

PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA SULFATE POLYSACCHARIDE CHIẾT XUẤT TỪ RONG NÂU VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC VÀ HỖ TRỢ ENZYME

Đến toà soạn 15-05-2024

Nguyễn Thị Thuận, Trần Nguyễn Hà Vy, Cao Thị Thúy Hằng, Trần Thị Thanh Vân, Võ Mai Như Hiếu, Nguyễn Ngọc Linh, Nguyễn Đình Thuất, Phạm Đức Thịnh

Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

*Email: nguyenthuan@nitra.vast.vn; ducthinh@nitra.vast.vn

SUMMARY

CHEMICAL COMPOSITION ANALYSIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SULFATED POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM BROWN ALGAE BY CHEMICAL AND ENZYME - ASSISTED METHODS

*Sulfate polysaccharides from four Vietnamese brown algae *Sargassum oligocystum*, *S. polycystum*, *S. seratum* and *Turbinaria ornata* were extracted by both chemical and enzyme –assisted methods. The monosaccharide composition, sulfate content and molecular weight of all chemical and enzymatic extracts were analyzed. The effect of extraction method on chemical features of sulfated polysaccharides was investigated. The enzymatic extract showed higher antioxidant activity compared to chemical extract.*

Keywords: antioxidant activity, brown algae, enzyme-assisted method, sulfated polysaccharides

1. GIỚI THIỆU

Các polysaccharide tự nhiên từ rong biển nói chung và sulfate polysaccharide từ rong nâu nói riêng thu hút các nhà nghiên cứu bởi các hoạt tính sinh học đa dạng của chúng, như kháng virus, kháng ung thư, chống oxy hóa, prebiotic...[1]. Sulfate polysaccharide (fucoidan) từ rong nâu có thành phần và cấu trúc phức tạp phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loài rong, điều kiện sinh trưởng, mùa thu hoạch. Sulfate polysaccharide rong nâu có mạch chính được cấu tạo từ các gốc fucose, liên kết với nhau bởi liên kết glycosidic (1→3) hoặc xen kẽ (1→3) và (1→4).

Ngoài ra, trong thành phần của sulfate polysaccharide rong nâu còn có sự hiện diện của các thành phần đường khác như galactose, glucose, mannose, xylose, rhamnose và acid uronic [2]. Dựa vào thành phần đường đơn, sulfate polysaccharide rong nâu có thể được chia thành ba nhóm chính: sulfate fucan (chủ yếu là fucose và sulfate), galactofucan (chủ yếu là fucose, galactose và sulfate) và polysaccharide có cấu trúc phức tạp (có thể bao gồm các thành phần khác, như uronic acid) [3]. Sulfate polysaccharide từ rong nâu được chiết xuất bằng nhiều phương pháp khác nhau từ truyền thống đến các phương pháp xanh hiện đại [4].

Mỗi phương pháp chiết đều có ưu nhược điểm riêng nên tùy thuộc vào mục đích sử dụng mà phương pháp chiết phù hợp được lựa chọn. Tuy nhiên, các công trình công bố đã cho thấy điều kiện chiết xuất ảnh hưởng đến đặc điểm cấu trúc của polysaccharide cũng như hoạt tính sinh học của chúng [5].

Cấu trúc và hoạt tính sinh học của sulfate polysaccharide từ một số rong nâu Việt Nam cũng đã được công bố [6,7]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ tập trung sử dụng phương pháp hóa học để chiết xuất polysaccharide, trong khi đó phương pháp chiết hỗ trợ enzyme mới chỉ bắt đầu được chú ý. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chiết xuất sulfate polysaccharide từ 04 loài rong nâu thuộc chi *Sargassum* và *Turbinaria* bao gồm *Sargassum oligocystum*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum seratum* và *Turbinaria ornata* bằng phương pháp hóa học truyền thống và phương pháp hỗ trợ enzyme. Một số đặc điểm cấu trúc của các sulfate polysaccharide thu nhận được được phân tích bao gồm thành phần đường đơn, hàm lượng sulfate, khối lượng phân tử. Hoạt tính chống oxy hóa khử của sản phẩm chiết cũng được thử nghiệm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU, THỰC NGHIỆM

