



Université du Québec
à Rimouski

EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DE LA MARENNINE

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise sur mesure
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

PAR

©WILLIAM BÉLANGER

Juillet 2021

Composition du jury :

Karine Lemarchand, présidente du jury, Institut des sciences de la mer de Rimouski

Réjean Tremblay, directeur de recherche, Institut des sciences de la mer de Rimouski

Richard Saint-Louis, codirecteur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Dror Warschawski, examinateur externe, Sorbonne Université

Dépôt initial le 22 avril 2021

Dépôt final le 8 juillet 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Réjean Tremblay et Richard Saint-Louis pour leur encadrement et leur soutien tout au long de mes recherches, de même que pour leur patience et leur révision exhaustive des manuscrits. La confiance qu'ils m'ont accordée m'a fait bénéficier d'une ample liberté dans les activités de recherches et je l'apprécie grandement. Merci à l'équipe du laboratoire RMN de l'UQAM pour leur accueil et leur contribution, de même qu'à Steeven Ouellet, Marie-Ève Anglehart, Nathalie Gauthier et Martin Forêt pour leur aide et leur expertise technique.

J'aimerais remercier également Jean-Bernard Pouvreau, François Turcotte, Jean-François Bardeau, Jens Dittmer, Jean-Luc Mouget et Romain Gastineau pour leur disponibilité et leurs réponses à mes questions, de même que les membres du jury pour leur évaluation de mon travail.

Merci à Ressources Aquatiques Québec et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour avoir rendu ces recherches possibles.

Enfin, je tiens à exprimer ma plus sincère reconnaissance à ma famille et à ma conjointe exceptionnelle pour leur présence et leur soutien.

RÉSUMÉ

L'appellation "marennine" désigne un pigment produit par des diatomées du genre *Haslea*, possédant des propriétés bioactives pouvant affecter la pathogénicité de certaines bactéries. Mieux connue pour sa faculté à teindre la chair des mollusques, une particularité à l'origine des célèbres "fines de claire vertes", elle présente aussi un intérêt en tant que composé prophylactique en aquaculture. En réponse aux défis rencontrés quant à sa purification, le but de cette recherche est de développer un procédé d'extraction sur phase solide graphitique qui soit adapté aux propriétés de la marennine. L'hypothèse testée est la suivante : la marennine devrait être principalement adsorbée par des interactions ioniques et hydrophobes. Les résultats ont permis de confirmer cette hypothèse, en plus de mettre en évidence la modularité des interactions ioniques, qui sont partiellement inhibables par l'ajout d'agents réducteurs. Ce faisant, la désorption est régie par l'état d'ionisation de l'analyte et le pouvoir éluotrope de la phase mobile, avec pour résultat un comportement similaire à la chromatographie en phase inverse. Qui plus est, des travaux de purification ont mené à l'isolation d'un groupe de coproduits à partir de l'eau bleue, dont la caractérisation suggère un potentiel pharmacologique. Le procédé d'extraction développé dans le cadre de ce mémoire a permis d'atteindre un rendement satisfaisant (66% comparativement à 57% pour la méthode traditionnelle d'ultrafiltration), avec une qualité apparemment similaire à la voie de préconcentration précédente. En respect des principes de chimie verte, l'usage de produits non toxiques, biosourcés et biodégradables a été favorisé. Notre méthode novatrice se démarque par son aspect économique et sa simplicité, des qualités qui permettront une accessibilité accrue de la marennine, un préalable pour les travaux de recherche futurs et le développement de son potentiel industriel.

Mots clés : noir de carbone graphité, graphite, extraction sur phase solide, marennine, polysaccharide sulfaté, diatomée

ABSTRACT

The name "marennine" designates a pigment produced by diatoms of the *Haslea* genus, possessing bioactive properties which can affect the pathogenicity of some bacteria. Better known for its ability to dye the flesh of molluscs, a feature at the origin of the famous "fines de claire vertes", it is also of interest as a prophylactic compound in aquaculture. In response to the challenges encountered towards its purification, the goal of this research is to develop a solid phase extraction process on graphitic matrices which is adapted to marennine properties. The hypothesis tested is as follows : marennine should be adsorbed mainly by ionic and hydrophobic interactions. The results confirmed this hypothesis, in addition to highlighting the chemically modifiable nature of the ionic interactions, which are partially inhibited by the addition of reducing agents. In doing so, desorption is driven by the ionization state of the analyte and the elutropic power of the mobile phase, resulting in a behavior similar to reverse phase chromatography. Furthermore, purification work led to the isolation of a group of co-products from blue water, with characteristics suggesting pharmacological potential. The extraction process developed within the framework of this thesis achieved a satisfactory yield (66% compared to 57% for traditional ultrafiltration process), with a quality seemingly similar to the previous preconcentration method. In respect to green chemistry principles, the use of non-toxic, bio-based and biodegradable chemicals has been favored whenever possible. This innovative method stands out for its low cost and its simplicity, qualities allowing an increased accessibility of marennine, a prerequisite for future research work and the industrial development.

Keywords : graphitized carbon black, graphite, solid-phase extraction, marennine, sulfated polysaccharide, diatom

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Problématique	2
<i>Haslea</i> spp. et "Fines de Claire Vertes"	4
Marennine : Extraction et Caractérisation	5
Extraction sur Phase Stationnaire Graphitique	8
Objectifs & Méthode	9
CHAPITRE 1	
AMÉLIORATION DE L'EXTRACTION DU PIGMENT BIOACTIF BLEU-VERT "MARENNINE" À PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DE LA DIATOMÉE <i>HAS- LEA OSTREARIA</i> : UN PROCÉDÉ D'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EM- PLOYANT UN SORBANT GRAPHITIQUE	10
1.1 Résumé en français	11
1.2 Extraction Improvement of the Bioactive Blue-Green Pigment "Maren- nine" from Diatom <i>Haslea ostrearia</i> 's Blue Water : A Solid-Phase Me- thod Based on Graphitic Matrices	12
DISCUSSION GÉNÉRALE	38
ANNEXE I	
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	45
ANNEXE II	
FABRICATION D'UN SPECTROPHOTOMÈTRE MONOCHROMATIQUE	47
RÉFÉRENCES	53

LISTE DES TABLEAUX

1 Nomenclature d'assemblage 52

LISTE DES FIGURES

1	Contribution de l'aquaculture à la production mondiale des produits de la mer, excluant les plantes aquatiques.	2
2	Photomicrographie de <i>Haslea karadagensis</i>	5
3	Spectres d'absorbance UV-visible de la marennine extracellulaire provenant de <i>H. ostrearia</i> et <i>H. karadagensis</i>	7
4	Allotropes cristallins du carbone.	8
5	Structures typiques du fucoïdane extrait des algues brunes.	41
6	Fractions obtenues par chromatographie d'échange anionique semi-préparative.	42
7	Spectre ^1H de l'extrait de polysaccharides sulfatés. DMSO- d_6 , 25°C. . .	46
8	Spectre ^1H de l'extrait de polysaccharides sulfatés. DMSO- d_6 , 25°C. . .	46
9	Photos du spectrophotomètre.	48
10	Vue intérieure et présentation des composantes principales.	49
11	Vue d'ensemble du porte-cuvette.	49
12	Schéma électrique de la carte mère et disposition des connecteurs. . . .	50
13	Schémas électriques des composantes du porte-cuvette.	50
14	Capture d'écran du logiciel d'acquisition des données.	51

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ATR** Réflexion totale atténuée
- BBFO** Sonde d'observation large bande, ¹⁹F
- DEAE** Diéthylaminoéthyle
- DEL** Diode électroluminescente
- FFF** Fused filament fabrication
- FTIR** Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- GCB** Noir de carbone graphité
- GPL** GNU General Public License
- LC** Chromatographie liquide
- LPS** Lipopolysaccharides
- MS** Spectrométrie de masse
- RMN** Résonance magnétique nucléaire
- SPE** Extraction sur phase solide
- UART** Universal asynchronous receiver transmitter

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'aquaculture est le secteur alimentaire ayant connu le développement le plus rapide au monde, avec une expansion marquée depuis les années 1980 (FAO, 2018). La contribution de l'aquaculture équivaut désormais à près de la moitié de la production mondiale des produits de la mer, atteignant 46.8 % en 2016 (figure 1). Au Canada, on retrouve des activités aquacoles dans chaque province, avec une production ayant plus que quadruplée durant la période de 1995 à 2015 (Pêches et Océans Canada, 2015). La production domestique, comptant environ 45 espèces cultivées, occupe une part grandissante de l'économie canadienne, offrant ainsi des perspectives d'emploi pour les collectivités rurales et côtières (Pêches et Océans Canada, 2015). Au cours des cinq dernières années, la production aquacole moyenne s'est établie à plus de 190 000 tonnes par année, incluant près de 25 000 tonnes de moules, le coquillage le plus cultivé au Canada (Statistique Canada, 2019b ; Pêches et Océans Canada, 2017). En termes de volume et de valeur à la ferme, il s'agit de la deuxième plus importante espèce cultivée au Canada (Pêches et Océans Canada, 2017), dont près de la moitié de la production est destinée à l'exportation (Statistique Canada, 2019a). Cette tendance s'illustre à l'échelle internationale, alors que la production de mollusques est passée de 1 à 16.1 millions de tonnes, de 1950 à 2015 (FAO, 2018).

Étant des espèces extractives par leur capacité de filtration et de rétention de la matière organique de l'eau environnante, l'élevage de bivalves marins peut présenter un avantage écologique important. Ainsi, ils captent les déchets organiques issus de la culture d'espèces nourries, de même qu'ils réduisent la charge de nutriments dans l'eau. Ces caractéristiques favorisent l'utilisation de ces espèces dans un contexte d'aquaculture multitrophique intégré, répondant à la fois à des intérêts économiques et environnementaux (FAO, 2018 ; Pêches et Océans Canada, 2017). Conséquemment, on note que l'élevage de ces coquillages "constitue une façon

innovatrice [d'utiliser] nos eaux de manière durable à des fins alimentaires" (Pêches et Océans Canada, 2015). Étant promue en tant que source nutritionnelle saine et durable, la demande pour les bivalves connaît donc un intérêt soutenu.

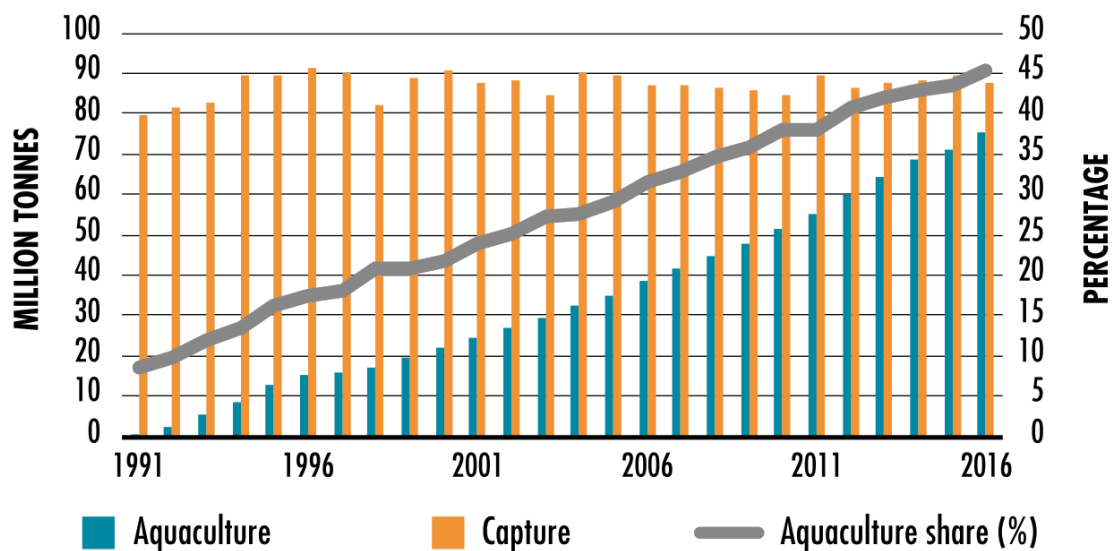


FIGURE 1 – Contribution de l'aquaculture à la production mondiale des produits de la mer, excluant les plantes aquatiques (FAO, 2018).

Problématique

À l'instar de l'agriculture moderne, l'aquaculture nécessite parfois l'usage de produits de synthèse afin de réduire les pertes occasionnées par certains pathogènes ou ravageurs. Dans ce contexte, la découverte de nouvelles molécules biodégradables est une avenue prometteuse afin de réduire les impacts négatifs sur la santé humaine et l'environnement (Syahidah *et al.*, 2015). Notamment, l'usage excessif d'antibiotiques est susceptible de causer leur persistance dans les produits consommés, en plus de favoriser l'émergence de résistances microbiennes, un phénomène auquel l'aquaculture serait particulièrement vulnérable (Watts *et al.*, 2017; Cabello, 2006).

Ces problèmes révèlent ainsi la nécessité d'intensifier les recherches en vue de la découverte d'approches alternatives et de nouveaux composés plus sécuritaires, tels les probiotiques, prébiotiques et symbiotiques. C'est ainsi que par sa vaste étendue et sa riche biodiversité, l'océan constitue une source prometteuse pour la découverte des produits alternatifs (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). À cet effet, la marennine, une molécule extraite à partir de microalgues benthiques, a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques, notamment en raison de son effet prophylactique dans les cultures de bivalves (Turcotte *et al.*, 2016).

La marennine désigne un pigment bleu-vert produit par des diatomées appartenant au genre *Haslea*. On en distingue deux formes, soit une intracellulaire, accumulée dans les vésicules, et une extracellulaire, relâchée dans le milieu de culture (Gastineau *et al.*, 2014). Cette dernière, dénommée "eau bleue", est la plus communément utilisée. D'abord une curiosité, elle fut découverte grâce à ses propriétés colorantes, conférant une valeur ajoutée dans les élevages de moules, huîtres et autres bivalves (Gastineau *et al.*, 2014). Plus récemment, ce sont ses propriétés bioactives qui ont retenu l'attention (Falaise *et al.*, 2019; Turcotte *et al.*, 2016; Gastineau *et al.*, 2012b). En dépit de plusieurs décennies de recherche, sa famille chimique demeure toutefois méconnue. Cela s'explique par sa masse moléculaire élevée, de même que par la co-extraction de contaminants, deux conditions entravant les travaux de caractérisation.

L'élaboration d'une méthode d'extraction économique et techniquement accessible est un préalable essentiel en vue de l'avancement des travaux de purification et d'une éventuelle analyse structurale de la marennine. Conséquemment, le développement d'une technique innovante d'extraction sur phase solide graphitique a été envisagé afin de répondre à ces objectifs.

***Haslea* spp. et "Fines de Claire Vertes"**

L'appellation "marennine" provient de la région à l'origine de sa découverte, en référence à la baie de Marennes-Oléron, un lieu majeur de production ostréicole dans le sud-ouest de la France (Gastineau *et al.*, 2014). Cette région, de même que la baie de Bourgneuf, est renommée pour la production des huîtres vertes. Les huîtres y sont élevées dans d'anciens marais salants appelés "claires", des étangs riches et peu profonds utilisés pour l'engraissement et l'affinage (Gastineau *et al.*, 2014). Dans ces étangs prolifèrent de nombreuses espèces phytoplanctoniques, incluant parfois des *Haslea*. Au fil des ans, ces dernières peuvent y dominer, augmentant ainsi la concentration de marennine dans l'eau (Gastineau *et al.*, 2014). En résulte alors le verdissement des branchies, intestins et palpes labiaux des huîtres, de même qu'une modification de leurs propriétés organoleptiques (Pouvreau, 2006). Les "fines de claires" deviennent alors des "fines de claire vertes", un produit de niche. Cette coloration est réversible et affecte de nombreuses espèces, incluant les polychètes, crabes, littorines, moules, anémones, pétoncles, palourdes et coques (Pouvreau, 2006; Gastineau *et al.*, 2014).

Haslea ostrearia est une espèce de diatomée appartenant à la famille des Naviculaceae. Sa frustule est fusiforme et symétrique, et ses apex présentent chacun une vésicule, qui deviennent bleu suite à l'accumulation de la marennine intracellulaire (figure 2) (Pouvreau, 2006). L'espèce *ostrearia* est décrite comme étant tychopélagique, soit benthique, planctonique et parfois épiphyte (Robert, 1983). Elle est euryhaline et peut proliférer dans une eau tempérée ou tropicale, de même que dans des environnements très lumineux (Gastineau *et al.*, 2014; Pouvreau, 2006).

Comme la plupart des diatomées pennées, *Haslea ostrearia* synthétise de nombreux pigments, notamment la chlorophylle *a*, *b* et *c*, de même que certains caroté-

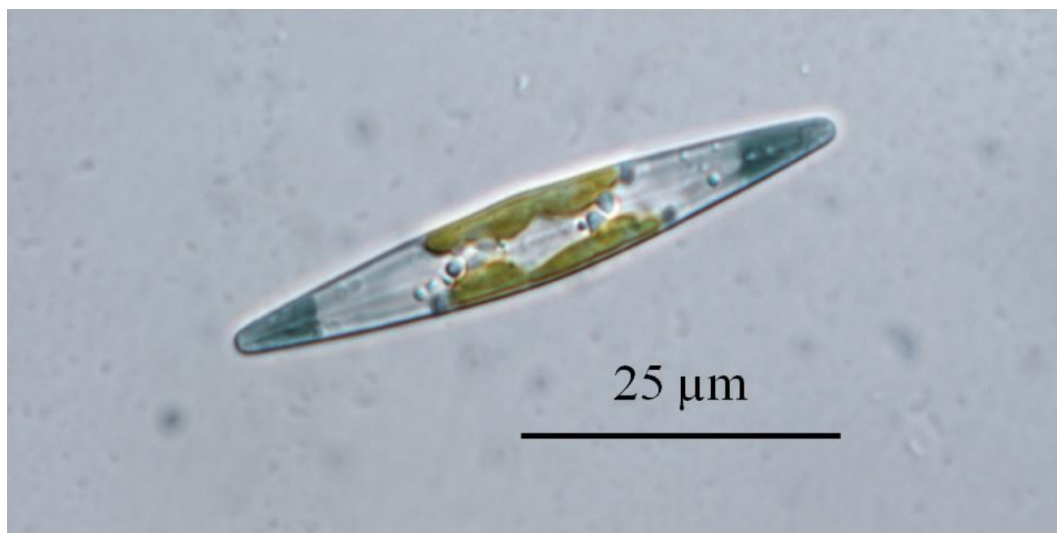


FIGURE 2 – Photomicrographie de *Haslea karadagensis* (Gastineau *et al.*, 2014).

noïdes, incluant le β carotène ainsi que des xanthophylles (fucoxanthine, diatoxanthine et diadinoxanthine) (Pouvreau, 2006). La marennine, un pigment apparemment unique au genre *Haslea*, se présente sous deux formes, soit intra- et extracellulaire, dont le processus d'externalisation pourrait s'effectuer par diffusion lors de la croissance ou de la sénescence des cellules (Pouvreau, 2006). Seule l'extraction de la forme extracellulaire a été étudiée dans le cadre de ce mémoire.

Marennine : Extraction et Caractérisation

Bien que de nombreuses approches aient été explorées afin d'extraire la marennine, aucune d'entre elles n'a mené à l'obtention d'une pureté suffisante permettant la caractérisation complète de sa structure moléculaire. Ces techniques comprennent l'utilisation d'un homogénéisateur à haute pression, des extractions solides-liquides employant des solvants aqueux ou organiques, ou encore des séparations par membranes ou chromatographie liquide (Pouvreau, 2006 ; Gastineau *et al.*, 2014). De même, l'identité chimique de la marennine a fait l'objet de nombreuses hypothèses, incluant

un complexe pigment-protéine, un caroténoïde, un produit de dégradation de la chlorophylle ou une anthocyane (Gastineau *et al.*, 2014).

En réponse à ces défis, l'équipe de Jean-Bernard Pouvreau a publié en 2006 leurs travaux concernant l'extraction et la caractérisation de la marennine (Pouvreau *et al.*, 2006a,b). Leur méthode a permis d'améliorer la qualité des extraits grâce à un procédé semi-préparatif en trois étapes, combinant deux membranes d'ultrafiltration (3 et 30 kDa), suivie d'une purification par chromatographie d'échange d'anions et d'une dialyse. Cette contribution a démontré des différences entre les formes intra- et extracellulaires, en plus de fournir de nouveaux indices quant à leur famille chimique. Enfin, l'hypothèse d'un composé apparenté aux proanthocyanidines, un polymère polyphénolique, a été énoncée.

Alors qu'aucun carbohydrate n'a été détecté à la suite d'une hydrolyse acide et d'un test colorimétrique (Pouvreau *et al.*, 2006a), des analyses par spectroscopie en résonance magnétique nucléaire (RMN) ont identifié des signaux suggérant la présence de polysaccharides (Gastineau *et al.*, 2014). Afin d'expliquer cette contradiction, l'hypothèse d'interférences a été avancée, et l'on suggère plutôt une possible complexation entre un chromophore et une macromolécule. Bien que les résultats soient difficiles à interpréter, une corrélation a été observée à 28/1.22 ppm ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$), avec une forte intensité de ce signal dans le spectre du proton pour les espèces *H. ostrearia* et *H. provincialis*. Les expériences de RMN ont permis de confirmer l'appartenance de ce signal à la macromolécule, qui proviendrait de la résonance de méthylènes (CH_2), voire de chaînes aliphatiques. Enfin, les signaux correspondant aux cycles aromatiques ont été trop faibles pour confirmer la présence de polyphénols (Gastineau *et al.*, 2014).

