

## Approche du mécanisme de gélification des sols d'agarose III. Comportement rhéologique de divers échantillons et étude énergétique de leur gélification

E. Bourret et L. Bardet \* avec la collaboration technique de  
R. Fortune

*Laboratoire de Physique Industrielle Pharmaceutique Faculté de Pharmacie, avenue Ch. Flahault, 34060 Montpellier Cedex (France)*

(Reçu le 22 décembre 1981)

(Accepté le 16 février 1982)

---

### Résumé

L'étude rhéologique de plusieurs sols d'agarose et de leur processus de gélification a révélé des différences notables au niveau des constantes rhéologiques des différents échantillons examinés et a permis de proposer une explication du comportement plastique des sols. L'étude énergétique de la formation des gels en fonction de l'échantillon et de la concentration en agarose contribue à élucider les interactions susceptibles de s'établir aux différentes étapes de la gélification et d'interpréter le rôle de la concentration du polymère dans la constitution du réseau tridimensionnel. Une concentration limite supérieure dont la valeur varie avec les propriétés rhéologiques du sol étudié, a été mise en évidence. Les résultats sont discutés en termes de volume libre et de mouvements coopératifs.

### Summary

Investigations of varied agarose samples indicate differences in rheological characteristics of their gels. An assumption is proposed to explain plastic behavior. The evaluation of the energy of activation for viscous flow depending on samples and concentration of polymer contribute to clarification of the gelling process. Intermolecular forces in every step of the forming network and the influence of polymer concentration are discussed. The results are interpreted in terms of free volume and

---

\* Auteur auquel toute correspondance doit être adressée.

cooperative motions. Repulsion intermolecular forces become of dominant importance and hinder the gelling process above a particular concentration varying with the rheological characteristics of agarose samples.

---

## Introduction

Dans les travaux précédents consacrés à une approche du mécanisme de gélification des sols d'agarose, nous avons suivi les variations des constantes rhéologiques et mis en évidence les différentes températures caractérisant l'évolution des propriétés rhéologiques au cours du refroidissement du sol (Bourret et Bardet, 1981a and b). Cette étude effectuée sur l'agarose indubiose IBF A37 est reconduite sur des agaroses de diverses provenances. Il est bien connu en effet que les caractères physico-chimiques des agaroses peuvent varier selon leur origine, la variété de l'algue, le cycle végétatif et surtout leur mode de préparation. Ces divers caractères peuvent se traduire notamment dans la température de gélification des sols (Guiseley, 1970) ou dans la force des gels obtenus (Kim et Henriquez, 1977; Untawale et al., 1977).

Il paraît donc intéressant de suivre l'évolution des paramètres rhéologiques sur plusieurs échantillons d'agarose afin de déceler des différences éventuelles. Nous examinerons le comportement et l'évolution des constantes rhéologiques et analyserons les variations de la viscosité en fonction de la température et cette analyse nous amènera alors à une étude énergétique de ces sols.

## Etude rhéologique

L'étude a été réalisée sur cinq échantillons d'agarose choisis en fonction de la force des gels obtenus et de la valeur du courant d'électro-endosmose en se référant aux caractéristiques indiquées par les fabricants: trois de ces agaroses proviennent de la Marine Colloids Division (Agarose Sea Kem HEEO, Sea Kem HGT (P) et Sea Plaque); une autre dont les caractéristiques sont proches de celle déjà étudiée est fournie par l'Industrie Biologique Française (A 45); la cinquième notée agarose B est d'origine inconnue.

Toutes ces agaroses ont été étudiées à des concentrations variant de 2 à 20 g · l<sup>-1</sup>.

L'étude rhéologique (rhéogrammes, courbes de viscosité, températures critiques) a été conduite comme il a été exposé dans les travaux précédents (Bourret et Bardet, 1981a, b).

### *Comportement rhéologique*

Les courbes d'écoulement respectives de ces différents agaroses possèdent les mêmes caractéristiques que celles décrites antérieurement pour l'agarose indubiose A 37: (a) les rhéogrammes des sols de 4 à 20 g · l<sup>-1</sup> révèlent une viscosité de structure; seule fluctue en fonction de l'agarose et naturellement de sa concentration la

température à laquelle apparaît l'écoulement de type plastique; et (b) dans les mêmes conditions, le rhéogramme des sols à  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  reflète un écoulement quasi-newtonien pour tous les échantillons d'agarose.