2.1 Vật liệu

Các loài rong nâu *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *S. seratum* và *T. ornata* được thu tại vùng biển Khánh Hòa. Các mẫu rong tươi được rửa sạch, phơi khô và cắt nhỏ. Rong được giữ trong tủ lạnh ở 4°C.

2.2 Phương pháp chiết xuất sulfate polysaccharide từ rong nâu

Sulfate polysaccharide từ các loài rong nâu *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *S. seratum* và *T. ornata* được chiết xuất bằng phương pháp hóa học và hỗ trợ

enzyme [8] với một số điều chỉnh như được mô tả theo sơ đồ ở Hình 1.

Chiết xuất bằng phương pháp hóa học: Rong nâu được xử lý trong dung dịch acid loãng HCl 0,1M ở 70 °C trong bể điều nhiệt trong 3 giờ. Sau đó hỗn hợp chiết được ly tâm để loại bỏ bã rong và thu dịch chiết, thêm CaCl₂ vào dịch chiết đến nồng độ 2%, để hỗn hợp qua đêm. Ly tâm để loại bỏ tủa alginate, thu dịch chứa sulfate polysaccharide. Thêm ethanol 96% vào dịch chiết theo tỉ lệ ethanol: dịch chiết là 3:1. Ly tâm thu tủa sulfate polysaccharide và đông khô lạnh để thu sản phẩm ở dạng bột khô.

Chiết xuất bằng phương pháp enzyme: Rong nâu được xử lý bằng hỗn hợp enzyme bao gồm cellulase Cellic®CTec2 5% (v/w) (Novozyme, Đan Mạch) và alginate lyase 0,35% (enzyme tái tổ hợp được tinh sạch theo [9]) trong đệm universal 4 (UB4) ở pH 6,5, 40 °C trong 24 giờ. Sau đó tiến hành đun nóng hỗn hợp chiết ở 90°C trong 10 phút để kết tủa protein, ly tâm thu dịch chiết chứa polysaccharide. Các bước tiếp theo được tiến hành tương tự như trong phương pháp hóa học.

