

Efecto del tratamiento de oscuridad y salinidad en el rendimiento y calidad del agar de *Gracilaria cornea* (Rhodophyceae)

Effect of dark and salinity treatment in the yield and quality of agar from *Gracilaria cornea* (Rhodophyceae)

Yolanda Freile-Pelegrín^{1*}

Daniel Robledo¹

Marianne Pedersén²

Ellen Bruno²

Jens Rönqvist²

¹ CINESTAV-Unidad Mérida

AP. 73 Cordemex, 97310

Mérida, Yucatán, México

*E-mail: freile@mda.cinvestav.mx

² Department of Botany, Stockholm University

Stockholm, Sweden

Recibido en octubre de 2001; aceptado en junio de 2002

Resumen

El tratamiento alcalino previo a la extracción del agar del género *Gracilaria* reduce, entre otras reacciones, el contenido de sulfatos y aumenta la fuerza de gel; sin embargo, a nivel industrial, requiere de costosos procesos de purificación de los efluentes para reducir los niveles de contaminación. El alga roja *Gracilaria cornea* fue cultivada bajo diferentes tratamientos de oscuridad y salinidad antes de su cosecha con el propósito de remplazar dicho tratamiento alcalino. Los diferentes tratamientos realizados fueron: (a) oscuridad y 33‰ de salinidad durante 8 días, [oscuridad]; (b) oscuridad y 50‰ de salinidad durante 4 días, seguidos de oscuridad y 25‰ de salinidad por 4 días, [4+4]; y (c) oscuridad y 50‰ de salinidad durante 8 días, seguidos por 4 días de oscuridad y 25‰ de salinidad, [8+4]. El tratamiento [4+4] incrementó el rendimiento de agar en un 26% (de 36.6 a 46.1%). Todos los tratamientos redujeron el contenido de sulfatos en el agar en aproximadamente un 24% cuando se les compara con el agar obtenido sin ningún tratamiento. Para *G. cornea* el tratamiento [4+4] puede en el futuro llegar a ser un método adicional a un tratamiento alcalino ligero en el que se utilice una menor concentración de álcali durante la extracción de agar.

Palabras clave: Agar, *Gracilaria cornea*, salinidad, tratamiento de oscuridad.

Abstract

The alkali treatment used previous to agar extractions from the *Gracilaria* genus reduces, among other reactions, the sulphate content and improves the gel strength; however, at an industrial level it requires expensive effluent processing to reduce its polluting charge. The red alga *Gracilaria cornea* was cultivated under dark and salinity treatments to replace this alkali treatment. The different treatments tested were: (a) darkness and 33‰ salinity for 8 days, [dark treatment]; (b) darkness and 50‰ salinity for 4 days, followed by darkness and 25‰ salinity for 4 days, [4+4]; and (c) darkness and 50‰ salinity for 8 days, followed by darkness and 25‰ salinity for 4 days, [8+4]. The treatment [4+4] increased the agar yield in 26% (from 36.6 to 46.1%). All treatments reduced the sulphate content of the agar in approximately 24% when compared with agar obtained without any treatment. For *G. cornea* the [4+4] treatment might become in the future an additional treatment to a mild alkali treatment using less alkaline reagents for agar extraction.

Key words: Agar, *Gracilaria cornea*, salinity, dark treatment.

Introducción

El agar es un mezcla de polisacáridos. El polisacárido con propiedades gelificantes es la agarosa y es el que posee una estructura alternante de 3,6 anhidro-L-galactosa (3,6-AG) y D-galactosa; es extraído de diferentes especies de algas rojas

Introduction

The agar is a gel forming mixture of polysaccharide, extracted from different species of marine red macroalgae (Rhodophyceae). It is widely used as a gelling food additive and in many biotechnological, medical and pharmaceutical

(Rhodophyceae); es usado ampliamente como aditivo alimenticio y en numerosas aplicaciones biotecnológicas, médicas y farmacéuticas. Las unidades repetitivas pueden estar sustituidas en mayor o menor grado por grupos sulfatos, metilos y piruvatos (Murano, 1995). La cantidad y localización de estos grupos sustituyentes en la molécula, además de factores medioambientales y diferentes procedimientos de extracción, pueden influir en la calidad del agar obtenido (Lignell y Pedersén, 1989; Lahaye y Rochas, 1991). Los grupos sustituyentes interfieren en la formación de la estructura en hélice durante el proceso de gelificación, por lo que agares con un alto contenido de grupos sulfato están asociados con geles de poca dureza (Yaphe y Duckworth, 1972; Lahaye y Rochas, 1991).

