



Potential uses of the brown seaweed *Cystoseira humilis* biomass: 1- Sodium alginate yield, FT-IR, ¹H NMR and rheological analyses

R. Zrid ¹, F. Bentiss ^{2,3}, R. Attoumane Ben Ali ¹, Z. Belattmania ¹, A. Zarrouk ⁴, S. Elatouani ¹, A. Eddaoui ¹, A. Reani ¹, B. Sabour ^{1*}

⁽¹⁾ Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Ecologie et Valorisation des Ecosystèmes – Faculté des Science, Université Chouaïb Doukkali, BP20, El-Jadida 24000, Maroc.

⁽²⁾ Laboratoire de Catalyse et de Corrosion des Matériaux – Faculté des Science, Université Chouaïb Doukkali, BP20, El-Jadida 24000, Maroc.

⁽³⁾ UMET-PSI, CNRS UMR 8207, ENSCL, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

⁽⁴⁾ LCAE-URAC18 – Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier, B.P. 717, Oujda 60000, Maroc.

Received 21 Dec 2015, Revised 07 Jan 2016, Accepted 22 Jan 2016

*Corresponding Author. E-mail: sabour.b@ucd.ac.ma

Abstract

Alginates are linear binary co-polymers of β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G), extracted from brown seaweeds and are used in industry for their colloidal properties. This work discusses the results of extraction, spectroscopic characterization and rheological behavior of alginates from the brown seaweed *Cystoseira humilis* harvested from the Atlantic coast of El Jadida, Morocco. The obtained results show that the yield of alginate from *C. humilis* depending on the used extraction method. For the method based on precipitation with ethanol the yield is about 5.43% dry weight, whereas the precipitation with calcium chloride (CaCl_2) gives a yield of 19.21% dry weight. The FT-IR spectroscopic analysis showed characteristic peaks corresponding to the various groups present in the both *C. humilis* and high-quality commercial alginates. The ¹H NMR spectroscopy was used to evaluate de quality of the studied polymer and to calculate the proportions of monads, dyads and the relationship between the two uronic acids ($F_G = 0.41$; $F_M = 0.59$; $F_{MG} = 0.19$; $M/G = 1.46$). Rheological assays demonstrate that *C. humilis* products a shear-thinning hydrogels except at the lowest concentrations which exhibit a Newtonian behavior with a linear relation between apparent viscosity and shear stress.

Keywords: Brown seaweeds, *Cystoseira humilis*, sodium alginate, FT-IR, ¹H NMR, rheological behavior.

Résumé

Extraits des algues brunes marines, les alginates sont des copolymères composés de l'acide β -D-mannuronique (M) et de l'acide α -L-guluronique (G). Ces biopolymères trouvent des applications industrielles variées grâce notamment à leurs propriétés colloïdales. Ce travail présente et discute les résultats de l'extraction, de la caractérisation spectroscopique et du comportement rhéologique d'alginates de la Phéophycée *Cystoseira humilis* récoltée de la côte Atlantique Marocaine au sud d'El Jadida. Les résultats obtenus montrent que le rendement en alginate de sodium chez cette espèce varie selon la méthode d'extraction utilisée. Ce rendement est de l'ordre de 5.43% pour la méthode basée sur la précipitation à l'éthanol alors qu'il atteint 19.21% par la précipitation au chlorure de calcium (CaCl_2). L'analyse spectroscopique IR-TF a montré des pics caractéristiques similaires à ceux d'un alginate commercial de haute qualité et correspondent aux différents groupements contenus dans ce genre de polymères. Les résultats de l'infrarouge ont été confirmés par la spectroscopie RMN ¹H. Cette dernière technique a permis également de calculer les proportions des monades, des dyades et du rapport entre les deux acides uroniques ($F_G = 0.41$; $F_M = 0.59$; $F_{MG} = 0.19$ $M/G = 1.46$). Les tests rhéologiques démontrent que *C. humilis* produit un gel à caractère rhéofluidifiant excepté à faibles concentrations où l'hydrocolloïde manifeste un comportement Newtonien.

Mots clés : Algues brunes, *Cystoseira humilis*, alginates, FT-IR, RMN ¹H, Rhéologie.

1. Introduction

Les algues marines sont largement utilisées dans divers domaines tels que l'alimentation humaine, l'extraction des phycocolloïdes, l'agriculture, l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Actuellement, dans le monde de l'industrie, les principaux produits d'origine algale mis en jeu sont les polysaccharides pariétaux désignés sous le nom de phycocolloïdes. Ces derniers représentent 40% du marché mondial des colloïdes [1]. Ces polysaccharides jouent un rôle de maintien dans les solutions aqueuses en donnant la texture souhaitée au liquide sans en modifier le goût, la couleur ou la forme. Trois types de polysaccharides sont extraits des algues: les agars, les caraghénanes issus des algues rouges et les alginates isolés des algues brunes [2].

