

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT AGAR CHẤT LƯỢNG CAO TỪ RONG CÂU
GRACILARIA HETEROCLADA BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION**

**Lê Đình Hùng, Ngô Quốc Bưu, Huỳnh Quang Năng, Bùi Minh Lý
Phân Viện Khoa Học Vật Liệu tại Nha Trang**

TÓM TẮT Rong Câu *Gracilaria heteroclada* đang được nuôi trồng khá phổ biến ở Việt Nam có khả năng cho agar đạt tiêu chuẩn chất lượng cao. Tuy nhiên, rong *Gracilaria spp.* của Việt Nam (bao gồm *Gracilaria heteroclada*) có chứa nhiều gốc sulfat và các ion hóa trị hai (có thể làm giảm chất lượng agar) hơn rong *Gracilaria spp.* ở các nước khác trên thế giới.

Quá trình tinh chế dịch chiết agar từ rong *Gracilaria heteroclada* bao gồm các bước: xử lý rong bằng kiềm; loại bỏ các cation hóa trị 2 (bằng nhựa trao đổi cation Na^+), loại bỏ các chất mang màu (bằng nhựa trao đổi anion Cl^-); chuyển gốc L-Galactosa - 6 - Sulfat thành dạng 3,6 anhydro - L - galactosa (bằng nhựa trao đổi anion OH^-).

Số liệu thực nghiệm cho thấy, bằng quá trình tinh chế bằng phương pháp trên có thể chế biến agar với độ bền gel (1.100 g/cm^2), độ trong của dung dịch agar (0,057), sulfat tổng số (0,87%), 3,6 anhydro galactosa (49,8%), agarose (79%), nitơ (0,03%), canxi (150 ppm), chất không tan (0,14%) và khả năng hòa tan đều tăng một cách đáng kể.

**THE STUDY ON PRODUCTION OF HIGH QUALITY AGAR FROM
GRACILARIA HETEROCLADA BY ION-EXCHANGE
CHROMATOGRAPHY METHOD**

**Le Dinh Hung, Ngo Quoc Bui, Huynh Quang Nang, Bui Minh Ly
Institute of Materials Science, Nha Trang Branch**

ABSTRACT *Gracilaria heteroclada*, which has been cultured widely in Vietnam, has a potential of high quality agar production. However, the genus *Gracilaria* in Vietnam (included *Gracilaria heteroclada*) was found to be rich in sulfate group and divalent metal ions (which can cause the decrease of agar quality) than in *Gracilaria* in other countries of the world.

Purification procedure of agar extract from *Gracilaria heteroclada* included: firstly, algal treatment by alkali; removing of divalent metal ions (using cation Na^+ exchange column), the color agents (using anion Cl^- exchange column) and converting from L-Galactosa - 6 - Sulfate to 3,6 anhydro - L - galactosa (using anion OH^- exchange column).

Experimental data indicated that by this purification process, it is enabled to obtain agar product with the increased characters such as gel strength (1.100 g/cm²), solution transparency (0.057), total sulfate (0.87%), 3,6 anhydro galactose (49.8%), agarose (79%), nitrogen (0.03%), calcium (150 ppm), insoluble substances (0.14%) and solubility.

I. GIỚI THIỆU

Hiện nay hàng năm trên thế giới khai thác và sản xuất khoảng 1 triệu tấn các loài rong chứa agar và chế biến khoảng 200.000 tấn agar các loại. Trong đó 28% sản lượng dành cho công nghệ sinh học, 14% công nghệ dược phẩm và 58% còn lại được sử dụng trong công nghệ thực phẩm và các ngành công nghiệp khác (Algorithme, FAO, 1997).

Nguyên liệu chế biến agar trên thế giới chủ yếu là các loài rong *Gracilaria* (chiếm 60% sản lượng nguyên liệu), *Gelidium* (30%) và 10% thuộc các chi *Gelidiella*, *Pterocladia* (Ohno, 1997).

