مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (5) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (5) 2010

مساهمة في دراسة استخلاص الاغار من الطحلب البحري السوري بتيروكلاديا كابيلاسيا (*Pterocladia capillacea*)

الدكتور آصف عباس*

(تاريخ الإيداع 20 / 10 / 2010. قبل للنشر في 28 / 12 / 2010)

□ ملخّص □

تمّ دراسة تأثير عامل الحرارة (100 و 121 °م) والزمن (1،2،3،4،5 سا) في أثناء استخلاص الاغار من الطحلب الأحمر *Pterocladia capillacea* على مردود وبعض الخصائص الفيزيائية والكيميائية للاغار المنتج. بلغ أعلى مردود من الاغار 36% عندما كانت الحرارة 100°م و الزمن 4 سا ويتميز الاغار المنتج بدرجة تجمد 31 °م و درجة ذوبان 84°م وقوة تهلم 431 غ/سم2. أما قيمة مردود الاغار بعد المعالجة القلوية فكانت 18% بدرجة حرارة 100 و زمن 2سا، بينما كانت قوة التهلم 1072 غ/سم2 وهي أعلى من الاغار الطبيعي.

اعتماداً على هذه النتائج، يمكن أن يشكل الطحلب *Pterocladia capillacea* مصدراً هاما لإنتاج الاغار التجاري مستقبلا.

الكلمات المفتاحية: الطحلب الأحمر بتيروكلاديا كابيلاسيا، استخلاص الاغار، بعض الخصائص الفيزيائية والكيميائية للاغار المنتج.

* مدرس – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (5) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (5) 2010

A Contribution to the Study of Agar Extraction from the Syrian Marine Alga *Pterocladia capillacea*

Dr. Assef Abbas*

(Received 20 / 10 / 2010. Accepted 28 / 12 /2010)

□ ABSTRACT □

The effects of temperatures (100 C° and 121C°) and extraction time (1, 2, 3, 4,5h) of agar from the *Pterocladia capillacea* have been studied on the yield and some physicochemical properties of extracted agar.The maximum agar yield (36%) has been obtained with time 4h and temperature 100C° which is characterized by a gelling temperature of 31C° and a melting temperature of 84C° with gel strength 431 g/cm². After alkali treatment, the yield (18%) obtained with time 2h and temperature 100C° was lower in comparison to non-alkali treated agar, while gel strength agar (1072 g/cm²) was significantly higher of gel strength agar native. Based on the results of this study, this alga is a potentially good source for the production of commercial agar in the future.

Keywords: *Pterocladia capillacea*, Extraction of Agar, Some Physical and Chemical Characterization of Agar.

*Assistant Prof., Department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria

مقدمة:

يعدّ الاغار مادة هلامية تستخلص من بعض الطحالب الحمراء (Rhodophyta) التي تنتمي إلى رتبة Gelidiales (*Gelidium, Gelidiella, Pterocladia*) و رتبة Gracilariales (*Gracilaria*) (Glicksman, 1983; Armisen and Galactas, 1987; Stanly, 1995). يتألف الاغار (سكريات متعددة كبريتية) من سلاسل طويلة من الاغاروز (Agarose) و الاغاروبكتين (Agaropectine) (Araki, 1966; Duckworth and Yaphe, 1971; Yaphe, 1984).

يتألف الاغاروز من وحدات متعاقبة من د _ غالاكتوز (D_Galactose) و 6,3 انهيدرو غالاكتوز 3,6) (anhydro-L-galactose) المسؤول عن تهلم وزيادة القوة الهلامية للاغار (Gel strength) (Armisen, 1995) أما سلاسل الاغاروبكتين فتتكون من وحدات من D – galactose والتي تحتوي على بقايا من الكبريتات والبيروفات والميتوكسيل (. Lahaye and Yaphe, 1988)تؤثر نسب هذه البقايا في الخصائص الفيزيائية للاغار) (Yaphe, Murano, 1995; Roleda *et al.*, 1997) وتختلف كميتها بحسب نوع الطحلب وطريقة الاستخلاص (1984وفصل النمو (Lahaye and Yaphe, 1988) والشروط البيئية (Craigie and Wen, 1984).

