

Tối ưu hóa điều kiện chiết fucoidan từ rong nâu *Tubinaria decurrens* bằng phương pháp chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm

Nguyễn Ngọc Anh¹, Ngô Văn Quang¹, Quách Thị Minh Thu¹,
Hồ Đức Cường², Nguyễn Quang Tâm¹, Thành Thị Thu Thủy^{1*}

¹Viện Hoá học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài 11/2/2022; ngày chuyển phản biện 15/2/2022; ngày nhận phản biện 7/3/2022; ngày chấp nhận đăng 10/3/2022

Tóm tắt:

Fucoidan là sulfate polysaccharide có trong rong nâu và được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y dược. Gần đây, xu hướng áp dụng các kỹ thuật chiết tiên tiến và tối ưu hóa các điều kiện chiết được đặc biệt quan tâm nhằm đạt hiệu suất chiết tách cao. Trong nghiên cứu này, phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology - RSM) được sử dụng để tối ưu hoá điều kiện chiết tách fucoidan từ rong nâu *Tubinaria decurrens* với sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Sự tác động của 3 yếu tố: nhiệt độ (X_1 : 50-80°C), thời gian (X_2 : 30-60, phút) và công suất siêu âm (X_3 : 40-100%) được nghiên cứu thông qua mô hình Box-Behnken. Kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu để chiết fucoidan là tại nhiệt độ 70°C, thời gian 53 phút và công suất siêu âm 90%. Tại điều kiện tối ưu này, hiệu suất chiết tách thực nghiệm đạt 4,28%, rất gần với hiệu suất cực đại theo tính toán (4,34%).

Từ khóa: chiết siêu âm, fucoidan, phương pháp đáp ứng bề mặt, *Tubinaria decurrens*.

Chỉ số phân loại: 1.4

Đặt vấn đề

Fucoidan là một sulfate polysaccharide có cấu trúc phức tạp, thường được tìm thấy trong rong nâu và được biết đến là một hợp chất có nguồn gốc tự nhiên với nhiều hoạt tính sinh học quý như: chống đông tụ máu, chống u, chống oxy hoá, kháng khuẩn, kháng nấm... [1]. Thành phần của fucoidan bao gồm nhiều loại đường, chủ yếu là fucose và một số đường khác như galactose, glucose..., ngoài ra còn có acid uronic [2]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, thành phần hoá học và cấu trúc của fucoidan phụ thuộc vào loài rong, thời điểm thu hái, vị trí địa lý và đặc biệt là điều kiện chiết tách [3, 4].

Để chiết tách polysaccharide, phương pháp hóa học (Conventional chemical extraction - CCE) thường được sử dụng vì dễ thực hiện nhưng lại tốn nhiều thời gian, năng lượng và hiệu suất không cao [5]. Hiện nay, các nhà khoa học tập trung đến các phương pháp chiết với kỹ thuật cao như chiết có sự hỗ trợ của vi sóng (Microwave assisted extraction - MAE), siêu âm (Ultrasound assisted extraction - UAE) hay enzym (Enzymes assisted extraction - EAE). Trong đó, phương pháp sinh học EAE hứa hẹn cho hiệu suất cao hơn với tính toàn vẹn của cấu trúc, tuy nhiên vấn đề lựa chọn enzym thích hợp cũng như việc giải phóng các chất không mong muốn vẫn đang được nghiên cứu [6]. Gần đây, UAE được đánh giá là phương pháp thay thế tốt hơn để chiết tách polysaccharide từ thực vật, việc sử dụng phương pháp chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm mang lại hiệu quả cao cũng như rút ngắn thời gian chiết và năng lượng tiêu thụ [7-9].

*Tác giả liên hệ: Email: thuyttt@ich.vast.vn

Hiện nay, xu hướng áp dụng các kỹ thuật chiết tiên tiến và tối ưu hóa các điều kiện chiết được đặc biệt quan tâm nhằm đạt được cả mục tiêu cho hiệu suất cao và các chỉ tiêu khác như độ tinh khiết, khối lượng phân tử và hoạt tính sinh học của polysaccharide. Công cụ thống kê phổ biến nhất được sử dụng cho mục đích trên là RSM [10]. Phương pháp nghiên cứu này đã được áp dụng thành công để chiết polysaccharide từ cả thực vật trên cạn [11] và rong biển [12].