Tùy theo chất lượng của nguyên liệu chế biến agar mà các thông số của qui trình công nghệ có khác nhau ít nhiều, nhưng nhìn chung có hai phương pháp chiết rút chính:

- Đối với nguyên liệu có chất lượng agar cao như *Gelidium*, *Gelidiella*, *Pterocladia* không cần công đoạn xử lý rong bằng kiềm trước khi chiết.

- Đối với nguyên liệu có chất lượng agar thấp và hàm lượng sulphat cao như *Gracilaria*, để nâng cao chất lượng agar cần phải xử lý rong bằng kiềm ở nhiệt độ 80 – 95°C, với nồng độ kiềm 2 – 6%, mục đích để chuyển L - galactose 6- sulphat thành 3,6 anhydro

- galactose (thành phần chính của agarose) (Murano, 1995).

- Các loài Rong Cầu Việt Nam có hàm lượng agar dao động từ 26 – 47%tlk, nghĩa là tương đương với các loài rong *agarophyte* trên thế giới (Le Dinh Hung *et al.*, 2000), nhưng sức đông chỉ đạt từ 140 – 160 g/cm², trong khi giá trị đó của Rong Cầu trên thế giới đạt 300 – 400 g/cm², vì vậy để làm tăng sức đông của agar, trong công nghệ cần phải có giai đoạn xử lý rong bằng kiềm trước khi chiết hoặc dùng các tác nhân hóa học như etylen glycol, cetylpyridinclorid, DMSO để kết tủa bớt thành phần agaropectin, nhờ đó làm tăng thành phần agarose. Những biện pháp công nghệ đó đều làm cho hiệu suất thu hồi agar giảm đáng kể (khoảng 50%) (Lebbar, 1988).

Công nghệ chế biến agar tại Việt Nam về cơ bản không khác với quy trình sản xuất agar của thế giới. Tuy nhiên do đặc tính nguyên liệu rong đầu vào có chất lượng thấp, trong quy trình sản xuất agar từ Rong Cầu ở Việt Nam còn nhiều vấn đề chưa được giải quyết một cách trọn vẹn. Hơn thế nữa, các cơ sở sản xuất ở nước ta trong quy trình chế biến agar cho đến nay vẫn còn sử dụng axit boric - một hóa chất từ lâu đã bị cấm sử dụng trong công nghệ thực phẩm - để cải thiện sức đông của agar. Vì vậy các loại sản phẩm agar hiện được sản xuất tại Việt Nam không đạt các tính chất của một agar nguyên

chất và rất khó tiêu thụ ngoài thị trường bởi sức đông và độ tan không cao và không thể đáp ứng yêu cầu sử dụng trong các lãnh vực khoa học đòi hỏi chất lượng cao và ngay cả trong thực phẩm.

Vì vậy mục tiêu của vấn đề nghiên cứu đặt ra là tìm một giải pháp công nghệ sản xuất agar chất lượng cao, đáp ứng được những đòi hỏi của khoa học – công nghệ và không tăng trong giá thành sản phẩm ở Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Rong *Gracilaria heteroclada*, thu mẫu tháng 08/2001, tại sông Cầu - Phú Yên.

Nhựa cation axit mạnh Amberlite IR – 120 (Na⁺); anion bazơ mạnh Amberlite IRA - 402 (Cl⁻, OH⁻). Chiều cao cột 100 cm; đường kính trong của cột 3 cm; mỗi cột chứa 0,5 lít nhựa, duy trì nhiệt độ ở các cột từ 55 – 80°C bằng thermostat.

2. Phương pháp chiết

Rong được loại bỏ tạp chất, rửa sạch bằng nước ngọt, phơi khô, bảo quản để chiết agar.

