatos y carbohidratos, de *C. pectinatus*. Muestras de primavera (P), verano (V) e invierno (I); fases reproductivas tetrasporofita (T), femenina (F) y estéril (E). NS = no significativo, * = 0.05.

Table 2. Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance (ANOVA) and non-parametric Tukey's comparison of means for the carrageenan yield and the chemical compounds, 3,6-anhydrogalactose (3,6-AG), sulphates and carbohydrates, of *C. pectinatus*. Spring (P), summer (V) and winter (I) samples; reproductive phases, tetrasporophyte (T), feminine (F) and sterile (E). NS = non-significant, * = 0.05

Variable	F calculada	F crítica	ANOVA	Comparación de medias
Muestras estacionales				
Rendimiento	6.9	9.55	NS	
3,6-AG	9.2	9.55	NS	
Sulfatos	9.7	9.55	*	P<V
Carbohidratos	1.3	9.55	NS	
Muestras de fases reproductivas				
Rendimiento	0.5	3.68	NS	
3,6-AG	506.7	3.68	*	T<F=E
Sulfatos	54.3	3.68	*	E=F<T
Carbohidratos	1.7	3.68	NS	

anhidro- α -D-galactosa). Además, se presentaron señales débiles a los 805 cm^{-1} (α -3,6-anhidro-D-galactosa-2-sulfato) y 970 cm^{-1} . La fase tetrasporica presentó señales de un tipo λ -carragenano con una banda ancha entre 820 y 830 cm^{-1} (α -D-galactosa-6-sulfato y D-galactosa-2-sulfato) además de una señal débil a 930 cm^{-1} (3,6-anhidro- α -D-galactosa) (fig. 1).

Discusión

El tipo de carragenano localizado en *C. pectinatus* coincidió con el patrón general expuesto por McCandless *et al.* (1983) para Gigartinales. La naturaleza híbrida localizada en los carragenanos de *C. pectinatus* (diferentes tipos de carragenano entre las fases gametofita y tetrasporofita) coincidió ampliamente con otras Gigartinales (Bellion, 1979; Bellion *et al.*, 1981; Greer and Yaphe, 1984 a, b; Correa-Díaz *et al.*, 1990), por lo cual el alga roja *C. pectinatus* se ubica correctamente en las Gigartinales. En la fase gametofita (n) se detectó el híbrido κ/ι -carragenano. La fase tetrasporofita mostró un tipo de gel diferente. McCandless *et al.* (1983) señalan la frecuente dificultad para discernir entre los carragenanos de esta familia. Los resultados del espectro de infrarojo para tetrasporofitos es más similar a la de un carragenano de la familia lambda. En la muestra tetrasporofita, se observa la presencia de 3,6-AG en pequeñas cantidades, lo cual indica un grado de hibridación dentro de esta familia. El carragenano de las plantas tetrasporicas mostró una composición cercana a la de la fracción insoluble en KCl del λ -carragenano obtenido de tetrasporofitos de *C. crispus* (McCandless *et al.*, 1973). McCandless *et al.* (1973) reportan que tetrasporofitos de Gigartina contienen más anhidrogalactosa que el carragenano de *Chondrus*, *Iridaea* y *Rhodoglossum*.

galactose) (fig. 1).

Discussion

The kind of carrageenan found in *C. pectinatus* coincided with the general pattern described by McCandless *et al.* (1983) for Gigartinales. The hybrid nature found in the carrageenans of *C. pectinatus* (different kinds of carrageenans between the gametophyte and tetrasporophyte phases) coincided widely with other Gigartinales (Bellion, 1979; Bellion *et al.*, 1981; Greer and Yaphe, 1984 a, b; Correa-Díaz *et al.*, 1990); therefore the red alga *C. pectinatus* is correctly placed within Gigartinales. In the gametophyte phase (n) the κ/ι -carrageenan hybrid was detected. The tetrasporophyte phase showed a different kind of gel. McCandless *et al.* (1983) point out how difficult it is to differentiate within the carrageenans of this family. The infrared spectrum results for tetrasporophytes is much closer to that of a carrageenan of the lambda family. In the tetrasporophyte sample, the presence of the 3,6-AG is observed in small amounts, which indicates an hybridation degree within this family. The carrageenan in tetrasporic plants showed a composition close to the KCl-insoluble fraction of λ -carrageenan obtained from *C. crispus* tetrasporophytes (McCandless *et al.*, 1973). McCandless *et al.* (1973) report that Gigartina tetrasporophytes have more anhydrogalactose than the carrageenan of *Chondrus*, *Iridaea* and *Rhodoglossum*.