تعدّ بعض أنواع طحلب الكرا سيلاريا *Gracilaria* من المصادر الرئيسية لإنتاج الاغار التجاري (شيلي، اليابان، الصين، الهند.....) حيث تقدر بحوالي 53% بينما تساهم أنواع الجيليديوم *Gelidium* والجيليديلا *Gelidiella* والبتيرو كلاديا *Pterocladia* بنحو 47 % من الانتاج العالمي (اسبانيا، المغرب، شيلي، نيوزيلندا، البرازيل.....) (Glicksman, 1983).

يعتمد استعمال الاغار في المجالات التطبيقية (الصناعات الغذائية، صيدلانية، طبية، مستحضرات التجميل تقانات حيوية، مخابر الميكروبيولوجيا) على درجة ذوبان Melting Temperature وتجمد الاغار Gelling Temperature وقوة تهلمه (Gel Strength) (Armisen and Galatas, 2000) وهنا تبرز أهمية البتيروكلاديا كمنتج للأغار ذي النوعية الممتازه.

أهمية البحث وأهدافه:

1. استخلاص الاغار الطبيعي والقلوي من الطحلب الأحمر بتيروكلاديا *Pterocladia capillacea*
2. دراسة تأثير المعالجة القلوية وعامل الحرارة وزمن الاستخلاص في مردود الاغار وبعض خصائصه الفيزيائية والكيميائية
3. مقارنة بين خصائص الاغار الطبيعي والاغار القلوي مثل قوة التهلم ودرجة التجمد والذوبان وغيرها.... .
4. تكمن أهمية هذا البحث في التعرف على بعض خصائص الاغار المنتج من الطحلب السوري *Pterocladia capillacea* لتحديد جودته التجارية ومجالات استعماله وإمكانية استثماره صناعياً في المستقبل.

طرائق البحث ومواده:

طحلب البتيروكلاديا كابيلاسيا *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Bornet & Thur

المشرة قائمة تتثبت بوساطة جزء قرصي قاعدي على الصخور الشاطئية ويصل ارتفاعها إلى 20 سم، تتألف من عدة محاور مسطحة ، تحمل تفرعات جانبية غزيرة في الجزء العلوي من المشرة (شكل 1). يعدّ هذا النوع من أكثر

الطحالب السورية الذي يحتوي على الاغار حيث ينمو على الصخور الشاطئية المضروبة بالأمواج قرب سطح الماء خاصة في المناطق المعرضة للتلوث بمياه الصرف الصحي(ميهوب، 1976، 1991 . ميهوب وعباس، 1992، عباس، 1992). أنجز هذا البحث في مخابر قسم علم النبات بكلية العلوم بجامعة تشرين خلال المدة من 2008 إلى 2009.

شكل –1– يبين الشكل العام لطحلب بتيروكلاديا كابيلاسيا *Pterocladia capillacea*

جمع العينات

تمّ جمع عينات طحلب البتيروكلاديا من شاطئ كورنيش جبلة خلال أشهر آذار ونيسان لعام 2009، نقلت الطحالب مباشرة إلى المختبر ضمن عبوات بلاستيكية، غسلت بالماء العذب جيداً لإزالة الشوائب والمواد العالقة عليها، ومن ثم جففت في الهواء الطلق ثم في المحم بدرجة (60°م) حتى ثبات الوزن .(Marinho-Soriano *et al*., 2001)

استخلاص الاغار

تؤثر طريقة الاستخلاص في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للاغار لذلك فهي نوعية لكل طحلب حتى ضمن الجنس الواحد كأنواع الكرا سيلاريا (Villanueva *et al*., 1999 ; Romero *et al*., 2008; Kumar and Fotedar, 2009).

أظهرت الدراسات المرجعية أهم العوامل المحددة لمردود وجودة أغار بعض أنواع الطحالب الهامة اقتصادياً كالحرارة وزمن الاستخلاص والمعالجة القلوية. يتراوح زمن الاستخلاص من 4.1 ساعات و الحرارة من 80– 121 ° م (Roleda *et al*., 1997; Chirapart *et al*., 2006; Pereira-Pacheco *et al*., 2007)، أما فيما يخص المعالجة القلوية فهي تحدد بتركيز هيدروكسيد الصوديوم وزمن المعالجة وحرارتها (Freile Pelegrin and Robledo ., 1997 ; Praiboon *et al*., 2006).