En plus des différences entre les deux formes de marennine, on note également des spécificités parmi les pigments extraits à partir des autres espèces d'*Haslea*. Bien que l'on retrouve le caractère halochrome pour la marennine extraites de *Haslea kara-*

dagensis, *H. silbo* et *H. provincialis*, les λ_{\max} d'absorbance UV-visible diffèrent chez *H. karadagensis* (figure 3) (Gastineau, 2011). De même, *H. ostrearia* présente deux points isobestiques pour la forme extracellulaire, contre un seul pour *H. silbo* et *H. provincialis*, qui semblent plutôt correspondre à la forme intracellulaire (Gastineau, 2011). Cette caractéristique spectrale serait liée au mode d'externalisation de la marennine, qui pourrait subir un clivage lors de l'excrétion par *H. ostrearia* (Gastineau, 2011). Cette idée est appuyée par la masse moléculaire inférieure de la forme extracellulaire (Pouvreau *et al.*, 2006a).

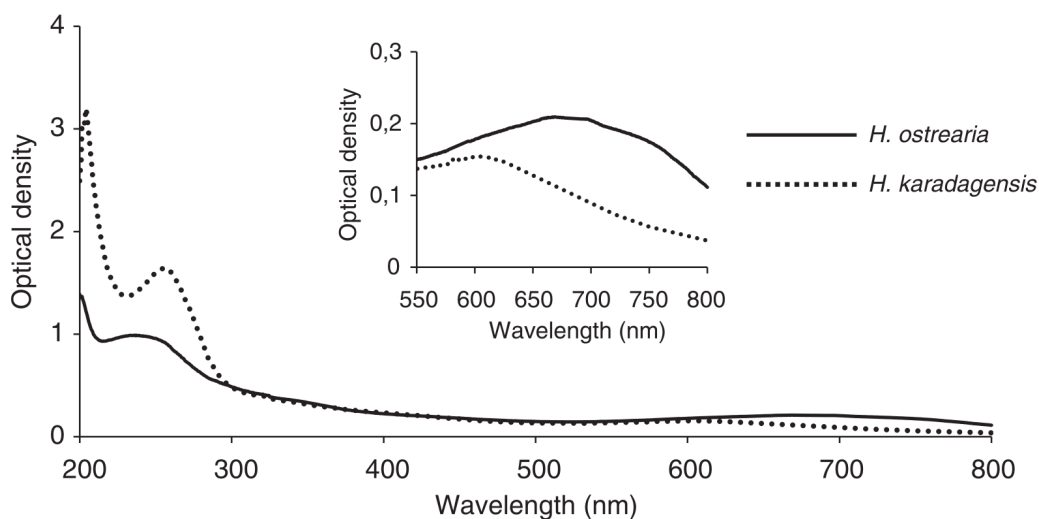


FIGURE 3 – Spectres d'absorbance UV-visible de la marennine extracellulaire provenant de *H. ostrearia* et *H. karadagensis*. L'encadré met en évidence la disparité des λ_{\max} dans la région du visible. (Gastineau *et al.*, 2012a)

Extraction sur Phase Stationnaire Graphitique

L'approche proposée dans ce mémoire consiste en une extraction sur phase solide (SPE) utilisant une phase stationnaire graphitique (Bélanger *et al.*, 2020). Cette méthode repose sur l'usage d'un support spécialisé appelé "noir de carbone graphité", ou *graphitized carbon black* (GCB).

Le graphite est un allotrope cristallin du carbone, à l'instar des nanotubes de carbones, du fullerène et du diamant (figure 4). Les atomes de carbones y sont disposés dans un arrangement hexagonal formant des feuillets d'un atome d'épaisseur. Ces couches, appelées graphène, sont densément et parallèlement superposées, formant ainsi la structure tridimensionnelle du graphite. D'apparence noire à grisâtre, ce dernier bénéficie d'une faible réactivité chimique et possède une forte stabilité thermique. Ces propriétés, de surcroît à sa conductivité électrique, font du graphite un candidat pour de nombreuses applications industrielles (Kharisov et Kharissova, 2019).

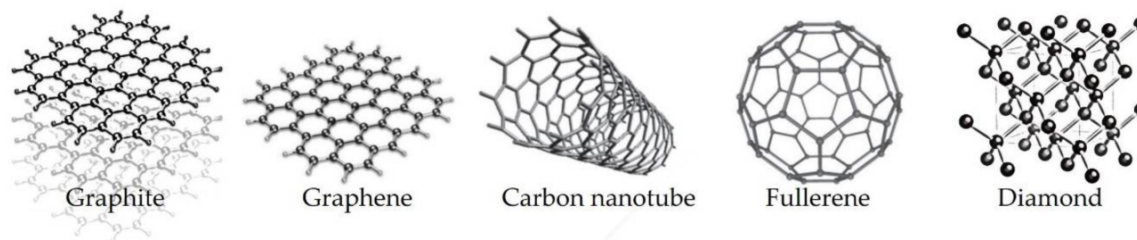


FIGURE 4 – Allotropes cristallins du carbone (Giubileo *et al.*, 2018).

De même, les supports graphités présentent un intérêt particulier en chromatographie (West *et al.*, 2010). La diversité des interactions intermoléculaires qu'ils exercent comprend à la fois des attractions polaires (Liška, 2000), apolaires (Michel et Buszewski, 2009) et ioniques (Shibukawa *et al.*, 2004), ce qui en fait des supports uniques par rapport aux phases stationnaires habituelles.

Objectifs & Méthode

Compte tenu des connaissances actuelles sur la nature potentielle de type anionique amphiphile de la marennine, nous posons l'hypothèse qu'elle devrait être principalement adsorbée par des interactions ioniques et hydrophobes. Spécifiquement, les objectifs sont (1) établir les paramètres clés permettant d'optimiser le rendement d'extraction sur cartouche graphitique SPE, (2) comparer le rendement et la pureté avec les extraits produits par ultrafiltration, (3) déterminer le potentiel de la SPE pour l'élimination des sels issus du milieu de culture et (4) développer une approche permettant d'améliorer la pureté des extraits. Afin de répondre à ces objectifs, une série d'expériences a été menée pour (1) déterminer l'effet exercé sur le rendement par la concentration en solvant organique, le pH, la force ionique et l'ajout d'agents réducteurs, (2) évaluer le rendement de l'ultrafiltration et comparer la pureté à l'aide de ratios d'absorbance UV-visible, (3) analyser la concentration en cations aux étapes clés du procédé et (4) développer des éluents sélectifs pour l'isolation de la marennine et d'autres biomolécules. Les principes fondamentaux qui régissent l'extraction sont expliqués en détail dans l'article 1.

CHAPITRE 1

AMÉLIORATION DE L'EXTRACTION DU PIGMENT BIOACTIF BLEU-VERT "MARENNINE" À PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DE LA DIATOMÉE *HASLEA OSTREARIA* : UN PROCÉDÉ D'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EMPLOYANT UN SORBANT GRAPHITIQUE

Cet article s'inscrit dans le cadre d'un projet de validation de la production du pigment marennine pour les besoins industriels. Le projet comprend les volets de culture semi-continue en photobioréacteur, de la mise à l'échelle, de la caractérisation du pigment et de l'optimisation des procédés d'extraction et de purification. Cet article, publié dans la revue *Marine Drugs* en décembre 2020, s'inscrit dans ces deux derniers volets. Il s'intitule « *Extraction Improvement of the Bioactive Blue-Green Pigment "Marennine" from Diatom Haslea ostrearia's Blue Water : A Solid-Phase Method Based on Graphitic Matrices* », et fut rédigé par William Bélanger, Alexandre A. Arnold, François Turcotte, Richard Saint-Louis, Jean-Sébastien Deschênes, Bertrand Genard, Isabelle Marcotte et Réjean Tremblay. Le matériel supplémentaire attaché à cet article présente des spectres RMN d'un coproduit extrait à partir de l'eau bleue. Des résultats complémentaires sont disponibles en annexe I.

Les données des sections concernant la culture des microalgues et l'ultrafiltration ont été produites par François Turcotte, biologiste à Pêches et Océans Canada. Le texte concernant ces éléments a été corédigé avec ce dernier. La caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) a fait l'objet d'une collaboration avec Alexandre A. Arnold, de l'équipe d'Isabelle Marcotte (Laboratoire de RMN des Systèmes Biologiques Complexes, UQAM). Autrement, en tant que premier auteur j'ai été responsable de l'entièreté de la rédaction, incluant l'idée originale, la méthodologie, l'expérimentation, l'analyse des résultats, l'analyse statistique et le dévelop-

pement d'un logiciel de prétraitement des données. Richard St-Louis a assisté à la conceptualisation et a assuré la supervision tout au long du projet. En plus de veiller aux aspects administratifs et financiers, Réjean Tremblay a fourni un encadrement lors de l'analyse et de la présentation des résultats. Jean-Sébastien Deschênes a contribué au développement des méthodes de culture, un préalable à l'obtention de l'eau bleue nécessaire à la réalisation de cette étude, tandis que les ressources matérielles ont été fournies par Richard St-Louis, Réjean Tremblay, Isabelle Marcotte et Bertrand Genard. Enfin, la correction du manuscrit a été effectuée par Réjean Tremblay, Richard St-Louis et Isabelle Marcotte.

1.1 Résumé en français


Le composé « marennine » est un pigment bleu-vert produit par la microalgue benthique *Haslea ostrearia*, possédant des activités de réduction de la pathogénicité contre certaines bactéries et un potentiel prometteur en tant que pigment naturel. Malgré plusieurs décennies de recherche, la famille chimique de ce composé demeure méconnue, principalement en raison des analyses structurales qui ont été entravées par la présence de composés co-extraits dans les isolats de marennine. Afin d'améliorer la pureté de l'extrait de marennine, nous avons développé une nouvelle méthode d'extraction utilisant une phase stationnaire graphitique, offrant divers avantages par rapport à la procédure classique, utilisant l'ultrafiltration en tandem. Notre méthode est plus rapide, plus polyvalente, offre un meilleur rendement brut (66%, contre 57% pour l'ultrafiltration) et se prête à une mise à l'échelle ainsi qu'à la culture continue en photobioréacteur. Notre objectif était de tirer parti des propriétés de surface modulables de la matrice graphitique en optimisant ses interactions avec la marennine. Ainsi, les effets exercés par le solvant organique, le pH et les agents réducteurs ont été étudiés. Grâce à cette amélioration de la purification de la marennine, nous avons réussi de surcroît à isoler à partir de l'eau bleue un polysaccharide sulfaté similaire

au fucoïdane. La caractérisation de la fraction polysaccharidique suggère qu'environ la moitié des composés absorbant les UV auraient été isolés des extraits bruts de marennine. La confirmation de ces polysaccharides sulfatés pourrait être une avancée majeure pour la purification de la marennine, désignant des techniques d'isolation ciblées. De même, la valeur ajoutée d'*Haslea ostrearia* et le rôle des polysaccharides dans les précédentes études de caractérisation chimique et de bioactivité de la marennine demeurent à déterminer.

1.2 Extraction Improvement of the Bioactive Blue-Green Pigment "Marennine" from Diatom *Haslea ostrearia*'s Blue Water : A Solid-Phase Method Based on Graphitic Matrices

Article

Extraction Improvement of the Bioactive Blue-Green Pigment “Marennine” from Diatom *Haslea ostrearia*’s Blue Water: A Solid-Phase Method Based on Graphitic Matrices

William Bélanger^{1,2,*}, Alexandre A. Arnold³, François Turcotte^{1,2}, Richard Saint-Louis², Jean-Sébastien Deschênes⁴, Bertrand Genard⁵, Isabelle Marcotte³ and Réjean Tremblay¹ 

¹ Institut des Sciences de la mer, Université du Québec à Rimouski, 310 des Ursulines, Rimouski, QC G5L 3A1, Canada; francois.turcotte@dfo-mpo.gc.ca (F.T.); rejean_tremblay@uqar.ca (R.T.)

² Département de Biologie, Chimie et Géographie, Université du Québec à Rimouski, 300 des Ursulines, Rimouski, QC G5L 3A1, Canada; richard_st-louis@uqar.ca

³ Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montreal, QC H3C 3P8, Canada; arnold.alexandre@uqam.ca (A.A.A.); marcotte.isabelle@uqam.ca (I.M.)

⁴ Département de Mathématiques, Informatique et Génie, Université du Québec à Rimouski, 300 des Ursulines, Rimouski, QC G5L 3A1, Canada; jean-sebastien_deschenes@uqar.ca

⁵ Iso-BioKem, 300 des Ursulines, Rimouski, QC G5L 3A1, Canada; bertrand.genard@isobiokem.ca

* Correspondence: william.belanger01@uqar.ca

Received: 15 November 2020; Accepted: 12 December 2020; Published: 18 December 2020



Abstract: The compound “marennine” is a blue–green pigment produced by the benthic microalgae *Haslea ostrearia*, with pathogenicity reduction activities against some bacteria and promising potential as a natural pigment in seafood industries. After decades of research, the chemical family of this compound still remains unclear, mainly because structural studies were impaired by the presence of co-extracted compounds in marennine isolates. To improve the purity of marennine extract, we developed a novel extraction method using a graphitic stationary phase, which provides various advantages over the previous procedure using tandem ultrafiltration. Our method is faster, more versatile, provides a better crude yield (66%, compared to 57% for ultrafiltration) and is amenable to upscaling with continuous photobioreactor cultivation. Our goal was to take advantage of the modulable surface properties of the graphitic matrix by optimizing its interactions with marennine. As such, the effects of organic modifiers, pH and reducing agents were studied. With this improvement on marennine purification, we achieved altogether the isolation of a fucoidan-related, sulfated polysaccharide from blue water. Characterization of the polysaccharides fraction suggests that roughly half of UV-absorbing compounds could be isolated from the marennine crude extracts. The identification of sulfated polysaccharides could be a major breakthrough for marennine purification, providing targeted isolation techniques. Likewise, the added value of *Haslea ostrearia* and the role of polysaccharides in previous marennine chemical characterization and bioactivity studies remain to be determined.

Keywords: graphitized carbon black; graphite; solid-phase extraction; marennine; sulfated polysaccharide; diatom

1. Introduction

Marennine designates a blue–green pigment produced by marine diatom species belonging to the genus *Haslea* [1]. Two distinct forms of marennine are available, one intracellular (IMn), accumulated

in the diatom vesicles, and another extracellular (EMn), which is released in the culture medium from the microalgae, and produce the so-called Blue Water (BW) [2]. EMn has been previously studied and showed halochromic properties [2], as well as promising prophylactic activity, where marennine does not necessarily act on bacteria growth [3], but rather on pathogenicity factors of some bacteria [4]. More recently, advances in photobioreactor (PBR) cultivation led to the development of a new artificial seawater medium which now enables suspension culture and higher yields through the optimization of calcium, magnesium and iron concentrations [5]. Although nearly two centuries passed since the first marennine studies [1], its molecular structure and chemical family are still not clearly described.

By far, the most extensive characterization to date was published in 2006 by Pouvreau et al. [2]. They assessed different structures for the intra- and extracellular pigment, and proposed a compound related to a polyphenol. While carbohydrates analyses were negative for Pouvreau's team, study from Gastineau et al. [1] noted NMR signals characteristic of glycosidic elements, suggesting a possible polysaccharide similar to chrysolaminarin. Until now, no experiment has confirmed either of those hypotheses, or the isolation of a pure pigment. Furthermore, an abundance of methyl groups and aliphatic chains were evidenced by NMR analysis [1], which adds to the mystery surrounding the chemical identity of marennine.

In light of the challenges toward the isolation of a pure marennine extract, we developed a novel solid-phase extraction (SPE) method to ease crude extract preparation. The use of carbon media for on-line pre-concentration of polar compounds is promising [6], as stationary phases such as graphitized carbon black (GCB) and porous graphitic carbon (PGC) are highly stable and exert both dispersive and electron-pair donor-acceptor interactions [6,7]. This, in addition to chemically modulable ion-exchange properties [8], allows selective retention of both polar and non-polar analytes. Thus, the unique combination of those intermolecular interactions open new avenues for bulk extraction and purification fine-tuning of marennine on a single stationary phase.

From the chemical information available so far, we expected that marennine has an anionic amphiphilic nature. Hence, to understand its behavior on the graphitic solid phase, we investigated key parameters related to ionic and hydrophobic interactions. As the retention is expected to be mainly driven by those forces, the graphite surface charge, the organic modifier concentration and the pH should exert the strongest effects on pigment recovery. In deference to green chemistry principles, we propose a food-grade method for bulk marennine extraction, by favoring environmentally suitable chemicals whenever possible. Thus, we emphasized the usage of ethanol and ethyl lactate as nontoxic and biodegradable solvents, which can both be produced from renewable feedstocks.

2. Material and Method

2.1. Algae Culture

Marennine production was conducted at the Station aquicole de Pointe-au-Père (48°31' N; 68°28' W, QC, Canada). Algal production was carried out using an axenic strain of *Haslea ostrearia* (NCC-136) isolated from Bourgneuf Bay, France and provided by Nantes Culture Collection. Cultures were grown in a semi-continuous mode in 50 kDa (KOCH Membrane, Romicon, Wilmington, DE, USA) ultrafiltered seawater enriched with F/2 media [9] and 30 mg·L⁻¹ silicates. Batch cultures were produced in 100 L flat bottom circular PBRs at light intensity of 180 μmol photons m⁻²·s⁻¹, 14/10 h light/dark cycles, temperature of 20 °C and salinity of 28 ppt. BW containing extracellular marennine from the PBRs was harvested after 35 days, when the concentration reached about 10 mg·L⁻¹. BW was filtered at 1 μm with a centrifugal pump to eliminate any cells or particles, and marennine concentration was determined on the cell-free culture water (syringe-filtered on 0.22 μm). Absorbance was measured at the visible λ_{max} (677 nm) [10], with a cuvette of 10 cm optical path length. Thus, all extracts obtained from different methods came from the same BW production.

2.2. Ultrafiltration and Dialysis: Previous Method Overview

Crude purification was conducted as published in Pouvreau et al. [10], with a scaled-up process for the treatment of high BW volumes [1,4]. The ultrafiltration system was composed of a diaphragm pump assuming the feeding of BW through 30 kDa and 3 kDa cutoffs regenerated cellulose spiral membranes (Prep/Scale-TFF cartridges 0.54 m², MilliporeSigma, Oakville, ON, Canada). Circulation flow was adjusted to 6 L·min⁻¹ and the working pressure was kept at 25 psi. Marennine was desalted by continuous diafiltration with deionized water, followed by dialysis using a Spectra/Por regenerated cellulose membrane (Repligen, Waltham, MA, USA), with a molecular weight cutoff (MWCO) of 3.5 kDa.

2.3. Mobile Phase Optimization

Key parameters of the mobile phase composition were evaluated to optimize marennine recovery extracted from BW, using the SPE-GCB method.

2.3.1. Effect of Organic Modifier

Eluents containing an increasing amount of ethyl lactate were compared. In triplicate, 4% increments of ethyl lactate were used, with concentrations ranging from 18 to 50% (*v/v*). Supelco EnviCarb 250 mg cartridges were conditioned with 6 mL ethanol, then 6 mL of an aqueous solution of 60 mM metabisulfite to equilibrate and reduce the stationary phase. Cartridges were loaded with 60 mL BW and washed with 6 mL deionized water. To minimize the hydrolysis of ethyl lactate occurring at alkaline pH, the mobile phase was prepared immediately before the elution of each sample, by mixing the organic solvent with an aqueous buffer (400 mM, ammonium bicarbonate, pH 9) containing 10 mM of sodium sulfite. Marennine concentrate was obtained by eluting 3 mL of the hydroorganic mixture, then analyzed by UV-Vis. Marennine concentration was determined by comparing the absorbance at the λ_{\max} of each sample in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length.

2.3.2. Effect of Analyte Ionization

The experiment was carried in two parts. First, the onset of the hydroorganic ionization pH_w^s was determined through successive elutions, by applying a linear gradient on the mobile phase similarly to the high-performance liquid chromatography (HPLC) method described by Kaliszan et al. for the separation of acids ionogenic analytes [11]. Then, the yield of single extractions was compared among the pH range where the analytes were ionized. The concentration of ethyl lactate was constant for all extractions, at 35% (*v/v*) of the final volume, and added immediately prior to elution. Both experiments were conducted in triplicate. Marennine spectra were acquired by UV-Vis and the concentration was determined by comparing the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length.

Chromophore ionization: Supelco EnviCarb 100 mg cartridges were conditioned with 2.4 mL ethanol, equilibrated with 2.4 mL deionized water, loaded with 24 mL BW, then washed with 2.4 mL deionized water. The charge of the adsorbed marennine molecules was neutralized with 1.2 mL of phosphate buffer (100 mM, pH 2) and eluents containing buffers of increasing pH (100 mM phosphate, pH_w^s 2 to 10) were sequentially applied on the same cartridge.