Spectra of samples extracted by means of alkaline treatment are needed to differentiate the different structures present in the tetrasporophyte phase and their hybridation degree.

The hypothesis of the carrageenan yield was rejected since there was not any significant difference between summer and winter, despite the fact that in most of the carrageenophytes

Es necesario contar con espectros de muestras extraídas mediante tratamiento alcalino para diferenciar las diferentes estructuras presentes de la fase tetraesporofita y su grado de hibridación.

La hipótesis del rendimiento de carragenano se rechazó ya que no se encontró diferencia significativa entre verano e invierno, a pesar de que en la mayoría de las carragenofitas se observa una variación estacional en el rendimiento atribuida a cambios en las condiciones ambientales (Fogg 1964; Neish y Shacklock, 1971; Dawes *et al.*, 1977a; Zertuche-González, 1988). Tal variación no se detectó a pesar de que en la costa NW del Golfo de California los parámetros físico-químicos cambian drásticamente, con diferencias de 17°C en temperatura y 10 μM en nitratos entre verano e invierno (Robinson, 1973; Alvarez-Borrego *et al.*, 1978; Bray y Robles, 1989; Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992). En tres *Gigartinas* de Nueva Zelanda se reportan comportamientos similares a los de *C. pectinatus* en un período anual de muestreo de carragenanos (Pickmere *et al.*, 1975).

A pesar de que *C. pectinatus* se caracteriza por presentar un crecimiento rápido y alta productividad en primavera (Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992), en este trabajo no se observó un decremento en el rendimiento del carragenano. Este comportamiento es diferente al observado en otras carragenofitas, ya que cuando existe rápido crecimiento en una macroalga se espera una baja en el rendimiento atribuible a que en un medio rico en nutrientes, el carbón producido en la fotosíntesis y que entra al ciclo de Krebs, es destinado principalmente a la síntesis de compuestos precursores de aminoácidos y en menor medida a la biosíntesis de carbohidratos (Raven, 1974; Neish *et al.*, 1977; DeBoer, 1979).

No se detectaron diferencias significativas en el rendimiento entre fases reproductivas (68 a 70%) de *C. pectinatus*, quizás atribuible a que las muestras se recolectaron en la misma estación del año. Un patrón similar se reporta en *Gigartina* sp. (McCandless *et al.*, 1973; 1983; Pickmere *et al.*, 1975) y *E. uncinatum* (Dawes *et al.*, 1977b; Zertuche-González, 1988). Además *C. pectinatus* presentó mayor rendimiento con menor fluctuación estacional (66 a 72%) a la reportada en *C. crispus* (30 a 70%) (Fuller y Mathieson, 1972).

Los valores de 3,6-anhidrogalaactosa y grupos hemiester sulfato encontrados en plantas femeninas y estériles de *C. pectinatus* fueron cercanos a valores reportados para la fracción insoluble en KCl de especies productoras de un carragenano híbrido del tipo kappa/iota como *C. crispus*, *Mazzaella leptorinchos* (J. Ag.) y *Mazzaella ornithorhynchos* (McCandless *et al.*, 1983), así como de *Eucheuma odontophorum* Børgesen (Santos, 1989).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por FOSIMAC (SIMAC/94/CM11), la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y CONACYT. Agradecemos a James Craigie sus valiosos