Les alginates sont des polymères constitués d'une succession de deux monomères d'acides uroniques dérivant du mannitol: l'acide mannuronique (M) et son épimère l'acide guluronique (G) liés par des liaisons glycosidiques (1→4) [3-5]. Ces deux monomères sont agencés au sein de la molécule d'alginate en différents types de séquences: des séquences homopolymériques constituées de zones à acide D-mannuronique (MM) ou d'acide L-guluronique (GG) et formant les « blocs durs » et des séquences hétéropolymères (MG) résultant d'une alternance entre les unités G et M, et formant les « blocs fragiles » [6]. De par ses diverses propriétés colloïdales, c'est à dire la rétention d'eau, la gélification et la stabilisation des émulsions, les alginates sont employés dans de nombreux domaines notamment les industries agroalimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et de textile [7].

Le Maroc dispose d'une double façade maritime caractérisée par une biomasse algale abondante et diversifiée. Cependant, les données sur la composition et les propriétés physico-chimiques des colloïdes d'origine algale sont quasi-absentes et pourtant nécessaires pour toute possibilité de valorisation industrielle future. Ce travail tente de présenter, pour la première fois, des informations sur le rendement et la caractérisation spectroscopique et rhéologique des alginates extraits de l'algue brune *Cystoseira humilis*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

L'algue brune *Cystoseira humilis* (Synonymie : *Cystoseira myriophylloides* var. *humilis*) est une espèce marine du Phylum des Ochrophyta et de la classe des Phaeophyceae. C'est une espèce qui se présente sous forme d'arbrisseaux très ramifiés de grande taille pouvant atteindre 1 mètre de hauteur et vivant dans les cuvettes plates peu profondes des étages médiolittoraux tout au long des côtes Marocaines à la fois Méditerranéennes et Atlantiques (Figures 1 et 2) où elle forme parfois des populations importantes. Le prélèvement de *Cystoseira humilis* a été effectué au printemps 2015 à marée basse au niveau d'une zone rocheuse au Sud de la ville d'El Jadida (Figure 2 ; 33°14'41.8"N 8°32'27.8"W). Les échantillons ont été rincés plusieurs fois à l'eau distillée afin d'éliminer toute impureté. La biomasse est séchée à l'air libre pendant plusieurs jours puis à l'étuve (60°C) jusqu'à poids constant avant d'être conservée à l'abri de l'humidité dans des sachets hermétiques.

2.2. Extraction des alginates

Dans cette étude, les deux méthodes d'extraction des alginates décrites ci-après ont été testées.

2.2.1. Précipitation des alginates à l'éthanol

Le protocole d'extraction est similaire à celui de Calumpong et al. [9] et Torres et al. [10] avec de légères modifications. Pour ce faire, une biomasse sèche de 12,5 g a été hydratée avec une solution de formol pendant 24 h à température ambiante puis lavée à l'eau distillée et ensuite immergée dans une solution d'acide chlorhydrique, avant d'être mis de côté pendant 24 h. Passer ce délai, suit l'étape d'extraction proprement dite des alginates : la carbonatation. L'acide alginique insoluble présent dans les parois cellulaires est converti en alginate de sodium soluble dans la phase liquide. Ainsi, la biomasse fut trempée dans une solution de carbonate de sodium durant 24h et l'opération a été répétée dans le but d'épuiser la biomasse en alginates. A la fin de cette étape, on obtient un jus : le jus de carbonatation qui après centrifugation (4000 tr/min) pendant 20 min fut coulé dans de l'éthanol à 95% dans une proportion de 1/3 afin de précipiter les fibres d'alginate de sodium. Les fibres ainsi obtenues sont lavées à l'acétone permettant leur blanchiment puis mises à sécher dans une étuve à 60°C pendant 48h et en fin broyées dans un mortier sec. Les teneurs en alginates sont exprimées en % poids sec (% PS).

2.2.2. Précipitation des alginates au chlorure de calcium

Le protocole a été adapté de celui d'Arvizu [11] avec légères modifications. Le procédé de pré-extraction est le même que celui effectué précédemment. Le jus de carbonatation est précipité dans une solution de chlorure de

calcium à 10%. Les fibres d'alginate de calcium formées sont converties en acide alginique par immersion des fibres dans trois bains successifs d'acide chlorhydrique (pH 2, pH 1.8 et pH 1.8) durant 15 min chacun.