Effective desorption: Eluents with aqueous phase pH_w^s ranging from 7 to 10 (pH_w^s 7.5 to 9.6) were prepared, with incremental steps of 0.5 pH unit. The mobile phase was composed of ethyl lactate mixed with a phosphate buffer (200 mM) containing 10 mM sodium sulfite. Supelco EnviCarb 100 mg cartridges were conditioned with 2.4 mL ethanol, then reduced with 2.4 mL of 60 mM metabisulfite. Cartridges were loaded with 24 mL of BW, washed with 2.4 mL of deionized water, then eluted with 1.2 mL of the hydroorganic mixture. An unbuffered control group was prepared with ethyl lactate and deionized water.

2.3.3. Effect of Ionic Strength

Eluents with increasing buffer concentration were compared. The mobile phase was composed of ethyl lactate (35%, (v/v)) mixed with a phosphate buffer (60 to 200 mM, pH 8) containing 10 mM sodium sulfite. In triplicate, Supelco EnviCarb 100 mg cartridges were conditioned with 2.4 mL ethanol, then reduced with 2.4 mL of 60 mM metabisulfite. Cartridges were loaded with 24 mL of BW, washed with 2.4 mL of deionized water, then eluted with 1.2 mL of mobile phase. Marennine concentration was determined by UV-Vis, by comparing the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length.

2.3.4. Effect of Reductants

Eluents with increasing reductant concentration were compared. The mobile phase was composed of ethyl lactate (35%, (v/v)) mixed with a phosphate buffer (100 mM, pH 8). Sodium sulfite was added in concentrations ranging from 0 to 20 mM. In triplicate, Supelco EnviCarb 100 mg cartridges were conditioned with 2.4 mL ethanol, then reduced with 2.4 mL of 60 mM metabisulfite. Cartridges were loaded with 24 mL BW, washed with 2.4 mL deionized water, then eluted with 1.2 mL of mobile phase. Marennine concentration was determined by UV-Vis, by comparing the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length.

2.4. Stationary Phases Evaluation

2.4.1. Reductants and Repeatability

Two sets of triplicate, with and without reducing agents were compared. Supelco EnviCarb 100 mg cartridges were conditioned with 2.4 mL ethanol, followed by either 2.4 mL of deionized water or sodium metabisulfite 60 mM. The cartridges were loaded with 25 mL BW, washed with 2.4 mL water, then eluted with 1.2 mL of the mobile phase. The eluent was prepared by mixing ethyl lactate (35%, (v/v)) with a phosphate buffer (100 mM, pH 8), with the addition of 5 mM sodium sulfite for the reductant group. Loading, washing and eluting cycles were repeated 20 times on the same cartridge to demonstrate the method repeatability, while assessing the matrix effect between the stationary phase and marennine. The crude yield of each sample was determined by UV-Vis, by comparing the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length.

2.4.2. Evaluation of Graphite Flakes As a GCB Alternative

Bulk GCB (EnviCarb, Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used as a benchmark for the evaluation of mineral graphite flakes as a low-cost stationary phase alternative. The graphite was wettable flakes, 325 mesh (50–70%), 99+% carbon (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). To determine their saturation point, roughly 500 mg were dried at 105 °C overnight and cooled in a desiccator. In triplicate, 100 mg were weighted on a microbalance, then placed in 50 mL conical centrifuge tubes with 2.4 mL of 60 mM sodium metabisulfite. The tubes were centrifuged 30 min at 4000× g and the supernatant discarded. Tubes were filled with 50 mL of BW, mixed and centrifuged again. The partially extracted supernatant was analyzed by UV-Vis and compared against the initial BW concentration to determine marennine retention capacity by weight of the solid phase. Marennine concentration was determined by UV-Vis, by comparing the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length.

From the results of the previous experiment, the yield by weight of natural graphite flakes was determined by loading the stationary phase with BW at near-saturation. Blank 1 mL SPE cartridges were wet-packed with 100 mg of graphite flakes suspended in ethanol. The graphite was placed between two fritted glass fibers disk and lightly pressed on a vacuum manifold. In duplicate, the cartridges were conditioned with 2.4 mL ethanol, then reduced with 2.4 mL of 60 mM metabisulfite. Cartridges were loaded with 15 mL of BW, washed with 2.4 mL of deionized water and eluted with 1.2 mL of an hydro-organic mixture of ethyl lactate (35%, (v/v)) and phosphate buffer (100 mM, pH 8)

containing 5 mM sodium sulfite. Marennine concentration was determined by UV-Vis, by comparing the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length. Data from the mobile phase reductants experiment was used for GCB.

2.5. Crude Extract Recovery: Antisolvent Precipitation

Dry extracellular marennine was obtained by precipitation of ultrafiltrated BW in a large excess of ethanol (5:1, (v/v)). The precipitate was collected by centrifugation, dried under a stream of nitrogen, dissolved in an aqueous mixture of ethyl lactate (35%, (v/v)) and filtered on glass wool. In triplicate, equal amounts of the hydroorganic extract were placed in microcentrifuge tubes, with an increasing concentration of ethanol. Tubes were cooled at 4 °C overnight and centrifuged 15 min at 4 °C, 15,000 × g. Supernatants were transferred in spectrophotometry cuvettes and gaged at the same volume. Marennine concentration was determined with the absorbance of each sample at the λ_{\max} in the visible range, with a cuvette of 1 cm path length. Marennine dissolved in a solution of ethyl lactate (35%, (v/v)) was used as a control.

2.6. Cations Removal

The concentration of Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ was first determined in BW, then at each key steps of the crude extract preparation; after precipitation, precipitate wash, and after treatment with a strong cation-exchange resin (SCX). In triplicate, three sets of samples were prepared to measure cations concentration at each stage. Crude extract was used from the repeatability experiment with reductants. A volume of 3 mL of hydroorganic extract was transferred into 15 mL conical centrifuge tubes, then mixed with ethanol to induce precipitation (2.5:1, (v/v)). Samples were cooled at 4 °C overnight and centrifuged for 20 min at 4200 × g, 4 °C. Supernatant was discarded, and one set was solubilized in 3 mL nanopure water, then prepared for cation analysis. Precipitates of the two remaining sets were washed with 10 mL of ethanol solution (80%, (v/v)) pre-chilled at −20 °C, then centrifuged again. The pellets were solubilised in 3 mL nanopure water, and one sample set was purified on a SPE-SCX cartridge (100 mg, sulphonic acid, Grace/Alltech, Columbia, SC, USA). The resin was conditioned with 3 mL ethanol and 3 mL deionized water prior to sample elution. Each set was analyzed by UV-Vis, then acidified with nitric acid (HNO₃, 3.65%, (v/v)) and syringe-filtered on polytetrafluoroethylene (PTFE) filters (13 mm, 0.45 μm, VWR, Edmonton, Canada). Samples were analyzed with a microwave plasma-atomic emission spectrometer (MP-AES), where cations abundance was calculated from a six-points rational calibration curve, with concentration ranging from 0.05 to 20 mg/L. The nitric acid used was Instra-analyzed, and all glassware was acid-washed with dilute HNO₃ (10%, (v/v)). Samples were analyzed as is for K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺, and diluted 1:1000 for Na⁺. Blue water was diluted by 1:50 for K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺, and 1:10,000 for Na⁺.

2.7. Purification

In triplicate, Supelco EnviCarb 250 mg cartridges were conditioned with 6 mL ethanol, followed by 6 mL sodium metabisulfite 60 mM. The cartridges were loaded with 60 mL BW then washed with 6 mL water. Water was removed with 6 mL ethanol and the polysaccharides fraction was recovered with 3 mL of a dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) mixture (6:4, (v/v)) containing 0.2% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA). Residual DCM was removed with 6 mL ethanol, and the adsorbed marennine molecules were ionized with 3 mL phosphate buffer solution (100 mM, pH 8). The marennine fraction was eluted with 3 mL of a mixture of acetonitrile (35%, (v/v)) and phosphate buffer (100 mM, pH 8) containing 5 mM sodium sulfite. Acetonitrile was used in replacement of ethyl lactate for its low UV cutoff wavelength.

The polysaccharides fractions were dried under a nitrogen stream and resolubilized in 3 mL methanol for UV-Vis analysis. The samples were transferred into glass vials, dried and weighted on a microbalance. The extracts were dissolved in 15 μL methanol, then dried on an attenuated total reflection (ATR) crystal and analyzed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR).

Another extraction was performed in the same manner, in triplicate, where the analytes were resolubilized in 3 mL water instead of methanol to study their absorbance without solvent cutoff artifacts.

A sulfated polysaccharides sample was prepared for NMR following the same purification procedure, scaled up 20 times. Two fritted glass fibers disks were added into a 60 mL syringe, wet-packed with 5 g of GCB (EnviCarb, Supelco, Bellefonte, PA, USA) suspension in ethanol. The crude extract was dried with a rotary evaporator and dissolved into 500 μ L of deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6). Another sample was prepared in the same manner and deacetylated by alkali treatment, as described in Tako et al. [12]. Briefly, the sample was stirred at 24 °C for 14 h in 5 mL of sodium hydroxide 50 mM and sodium chloride 13.5 mM under nitrogen atmosphere. The sample was neutralized with HCl, filtrated on Celite 545, dialyzed in a regenerated cellulose membrane of 3.5 kDa MWCO (Spectra/Por) and freeze-dried.

The marennine fractions were transferred into 15 mL conical centrifuge tubes, then precipitated with ethanol (2.5:1, (*v/v*)). Samples were cooled at 4 °C overnight and centrifuged during 20 min at $4200 \times g$, 4 °C. Supernatant was discarded, and the precipitate washed with 10 mL ethanol solution (80%, (*v/v*)) pre-chilled at -20 °C. Samples were centrifuged again and the precipitate resolubilized in 3 mL of deionized water for UV-Vis analysis. Absorbance was measured in a cuvette of 1 cm path length.

2.8. Instruments

UV-Visible (UV-Vis) spectra were acquired on a spectrophotometer (Cary 100, Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA), using Varian WinUV software (version 3.00). Samples for UV-Vis were analyzed at 24 °C, in quartz cuvettes. Other instruments used were the microbalance Cubis 3.6P-2500-M (Sartorius, Goettingen, Germany), freeze dryer FreeZone 2.5 (Labconco, Kansas City, MO, USA), microcentrifuge PrismR and the centrifuge Sigma 3-18KS with rotor 11,180 (MBI Lab Equipment, Dorval, QC, Canada). pH values were recorded on an Accumet basic AB15 with a standard pH combination electrode 13-620-287a (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). ATR-FTIR spectra were acquired on a Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific), between 400 and 4000 cm^{-1} , with 64 scans per sample and a resolution of 2 cm^{-1} , using OMNIC software (7.3). Cations determination was carried with a MP-AES (4200, Agilent, Santa Clara, CA, USA), using MP Expert software (1.6.0.9255).

NMR samples were analyzed using a Bruker Avance III HD spectrometer operating at a ^1H frequency of 599.9 MHz using a double-resonance 5 mm BBFO probehead. The proton spectra were recorded with a single 30° pulse, 16 repetitions and an acquisition time of 2.73 s. Residual moisture signal was eliminated by pre-saturating the water peak during the 2 s recycle delay. ^1H - ^{13}C heteronuclear single quantum correlation (HSQC) spectra with multiplicity editing were acquired with 48 repetitions and 324 increments, applying the echo-antiecho scheme with an acquisition time of 166 ms. Data was analyzed using Bruker TopSpin software (4.0.6).

2.9. Statistical Analysis

Data are expressed as means (\pm standard deviation). Normality was tested by a Shapiro-Wilk test and the homoscedasticity was assessed with Leneve's test. When the null hypothesis of a normal distribution could not be rejected for a set of samples, the difference between treatments was validated with an analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc Tukey HSD test. Else, the difference was validated with a Kruskal-Wallis test, followed by a Wilcoxon rank-sum test using normal approximation without continuity correction. Data were analyzed using the R software (version 4.0.2-1), with packages car (3.0.7), agricolae (1.3.2), multcompView (0.1.8) and rcompanion (2.3.25). For all statistical analysis, an alpha value of 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Ultrafiltration Crude Yield: Previous Method

The yield using the previous ultrafiltration method was determined according to Beer-Lambert law, by using the molecular mass assessed by Pouvreau et al. for EMn (9893 ± 1 Da) [2]. Thus, the yield of marennine crude extract after ultrafiltration between 3 and 30 kDa was estimated at 56.6 (2.6)%. The lower value compared to the reference crude yield is likely due to the scale-up of the ultrafiltration procedure and the usage of a different strain of *Haslea ostrearia* (NCC-136), comparatively to Pouvreau et al. [10]. BW concentration and ultrafiltration yields are detailed in Table 1.

Table 1. Recovery yields for *Haslea ostrearia* culture in photobioreactors (PBRs), before and after marennine ultrafiltration.

Lot	BW Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ultrafiltration Yield (Non-Dialyzed, %)	Ultrafiltration Yield (Reference, %) [10]
1	9.3	54.9	–
2	11.7	55.3	–
3	12.3	59.5	–
Average	11.1 (1.6)	56.6 (2.6)	62.5

3.2. Overview of the Novel SPE-GCB Method

The main steps and parameters of the optimized SPE-GCB procedure are summarized in Figure 1, including an optional purification step for the recovery of a sulfated polysaccharides fraction.

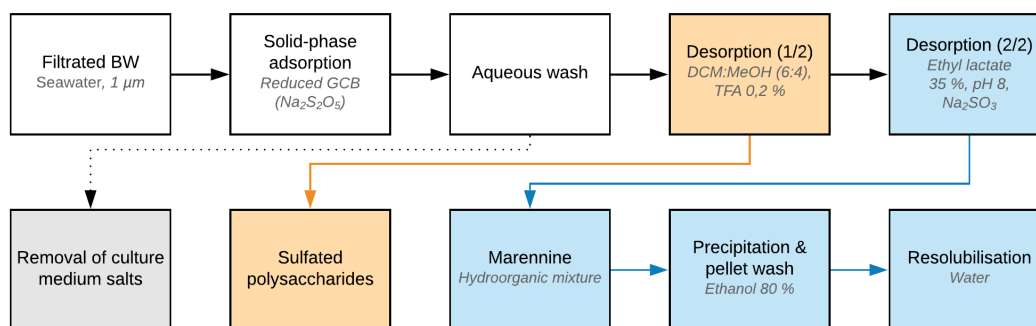


Figure 1. Schematic representation of the optimized solid-phase extraction (SPE)-graphitized carbon black (GCB) extraction process of extracellular marennine harvested from BW. Concentrations are expressed as (v/v).

3.3. Effect of Organic Modifier

The extraction yield was improved up to 70% as the concentration of ethyl lactate increased (Figure 2), where concentrations above 38% (v/v) showed a linear decrease of yield. Thus, the recommended proportion of ethyl lactate to use is between 34 and 38% (v/v).

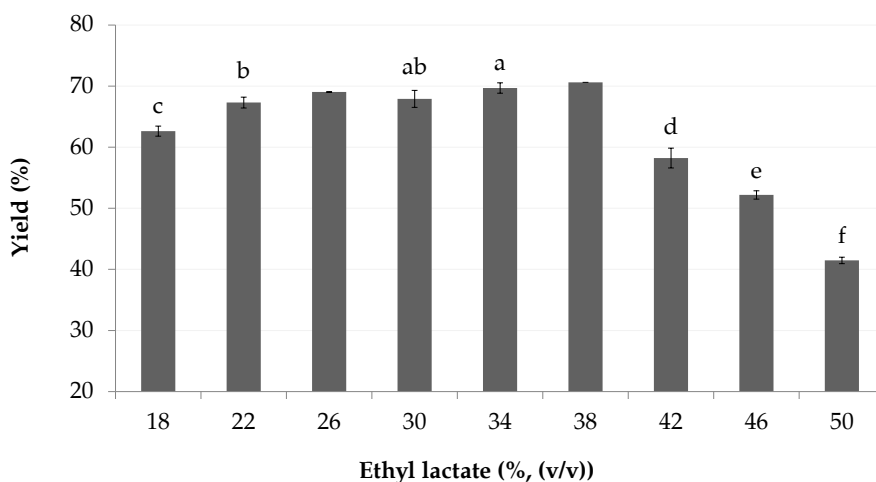


Figure 2. Crude extraction yield according to ethyl lactate concentration in the mobile phase. As values at 26 and 38% ethyl lactate (v/v) are unbalanced, containing only two samples instead of three, statistical differences with other concentrations could not be calculated adequately.

3.4. Effect of Analyte Ionization

In the chromophore ionization experiment (Figure 3), the visible λ_{\max} undergoes a bathochromic shift as the pH increases. Similarly to the method described in Berkhout et al. for spectrophotometric pK_a determination [13], the maximum absorption wavelengths were plotted against the mobile phase s_w pH values, which translates into a sigmoid shaped curve. The inflexion point (5.5) gives an approximation of the chromophore dissociation constant (pK_a), where half of the chromophores are ionized. Thus, marennine chromophore appears fully ionized from s_w pH 6.8 and above.

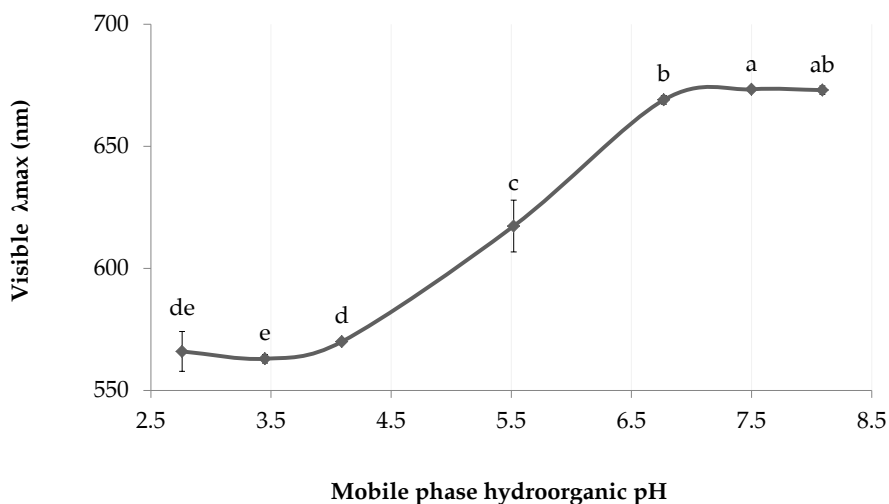


Figure 3. Approximation of the hydroorganic dissociation constant ($^s_w pK_a$) of EMn in ethyl lactate solution (35%, (v/v)). Letters indicate statistical differences between treatments.

In accordance with the approximation of marennine $^s_w pK_a$ in dilute ethyl lactate, the extraction yields obtained with mobile phase of s_w pH values between 7.9 and 9.1 were not significantly different, where slight differences for the higher (9.6) and lower ends (7.6) are assumed to result from experimental variance (Figure 4). The average yield for pH 7.6 and above was 71 (2)%, in contrast to the unbuffered control which is drastically lower, at 13 (2)%, being acidified by the organic solvent.

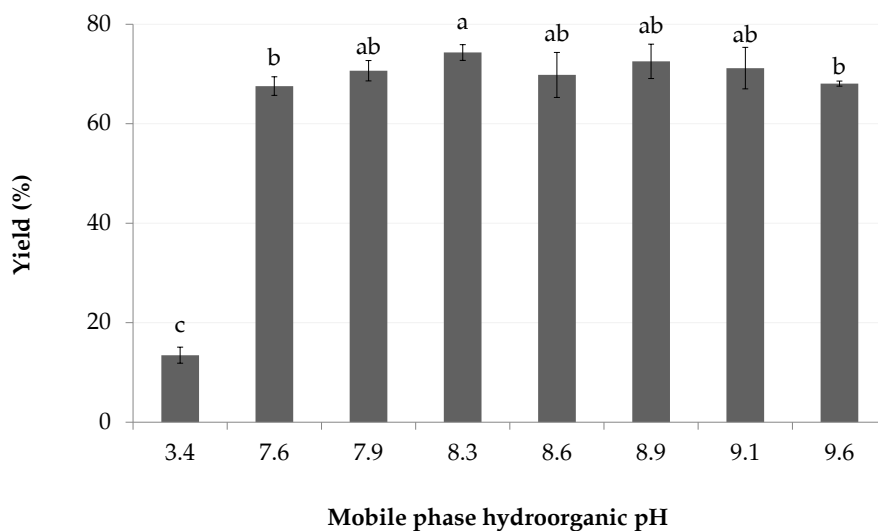


Figure 4. Effect of mobile phase pH on the crude yield. Samples are buffered with 200 mM phosphate, control is unbuffered (3.4). Letters indicate statistical differences between treatments.

3.5. Effect of Ionic Strength

An increase in ionic strength from 60 to 200 mM slightly improved the crude yield (Figure 5), from 59 (1)% to 71 (4)% (100–200 mM). The lowest buffer concentration (60 mM) allowed a constant pH of 8 following the addition of ethyl lactate. A high concentration of some buffers, such as ammonium bicarbonate, caused an adverse reaction where marennine color changed from green to brown, with a pronounced absorbance bathochrome in the visible region. The λ_{max} moved to 750 nm, compared to 672 nm with a phosphate buffer (Figure 6).