Gracilaria cornea J. Agardh, un alga roja presente en la costa de Yucatán, en México, ha sido recientemente reconocida como una fuente potencial de agar (Freile-Pelegrín y Robledo, 1997a). El agar nativo de esta especie tiene altos rendimientos (40%), sin embargo, debido a su alto contenido en grupos sulfatos (5%) y sus bajas fuerzas de gel (50–100 g cm⁻²) es reconocido como un agaroido (Freile-Pelegrín y Robledo, 1997a). El aumento en la calidad del agar de esta especie ha sido satisfactoriamente obtenido mediante un tratamiento alcalino previo a la extracción, el cual reduce el contenido de sulfatos e incrementa la fuerza de gel a través de la conversión del sulfato lábil de la L-galactosa-6-sulfato a 3,6-AG, (Freile-Pelegrín y Robledo, 1997b). No obstante, este tratamiento provoca una ligera disminución ($\approx 16\%$) en el rendimiento.

A pesar de la ventaja que tiene el tratamiento alcalino para elevar la calidad del agar, éste requiere de costosos procesos de purificación de los efluentes industriales para reducir sus niveles de contaminación, particularmente debido a los agaropectinatos de sodio, antes de verterlos al medio (Armisen, 1995).

En Suecia ha sido desarrollado un método alternativo para inducir la conversión del sulfato inestable a 3,6-AG e incrementar el rendimiento en *Gracilaria* (Ekman y Pedersén, 1990; Ekman *et al.*, 1991; Rincones *et al.*, 1993). Este método involucra el manejo de algunos procesos enzimáticos en el alga, a través de un tratamiento bajo condiciones de hiper- e hiposalinidad y de oscuridad. Bajo estas condiciones se produce la activación de enzimas sulfohidrolasas y sulfotransferasas que provocan la desulfatación de la molécula aumentando los niveles de 3,6-AG y, por lo tanto, la calidad del agar.

Por otro lado, la fosforilasa y la α -glucanoliasa son dos enzimas responsables de la degradación del almidón florideano, reserva de carbono de algas rojas que es considerada una impureza en el agar (Yu y Pedersén, 1991). Se ha reportado que en *Gracilaria* estas enzimas mantienen su actividad durante la oscuridad (Rincones *et al.*, 1993). En la especie *G. sordida* Nelson (ahora llamada *G. chilensis* Bird, McLachlan *et Oliveira*) se observa un incremento en una fuente de carbono de bajo peso molecular llamada florodósido durante condiciones de oscuridad e hiper-salinidad (Ekman *et al.*, 1991). Bajo estas condiciones, el almidón florideano es transformado a florodósido que actúa como un osmolito orgánico (Macler, 1986). La actividad de la α -galactosidasa, enzima que degrada el florodósido, aumenta cuando *Gracilaria* es expuesta a

applications. It consists of repeating units of 3,6 anhydro-L-galactose (3,6-AG) and D-galactose. These units can be substituted to a greater or lesser degree with sulphate, methyl and pyruvate groups (Murano, 1995). The amount and location of these substituents in the molecule, as well as environmental factors and different extraction procedures, can influence the agar quality (Lignell and Pedersén, 1989; Lahaye and Rochas, 1991). The substituent groups interfere with the helix structure formation during the gelling process and therefore agars with high sulphate contents are usually associated with weak gels (Yaphe and Duckworth, 1972; Lahaye and Rochas, 1991).

Gracilaria cornea J. Agardh, a red seaweed from the Yucatan coast of Mexico, has recently been recognised as a potential source of agar (Freile-Pelegrín and Robledo, 1997a). The native agar of this species gives a high yield (40%) but due to its high sulphate content (5%) and low gel strength (50–100 g cm⁻²) it has been recognised as an agaroid (Freile-Pelegrín and Robledo, 1997a). The improvement of the agar quality in this species has been carried out successfully using an alkali treatment prior to the extraction which reduced the sulphate content and increased the gel strength through the conversion of the alkali labile sulphate 4-L-galactose-6-sulphate to 3,6-AG (Freile-Pelegrín and Robledo, 1997b). However, this treatment promotes a slight reduction on the agar yield ($\approx 16\%$).

Despite the advantage of the alkali treatment for increasing agar quality, it requires expensive industrial effluent processing before releasing to nature, in order to reduce its polluting charge mainly due to sodium agaropectinates (Armisen, 1995).

An alternative method to induce the conversion of the alkali labile sulphate to 3,6-AG and to increase the yield in *Gracilaria* has been developed in Sweden (Ekman and Pedersén, 1990; Ekman *et al.*, 1991; Rincones *et al.*, 1993). This method involves the management of certain algal enzyme processes by means of algal treatment under hyper- and hyposaline conditions and darkness. Under these conditions the activation of the enzymes sulphohydrolase and sulphotransferase produces a desulphation of the agar molecule increasing the 3,6-AG levels and therefore the agar quality.