2.3 Phương pháp phân tích đặc điểm hóa học của sulfate polysaccharide

2.3.1 Thủy phân mẫu và phân tích thành phần đường đơn

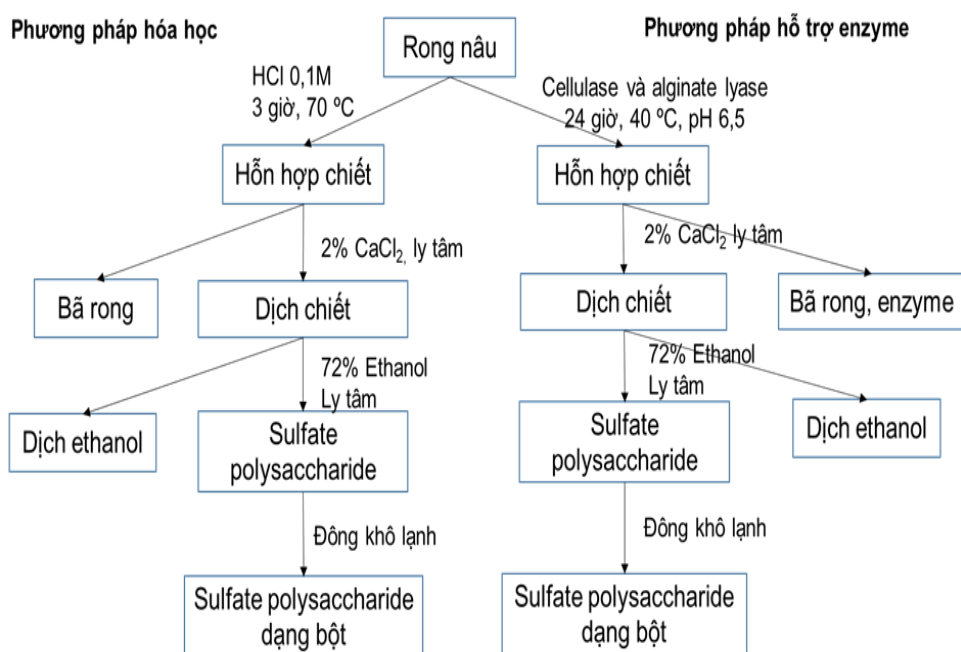
Các mẫu rong biển và sulfate polysaccharide được thủy phân bằng acid sulfuric H₂SO₄ theo hai bước theo phương pháp được mô tả bởi Manns và cộng sự [10]. Thành phần đường đơn được phân tích bằng hệ thống Dionex ICS-3000 HPAEC-PAD. Dung môi rửa giải bao gồm A - nước khử ion, B - 200 mM NaOH và C - 200 mM NaOH, 1 M NaOAc. Tốc độ rửa giải là 0.4 mL/phút với các điều kiện tương ứng: 10 mM NaOH trong 17 phút đầu để phân tách đường trung tính, 18 mM NaOH, 60 mM

NaOAc trong 20 phút để phân tách uronic acid. Cột được rửa bằng dung môi 200 mM NaOH trong 6 phút và cân bằng lại bằng 10 mM NaOH. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Chromeleon™ 7.2 (Thermo Scientific).

2.3.2 Phân tích hàm lượng sulfate

Các mẫu sulfate polysaccharide được thủy phân bằng TFA 2 M (5mg/mL) ở 100 °C

trong 6 giờ. Dịch thủy phân được dùng để phân tích hàm lượng sulfate theo phương pháp đo độ đục [11]. Hỗn hợp phản ứng gồm 110 µL dịch thủy phân và 120 µL TCA 8%. Thêm 60 µL BaCl₂ 2% trong 15% PEG6000 và để 35 phút. Sau đó tiến hành đo OD 500 nm. BaSO₄ được dùng để dựng đường chuẩn.



Hình 1. Sơ đồ chiết sulfate polysaccharide từ rong nâu Việt Nam bằng phương pháp hóa học và enzyme

2.3.3 Phân tích khối lượng phân tử

Khối lượng phân tử của các sulfate polysaccharide thu nhận được được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký thẩm thấu gel trên hệ thống Shimadzu LC-20AD, đầu dò RID, cột GPC/SEC Suprema Ultrahigh 10 µm (8 x 300 mm). Mẫu được hòa tan trong nước khử ion và lọc qua màng 0,45 µm. Dung dịch Lithium nitrate (LiNO₃) nồng độ 0,1M được sử dụng làm pha động. Các thông số phân tích gồm tốc độ dòng 1 mL/phút, thời gian phân tích 50 phút, nhiệt độ 40 °C. Các dextran có khối lượng phân tử 1, 5, 12, 50, 150, 270 và 670 kDa được sử dụng làm chuẩn [12].

2.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa được thực hiện thông qua hai phép thử đó là khả năng quét gốc tự do DPPH [13]. Sulfate polysaccharide được hòa tan trong nước với nồng độ 2 mg/mL. Lấy 1,0 mL mẫu thêm 2,0 mL DPPH 0,16 mM/Methanol. Hỗn hợp để trong tối nhiệt độ phòng, 30 phút, đo OD ở 517nm. Khả năng quét gốc DPPH (Sc%) tính theo công thức:

$$Sc\% = \left[\frac{1 - (A_{mẫu} - A_{mẫu trắng})}{A_{chuẩn}} \right] \times 100$$

Trong đó A_{chuẩn}: Độ hấp thụ của DPPH không mẫu, A_{mẫu}: Độ hấp thụ của mẫu,

$A_{\text{màu trắng}}$: Độ hấp thụ của mẫu không có DPPH.