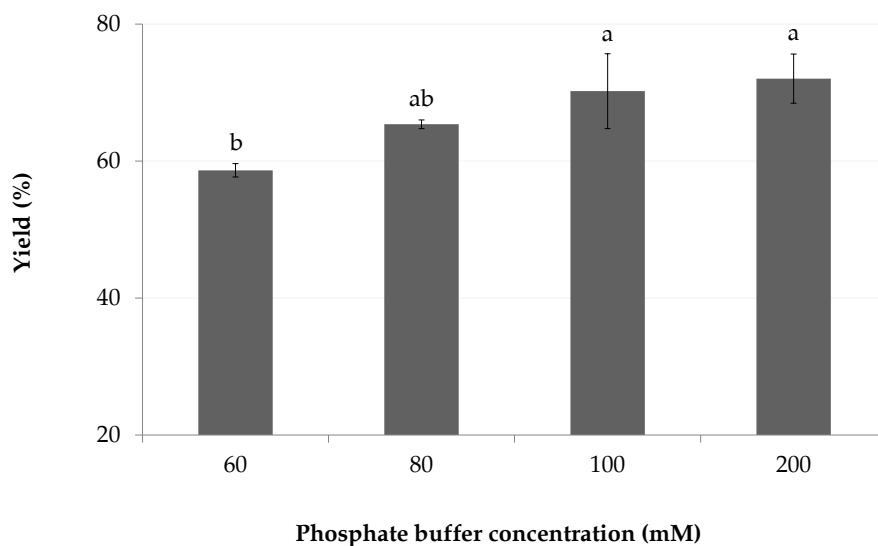


Figure 5. Effect of mobile phase ionic strength on crude yield. Increase of buffer concentration with constant pH and mobile phase composition. Letters indicate statistical differences between treatments.

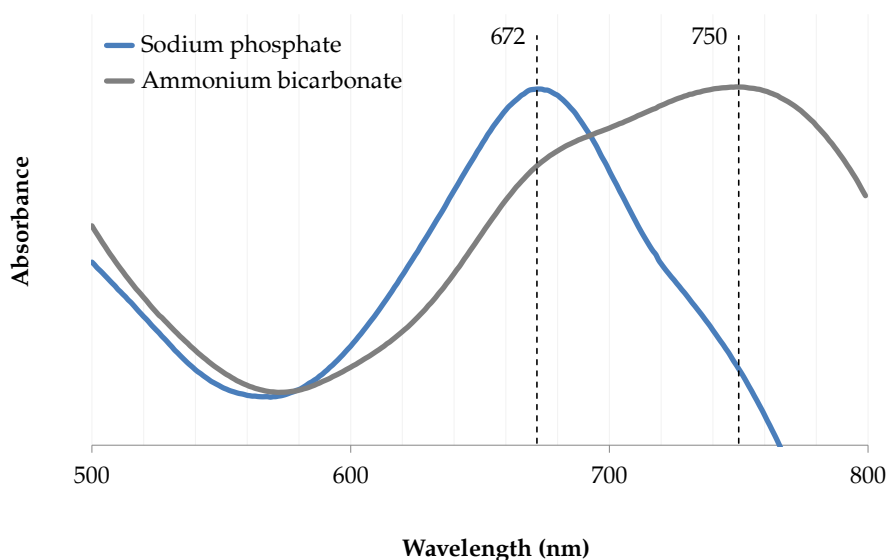


Figure 6. Bathochrome shift of the visible absorption band in ammonium bicarbonate (400 mM), compared to sodium phosphate buffer (200 mM).

3.6. Effect of Reductants

The addition of sodium sulfite in the mobile phase increased the yield by roughly one third, from 46 (2)% to 63 (2)% (Figure 7). The yields between 5 and 20 mM were not significantly different, which suggests that a low reductant concentration is sufficient to induce desorption.

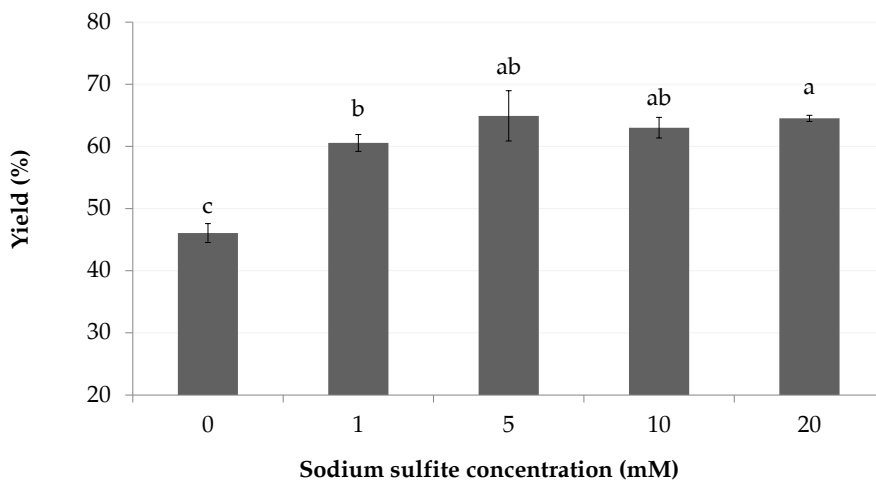


Figure 7. Effect of reductant (sulfite) concentration of mobile phase on the crude yield. The stationary phase was pretreated with sodium metabisulfite (60 mM). Letters indicate statistical differences between treatments.

3.7. Stationary Phases Evaluation

The stationary phase was reduced with sodium metabisulfite to improve the recovery of anionic analytes. Likewise, sodium sulfite was added in the mobile phase. Sodium sulfite was preferred over dithionite or metabisulfite in the eluant, as it effectively improves marennine recovery while being weak enough to avoid reduction of the pigment (not shown).

3.7.1. Reductants and Repeatability

The yield of the first extraction (Table 2) was greatly increased with reductants, indicating ionic interactions between the solid phase and the marennine molecules. While the effect was pronounced for the first fractions, it quickly decreased as the extractions were repeated. The cumulative yield of extractions 1 to 20 shows a logarithmic growth ($R^2 = 0.9898$) for the control group, while the matrix effect is mostly canceled with reducing agents (Figure 8).

Table 2. Average crude yield (%) of successive extractions on the same stationary phase, with and without stationary phase pretreatment and reductants in the mobile phase.

Fractions	1	5–10	11–20	Average
Reductants	61 (3)	66 (2)	67 (2)	66 (3)
Blank	47 (3)	66 (2)	67 (2)	64 (5)

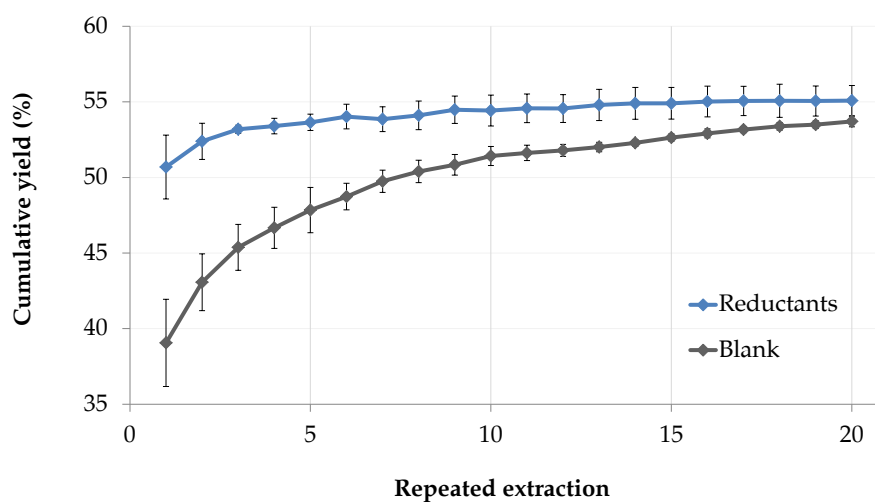


Figure 8. Matrix effect evaluation following stationary phase pretreatment with sodium metabisulfite (60 mM) and addition of sodium sulfite (5 mM) in the mobile phase. Comparison of the average cumulative yield with and without reductants after 20 successive extractions.

3.7.2. Evaluation of Graphite Flakes As GCB Alternative

Determination of the saturation point of each stationary phase has shown that while GCB had the best retention capability, the crude yield at near-saturation was not significantly different between GCB and natural graphite flakes (Table 3). Thus, mineral graphite flakes appear to be a strong contender, reaching 68% of GCB retention.

Table 3. Performance of graphite flakes compared to graphitized carbon black (GCB) (Supelco EnviCarb). $\text{AU}\cdot\text{g}^{-1}$ refers to absorbance units measured at the visible λ_{max} , relative to the stationary phase mass. The letters in parentheses indicate significant differences between treatments.

Stationary Phase	Saturation ($\text{AU}\cdot\text{g}^{-1}$)	Yield (%)
Graphitized carbon black (GCB)	23.03 (0.97) (a)	64.90 (4.04) (a)
Graphite flakes	15.69 (0.59) (b)	61.97 (1.40) (a)

3.8. Crude Extract Recovery: Antisolvent Precipitation

Marennine solubility has readily decreased as the concentration of organic solvents increased (Figure 9). The recovery through precipitation reached 99% with the addition of 2.4 mL of ethanol per milliliter of the mobile phase. At this concentration, the organic solvent concentration accounts for 80% of the sample volume. The marennine sample is deemed as a precipitable fraction, as it was prior extracted by ethanol precipitation. Thus, the true yield might be lower.

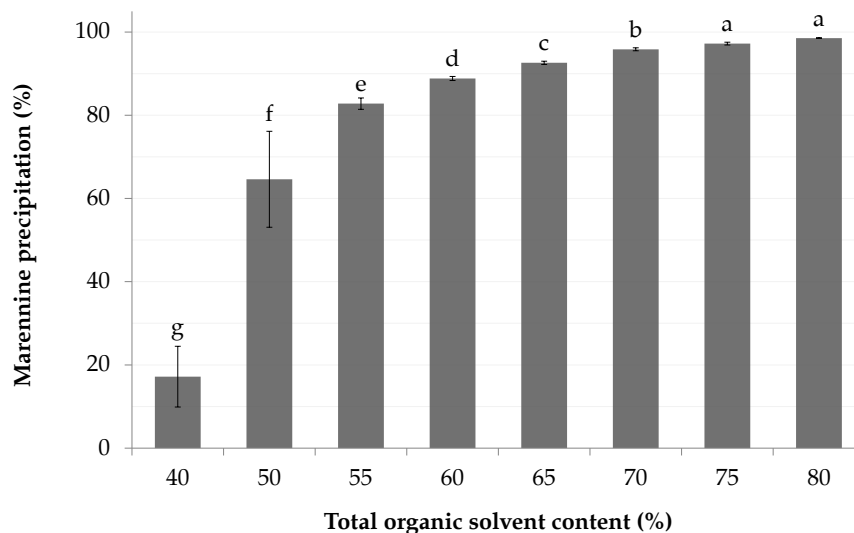


Figure 9. Precipitation yield according to total organic solvent concentration, with addition of ethanol to a marennine solution containing ethyl lactate (35%, (v/v)). Letters indicate statistical differences between treatments.

3.9. Cations Removal

The concentration of cations others than Na^+ was greatly reduced at the precipitation step. Acknowledging the volumetric concentration factor, for which 62.5 mL of BW was concentrated into 3 mL of hydroorganic extract, the abundance of magnesium ions dropped by more than three thousand folds relative to the concentration found in BW. Therefore, the aqueous washing step during the SPE-GCB appears highly effective to remove most salts. Thus, the high concentration of leftover sodium ions likely arise from the sodium phosphate buffer, which is only partially eliminated at the precipitation step. Similarly, pellet rinse with ethanolic solution had little effect on cation abundance. In contrast, SPE-SCX removed nearly all traces of cations, although anions were left behind. Results from the cation determination are shown in Table 4.

Table 4. Concentration of cations in blue water and through key purification steps ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Purification Step	Yield (%)	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
Blue water	100	10,095 (56)	348 (8)	1109 (13)	372 (5)
Precipitation	49.5 (1.0)	1609 (32)	5.18 (0.51)	7.10 (0.35)	4.17 (0.08)
Pellet rinse	48.4 (0.3)	1596 (105)	4.30 (1.30)	7.29 (0.05)	3.20 (0.04)
Desalting (SCX)	36.5 (3.9)	51 (89)	0.10 (0.07)	0.24 (0.13)	0.63 (0.48)

3.10. Purification

Prior to marennine elution, an additional washing step achieved the isolation of a brown-tinted component. The crude yield of the methanol-soluble fraction was 12.8 (0.2) mg per liter of blue water. Marennine mass could not be determined precisely due to leftover buffer counterions.

3.10.1. ATR-FTIR Analysis

The infrared spectrum of the methanol-soluble fraction (Figure 10) share the same bands as a fucoidan extract from the brown algae *Padina tetrastromatica* (Table 5). While the fingerprint region strongly matches *P. tetrastromatica* spectrum, there is a slight shift of the O–H broad stretching band, with the presence of two additional weak bands at 2930 and 2359 cm^{-1} . Still, those two bands were also found in a commercial fucoidan extract from *Ascophyllum nodosum* (AscophyScient®), as well as in a further purified version following precipitation of polyuronic acids residues (i.e., ascophyllan) with calcium acetate [14]. To our knowledge, assignment of the 2359 cm^{-1} band could not be found in the literature for fucoidans, but was assigned to O–H vibration of carbohydrates in bacterial extracellular polymeric substance [15].

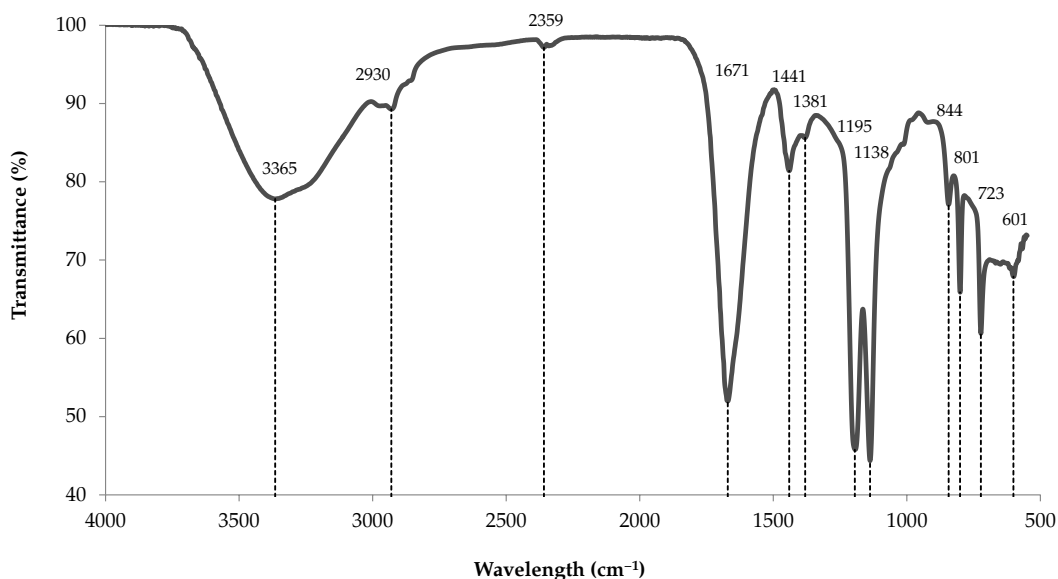


Figure 10. Attenuated total reflection (ATR)-FTIR spectrum of sulfated polysaccharides extracted from blue water.

Table 5. Band assignments for the ATR-FTIR spectra of the contaminant fraction extracted from blue water. Comparison with spectra of fucoidan extracted from brown seaweeds *Padina tetrastromatica* and *Ascophyllum nodosum*.

Experimental Wavelength (cm^{-1})	Fucoidan Wavelength (cm^{-1})	Assignment	Reference
3365 (4)	3448	Hydrogen bonded O–H broad band	[16,17]
2930 (1)	2940	C–H stretching of pyranose ring	[14]
1671 (4)	1688	O–C–O asymmetric stretching	[16]
1441 (0)	1437	O–C–O symmetric stretching	[16,18]
1381 (2)	–	C–H bending	[18]
1195 (7)	1203	C–H deformation of β -manuronic residues	[16]
1138 (2)	1140	O=S=O symmetric stretching	[16,17]
844 (0)	844	S=O stretching	[16]
801 (1)	803	Sulphate group absorption band	[16]
723 (1)	724	C–O–S stretching	[16]
601 (1)	601	C=C–H stretching	[16]

The experimental spectrum comprises all bands typical of polysaccharides, including a strong and broad O–H stretching at 3500–3000, C–H stretching at 3000–2800, O–C–O asymmetric stretching at 1630–1600 and 1400 (here 41 cm^{-1} higher), with a weak C–H bending near 1380 cm^{-1} [18]. In a

fucoïdan extract from *Sargassum henslowianum*, the band around 1400–1470 cm^{-1} was also ascribed to methylene (CH_2) scissoring vibration in the case of mannose and galactose, and to methyl (CH_3) asymmetric bending in fucose and *O*-acetyl [19]. The spectrum also possesses the three bands that are characteristic of fucoïdan compounds in *Sargassum oligocystum* and *P. tetrastromatica* species, near 1437, 1203 and 1140 cm^{-1} [16]. Likewise, the fingerprint region contains all the peaks attributed to sulfur-bonded atoms, from 1142 to 723 cm^{-1} [16]. Of those, the two bands near 801 and 842 cm^{-1} were previously ascribed to sulfated carbohydrates in carrageenans, where 845 cm^{-1} was assigned to *D*-galactose-4-sulfate [20]. For fucoïdanes, they were assigned to sulfation in axial and equatorial positions in *P. tetrastromatica*, respectively, and 844 cm^{-1} to axial C-4 position on fucoïpyranose residues in *Fucus serratus* [16,21].

3.10.2. UV–Vis Analysis

From the UV–Vis spectra of the methanol-soluble fraction, the purity of various marennine preparations was evaluated by comparing their absorbance at wavelength ratios which are characteristic of the marennine chromophores. In accordance with the previously published molar attenuation coefficient for EMn [2], wavelengths of 247, 322 and 677 nm were used. The UV–Vis spectrum of the polysaccharides extract (Figure 11a) overlaps the UV region of purified marennine (Figure 11b), and shows a great resemblance to IMn spectrum, which has no peak at 322 nm [10], but rather a small shoulder much alike the extracted polysaccharides. The spectrum also closely matches the one obtained from *Sargassum vachellianum* fucoïdan-rich polysaccharide extract, with a sharp peak in the UVC region, a shoulder near 280 nm and no absorbance in the visible spectrum [22]. The light bathochrome seen in *S. vachellianum* extract most likely results from different solute concentrations.

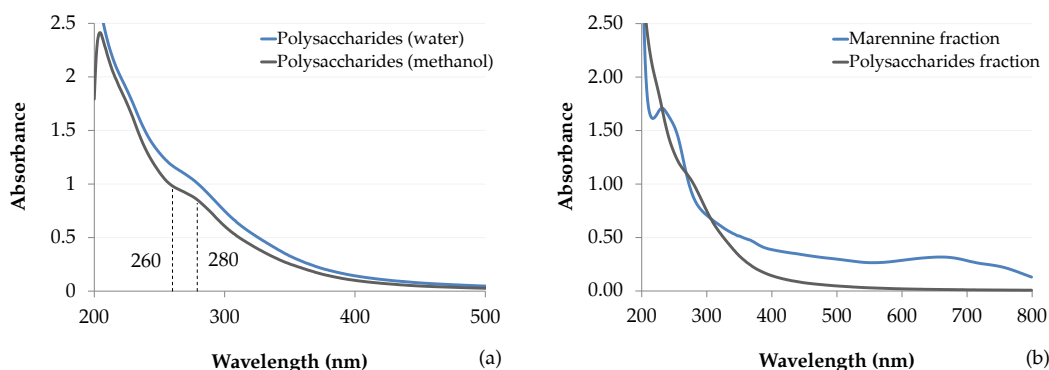


Figure 11. (a) UV–Vis spectra of the isolated polysaccharides solubilized in water and methanol. (b) UV–Vis spectra of the two fractions obtained from the SPE–GCB method. Fractions were resolubilized in water at their original volume.

From the overlap between the spectra of marennine and sulfated polysaccharides, wavelength ratios were used as a proxy for the determination of UV-absorbing components in marennine samples (Table 6). Sulfated polysaccharides and all marennine extracts shared a similar ratio for UV wavelengths, at 247/322 nm. In contrast, the UV-to-visible ratio (247/677 nm) of the anion-exchange purified sample is lower than both crude extracts. The apparent stability of the UV ratio, regardless of the preparation method, suggests that the absorbance in the UV region mainly stems from compounds unrelated to marennine chromophores. Hence, those results could indicate similar purity between the ultrafiltrated and the SPE–GCB crude extracts. Following reconstitution, the UV–Vis spectra show similar absorbance in the UV region of marennine and the isolate (Figure 11b), suggesting that the contamination from UV-absorbing compounds was reduced by half.

Table 6. Absorbance ratios of marennine characteristics wavelengths (nm) [2]. Comparison of the methanol-soluble and the marennine fractions from SPE-GCB, ultrafiltrated and dialyzed EMn, and a purified reference.