On the other hand, the phosphorylase and the α -glucanlyase are two enzymes responsible for the degradation of the floridean starch, a carbon storage pool in red algae that is considered an impurity of agar (Yu and Pedersén, 1991). These enzymes are reported to maintain their activity during darkness in *Gracilaria* (Rincones *et al.*, 1993). An increase in the low molecular-weight carbon source, the floridoside, in *G. sordida* Nelson (now called *G. chilensis* Bird, McLachlan *et Oliveira*) has been observed under darkness and hypersaline conditions (Ekman *et al.*, 1991). Under these conditions floridean starch is converted to floridoside that serves as an organic osmolyte (Macler, 1986). The α -galactosidase activity, a floridoside degrading enzyme, increases when *Gracilaria* is exposed to hyposaline conditions (Yu and Pedersén, 1990a, 1990b; Ekman *et al.*, 1991). Ekman *et al.* (1991) suggests that the released carbon from the degradation of floridean starch and floridoside during darkness and hyper and hyposaline conditions can be mobilised towards the agar synthesis (fig. 1).

condiciones hipo-salinas (Yu y Pedersén, 1990a, 1990b; Ekman *et al.*, 1991). Ekman *et al.* (1991) sugieren que el carbono resultante de la degradación del almidón florideano y del florodósido durante estas condiciones de oscuridad y choque osmótico pueden movilizarse hacia la síntesis de agar (fig. 1).

En este estudio se llevó a cabo una investigación del efecto del tratamiento de oscuridad y salinidad sobre el rendimiento y la calidad del agar nativo de *Gracilaria cornea* en cultivos de laboratorio. El objetivo de este estudio fue eliminar los grupos sulfatos inestables de la molécula de agar para aumentar la fuerza de gel en el agar nativo de *G. cornea* y al mismo tiempo incrementar el rendimiento.

Materiales y métodos

Material algal y método de cultivo

Gracilaria cornea fue colectada de una población natural en la localidad de Dzilam de Bravo (21°23'N, 88°57'W) durante septiembre de 1998. Para asegurar el mismo estado nutricional, las algas fueron cultivadas en el laboratorio con agua de mar (33‰) filtrada (45 µm) y enriquecida con medio Provasoli (1968) modificado, con una concentración de fósforo 82 µM y sin vitaminas (MPES). El material algal fue cultivado durante siete semanas en 12 cilindros de acrílico transparente de 80 L con aereación bajo un fotoperiodo 16:8 h (L:O) con una irradiancia de 100 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura entre 22 y 27°C. La densidad inicial de las plantas fue de 3 g L⁻¹ peso fresco y su tasa promedio de crecimiento diario fue de 2% d⁻¹.

Tratamientos experimentales

Los tratamientos de oscuridad y salinidad se llevaron a cabo introduciendo 200 g peso fresco de *G. cornea* en cubetas tapadas provistas de aireación conteniendo 16 L de agua de mar filtrada. Las cubetas se pintaron por fuera de color negro para evitar el paso de la luz. Para la determinación de los valores de salinidad para el tratamiento de choque osmótico se realizaron pruebas preliminares de tolerancia de *G. cornea* a distintas salinidades. Las salinidades usadas fueron 50‰ y 25‰ y se llevaron a cabo mediante la adición de sal marina natural o agua dulce, respectivamente. Para evitar que el alga usase sus reservas nutricionales como reguladores osmóticos, el agua fue enriquecida con MPES. La temperatura del agua fue mantenida a 27 ± 1°C. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado con algas seleccionadas al azar de los 12 cilindros de cultivo.

Antes de la realización de los tratamientos experimentales, 400 g peso fresco de algas fueron separadas, lavadas cuidadosamente con agua dulce, secadas en una estufa a 60°C y almacenadas en bolsas de plástico a temperatura ambiente hasta la extracción de agar. Estas muestras, sin ningún tratamiento, fueron utilizadas como control.

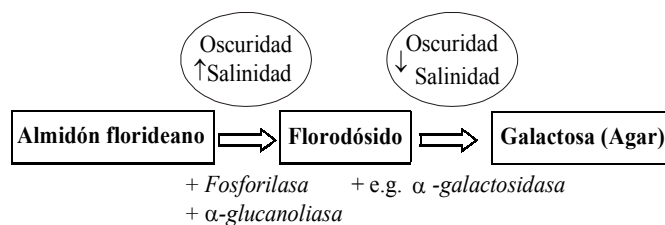


Figura 1. Ruta del carbono para la formación de agar a partir del almidón florideano en *Gracilaria* spp.

Figure 1. Carbon pathway to the formation of agar from floridean starch in *Gracilaria* spp.

In this work we studied the effects of dark and salinity treatments on the yield and quality of native agar from *Gracilaria cornea* in laboratory cultures. The aim of the study was to eliminate labile sulphate groups of the agar molecule and at the same time to increase both gel strength and yield.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Gracilaria cornea was collected from a natural population at Dzilam de Bravo (21°23'N, 88°57'W) in September 1998. In order to assure the same internal nutrient status, they were cultivated in the laboratory with filtrated (45 µm) seawater (33‰) and enriched according to Provasoli (1968), but modified with a phosphorous concentration of 82 µM and without vitamins (MPES). Algae were cultivated for seven weeks in 12 aerated 80-L Plexiglass cylinders with an irradiancia of 100 µmol m⁻² s⁻¹, temperature between 22 and 27°C, and a 16:8 h (L:D) photoperiod. The initial plant density was 3 g L⁻¹ fresh weight (fw) and the mean daily growth rate was 2% d⁻¹.