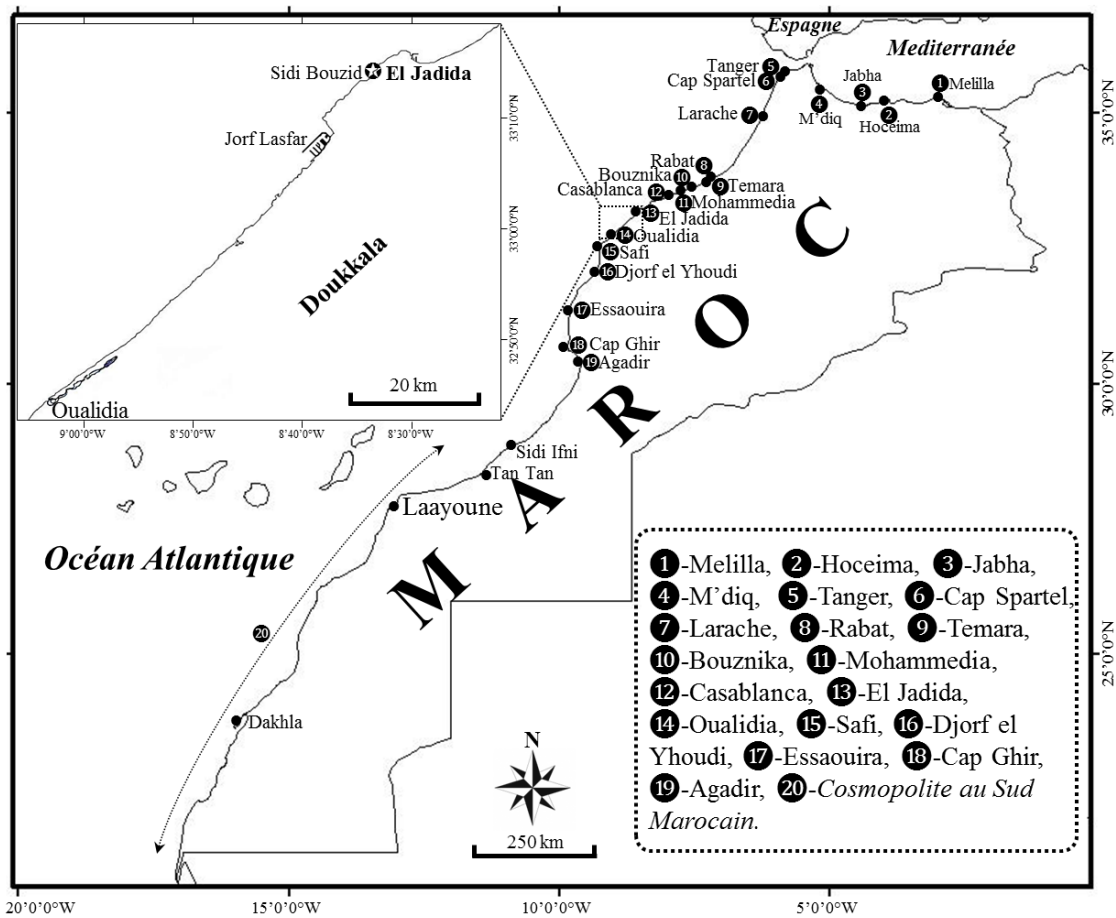


Figure 1 : Distribution de *Cystoseira humilis* sur les côtes marocaines et localisation géographique du site d'échantillonnage (☆). Carte élaborée sur la base des données de Benhissoune et al. [8]



Figure 2: Aspect morphologique de *Cystoseira humilis* (Sud d'El Jadida, printemps 2015).

2.3. Analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF)

Les échantillons de l'alginate de sodium ont été séchés à 50°C pendant 3 h dans une étuve avant l'analyse. Les spectres infrarouges ont été enregistrés à température ambiante sur la plage de nombre d'onde 4000-400 cm⁻¹ avec un spectromètre de type Thermo Scientific Nicolet iS50 IR-TF équipé d'un diamant ATR (Attenuated Total Reflectance) et d'un software OMNIC 9.1 de traitement de spectres. Un total de 64 scans a été adopté sous une résolution de 4 cm⁻¹.

2.4. Caractérisation par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H)

Les échantillons d'alginate de sodium ont été dissous dans du D₂O et agités avant l'obtention des spectres. La composition des alginate chez *Cystoseira humilis* a été étudiée moyennant un spectromètre RMN 1H à haut champ (400.33MHz) de type AVII-400, 9.4T. Nous avons utilisé une sonde TBI de 5 mm. La température de la sonde a été réglée à 343K.

