Ulvan extraction from two types of green algae *Ulva* and studying the effect of pH and temperature on the yield

Dr. George Deeb*
Dr. Hasan Albodi**
Mahmoud Takla***

(Received 21/ 4 / 2021. Accepted 2 / 11 /2021)

□ ABSTRACT □

In this study, ulvan (sulphated polysaccharide) was extracted from two species of green algae: *Ulva fasciata* and *U.lactuca*, which were collected from the Syrian coast and calculate the yield for each, in addition to study the effect of pH and temperature on the yield.

The results showed that *U. fasciata* was superior to *U. lactuca* in ulvan content where the yield was 27.35% and 24.38% respectively at reference condition of, upon modifying in the extraction conditions, the yield of two types increased until it reached 29.55% and 27.11% respectively, at a temperature of 85^0 C and pH=2, while the lowest yield was 9.75% of *Ulva lactuca* at pH=1 and 95^0 C opposite 10.43% of *U. fasciata* at pH=1 and 75^0 C.

Key words: Ulvan, polysaccharide, extraction, *Ulva fasciata, Ulva lactuca*

* **Professor, Department of Botany, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia , Syria. gdeeb61@gmail.com**

** **Associate Professor, Department of chemistry , Faculty of Sciences, Tishreen University , Lattakia , Syria. boudi251162@gmail.com**

*** **PHD Student, Department of Botany, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria. mahmoudtakla1@gmail.com**

استخلاص الأولفان لنوعين من الطحلب الأخضر *Ulva* ودراسة تأثير درجة الـpH والحرارة في المردود

الدكتور جورج ديب*

الدكتور حسن البودي**

محمود تقلا***

(تاريخ الإيداع 21 / 4 / 2021. قبل للنشر في 2 / 11 / 2021)

□ ملخّص □

تم في هذا البحث استخلاص الأولفان (سكر متعدد كبريتي) لنوعين من الطحالب الخضراء *Ulva fasciata* و *Ulva lactuca* المجموعة من الساحل السوري وحساب المردود لكل منهما، بالإضافة لدراسة تأثير كل من درجتي الـ pH والحرارة على المردود.

أظهرت النتائج تفوق الطحلب *U. fasciata* على الطحلب *U. lactuca* في محتوى الأولفان حيث بلغ المردود 27.35% و 24.38% على التوالي في الشروط المرجعية، وعند التعديل في شروط الاستخلاص ارتفع المردود للنوعين حتى بلغ 29.55% و27.11% على التوالي وذلك عند درجة حرارة 85 مئوية ودرجة pH=2 ، بينما كانت أخفض قيمة للمردود 9.75% من طحلب *U. lactuca* عند pH=1 ودرجة حرارة 95 مئوية مقابل 10.43% من طحلب *U. fasciata* عند درجة pH=1 ودرجة حرارة 75 مئوية.

الكلمات المفتاحية : أولفان، سكر متعدد، استخلاص، الطحلب الأخضر *Ulva fasciata* ، الطحلب الأخضر *Ulva lactuca* .

* أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية . gdeeb61@gmail.com

** أستاذ مساعد – قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .boudi251162@gmail.com

*** طالب دكتوراه– قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .mahmoudtakla1@gmail.com

مقدمة

تلعب الطحالب البحرية دوراً هاماً في تأمين الأوكسجين للنباتات والمواد العضوية للكائنات الأخرى الموجودة في البيئة المائية، كما أن مدخراتها الغذائية جعلت منها محط أنظار للعديد من الدراسات للاستفادة منها، ففي العقود الماضية بدأ الاستثمار الفعلي للطحالب في العديد من المجالات الطبية (Synytsya *etal*.,2010) والصيدلانية (*etal*.,1998 Kim)، وكذلك كغذاء للإنسان (Murata and Nakazoe, 2001) والحيوان (Schliching,1971) ، تم وضع أول ملامح الفلورا البحرية السورية في سبعينيات القرن الماضي من قبل (Mayhoob,1976) حيث أنجز أول دراسة تصنيفية تضمنت أكثر من 400 نوع ثم تتالت الأبحاث التصنيفية، وبعدها انتقلت الدراسات باتجاه نواحي تطبيقية هامة مثل استخدام الطحالب كأسمدة حيوية زراعية (Deeb *etal*,2017) وكذلك تأثيرها على الجراثيم (داؤود ومسطو، 1997) وغيرها، كما جذبت الطحالب البحرية مؤخراً الانتباهِ كونها تشكل مصدراً للمركبات القابلة للتجديد حيث تحتوي جدران الخلايا مِنْ الطحالبِ البحريةِ على سكريات متعددة كبريتية مثل الآغار والكاراجينان والألجينات (Mayer and Hamann,2002) بالإضافة لبعض المركبات التي لم تدرس بشكل وافي من حيث طرق الاستخلاص والخواص مثل الأولفان الموجود بشكل خاص في أجناس رتبة Ulvales من الطحالب الخضراء Cunha and (Grenha,2016) والذي يُظهِر نشاط مضاد للأكسدة(Huimin, *etal*.,2005) كما يلعب دوراً في خفض الكولستيرول(Qia,*etal*.,2012) ، ويبدي نشاط معادٍ للفيروسات عند الإنسان والطيور وخاصةً فيروسات الأنفلونزا (Ivanova *etal*.,1994) كما لوحظ تأثيره بشكل عالي ومحدد ضد فيروس الحلأ البسيط (Cassolato *etal*.,2008) ، بالإضافة لخواصه الكيميائية والفيزيائية الفريدة جعلته مادة هامة للعديد من التطبيقات الغذائية والزراعية والصيدلانية (Lahaye and Robic,2007) ، بالرغم من هذه الأهمية للأولفان لم نرَ أي بحث محلي أو منشور بالعربية تناول استخلاصه ودراسة خواصه لإمكانية معرفة مجالات استثماره بالرغم أن الطحالب الخضراء تتفوق على الحمراء والسمراء من حيث التنوع ومناطق الانتشار، نظراً لهذه الأهمية للأولفان وانتشار أجناس رتبة Ulvales بكثافة على امتداد الساحل السوري قررنا في بحثنا دراسة استخلاص الأولفان من النوعين *U.fasciata* و *U.lactuca* وتأثير بعض الشروط على المردود تمهيداً لاستثماره مستقبلاً بالشكل الأمثل.

أهمية البحث وأهدافه

نظراً للأهمية التطبيقية التي يشكلها الأولفان في المجالات الطبية والصيدلانية والغذائية والزراعية والإقبال العالمي في البحث عن مصادر طبيعية متجددة وبسبب غزارة الطحالب الخضراء على الشاطئ السوري، نرى من المهم استخلاص الأولفان وتحديد تأثير بعض الشروط المخبرية كدرجة الحرارة والـ pH في المردود تمهيداً لدراسة بعض خواصه لمعرفة مجالات استثماره مستقبلاً.

طرائق البحث ومواده:

1-الخصائص الشكلية والتصنيف لعينات الطحالب :

(1 : *Ulva fasciata Delile*, 1813 :

صف : *Ulvophyceae*

رتبة : *Ulvales*

فصيلة : *Ulva*ceae

جنس : *Ulva*

نوع : *U.fasciata*
U.lactuca

- *Ulva fasciata* : ذو مشرة خضراء صفيحية قائمة تتثبت بواسطة جزء قرصي صغير تنطلق منه أجزاء شريطية عريضة في المنتصف وضيقة قرب القمة. يبلغ طول المشرة أكثر من 30 سم، وتتميز بحواف مموجة، نوع شائع واسع الانتشار على شواطئنا ولا سيما في المياه المعرضة للتلوث بالمواد العضوية كمصبات مياه الصرف الصحي.
- *Ulva lactuca* : يتميز بمشرة صفيحية عريضة ذات لون أدكن من النوع الأول ويتواجد النوعان بكميات كبيرة على الشواطئ السورية(Mayhoob,1976؛ Abbas,1992).(شكل1 و2)

الشكل(1) الشكل العام لطحلب *Ulva lactuca* الشكل(2) الشكل العام لطحلب *Ulva faciata*

2-جمع العينات الطحلبية :

جمعت عينات *U. fasciata* و *U. lactuca* من شاطئ المدينة الرياضية (بمدينة اللاذقية) خلال ربيع 2020 ،وتم غسلها بالماء العذب ثم بالماء المقطر بشكل جيد وذلك للتخلص من الملوحة والشوائب العالقة بها ثم نقلت إلى المخبر بأكياس بلاستيكية وجففت في الظل لعدة أيام ثم في محمٍ عند الدرجة 60^0 م حتى ثبات الوزن، وسحقت بطاحونة كهربائية لتصبح على شكل مسحوق ناعم، وضعت في عبوات بلاستيكية محكمة الإغلاق لحين الاستعمال، وسجلت المعلومات المتعلقة بمكان وتاريخ الجمع.