Ở Việt Nam, fucoidan từ rong biển đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và đưa được fucoidan ứng dụng vào cuộc sống như một loại thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Tuy nhiên, đa số các nghiên cứu đều sử dụng phương pháp chiết truyền thống CCE [13-15].

Trong bài báo này, chúng tôi đưa ra các kết quả nghiên cứu chiết tách fucoidan từ rong nâu *Tubinaria decurrens* bằng phương pháp UAE, các thông số nhiệt độ, thời gian và công suất siêu âm được tối ưu bằng phương pháp RSM với mô hình Box-Behnken để thu được fucoidan với hiệu suất cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Rong nâu *Tubinaria decurrens* thu hái ở Mũi Giác (tỉnh Kiên Giang) tháng 4/2020 và được định danh bởi TS Võ Thành Trung (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang). Mẫu rong biển được rửa sạch bằng nước, phơi khô, nghiền nhỏ và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions of fucoidan from brown seaweed *Tubinaria decurrens*

Ngoc Anh Nguyen¹, Van Quang Ngo¹,
Thi Minh Thu Quach¹, Duc Cuong Ho²,
Quang Tam Nguyen¹, Thi Thu Thuy Thanh^{1*}

¹Institute of Chemistry, VAST

²Hanoi University of Science and Technology

Received 11 February 2022; accepted 10 March 2022

Abstract:

Fucoidan is a sulfated polysaccharide derived from brown seaweed, and it has been applied in pharmaceutical fields. Recently, the trend of applying advanced extraction techniques and optimizing extraction conditions has been particularly interested in order to achieve high extraction yield. In this study, response surface methodology (RSM) were employed to optimise the ultrasound-assisted extraction of fucoidan from brown seaweed *Tubinaria decurrens*. The impacts of three independent variables, including extraction temperatures (X_1 : 50-80°C), extraction time (X_2 : 30-60 min), and ultrasound power (X_3 : 40-100%) was investigated through Box-Behnken experimental design. The results showed that the optimised condition was at extraction temperatures of 70°C, extraction time of 53 min, and ultrasound power of 90%. Under this optimised condition, the extraction yield was 4.28% and close to the predicted yield of 4.34%.

Keywords: fucoidan, response surface methodology, *Tubinaria decurrens*, ultrasound-assisted extraction.

Classification number: 1.4

Phương pháp nghiên cứu

Chiết tách fucoidan từ rong nâu: Chiết tách fucoidan từ rong được thực hiện theo phương pháp của Chen Yang và Donghwa Chung (2008) [16] với một số thay đổi nhỏ. Cân 5 g bột rong được xử lý với hỗn hợp methanol (MeOH), chloroform (CHCl₃) và nước theo tỷ lệ 4:2:1 v/v để loại bỏ chất màu và các chất có trọng lượng phân tử thấp. Sau đó, lọc, rửa với cồn, để khô ở nhiệt độ phòng. Nguyên liệu rong được sử dụng để chiết fucoidan với sự thay đổi của 3 điều kiện chiết: nhiệt độ 50-80°C, thời gian 30-60 phút và công suất của máy siêu âm 40-100%. Sau khi chiết, lọc ly tâm lấy dịch trong, thêm dung dịch CaCl₂ 2%. Dung dịch để qua đêm ở nhiệt độ 4°C, ly tâm bằng máy Hellich-EBA 21

với tốc độ 5000 vòng/phút, lấy dịch trong, cô quay loại bớt nước trên hệ thiết bị Buchi Rotavapor R-200 rồi kết tủa bằng ethanol 96% (dịch chiết với ethanol theo tỷ lệ 1:3 v/v). Ly tâm lấy tủa, rửa tủa bằng cồn và sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi thu được fucoidan. Các mẫu fucoidan được cân và tính hiệu suất chiết tách theo khối lượng rong khô.