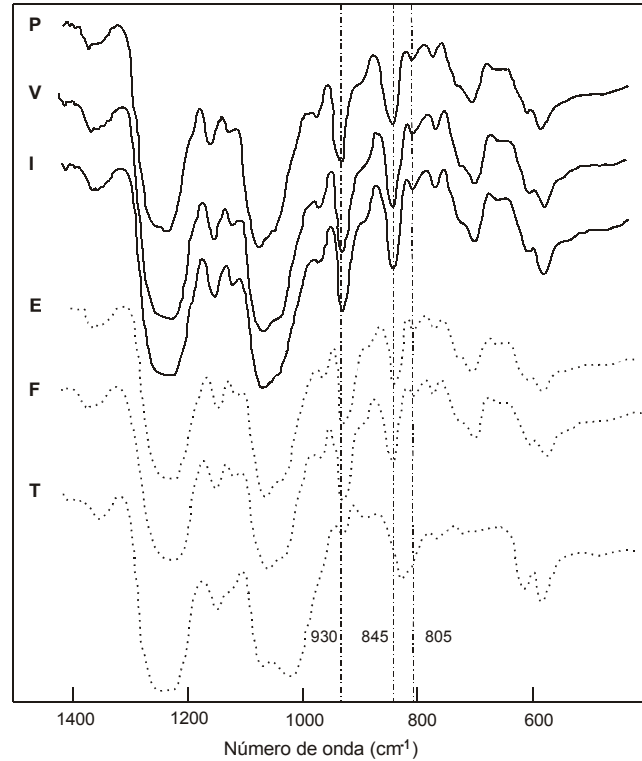


Figura 1. Espectro de infrarrojo del carragenano de *Chondracanthus pectinatus* de las muestras estacionales de primavera (P), verano (V), invierno (I) y fases reproductivas: estéril (E), femenino -carposporofitos- (F) y tetrasporofitos (T).

Figure 1. Infrared spectrum of the *Chondracanthus pectinatus* carrageenan from the spring (P), summer (V) and winter (I) seasonal samples and reproductive phases: sterile (E), feminine -carposporophytes- (F) and tetrasporophytes (T).

there is a seasonal variation in the yield that is attributed to changes in the environmental conditions (Fogg, 1964; Neish and Shacklock, 1971; Dawes *et al.*, 1977a; Zertuche-González, 1988). Such variation was not detected even though in the NW coast of the Gulf of California the physical-chemical parameters change drastically, with differences of 17°C in temperature and 10 μM of nitrates between summer and winter (Robinson, 1973; Álvarez-Borrego *et al.*, 1978; Bray and Robles, 1989; Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992). Similar behaviors to that of *C. pectinatus* are reported in three *Gigartinales* from New Zealand in an annual sampling period of carrageenans (Pickmere *et al.*, 1975).

Despite the fact that *C. pectinatus* characterizes by having a fast grow and a high productivity in spring (Pacheco-Ruíz *et al.*, 1992), in this study there was not any decrease observed in the yield of carrageenan. Such a behavior is anomalous when compared to other carrageenophytes since when there is a fast growth in a macroalga, a drop in the yield is expected, which is attributable to the fact that in a nutrient-rich environment, the carbon produced by photosynthesis entering into the Krebs cycle is used mainly for the synthesis of compounds that promote aminoacids and in a lesser extent, for the biosynthesis

comentarios para mejorar este escrito así como a los revisores anónimos por sus valiosas sugerencias. Agradecemos a Antonio Reséndiz por su apoyo logístico en el trabajo de campo.