3-استخلاص مركب الأولفان :

تم وضع 60 غ من مسحوق النوعين الطحلبيين كل على حدا في 1 ل من محلول حمض كلور الماء pH=2 ، وحرك، ثم وضع في حمام مائي ساخن بدرجة حرارة 90^0 م لمدة 3 ساعات، بعد ذلك رشح وبرد بدرجة حرارة الغرفة، وتم تثفيله (10000 دورة/الدقيقة لمدة 20 دقيقة)، ورشح القسم الطافي مرة ثانية، ومن ثم تم تعديل pH الوسط إلى 3.5 بإضافة NaOH، وبعد ذلك تمت إضافة 3 أضعافه من الإيتانول 96%، ووضع في المثفلة من جديد(5000 دورة/الدقيقة لمدة 20 دقيقة)، ثم أخذ الراسب وتمت معالجته مرة ثانية بالإيتانول وثفل أيضاً (5000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق)، ثم جفف عند الدرجة 40^0 م حتى ثبات الوزن ،ثم طُحِن لحين استخدامه.(Yaich *etal*.,2013)

حساب المردود من العلاقة : المردود Y%= (الوزن الجاف للأولفان) / (الوزن الجاف للطحالب) × 100

وأجريت 5 مكررات لكل نوع من الطحالب.

كررت طريقة الاستخلاص ذاتها للنوعين، مع تعديل الشروط من درجتي الحرارة والـpH ثم تم حساب المردود لكل تجربة، وقورنت النتائج.

تم إجراء البحث في مخابر قسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم بجامعة تشرين.

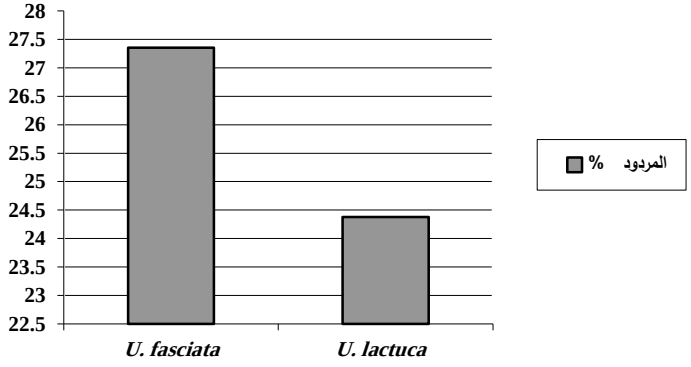
النتائج و المناقشة :

1-استخلاص الأولفان:

أظهرت النتائج جدول(1) والشكل(3)، أن المردود الأعلى للأولفان كان من الطحلب *U. fasciata* حيث بلغ 27.35% في حين كان المردود من الطحلب *U. lactuca* 24.38%

جدول (1) الوزن الجاف والمردود في الشروط المثلى

نوع الطحلب	الوزن الجاف مقدراً بالـ غ	المردود%
U. fasciata	16.41	27.35
U. lactuca	14.63	24.38



الشكل (3) التمثيل البياني للمردود في الشروط المثلى

وهذا يتوافق مع (Hussein *etal*,2015) في مصر مع اختلاف النسبة، حيث بلغ المردود من *U. fasciata* 16.96% ومردود *U. lactuca* 14.83%، وتوافق مع مجال المردود في أمريكا حيث تراوحت 29-8% (Lahaye and Robic,2007)، وتفوقت هذه النسب للمردود على نسبته في البرازيل 21.1% (Paulert *etal*,2010) والفيلبين 23.71% (Magdugo *etal*,2020) واليابان8.5% (Tako *etal*,2015) وفرنسا 21.5% (Robic *etal*,2009)، في حين انخفض عن مستوى المردود في تونس البالغ 32.67% (Yaich *etal*,2013)، أرجعت هذه الاختلافات في قيم المردود وفق العديد من الدراسات إلى اختلاف أنواع الطحالب المستخدمة والشروط الفيزيولوجية والبيئية المرافقة لنموها (Cardozo *etal*., 2007; Wang *etal*., 2014)، كما أن المحصول الكمي والنوعي للأولفان ممكن أن يتفاوت بشكل ملحوظ اعتماداً على طريقة الاستخلاص وعمليات التنقية ومصدر الكتلة العضوية للطحالب (Alves *etal*,2013) بالإضافة إلى شروط تخزين الكتلة العضوية للطحالب التي تم جمعها والمعالجة قبل الاستخلاص (Robic *etal*,2008) .