#### *Evolution des constantes rhéologiques*

L'évolution de la viscosité apparente au gradient de vitesse  $870 \text{ s}^{-1}$ , de la viscosité plastique et du seuil d'écoulement en fonction de la température du sol est tout à fait similaire à celle déjà enregistrée dans les travaux précédents. Ces constantes évoluent en fonction inverse de la température et l'intensité de leurs variations est proportionnelle à la concentration en polymère dans l'intervalle 4 à  $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

*Courbes de viscosité.* A titre d'exemple, la Fig. 1 représente les courbes de la viscosité apparente de ces différents agaroses à une même concentration  $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ : remarquons qu'un des agaroses étudiés, l'agarose Sea Kem HGT(P), possède une viscosité particulièrement élevée et se différencie entièrement des autres échantillons, ce résultat étant reproductible aux autres concentrations; il faut également noter la faible viscosité des sols des deux agaroses IBF (A 45 et A 37).

*Seuils d'écoulement.* Les valeurs des seuils d'écoulement varient d'un agarose à

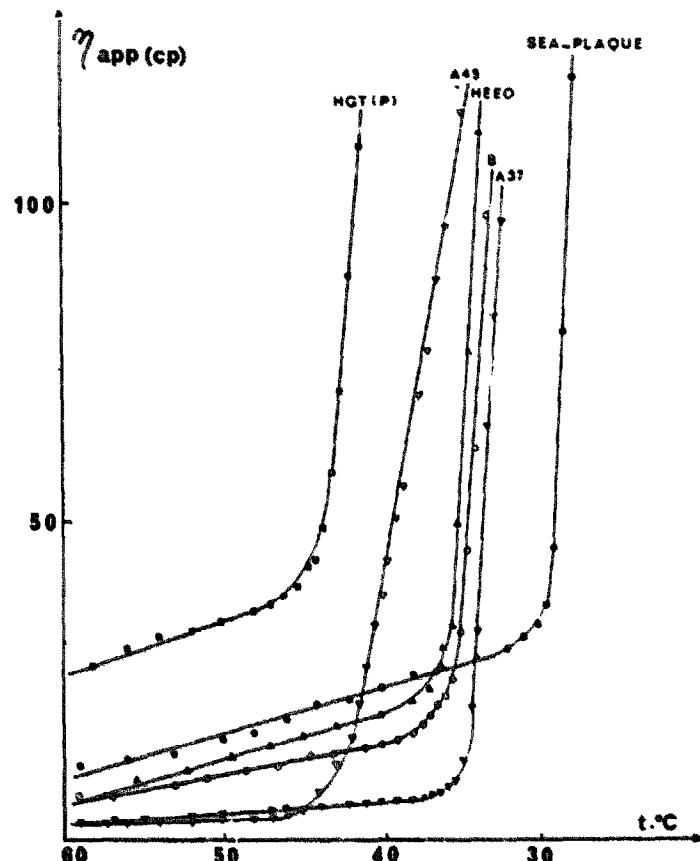


Fig. 1. Evolution de la viscosité apparente au cours du refroidissement des sols pour les différents échantillons d'agarose à la concentration de  $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  (gradient de vitesse:  $870 \text{ s}^{-1}$ ).

TABLEAU 1

TEMPÉRATURES DE GÉLIFICATION OBTENUES PAR LES COURBES DE VISCOSITÉ ( $t^\circ$  dyn) ET PAR LES SEUILS D'ÉCOULEMENT  $t^\circ$  ( $F_0$ )

C ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )		4	6	8	10	12	15	18	20
A 45 (IBF)	$t^\circ$ dyn	34.0	34.0	38.5	40.0	41.0	42.0	42.5	43.0
	$t^\circ$ ( $F_0$ )	36.0	33.5	38.5	39.5	41.0	41.0	42.5	42.5
A 37 (IBF)	$t^\circ$ dyn	30.5	31.0	32.0	33.0	33.5	34.5	35.0	35.0
	$t^\circ$ ( $F_0$ )	30.5	31.5	32.5	33.0	33.5	35.0	35.0	35.5
Sea Kem HEEO	$t^\circ$ dyn	32.5	33.0	34.0	34.0	34.5	35.0	35.0	35.5
	$t^\circ$ ( $F_0$ )	33.5	32.0	34.0	34.0	34.5	35.0	35.5	36.5
B origine inconnue	$t^\circ$ dyn	31.0	32.5	33.5	34.0	34.5	34.5	34.0	35.0
	$t^\circ$ ( $F_0$ )	30.0	32.5	34.0	34.0	34.5	35.0	35.0	35.5
Sea Kem HGT (P)	$t^\circ$ dyn	39.0	40.0	40.5	41.5	41.0	42.5	44.0	44.5
	$t^\circ$ ( $F_0$ )	39.0	40.0	41.0	41.5	41.5	42.5	44.0	45.0
Seaplaque	$t^\circ$ dyn	26.0	26.5	27.0	27.5	28.0	29.0	30.5	31.0
	$t^\circ$ ( $F_0$ )	26.0	26.5	27.0	28.0	28.5	29.0	30.5	31.0

l'autre mais sont toujours assez élevées comme c'est généralement le cas pour les solutions donnant des gels micro-cristallins (Erdi et al., 1968). Les valeurs extrêmes exprimées en dynes  $\cdot$  cm $^{-2}$  pour trois de ces agaroses sont les suivantes: A 45: 2-200; Sea Kem HEEO: 10-400; Sea Kem HGT(P): 35-440. Leur évolution au cours du refroidissement du sol permet de déterminer la température de gélification du milieu, températures qui concordent parfaitement quelque soit l'agarose et la concentration avec les températures de gélification dynamiques relevées sur les courbes de viscosité comme il a été indiqué dans les travaux précédents (Tableau 1).

#### *Comportement rhéologique et mécanisme de gélification*

L'analyse des rhéogrammes et des courbes de viscosité de l'agarose A 37 qui permet de définir respectivement la température d'apparition de l'écoulement plastique et du début de la gélification, nous avait amené à conclure que ces deux manifestations sont concomitantes et relèvent des mêmes modifications structurales du milieu (Bourret et Bardet, 1981). La confrontation de ces températures critiques pour les divers agaroses étudiés infirme cette hypothèse. En effet, les températures de gélification commençante et de la zone d'apparition de l'écoulement plastique notée  $t^\circ(N)$  (Tableau 2) ne coïncident pas pour tous les échantillons: l'anomalie d'écoulement se manifeste au cours du refroidissement avant même l'apparition des premières modifications structurales à l'origine de la gélification; la dissociation de ces deux phénomènes qui s'accentue avec la concentration en agarose est liée à la viscosité initiale élevée des sols. C'est ainsi que l'écart est très marqué pour l'agarose Sea Kem HGT (P) même aux faibles concentrations alors qu'il est significatif uniquement aux fortes concentrations pour l'agarose Sea Kem HEEO, Sea plaque et l'agarose B dont les viscosités sont nettement inférieures à celle de l'agarose HGT (P); au contraire, les sols d'agarose IBF A 45, comme ceux de l'agarose A 37, de faibles viscosités, montrent une bonne simultanéité des deux processus (Tableau 2).

**TABLEAU 2**  
**TEMPÉRATURES DE GÉLIFICATION COMMENÇANTE ET ZONE DE TEMPÉRATURES POUR L'APPARITION DE L'ÉCOULEMENT PLASTIQUE (° GEL COMMENÇANTE = ° STAT.)**

C ( $\text{g} \cdot \text{i}^{-1}$ )	4	6	8	10	12	15	18	20
<b>A 45 (IBF)</b>	40	44	45	45	46,5	47	48	48
	° stat	° (N)	36	44	46	45-47,5	45	44,5-50
<b>A 37 (IBF)</b>	35	36	37	38	39	40	41	41,5
	° stat	° (N)	31,5	35	36	38	39	39-44
<b>Sea Kem HEEO</b>	35,0	36,0	36,5	40	39,0	43,0	44,0	46,0
	° stat	° (N)	34,0	35-36	36,5-38	40	46,5-52	52,5
<b>B origine inconnue</b>	34	35,5	36	37,5	38	40	39	64,0
	° stat	° (N)	33	35	37	52	51	42
<b>Sea Kem HGT (P)</b>	43	45	45	44	46,5	48	48	50
	° stat	° (N)	-	49	57	>63	-	>64
<b>Seaplaque</b>	29	29	30	32	31	34	33	34
	° stat	° (N)	41,5	43-46	30	31-51	46	>65