Hoạt tính khử sắt được xác định bằng phương pháp được mô tả bởi Yu và cộng sự [14]. Hỗn hợp gồm 1 mL mẫu, 1 mL dung dịch đệm phosphate (pH 7,2) và 1 mL Kali ferricyanide 1%. Hỗn hợp được ủ ở 50 °C trong 20 phút. Lần lượt cho thêm vào hỗn hợp 1mL trichloroacetic acid 10%, 0,6 mL nước và 0,16 mL FeCl_3 1%. Đo mật độ quang của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 655 nm. Dùng $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ để dựng đường chuẩn.

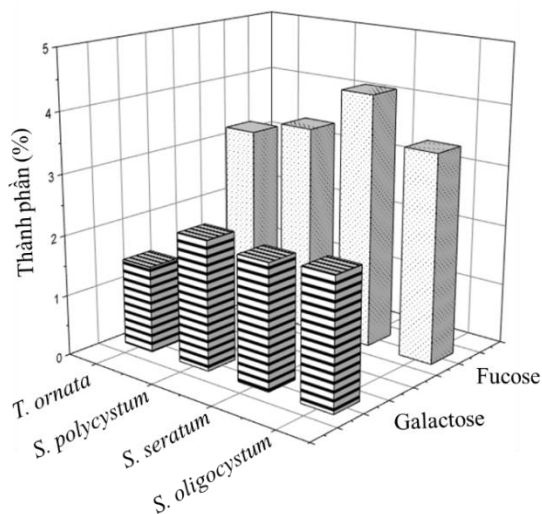
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần đường đơn của một số loài rong nâu

Để đánh giá nguồn nguyên liệu dùng chiết xuất sulfate polysaccharide, thành phần đường của một số loài rong nâu Việt Nam đã được phân tích. Kết quả cho thấy các loài rong nâu Việt Nam *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *S. seratum* và *T. ornata* chứa đa dạng các đường đơn đặc trưng như fucose (fuc), galactose (gal), glucose (glu), xylose (xyl), mannose và uronic acid với hàm lượng khác nhau. Hàm lượng fucose và galactose của các loài rong nghiên cứu được thể hiện ở Hình 2.

Fucose dao động từ 3,21 đến 4,9% khối lượng rong khô trong các loài rong nâu được phân tích, trong khi đó hàm lượng galactose thấp hơn (1,44 đến 2,15%). Đây là hai monomer đặc trưng cho sulfate polysaccharide có trong rong nâu Việt Nam [15]. Kết quả này cho thấy hàm lượng fucose trong rong nâu Việt Nam thấp hơn so với rong *Fucus evanescens* và *Saccharina latissima* ở vùng ôn đới đã được công bố [8]. Tuy nhiên hàm lượng galactose trong các loại rong được phân tích lại cao hơn nhiều. Hơn nữa sulfate polysaccharide (fucoidan) từ hai loại rong

trên được công bố thuộc nhóm sulfate fucan có thành phần chính là fucose. Điều này cho thấy sự khác biệt trong thành phần sulfate polysaccharide của các loài rong nâu Việt Nam so với rong *F. evanescens* và *S. latissima*.



Hình 2. Thành phần fucose và galactose trong một số loài rong nâu

3.2 Thành phần hóa học của sulfate polysaccharide

Hiệu suất chiết sulfate polysaccharide thô bằng phương pháp enzyme đều cao hơn so với phương pháp hóa học đối với tất cả các loài rong nghiên cứu (Bảng 1). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu thành phần đường đơn cho thấy hàm lượng các đường chính là fucose và galactose trong sulfate polysaccharide thô thu nhận từ phương pháp enzyme thấp hơn so từ phương pháp hóa học. Và hàm lượng hàm lượng guluronic acid (GuluA) và mannuronic acid (ManA) trong sulfate polysaccharide thô thu nhận từ phương pháp enzyme khá cao. Điều này có thể được giải thích là trong phương pháp hỗ trợ enzyme, alginate bị thủy phân bởi alginate lyase thành các sản phẩm khối lượng phân tử thấp và chưa bị loại bỏ hết trong quá trình chiết.