2- تأثير درجتي الـ pH والحرارة على المردود:

جدول (2) الوزن الجاف مقدراً بـ(g) من الأولفان المستخلص من طحلب *U. fasciata*

pH / الحرارة	1	1.5	2	2.5	3	3.5
75	6.26	8.29	11.03	11.48	10.98	10.09
80	6.76	9.14	13.45	12.78	11.54	11.01
85	8.59	11.82	17.73	14.51	13.42	11.36
90	7.28	11.18	16.41	13.27	12.10	10.34
95	7.23	10.46	14.65	12.50	11.60	10.17

جدول(3) مردود الأولفان % المستخلص من طحلب *U. fasciata*

pH / الحرارة	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**
75	10.43	13.81	18.38	19.13	18.30	16.81
80	11.26	15.23	22.41	21.30	19.23	18.35
85	14.31	19.70	29.55	24.18	22.36	18.93
90	12.13	18.63	27.35	22.11	20.16	17.23
95	12.05	17.43	24.41	20.83	19.33	16.95

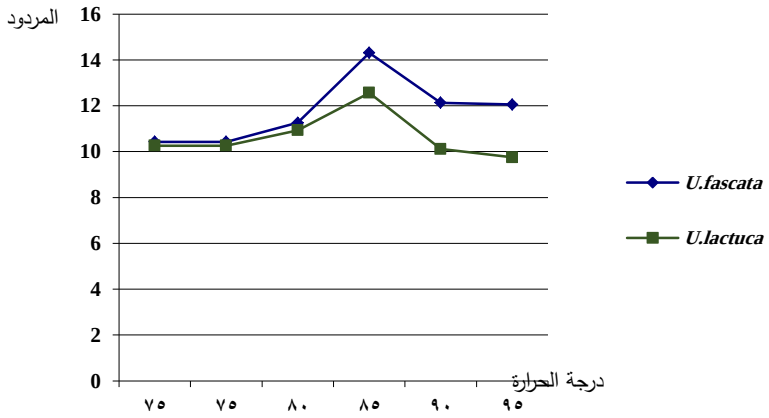
جدول(4) الوزن الجاف مقدراً بـ(g) من الأولفان المستخلص من طحلب *U. lactuca*

pH / الحرارة	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**
75	6.16	7.49	10.33	10.77	9.16	7.87
80	6.56	8.51	13.14	11.66	10.39	9.74

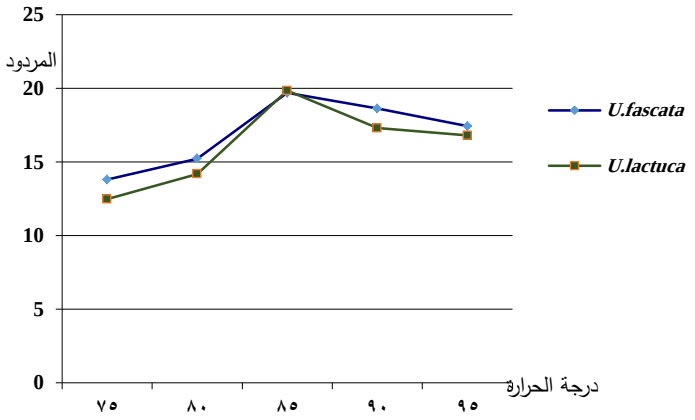
85	7.54	11.91	16.27	12.68	12.43	10.78
90	6.07	10.39	14.63	12.14	11.06	9.20
95	5.85	10.09	14.05	10.93	10.64	8.35