Tối ưu hóa điều kiện chiết tách fucoidan từ rong nâu: Thí nghiệm tối ưu hoá điều kiện chiết fucoidan từ rong nâu *Tubinaria decurrens* bằng phương pháp UAE được thiết kế theo mô hình Box-Behnken với 15 thí nghiệm. Các yếu tố tác động được khảo sát bao gồm: nhiệt độ (X_1 : 50-80°C), thời gian (X_2 : 30-60, phút) và công suất của máy siêu âm (X_3 : 40-100%), với hàm mục tiêu là hiệu suất chiết Y. Mức các biến độc lập được mã hoá theo bảng 1.

Bảng 1. Nhân tố và các mức độ bố trí theo mô hình Box-Behnken.

Nhân tố (biến)	Ký hiệu	Mức độ mã hóa		
		-1	0	+1
Nhiệt độ (°C)	X_1	50	65	80
Thời gian (phút)	X_2	30	45	60
Công suất (%)	X_3	40	70	100

Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu thu thập được tính toán, phân tích ANOVA bằng phần mềm Design Expert (version 11.0). Các giá trị bất thường được loại bỏ bằng phép toán Dulcan ($p < 0,05$). Mô hình thực nghiệm cho thấy mối tương quan giữa biến phụ thuộc với các biến độc lập được mô tả thông qua mô hình đa thức bậc 2 như sau:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

trong đó: Y là biến phụ thuộc (hiệu suất chiết fucoidan, %); β_0 là hằng số không đổi của mô hình; β_i ($i=1, 2, 3$) là hệ số tuyến tính bậc 1; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ là hệ số phương trình bậc 2; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ là hệ số tương tác của 2 biến độc lập.

Phổ NMR: Đo trên máy Bruker AVANCE Neo 600Mhz ở nhiệt độ 70°C, sử dụng nước deuteri hóa (D₂O) + 1% acid acetic deuteri hóa (CD₃COOD) làm dung môi và 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) làm chất chuẩn nội với kỹ thuật đo khử tín hiệu nước.

Kết quả và bàn luận

Hiệu suất chiết fucoidan trong miền thí nghiệm khảo sát dao động 2,36-4,23% (bảng 2). Tại điểm trung tâm của vùng khảo sát (thí nghiệm 8), hiệu suất chiết có giá trị là 4,23%, đây cũng là giá trị cao nhất khi so sánh với các điều kiện chiết khác.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm và kết quả thiết kế tối ưu theo mô hình Box-Behnken.

STT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Công suất (%)	Hiệu suất (%)
1	65	30	40	2,36
2	50	60	70	3,96
3	80	30	70	3,76
4	65	45	70	3,85
5	50	45	100	3,12
6	65	60	40	3,01
7	65	30	100	3,84
8	65	60	100	4,23
9	50	30	70	3,71
10	80	45	40	2,72
11	80	60	70	4,13
12	65	45	70	3,99
13	80	45	100	4,13
14	65	45	70	3,94
15	50	45	40	2,70

Phân tích dữ liệu hồi quy đa nhân tố, biến đáp ứng và kiểm nghiệm có liên quan với nhau bởi phương trình đa thức bậc 2. Dựa vào thực nghiệm và mô hình đáp ứng bề mặt xác định được phương trình phi tuyến đối với hàm mục tiêu Y như sau:

$$Y = 3,93 + 0,1562X_1 + 0,22X_2 + 0,5788X_3 + 0,03X_1X_2 + 0,2475X_1X_3 - 0,04X_2X_3 - 0,1271X_1^2 + 0,0904X_1X_3 - 0,6321X_2^2X_3$$

Phân tích phương sai ANOVA được thực hiện để đánh giá sự phù hợp của mô hình, kết quả đưa ra ở bảng 3, giá trị F=15,46 và p=0,0614 (p>0,05) cho thấy, bề mặt xác suất mô hình đáp ứng nhu cầu với ma trận tương quan của các phương trình bậc 2 với đỉnh cực đại không phù hợp là không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. Tổng hợp hệ số và xác suất của các hệ số trong phương trình đáp ứng.