تمّ في هذا البحث دراسة تأثير عامل زمن (5.1 ساعات) و حرارة الاستخلاص (100 و 121° م) والمعالجة الطبيعية والقلوية كما يأتي:

الاستخلاص الطبيعي (أغار طبيعي)

تمّ وضع 35 غ من الطحلب الجاف *Pterocladia capillacea* في بيشر يحوي 1750 مل من الماء المقطر ثم تم اجراء 5 تجارب (كررت كل تجربة 3 مرات) بدرجة حرارة ثابتة (100° م) و بزمن مختلف (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ساعات) و تجربة سادسة بدرجة حرارة 121° م (اوتوغلاف) ولمدة 2 ساعة. رشحت الخلاصة باستخدام قطعة قماشية ذات ثقوب قطرها 10 ميكرون، يترك المحلول حتى يتجمد وبعدها يوضع في درجة حرارة -10° م. في اليوم التالي، توضع خلاصة الاغار المجمدة في درجة حرارة الغرفة ليذوب الماء منها والحاوي على بعض الشوائب غير المرغوب بها مثل الأصبغة والسيللوز والبروتينات، ثم تعاد الخلاصة إلى الدرجة -10° م، وهكذا تتكرر هذه العملية من 4 إلى 5 مرات للتخلص من الماء والحصول على الاغار الطبيعي بشكل بودرة وتسمى طريقة التنقية هذه بالتجميد والتذويب (Freezing-Thawing Method)(Armisen and Galatas, 2000) .

الاستخلاص القلوي (أغار قلوي)

تمّ أخذ 35 غ من الطحلب الجاف *Pterocladia capillacea* ثم وضعت في بيشر يحوي 1750 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (تركيز 5 % NaOH). تمت المعالجة القلوية بدرجة حرارة 100° م ولمدة ساعة واحده. غسلت الطحالب المعالجة بالماء الجاري لمدة ساعة واحده ثم عدلت درجة الحموضة لتصبح بين 3 ,6 و6,8 باستخدام حمض الخل. تمّ إجراء عملية الاستخلاص بدرجة حرارة 100° م و121° م لمدة 2 ساعة. تهدف هذه الطريقة إلى التخلص من الكبريتات (تؤثر سلبا في جودة الاغار) المرتبطة مع سلاسل الاغاروبكتين لرفع قدرة الاغار على التهلم من خلال زيادة تحويل الغالاكتوز – 6 - كبريتات إلى 6،3 انهيدرو غالاكتوز (Freile-Pelegrin and Robledo, 1997).

قياس قوة الهلام Gel Strength

تمّ تحضير محلول من الاغار (1,5%) ثم صب في أطباق بتري وترك حتى يبرد، ثم حفظ الهلام المتشكل في الدرجة 10° م لمدة 15 ساعة (Chirapart and Ohno, 1993).

تم قياس قوة الهلام في الدرجة 20 باستخدام جهاز Penetrometer موديل G4 والذي يتألف من غاطس نازل مساحته السفلية التي توضع على سطح الهلام 1 سم^2، وعندما يخترق هذا الغاطس الاغار المجمد يسجل الجهاز قوة الهلام.

قياس درجة حرارة تجمد الاغار Gelling Temperature

تمّ تحضير محلول من الاغار (1,5%) ثم يؤخذ منه 10 مل ويوضع في أنبوب اختبار موجود في حمام مائي درجة حرارته 60 ° م ثم يبرد المحلول تدريجياً (بمعدل درجة مئوية واحدة لكل دقيقة). يوضع ميزان حرارة داخل الأنبوب وتسجل درجة حرارة التجمد عندما يبدو سطح الاغار نصف جامد (Freile-Pelegrin and Robledo, 1997; Praiboon *et a*l., 2006).

قياس درجة حرارة ذوبان الاغار Melting Temperature

تمّ تحضير محلول من الاغار (1,5%) ثم يؤخذ منه 5 مل، يوضع في أنبوب اختبار محكم الإغلاق ثم يترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة. يوضع الأنبوب الحاوي على الاغار الجامد وعلى سطحه كرة معدنية وزنها واحد غرام في حمام مائي ثم يسخن بحيث ترتفع درجة الحرارة درجة مئوية واحدة لكل دقيقة وعندما تسقط الكرة المعدنية إلى قاع الأنبوب نسجل درجة حرارة الذوبان (Armisen and Galatas., 1987; Freile-Pelegrin and Robledo., 1997).