جدول(5) مردود الأولفان % المستخلص من طحلب *U. lactuca*

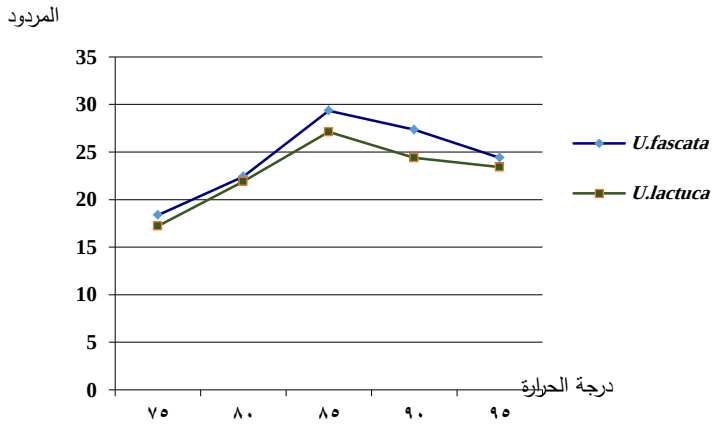
pH / الحرارة	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**
75	10.26	12.48	17.21	17.95	15.26	13.11
80	10.93	14.18	21.90	19.43	17.31	16.23
85	12.56	19.85	27.11	21.13	20.71	17.96
90	10.11	17.31	24.38	20.23	18.43	15.33
95	9.75	16.81	23.41	18.21	17.73	13.91



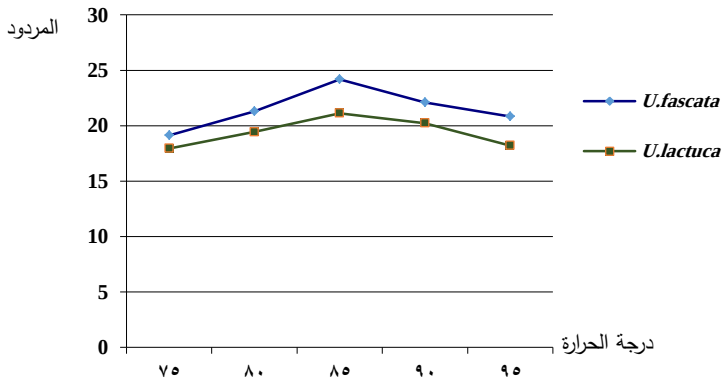
الشكل(4) تمثيل بياني للمردود عند درجة pH=1 بدرجات حرارة مختلفة



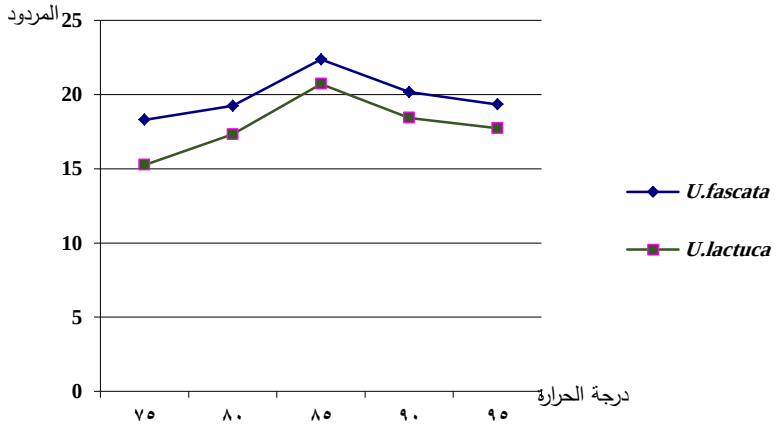
الشكل(5) تمثيل بياني للمردود عند درجة pH=1.5 بدرجات حرارة مختلفة



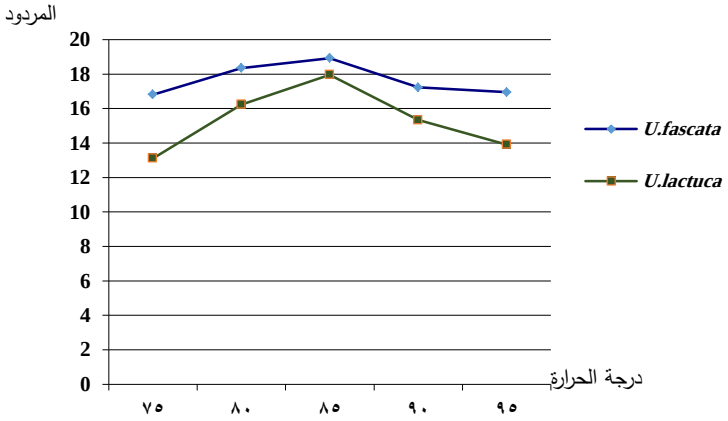
الشكل(6) تمثيل بياني للمردود عند درجة pH=2 بدرجات حرارة مختلفة