Agar tự nhiên:

0,5 kg rong khô, ngâm trương, xử lý với HCl 10⁻³N ở nhiệt độ phòng trong vòng 2 giờ; rửa sạch rong, xử lý với đệm axêtat/axêtic ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút; rửa sạch rong về pH trung tính và tiến hành chiết ở nhiệt độ 95°C - 102°C khoảng 1,40 h trong autoclave với p = 1,2atm, lọc thô qua túi vải, sau đó lọc tinh với chất trợ lọc diatomite, dịch lọc được bơm qua các

cột nhựa trao đổi ion dạng Na⁺, Cl⁻ và OH⁻ bằng bơm nén với tốc độ từ 80 – 120 ml dịch/phút. Thu dịch agar để tạo gel, cho lạnh đông ở nhiệt độ -10°C thời gian 48 h, xả đá, ép ráo sợi agar và sấy khô.

Agar xử lý kiềm:

0,5 kg rong khô được xử lý kiềm NaOH ở nhiệt độ 90 ± 2°C trong thời gian 1giờ; rửa sạch rong, xử lý với HCl 10⁻³N ở nhiệt độ phòng trong vòng 2 giờ; rửa sạch rong, xử lý với đệm axêtat/axêtic ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút; rửa sạch rong về pH trung tính và tiến hành chiết ở nhiệt độ 95°C - 102°C khoảng 1h40' trong autoclave với p = 1,2atm, lọc thô qua túi vải, sau đó lọc tinh với chất trợ lọc diatomite, dịch lọc được cho chạy qua các cột nhựa trao đổi ion dạng Na⁺, Cl⁻ và OH⁻ bằng bơm nén với tốc độ từ 80 – 120 ml dịch/phút. Thu dịch agar để tạo gel, cho lạnh đông ở nhiệt độ -10°C thời gian 48h, xả đá, ép ráo sợi agar và sấy khô.

3. Các phương pháp xác định định lượng

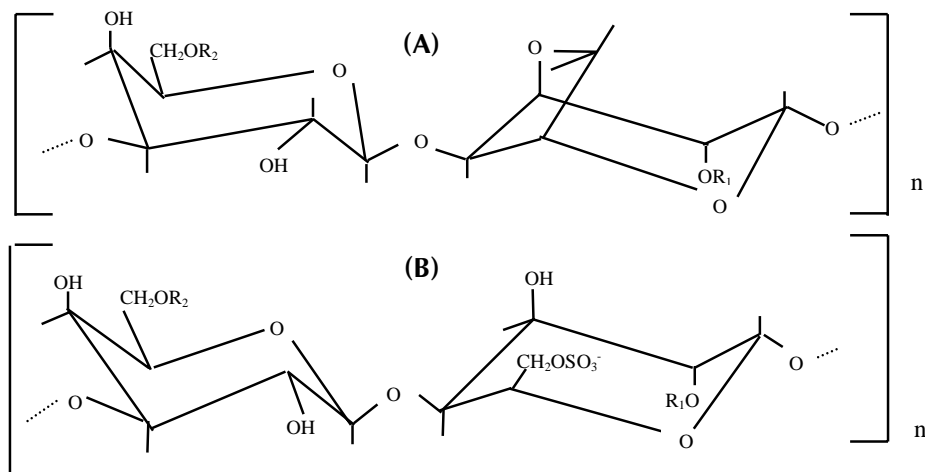
Xác định đường tổng số, 3 - 6 anhydro galactosa và sunfat như đã mô tả trong bài báo trước đó (Le Dinh Hung *et al.*, 2000). Xác định agarose và agaropectin bằng cách cho dịch agar 0,1% chạy qua cột DEAE - sephadex A -50 (CL⁻) (Whyte, 1981). Xác định trọng lượng phân tử trung bình (Martinsen *et al.*, 1991). Xác định nhiệt độ đông và nhiệt độ tan của agar (Craigie, 1978).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cấu trúc cơ bản của phân tử agar là một dime gồm một β-D-galactosa và

một 3,6-anhydro- α -L-galactoza gọi là agarbiose (thành phần chủ yếu của agarose) (hình 1A) hoặc một β -D-galactoza và một 6-sunphat α -L-galactoza gọi là tiền tố agarbiose (thành phần chủ yếu của agaropectin)

(hình 1B). Các monome này được nối với nhau qua liên kết glicozit (1 \rightarrow 4), trong khi các đime được liên kết với nhau bằng cầu nối (1 \rightarrow 3) (Duckworth, 1971).