L'ébauche du mécanisme de gélification à travers ses 4 températures caractéristiques données dans les travaux précédents, n'est pas modifiée mais il faut conclure de ces nouvelles observations que la viscosité de structure n'est pas liée au mécanisme de gélification. La température de gélification commençante caractérise l'amorce du processus de gélification avec la formation des premiers agrégats alors que le comportement rhéologique non-newtonien de ces sols procède, outre de la présence en nombre croissant des hélices, de la structure initiale et des caractéristiques physico-chimiques propres à chaque type d'agarose telles que masse moléculaire, longueur de la chaîne, ramification.

### **Etude énergétique**

L'étude rhéologique des sols a mis en évidence quelques différences entre les agaroses étudiées notamment au niveau de la résistance des sols à l'écoulement. Or l'écoulement d'un fluide visqueux soumis à une tension de cisaillement peut être interprété selon la théorie énergétique développée par Eyring et nous fournir alors des renseignements sur l'état de réticulation du soluté (Fox, 1956).

#### *Rappels théoriques*

Si on suppose la macromolécule constituée d'un enchainement de segments, la viscosité d'un fluide peut s'exprimer par le rapport  $\eta = F(Z)/J$  où  $F(Z)$  est une fonction liée à la longueur de la chaîne et  $J$  représente la fréquence des sauts d'un segment d'une position d'équilibre à une autre;  $J$  dépend essentiellement de la température et du volume libre. Les mouvements des segments individuels ne sont pas entièrement indépendants les uns des autres et le déplacement de chacun d'eux dépend de l'arrangement configurationnel des segments les plus voisins. Dans un système où les lacunes sont suffisantes pour que l'orientation des molécules ne soit pas un facteur prédominant dans la fréquence des sauts, la résistance à l'écoulement est reconnue comme le passage d'un segment d'un niveau énergétique à un autre. Ainsi le processus primaire de l'écoulement est contrôlé par l'énergie libre requise pour franchir la barrière énergétique de potentiel entre deux positions d'équilibre. Eyring a pu ainsi montrer que si l'écoulement est newtonien, le terme  $E$  de la relation d'Arrhenius

$$\eta = \text{const} \cdot \exp(E/RT) \quad (1)$$

peut être identifié à l'énergie d'activation  $\Delta H$  de l'écoulement visqueux, le terme constant renfermant implicitement le terme entropique  $\Delta S$  puisque l'expression mathématique de la viscosité est alors:

$$\eta = \frac{hN}{V} \exp\left(-\frac{\Delta S}{R}\right) \exp\left(\frac{\Delta H}{RT}\right) \quad (2)^1$$

<sup>1</sup>  $h$  est la constante de Plank,  $N$  le nombre d'Avogadro,  $V$  le volume molaire supposé constant,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température absolue.

Par contre dans le cas d'écoulement non-newtonien la relation 1 demeure valable à condition de l'exprimer en termes de viscosité apparente extrapolée à gradient de vitesse nul.

Ainsi l'analyse des variations de la viscosité apparente des sols en fonction de la température selon la relation

$$(\eta)_{\frac{d\gamma}{dx} \rightarrow 0} = \text{const} \cdot \exp(-\Delta H/RT) \quad (3)$$

permet d'évaluer l'énergie d'activation apparente du milieu  $\Delta H$  qui se trouve en étroite relation avec les interactions soluté-soluté et soluté-solvant.

Sur le plan pratique l'étude a été effectuée sur la viscosité apparente des sols mesurée au cours de leur refroidissement en maintenant constant un très faible gradient de vitesse ( $97.04 \text{ s}^{-1}$ ); un essai d'interprétation suivra la description des phénomènes observés.