Experimental treatments

The dark and salinity treatments were carried out by placing 200 g fw of *Gracilaria cornea* in aerated lid-covered buckets containing 16 L of natural filtrated seawater kept at 27 ± 1°C. The buckets were painted outside with black paint to avoid light passing through. In order to determine the salinity values for the osmotic shock treatment, preliminary experiments of salinity tolerance for *G. cornea* were performed. The salinities used were 50 and 25‰ and were achieved with the addition of natural sea salt or fresh water respectively. To avoid algae using their nutrient pool as osmotic regulators, water was enriched with MPES. All treatments were carried out with three replicates with algae randomly selected from the 12 cultivation cylinders.

Before experimental treatments were performed, 400 g fw of algae were taken out, washed thoroughly with tap water, oven dried at 60°C and stored in sealed plastic bags at ambient temperature until agar extraction. These samples without any treatment were used as control.

Los diferentes tratamientos de oscuridad y salinidad consistieron en:

- (a) oscuridad y 33‰ de salinidad durante 8 días, [oscuridad];
- (b) oscuridad y 50‰ de salinidad durante 4 días, seguidos por oscuridad y 25‰ de salinidad durante 4 días, [4+4]; y
- (c) oscuridad y 50‰ de salinidad durante 8 días, seguidos por oscuridad y 25‰ de salinidad durante 4 días, [8+4].

Después de los tratamientos antes mencionados, las algas fueron lavadas con agua dulce, secadas, pesadas y almacenadas de la misma forma que las muestras control.

Extracción de agar

Para la extracción del agar se separaron muestras de algas de 10 g peso seco. Las algas, previamente hidratadas durante toda la noche en agua destilada, fueron sumergidas en 400 mL de agua destilada a un pH de 6.3–6.4 y llevadas a ebullición a una temperatura de 100–105°C durante 1.5 h. Al momento de la ebullición el pH ajustado nuevamente a 6.3–6.4 con un potenciómetro con sonda compensadora de temperatura. El extracto fue mezclado con 8 g de ayuda de filtración (Celite) y filtradas en un filtro a presión. El agar obtenido se dejó gelificar a temperatura ambiente por 24 horas, y fue congelado durante 2 días y descongelado posteriormente a temperatura ambiente. Finalmente, el agar se secó a 60°C durante 24 horas, se enfrió en un desecador y se pesó para obtener el rendimiento de agar, expresado como porcentaje del alga en peso seco. Las extracciones de agar de cada tratamiento fueron realizadas por triplicado.

Propiedades físicas

La fuerza de gel y temperaturas de fusión y gelificación fueron medidas, por triplicado, sobre una disolución de agar (1.5% peso/volumen). Para evitar evaporación, el gel fue cubierto con una delgada capa de agua y se dejó gelificar a temperatura ambiente. La fuerza de gel y temperatura de fusión se midieron después de dejar estabilizar a temperatura ambiente el gel durante 24 horas. La fuerza de gel se midió mediante el método Nikan Sui que está basado en medir la fuerza (g cm^{-2}) que causa un émbolo (1 cm^2 de sección) para romper un gel de agar a los 20 s (Armisen y Galatas, 1987). La temperatura de gelificación se obtuvo vertiendo 10 mL de la solución de agar en un tubo de ensayo conteniendo una perla de vidrio. El tubo fue girado lentamente en un baño maría a 50°C y la temperatura de gelificación fue registrada con un termómetro de precisión cuando la perla de vidrio cesó su movimiento. La temperatura de fusión se midió colocando una bola de hierro (9 mm de diámetro) en la superficie del gel en un tubo de ensayo el cual se introdujo en un baño maría, elevando su temperatura lentamente de 50 a 100°C. El punto de fusión fue registrado con un termómetro de precisión en el momento en el que la bola inicia su recorrido a través del gel.

The different dark and salinity treatments consisted of:

- (a) darkness and 33‰ salinity for 8 days, [dark treatment];
- (b) darkness and 50‰ salinity for 4 days, followed by darkness and 25‰ salinity for 4 days, [4+4]; and
- (c) darkness and 50‰ salinity for 8 days, followed by darkness and 25‰ salinity for 4 days, [8+4].

After the treatments mentioned above, algae were washed with tap water, dried, weighed and stored in the same way as control samples.

Agar extraction

For the agar extraction, 10 g of dry algae were used. The algae, previously hydrated overnight in distilled water, were submerged in 400 mL distilled water adjusting pH at 6.3–6.4 and boiling them at 100–105°C for 1.5 h. At the time of boiling, pH was adjusted again to 6.3–6.4 with a pH-meter provided with a temperature compensated pH electrode. The extract was mixed with 8 g of Celite and pressure filtered. The agar was allowed to gel during 24 h at room temperature then frozen during 2 days and thawed at room temperature. Finally the agar was dried for 24 hours at 60°C, cooled in a dessicator and weighed to determine the agar yield, which was expressed as percentage of algae dry weight. The extractions were made in three replicates per treatment.