قياس لزوجة الاغار

تمّ تحضير محلول من الاغار (1,5%) ثم يوضع في بيشر سعته 100 مل، تقاس اللزوجة (باستخدام جهاز قياس اللزوجة Nahita موديل 2/807) عندما تصبح درجة حرارة المحلول 80 ° م (Armisen and Galatas., 1987).

قياس نسبة الكبريتات في الاغار

يوضع 0,5غ من مسحوق الاغار في أنبوب اختبار ثم يضاف إليه 10 مل من حمض الأزوت الكثيف، يسخن بدرجة حرارة 123° م لمدة 30 دقيقة. يبرّد المحلول في درجة حرارة الغرفة ثم يضاف إليه من 2 – 3 قطرات من محلول فورم الدهيد وذلك للتخلص من كمية حمض الأزوت الزائدة. يرشح المحلول في ارلنماير سعته 250 مل ويضاف إليه 0,5 مل حمض كلور الماء المركز وماء مقطر ليصبح حجم المحلول 200 مل. يغلى المحلول مع إضافة كلور الباريوم 0,25M (10 مل) بشكل تدريجي ومع التحريك المستمر لمدة 5 دقائق ثم يحفظ المحلول لمدة 5 ساعات بدرجة حرارة الغرفة. يتشكل راسب من كبريتات الباريوم، يجمع باستخدام ورقة ترشيح عديمة الرماد، توضع هذه الورقة في مرمدة بدرجة حرارة 700 ° م ولمدة ساعة واحدة، تحسب النسبة المئوية للكبريتات بحسب الطريقة الآتية (AOAC, 1995; Freile-Pelegrin and Robledo, 1997).

$$\%SO_4 = \frac{41.16 \times wt.BaSO_4}{\text{Weight sample}} \times 100$$

النتائج والمناقشة:

مردود الاغار

أظهرت عدة دراسات سابقة بان مردود الاغار يتغير بحسب:

نوع الطحلب وحلقة حياته (Marinho-Soriano, 1999)

فصل النمو (Chirapart and Ohno, 1993; Freile-Pelegrıin and Robledo, 1997)

الشروط البيئية (Villanueva *et al*., 1999 ; Romero *et al*.,2008)

طريقة الاستخلاص (Kumar and Fotedar, 2009; Sousa *et al*., 2010).

الجدول –1– يبين طريقة الاستخلاص و الخصائص الفيزيائية للاغار المنتج

رقم التجربة	نوع الاستخلاص	الحرارة ° م	الزمن ساعة	المردود %	درجة الذوبان ° م	درجة التجمد ° م	اللزوجة سنتيبواز	قوة التهلم غ/سم^2
1	طبيعي	100	1	12	83	29	180	890
2	طبيعي	100	2	26	84	29	120	710
3	طبيعي	100	3	28	85	30	95	640
4	طبيعي	100	4	36	84	31	34	431
5	طبيعي	100	5	30	81	32	20	322
6	طبيعي	121	2	21	83	30	46	590
7	قلوي	100	2	18	88	35	33	1072
8	قلوي	121	2	16	89	34	27	870

يبين الجدول رقم 1 أن مردود الاغار الطبيعي والقلوي يتراوح بين 12 و 36 % بالنسبة للوزن الجاف بينما بلغ مردود الاغار للطحلب نفسه في فنزويلا 17-35% (Lemus *et al*., 1991) والبرازيل 5 -33% (Geyer *et*

(Rao and Bekheet, 1976) وفي مصر 14-26% (*al*., 1990; Oliveira *et al*., 1996) ويصل إلى 44% في هاواي (Santos and Doty, 1983). يعود تفاوت المردود في هذا البحث إلى اختلاف زمن الاستخلاص وحرارته وطريقته (طبيعي و قلوي). تم الحصول على أفضل مردود (36%) في زمن 4 ساعات ودرجة حرارة 100 وأقل مردود 12% في زمن 1 ساعة. تؤدي المعالجة القلوية وزيادة حرارة الاستخلاص من الدرجة 100 الى121° م إلى انخفاض المردود من 26 إلى 16% وقد يعزى السبب إلى تحطم سلاسل جزيء الاغار وخروجها مع الماء لعدم قدرتها على التجمد في أثناء تنقية الاغار بطريقة التجميد والتذويب (Kumar and Fotedar, 2009).