### Résultats expérimentaux

La transformée logarithmique de la relation ci-dessus est théoriquement une droite dont la pente est égale à  $\Delta H/R$ . Cette anamorphose appliquée à nos résultats aboutit à l'obtention de 2 portions de droite dont l'intersection correspond à la température de gélification commençante et ceci quelque soit l'agarose et la concentration; un exemple est donné dans la Fig. 2: cette scission en deux zones apporte la preuve que l'on est en présence d'un milieu dans des états structuraux différents

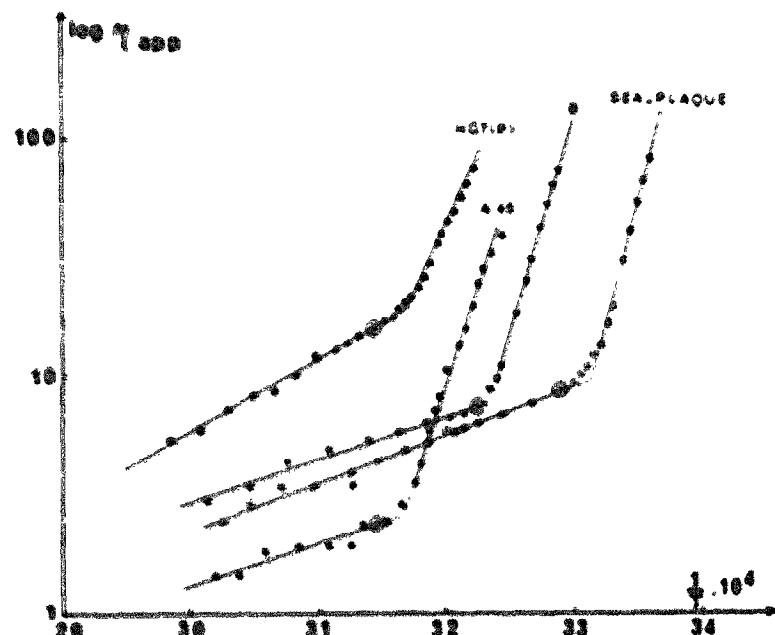


Fig. 2. Représentation graphique de  $\log \eta_{app} = f(1/T)$  au gradient de vitesse  $97 \text{ s}^{-1}$  et à la concentration de  $8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

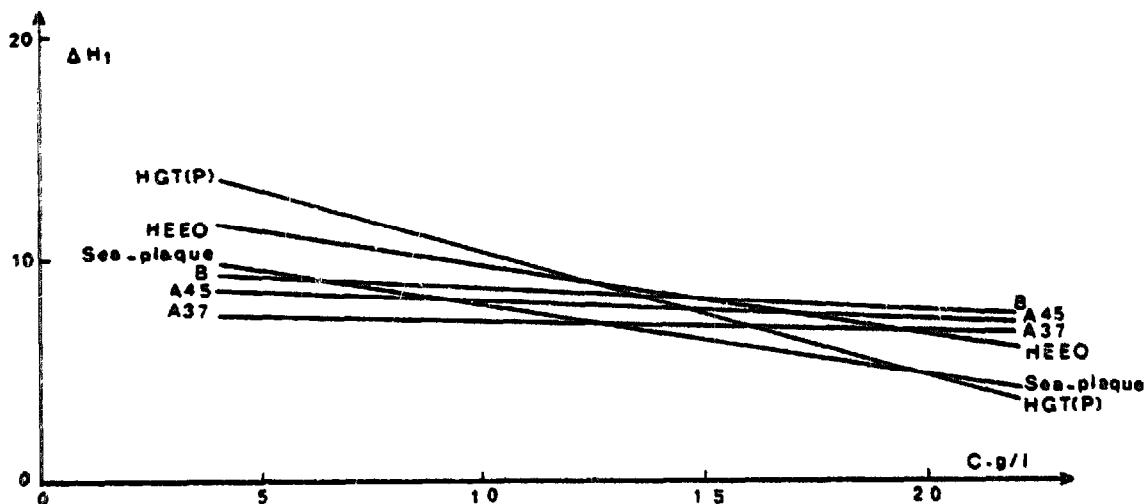


Fig. 3. Droites de régression de l'énergie d'activation en fonction de la concentration: températures expérimentales supérieures à la température gel. commençante.