Hình 1: (A) Agarobiose: O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-3,6-anhydro- α -L-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)
(B) Tiền tố agarobiose: O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-6-O-sulfate- α -L-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3). R_1, R_2 : H, CH_3

Phương pháp quang phổ hồng ngoại là phương pháp thuận lợi để đánh giá tỉ lệ nồng độ sơ bộ của sunfat tổng số, 3,6 - anhydro - L - galactoza, 4 - sunfat - D - galactoza trên đường tổng số trong agar. Phổ hồng ngoại của agar từ *Gracilaria* thu được cho thấy có sự hấp thụ mạnh ở 930 cm^{-1} đặc trưng cho

3,6 - anhydro - L - galactoza, sự hấp thụ yếu ở 1.250 cm^{-1} đặc trưng cho sunfat tổng số, sự hấp thụ ở 845 cm^{-1} đặc trưng cho 4 - sunfat - D - galactoza và ở 2.920 cm^{-1} đặc trưng cho đường tổng số (Lahaye, 1986; Lahaye, 1988; Rochas, 1986).

Bảng 1: Tỉ lệ độ hấp thụ hồng ngoại của 3,6-anhydro-L- galactoza (3,6 - AG), sunfat tổng số và 4 - sunfat - D - galactoza trên đường tổng số của những mẫu agar từ *G. heteroclada*

Mẫu	3,6 - AG/Đường tổng số (930 / 2920)	Sunfat tổng số/Đường tổng số (1250/2920)	4 - sunfat - D - galactoza/ Đường tổng số (845/2920)
Agar 1	1,39	0,59	0,047
Agar 2	1,73	0,34	0,046
Agar 3	1,86	0,26	0,047
Agar 4	3,5	0,21	0,046

Bảng 2: Thành phần hóa học và tính chất vật lý của agar trước và sau khi chạy qua cột trao đổi ion (% agar khô)

STT	Chỉ tiêu chất lượng agar	Agar 1	Agar 2	Agar 3	Agar 4	Agar VN
1	Hàm lượng agar trong rong, %	36 - 38%				-
2	Hiệu suất thu hồi, %tlrk	-	19 - 21	-	12- 13%	-
3	Đường tổng số	90,2	92,7	96,2	98,3	84,7
4	D, L - galactoza	56,2	53,2	50,1	48,5	53,7
5	3,6-anhydro-L-galactoza (3,6-AG)	34	39,5	46,1	49,8	31
6	Agarose (AG)	46	52	69	79	42
7	Agaropectin (AP)	44	38	27	19	41
8	Sunfat tổng số	5,47	3,75	1,9	0,87	3,55
9	Tro	4	3,3	3,2	2,4	3,2
10	Nitơ tổng số	0,5	0,15	0,05	0,03	0,85
11	Sức đông, g/cm ²	270	380-400	750	1100	380-420
12	Chất không tan trong nước nóng	0,33	0,18	0,34	0,14	5,5
13	Canxi, mg/g	4,3	0,4	2,9	0,15	5,7
14	Nhiệt độ đông, °C	38,5 ± 0,5	38,5 ± 0,5	38,5 ± 0,5	38,5 ± 0,5	≥ 50
15	Nhiệt độ tan, °C	91± 0,5	91± 0,5	91± 0,5	91± 0,5	95
16	Độ trong quang học, O.D.	0,099	0,067	0,098	0,057	-
17	Khả năng tan của agar trong nước nóng	Không tan hết sau 5 phút	Tan hoàn toàn sau 2-5 phút	Không tan hết sau 5 phút	Tan hoàn toàn sau 5 phút	Không tan hết sau 30 phút
18	Trọng lượng phân tử trung bình	144.000	144.000	243.000	243.000	-