درجة حرارة تجمد وذوبان الاغار

تبدي الطريقة القلوية تأثيراً طفيفاً على درجات حرارة تجمد الاغار وذوبانه (جدول رقم 1) في حين لا تتأثر باختلاف زمن (1-5 ساعات) وحرارة (100 و 121° م) استخلاص الاغار. وقد يعزى هذا التأثير إلى انخفاض الوزن الجزيئي للاغار أو إلى وجود مجموعات من الميتوكسيل في الاغارو بكتين .(Guiseley, 1970)

كلما ارتفعت نسبة الميتوكسيل في الاغار زادت درجة التجمد وهذا ما يلحظ في اغار بعض أنواع الكراسيلاريا (Gracilaria) حيث درجة تجمده بين 42 و 45° م الذي يفسر استخدامه في الصناعات الغذائية فقط. يظهر الجدول 1 درجات تجمد الاغار والتي تتراوح من 29 إلى 35 ° م بينما درجات الذوبان من 84 إلى 89 ° م وهي مناسبة جداً لاستخدام الاغار في الصناعات الغذائية والصيدلانية وكأوساط جامدة لزراعة الجراثيم (Armesin, 1995; Kumar and Fotedar, 2009). ومطابقة لمواصفات الاغار التجاري (درجات الذوبان 5± 85 و التجمد3 ±34). .

لزوجة الاغار

يتضح من النتائج في الجدول رقم 1 تأثير حرارة الاستخلاص وزمنه والمعالجة القلوية على لزوجة الاغار الطبيعي والقلوي. كلما زاد زمن استخلاص الاغار الطبيعي (1-5 ساعات) انخفضت اللزوجة من 180 إلى 20 سنتيبواز ومن 120 إلى 46 سنتيبواز عندما ارتفعت درجة الحرارة من 100 إلى 121 ° م. تبدي لزوجة الاغار القلوي انخفاضاً واضحاً وقد يعلل السبب إلى تحطم سلاسل الاغار بسبب تأثير تركيز هيدروكسيد الصوديوم 5% والحرارة المرتفعة (121° م).

قوة الهلام و نسبة الكبريتات

أثبتت عدة دراسات سابقة فعالية المعالجة القلوية في رفع وتحسين القدرة الهلامية للاغار المستخلص من بعض أنواع الطحالب الحمراء وخاصة أنواع اللكلاسيلاريا .(Chirapat and Ohno, 1993; Roleda *et al*., 1997)

تعلل زيادة القوة الهلامية للاغار نتيجة تحول غالاكتوز – 6 - كبريتات إلى 3-6 انهيدروغالاكتوز (بفضل استخدام هيدروكسيد الصوديوم) والذي يرفع من قوة الهلام، ويؤدي هذا التحول إلى تناقص كمية الكبريتات وزيادة 3-6 انهيدروغالاكتوز.

تتناقص قوة هلام الاغار الطبيعي (جدول 1) من 890 إلى 322 غ/ سم^2 مع زيادة زمن الاستخلاص وتصل إلى 1072 غ/ سم^2 بالنسبة للاغار القلوي والتي هي اقل من قوة الهلام المسجلة (1350 غ/ سم^2) للنوع نفسه في مصر وهاواي (1174 غ/ سم^2) (Roa and Bekheet, 1976; Santos and Doty,1983). يرجع سبب هذا الاختلاف إلى طريقة الاستخلاص وتركيز هيدروكسيد الصوديوم وإلى مكان الحصاد وموسمه (Hoyle., 1978).

تبين نتائج قياس نسبة الكبريتات في الاغار المنتج أنها تتراوح بين 2.5 (أغار قلوي) و 3.7% (أغار طبيعي) بينما في الاغار المنتج للنوع نفسه في مصر فهي بين 1.3 و 2.7% وفي هاواي 3.06 و 3.18% وتصل إلى

5.2% في البرازيل (Rao and Bekheet, 1976; Santos and Doty, 1983 Oliveria *et al*., 1996). يرجع السبب الرئيسي لاختلاف نسبة الكبريتات إلى استخدام هيدروكسيد الصوديوم بتراكيز وزمن ودرجات حرارة مختلفة في أثناء المعالجة القلوية فضلا عن تأثير اختلاف الموقع الجغرافي والشروط البيئية.