Physical properties

The agar gel strength, and its melting and gelling temperatures were measured by triplicate in an agar solution (1.5% w/v). To avoid evaporation, the gel was covered with a thin water layer and allowed to cool down at room temperature. The gel strength and melting temperature were measured after the gel had stabilised at room temperature for 24 hours. The gel strength was measured by the Nikan Sui method, that is based in the force (g cm^{-2}) driven by a round plunger (1-cm² cross-section) to break a standard gel in 20 s (Armisen and Galatas, 1987). The gelling temperature was measured by pouring 10 mL of agar solution into a test tube with a glass bead. The tube was tilted in a water bath at 50°C and the temperature of the solution was recorded with a precision thermometer when the glass bead ceased from moving. The melting temperature of the gel was measured by placing an iron bead (9 mm in diameter) on the surface of the gel in a test tube. The tube was clamped in a water bath with temperature slowly raising from 50 to 100°C. The melting temperature was measured with a precision thermometer at the moment that the bead sank into the solution.

Chemical properties

The agar sulphate content was analysed using the spectrophotometric method described by Jackson and McCandless (1978), using K_2SO_4 as standard. Agar samples (50 mg) were oven dried at 105°C and hydrolysed in 2 mL 1M HCl for 6 h in

Propiedades químicas

El contenido de sulfato en el agar fue medido usando el método espectrofotométrico descrito por Jackson y McCandless (1978), usando K_2SO_4 como estándar. Las muestras de agar (50 mg) fueron secadas en un horno a $105^\circ C$ e hidrolizadas en 2 mL de una solución 1 M de HCl durante 6 h en un baño de arena a $110^\circ C$. El hidrolizado se centrifugó y fue cuantitativamente transferido y diluido veinte veces, y 2.2 mL de éste fueron mezclados con 2.4 mL de ácido tricloro-acético al 8 % y 1.2 mL de solución de agarosa al 0.01% con 0.5 g de cloruro de bario. Un agar comercial de Hispanagar (ref. A-127/94) con un contenido conocido de sulfato fue usado como control. La absorbancia fue leída a 500 nm y el contenido de sulfato se expresó como porcentaje del agar en peso seco.

El contenido de 3,6-AG fue determinado siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Yaphe y Arsenault (1965), usando D-fructosa como estándar. Se disolvieron muestras de agar de 10 mg en 25 mL de agua destilada durante 3 h en un baño de agua a $80^\circ C$. La solución fue diluida 16 veces y 2 mL de ésta fueron mezcladas cuidadosamente con 10 mL del reactivo acetal-resorcinol. Después de calentar, la absorbancia fue leída a 550 nm y el contenido de 3,6-AG fue expresado como porcentaje del agar en peso seco. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los controles y los tratamientos experimentales fueron analizadas con un ANOVA de una vía y una prueba *t*. Para determinar la correlación entre las propiedades del agar se utilizó el test de correlación de Pearson.

Resultados

En general, los tratamientos de oscuridad y salinidad incrementaron el rendimiento de agar de *G. cornea* (fig. 2a). El aumento fue significativo ($P < 0.01$) para las algas sometidas al tratamiento [4+4], incrementando su rendimiento de 36.6 % a 46.1%, lo que representa un incremento en el rendimiento de agar del 26 %.

Ninguno de los tratamientos cambió significativamente el contenido de 3,6 A-G (fig. 2b). Sin embargo, todos los tratamientos disminuyeron hasta un 24% el contenido de sulfatos en comparación con el control ($P < 0.001$, fig. 2c) obteniéndose niveles de sulfato de aproximadamente 3.2%.

El tratamiento [4+4] no afectó significativamente la fuerza de gel, sin embargo, los tratamientos [8+4] y [oscuridad] redujeron ésta desde 251 a 125 $g\ cm^{-2}$ y a 188 $g\ cm^{-2}$, respectivamente (tabla 1). Los tratamientos experimentales no afectaron significativamente ni las temperaturas de gelificación ni las de fusión de los agares extraídos. Solamente hubo una variación considerable en la temperatura de fusión para la muestra [8+4] y los tratamientos de [oscuridad] y [4+4] causaron una ligera disminución en la temperatura de gelificación desde 41.8 a 39.1 $^\circ C$ y 39.5 $^\circ C$, respectivamente (tabla 1).