Ký hiệu: Cho bảng 1 và 2

- Agar 1: Agar tự nhiên trước khi qua cột.
- Agar 2: Agar tự nhiên sau khi qua cột $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Cl}^- \rightarrow \text{OH}^-$.
- Agar 3: Agar chỉ xử lý kiềm.
- Agar 4: Agar xử lý kiềm và qua cột $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Cl}^- \rightarrow \text{OH}^-$.
- AgarVN: Agar lưu hành ngoài thị trường hiện nay.

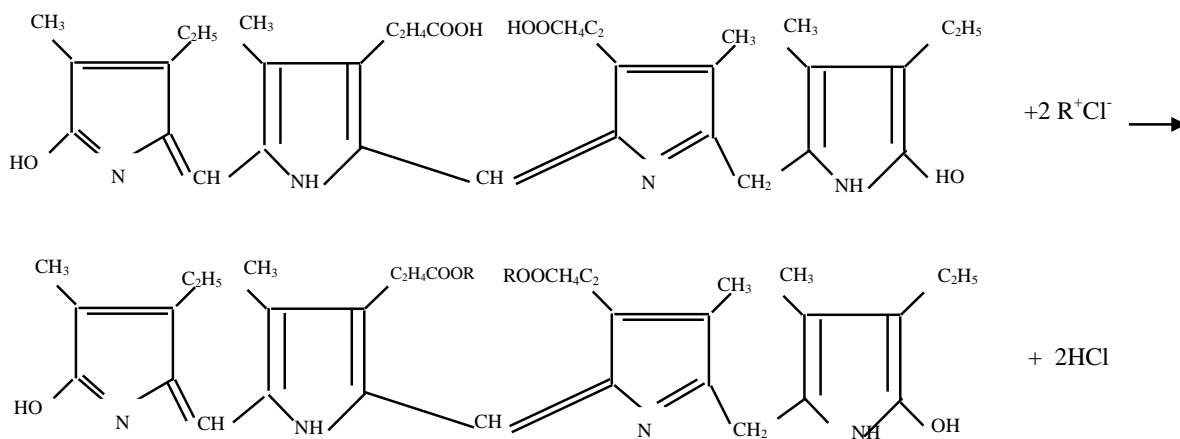
Từ bảng 1 cho thấy, tỉ lệ độ hấp thụ hồng ngoại tương đối của sunfat tổng số trên đường tổng số (1250/2920) cao nhất trong agar tự nhiên (agar 1) (0,59) và nhìn chung đã giảm trong mẫu agar 4 (0,21). Trong khi đó, tỉ lệ tương đối của 3,6 - anhydro L - galactoza trên đường tổng số (930/2920) đạt cao nhất ở mẫu agar 4

(3,5) và thấp nhất trong mẫu agar 1 (1,39). Nghĩa là sự ép dịch chiết agar qua nhựa trao đổi ion dạng OH^- đều có thể chuyển L - galactoza - 6 - sunfat thành dạng 3,6 - anhydro - L - galactoza, kết quả là khả năng tạo gel của agar tăng lên. Trái lại tỉ lệ độ hấp thụ hồng ngoại tương đối của 4 - sunfat - D - galactoza trên đường tổng số

(845/2920) gần như không có sự thay đổi ở các mẫu agar, bởi vì nhóm sunfat gắn ở vị trí C₄ và C₆ của vòng D - galactosa bên với kiềm và nhựa trao đổi anion OH⁻ (Murano, 1995).