الشكل(7) تمثيل بياني للمردود عند درجة pH=2.5 بدرجات حرارة مختلفة



الشكل(8) تمثيل بياني للمردود عند درجة pH=3 بدرجات حرارة مختلفة



الشكل(9) تمثيل بياني للمردود عند درجة pH=3.5 بدرجات حرارة مختلفة

أظهرت النتائج أن القيمة العظمى للمردود بلغت 29.55% من طحلب *U. fasciata* مقابل 27.11% من طحلب *U. lactuca* عند درجة pH=2 ودرجة حرارة 85^0 م، وأخذت المنحنيات بالارتفاع نحو الحد الأعظمي المذكور ثم انخفضت تدريجياً شكل (6)، في حين كانت أخفض قيمة للمردود 9.75% من طحلب *U. lactuca* عند درجة pH=1 ودرجة حرارة 95^0 م مقابل 10.43 %من طحلب *U. fasciata* عند درجة pH=1 ودرجة حرارة 75^0 م الجدول(5) و(3) ومن الممكن أن يعزى هذا الانخفاض إلى تفاعلات الأولفان مع مكونات جدار الخلايا الأخرى(Robic *etal*, 2009).

لوحظ عند تعديل الحموضة pH=1.5 وفي الدرجة 85^0 م، ازداد مردود الأولفان ليصبح 19.85% من طحلب *U. lactuca* جدول(5) شكل(5) ، بينما كانت القيم العظمى الموافقة لدرجات الـ pH : 2.5 و 3 و3.5 كانت على الترتيب: 21.13% ، 20.71% ، 17.96% للطحلب ذاته جدول(5) في حين كانت لطحلب *U. fasciata* جدول(3) 24.18% و22.36% و18.93% على الترتيب عند نفس الشروط.

توافقت هذه النتائج مع دراسة (Yaich *etal*,2013) من حيث قيمة pH واختلفت عنها بدرجة الحرارة، كما وافقت دراسة (Kidgell, *etal*,2019) من حيث pH ودرجة الحرارة معاً.

تشير النتائج إلى انخفاض المردود تدريجياً بالابتعاد عن درجة الحرارة 85^0 م للأعلى أو للأسفل، وقد يعزى ذلك إلى أن درجات الحرارة المرتفعة قد تسبب تفكك في الروابط مما يؤدي إلى تناقص المردود في حين درجات الحرارة المنخفضة تكون غير قادرة على انتزاع الأولفان المتوضع في جدران خلايا الطحلب (Lahaye and Robic, 2007; Robic *etal*, 2009)، كما تشير إلى أنه مع ازدياد درجة الـpH عن 2 درجة ينخفض المردود وبالتالي تقل الشروط المثلى لاستخلاص الأولفان أي أن هناك ترابط بين درجتي الـpH والحرارة.

الاستنتاجات والتوصيات:

1- زيادة مردود الأولفان المستخلص من طحلب *U. fasciata* (27.35%) مقارنةً بمردود الأولفان المستخلص من *U. lactuca* (24.38%) في نفس الشروط المرجعية.

2- وافقت درجة pH=2 القيمة العظمى للمردود المستخلص عند درجة حرارة 85 مئوية إذ بلغت (29.55%) من طحلب *U. fasciata* مقابل (27.11%) من *U. lactuca*.

3- نوصي باستخلاص الأولفان من أنواع أخرى من الطحالب الخضراء السورية لأهميته الطبية والصيدلانية والزراعية.

4- نوصي بدراسة تأثير شروط أخرى للاستخلاص مثل المدة ودرجات حرارة و pH مختلفة.

References:

1. Dawod.N,Mesto.B.*contribution to recovery the antimicrobial properties of some marine algae*. Damascus University Journal.vol(13)(2),1997,109-116.
2. Deeb.G,Abbas.A,Takla.M. *the effect of some Syrian algae powder on the growth of tomato plant under different conditions (laboratory and green house).*Tishreen University Journal, Vol(39),2017
3. ABBAS, A. 1992- Master Thesis. *Contribution to the study of marine benthic algae on the coast of Latakia*. Tishreen University - Faculty of Sciences – Syria.
4. Alves.A, Sousa.R, Reis.R.*practical perspective on ulvan extracted from green algae*, J. Appl. Phycol. 25 (2013) 407–424.
5. Cardozo, K,Guaratini, T,Barros, M,Falcão,V,Tonon, A,Lopes,N,Pinto,E. *Metabolites from algae with economical impact*.Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, 146(1-2),2007, 60-78.
6. Cassolato, J.E.F.; Noseda, M.D.; Pujol, C.A.; Pellizzari, F.M.; Damonte, E.B.; Duarte, M.E.R. *Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed Gayralia oxysperma*. Carbohydr. Res. 2008, 343, 3085–3095.
7. Cunha,L., A. *Grenha, Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications*, Mar. Drugs 14 ,2016, 1– 42.
8. Huimin, Q.; Tingting, Z.; Quanbin, Z.; Zhien, L.; Zengqin, Z.; Ronge, X.*Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from Ulva pertusa Kjellm (Chlorophyta)*. J. Appl. Phycol.2005, 17,527-534.