Sample	Extraction Method	247/322	247/677
Polysaccharides fraction	SPE-GCB	2.53 (0.02)	–
Marennine fraction	SPE-GCB	2.60 (0.04)	5.07 (0.13)
Ultrafiltrated marennine	3–30 kDa	2.86 (0.03)	5.49 (0.07)
Purified reference [2]	3–30 kDa, anion-exchange	2.63	3.50

3.10.3. NMR Analysis

Following the scaled-up extraction, 15 mg of the methanol-soluble fraction was recovered for NMR analysis. The ^1H - ^{13}C HSQC and ^1H spectra (Figures S1 and S2) share some similarities with the latest published spectrum of marennine [1], with $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ resonances at 10–25/0.90 ppm (CH_3), including an intense crosspeak at 28/1.22 ppm in marennine and 28/1.24 ppm in our sample (CH_2). Both spectra are dominated by signals from the ring carbons (60–75/3.5–4.5 ppm) and the aliphatic regions (10–40/1.0–2.5 ppm). This is in agreement with some spectral features observed with fucoidan from brown algae for which ^1H signals at 1.1–1.3 and 1.24 ppm were attributed to methyl protons of *L*-fucopyranose moieties [12,19]. Moreover, resonances at 60–85 ppm were associated with fucoidan ring carbons [12], among which we found signals at 65–69/3.2–4.1 ppm, previously ascribed to CH_2 of non-fucose residues, such as xylose and galactose [23].

However, in contrast to both marennine and fucoidan spectra, no anomeric carbons were found at 95–105/4.3–5.8 ppm nor 95–105/5.0–5.5 ppm in our methanol-soluble sample [12,19,23]. Although signals may be masked due to random sulfation and acetylation of the carbohydrates [24,25], the absence of characteristics resonances near 100 ppm refutes the presence of fucose, glucose and xylose, and thus contradicts the prospect of fucoidan. Instead, the spectrum shows high-field anomeric signals at 110/4.7 ppm and 113/4.9 ppm, most likely attributable to arabinose. Although the latter is common in brown seaweeds and diatoms mucilage, it is usually present in low proportions [19,26,27], while a major arabinose content is more typical of green algae polysaccharides, among which sulfated arabinan containing up to 57% arabinose was reported [28–30].

In its native state, the compound was insoluble in DCM and soluble in water, methanol and DMSO. Although the analysis of the deacetylated sample was inconclusive, its solubility in DMSO successfully decreased, and the retention during dialysis confirms its polymeric nature.

4. Discussion

4.1. Optimization of Extraction Parameters

Our results showed that the solid-phase extraction with carbonaceous media is a successful method for pre-concentration of the blue pigment marennine, respecting green chemistry principles and providing a crude yield near 70%. Regarding the various intermolecular interactions in the graphitic stationary phase, we evaluated several parameters to optimize the composition of the mobile phase and improve marennine recovery. As expected for carbonaceous sorbents, the mobile phase pH, organic modifier concentration and the stationary phase surface charge all exerted a significant effect on marennine crude yield. We found evidence of both ionic and dispersive interactions, and following the use of reducing agents, marennine desorption was mainly driven by a typical chromatographic reversed-phase behavior. Hence, the yield depends on the analyte state of ionization, its solubility, and the eluting strength of the mobile phase.

Results have shown that marennine is more effectively desorbed at alkaline pH. This is in agreement with the studied behavior of ionogenic solutes on carbonaceous sorbents, as neutral compounds are more strongly retained on the stationary phase, showing similarity to reversed-phase chromatography [31,32]. The chromophore ionization experiment indicated an apparent $s_w\text{pK}_a$ of

roughly 5.5 for EMn in 35% ethyl lactate, which is 1.5 higher than the $\text{p}K_a$ previously reported (4.02 ± 0.02) [2]. This most likely results from the influence of the organic solvent on pH values, which is expected to differ from the standard reference [11,33]. As *Haslea ostrearia* is grown in seawater, a mobile phase of pH 8 was chosen. Thus, the solution pH in which marennine is dissolved remains constant through cultivation and extraction, while providing chromophore ionization and sulfites stability [34].

Similar to the use of acetonitrile on PGC [35], the positive relationship between increasing organic modifier concentration and desorption is assumed to result from the competition with dispersive interactions on the graphitic surface. Their strength could result from the planarity and the polarisable surface of graphitized sorbents, which might favor the contact with analytes and induce those forces [36]. Hence, previous studies described a similar reversed-phase behavior for chromatographic separation of purines and opiates on PGC [31,32]. Barret et al. also noted that compounds with acidic functional groups are mostly affected [32], which is in line with the low dissociation constant of EMn (4.02 ± 0.02) [2]. In contrast, the yield decreased as the concentration of ethyl lactate rose above 38%, corresponding to the results from the crude extract recovery experiment where precipitation began at the lowest concentration tested (40% of total organic solvent volume). Thus, a concentration of 35% was chosen in order to provide satisfactory desorption and ensure solubility of marennine in the mobile phase. High concentrations of pH buffers were used to provide a stable pH despite the varying ethyl lactate concentration, as this solvent undergoes a base-catalyzed hydrolysis at alkaline pH [37], which releases lactic acid and thus lowers the pH of the mobile phase over time.

As the choice of solvents deeply defines the environmental performance of a process [38], efforts were made to find a greener alternative to acetonitrile early in the method development. Water, alcohols, ethers and esters are usually preferred [38,39], hence in extraction processes a promising avenue is the utilization of bio-based solvents in replacement of those derived from petrochemistry [39]. Moreover, as they are more likely to benefit from a decentralized production and a shorter supply chain [40,41], green alternatives may further reduce energetic costs associated with transportation, while increasing resilience to global shortages. Ethyl lactate is regarded as a promising candidate as it can be produced from carbohydrate feedstocks, is biodegradable, easy and inexpensive to recycle, readily metabolized in vivo, and has a very low ecotoxicity [37,42]. Ethyl lactate has a high boiling point and is a polar protic solvent, with effectiveness comparable to traditional solvents such as acetonitrile [42,43]. Lastly, Hennion reduced solvent usage by 67% by reversing the extraction cartridge prior to elution, and recommends always using this method for carbonaceous sorbents. While using less solvent, back-flush desorption could also improve marennine yield as it has shown improved recovery for more than half of the analytes tested [44].

Increasing the ionic strength had a moderate effect on crude yield, in agreement with a previously reported separation of charged compounds on graphitized carbon [45]. However, the high buffer concentration requires additional steps for desalting, which may hinder those gains. Although the use of ethyl lactate is advantageous from an environmental perspective, an aprotic solvent such as acetone might be more suited for marennine extraction, requiring minimal buffering. Acetone is considered a greener alternative to acetonitrile, and has similar physicochemical properties and separation performance in reversed-phase HPLC [39,46]. Moreover, acetone has a low boiling point ($56\text{ }^\circ\text{C}$) and does not form an azeotrope with water, thus it can be easily recovered by distillation [47]. Although ethyl lactate was favored from a safety perspective, for its high boiling point and low vapor pressure, there might be an interesting tradeoff with repeated extraction using acetone as the organic modifier.

Carbonaceous sorbents contain positively charged groups such as oxonium and quinones, which act as anion-exchange sites [44]. Negatively-charged compounds may bind too strongly on those sites, and pretreatment with ascorbic acid in dilute hydrochloric acid (HCl) can improve their recovery by altering the surface charge of the stationary phase [8,44]. As an alkaline counterpart, sodium metabisulfite was used in replacement of ascorbic acid and HCl. Thus, the stationary phase

was pretreated with metabisulfite, leaving an apparent negative charge at the surface of the GCB. When marennine extraction was repeated multiple times on the same stationary phase, the yield of the first fractions was much higher with reductants, both as sorbent pretreatment and mobile phase additive. These results indicate the presence of ionic interactions between GCB and the solute, which can be chemically mitigated. As the yield reaches a plateau, this suggests that GCB undergoes a progressive saturation of its positively charged groups. This is supported by numerous studies reporting a chromatographic behavior resembling a weak anion-exchange, with negligible cation-exchange capacity [36]. In its native state, it has been speculated that PGC has an oxidizing activity, which can be altered by redox treatments [36]. Oxidation seems to increase the positive surface charge, thus causing a stronger retention of anions, while reduction decreased anionic interactions and may improve solute recovery [8,36,48]. Hence, redox treatments strongly influence ionogenic compounds, which fits the description of marennine being a polyanionic species [2,36].

Likewise, the addition of sodium sulfite in the mobile phase has a pronounced effect on yield. It has been reported that its use in the mobile phase acts as a redox buffer that cancels a catalytic reaction between dissolved oxygen and PGC surface, thus preventing oxidation of analytes and decreasing the retention of anionic compounds [36,49]. It has been shown that upon passage through a PGC column, the sulfite ions are completely converted to sulfates, suggesting that the oxidation of carbonaceous sorbent might be driven by the concentration of oxygen in the mobile phase [50]. Thus, the use of redox buffers and sorbent pretreatment is advisable to improve reproducibility in chromatographic separations [8].

Natural graphite flakes seem to be a promising alternative for the low-cost pre-concentration of marennine. From our results, they provide similar performance to GCB, at a fraction of the cost. Graphite retails at about \$0.04 per gram (USD), i.e., over 200 times cheaper than bulk GCB. Moreover, the retention capacity of graphite could be further improved by chemical exfoliation to produce expanded graphite, which has a greatly increased surface area [51].

Results from the precipitation experiment have shown that ethanol is a suitable anti-solvent for marennine. While it induces precipitation, the use of volatile solvents such as ethanol is mandatory for the removal of residual ethyl lactate in the crude extract, as they have an excellent miscibility [37] and ethanol has a much lower boiling point (78 °C) [52]. As a chemical precursor and degradation product of ethyl lactate [37], ethanol also prevents the production of complex solvent wastes. Pouvreau has shown that contaminating pigments, such as chlorophylls and carotenoids were eliminated by precipitation with acetone [53]. We assume that those would also remain in the ethanolic supernatant, along with the methanol-soluble fraction.

Cations concentration was monitored through the precipitation and pellet washing steps. Our results showed that most ions from seawater were removed during the aqueous wash of the SPE-GCB procedure, but that the sodium ions from the pH buffer remained in the final extract. Solid-liquid extraction of the marennine pellet had little effect on the concentration of cations, either due to poor solubility in the ethanol solution, bonds between cations and the polyanionic structure, or limited contact. As the pellet is repulsed by the organic solvent, it is tightly held together even after prolonged mixing. In order to improve purification, we suggest that ultrasound-assisted extraction might help to disrupt the precipitate. In contrast, residual cations were nearly eliminated after elution on a cationic exchange resin (SPE-SCX). It appears that SCX decreased the extraction yield, although there was no apparent retention of marennine. This might result from loss during the manipulation of small sample volume rather than unrecoverable loss due to adsorption. However, the resulting acidification might be detrimental to marennine structural integrity. Due to a large amount of residual ions, dialysis remains more appropriate as a gentler desalting step. Salt concentration could also be minimized by using a volatile buffer, but sodium phosphate was preferred to avoid an adverse reaction observed with ammonium bicarbonate.

4.2. Extraction and Characterization of a Sulfated Polysaccharide

In their review on PGC, West et al. reported that some molecules exert strong dispersive interactions with the carbon surface, requiring solvents with high eluting strength [36]. Likewise, Hennion used a mobile phase composed of dichloromethane and methanol to improve pesticides desorption, with the addition of TFA for acidic compounds [44]. We used a variation of this method to extract a component from BW, which was further characterized. Results from both UV–Vis and FTIR analyses match those of fucoidan references. For the latter, the functional groups region bears all the expected bands for polysaccharides, along with fingerprint signals which correspond to all observed bands in fucoidan from the brown algae *P. tetrastromatica*. Among those, the fingerprint includes signals stemming from sulfur-bonded carbohydrates, which are typical of marine sulfated polysaccharides.

Fucoidans are complex, diverse, high molecular weight sulfated polysaccharides, composed of a fucose backbone (homofucans) or possessing fucose side branches (heterofucans) [24]. They contain a variable amount of monosaccharides and uronic acid, with random branching, sulfation and acetylation, sometimes even with protein moieties [54,55]. They are typically found in brown algae [56], but also produced by sea cucumbers [54] and recently identified in diatoms [24]. In diatoms, they were observed when excreted as exopolysaccharide (EPS) similar to fucoidan, although their structure remains uncharacterized and might differ from brown algae extracts [24]. Analysis of fucoidan from *Chaetoceros socialis* revealed a rather low fucose content (10%) compared to brown algae (17–44%), being the least abundant monosaccharide after glucose, xylose and galactose [24]. As EPS, they act as a surfactant and provide a polyanionic nucleus for the formation of marine particles and biofilm, whose aggregates eventually sink and may act as a precursor of marine snow [24]. Hence, they may share similarities with acylated polysaccharides (APS), which constitute a major fraction of marine surface water's high molecular weight dissolved organic matter [57]. Previous analysis of diatom EPS also revealed the presence of heteropolysaccharides, often branched and containing rhamnose, fucose, galactose, glucose, mannose and xylose, which may also be sulfated and contains uronic acids [26].

Diatom-sourced fucoidan was reported as being stable to bacterial degradation, which suggests other biological functions such as protection from pathogens [24]. Fucoidans are of high pharmaceutical interest and were reported for their anti-inflammatory, immunomodulatory and anticoagulant activities [56]. They are also of interest for their anti-proliferative properties on cancer cells and as antiviral agents against many enveloped viruses, including influenza, dengue, human immunodeficiency viruses (HIV), measles and recently SARS-CoV-2 (COVID-19) [58–60]. Similar to marennine, it could inhibit the growth of *Vibrio alginolyticus*, although the effect was associated with an uncharacterized methanol-soluble fraction extracted from fucoidan, hypothesized as a possible polyphenolic contaminant [61]. Their bioactivity varies according to their structure, and is usually favored by branching, low molecular weight (5–30 kDa), monosaccharides composition and degree of sulfation [55].

NMR spectra showed some similarities in the aliphatic and ring carbons regions between the methanol-soluble fraction and the latest published marennine spectrum [1]. Likewise, retention in membrane of 3.5 kDa MWCO suggests a probable co-extraction during ultrafiltration between 3 and 30 kDa. While the abundance of aliphatic signals could fit a compound composed of monosaccharides comprising methyl and methylene substituents, no anomeric signals were found in the characteristic regions expected in brown algae and diatom fucoidan. Although the FTIR spectrum matched a brown alga fucoidan spectrum and suggested the presence of a sulfated polysaccharide, the NMR results cannot validate this hypothesis. Since fucoidans are defined as fucose-containing sulfated polysaccharides [24,62], confirmation of fucose is required.

The solubility in methanol is also unusual compared to brown algae fucoidans, as they are commonly extracted by alcohol precipitation [55]. Although polysaccharides are usually insoluble in organic solvents, the presence of hydrophobic groups such as *O*-acetyl and *O*-methyl, can also affect their solubility [63], two substituents which are part of fucoidans [55].

Regarding the high resemblance between the polysaccharides fraction and marennine UV spectra, especially for IMn, we speculate that similar compounds remain in the marennine extract. This implies

that the methanol-soluble fraction represents only a specific group of other carbohydrates, although its composition remains to be defined. Being polyanionic, compounds similar to fucoidan might be chemically bound to a smaller marennine chromophore, and thus might constitute a major component of the current marennine extracts. This is supported by the comparison of wavelength ratios between different extraction methods, evidences of polysaccharide and aliphatic signals from previous NMR analysis of marennine [1], along with previously reported attributes, such as its polyanionic charge, elevated oxygen content and its high molecular weight, polymeric nature [2].

5. Conclusions

Our method provides a straightforward extraction, outperforming ultrafiltration while opening new avenues towards in-line extraction for biotechnology use and further chromophore purification. We demonstrated the potential of low-cost, natural graphite flakes as a stationary phase for marennine pre-concentration, and the effective usage of environmentally suitable solvents and reagents. The process made possible the isolation of a sulfated polysaccharide fraction that requires further characterization. Eventually, methanol and dichloromethane could be replaced by greener solvents. More UV-absorbing compounds are expected to remain in the marennine fraction, either through co-extraction or chemically bound complexes with the chromophore. Hence, we speculate that those might be a major component of marennine extract, and perhaps constitute their active moiety. Still, a thorough characterization of the polysaccharides fraction is necessary to evaluate its purity, bioactivity, molecular weight, monosaccharides composition and degree of sulfation. Confirmation of polysaccharides such as fucans would lead to considering blue water as an important source of bioactive molecules, together with marennine, thus increasing the value of *Haslea ostrearia* cultivation.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1660-3397/18/12/653/s1>, Figure S1: HSQC ^1H - ^{13}C spectrum of the sulfated polysaccharides crude extract in DMSO- d_6 , 25 °C; Figure S2: NMR proton spectrum of the sulfated polysaccharides crude extract in DMSO- d_6 , 25 °C.

Author Contributions: Conceptualization, W.B. and R.S.-L.; methodology, W.B.; software, W.B.; formal analysis, W.B.; investigation, W.B., A.A.A., F.T., B.G. and J.-S.D.; resources, R.T., R.S.-L., I.M. and B.G.; data curation, W.B.; writing—original draft preparation, W.B., F.T. and A.A.A.; writing—review and editing, R.T., R.S.-L. and I.M.; visualization, W.B.; supervision, R.S.-L. and R.T.; project administration, R.T.; funding acquisition, R.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through Collaborative Research and Development Grants (project RDCPJ513536-17) and by Ressources Aquatiques Québec Research Network (Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies, project 2020-RS4-265329).

Acknowledgments: The authors would like to thank Nathalie Gauthier, Steeven Ouellet, Marie-Ève Anglehart, Mathilde G. Pinsonneault and Ressources Aquatiques Québec (RAQ) for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ATR	Attenuated total reflection
BW	Blue water (<i>Haslea ostrearia</i> culture supernatant)
DCM	Dichloromethane
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EMn	Extracellular marennine
EPS	Exopolysaccharide
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GCB	Graphitized carbon black

HPLC	High-performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
IMn	Intracellular marennine
MP-AES	Microwave plasma-atomic emission spectrometer
MWCO	Molecular weight cutoff
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
PBR	Photobioreactor
ξ_w pH	Hydroorganic pH value of an electrode calibrated in aqueous buffers
w pH	Aqueous pH value
PGC	Porous graphitic carbon
PTFE	Polytetrafluoroethylene
SCX	Strong cation exchange
SPE	Solid-phase extraction
TFA	Trifluoroacetic acid
UV-Vis	UV-Visible spectroscopy

References

- Gastineau, R.; Turcotte, F.; Pouvreau, J.B.; Moraçais, M.; Fleurence, J.; Windarto, E.; Prasetya, F.S.; Arsad, S.; Jaouen, P.; Babin, M.; et al. Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 3161–3189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pouvreau, J.B.; Moraçais, M.; Fleury, F.; Rosa, P.; Thion, L.; Cahingt, B.; Zal, F.; Fleurence, J.; Pondaven, P. Preliminary characterisation of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 757–767. [[CrossRef](#)]
- Falaise, C.; James, A.; Travers, M.A.; Zanella, M.; Badawi, M.; Mouget, J.L. Complex Relationships between the Blue Pigment Marennine and Marine Bacteria of the Genus *Vibrio*. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Turcotte, F.; Mouget, J.L.; Genard, B.; Lemarchand, K.; Deschênes, J.S.; Tremblay, R. Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* culture supernatant containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. *Aquat. Living Resour.* **2016**, *29*, 401. [[CrossRef](#)]
- Xuan, R.N.; Safitri, I.; Mouget, J.; Pruvost, J.; Turpin, V.; Jaouen, P. Design of an artificial culture medium to optimize *Haslea ostrearia* biomass and marennine production. *Algal Res.* **2020**, *45*, 101653. [[CrossRef](#)]
- Liška, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis—historical development and overview. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 3–16. [[CrossRef](#)]
- Michel, M.; Buszewski, B. Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications. *Adsorption* **2009**, *15*, 193–202. [[CrossRef](#)]
- Shibukawa, M.; Terashima, H.; Nakajima, H.; Saitoh, K. Evaluation of the surface charge properties of porous graphitic carbon stationary phases treated with redox agents. *Analyst* **2004**, *129*, 623–628. [[CrossRef](#)]
- Guillard, R.R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1975; pp. 29–60.
- Pouvreau, J.B.; Moraçais, M.; Massé, G.; Rosa, P.; Robert, J.M.; Fleurence, J.; Pondaven, P. Purification of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 769–781. [[CrossRef](#)]
- Wiczling, P.; Markuszewski, M.J.; Kaliszczan, R. Determination of p K a by pH Gradient Reversed-Phase HPLC. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3069–3077. [[CrossRef](#)]
- Tako, M.; Yoza, E.; Tohma, S. Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Bot. Mar.* **2000**, *43*, 393–398. [[CrossRef](#)]
- Berkhout, J.H.; Aswatha Ram, H. Recent Advancements in Spectrophotometric pKa Determinations: A Review. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **2019**, *53*, S475–S480. [[CrossRef](#)]
- Saboural, P.; Chaubet, F.; Rouzet, F.; Al-Shoukr, F.; Azzouna, R.B.; Bouchemal, N.; Picton, L.; Louedec, L.; Maire, M.; Rolland, L.; et al. Purification of a low molecular weight fucoidan for SPECT molecular imaging of myocardial infarction. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4851–4867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Ziadi, M.; Bouzaïene, T.; M'Hir, S.; Zaafour, K.; Mokhtar, F.; Hamdi, M.; Boisset-Helbert, C. Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by three lactic acid bacteria. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1896240. [[CrossRef](#)]
16. Rani, V.; Shakila, R.; Jawahar, P.; Srinivasan, A. Influence of species, geographic location, seasonal variation and extraction method on the fucoidan yield of the brown seaweeds of Gulf of Mannar, India. *Indian J. Pharm. Sci.* **2017**, *79*, 65–71. [[CrossRef](#)]
17. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Vyvyan, J.A. *Introduction to Spectroscopy*, 5th ed.; Cengage Learning: Boston, MA, USA, 2013.
18. Guo, Q.; Ai, L.; Cui, S. *Methodology for Structural Analysis of Polysaccharides*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019.
19. Ale, M.T.; Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2605–2621. [[CrossRef](#)]
20. Pereira, L.; Amado, A.M.; Critchley, A.T.; Van de Velde, F.; Ribeiro-Claro, P.J. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1903–1909. [[CrossRef](#)]
21. Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 238–245. [[CrossRef](#)]
22. Jesumani, V.; Du, H.; Pei, P.; Aslam, M.; Huang, N. Comparative study on skin protection activity of polyphenol-rich extract and polysaccharide-rich extract from *Sargassum vachellianum*. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227308. [[CrossRef](#)]
23. Sichert, A.; Le Gall, S.; Klau, L.J.; Laillet, B.; Rogniaux, H.; Aachmann, F.L.; Hehemann, J.H. Ion-exchange purification and structural characterization of five sulfated fucoidans from brown algae. *Glycobiology* **2020**. [[CrossRef](#)]
24. Sichert, A. Fucoidan Degradation by Marine Bacteria. Ph.D. Thesis, Universität Bremen, Bremen, Germany, 2020.
25. Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Ustuzhanina, N.E.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 719–730. [[CrossRef](#)]
26. Gügi, B.; Le Costaouec, T.; Burel, C.; Lerouge, P.; Helbert, W.; Bardor, M. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5993–6018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Song, H.; Li, P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46*, 6–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Pereira, L. *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018.
29. Pierre, G.; Sopena, V.; Juin, C.; Mastouri, A.; Graber, M.; Maugard, T. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2011**, *16*, 937–945. [[CrossRef](#)]
30. Rao, E.V.; Ramana, K.S. Structural studies of a polysaccharide isolated from the green seaweed *Chaetomorpha antennina*. *Carbohydr. Res.* **1991**, *217*, 163–170. [[PubMed](#)]
31. Monser, L. Liquid chromatographic determination of four purine bases using porous graphitic carbon column. *Chromatographia* **2004**, *59*, 455–459. [[CrossRef](#)]
32. Barrett, D.; Pawula, M.; Knaggs, R.; Shaw, P. Retention behavior of morphine and its metabolites on a porous graphitic carbon column. *Chromatographia* **1998**, *47*, 667–672. [[CrossRef](#)]
33. Reijenga, J.; van Hoof, A.; van Loon, A.; Teunissen, B. Development of methods for the determination of pKa values. *Anal. Chem. Insights* **2013**, *8*, ACI-S12304. [[CrossRef](#)]
34. Karaffa, L.S. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*; RSC Publishing: Cambridge, UK, 2013.
35. Bapiro, T.E.; Richards, F.M.; Jodrell, D.I. Understanding the complexity of porous graphitic carbon (PGC) chromatography: modulation of mobile-stationary phase interactions overcomes loss of retention and reduces variability. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6190–6194. [[CrossRef](#)]
36. West, C.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3201–3216. [[CrossRef](#)]