2.5. Analyse rhéologique

Différentes concentrations de solution d'alginate de sodium allant de 0,5 à 5% ont été préparées afin de déterminer la viscosité de l'alginate des espèces étudiées. L'analyse rhéologique a été réalisée avec un rhéomètre HAAK MARES. L'appareil fonctionne à vitesse de cisaillement imposée (0 à 600 s⁻¹) fournissant des rhéogrammes de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse du cisaillement à différentes concentrations d'alginate de sodium.

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement en alginate de sodium

Les teneurs en alginate extraits de *Cystoseira humilis* sont présentés dans le tableau 1. La précipitation à l'éthanol a donné un rendement en alginate de sodium de 5.43 % PS tandis que l'acide alginique extrait par précipitation au chlorure de calcium est de l'ordre de 19.21 % PS. Selon la littérature, on parle d'espèce alginophyte industriellement commercialisable lorsque sa teneur en acide alginique est supérieure à 18 % PS [2]. En effet, l'amélioration du rendement par la méthode de précipitation des alginate au chlorure de calcium nous permet de considérer *Cystoseira humilis* parmi les alginophytes potentielles. En comparaison avec les données de la littérature, la teneur en alginate obtenus par la méthode au CaCl₂ chez l'espèce étudiée s'avère prometteuse et avoisine les rendements de certaines alginophytes telles que *Macrocystis pyrifera* (18-21 % PS), *Laminaria japonica* (20-26 % PS), *Ascophyllum nodosum* (15-20% PS). Ces teneurs restent néanmoins inférieures par rapport aux alginophytes qui dominent le marché mondial de l'industrie des alginate comme par exemple les espèces *Durvillaea antarctica* (53 % PS) et *Ecklonia cava* (35-38 % PS). Selon certains auteurs, le rendement en alginate dépend de plusieurs facteurs : de l'espèce, de la saisonnalité [12], et surtout de la méthode d'extraction [13]. Dans cette étude, le taux d'alginate extrait varie fortement en fonction de la méthode utilisée.

Tableau 1. Comparaison des teneurs en alginate chez *Cystoseira humilis* par rapport aux principales alginophytes dans le monde.

Espèce	Teneur en alginate (% Poids Sec)	Références
<i>Macrocystis pyrifera</i>	18 – 21	
<i>Laminaria japonica</i>	20 – 26	
<i>Laminaria hyperborea</i>	24 – 30	
<i>Laminaria digitata</i>	22 – 36	[2]
<i>Ecklonia cava</i>	35 – 38	
<i>Ascophyllum nodosum</i>	15 – 20	
<i>Fucus serratus</i>	18 – 28	
<i>Durvillaea antarctica</i>	53	[17]
<i>Lessonia trabeculata</i>	25.67	[18]
<i>Saccharina longicruris</i>	20	[19]
<i>Cystoseira humilis</i>	5.43 / 19.21	Cette étude

Cependant, une autre recherche a démontré que la différence du rendement entre ces deux méthodes n'était pas significative ; c'est le cas de *Macrocystis pyrifera* avec un rendement de 33% pour la précipitation à l'éthanol et de 27% pour la méthode au chlorure de calcium [14]. En outre, à une concentration de 10% de CaCl₂, la méthode au chlorure de calcium affiche plusieurs avantages, notamment, celui d'obtenir un taux de filtration maximal, des fibres longues et dures et un alginate de calcium commercial de qualité supérieur. En comparaison avec la méthode à l'éthanol, la précipitation au chlorure de calcium permet également une perte minimale des

fibres et présente l'avantage d'être de faible coût. De plus, lorsque l'alginate de calcium est traité avec une solution acide, l'acide alginique qui en résulte possède les mêmes caractéristiques que l'alginate de calcium. Ces caractéristiques sont très importantes pour une production économique des alginates à l'échelle commerciale [15]. On reporte dans la littérature des résultats similaires aux nôtres avec l'alginate extrait de *Cystoseira barbata* par la méthode au chlorure de calcium ; les teneurs en alginate oscillent entre 18.3 et 26.6% PS [16]. Toutefois, il convient de noter que l'échantillonnage fut réalisé en saison printanière (mars 2015). Il serait important de poursuivre ce travail par la réalisation d'une étude qualitative et quantitative sur ces polysaccharides sur tout un cycle de vie de l'espèce afin de confirmer nos données.