Nhân tố	SS	DF	MS	F	p	Ý nghĩa thống kê
Mô hình	5,09	9	0,5659	11,62	0,0074	Có ý nghĩa
Nhiệt độ - A	0,1953	1	0,19531	4,02	0,1010	
Thời gian - B	0,3872	1	0,38720	7,96	0,0370	
Công suất - C	2,68	1	2,67961	55,09	0,0010	
A ²	0,0596	1	0,0596	1,22	0,3189	
B ²	0,0302	1	0,0302	0,6198	0,4668	
C ²	1,48	1	1,48	30,29	0,0027	
AB	0,0036	1	0,0036	0,0739	0,7966	
AC	0,2450	1	0,24502	5,04	0,0749	
BC	0,0064	1	0,00640	0,13	0,7318	
Residual	0,24323	5	0,04865			
Lack of fit	0,23343	3	0,0778	15,46	0,0600	Không có ý nghĩa
Pure error	0,00980	2	0,0050			
Tổng cộng	5,34	14				
R ²	0,9544					
Adj.R ²	0,8722					
Pred.R ²	0,2959					
Adeq. precision	9,9830					
CV%	6,18					

Trong đó: SS: tổng bình phương (sum of squares); DF: bậc tự do (degree of freedom); MS: bình phương trung bình (mean square).

Kiểm định xác suất ý nghĩa và mối tương quan giữa các yếu tố tác động đầu vào của quá trình chiết và hàm mục tiêu cho thấy, mô hình là có ý nghĩa thống kê (p=0,0074<0,05) (bảng 3), điều này đồng nghĩa với mô hình đáp ứng hình cầu là phù hợp. Hệ số tự do và hệ số của các yếu tố tác động X₁, X₂, X₃ lên hiệu suất chiết Y₁ được thể hiện ở bảng 3. Phân tích đơn lẻ các yếu tố tác động X₁, X₂ và X₃ cho thấy, nếu không có sự tác động của nhiệt độ, thời gian và công suất siêu âm thì sẽ không có sự công phá thành tế bào có ý nghĩa đủ để tạo ra sự khác biệt về hiệu suất chiết. Dưới tác động của nhiệt độ chiết, hiệu suất chiết thu được luôn mang lại giá trị khác biệt về toán học (p<0,05).

Sự phù hợp của mô hình còn được kiểm tra qua hệ số xác định tương quan R². Mô hình tương quan tốt khi hệ số xác định tương quan R²>0,8 [17]. Mô hình tương quan xây dựng từ thí nghiệm đã thỏa mãn điều kiện với R²=0,9544 cho thấy sự thay đổi hiệu suất chiết có thể được dự đoán bằng mô hình. Hơn nữa, giá trị của hệ số biến thiên CV% là 6,18% cho thấy độ chính xác và tin cậy cao của các giá trị thực nghiệm.

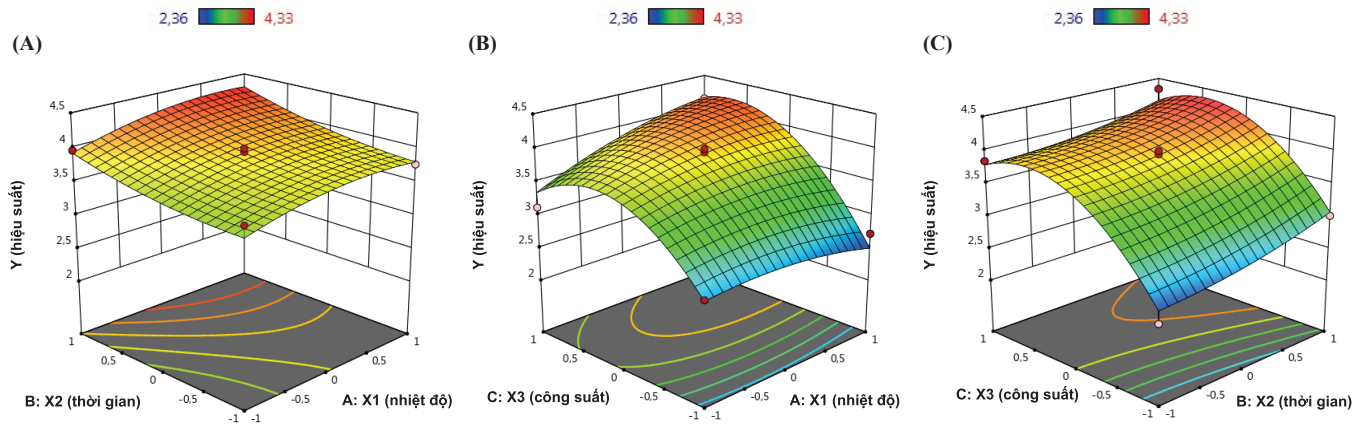
Đồ thị bề mặt đáp ứng 2D và 3D cho thấy sự tương tác lẫn nhau của 3 yếu tố nhiệt độ, thời gian và công suất siêu âm. Trong nghiên cứu này, hiệu suất chiết thu được khi kết hợp sự thay đổi của hai biến, trong khi biến còn lại được cố định ở mức độ bố trí 0 (bảng 1).