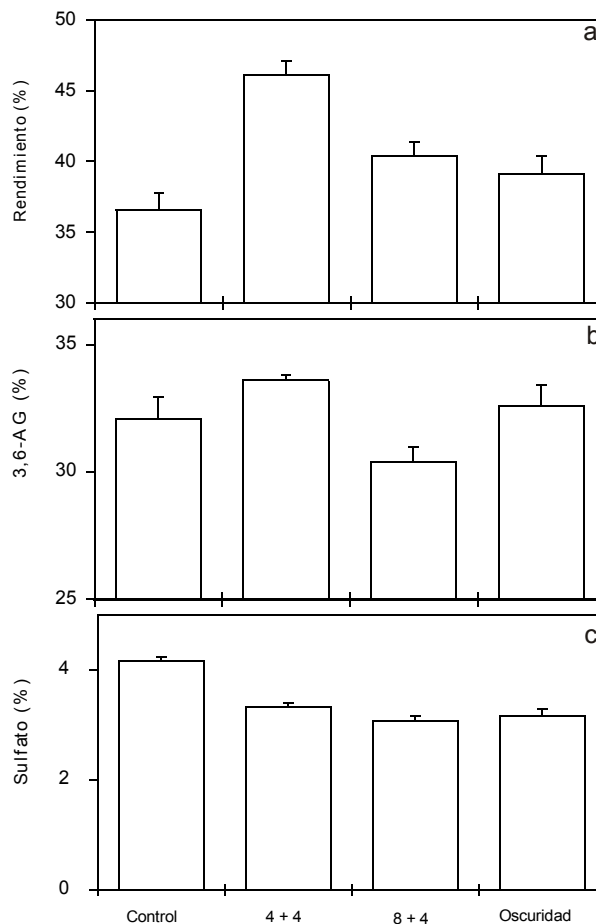


Figura 2. Rendimiento y propiedades químicas del agar de *Gracilaria cornea* después de los tratamientos experimentales: (a) Rendimiento de agar; (b) contenido de 3,6-AG; y (c) contenido en sulfatos. Se indica desviación estándar.

Figure 2. Yield and chemical properties of *Gracilaria cornea* agar after the experimental treatments. (a) Agar yield; (b) 3,6-AG content; and (c) sulfate content. Standard deviation indicated.

a sand bath at $110^\circ C$. The hydrolyte was centrifuged and quantitatively transferred and diluted twenty times, 2.2 mL of this were mixed with 2.4 mL 8% trichloric acid and 1.2 mL 0.01% agarose solution with 0.5 g of barium chloride. A commercial agar from Hispanagar (ref. A-127/94) with known sulphate content was used as control. Absorbance was read at 500 nm and sulphate content expressed as percentage of agar dry weight.

The 3,6-AG content was determined following the spectrophotometric method described by Yaphe and Arsenault (1965), using D-fructose as standard. Agar samples (10 mg) were dissolved in 25 mL distilled water for 3 h in a water bath at $80^\circ C$. The solution was diluted 16 times and 2 mL of this were mixed thoroughly with 10 mL resorcinol-acetal reagent. After heating, the absorbance was read at 550 nm and the 3,6-AG content was expressed as percentage of agar dry weight. All analyses were done in three replicates per treatment.

Tabla 1. Fuerza de gel y temperaturas de gelificación y fusión del agar de *Gracilaria cornea* después de los tratamientos experimentales.**Table 1.** Gel strength and gelling and melting temperatures of *Gracilaria cornea* after experimental treatments.

Tratamientos experimentales	Fuerza de gel (g cm ⁻²)	Temperatura de gelificación (°C)	Temperatura de fusión (°C)
[Control]	251 ± 29	41.8 ± 1.2	82.6 ± 1.4
[4 + 4]	225 ± 38	39.5 ± 0.6	80.3 ± 5.5
[8 + 4]	125 ± 44	40.2 ± 1.5	74.3 ± 5.3
[Oscuridad]	188 ± 7	39.2 ± 0.7	82.2 ± 1.6

Discusión

Los rendimientos de agar obtenidos para las algas no tratadas de *G. cornea* fueron altos cuando se comparan con otras especies tropicales de *Gracilaria* (Cote y Hanisak, 1986; Aponte-Díaz y Lemus, 1989; López-Bautista y Kapraun, 1995). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento [4+4] permite obtener rendimientos incluso más elevados (46.1 %) que los obtenidos en los anteriores estudios. Este incremento en el rendimiento, después del tratamiento con oscuridad y salinidad en *G. cornea*, puede ser debido a una redistribución de las reservas metabólicas de carbono hacia la formación de agar, como se ha encontrado en otras especies de *Gracilaria* (Ekman y Pedersén, 1990; Ekman *et al.*, 1991). El incremento en el rendimiento no fue tan evidente para las algas del tratamiento en [oscuridad], indicando que la síntesis del nuevo agar se estimula principalmente por el tratamiento salino. Más aún, el rendimiento de agar disminuye durante la exposición a salinidades elevadas ([8+4]), probablemente debido a la pérdida de carbono a través de la respiración o por degradación. Los diferentes tratamientos redujeron satisfactoriamente el contenido de sulfatos en el agar indicando que este proceso, tal como se esperaba, fue afectado principalmente por la ausencia de luz. Este descenso observado está de acuerdo con otros resultados previos encontrados por Rincones *et al.* (1993) en *Gracilariopsis lemaneiformis*, y por Hemmingson y Furneaux (2000) en *Gracilaria chilensis*. Hemmingson y Furneaux (2000) sugieren que mediante la inhibición de la fotosíntesis el balance es dirigido hacia la formación de 3,6-AG a partir L-galactosa-6-sulfato debido a la activación de las enzimas sulfhidrolasas.