3.2. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Les spectres IR-TF de l'alginate de sodium commercial et celui isolé à partir de *Cystoseira humilis* sont présentés dans la Figure 3. Les deux spectres sont similaires et présentent les mêmes bandes caractéristiques. Selon certains auteurs [20], la large bande à 3275 cm^{-1} correspond à l'élongation du groupement O-H et celle à 2921 cm^{-1} peut être attribuée à l'élongation du groupement C-H. Une autre bande caractéristique apparaît à 1602 cm^{-1} et elle est attribuée à l'élongation asymétrique du groupement carboxylate O-C-O confirmant la haute teneur en acide uronique du polysaccharide [21]. L'absorption à 1403 cm^{-1} peut être due à la vibration de flexion C-OH avec la contribution de l'étirement symétrique du groupement carboxylate O-CO [21,22]. La bande à 1022 cm^{-1} peut être également due à la vibration C-O [23]. Selon Mathlouthi et al. [22], le pic enregistré à 929 cm^{-1} est indicatif de la présence d'acide uronique par la vibration d'étirement C-O et l'autre à 869 cm^{-1} attribuée à la liaison C1-H de l'acide α -L-gulonique. L'absorption à 815 cm^{-1} semble être caractéristique des résidus de l'acide mannuronique [24].

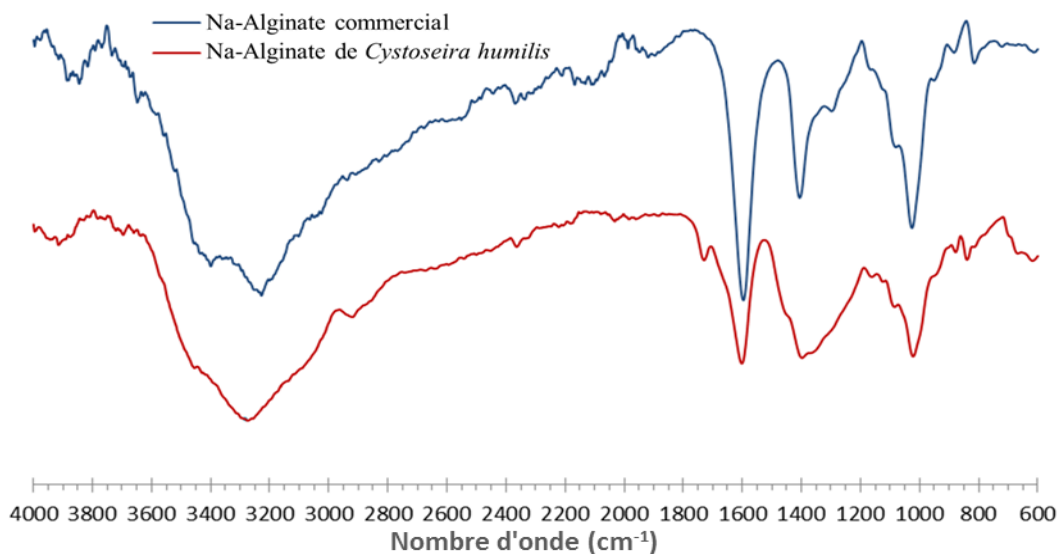


Figure 3 : Spectres IR-TF de l'alginate de sodium commercial et celui isolé à partir de *Cystoseira humilis*.

3.3. Analyse par spectroscopie RMN ^1H

La caractérisation des polysaccharides chez les algues brunes par spectroscopie RMN ^1H est bien connue pour être la méthode la plus fiable pour déterminer la composition et la structure des alginates [24,25]. En effet, les positions et les surfaces relatives des signaux des spectres, particulièrement dans la zone anomérique, nous informent sur la composition en acides uroniques de l'alginate étudié et nous permettent le calcul du rapport acide mannuronique / acide guluronique (M/G) [25] ainsi que la distribution des unités M et G tout au long de la chaîne du polymère [26]. Les propriétés physiques des alginates dépendent de la proportion des trois types de blocs et principalement des séquences GG [27] : les alginates avec de hautes teneurs en blocs MM forment des gels plus souples tandis que les alginates avec des blocs élevés en GG donneront des gels plus rigides [28]. Le rapport M/G est une caractéristique importante pour déterminer la nature du gel formé [29] : pour un rapport plus faible, l'alginate forme un gel fragile alors qu'il fournit un gel plus élastique dans le cas d'un rapport plus élevé [30].