Referencias

- Alvarez-Borrego, S., Rivera, J.A., Gaxiola-Castro, G., Acosta-Ruiz, M.J. y Schwartzlose, R.A. (1978). Nutrientes en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 5: 53–71.
- Austen, K.R.J., Goodall, D.M. and Norton, I.T. (1985). Anion-independent conformational ordering in iota-carrageenan: disorder-order equilibria and dynamics. *Carbohydrate Res.*, 140: 251–262.
- Bellion, C. (1979). Enzyme utilisation in the characterisation of kappa- and iota-carrageenans. Ph. D. thesis McGill University, Montreal, 176 pp.
- Bellion, C., Hamer, G.K. and Yaphe, W. (1981). Analysis of Kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carrageenan, iota-carrageenan and ¹³C NMR. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 10: 379–384.
- Bray, N.A. and Robles, J.M. (1989). Physical oceanography of the Gulf of California. In: J.P. Dauphin and B.R.T. Simoneit (eds.). *The Gulf and Peninsular Province of the California*. American Association Petroleum Geology, Tulsa, Okla, pp. 511–533.
- Correa-Díaz, F., Aguilar-Rosas, R. and Aguilar-Rosas L.E. (1990). Infrared analysis of eleven carragenophytes from Baja California, Mexico. *Hydrobiologia*, 204/205: 609–614.
- Craigie, J.S. (1990). Cell walls. In: Cole, K.M. and Sheath, R.G. (eds). *Biology of red algae*. Cambridge, Univ. Press, Cambridge, New York, pp. 221–257.
- Craigie, J.S. and Leigh, C. (1978). Carrageenans and agars. In: Hellebust and Craigie (eds). *Handbook of Phycological and Biochemical Methods*. Cambridge Univ. Press, pp. 109–131.
- Craigie, J.S., Wen, Z.C. and Van Der Meer, J.P. (1984). Interspecific, intraspecific and nutritionally determined variations in the composition of agar from *Gracilaria* sp. *Botanica Marina*, 27: 55–61.
- Dawes, C.J., Stanley, N.F. and Stancioff, D.J. (1977a). Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and ι-carrageenan from floridean *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina*, 20: 137–147.
- Dawes, C.J., Stanley, N.F. and Moon, R.E. (1977b). Physiological and biochemical studies on the ι-carrageenan producing red alga *Eucheuma uncinatum* Setchell and Gardner, from the Gulf of California. *Botanica Marina*, 20: 437–442.
- DeBoer, J.A. (1979). Effects of nitrogen enrichment on growth rate and phycocolloid content in *Gracilaria folifera* and *Neogardhiella baileyi* (Florideophyceae). *Proc. Intl. Seaweed Symp.*, 9: 263–271.
- Doty, M.S. and Santos, G.A. (1978). Carrageenan from tetrasporic and cystocarpic *Eucheuma* species. *Aquat. Bot.*, 4: 143.
- Dubois M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, S. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350–356.
- Fogg, G.E. (1964). Environmental conditions and the pattern of metabolism in algae. In: D. Jackson (ed.), *Algae and Man*. New York: Plenum, pp. 77–85.
- of carbohydrates (Raven, 1974; Neish *et al.*, 1977; DeBoer, 1979).
- No significant differences were detected in the yield among reproductive phases (68 to 70%) of *C. pectinatus* which might be attributable to the samples being collected in the same season. A similar pattern is reported in *Gigartina* sp. (McCandless *et al.*, 1973; 1983; Pickmere *et al.*, 1975) and *E. uncinatum* (Dawes *et al.*, 1977b; Zertuche-González, 1988). Moreover, *C. pectinatus* showed a higher yield with less seasonal fluctuations (66 to 72%) when compared to that reported in *C. crispus* (30 to 70%) (Fuller and Mathieson, 1972).
- Values of 3,6-anhydrogalactose and hemi-ester sulfate groups found in feminine and sterile plants of *C. pectinatus* were close to the values reported for the KCl-insoluble fraction of species that produce a hybrid carrageenan of the kind kappa/iota as *C. crispus*, *Mazzaella leptorinchos* (J. Ag.) and *Mazzaella ornithorhynchos* (McCandless *et al.*, 1983) as well as in *Eucheuma odontophorum* Borgesen (Santos, 1989).

Acknowledgements

FOSIMAC (SIMAC/94/CM11), Universidad Autónoma de Baja California (UABC) and CONACYT sponsored this research. We thank James Craigie for his valuable comments to improve this paper, as well as the anonymous reviewers for their valuable suggestions. Thanks Antonio Reséndiz for his logistic support in the fieldwork.

English translation by Adrián R. López-González.