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, dịch chiết agar trước và sau khi chạy qua cột trao đổi cation dạng Na⁺, hàm lượng canxi đã giảm từ 4,3 mg/g xuống 0,4mg/g (agar 1 và agar 2) và từ 2,9 mg/g xuống 0,15mg/g (agar 3 và agar 4) so với agar VN 5,7mg/g. Ion canxi liên kết với các gốc sunfat tạo thành cấu hình lồng và làm cho khả năng tan của agar kém, ngược lại ion natri thay thế vào dẫn đến khả năng tan của agar cao (3 - 5 phút) và đáp ứng được những yêu cầu nuôi cấy vi sinh và nuôi cấy mô so với agar VN (> 30 phút).

Dịch agar trước và sau khi chạy qua cột trao đổi anion dạng Cl⁻, mật độ quang (OD) đã giảm từ 0,099 xuống 0,067 (agar 1 và agar 2) và từ 0,098 xuống 0,057 (agar 3 và agar 4). Sắc tố trong Rong Cầu chủ yếu là phycobilin chứa 4 vòng pyrol và nối với nhau bởi các cầu nối metylen, phycobilin liên kết với prôtít bằng liên kết peptit và không chứa ion Mg²⁺ hay ion nào khác. Trong công nghệ hiện nay ở Việt Nam để loại bỏ sắc tố trong rong cũng như dịch chiết agar người ta dùng tác nhân hóa học để tẩy trắng (H₂O₂, NaOCl, NaHSO₃...), điều này làm giảm đáng kể chất lượng của agar (sức đông và trọng lượng phân tử) cũng như khó loại bỏ hoàn toàn tác nhân tẩy trắng còn lại.



Hình 2: Cơ chế trao đổi giữa sắc tố (phycobilin) trong dịch agar và nhựa anion

Ngoài phản ứng hấp thụ màu, nhựa anion dạng Cl⁻ còn hấp thụ một số tạp chất hữu cơ mang điện tích (axít amin, axít béo...có trong dịch chiết agar), điều này thể hiện ở hàm lượng

nitơ tổng số và hàm lượng chất không tan trong nước nóng giữa agar không chạy qua cột và cho chạy qua cột trao đổi ion (bảng 2). Hàm lượng chất không tan của mẫu agar 2 và agar 4

(0,18 và 0,14%) thấp hơn nhiều so với tiêu chuẩn agar (Merck) (hàm lượng chất không tan $\leq 0,5\%$), agar VN (5,5%) và đây cũng là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độ tinh khiết hóa học của agar được sử dụng trong công nghệ vi sinh và nuôi cấy mô.

Dịch chiết agar trước và sau chạy qua cột trao đổi anion OH^- , hàm lượng 3,6 anhydro -L - galactoza tăng lên từ 34 đến 39,5% (agar 1 và agar 2) và từ 46,1 đến 49,8% (agar 3 và agar 4), điều này có thể khẳng định rằng, mặc dù xử lý rong bằng kiềm, khả năng chuyển hóa L - galactoza - 6 - sunfat thành 3,6 anhydro L - galactoza vẫn không hoàn toàn so với xử lý dịch chiết agar với nhựa trao đổi anion dạng OH^- , do động học của phản ứng trao đổi ion trên cột xảy ra chậm hơn và không cưỡng bức, agar lúc này ở pha lỏng so với xử lý rong bằng kiềm thì agar ở pha rắn.

Hơn nữa, độ tinh khiết của agar còn được đánh giá qua chỉ tiêu hàm lượng đường tổng số, agar 4 (98,3%) cao hơn nhiều so với agar VN (84,7%). Mặt khác, không có sự giảm trọng lượng phân tử của agar trước và sau khi chạy qua các cột trao đổi ion.