Le spectre RMN ^1H de l'alginate extrait de *Cystoseira humilis* (Figure 4) révèle la présence de trois pics caractéristiques de l'acide uronique : le pic I (G1) à 5.048 ppm et le pic III (GG-5G) à 4.446 ppm correspondent respectivement à l'hydrogène en C1 et C5 de l'acide guluronique et le pic II (M-1M) à 4.655 ppm correspond à l'hydrogène en C1 des résidus de l'acide mannuronique. Les petits pics observés en épaulement (4.8 – 4.82 ppm) au pic II sont indicatifs des protons H-5 des résidus G centrés au niveau des triades GG-5M and MG-5M [25].

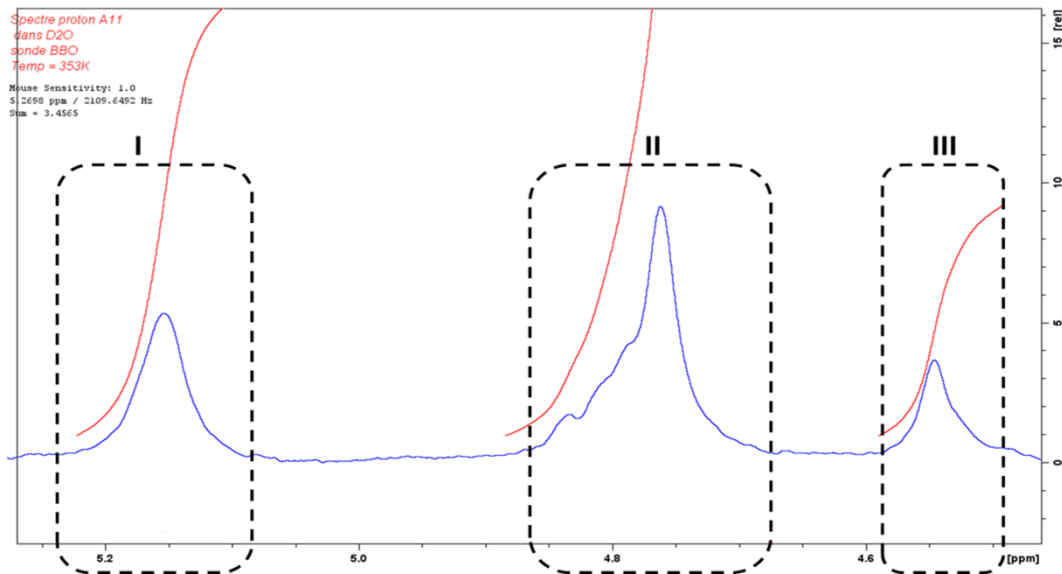


Figure 4: Spectre RMN ^1H (400MHz, solution D_2O à 70°C) de l'alginate de sodium extrait de *Cystoseira humilis*.

Le spectre de RMN ^1H permet également de déterminer la composition et la structure des blocs formant la molécule d'alginate (Tableau 2) en utilisant la méthode proposée par Grasdalen et al. [25] selon les équations suivantes :

$$\begin{aligned} F_G &= A_I / (A_{II} + A_{III}) \\ F_M &= 1 - F_G \\ F_{GG} &= A_{III} / (A_{II} + A_{III}) \\ F_{GM} = F_{MG} &= F_G - F_{GG} \\ F_{MM} &= F_M - F_{MG} \\ M/G &= (1 - F_G) / F_G \end{aligned}$$

Une description complète de la composition des alginates, notamment la distribution des dyades, n'est pas suffisante en se basant uniquement sur les équations sus-mentionnées. Elle peut être complétée par le calcul du paramètre η définie par l'équation :

$$\eta = F_{GM} / (F_M \times F_G)$$

Ce paramètre permet de caractériser la distribution des séquences MM, GG et MG tout au long du polymère [31]. L'étude de l'alginate extrait de *Cystoseira humilis* montre un $\eta = 0.8 < 1$ (Tableau 2). Selon Grasdalen et al. [25], cette valeur de η permet de conclure que notre polymère est riche en séquences homopolymériques MM et GG. Par ailleurs, et comme discuté auparavant, les propriétés physiques des alginates dépendent essentiellement de leurs caractéristiques moléculaires et plus particulièrement de leur teneur en monomère G et de la longueur des blocs G ; l'évaluation du rapport M / G est donc primordiale : les espèces ayant des rapports M/G > 1 produisent des alginates à propriété élastique tandis que dans les cas des rapports faibles les gels formés sont plutôt cassants. L'alginate extrait de *Cystoseira humilis* donne un rapport M/G de 1.46 considéré comme relativement élevé par rapport à la littérature (Tableau 2) et impliquant un phycocolloïde beaucoup plus riche en acide mannuronique que d'acide guluronique et, par conséquent, la formation d'hydrogels élastiques.