Bảng 1. Thành phần hóa học của sulfate polysaccharide chiết từ các loài rong nâu bằng phương pháp chiết hóa học và enzyme

Thành phần đường	<i>T. ornata</i>		<i>S. polycystum</i>		<i>S. seratum</i>		<i>S. oligocystum</i>	
	HH	E	HH	E	HH	E	HH	E
Fuc	37,67	20,08	46,50	16,28	35,08	14,33	57,62	8,44
Gal	8,37	10,57	19,65	9,73	11,95	7,23	18,64	3,62
Glu	13,60	1,81	5,41	2,85	2,90	2,34	0,39	0,42
Xyl	1,52	2,19	9,61	4,61	6,10	3,71	8,46	1,59
Mannose	0,41	1,57	0,91	1,00	0,91	0,68	0,93	0,55
Man	0,41	1,57	0,91	1,00	0,91	0,68	0,93	0,55
GuluA	16,67	22,58	1,70	18,61	8,72	18,50	1,53	24,33
ManA	19,54	35,20	11,87	43,31	29,60	49,93	11,13	60,38
Sulfate % (w/w)	17,51 ± 0,41	14,62 ± 1,40	19,83 ± 2,04	15,2 ± 2,35	17,42 ± 0,88	10,77 ± 0,68	21,27 ± 2,51	12,31 ± 1,38
SO ₄ ²⁻ : Fucose (w/w)	0,8	1,2	2,5	3,4	1,1	1,8	0,8	2,5
Hiệu suất % (w/w)	3,2 ± 0,21	8,5 ± 0,71	3,0 ± 0,02	6,75 ± 0,35	2,2 ± 0,12	6,75 ± 1,06	1,2 ± 0,32	8,85 ± 0,92

HH: Phương pháp chiết hóa học; E: Phương pháp chiết enzyme

Kết quả phân tích hàm lượng sulfate cho thấy tỉ lệ sulfate: fucose trong sản phẩm thu nhận từ phương pháp hỗ trợ enzyme lần lượt là 1,2; 3,4; 1,8; 2,5 tương ứng với các rong *T. ornata*, *S. polycystum*, *S. seratum* và *S. oligocystum* cao hơn so với trong phương pháp hóa học (tương ứng là 0,8; 2,5; 1,1 và 0,8). Như vậy có thể thấy điều kiện chiết xuất ảnh hưởng rõ rệt đến đặc điểm của sulfate polysaccharide thu nhận được. Dưới tác động của môi trường acid các gốc sulfate trong polysaccharide có thể bị loại bỏ một phần trong khi đó phương pháp chiết enzyme với điều kiện chiết nhẹ nhàng hơn các gốc sulfate có thể được bảo toàn. Ảnh hưởng của phương pháp chiết đến đặc điểm cấu trúc của sulfate polysaccharide cũng đã được công bố [8]. Kết quả phân tích tỉ lệ sulfate: fucose cho thấy mức độ sulfate hóa của các sulfate polysaccharide khác nhau tùy thuộc vào loài rong.