9. Hussein .M; Hamouda.R; El-Naggar.N. and Karim-Eldeen.M.*Characterization, antioxidant potentiality and biological activities of the polysaccharide ulvan extracted fromthe marine macroalga ulva spp*. J.Agric.Chem.and Biotechn., Mansoura Univ.Vol. 6 (9),2015, 373 – 392.
10. Ivanova, V.; Rouseva, R.; Kolarova, M.; Serkedjieva, J.; Rachev, R.; Manolova, N. *Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from Ulva lactuca. Prep. Biochem*.24, 1994, 83–97.
11. Kidgella,J.T, Marie Magnussonb, Rocky de Nysa, Christopher R.K. Glassonb. *Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function*. Algal Research 39 ,2019, 101422.
12. Kim, K. I., Seo, H. D., Lee, H. S., Cho, H. Y., and Yang, H. C. *Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of Hizikia fusiforme Korean J*. Food Sci. Nutr. 27, 1998, 1204–1210.
13. Lahaye, M., and Robic, A. *Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds*. Biomacromolecules.8, 2007, 1765–1774.
14. Magdugo.R, Terme.N, Lang.M, Pliego-Cortés .H , Marty .C, Hurtado.A, Bedoux.G, and Bourgougnon.N. *An Analysis of the Nutritional and Health Values of Caulerpa racemosa (Forsskål) and Ulva fasciata (Delile)—Two Chlorophyta Collected from the Philippines.* Molecules, MDPI, 25 (12), 2020,2901.
15. Mayer, A. M. and Hamann, M. T. *Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 132, 2002, 315–339.
16. 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, 286.
17. MURATA, M. and NAKAZOE, J.*Production and use of marine algae in Japan*. Jpn. Agric. Res. Q. 35,2001, 281–290.
18. Paulerta.R, Ebbinghausb.D, Urlassb.C and Moerschbacher.B. *Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants*. Plant Pathology , 59,2010, 634–642.
19. Qia, H.; Huang, L.; Liu, X.; Liu, D.; Zhang, Q.; Liu, S. *Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta).* Carbohydr. Polym. 2012, 87,1637–1640.
20. Robic .A, Rondeau-Mouro.C, Sassi .J, Lerat .Y, Lahaye.M. *Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae Ulva rotundata (Ulvales, Chlorophyceae).* Carbohydrate Polymers 77 (2009) 206–216.
21. Robic.A, Sassi.J, Lahaye.M, *Impact of stabilization treatments of the green seaweed Ulva rotundata (Chlorophyta) on the extraction yield*, the physico-chemical and rheological properties of ulvan, Carbohydr. Polym. 74 ,2008, 344–352.
22. SCHLICHTING, Jr., H.E. *Protein quality of some fresh water algaeEcon*. Botan. 25, 1971, 317-319.

23. SYNYTSYA, A., KIM, W. K., KIM, S. M., POHL, R., SYNYTSYA, A., KYASNICKA, F., COPIKOVA, J., and PARK, Y. I. *Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed Undaria pinnatifida*. Carbohydr. Polym. 81, 2010, 41–48.
24. Tako1.M, Tamanaha.M, Tamashiro.Y, Uechi.S. *Structure of Ulvan Isolated from the Edible Green Seaweed, Ulva pertusa*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2015, 6, 645-655.
25. Wang, L., Wang, X., Wu, H., and Liu, R. *Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. Marine Drugs*, *12*(9),2014, 4984-5020.
26. Yaich.H, Ben Amira.A, Abbes.F, Bouaziz.M, Besbes.S, Richel.A, Blecker.C, Attia.H, Garna.H. *Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from Ulva lactuca collected in Monastir coast*, International Journal of Biological Macromolecules, S0141-8130(17) , 2017,32003-2.