Tableau 2: Composition de l'alginate extrait de *Cystoseira humilis* comparé à ceux cités chez certaines espèces d'algues brunes.

Espèces	F _G	F _M	F _{GG}	F _{GM}	F _{MG}	F _{MM}	M/G	η	Références
<i>Cystoseira trinode</i>	0.63	0.37	0.50	0.13	0.13	0.24	0.59	0.56	[31]
<i>Sargassum fluitans</i>	0.87	0.13	0.76	0.11	0.11	0.02	0.15	0.97	[27]
<i>Sargassum vulgare</i>	0.44	0.56	0.43	0.02	0.02	0.55	1.27	0.04	[10]
<i>Laminaria japonica</i>	0.35	0.65	0.21	0.14	0.14	0.51	1.86	0.62	[32]
<i>Cystoseira humilis</i>	0.41	0.59	0.21	0.19	0.19	0.40	1.46	0.80	Cette étude

3.4. Caractérisation rhéologique

Le comportement rhéologique du gel extrait de *Cystoseira humilis* est représenté par le tracé du rhéogramme viscosité apparente – taux de cisaillement (Figure 5). Hormis la variation presque linéaire de la viscosité du polymère dans la solution la moins concentrée (0.5 %), la viscosité de l'alginate de *Cystoseira humilis* dans les solutions les plus concentrées (1.5 – 5 %) adopte un comportement non linéaire dit aussi pseudo-Newtonien. En effet, la viscosité tend à diminuer en fonction du taux de cisaillement correspondant ainsi à une caractéristique d'un gel rhéofluidifiant. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'une grande densité d'interactions entre les chaînes du polymère (enchevêtrements, liaison OH) qui sont détruites sous l'effet d'une augmentation de la vitesse de cisaillement [33]. Le comportement de type rhéofluidifiant est un avantage pour des utilisations potentielles des alginates dans les industries de textile et de l'agroalimentaire [34].

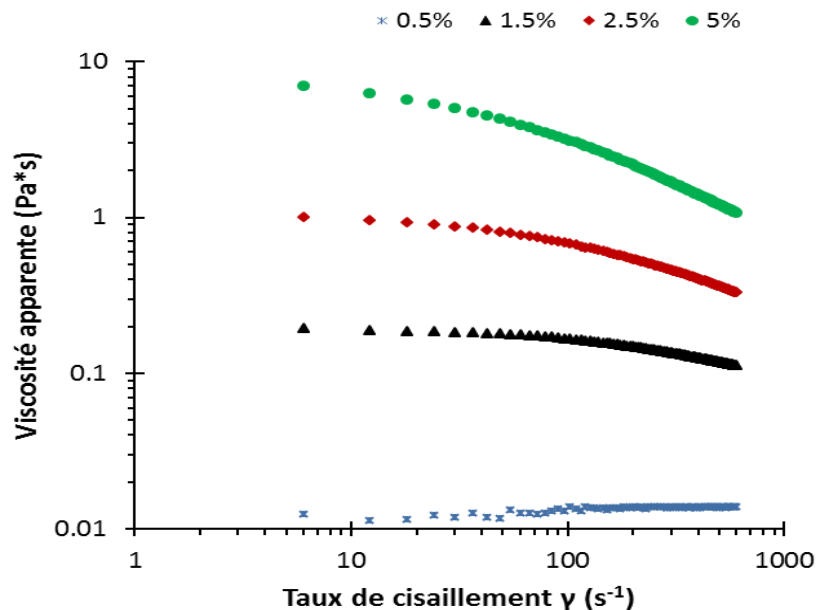


Figure 5 : Rhéogramme viscosité apparente – taux de cisaillement pour des solutions d'alginate de sodium de *Cystoseira humilis* à différentes concentrations.

Conclusion

Au terme de ce travail, nous avons pu évaluer le rendement, la composition et la qualité de l'alginate extrait de *Cystoseira humilis* en utilisant diverses méthodes. Le meilleur rendement d'extraction des alginates (19.21%) est obtenu par la méthode basée sur la précipitation des fibres du polymère par le chlorure de calcium (CaCl₂). L'analyse spectroscopique FT-IR a montré des pics caractéristiques similaires à ceux de l'alginate commercial et correspondant aux différents groupements contenus dans ce genre de polymères. Ceci a été relaté par l'étude de la structure de l'alginate étudié par la spectroscopie RMN ¹H. Cette technique a permis de calculer les proportions des monades, des dyades et du rapport entre les deux acides uroniques (F_G = 0.41 ; F_M = 0.59 ; F_{MG} = 0.19 M/G = 1.46). L'étude rhéologique a démontré que *Cystoseira humilis* produit généralement un gel à caractère rhéofluidifiant excepté à très faible concentration.