Sức đông và nhiệt độ đông của agar là hai chỉ tiêu cơ bản của một mẫu agar cho nuôi cấy vi sinh và nuôi cấy mô ($\geq 800 \text{ g/cm}^2$; 38 - 45°C) (Murano, 1992). Đối với agar từ rong *Gracilaria heteroclada* (Sông Cầu, Phú Yên) mẫu agar 4 đạt tiêu chuẩn để sản xuất agar chất lượng cao cho các lĩnh vực nuôi cấy vi sinh (1.100 g/cm^2 ; 38,5°C) cao hơn so với agar từ *Gracilaria* spp. của Đài Loan, Philippin và Thái Lan, sức đông (660 g/cm^2 , 622 g/cm^2 và 716 g/cm^2) (Orosco, 1992).

Bảng 3: Ma trận hệ số tương quan (r) của các tham số hóa học - vật lý của agar

	Đường	Galactoza	3,6 -AG	AG	AP	Sunfat	Tro	Nitơ	Sức đông
Đường	1								
Galactoza	- 0,997	1							
3,6 - AG	0,999	- 0,999	1						
AG	0,991	- 0,980	0,985	1					
AP	- 0,988	0,975	- 0,981	- 0,999	1				
Sunfat	- 0,997	0,999	- 0,999	- 0,980	0,975	1			
Tro	- 0,938	0,935	- 0,938	- 0,915	0,913	0,939	1		
Nitơ	- 0,895	0,925	- 0,913	- 0,832	0,819	0,924	0,869	1	
Sức đông	0,979	-0,962	0,970	0,992	- 0,994	- 0,963	- 0,937	- 0,796	1

Bảng 3 trình bày kết quả đánh giá mối tương quan và độ tin cậy của số liệu phân tích bằng phương pháp

phân tích hệ số tương quan (phần mềm ANOVA). Với $p = 0,95$ và $f = m - 2$, giá trị hệ số tương quan giới hạn $r_{gh}(p, f)$

tra theo bảng = 0,95 (Doerffel, 1983). Để có sự tương quan giữa hai biến thì giá trị r tính được phải là: $|r| > r_{gh}$ (p , f). Các hệ số tương quan cao giữa 3,6 - AG và AG (0,985), 3,6 - AG với độ bền gel (0,97) cũng như giữa AG và độ bền gel (0,99) là mối quan hệ thuận chiều; trong khi các hệ số tương quan giữa AP với 3,6 -AG (-0,98), AP với AG (-0,99) và AP với độ bền gel (-0,99) và sunfat với AG (-0,98) là mối quan hệ nghịch. Mối quan hệ thuận nghịch này phù hợp với quy luật tương quan đã được biết trước (Cote, 1986). Hệ số tương quan nghịch giữa sunfat với độ bền gel là nét điển hình của các loài agarophyt (Hurtado - Ponce, 1994; Macchiavello, 1999). Hệ số tương quan giữa hàm lượng tro và nitơ tổng số so với các tham số khác không thể hiện rõ ràng.

Mối quan hệ nghịch chiều giữa hiệu suất thu hồi với 3,6 - AG và với độ bền gel đã chỉ ra rằng để có được hàm lượng 3,6-AG và độ bền gel cao chúng ta phải chấp nhận hiệu suất thu hồi agar thấp.

Các giá trị hệ số tương quan của các tham số thực nghiệm thu được đều lớn hơn giá trị giới hạn (0,95), điều đó chứng tỏ các số liệu phân tích có độ chính xác cao.

IV. KẾT LUẬN

Với kết quả nghiên cứu đạt được bằng phương pháp xử lý rong bằng kiềm và tiếp theo với những nhựa trao đổi ion khác nhau, có thể cho phép chế biến agar với độ bền gel tăng ($1.100\text{g}/\text{cm}^2$), độ trong của dung dịch agar (0,057), sunfat tổng số (0,87%),

3,6 anhydro galactoza (49,8%), agarose (79%), nitơ (0,03%), tro (2,4%), canxi (150ppm), chất không tan (0,14%) cũng như khả năng tan của agar tăng lên.