La reducción del sulfato no tuvo un efecto directo en la fuerza de gel. Sin embargo, está descrito que un descenso en el sulfato lábil o inestable acompañado por un incremento en el contenido de 3,6-AG incrementa la fuerza de gel sólo si la reacción es llevada a cabo bajo aquellas condiciones en las que no se produzca una reducción severa del peso molecular del agar (Armisen y Galatas, 1987). La correlación encontrada entre la fuerza de gel y la temperatura de fusión ($r = 0.84$, $P < 0.05$) para el agar nativo de *G. cornea* ha sido encontrada también para los agares tratados de esta misma especie (Freile-Peigrín y Robledo, 1997b). Por otro lado, la temperatura de fusión al igual que la fuerza de gel están relacionados

Statistical analysis

Differences between non-treated algae and the dark and salinity treatments were tested using a one way ANOVA and a *t*-test. A Pearson's correlation test was used to determine the correlation between agar properties.

Results

In general, dark and salinity treatments increased the agar yield of *G. cornea* (fig. 2a). The increase was significant ($P < 0.01$) for algae under the [4+4] treatment with an increase from 36.6% obtained in the control to 46.1%, representing a 26 % increase in the agar yield.

None of the treatments led to a significant change in the 3,6-AG content (fig. 2b); however, all treatments reduced sulphate content in approximately 24% when compared to untreated algae ($P < 0.001$, fig. 2c), resulting in sulphate contents of 3.2%.

The [4+4] treatment did not affect significantly the gel strength, although both, the [8+4] and the [darkness] treatments reduced gel strength from 251 to 125 g cm⁻² and 188 g cm⁻², respectively. The treatments did not significantly affect the gelling and melting temperatures of the extracted agars. Only the dark and the [4+4] treatments caused a small decrease in the agar gelling temperature from 41.8 to 39.1°C and to 39.5°C, respectively.

Discussion

The agar yields for non-treated *G. cornea* were high when compared to other tropical species of *Gracilaria* (Cote and Hanisak, 1986; Aponte-Díaz and Lemus, 1989; López-Bautista and Kapraun, 1995). According to the results obtained in the present study, the [4+4] treatment led to higher yields (46.1%) than those reported in the studies mentioned above. The increase in the agar yield after the dark and salinity treatment of *G. cornea* could be due to a redistribution of the metabolic carbon towards the agar synthesis as found in other *Gracilaria* sp. (Ekman and Pedersén, 1990; Ekman *et al.*, 1991). The increase in yield was not evident for algae subjected to the dark treatment, indicating that the synthesis of new agar was primarily stimulated by the salinity shock. Furthermore, agar

directamente con el peso molecular del agar (Murano, 1995). En este sentido, la disminución que se observa en ambos parámetros para el tratamiento de [8+4] puede indicar un acortamiento no deseado del polímero.

Los tratamientos probados en este estudio incrementaron el rendimiento y disminuyeron el contenido de sulfatos del agar nativo de *G. cornea*, aunque no aumentaron significativamente la fuerza de gel. Sin embargo, para que estos tratamientos puedan ser tomados como un método alternativo al tratamiento alcalino se requieren más estudios, a fin de probar y optimizar los diferentes tratamientos en cultivo. Hasta ahora, los tratamientos presentados aquí podrían ser usados como métodos aditivos a tratamientos alcalino ligeros, que podrían proveer agares con propiedades similares a los obtenidos con concentraciones más elevadas de álcali.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto J2839-B de CONACYT y por el programa Marine Macroalgae STINT Fellowship que hizo posible la colaboración entre México y Suecia. Los autores agradecen de igual forma la ayuda prestada en el laboratorio por Cresencia Chávez y María Luisa Zaldivar.