Références

1. FAO. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. FAO, Rome. (2014).
2. Pérez R. Ces algues qui nous entourent : Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. Ed. Ifremer (1997).
3. Smidsrød O., Christensen B.E. Molecular structure and physical behavior of seaweed colloids as compared with microbial polysaccharides. In: Seaweed Resources in Europe, uses and potential. John Wiley and Sons (1991).
4. Rioux L. E., Turgeon S. L., Beaulieu M. *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 530.
5. Draget K.I., Taylor C. *Food. Hydrocolloids.* 25 (2011) 251.
6. Gacesa P. *Microbiology.* 144 (1998) 1133.
7. Person J., Lando D., Mathieu D., Livre turquoise : Algues, filières du futur. AdebioTech (2010).
8. Benhissoune S., Boudouresque C. F., Verlaque M. *Bot. Mar.* 45(2002) 217.
9. Calumpong P. H., Maypa P. A., Magbanua M. *Hydrobiol.* 398 (1999) 211.
10. Torres M. R., Sousa A. P. A., Silva Filho E. A. T., Melo D. F., Feitosa J. P. A., de Paulab R. C. M., Lima M. G. S. *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 2067.
11. Arvizu H. D. L., Hernández C. G., Rodríguez M. Y. E. *Cienc. Mar.* 23 (1997) 195.
12. Pérez R. La culture des algues marines dans le monde. Ifremer (1992).
13. Rahilivao M. P., Andriamanantoanina H., Heyraud A., Rinaudo M. *Food. Hydrocolloids.* 32 (2013) 143.
14. Gomez. C. G., Lambrecht M. V. P., Lozano J. E. *Int. J. Biol. Macromol.* 44 (2009) 365.
15. McHugh D. J., Hernandez-Carmona G., Arvizu-Higuera D. L., Rodriguez-Montesinos Y. E. *J. Appl. Phycol.* 13 (2001) 471.
16. Manev Z., Iliev A., Vachkova V., Bulg. *J. Agric. Sci.* 1 (2013) 12.
17. Miller I. J. *Phytochem.* 41 (1996) 1315.
18. Chandía N. P., Matsuhira B., Vásquez A. E., *Carbohydr. Polym.* 46 (2001) 81.
19. Rioux L. E. Caractérisation rhéologique des alginates polysaccharides extraits des algues brunes. Thèse de Doctorat, Université Laval. (2005).
20. Fenoradosa T. A., Ali G., Delattre C., Laroche C., Petit E., Wadouachi A., Michaud P. *J. App. Phycol.* 22 (2010) 131.
21. Silverstein R. M., Webster F. X. Spectrometric identification of organic compounds. Sixth (1991).
21. Bi F., Mahmood S. J., Arman M., Taj N., Iqbal S. *Phys. Chem. Liq.* 45 (2007) 453.
22. Mathlouthi M., Koenig J. L. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 44 (1986) 7.
23. Karaki N. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3 (2013) 43.
24. Chandía N. P., Matsuhira B., Vásquez A. E. *Carbohydr. Polym.* 46 (2001) 81.
25. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. *Carbohydr. Res.* 68 (1979) 23.
26. Stokke B., Smidsord O., Bruheim P., Skjak-Braek G. *Macromol.* 24 (1991) 4637.
27. Davis T.A., Volesky B., Muncci A. *Water. Res.* 37 (2003) 4311.
28. McHugh D. J. Production, proprieties and uses of alginates. In: Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO (1987).
29. Penman A., Sanderson G. R. *Carbohydr. Res.* 25 (1972) 273.
30. Sokolova R., Ermakova S., Awada S., Zvyagintseva T., Kanaan H. *Chem. Nat. Compd.* 47 (2011) 329.
31. Larsen B., Salem D. M. S. A., Sallam M. A. E, Mishrikey M. M., *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 2325.
32. Nai-yu Z., Yan-xia Z., Xiao F., Li-jun H. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 12 (1994) 78.
33. Morris, E.R., Cutler, A. N., Ross-Murphy, S. B., Rees, D. A., Price, J. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydr. Polym.* 1 (1981) 5.
34. Draget K. I., Smidsrød O., Skjåk-Braek G. Polysaccharides and polyamides in the food industry. Properties, production and patents. Wiley-VCH (2005).

(2016) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>