selon la température expérimentale. Cette observation nous amène alors à examiner les résultats d'abord aux températures élevées (supérieures à la température de gel commençante) puis aux basses températures (inférieures à la température de gel commençante). Pour chacune de ces deux zones, le coefficient directeur des droites de régression permet de déterminer l'énergie d'activation apparente notée respectivement  $\Delta H_1$  aux hautes températures et  $\Delta H_2$  aux basses températures. Nous notons les observations suivantes: (a) aux températures élevées, les valeurs  $\Delta H_1$  de l'énergie d'activation sont faibles et restent constantes ou en faible diminution lorsque la concentration du polymère augmente (Fig. 3); enfin ces valeurs ne sont pas sig-

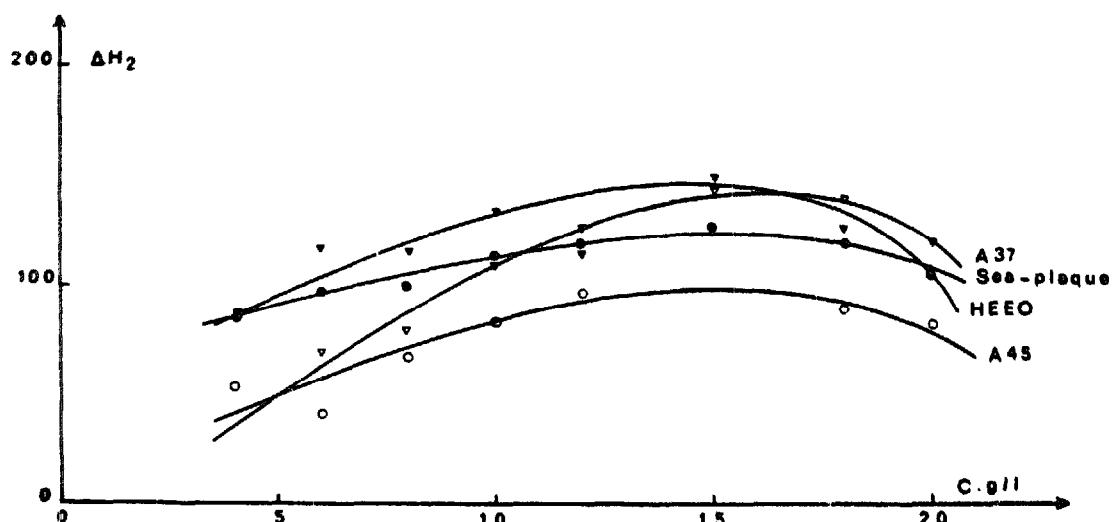


Fig. 4. Evolution de l'énergie d'activation en fonction de la concentration: températures expérimentales inférieures à la température de gel. commençante.

nificativement différentes d'un agarose à un autre; (b) aux basses températures: les valeurs de  $\Delta H_2$  sont très supérieures à celles de  $\Delta H_1$ , et l'énergie d'activation  $\Delta H_2$  diffère significativement d'un échantillon d'agarose à l'autre; enfin lorsque la concentration du polymère croît, leurs valeurs augmentent d'abord puis selon les échantillons se stabilisent ou diminuent légèrement (Fig. 4).

### *Essai d'interprétation*

#### *Températures élevées*

Au dessus de la température de gélification commençante, le nombre restreint d'hélices formées n'exerce pas de contrainte excessive si bien que les segments peuvent s'orienter librement les uns par rapport aux autres et les mouvements moléculaires suivent les théories probabilistes. Ainsi, les variations de la viscosité peuvent s'expliquer conformément au modèle d'Eyring: la barrière énergétique à franchir avant que l'écoulement élémentaire puisse commencer est faible comme le montre les valeurs de  $\Delta H_1$ ; ces valeurs à peine supérieures à  $5 \text{ k} \cdot \text{cal/mol}$  suggèrent d'une part le rôle de la liaison hydrogène dans la formation de l'hélice comme l'indique Hayashi (1977) et d'autre part une bonne solvatation du polymère. Comme attendu le facteur entropique  $\Delta S$  du système est très élevé et dans ces conditions, aucun effet particulier ne peut différencier les agaroses entre eux.