Mô hình bề mặt đáp ứng hình 1A và 2A cho thấy, hiệu suất chiết là một hàm chịu sự ảnh hưởng của 2 yếu tố thời gian và nhiệt độ tại công suất siêu âm là 70%. Kết quả cho thấy, hiệu suất chiết tăng nhanh chóng tỷ lệ với sự tăng của cả 2 yếu tố và đạt giá trị cực đại tại điều kiện chiết 80°C và 60 phút.

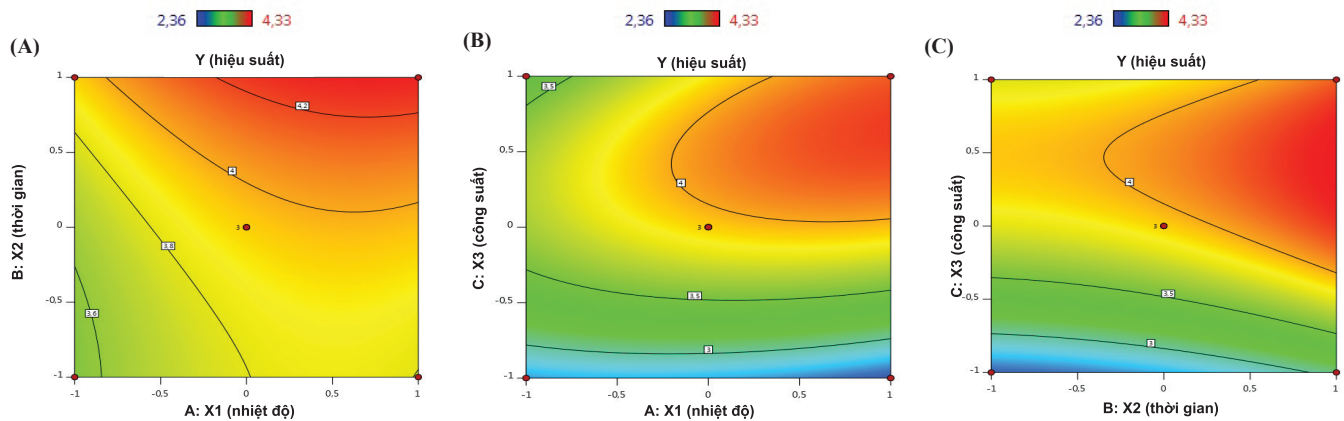
Ảnh hưởng của nhiệt độ và công suất siêu âm đến hiệu suất chiết với thời gian chiết giữ không đổi tại 45 phút (hình 1B và 2B) cho thấy, khi tăng công suất siêu âm từ 40 lên 75% thì hiệu suất tăng, tuy nhiên khi tiếp tục tăng công suất đến 100% thì hiệu suất có khuynh hướng giảm dần. Sự thay đổi công suất siêu âm ảnh hưởng đến khả năng phá vỡ cấu trúc thành tế bào của rong nâu giúp fucoïdan dễ dàng di chuyển ra môi trường, nhưng các tác động cơ học này cũng ảnh hưởng đến sự phân cắt mạch của fucoïdan dẫn đến làm giảm hiệu suất chiết.

Hình 1C và 2C mô tả bề mặt đáp ứng đối với tác động của thời gian và công suất siêu âm, kết quả cũng chỉ ra khi kéo dài thời gian sẽ làm tăng khả năng tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu, fucoïdan dễ dàng di chuyển ra môi trường hơn. Tuy nhiên, nếu thời gian quá dài cũng sẽ làm giảm hiệu suất của quá trình chiết.