Phương pháp dùng kỹ thuật trao đổi ion có thể giải quyết một cách trọn vẹn các vấn đề mà công nghệ sản xuất agar hiện nay ở nước ta còn tồn tại như: độ tan, màu sắc, độ tinh khiết cũng như chất lượng agar và có thể đáp ứng đủ yêu cầu cho sản xuất agar chất lượng cao từ nguồn nguyên liệu Rong Cầu hiện nay ở nước ta, để phục vụ cho các lĩnh vực y học, dược học và công nghệ vi sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cote G. L., M. D. Hanisak, 1986. Production and properties of native agars. Proc. Int from *Gracilaria tikvahiae* and other Red Algae. Bot. Mar., 29: 359 – 366.
2. Craigie J. S., C. Leigh, 1978. Carrageenas and Agar. In JA Hellebust, JS Craigie (eds). Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods. Cambridge Univ. Press. 109 - 131.
3. Doerffel K., 1983. Thống kê trong hóa học phân tích (Trần Bính và Nguyễn Văn Ngạc dịch). Nhà Xuất bản ĐH và THCN, Hà Nội. Trang 237 – 241.
4. Duckworth M., W. Yaphe, 1971. Structure of agar. I: Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. Carbohydr. Res., 16: 189 – 197.

5. FAO, 1998. La production mondiale des algues au 31-12-1997. Algorithme, no. 47.
6. Hurtado – Ponce A. Q., 1994. Rheological properties of agar from *Gracilaria heteroclada* (Zhang et Xia) Zhang et Xia (Gracilariales, Rhodophyta) treated with powdered commercial lime and aqueous alkaline solution. Bot. mar., 35: 365 – 369.
7. Lahaye M., C. Rochas, W. Yaphe, 1986. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell wall of *Gracilaria* spp. (Gracilariaceae). Can. J. Bot., 64: 579 - 585.
8. Lahaye M., W. Yaphe, 1988. Effect of seasons on the chemical structure and gel strength of *Gracilaria pseudoverrucosa* agar (Gracilariaceae, Rhodophyta). Carbohydr. Polym., 8: 285 - 301.
9. Le Dinh Hung, Huynh Quang Nang, Ngo Quoc Buu, 2000. Chemical composition of sulphated galactans in agar from some *Gracilaria* species growing along the coast of southern Vietnam. Journal of Chemistry. Ha Noi, vol.38(4).
10. Lebbar R., M. Delmas, A. Gaset, 1988. For producing agar-agar algae extraction juice. U.S. Patent, N°4: 780 - 534.
11. Macchiavello J., R. Saito, G. Garofalo, E. C. Oliveira, 1999. A comparative analysis of agrans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown in vitro. J. M. Kain (Jones), M. T. Brown, M. Lahaye (eds). Sixteenth International Seaweed Symposium. Kluwer Academic Publishers. Hydrobiologia. No. 398/399: 397 – 400.
12. Martinsen A., G. Skjak - Brak, O. Smidsrod, F. Zanetti, S. Paoletti, 1991. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. Carbohydr. Polym., 15: 171-193.
13. Murano E., 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. J. Apl. Phycology, 7: 245 – 250.
14. Murano E., R. Toffanin, F. Zanetti, S. H. Knutsen, S. Paoletti, R. Rizzo, 1992. Chemical nad macromolecular characterisation of agars polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh), J Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). Carbohydr. Polym., 18: 171 – 178.
15. Ohno M., A. Critchley, 1997. Seaweed Cultivation and Marine Ranching. JICA.
16. Orosco C. A., M. Chirapart, M. Ohno, M. Sawanura, 1992. Yield and physical characteristics of agar from *Gracilaria chorda* Holmes: comparision with those from Southeast Asian species. Nippon Gakkaishi, 58(9): 1711 – 1716.
17. Rochas C., M. Lahaye, W. Yaphe, 1986. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. Bot. Mar., 29: 335 - 340.

18. Whyte J. N. C. *et al.*, 1981. *Gracilaria*. Botanica Marina, vol. XXIV: 493 -501.
Biomass and agar from reproductive and vegetative