Lorsque la concentration du polymère augmente, on observe une très légère diminution de l'énergie d'activation; cette variation se justifie par une perte du volume libre: en effet les lacunes au sein du milieu fluide deviennent moins denses et la fréquence des sauts d'un niveau énergétique à un autre diminue ce que traduit l'augmentation de la viscosité. Ainsi le nombre de molécules possédant l'énergie nécessaire pour franchir la barrière énergétique avant que l'écoulement commence, a tendance à décroître lorsque la concentration augmente.

#### *Basses températures*

Aux températures inférieures à la température de gélification commençante, l'énergie d'activation  $\Delta H_2$  croît de façon spectaculaire par comparaison à  $\Delta H_1$ , car dans ce domaine de température, les propriétés du milieu évoluent rapidement; ce phénomène est dû à un processus coopératif c'est à dire au déplacement non plus d'un segment comme le postule la théorie d'Eyring, mais de tout ou d'une partie des segments constituant la molécule ou même de plusieurs molécules ensembles: cette interprétation est compatible avec le fait que, à ces températures, se constitue le réseau tridimensionnel, et avec le processus évoqué par Liang et al. (1979) dans son étude contributive au mécanisme de gélification. En outre il faut noter que, sous l'effet de la tension de cisaillement, les macromolécules s'orientent dans la direction de l'écoulement ce qui accroît leurs possibilités d'interactions, favorise la cristallinité du réseau et augmente la résistance du milieu. Ainsi, les liaisons intermoléculaires qui s'établissent au cours du refroidissement assurent une grande cohésion du réseau et les mouvements moléculaires se trouvent particulièrement ralentis; la barrière de potentiel à franchir est située à un très haut niveau d'énergie ce que révèlent les valeurs élevées de  $\Delta H_2$ . Cet effet dont l'importance est variable selon l'échantillon

d'agarose, s'amplifie avec la concentration du polymère, les chaînes macromoléculaires perdant progressivement leurs degrés de liberté de mouvement.

Cependant lorsque le polymère atteint une certaine concentration dans le milieu, on constate une stabilisation ou un affaiblissement de l'énergie d'activation  $\Delta H_2$ . Une diminution de l'énergie d'activation avec des concentrations supérieures à 1.5% d'agarose ont déjà été rapportées par Watase et Nishinari (1980) dans une étude où l'énergie d'activation était évaluée à partir des variations du temps de relaxation; cet auteur l'explique par la formation d'un réseau très dense. En ce qui concerne nos résultats, nous incriminons le rôle des forces de répulsion entre atomes trop voisins: dans les sols d'agarose concentrés, les distances interatomiques se réduisent peu à peu si bien que les forces de répulsion s'exercent entre les segments les plus voisins; les contacts polymère-polymère deviennent moins fréquents ce qui justifie alors la diminution de  $\Delta H_2$ . Ce phénomène apparaît dès 15 ou  $18 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  d'agarose selon l'échantillon.

Enfin nous n'avons pas évoqué les variations de la constante qui traduit l'entropie du système. En effet les résultats obtenus prévoient une entropie  $\Delta S$  plus élevée aux basses températures qu'aux températures élevées ce qui est logiquement inconcevable en regard de l'état fortement organisé que représente le réseau cristallin du gel. Plusieurs raisons peuvent être invoquées: (i) la première est un dépassement des limites du modèle postulé par la théorie d'Eyring; (ii) la deuxième serait un changement du volume molaire avec la température; et (iii) enfin il ne faut pas exclure le fait que le gel retient dans ses mailles une très grande quantité d'eau, plusieurs types de liaisons pouvant s'exercer de façon coopérative pour retenir plusieurs couches de molécules; les nombreuses interactions soluté-solvant peuvent alors expliquer l'entropie élevée du système.