37. Chemat, F.; Vian, M.A. *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014.
38. Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* **2007**, *9*, 927–934. [[CrossRef](#)]
39. Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. Greener organic solvents in analytical chemistry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2017**, *5*, 1–4. [[CrossRef](#)]
40. Golden, J.S.; Handfield, R.B. Why biobased? In *Opportunities in the Emerging Bioeconomy*; US Department of Agriculture: Washington, DC, USA, 2014; Volume 40.
41. Kurian, J.K.; Nair, G.R.; Hussain, A.; Raghavan, G.V. Feedstocks, logistics and pre-treatment processes for sustainable lignocellulosic biorefineries: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2013**, *25*, 205–219. [[CrossRef](#)]
42. Pereira, C.S.; Silva, V.M.; Rodrigues, A.E. Ethyl lactate as a solvent: properties, applications and production processes—A review. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2658–2671. [[CrossRef](#)]
43. Micăle, F.; Albu, F.; Iorgulescu, E.E.; Medvedovici, A.; Tache, F. Ethyl Lactate as a Greener Alternative to Acetonitrile in RPLC: A Realistic Appraisal. *J. Chromatogr. Sci.* **2015**, *53*, 1701–1707. [[CrossRef](#)]
44. Hennion, M.C. Graphitized carbons for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 73–95. [[CrossRef](#)]
45. Ruhaak, L.R.; Deelder, A.M.; Wuhler, M. Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 163–174. [[CrossRef](#)]
46. Funari, C.S.; Carneiro, R.L.; Khandagale, M.M.; Cavalheiro, A.J.; Hilder, E.F. Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 1458–1465. [[CrossRef](#)]
47. Smallwood, I.M. *Solvent Recovery Handbook*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2002.
48. Miller, R.L.; Guimond, S.E.; Prescott, M.; Turnbull, J.E.; Karlsson, N. Versatile separation and analysis of heparan sulfate oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 8942–8950. [[CrossRef](#)]
49. Takeuchi, T.; Kojima, T.; Miwa, T. Ion chromatography of inorganic anions on graphitic carbon as the stationary phase. *J. High Resolut. Chromatogr.* **2000**, *23*, 590–594. [[CrossRef](#)]
50. Shibukawa, M.; Unno, A.; Oyashiki, Y.; Nagoya, A.; Oguma, K.; Miura, T. Redox reaction catalyzed by a porous graphite carbon packing and its application to selectivity enhancement of high-performance liquid chromatography separation of metal complexes. *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 397–400. [[CrossRef](#)]
51. Zhang, F.; Zhao, Q.; Yan, X.; Li, H.; Zhang, P.; Wang, L.; Zhou, T.; Li, Y.; Ding, L. Rapid preparation of expanded graphite by microwave irradiation for the extraction of triazine herbicides in milk samples. *Food Chem.* **2016**, *197*, 943–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kerton, F.M.; Marriott, R. *Alternative Solvents for Green Chemistry*; Number 20; Royal Society of Chemistry: London, UK, 2013.
53. Pouvreau, J.B. Purification et Caractérisation du Pigment Bleu-Vert “Marennine” Synthétisé par la Diatomée Marine *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen: Propriétés Physico-Chimiques et Activités Biologiques. Ph.D. Thesis, Université de Nantes, Nantes, France, 2006.
54. Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules* **2008**, *13*, 1671–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shen, P.; Yin, Z.; Qu, G.; Wang, C. Fucoidan and Its Health Benefits. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 223–238.
56. Ale, M.T.; Meyer, A.S. Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 8131–8141. [[CrossRef](#)]
57. Gogou, A.; Repeta, D.J. Particulate-dissolved transformations as a sink for semi-labile dissolved organic matter: Chemical characterization of high molecular weight dissolved and surface-active organic matter in seawater and in diatom cultures. *Mar. Chem.* **2010**, *121*, 215–223. [[CrossRef](#)]
58. Satpati, G.G. Algal Sulfated Polysaccharides: Potent Immunomodulators against COVID-19 in Pandemic 2020. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* **2020**, *17*, 601–605. [[CrossRef](#)]
59. Song, S.; Peng, H.; Wang, Q.; Liu, Z.; Dong, X.; Wen, C.; Ai, C.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhu, B.W. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7415–7420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kwon, P.S.; Oh, H.; Kwon, S.J.; Jin, W.; Zhang, F.; Fraser, K.; Hong, J.J.; Linhardt, R.J.; Dordick, J.S. Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 50. [[CrossRef](#)]

61. Nishiguchi, T.; Jiang, Z.; Ueno, M.; Takeshita, S.; Cho, K.; Roh, S.W.; Kang, K.H.; Yamaguchi, K.; Kim, D.; Oda, T. Reevaluation of bactericidal, cytotoxic, and macrophage-stimulating activities of commercially available *Fucus vesiculosus fucoïdan*. *Algae* **2014**, *29*, 237–247. [[CrossRef](#)]
62. Holtkamp, A.D.; Kelly, S.; Ulber, R.; Lang, S. Fucoïdanes and fucoïdanases—Focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 1. [[CrossRef](#)]
63. Guo, M.Q.; Hu, X.; Wang, C.; Ai, L. Polysaccharides: Structure and solubility. In *Solubility of Polysaccharides*; BoD—Books on Demand: Norderstedt, Germany, 2017; pp. 7–21.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: Extraction improvement of the bioactive blue-green pigment “marennine” from diatom *Haslea ostrearia*’s blue water: a solid-phase method based on graphitic matrices

William Bélanger^{1,2}, Alexandre A. Arnold³, François Turcotte^{1,2}, Richard Saint-Louis², Jean-Sébastien Deschênes⁴, Bertrand Genard⁵, Isabelle Marcotte³ and Réjean Tremblay¹

1. Supplementary results

- 2 NMR spectra are shown in the following figures. The figure S1 presents the HSQC ¹H-¹³C
- 3 spectrum of the yellow tinted, sulfated polysaccharides fraction extracted from *Haslea ostrearia*’s blue
- 4 water, while the proton spectrum appears in figure S2.

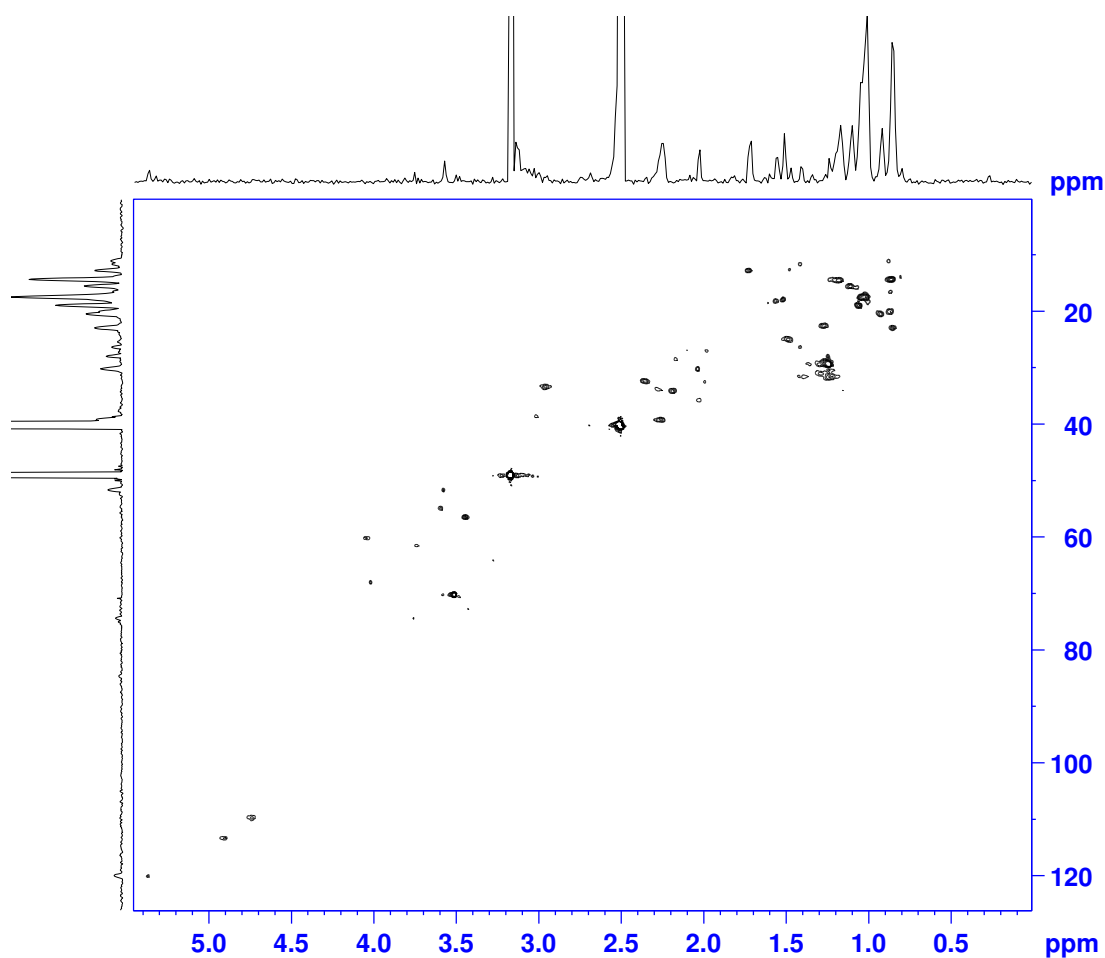


Figure S1. HSQC ¹H-¹³C spectrum of the sulfated polysaccharides crude extract in DMSO-d₆, 25 °C.

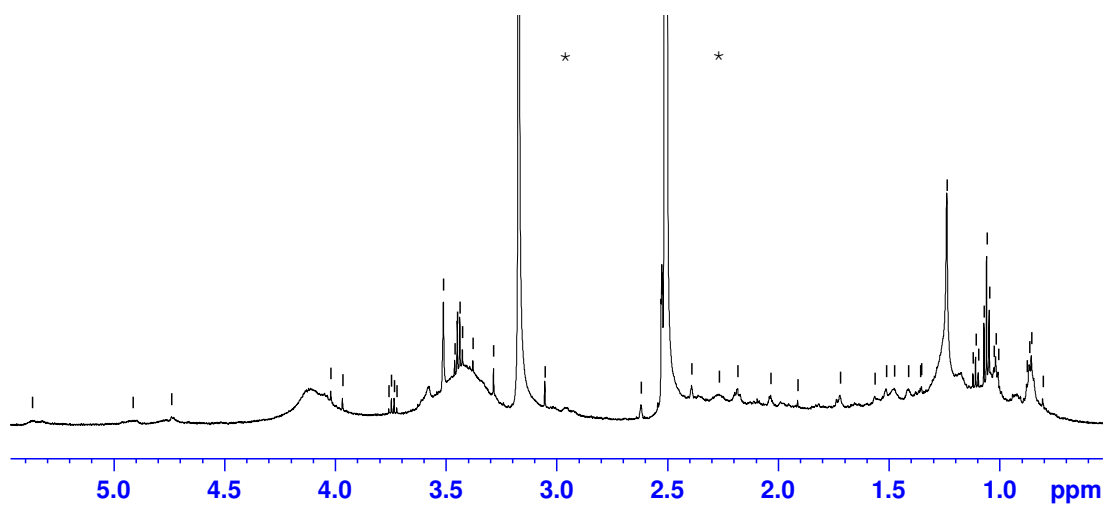


Figure S2. NMR proton spectrum of the sulfated polysaccharides crude extract in DMSO-d₆, 25 °C.
Intense signals at 2.5 and 3.2 ppm (*) belong to DMSO and methanol, respectively.

5 **Abbreviations**

6 The following abbreviations are used in this manuscript:

7

8 NMR Nuclear magnetic resonance spectroscopy

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de la présente étude consistait à développer un procédé d'extraction sur phase solide graphitique qui soit adapté aux propriétés de la marennine. En réponse aux obstacles inhérents à la méthode précédente et aux défis entourant sa caractérisation moléculaire, une approche novatrice a été proposée. En plus de mettre en évidence les principes et paramètres clés régissant l'extraction, nos résultats posent une nouvelle hypothèse concernant l'identité chimique de la marennine.

En ce qui a trait à l'extraction, l'utilisation du noir de carbone graphité (GCB) s'est avérée être un succès pour la production d'extrait brut, avec un rendement avoisinant 70% et une qualité apparemment similaire à ce que procure l'ultrafiltration. Il a été démontré que la marennine est retenue sur la phase stationnaire par des forces de dispersion de London (Van der Waals), de même que par des interactions ioniques pouvant être partiellement inhibées par l'ajout d'agents réducteurs. Ainsi, le pH de la phase mobile et la concentration en solvant organique ont été les principaux facteurs affectant le rendement. Ces paramètres sont en lien avec l'état d'ionisation de l'analyte, sa solubilité dans la phase mobile et le pouvoir éluotropique (Bélanger *et al.*, 2020). Les résultats suggèrent également qu'il est possible d'utiliser le graphite, une alternative naturelle à faible coût pouvant être produite par la pyrolyse de biomasse (Kamal *et al.*, 2020).

En contraste avec l'ultrafiltration, notre procédé requiert un investissement minimal et se prête à une extraction "en ligne", ainsi compatible avec la production continue en photobioréacteur et évitant l'entreposage d'eau bleue sur le site de production. Ces avancées pourraient permettre le développement d'une unité d'extraction mobile, en plus d'ouvrir la voie vers une procédure unifiée permettant d'exécuter à la fois la préconcentration, le dessalage et la purification. Alors que l'accessibilité constitue souvent un facteur limitant en ce qui a trait à l'obtention de produits na-

turels marins pharmacologiquement actifs (Doshi *et al.*, 2011), ces avantages seront des facilitateurs en vue des recherches futures en lien avec la marennine. En complément à cette méthode, un spectrophotomètre monochromatique à flux continu a été développé (voir annexe II). Bien que les spectrophotomètres à large spectre soient communément utilisés en laboratoire, des détecteurs monochromatiques portables sans pièces mobiles et à coût modique pourraient remplir une niche en biotechnologie. En l'occurrence, cet appareil permet de déterminer en temps réel la concentration en marennine dans les photobioréacteurs, ou encore la détection du point de saturation d'un système d'extraction en ligne.

Malgré que l'usage du lactate d'éthyle ait permis d'atteindre un haut rendement d'extraction, son acidité est toutefois incompatible avec la constante de dissociation (pK_a) de la marennine, qui nécessite une phase mobile de pH alcalin afin d'être désorbée. Alors que le lactate d'éthyle a été retenu pour sa faible volatilité, un choix ainsi plus sécuritaire que l'acétone, ce dernier pourrait s'avérer plus approprié compte tenu de sa nature aprotique. Cette propriété permettrait de minimiser la concentration en tampon pH et ainsi prévenir l'étape de dialyse en fin de procédé. Comme le lactate d'éthyle, l'usage de l'acétone constitue un choix écologique, tant pour sa faible toxicité que pour sa rapide biodégradabilité (Howard, 2000). De même, il peut être biosourcé à partir de lignocellulose (Haigh *et al.*, 2018) et pourrait constituer une opportunité pour la valorisation de la biomasse algale provenant des systèmes de traitements des eaux usées (Ellis *et al.*, 2012).

Enfin, certaines biomolécules sont susceptibles à une dégradation en présence de concentrations élevées en solvant organique (Wiczling *et al.*, 2004). À cet effet, Pouvreau (2006) avait noté une possible altération de la marennine intracellulaire suite à la précipitation dans l'acétone. Dans l'éventualité d'une dégradation de la marennine lors cette étape, l'absence d'azéotrope aqueux et le faible point d'ébullition de l'acétone permettraient sa récupération par évaporation sous pression réduite.

Néanmoins, cette approche implique une étape de purification complémentaire, permettant le retrait de composés plus hydrophobes autrement éliminés lors de la précipitation. Advenant l'innocuité du procédé pour les deux formes de marennine, la précipitation demeurerait ainsi la voie de prédilection.

Notre méthode a permis d'isoler un coproduit jaunâtre à partir de l'eau bleue, pour lequel les spectres infrarouges (ATR-FTIR) correspondent à des fucoïdanes extraits d'algues brunes (figure 5). En revanche, les analyses par RMN n'ont pas été en mesure de confirmer cette hypothèse (Bélanger *et al.*, 2020). Malgré l'absence de certains signaux, les déplacements chimiques sont compatibles avec la structure d'un polysaccharide, bien que les résonances à haut champ pourraient correspondre à des phénols plutôt qu'à de l'arabinose (communication personnelle, Alexandre A. Arnold, 2020). De même, des signaux vers 7 ppm sur le spectre RMN ^1H pourraient indiquer la présence de cycles aromatiques (voir annexe I).

Les techniques de spectroscopie infrarouge et RMN sont complémentaires et fréquemment utilisées pour la caractérisation des polysaccharides sulfatés (Korva *et al.*, 2016). La FTIR est utilisée afin d'identifier les groupes fonctionnels d'une molécule pour en faire ressortir sa nature chimique générale, alors que la RMN permet d'obtenir une caractérisation fine de la structure moléculaire par une représentation des différences entre les environnements chimiques des atomes. Dans le cas d'un polymère complexe, l'infrarouge est donc utile afin d'identifier les caractères dominants, en l'occurrence une structure polysaccharidique liée à des groupements sulfates. En revanche, une surabondance d'information entrave l'interprétation des spectres RMN, dont les signaux tendent à se superposer. En réponse à la complexité inhérente à la structure des fucoïdanes, ces derniers sont donc communément désulfatés et désacétylés afin de simplifier leurs spectres (Bilan *et al.*, 2008; Tako *et al.*, 2000). Le coproduit à l'étude, une fraction non dérivée, présente ainsi un spectre RMN fortement encombré. L'absence des signaux caractéristiques attendus pour les carbonés

anomériques du fucose tend à réfuter l'hypothèse d'un fucoïdane, bien qu'un autre type de polysaccharide sulfaté demeure possible. Les similitudes entre les spectres des différents polysaccharides peuvent aussi causer des ambiguïtés, alors que les substitutions au sein même de la famille des fucoïdanes sont souvent hétérogènes (Luthuli *et al.*, 2019). L'incohérence entre les deux résultats pourrait aussi provenir d'une faible teneur en fucose, en plus de signaux RMN pouvant être masqués par la sulfatation des glucides (Sichert, 2019; Bilan *et al.*, 2002).