Như vậy, nhiệt độ là yếu tố có tác động mạnh đến hiệu suất chiết của quá trình, bên cạnh đó 2 yếu tố thời gian và công suất siêu âm cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất của quá trình.



Hình 1. Mô hình bề mặt đáp ứng 3D của quá trình chiết bằng phương pháp UAE.

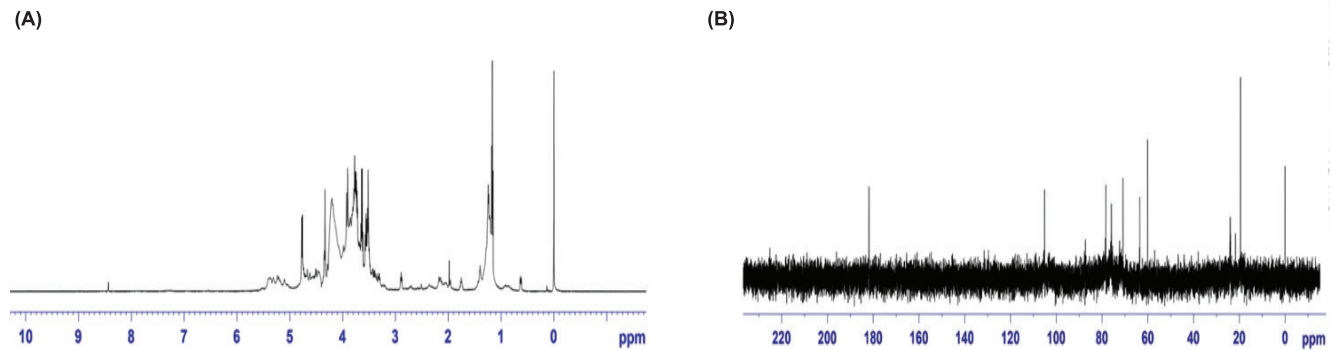


Hình 2. Mô hình bề mặt đáp ứng 2D của quá trình chiết bằng phương pháp UAE.

Các giá trị tối ưu của các biến độc lập trong quá trình được xác định như sau: Điểm cực đại của hàm mục tiêu Y (hiệu suất chiết) đạt được khi nhiệt độ, thời gian và công suất siêu âm tương ứng là 70,08°C, 53,28 phút và 91,6%. Khi đó hiệu suất cực đại tính toán là 4,34% với sai số chuẩn là 0,22. Để kiểm định kết quả, tiến hành thí nghiệm chiết tách fucoidan tại điều kiện tối ưu làm tròn: 70°C, 53 phút và 90%, hiệu suất chiết đạt được là 4,28%, giá trị này gần với hiệu suất cực đại tính toán (4,34%) và cao hơn tất cả các

giá trị hiệu suất thực nghiệm khi chưa tối ưu (bảng 2). Điều này khẳng định mô hình phù hợp với dữ liệu thực nghiệm và điều kiện chiết đã được tối ưu hoá.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ - và $^{13}\text{C-NMR}$ của mẫu fucoidan chiết tách theo điều kiện tối ưu (hình 3A và 3B), điển hình cho cấu trúc fucoidan. Ở phổ $^1\text{H-NMR}$, các peak ở trong khoảng 4,8-5,5 ppm là proton anomer; các peak ở khoảng 3,2-4,5 ppm là proton vòng pyranose; peak ở vùng trường cao 1,3 ppm được gán cho proton nhóm $-\text{CH}_3$ của fucose.



Hình 3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (A) và $^{13}\text{C-NMR}$ (B) của fucoidan chiết tách tại điều kiện tối ưu.

Trên phổ ^{13}C -NMR, các peak ở vùng 100-105 ppm thuộc về carbon anomer, carbon vòng sẽ ở vùng tín hiệu 60,08-87,27 ppm. Tín hiệu ở khoảng 20 ppm đặc trưng cho carbon của methyl C-CH_3 của fucose và tín hiệu 181,75 ppm chứng tỏ sự có mặt của acid uronic trong phân tử fucoidan.