الاستنتاجات والتوصيات:

أظهرت طرائق استخلاص الاغار المستخدمة في هذا البحث إمكانية الحصول على مردود من الاغار (36%) بمواصفات فيزيائية (درجة ذوبان، درجة تجمد، قوة التهلم) تسمح له أن يكون بجودة الاغار التجاري. تبدي المواصفات الفيزيائية للاغار المنتج أهمية كبيرة نظراً لإمكانية استخدامه في مجالات تطبيقية أوسع. انطلاقاً من هذه النتائج لا بدّ من القيام بدراسة كافة الشروط المؤثرة في طرائق الاستخلاص وتحديداً تأثير تركيز القلوي وزمنه وحرارته ثم تأثير التغيرات الفصلية بهدف الوصول إلى أعلى مردود يتمتع بأفضل المواصفات التجارية العالمية.

المراجع:

1- ميهوب، حامد. *الطحالب البحرية ذات الأهمية الاقتصادية والطبية في سورية؛2-الطحالب الحمراء*، مجلة جامعة تشرين،المجلد13، 1991 العدد3 ،80-102.

2- ميهوب، حامد وعباس. آصف. *الطحالب ذات الأهمية الاقتصادية والطبية في سورية. 2-الطحالب السمراء والخضراء*. مجلة جامعة دمشق. 8، 1992، 51-72.

3- عباس، آصف. *مساهمة في دراسة النباتات البحرية القاعية على شاطئ اللاذقية*. اطروحة ماجستير، 1992، كلية العلوم، جامعة تشرين.

4- AOAC. *Official methods for analysis.* Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

5- ARAKI, C. *Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes.* Proc. Int. Seaweed Symp, 5, 1966, 3–19.

6- ARMISEN, R. and F. GALATAS. *Production and properties and uses of agar*. *In*: (D. S. McHugh, ed.) *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds* FAO, 1987, pp. 1-57.

7- ARMISEN, R. *World-wide use and importance of Gracilaria*. J. Appl. Phycol, 7, 1995, 231–243.

8- ARMISEN, R. and GALATAS, F. *Agar*. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.),Handbook of hydrocolloids, Cambridge. England. CRC Press, 2000, pp. 21–40.

9- CHIRAPART, A. and OHNO, M. *Seasonal variation in the physical properties of agar and biomass of Gracilaria sp. (chorda type) from Tosa Bay, southern Japan*. Hydrobiologia, 260/261**,** 1993**,** 541–547.

10- CHIRAPART, A. ; MUNKIT, J. ; LEWMANOMONT, K. *Changes in Yield and Quality of Agar from the Agarophytes, Gracilaria fisheri and G. tenuistipitata var. liui Cultivated in Earthen Ponds*. Kasetsart J. (Nat. Sci.), 40 : 2006, 529 – 540.

11- CRAIGIE, J. S. and. WEN, Z. C. *Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from Gracilaria tikvahiae (Rhodophyceae).* Can. J. Bot, 62,1984, 1665-1670.

12- DUCKWORTH, M. ; Yaphe, W. Properties of agar. Carbohydr. Res. 16, 1971, 189–191