3.3 Khối lượng phân tử của các sulfate polysaccharide rong nâu

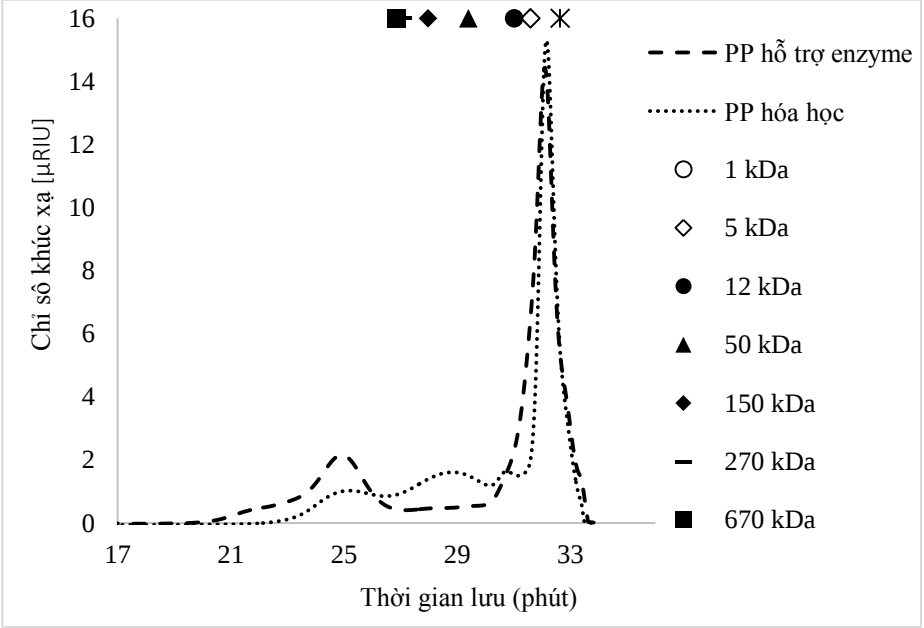
Khối lượng phân tử trung bình của các sulfate polysaccharide thu nhận được từ phương pháp hóa học và enzyme được phân tích và so sánh. Kết quả cho thấy tất cả sulfate polysaccharide thu nhận được đều có dải phân bố khối lượng phân tử rộng chứng tỏ chúng là hỗn hợp các polysaccharide khác nhau. Sắc kí đồ của các sulfate polysaccharide (Hình 3) cho thấy chúng bao gồm hai nhóm chính: nhóm khối lượng phân tử thấp dưới 50 kDa và nhóm khối lượng phân tử cao lớn hơn 50 kDa. Nhóm polysaccharide khối lượng phân tử thấp có thể là do sự có mặt của alginate trong sản phẩm chiết.

3.4 Hoạt tính chống oxy hóa của sulfate polysaccharide

Ngày nay, nhu cầu sử dụng các hoạt chất chống oxy hóa có nguồn gốc từ tự nhiên ứng dụng trong thực phẩm và y dược ngày càng tăng. Do đó, các nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất chống oxy hóa mới, phát triển các phương pháp chiết xuất hiệu quả đang nhận được nhiều sự

quan tâm. Một số công trình nghiên cứu sử dụng enzyme để chiết xuất các hoạt chất có hoạt tính chống oxy hóa từ rong nâu đã được công bố [16,17]. Trong nghiên cứu này, các sulfate polysaccharide được chiết bằng phương pháp hỗ trợ enzyme bên cạnh phương pháp hóa học truyền thống và được thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng quét gốc DPPH và khử sắt. Kết quả thử nghiệm được thể hiện ở Bảng 2 cho thấy khả năng quét gốc DPPH và khử sắt của các sulfate polysaccharide dao

động giữa các loài rong và giữa các phương pháp chiết. Hoạt tính sinh học của sulfate polysaccharide đã được công bố liên quan chặt chẽ đến đặc điểm cấu trúc. Do đó, kết quả thử nghiệm cho thấy được sự đa dạng của sulfate polysaccharide trong rong nâu. Sulfate polysaccharide thu nhận được bằng phương pháp hỗ trợ enzyme thể hiện hoạt tính quét gốc tự do DPPH cao hơn 1,4; 1,8; 1,9 và 2,3 lần so với phương pháp hóa học tương ứng với các loài rong *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *S. seratum* và *T. ornata*.