Trong một nghiên cứu trước, Bùi Văn Nguyên và cs (2014) [14] đã chiết tách fucoidan từ cùng loài rong *Tubinaria decurrens* bằng phương pháp CCE, hiệu suất chiết tách đạt 2,9%. Điều này cho thấy, trên khía cạnh hiệu suất thì sử dụng phương pháp UAE cho kết quả cao hơn hẳn so với CCE, hơn nữa tốn ít thời gian và nhiệt lượng, Do vậy, đây là phương pháp tiềm năng để sử dụng sản xuất fucoidan cho mục đích thương mại.

Kết luận

Trong bài báo này, điều kiện tối ưu để chiết fucoidan từ rong nâu *Tubinaria decurrens* bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm đã được nghiên cứu để thu được fucoidan với hiệu suất cao ở nhiệt độ 70°C , thời gian 53 phút với công suất chiết của máy siêu âm là 90%. Tại điều kiện thực nghiệm này, hiệu suất chiết fucoidan đạt cực đại là 4,28% tính theo trọng lượng rong khô. Phân tích phương sai cho thấy rằng, mô hình hồi quy là hoàn toàn chính xác và phù hợp để tối ưu hóa điều kiện chiết tách fucoidan từ rong nâu bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Bộ Khoa học và Công nghệ (đề tài mã số NĐT.89.JPN/20). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.D. Anastuyk, et al. (2012), "Anticancer activity *in vitro* of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry", *Carbohydrate Polymers*, **87**(1), pp.186-194.

[2] Usoltseva Shevchenko, et al. (2019), "Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity *in vitro*", *Carbohydrate Polymers*, **221**(1), pp.157-165.

[3] Q.L. Sun, et al. (2020), "Structural characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae *Sargassum henslowianum*", *Carbohydrate Polymers*, **229**, DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115487.

[4] A.J. Lorbeer, et al. (2017), "Sequential extraction and characterization of fucoidans and alginates from *Ecklonia radiata*, *Macrocystis pyrifera*, *Durvillaea potatorum*, and *Seirococcus axillaris*", *Journal of Applied Phycology*, **29**, pp.1515-1526.

[5] Ligen Chen, et al. (2018), "Physicochemical characterization, antioxidant and immunostimulatory activities of sulfated polysaccharides extracted from *Ascophyllum nodosum*", *Molecules*, **23**(8), DOI: 10.3390/molecules23081912.

[6] Y.R. Song, et al. (2020), "Effect of enzyme-assisted extraction on the physicochemical properties and bioactive potential of lotus leaf polysaccharides", *International Journal of Biological Macromolecules*, **153**, pp.169-179.

[7] K. Kumar, et al. (2021), "Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review", *Ultrason Sonochem*, **70**, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325.

[8] Q. Li, et al. (2013), "Extraction optimization of *Bruguiera gymnorrhiza* polysaccharides with radical scavenging activities", *Carbohydrate Polymers*, **96**(1), pp.148-155.

[9] S. Surin, et al. (2020), "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from purple glutinous rice bran (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant activities", *Sci. Rep.*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-67266-1.

[10] Y. Zou, et al. (2011), "Response surface methodology for optimization of the ultrasonic extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* LT. Shen", *Carbohydrate Polymers*, **84**(1), pp.503-508.

[11] Libo Wang, et al. (2018), "Optimization of ultrasound-assisted extraction and structural characterization of the polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds", *Molecules*, **23**(5), DOI: 10.3390/molecules23051207.

[12] F. Rahimi, et al. (2016), "Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: Optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity", *Journal of Applied Phycology*, **28**(5), pp.2979-2990.

[13] Nguyễn Duy Nhứt và cs (2007), "Phân lập và đặc điểm của fucoidan từ 5 loài rong mơ miền Trung", *Tạp chí Hóa học*, **45**(3), tr.339-345.

[14] Bùi Văn Nguyên và cs (2014), "Xác định cấu trúc của fucoidan tách chiết từ rong nâu *Tubinaria decurrens* bằng các phương pháp phổ IR, NMR và ESIMS", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **52**(5A), tr.637-642.

[15] T.T.T. Thuy, et al. (2015), "Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species", *Carbohydrate Polymers*, **115**, pp.122-128.

[16] Chen Yang, Donghwa Chung (2008), "Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*", *Biological Macromolecules*, **43**(5), pp.433-437.

[17] X. Guan, H. Yao (2008), "Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology", *Food Chemistry*, **106**(1), pp.345-351.