13- FREILE-PELEGRIN, Y. ; ROBLEDO, D. *Influence of alkali treatment on agar from Gracilaria cornea from Yucat_an, Mexico*. J. Appl. Phycol, 9, 1997, 533–539.
14- FREILE-PELEGRIN, Y. ; D. ROBLEDO. *Effects of season on the agar content and chemical characteristics of Gracilaria cornea from Yucata´n, Me´xico.* Bot. Mar, 40, 1997, 285–290.
15- GEYER, A. L. M.; MOREIRQ, J . C.; FAIGLE, J. F.; BRUNS, R. E.; CURTIUS, A. J. *Local and temporal variations in essential elements and agar of the marine algae Pterocladia capillacea*. Hydrobiologia, 194, 1990,143 -148.
16- GLICKSMAN, M. *Food Hydrocolloids.* ed. Martin Glicksman, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, vol, 2, 1983, pp. 74–83.
17- GUISELEY, K.B. *The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose*. Carbohydr. Res, 13, 1970, 247–256.
18- HOYLE, M.D. *Agar studies in two Gracilaria species (G. bursapastoris (Gmelin) Silva and G. coronopifolia J. Ag.) from Hawaii.* II. *Seasonal aspects*. Bot. Mar, 21,1978, 347–352.
19- KUMAR, V . ; FOTEDAR, R. *Agar extraction process for Gracilaria cliftonii (Withell, Millar, & Kraft, 1994*). Carbohydrate Polymers, 78, 2009, 813–819.
20- LAHYE, M. ; YAPHE, W. *Effects of seasons on the chemical structure and gel strength of Gracilaria pseudoverrucosa agar (Gracilariaceae, Rhodophyta).* Carbohydr. Polym, 8, 1988, 285–301.
21- LEMUS, A.; BIRD, K.; KAPRAUN, D.; KOEHN, F. *Agar yield, quality and standing crop biomass of Gelidium serrulatum, Gelidium floridanum and Pterocladia capillacea in Venezuela* . Food Hydrocolloids, 5, 1991, 469-480.
22- MARINHO-SORIANO, E. *Biomass and agar yield of Gracilaria bursapastoris in Mediterranean lagoon. Seaweed Res.Util*, 21, 1999, 1–8.
23- MARINHO-SORIANO, E . ; SILVA, T.S.F and MOREIRA, W.S.C.. *Seasonal variation in biomass and agar yield from Gracilaria the cervicornis and Hydropuntia cornea from Brazil*. Bioresource Technology, 77, 2001,115-120.
24- -MAYHOOB, H. Recherches sur la ve'ge'tation marine de la cote syrienne.Etude experimental sur la morphpge'nse et le development de quelques especes peu connues .these Doctorat d' Etat. Caen. France. 1976, 286p.
25- MURANO, E. *Chemical structure and quality of agars from Gracilaria.* J. Appl. Phycol, 7, 1995, 245–254.
26- OLIVEIRA, E . C; SAITO, R.M; SANTO NETO, J.F; GAROFALO, M.C. *Temporal and spatial variation in agar from a population of Pterocladia capillacea (Gelidiales, Rhodophyta) from* Brazil. Hydrobiologia, 326/327, 1996, 501-504.
27- PEREIRA-PACHECO,F.; ROBLEDO, D.;. RODRIGUEZ –CARAVAJAL, L .; FREILE-PELEGRIN. *Optimization of native agar extraction from Hydropuntia cornea from Yucatan, Mexico.* Bioresource Technology, 98, 2007, 1278–1284.
28- PRAIBOON, J.; CHTRAPART, .; AKAKABE, .; BHUMIBHAMOND, O.; and KAJIWARAC, T. *Physical and Chemical Characterization of Agar Polysaccharides Extracted from the Thai and Japanese Species of Gracilaria*. ScienceAsia 32 Supplement, 1, 2006, 11-17.
29- RAO, A.V. and BEKHEET, I.A. *Preparation of Agar-Agar from the Red Seaweed Pterocladia capillacea off the Coast of Alexandria, Egypt.* Applied and environmental microbiology. Oct, 1976, p. 479-482.

30- ROLEDA, M.Y.; MONTANO, N.E.; GAZON-FORTES, E.T.; VILLANUEVA, R.D. *Acetic acid pretreatment in agar extraction of philipine Gelidiella acerosa (Forskaal) Feldmann et Hamel (Rhodophyta, Gelidiales).* Bot. Mar, 40, 1997, 63–69.

31- ROMERO, J.B . ; VILLANUEVA, R.D. ; MONTAO, N.M. *Stability of agar in the seaweed Gracilaria eucheumatoides(Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage*. Bioresource Technology, 99, 2008, 8151–8155.

32- SANTOS, G. and DOTY, M.S. *Agar from some Hawiian red algae*. Aquatic Botanny, 16, 1983, 385 – 389.

33- S0USA, A.M.M. ; ALVES, V.D. ; MORAIS, S. ; DELERUE-MATOS, C.; GONCALVES, M.P. *Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured Gracilaria vermiculophylla: Evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology*. Bioresource Technology, 101, 2010, 3258–3267.

34- STANLEY, N. F. *Food Polysaccharides and their applications* ed. Alistair M. Stephen. Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 187–204.

35- VILLANUEVA, R. ; MONTANO, N. ; ROMERO, J.B. ; AlIGGANGA. ; ENRIQUEZ, B. *Seasonal variations in the yield, gelling properties, and chemical composition of agars from Gracilaria eucheumoides and Gelidiella acerosa (Rhodophyta) from the Philippines*. Bot. Mar, 42, 1999, 175–182.

36- YAPHE, W. *Properties of Gracilaria agars*. Hydrobiologia, 116/117, 1984, 171–186.