Hình 3. Khối lượng phân tử trung bình của sulfate polysaccharide chiết từ loài rong *S. polycystum*

Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa của các sulfate polysaccharide

Rong nâu	Phương pháp chiết	Hoạt tính quét gốc DPPH (SC%)	Hoạt tính khử sắt (mgFe ²⁺ /g chất)
<i>S. polycystum</i>	Hỗ trợ enzyme	52,08 ± 0,83	15,69 ± 0,35
	Hóa học	27,92 ± 2,20	9,12 ± 0,46
<i>T. ornata</i>	Hỗ trợ enzyme	63,06 ± 1,88	15,77 ± 0,18
	Hóa học	44,72 ± 1,46	7,39 ± 0,14
<i>S. seratum</i>	Hỗ trợ enzyme	71,25 ± 1,50	21,67 ± 0,18
	Hóa học	30,42 ± 1,91	16,44 ± 0,14
<i>S. oligocystum</i>	Hỗ trợ enzyme	61,25 ± 1,10	16,14 ± 0,21
	Hóa học	33,61 ± 1,58	12,47 ± 0,11

Kết quả thử nghiệm hoạt tính khử sắt cũng tương tự với kết quả thử nghiệm hoạt tính quét gốc tự do DPPH. Tất cả sản phẩm chiết thu nhận bằng phương pháp enzyme có khả năng khử sắt cao hơn so với phương pháp hóa học. Như vậy, kết quả nghiên cứu đã thể hiện rõ sự ảnh hưởng của phương pháp chiết lên hoạt tính chống oxy hóa của sulfate polysaccharide nói riêng và hoạt tính sinh học nói chung. Kết quả thử nghiệm này tương đồng với các kết quả phân tích được trình bày ở mục 3.2 và 3.3. Phương pháp chiết xuất bằng enzyme với điều kiện chiết nhẹ nhàng ít ảnh hưởng đến đặc điểm cấu trúc của sulfate polysaccharide, trong đó có khối lượng phân tử và hàm lượng sulfate do đó bảo toàn được hoạt tính sinh học của polysaccharide. Và các sulfate polysaccharide từ rong nâu là những hoạt chất có hoạt tính chống oxy hóa tiềm năng.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, sulfate polysaccharide từ một số loài rong nâu Việt Nam đã được chiết xuất bằng phương pháp hóa học và hỗ trợ enzyme. Sản phẩm chiết chứa sulfate polysaccharide chiết xuất bằng phương pháp enzyme có hiệu suất chiết, hàm lượng sulfate và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với phương pháp hóa học.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam mã số KHCBB1.01/21-23.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Tran H.L. Phuong.; Lee, B.J.; Tran T.D. Thao, (2021). Current Developments in the Oral Drug Delivery of Fucoidan. *International Journal of Pharmaceutics*, **598**, 12031
- [2] Ale, M.T.; Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S., (2011). Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds Inhibit Proliferation of Melanoma Cells and Induce Apoptosis by Activation of Caspase-3 in Vitro. *Marine Drugs*, **9**, 2605–2621.
- [3] Zvyagintseva, T.N.; Usoltseva, R. V.; Shevchenko, N.M.; Surits, V. V.; Imbs, T.I.; Malyarenko, O.S.; Besednova, N.N.; Ivanushko, L.A.; Ermakova, S.P., (2021). Structural Diversity of Fucoidans and Their Radioprotective Effect. *Carbohydrate Polymers*, **273**, 118551.
- [4] Hahn, T.; Lang, S.; Ulber, R.; Muffler, K., (2012). Novel Procedures for the Extraction of Fucoidan from Brown Algae. *Process Biochemistry*, **47**, 1691–1698,
- [5] Alboofetileh, M.; Rezaei, M.; Tabarsa, M., (2018). Enzyme-Assisted Extraction of *Nizamuddinia Zanardinii* for the Recovery of Sulfated Polysaccharides with Anticancer and Immune-Enhancing Activities. *Journal of Applied Phycology*, **31**, 1391–1402.
- [6] Bui Minh Ly, Ngo Quoc Buu, Nguyen Duy Nhut, Pham Duc Thinh, Tran Thị Thanh Van, (2007). Studies on Fucoidan and Its Production from Vietnamese Brown Seaweeds. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, **22**, 371–380.
- [7] Pham Duc Thinh; Menshova, R. V.; Ermakova, S.P.; Anastuyuk, S.D.; Bui Minh Ly; Zvyagintseva, T.N., (2013). Structural Characteristics and Anticancer Activity of Fucoidan from the Brown Alga *Sargassum Mcclurei*. *Marine Drugs*, **11**, 1453–1476.
- [8] Nguyen Thi Thuan; Mikkelsen, M.D.; Tran Nguyen Ha Vy; Vo Thi Dieu Trang; Rhein-Knudsen, N.; Holck, J.; Rasin, A.B.; Cao Thi Thuy Hang; Tran Thị Thanh Van; Meyer, A.S., (2020). Enzyme-Assisted Fucoidan Extraction from Brown Macroalgae *Fucus Distichus* Subsp. *Evanescens* and *Saccharina Latissima*. *Marine Drugs*, **18**(6), 296.13
- [9] Manns, D.; Nyffenegger, C.; Saake, B.; Meyer, A.S., (2016). Impact of Different Alginate Lyases on Combined Cellulase-