-
- Fuller, S.W. and Mathieson, A.C. (1972). Ecological studies of economic red algae. IV. Variations of carrageenan concentration and properties in *Chondrus crispus* Stackhouse. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 10: 49–58.
- Greer, C.W. and Yaphe, W. (1984a). Characterization of hybrid (Betha, Kappa and Gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carragenases, infrared and C-NMR spectroscopy. *Botanica Marina*, 27: 473–478.
- Greer, C.W. and Yaphe, W. (1984b). Hybrid (Iota, Nu and Kappa) carrageenan from *Eucheuma nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae) identified using iota and kappa carragenases and C-NMR spectroscopy. *Botanica Marina*, 27: 479–484.
- McCandless, E.L., Craigie, J.S. and Walter, J.A. (1973). Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. *Planta*, 112: 201–212.
- McCandless, E.L. and Craigie, J.S. (1979). Sulphated polysaccharides in red and brown algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 30: 41–53.
- McCandless, E.L., West A. West and Michael D. Guiry. (1983). Carrageenan Patterns in the Gigartinales. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 11, N. 3, pp. 175–182.
- Mollion, J., Moreau, S. and Christiaen, D. (1986). Isolation of a new type of carrageenan from *Risoella verruculosa* (Bert.) J. Agardh (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina*, 29: 549–552.

- Neish, A.C. and Shacklock, P.F. (1971). Greenhouse experiments on the propagation of strain T4 of Irish Moss. National Research Council of Canada, Atlantic Regional Lab., Tech. Rep. No. 14.
- Neish, A.C., Shacklock, P. F., Fox, C. H. and Simpson, F.J. (1977). The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. *Can. J. Botany*, 55: 2263–2271.
- Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J.A., Cabello-Pasini, A. and Brinkhuis, B.H. (1992). Growth responses and biomass variation of *Gigartina pectinata* Dawson (Rhodophyta) in the Gulf of California. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 157: 263–274.
- Pacheco-Ruiz, I. and Zertuche-González, J.A. (1999). Population structure and reproduction of the carrageenophyte *Chondracanthus pectinatus* in the Gulf of California. *Hydrobiologia*, 398/399: 159–165.
- Painter, T.J. (1983). Algal Polysaccharides. In: G.O. Aspinall (ed.), *The Polysaccharides*. Academic Press Inc., New York, pp. 2–195.
- Percival, E. (1978). Do the polysaccharides of brown and red seaweeds ignore taxonomy? In: D.E.G. Irvine and J. H. Price (eds.), *Modern Approaches to the Taxonomy of Red and Brown Algae*. London Academic Press, pp. 47–62.
- Pernas, A.J., Smidsrod, O., Larsen, B. and Haug, A. (1967). Chemical heterogeneity of carrageenan as shown by fractional precipitation with potassium chloride. *Acta Chem. Scand.* 21(1): 98–110.
- Pickmere, S.E., Parsons, M.J. and Bailey, R.W. (1973). Composition of *Gigartina carrageenan* in relation to sporophyte and gametophyte stages of the life cycle. *Phytochemistry*, 12: 2441–2444.
- Pickmere, S.E., Parsons, M.J. and Bailey, R.W. (1975). Variations in carrageenans levels and composition in three New Zealand species of *Gigartina*. *N. Z. J. Sci.*, 18: 585–595.
- Peats, S. (1981). The infrared spectra of carrageenans extracted from various algae. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 10: 495–502.
- Raven, J.A. (1974). Carbon dioxide fixation. In: W.D.P. Stewart (ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 443–445.
- Robinson, M.K. (1973). Atlas of monthly mean surface and subsurface temperatures in the Gulf of California, Mexico. *San Diego Society of Natural History. Mem.*, 5, 97 pp.
- Santos, G.A. (1989). Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). *Aquatic Botany*, 36: 55–67.
- Stancioff, D.J. and Stanley, N.F. (1969). Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. *Proc. Intl. Seaweed Symp.*, 4: 595–609.
- Yaphe, W. and Arsenault, G.P. (1965). Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.*, 13: 143–148.
- Zar J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, 718 pp.
- Zertuche-González, J.A. (1988). *In situ* life history, growth and carrageenan characteristics of *Eucheuma uncinatum* (Setchell and Gardner) Daw. from the Gulf of California. Ph.D. Dissertation, State University of New York at Stony Brook, 162 pp.
- Zizumbo-Alamilla, L.E. (1999). Biomasa, crecimiento y extracción química de la carragenofita *Mastocarpus papillatus* (C. Agardh) Kützinger (Rhodophyta, Gigartinales), de Punta San Isidro (Ejido Eréndira), B.C. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California, 39 pp.