Referencias

- Aponte-Díaz, M. and Lemus, A.L. (1989). Comparative study of the agar obtained from three species of *Gracilaria* feasible for culture in Venezuela. In: E.C. De Oliveira and N. Kautsky (eds.), Cultivation of Seaweeds in Latin America. USP/IFS, Brasil, pp. 117–119.
- Armisen, R. (1995). World-wide use and importance of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.*, 7: 231–243.
- Armisen, R. and Galatas, F. (1987). Production, properties and uses of agar. In: D.J. Mchugh (ed.), Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds, FAO Fish. Tech. Pap., 288: 1–57.
- Cote, G.L. and Hanisak, M.D. (1986). Production and properties of native agars from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. *Bot. Mar.*, 29: 359–366.
- Ekman, P., Yu, S. and Pedersén, M. (1991). Effect of altered salinity, darkness and algal nutrient status on florodósido and starch content, α -galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. *Br. Phycol. J.*, 26: 123–131.
- Ekman, P. and Pedersén, M. (1990). The influence of photon irradiance, day length, dark treatment, temperature, and growth rate on the agar composition of *Gracilaria sordida* and *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 33: 483–495.
- Freile-Peigrín, Y. and Robledo, D. (1997a). Effects of season on the agar content and chemical characteristics of *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. *Bot. Mar.*, 40: 285–290.
- Freile-Peigrín, Y. and Robledo, D. (1997b). Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. *J. Appl. Phycol.*, 9: 533–539.
- Hemmingson, J.A. and Furneaux, R.H. (2000). Manipulation of galactan biosynthesis in *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan *et* Oliveira by light deprivation. *Bot. Mar.*, 43: 285–289.
- yield diminished during the extended exposition to high salinity ([8+4]) probably due to a carbon loss through respiration or degradation. The different treatments reduced successfully the agar sulphate content, indicating that this process was affected primarily by the absence of light. The observed decrease agrees with previous results in *Gracilariopsis lemaneiformis* by Rincones *et al.*, (1993) and in *Gracilaria chilensis* by Hemmingson and Furneaux (2000). Hemmingson and Furneaux (2000) suggest that by inhibiting photosynthesis, the balance is shifted to the formation of 3,6-AG from L-galactose-6-sulfate due to the activation of sulfohydrolases.
- The sulphate reduction did not have any direct effect on the gel strength because a decrease in alkali-labile sulphate, along with an increase in the 3,6-AG content, increases the gel strength only if the reaction is carried out under those conditions where there is not any severe reduction of the agar molecule weight (Armisen and Galatas, 1987).
- There was a significant correlation ($r = 0.84$) between the gel strength and the melting temperature for agar from cultivated algae. This has also been documented for alkali-treated agars from *G. cornea* (Freile-Peigrín and Robledo, 1997b). On the other hand, the melting temperature as well as the gel strength are positively correlated with the molecular weight of the agar polymers (Murano, 1995). In this way, the decrease observed in both parameters for the [8+4] treatment may indicate an undesired shortening of the agar polymer.
- All treatments tested in this study increased the agar yield and decreased the sulphate content in the native agar from *Gracilaria cornea* although no significant increase in the gel strength was observed. In order to use these treatments as an alternative to the alkali treatment, more studies are needed to evaluate and optimize them in culture. At present, these treatments might be used as an additive method to a milder alkali treatment that could provide agars with similar properties to those obtained with higher alkali concentrations.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT (Project J2839-B). The Marine Macroalgae STINT Fellowship program is also acknowledged for supporting the Sweden-Mexico cooperation. We also express our gratitude to M. L. Zaldivar and C. Chávez for their technical support in this work.

English translation by the authors.

- Jackson, S.G. and McCandless, E.L. (1978). Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulphate and/or protein. *Ann. Biochem.*, 90: 802–808.
- Lahaye, M. and Rochas, C. (1991). Chemical structures and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia*, 221: 137–148.
- Lignell, Å. and Pedersén, M. (1989). Agar composition as function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa*. *Bot. Mar.*, 32: 219–227.

- Lopez-Bautista, J. and Kapraun, D.F. (1995). Agar analysis, nuclear genome quantification and characterization of four agarophytes (*Gracilaria*) from the Mexican Gulf Coast. *J. Appl. Phycol.*, 7: 351–357.
- Macler, B.A. (1986). Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the red algae, *Geldium coulteri*. *Pl. Physiol.*, 82: 136–141.
- Murano, E. (1995). Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.*, 7: 245–254.
- Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. Cultures and collections of algae. *Jpn. Soc. Plant Physiol.*, 63–75.
- Rincones, R.E., Yu, S. and Pedersén, M. (1993). Effect of dark treatment on the starch degradation and the agar quality of cultivated *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta, Gracilariales) from Venezuela. *Hydrobiologia*, 260/261: 633–640.
- Yaphe, W. and Duckworth, M. (1972). The relationship between structures and biological properties of agar. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 7: 15–22.
- Yaphe, W. and Arsenault, G.P. (1965). Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Analyt. Biochem.*, 13: 143–148.
- Yu, S. and Pedersén, M. (1990a). The α -galactosidase of *Gracilaria tenuistipitata* and *G. sordida* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycologia*, 29: 454–460.
- Yu, S., and Pedersén, M. (1990b). The effect of salinity changes on the activity of α -galactosidase of the red algae *Gracilaria tenuistipitata* and *G. sordida*. *Bot. Mar.*, 33: 385–391.
- Yu, S., and Pedersén, M. (1991). Purification and properties of α -1,4-glucan-phosphorylase from the red seaweed *Gracilaria sordida* (Gracilariales). *Plant Physiol.*, 81: 149–155.