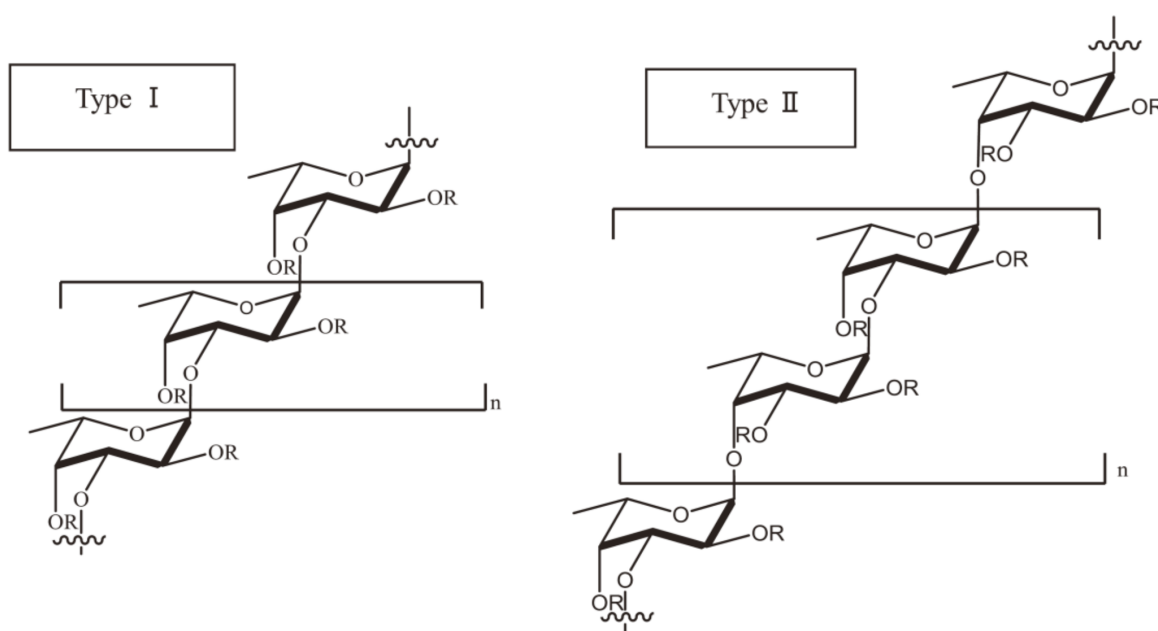


FIGURE 5 – Structures typiques du fucoïdane extrait des algues brunes. La lettre R représente un groupement sulfate, un acide glucuronique ou un fucopyranose. La répartition des autres sucres est généralement méconnue (Luthuli *et al.*, 2019).

En RMN, des résonances similaires ont aussi été observées dans plusieurs échantillons de marennine (Dittmer, 2015). À cet effet, des carbohydrates complexes constitués de fucoïdanes et de polyphénols ont été isolés à partir de l'algue brune *Fucus vesiculosus* (Marinova, 2020). La caractérisation par spectrophotométrie UV-visible laisse supposer de la persistance de ce polymère dans les extraits de marennine, et l'intense résonance à 1,22 ppm observée dans les spectres RMN de la marennine do-

mine dans la fraction jaune (voir annexe I). L'analyse de chromatogrammes obtenus d'après la méthode décrite par Pouvreau *et al.* (2006b) indique que la purification sur diéthylaminoéthyle (DEAE-Sepharose) permette également d'isoler une fraction jaune absorbant peu dans le visible (677 nm) et fortement dans les UV (280 nm) (figure 6). Toutefois, le chromatogramme à l'origine de cette sous-fraction diffère du profil habituel obtenu lors de la purification par échange anionique (communication personnelle, Jean-Bernard Pouvreau, 2021). Ainsi, les incohérences rapportées concernant la présence de polysaccharides dans les extraits de marennine (Pouvreau *et al.*, 2006a; Gastineau *et al.*, 2014) pourraient provenir de légères variations lors de cette étape de purification.

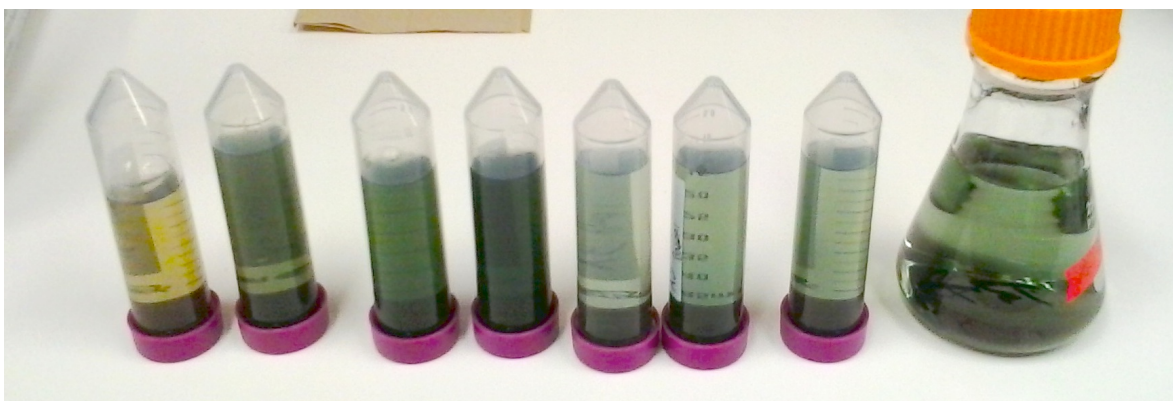


FIGURE 6 – Fractions obtenues par chromatographie d'échange anionique semi-préparative (Pouvreau et Turcotte, 2015).

La caractérisation de cette fraction pourrait mener à des techniques plus ciblées permettant l'isolation du chromophore, de même qu'à une meilleure distinction des molécules responsables de la bioactivité dans les extraits de marennine. Un composé apparenté aux fucoïdanes pourrait aussi fournir une opportunité pour la valorisation de la pâte de microalgues. Néanmoins, davantage de recherches sont nécessaires afin de mieux discerner sa composition. L'hypothèse d'un polysaccharide sulfaté pourrait être validée par un test qualitatif tel que Heparin Red (Zayed *et al.*, 2018), et sa composition en sucre par une hydrolyse suivie d'une analyse par chromatographie liquide

couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Wang *et al.*, 2015). Enfin, la présence de polyphénols et la masse moléculaire des différents composés présents dans cette fraction devraient être déterminées.

La présence de composés similaires aux fucoïdanes pourrait aussi expliquer certains effets bioactifs observés pour la marennine. Notamment, il a été démontré que la marennine produite par *H. ostrearia* exerce un effet inhibiteur contre le virus de l'herpès simplex (HSV1), de même qu'une action anti-proliférative pour certaines cellules cancéreuses (Gastineau *et al.*, 2012b). Ces effets sont aussi bien décrits pour plusieurs fucoïdanes (Ale et Meyer, 2013; Shen *et al.*, 2018). Pour ces derniers, on suppose que le mécanisme antiviral proviendrait de leur charge négative, permettant une liaison avec les glycoprotéines de la membrane de certains virus et entravant ainsi leur adsorption sur les cellules hôtes (Shen *et al.*, 2018). De façon similaire, il a été proposé que la marennine puisse se lier aux protéines contenues dans les membranes cellulaires (Gastineau *et al.*, 2012b). Plus récemment, des expériences en RMN du solide ont démontré que la marennine extracellulaire de *H. provincialis* permet de perturber la membrane externe de bactéries *Escherichia coli* par une possible interaction avec les lipopolysaccharides (LPS), dont l'effet serait presque identique à celui exercé par des nanoparticules de fullerénol (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). De même, Bouhleb *et al.* (2021) ont étudié l'action de la marennine sur la membrane de *Vibrio splendidus*, démontrant à nouveau une probable interaction avec les LPS. Bien qu'ils soient chargés négativement, les LPS sont stabilisés par la présence de cations divalents, pour lesquels les polyanions peuvent exercer une compétition électrostatique (Lam *et al.*, 2014).

Selon les travaux de Zayed et Ulber (2019), les biotechnologies constituent une nouvelle opportunité pour la production de composés d'intérêt pharmaceutique. Dans le cas du fucoïdane, la présence de contaminants tels que les polyphénols peut présenter des effets bioactifs importants. Ce faisant, le développement d'un procédé de

production économique permettant l'atteinte d'un degré de purification suffisant est un prérequis à son étude pharmacologique. La culture de microalgues en photobio-réacteur pourrait ainsi constituer une voie de production future afin de réduire la pression écologique exercée sur les algues brunes, principale source biogénique de fucoïdane. De même, les étapes de post-récolte sont simplifiées par rapport aux traitements habituels des macroalgues, alors que pour ces dernières la préparation de la biomasse nécessite un nettoyage des impuretés, un trempage et parfois une étape de blanchiment (Zhu *et al.*, 2021). Qui plus est, la culture de microalgues permet de stabiliser l'approvisionnement, d'optimiser la production, d'accélérer la croissance, d'accroître la qualité et de densifier la production (Zayed et Ulber, 2019).

Dans ce contexte, le procédé décrit dans ce mémoire est susceptible de répondre aux impératifs du futur, tant pour ses aspects écologiques et économiques que pour l'ensemble des bénéfices inhérents à la régie biotechnologique. Les bases de son utilisation étant établies, davantage de recherches sont nécessaires afin d'optimiser son utilisation. Notamment, le remplacement du lactate d'éthyle par un solvant aprotique, la substitution de la solution dichlorométhane-méthanol pour des solvants verts, et enfin l'ajout d'étapes supplémentaires permettant d'améliorer la pureté des extraits. Le transfert vers la chromatographie liquide pourrait aussi devenir un atout au développement de la purification, avec des retombés à la fois pour l'étape de pré-concentration et la caractérisation moléculaire de la marennine.

ANNEXE I

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Des aperçus détaillés d'un spectre RMN du proton sont présentés dans les figures suivantes. Ces données proviennent de l'analyse d'un groupe de polymères jaunâtre contenu dans l'eau bleue. Cette fraction ne contient aucun pigment bleu.

Brièvement, 5 g de noir de carbone graphité (GCB) a été conditionné avec 120 mL d'éthanol, réduit avec 120 mL de métabisulfite de sodium 60 mM, puis chargé avec 1,2 L d'eau bleue. Les sels et l'eau résiduelle ont été rincés avec 120 mL d'eau suivis de 120 mL d'éthanol, puis la fraction jaune a été éluée avec 60 mL d'une solution de dichlorométhane et méthanol (6 : 4, v/v) contenant de l'acide trifluoroacétique (0,2%, v/v). L'extrait a été évaporé à sec puis dissous dans 500 µL de diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d₆). Les échantillons ont été analysés avec un spectromètre Bruker Avance III HD à une fréquence ¹H de 599.9 MHz équipé d'une sonde BBFO double-résonance de 5 mm. Les spectres ¹H ont été enregistrés avec une seule impulsion de 30° degrés, 16 répétitions et un temps d'acquisition de 2,73 s. Le signal provenant de l'humidité résiduelle a été éliminé par présaturation du pic de l'eau. (Bélanger *et al.*, 2020)

La figure 7 présente un grossissement du pic vers 1,22 ppm tel qu'observé dans les extraits de marennine.

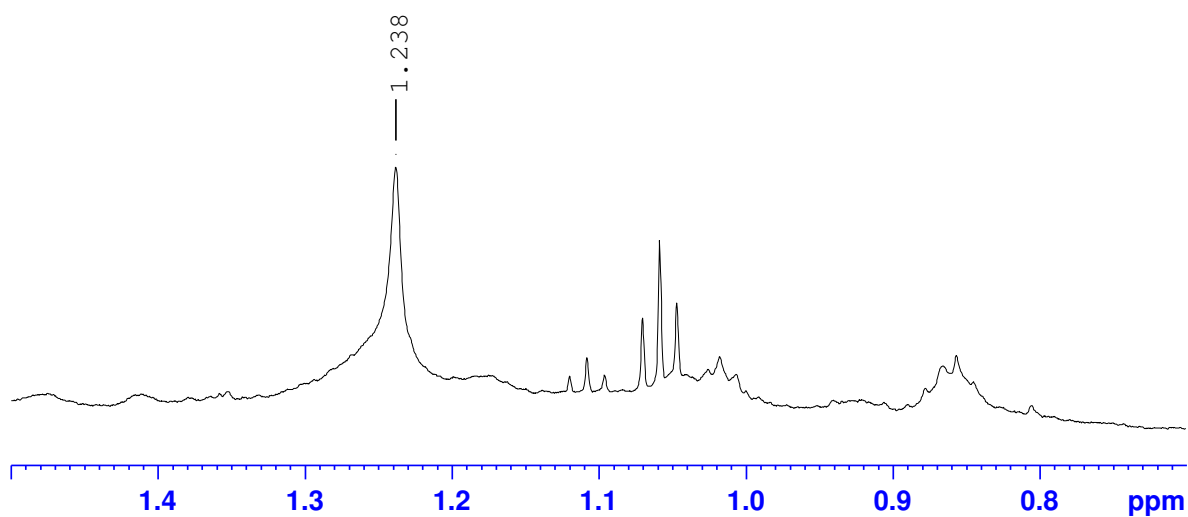


FIGURE 7 – Spectre ^1H de l'extrait de polysaccharides sulfatés. DMSO- d_6 , 25°C.

La figure 8 illustre des signaux vers 7 ppm, pouvant correspondre à des cycles aromatiques.

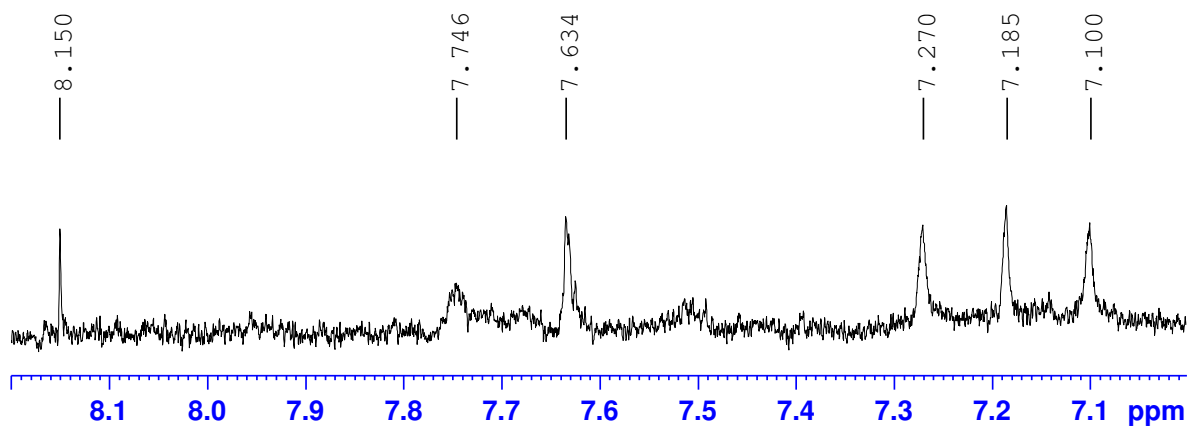


FIGURE 8 – Spectre ^1H de l'extrait de polysaccharides sulfatés. DMSO- d_6 , 25°C.

ANNEXE II

FABRICATION D'UN SPECTROPHOTOMÈTRE MONOCHROMATIQUE

En complément à la méthode d'extraction sur phase solide décrite précédemment, la conception d'un spectrophotomètre minimaliste a été explorée. L'appareil fut inspiré d'un compteur de cellules décrit par Kutschera et Lamb (2018), dont le principe consiste en la mesure de la diffusion lumineuse à une longueur d'onde à la limite du visible (740 nm). Au coeur de ce spectrophotomètre, on retrouve un porte-cuvette imprimable par dépôt de filament en fusion (FFF), une diode électroluminescente (DEL) monochromatique et une photodiode permettant de mesurer l'intensité lumineuse. Une longueur d'onde de 660 nm a été utilisée conformément au λ_{\max} d'absorbance de la marennine extracellulaire (Bélanger *et al.*, 2020). La cuvette est constituée d'une pipette Pasteur en borosilicate, une commodité répandue en laboratoire. Le porte-cuvette est une modélisation 3D paramétrique, une propriété permettant des modifications rapides par l'utilisateur. Ainsi, le diamètre de la cuvette est ajusté avec précision et des longueurs d'onde supplémentaires peuvent être ajoutées par une modification minimale du code. Cette flexibilité permet également la modification du parcours optique selon le type de cuvette utilisée, allant des pipettes à large volume aux tubes capillaires.

Combiné à une unité d'extraction mobile, le module de détection serait utile afin de détecter la saturation de la phase stationnaire, ou encore pour déterminer en temps réel la concentration en marennine dans les photobioréacteurs.

Un aperçu du module est présenté à la figure 9. L'appareil est muni de deux raccords passe-cloison (*bulkhead hose barb*) qui assurent l'entrée et la sortie du liquide. Un bouton permet de réinitialiser la ligne de base servant à calculer la transmittance et l'absorbance. Une transmittance supérieure à 101% est indiquée par un voyant rouge (libellé "calibration"), alors qu'une diminution en deçà de 98% est communiquée à l'aide du voyant "Saturation".

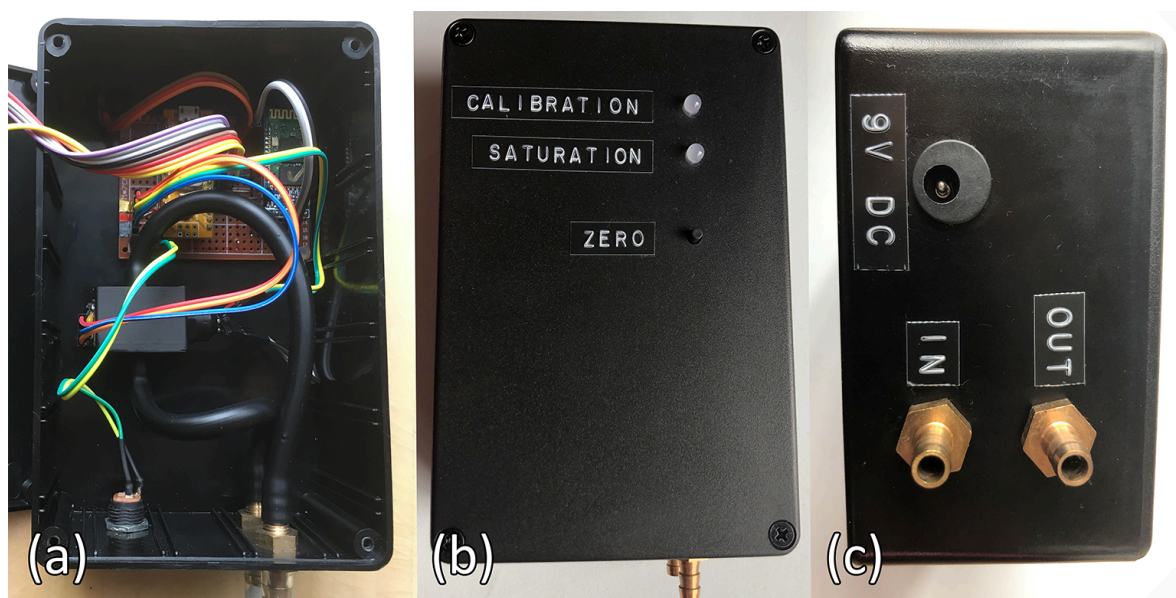


FIGURE 9 – Photos du spectrophotomètre. Vues (a) intérieure, (b) extérieure, (c) inférieure.

Les signaux provenant de la photodiode et des sondes de températures sont transférés vers un microcontrôleur, où l'information est traitée puis envoyée à un module de transmission Bluetooth via un protocole de communication série UART (Universal Asynchronous Receiver Transmitter). Les différentes composantes de l'appareil sont détaillées dans la figure 10, tandis que la figure 11 illustre le modèle 3D de la porte-cuvette, dont la source lumineuse (DEL) peut être remplacée afin d'en modifier la longueur d'onde. Les figures 12 et 13 présentent les schémas électriques.