- Lyase Saccharification of Brown Seaweed. *RSC Advances*, **6**, 45392–45401.
- [10] Manns, D.; Deutschle, A.L.; Saake, B.; Meyer, A.S., (2014). Methodology for Quantitative Determination of the Carbohydrate Composition of Brown Seaweeds (Laminariaceae). *RSC Advances*, **4**, 25736–25746.
- [11] Jackson, S.G.; McCandless, E.L, (1978). Simple, Rapid, Turbidometric Determination of Inorganic Sulfate and/or Protein. *Analytical Biochemistry*, **90**, 802–808.
- [12] Pham Duc Thinh; Cao Thi Thuy Hang; Dinh Thanh Trung; Nguyen Thanh Danh, (2023). Pectin from Three Vietnamese Seagrasses: Isolation, Characterization and Antioxidant Activity. *Processes*, **11**, 1–12.
- [13] Blois, M.S., (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, **181**, 1199–1200
- [14] Yu, J.; Li, Q.; Wu, J.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, W.; Liu, Y.; Tang, W.; Nie, S.; Hassouna, A, (2021). Fucoidan Extracted From Sporophyll of *Undaria Pinnatifida* Grown in Weihai, China – Chemical Composition and Comparison of Antioxidant Activity of Different Molecular Weight Fractions. *Frontiers in Nutrition*, **8**, 1–11.
- [15] Thanh Thi Thu Thuy; Bui Minh Ly; Tran Thi Thanh Van; Ngo Van Quang; Ho Cam Tu; Zheng, Y.; Seguin-Devaux, C.; Mi, B.; Ai, U, (2015). Anti-HIV Activity of Fucoidans from Three Brown Seaweed Species. *Carbohydrate Polymers*, **115**, 122–128.
- [16] Nguyen Hoang Chinh; Ngo Kim Ngan; Tran Hoai Khang; ; Barrow, C.J., (2024). Enzyme-Assisted Coextraction of Phenolics and Polysaccharides from *Padina Gymnospora*. *Marine Drugs*, **22(1)**, 42.
- [17] Heo, S.J.; Park, E.J.; Lee, K.W.; Jeon, Y.J., (2005). Antioxidant Activities of Enzymatic Extracts from Brown Seaweeds. *Bioresource Technology*, **96**, 1613–1623.