## Conclusion

L'analyse effectuée confirme les observations précédentes sur le plan rhéologique alors que l'étude énergétique apporte de précieux renseignements sur les interactions susceptibles de s'établir aux différentes phases de la gélification. Nos résultats s'intègrent logiquement dans le schéma du mécanisme de gélification proposé par Hayashi et al. (1978); en effet, si la gélification peut être interprétée en termes de séparation de phases, alors certains résultats peuvent trouver une signification comme exposé ci-dessous.

La température de gélification commençant qui caractérise la transition du sol au milieu sol-gel correspond au point de séparation du coacervat, les liaisons intermoléculaires assurant l'agrégation des hélices ne s'établissant qu'à partir de cette température.

La faible augmentation de la viscosité d'un sol maintenu 3 à 4 heures à la température de gélification isothermique publiée dans les travaux antérieurs, doit être attribuée à la formation progressive des hélices, processus de cinétique lente appelé 'cristallisation' par Hayashi (1978). L'augmentation très légère de la viscosité d'un sol à  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  que l'on observe parfois aux basses températures peut également être due à ce même processus.

Un sol à  $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  d'agarose se distinguait, dans l'étude rhéologique antérieure, par un accroissement de la viscosité au cours du temps très nettement inférieur à celui obtenu à toutes les concentrations supérieures; le comportement particulier de ce sol serait engendré par un état structural intermédiaire correspondant à l'agrégation des hélices, processus insuffisant pour une gélification complète (Liang 1979), les agrégats s'interconnectant seulement dans les sols de concentration supérieure pour constituer un réseau tridimensionnel de grande rigidité. Ce sol à  $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  serait l'équivalent d'un coacervat.

En outre, l'étude énergétique montre qu'il existe une concentration limite supérieure ( $15$  ou  $18 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  selon les échantillons) au delà de laquelle les forces de répulsion empêchent la formation d'un réseau tridimensionnel régulier. Le réseau gélifié ne s'établit donc que pour des concentrations comprises entre  $6$  et  $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de polymère.

Enfin l'étude rhéologique dans son ensemble et en particulier l'étude énergétique laissent présager la possibilité future de relier les données rhéologiques à certains critères tels que pureté de l'agarose ou rigidité du gel.

## Bibliographie

- Bourret, E. et Bardet, L., Approche du mécanisme de gélification des sols d'agarose: I. Evolution des caractéristiques rhéologiques des sols. *Int. J. Pharm.*, 8 (1981a) 241-252.
- Bourret, E. et Bardet, L., Approche du mécanisme de gélification des sols d'agarose: II. Températures de gélification. *Int. J. Pharm.*, 9 (1981b) 81-90.
- Erdi, N.Z., Cruz, M.M. and Battista, O.A., Rheological characteristics of polymeric microcrystal-gels. *J. Colloid Interface Sci.*, 28 (1968) 36-47.
- Guiseley, K.B., The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. *Carbohydrate Res.*, 13 (1970) 247-256.
- Hayashi, A., Kinoshita, K. and Kuwano, M., Studies of agarose gelling system by the fluorescence polarization method: I. *Polymer J.*, 9 (1977) 219-225.
- Hayashi, A., Kinoshita, K. and Kuwano, M., Studies of agarose gelling system by the fluorescence polarization method, II. *Polymer J.*, 10 (1978) 485-494.
- Kim, D.H. and Henriquez P., Yields and strengths of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa*. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 9 (1977) paru 1979, 257-262.
- Liang, J.N., Stevens E.S., Morris E.R. and Rees D.A., Spectroscopic origin of conformation sensitive contributions to polysaccharide optical activity: vacuum-UV circular dichroism of agarose. *Biopolymers*, 18 no. 2 (1979) 327-333.
- Untawale, A.G., Bhosle N.B. and Dhargalkar V.K., Properties of phycocolloid extracts from seaweeds of Goa. *Ind. J. Marine Sci.*, 6 no. 2 (1977) 181-183.
- Watase, M. and Nishinari, K., Rheological properties of agarose-gelatin gels. *Rheol. Acta*, 19 (1980) 220-225.
- Fox, T.G., Gratch, S. and Hoshak, S., Viscosity relationship for polymers in bulk and in concentrated solution. In Eirich F.R. (Ed.), *Rheology, Theory and Applications*, Academic Press, New York, 1956, Tome 4, pp. 431-493.