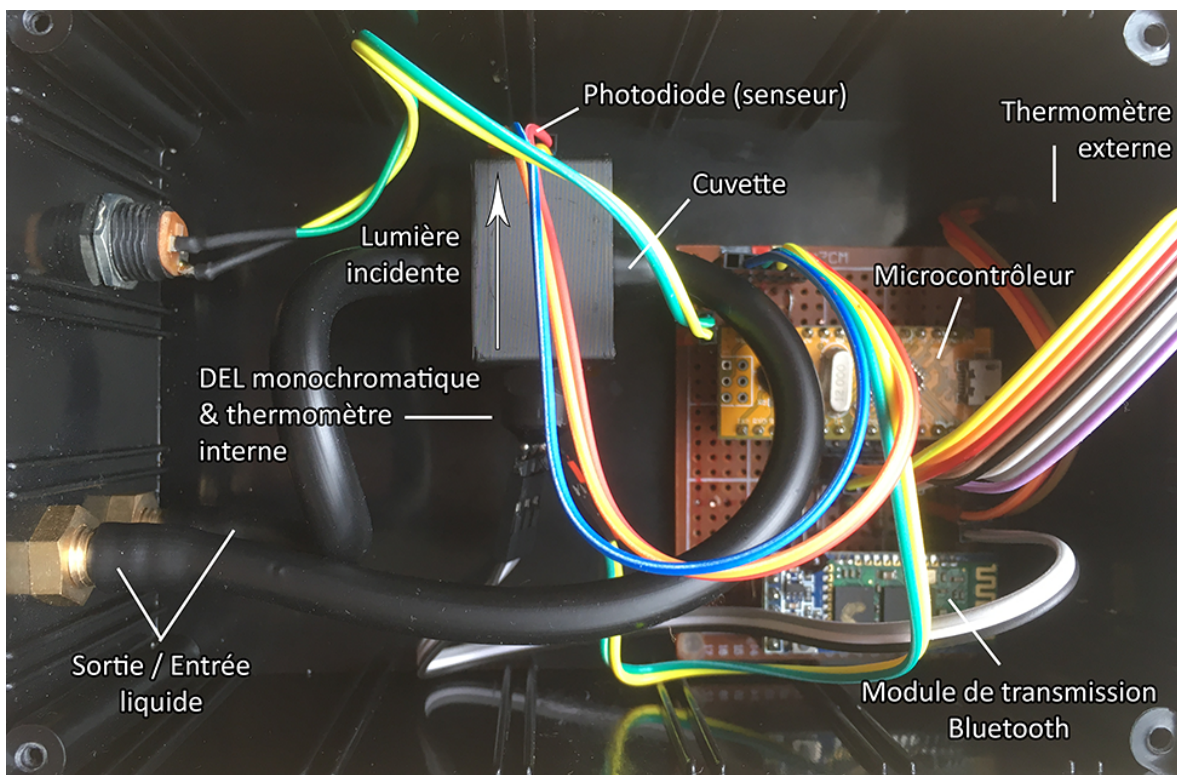


FIGURE 10 – Vue intérieure et présentation des composantes principales.

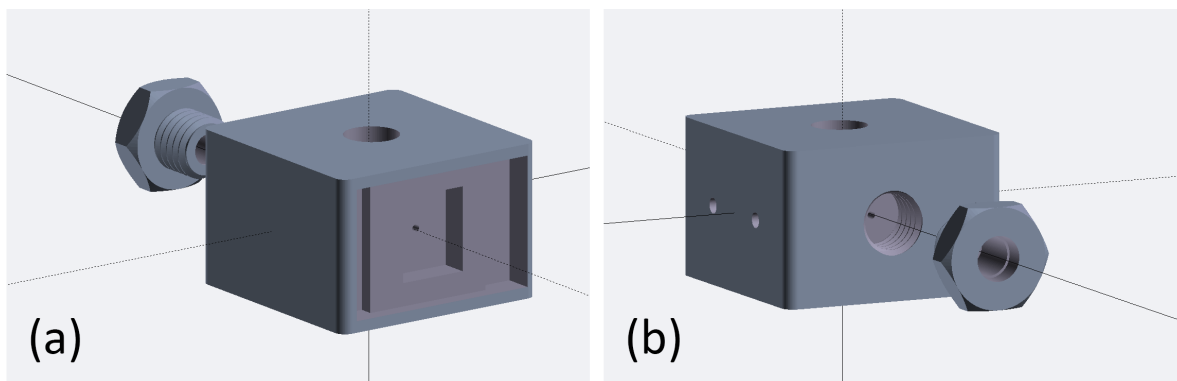


FIGURE 11 – Vue d'ensemble du porte-cuvette, avec d'un côté (a) un support pour la photodiode et de l'autre (b) un trou taraudé pour l'insertion d'une DEL monochromatique interchangeable. L'opercule traverse une pipette en verre placé perpendiculairement au faisceau lumineux.

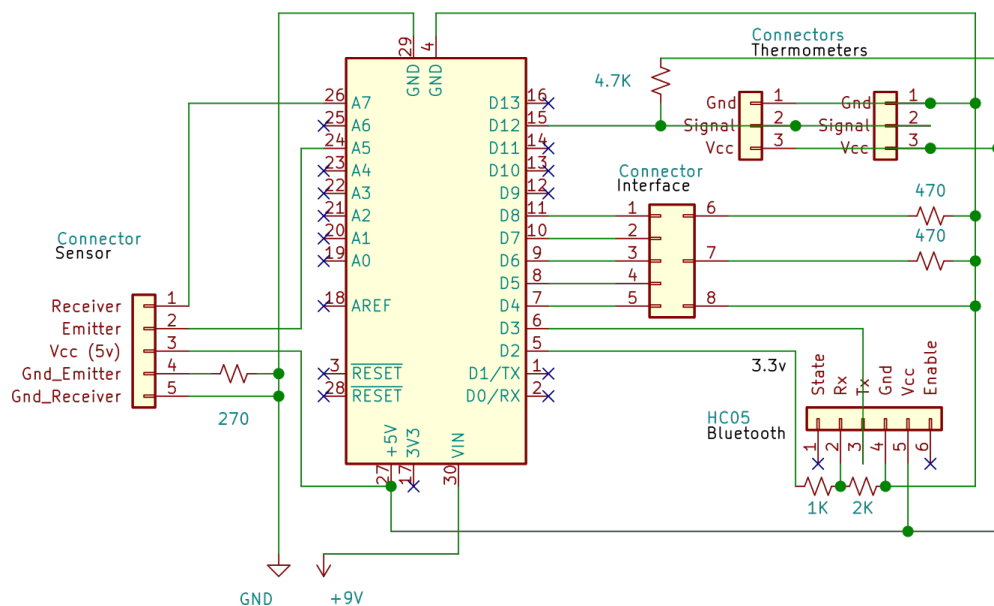


FIGURE 12 – Schéma électrique de la carte mère et disposition des connecteurs.

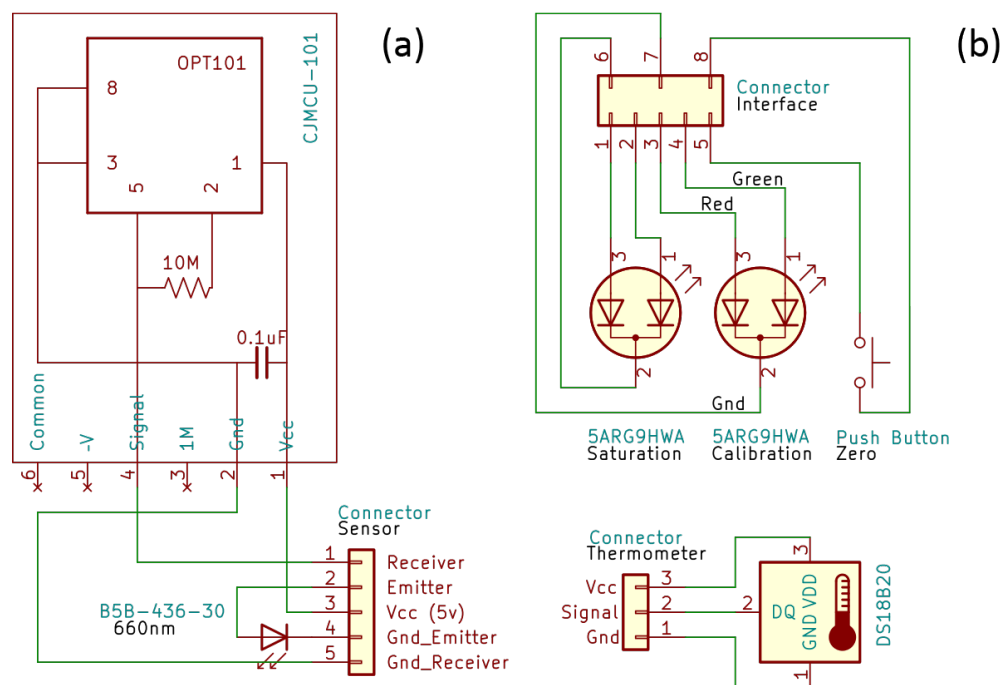


FIGURE 13 – Schémas électriques des composants du porte-cuvette (a) et des interfaces périphériques (b).

Dans le but de faciliter l'enregistrement et la visualisation des données en temps réel, un logiciel d'acquisition multiplateforme a été développé dans le langage Python, avec l'aide de liaisons C++ pour le cadre (*framework*) Qt (figure 14). Le logiciel permet d'établir la connexion Bluetooth, d'ajuster la résolution et d'exporter les données en format tableur. Enfin, la communication de type duplex permet l'envoi de commande vers le spectrophotomètre. Il est ainsi possible de réinitialiser la valeur de référence ou de contrôler la source lumineuse à distance.

Signal	Baseline	Transmittance	Absorbance	Internal	External	Date	Time
853	858	99.42	0.0025	12.75	23.75	30/03/2021	14:40:13
853	858	99.42	0.0025	12.75	24.00	30/03/2021	14:40:14
853	858	99.42	0.0025	12.75	24.00	30/03/2021	14:40:15
853	858	99.42	0.0025	12.75	24.00	30/03/2021	14:40:16
853	858	99.42	0.0025	12.75	24.00	30/03/2021	14:40:17
853	858	99.42	0.0025	13.00	24.25	30/03/2021	14:40:18
853	858	99.42	0.0025	13.00	24.25	30/03/2021	14:40:19
853	858	99.42	0.0025	13.00	24.25	30/03/2021	14:40:20

FIGURE 14 – Capture d'écran du logiciel d'acquisition des données.

La compatibilité avec le système d'exploitation Linux permet de dédier un ordinateur portable ancien, ou encore un nano-ordinateur monocarte (p. ex. Raspberry Pi) à l'acquisition des données. De même, la liste succincte des composantes réduit l'investissement à un minimum. Le coût est de 98\$ par unité, pouvant être réduit à 42\$ pour une échelle de seulement 10 unités (tableau 1). Le coût unitaire est augmenté de 7\$ par longueur d'onde supplémentaire. Le capteur (OPT101) est optimisé pour le spectre du visible et du proche infrarouge (Texas Instruments, 2015), mais l'absorbance dans l'UV-B pourrait être mesurée jusqu'à 240 nm avec la photodiode GUYA-S12SD (Roithner LaserTechnik, 2011).

TABLEAU 1 – Nomenclature d’assemblage (\$CAD)

Composante	Détails	Prix unitaire (\$)	Quantité	Total (\$)
Boîtier	150 x 100 x 55 mm	13.77	1	13.77
Bloc d’alimentation	AC/DC 9 V	4.50	1	4.50
Carte électronique	Atmega328 “Nano”	4.45	1	4.45
DEL bicolore	5ARG9HWA	0.16	2	0.32
DEL monochrome	B5B-436-30	4.46	1	4.46
Module Bluetooth	HC05	4.44	1	4.44
Photodiode	OPT101	2.64	1	2.64
Raccord passe-cloison	1/4”	2.51	2	5.02
Sonde de température	DS18B20	0.55	2	1.09
Tube opaque en silicone	1/4” x 1 m	3.05	0.5	1.53
				42 \$

Ce projet offre un exemple *ad hoc* pour la mesure de l’absorbance UV-visible, avec des applications en chimie et en biotechnologie. Il propose également un modèle pour d’autres techniques reposant sur un principe similaire, par exemple la fluorimétrie ou la mesure d’un point de fusion. Il s’agit d’un outil intéressant afin de vulgariser ces techniques de chimie analytique, voire pour favoriser leur accessibilité. Alors que l’étape d’assemblage est exigeante en main-d’oeuvre, l’effort requis serait minimal suivant l’élaboration d’un circuit imprimé.

La détermination des limites de détection et de quantification pourrait faire l’objet d’une publication future. L’ensemble du projet est distribué sous la licence GNU General Public License v2.0 (GPLv2), incluant les schémas, le modèle du porte-cuvette, le microgiciel (*firmware*) ainsi que le logiciel de l’interface graphique. Le code est disponible à l’adresse suivante :

<https://www.gitlab.com/william.belanger/flowcell>

BIBLIOGRAPHIE

- Ale, M.T. et Meyer, A.S. : Fucoidans from brown seaweeds : An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Advances*, 3(22) :8131–8141, 2013.
- Bélanger, W., Arnold, A.A., Turcotte, F., Saint-Louis, R., Deschênes, J.S., Genard, B., Marcotte, I. et Tremblay, R. : Extraction improvement of the bioactive blue–green pigment “marennine” from diatom *Haslea ostrearia*'s blue water : A solid-phase method based on graphitic matrices. *Marine drugs*, 18(12) :653, 2020.
- Bilan, M.I., Grachev, A.A., Ustuzhanina, N.E., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E. et Usov, A.I. : Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate research*, 337(8) :719–730, 2002.
- Bilan, M.I., Vinogradova, E.V., Tsvetkova, E.A., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E. et Usov, A.I. : A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*. *Carbohydrate research*, 343(15) :2605–2612, 2008.
- Bouhrel, Z., Arnold, A.A., Deschênes, J.S., Mouget, J.L., Warschawski, D.E., Tremblay, R. et Marcotte, I. : Investigating the action of the microalgal pigment marennine on *Vibrio splendidus* by in vivo 2H and 31P solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, page 183642, 2021.
- Cabello, F.C. : Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture : a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7) :1137–1144, 2006.
- Dittmer, J. : *NMR tests of marennine EMn preparations (Rimouski)*. Université le Mans, 2015. Document de travail non publié.
- Doshi, G., Aggarwal, G., Martis, E. et Shanbhag, P. : Novel antibiotics from marine sources. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4 :1446–1461, 2011.
- Ellis, J.T., Hengge, N.N., Sims, R.C. et Miller, C.D. : Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresource technology*, 111 :491–495, 2012.
- Falaise, C., James, A., Travers, M.A., Zanella, M., Badawi, M. et Mouget, J.L. : Complex relationships between the blue pigment marennine and marine bacteria of the genus *Vibrio*. *Marine drugs*, 17(3) :160, 2019.
- FAO : *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the Sustainable Development Goals*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 2018. ISBN 978-92-5-130562-1. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- Gastineau, R. : *Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre Haslea et valorisation de leurs pigments de type marennine*. Thèse de doctorat, Université du Maine, 2011.
- Gastineau, R., Davidovich, N.A., Bardeau, J.F., Caruso, A., Leignel, V., Hardivillier, Y., Jacquette, B., Davidovich, O.I., Rincé, Y., Gaudin, P. et others : *Haslea karadagensis* (bacillariophyta) : a second blue diatom, recorded from the black sea and producing a novel blue pigment. *European Journal of Phycology*, 47(4) :469–479, 2012a.
- Gastineau, R., Pouvreau, J.B., Hellio, C., Morançais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Bourgougnon, N. et Mouget, J.L. : Biological activities of purified marennine, the blue pigment responsible for the greening of oysters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(14) :3599–3605, 2012b.
- Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.B., Morançais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Prasetya, F.S., Arsad, S., Jaouen, P. et others : Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Marine drugs*, 12(6) :3161–3189, 2014.
- Giubileo, F., Di Bartolomeo, A., Iemmo, L., Luongo, G. et Urban, F. : Field emission from carbon nanostructures. *Applied Sciences*, 8(4) :526, 2018.
- Haigh, K.F., Petersen, A.M., Gottumukkala, L., Mandegari, M., Naleli, K. et Görrens, J.F. : Simulation and comparison of processes for biobutanol production from lignocellulose via ABE fermentation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(6) :1023–1036, 2018.
- Howard, W.L. : Acetone. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.
- Kamal, A.S., Othman, R. et Jabarullah, N.H. : Preparation and synthesis of synthetic graphite from biomass waste : A review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(2) :881–894, 2020.
- Kharisov, B.I. et Kharissova, O.V. : *Carbon Allotropes : Metal-Complex Chemistry, Properties and Applications*. Springer, 2019.
- Korva, H., Kärkkäinen, J., Lappalainen, K. et Lajunen, M. : Spectroscopic study of natural and synthetic polysaccharide sulfate structures. *Starch-Stärke*, 68(9-10) : 854–863, 2016.
- Kutschera, A. et Lamb, J.J. : Cost-effective live cell density determination of liquid cultured microorganisms. *Current microbiology*, 75(2) :231–236, 2018.
- Lam, N.H., Ma, Z. et Ha, B.Y. : Electrostatic modification of the lipopolysaccharide layer : competing effects of divalent cations and polycationic or polyanionic molecules. *Soft Matter*, 10(38) :7528–7544, 2014.

- Liška, I. : Fifty years of solid-phase extraction in water analysis—historical development and overview. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2) :3–16, 2000.
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M. et Tong, H. : Therapeutic effects of fucoidan : a review on recent studies. *Marine drugs*, 17(9) :487, 2019.
- Marinova : Maritech® synergy, 2020. URL https://www.marinova.com.au/assets/Maritech_Synergy.pdf. Consulté le 2 février 2021.
- Michel, M. et Buszewski, B. : Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications. *Adsorption*, 15(2) :193–202, 2009.
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B. et Balcázar, J.L. : Biological approaches for disease control in aquaculture : advantages, limitations and challenges. *Trends in microbiology*, 26(11) :896–903, 2018.
- Pouvreau, J.B. : *Purification et caractérisation du pigment bleu-vert "marennine" synthétisé par la diatomée marine Haslea ostrearia (Gaillon/Bory) Simonsen : propriétés physico-chimiques et activités biologiques*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 2006.
- Pouvreau, J.B., Morançais, M., Fleury, F., Rosa, P., Thion, L., Cahingt, B., Zal, F., Fleurence, J. et Pondaven, P. : Preliminary characterisation of the blue-green pigment "marennine" from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of applied phycology*, 18(6) :757–767, 2006a.
- Pouvreau, J.B., Morançais, M., Massé, G., Rosa, P., Robert, J.M., Fleurence, J. et Pondaven, P. : Purification of the blue-green pigment "marennine" from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of applied phycology*, 18(6) :769–781, 2006b.
- Pouvreau, J.B. et Turcotte, F. : *Study on different fractions of marennine*. Université du Québec à Rimouski, 2015. Document de travail non publié.
- Pêches et Océans Canada : Cultiver la mer – faits marquants, 2015. URL <https://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/frm-tml-fra.htm>. Consulté le 26 janvier 2021.
- Pêches et Océans Canada : Moules d'élevage, 2017. URL <https://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/species-especes/mussels-moules-fra.htm>. Consulté le 22 janvier 2021.
- Robert, J.M. : *Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement : utilisation de l'azote par les diatomées dominantes*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 1983.
- Roithner LaserTechnik : *GUVA-S12SD UV-B Sensor*. Roithner LaserTechnik, 2 2011.

- Shen, P., Yin, Z., Qu, G. et Wang, C. : Fucoïdan and its health benefits. *In Bioactive Seaweeds for Food Applications*, pages 223–238. Elsevier, 2018.
- Shibukawa, M., Terashima, H., Nakajima, H. et Saitoh, K. : Evaluation of the surface charge properties of porous graphitic carbon stationary phases treated with redox agents. *Analyst*, 129(7) :623–628, 2004.
- Sichert, A. : *Fucoïdan degradation by marine bacteria*. Thèse de doctorat, Universität Bremen, 2019.
- Statistique Canada : Aquaculture, exportations de certains produits canadiens d'aquaculture, selon la destination, 2019a. URL <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tb11/fr/tv.action?pid=3210000501>. Consulté le 22 janvier 2021.
- Statistique Canada : La production et la valeur de l'aquaculture, 2019b. URL <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tb11/fr/tv.action?pid=3210010701>. Consulté le 22 janvier 2021.
- Syahidah, A., Saad, C., Daud, H. et Abdelhadi, Y. : Status and potential of herbal applications in aquaculture : A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1) :27–44, 2015.
- Tako, M., Yoza, E. et Tohma, S. : Chemical characterization of acetyl fucoïdan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. 2000.
- Tardy-Laporte, C., Arnold, A.A., Genard, B., Gastineau, R., Morançais, M., Mouget, J.L., Tremblay, R. et Marcotte, I. : A 2H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(2) :614–622, 2013.
- Texas Instruments : *OPT101 Monolithic Photodiode and Single-Supply Transimpedance Amplifier*. Texas Instruments, 6 2015. Rev. B.
- Turcotte, F., Mouget, J.L., Genard, B., Lemarchand, K., Deschênes, J.S. et Tremblay, R. : Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* culture supernatant containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. *Aquatic Living Resources*, 29 (4) :401, 2016.
- Wang, H., Zhao, J., Li, D., Wen, C., Liu, H., Song, S. et Zhu, B. : Comparison of polysaccharides of *Haliotis discus hannai* and *Volutharpa ampullacea perryi* by PMP-HPLC-MSn analysis upon acid hydrolysis. *Carbohydrate research*, 415 :48–53, 2015.
- Watts, J.E., Schreier, H.J., Lanska, L. et Hale, M.S. : The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture : sources, sinks and solutions. *Marine drugs*, 15(6) :158, 2017.

- West, C., Elfakir, C. et Lafosse, M. : Porous graphitic carbon : a versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(19) :3201–3216, 2010.
- Wiczling, P., Markuszewski, M.J. et Kaliszan, R. : Determination of pK_a by pH gradient reversed-phase HPLC. *Analytical Chemistry*, 76(11) :3069–3077, 2004.
- Zayed, A., Dienemann, C., Giese, C., Krämer, R. et Ulber, R. : An immobilized perylene diimide derivative for fucoidan purification from a crude brown algae extract. *Process Biochemistry*, 65 :233–238, 2018.
- Zayed, A. et Ulber, R. : Fucoidan production : Approval key challenges and opportunities. *Carbohydrate polymers*, 211 :289–297, 2019.
- Zhu, X., Healy, L., Zhang, Z., Maguire, J., Sun, D.W. et Tiwari, B.K. : Novel postharvest processing strategies for value-added applications of marine algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021.