



Original Article

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Ulvan from Green Seaweed *Ulva lactuca*

Ngo Van Quang¹, Nguyen Ngoc Anh¹, Quach Thi Minh Thu¹, Tran Thi Thanh Van², Dang Xuan Cuong², Nguyen Quang Tam¹, Thanh Thi Thu Thuy^{1,*}

¹*Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

²*Nha Trang Institute of Technology Research and Application Vietnam Academy of Science and Technology, 02 Hung Vuong, Nha Trang, Vietnam*

³*Hanoi University of Science and Technology, 01 Dai Co Viet, Hanoi, Vietnam*

Received 29 October 2021

Revised 08 April 2022; Accepted 14 April 2022

Abstract: In this paper, the extraction conditions of ulvan from green seaweed *Ulva lactuca* by using Ultrasound-assisted extraction method were optimised. Experience was designed using Box-behnken model with experient areas as following: extraction temperature (X_1 : 50–90 °C), extraction time (X_2 : 20–40, min) and solvent-to-material ratio (X_3 : 50/1–70/1, v/w), objective function (Y : extraction yield) was required to get maximum value. The result showed that the optimization conditions for extraction were: extraction temperature 84.28 °C, extraction time 30.59 min with 60.21/1 (v/w) as solvent-to-material ratio, and the expected objective function Y is 22.86% based on dried seaweed weight.

Keywords: *Ulva lactuca*, polysaccharide, green seaweed, extraction, ulvan.

* Corresponding author.

E-mail address: thuyttt@ich.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5371>

Tối ưu hoá điều kiện chiết Ulvan từ rong lục *Ulva lactuca* bằng phương pháp chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm

Ngô Văn Quang¹, Nguyễn Ngọc Anh¹, Quách Thị Minh Thu¹, Trần Thị Thanh Vân²,
Đặng Xuân Cường², Nguyễn Quang Tâm¹, Thành Thị Thu Thủy^{1,*}

¹Viện hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công Nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công Nghệ Việt Nam,
02 Hùng Vương, Nha Trang, Việt Nam

³Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, 01 Đại Cồ Việt, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 10 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 08 tháng 4 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 4 năm 2022

Tóm tắt: Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu điều kiện chiết tối ưu ulvan từ rong lục *Ulva lactuca* bằng phương pháp chiết với dung môi nước có hỗ trợ của sóng siêu âm để thu được ulvan với hiệu suất chiết cao. Bố trí thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken với miền thí nghiệm khảo sát là nhiệt độ (X_1 : 50–90 °C), thời gian chiết (X_2 : 20–40, phút) và tỷ lệ DM/NL (X_3 : 50/1–70/1, v/w), với mục đích là thu được hàm mục tiêu (Y_1 : hiệu suất chiết tách) cao nhất. Kết quả nghiên cứu cho thấy điều kiện tối ưu là nhiệt độ chiết 84,28 °C, thời gian chiết 30,59 phút với tỷ lệ DM/NL là 60,21/1 (v/w), với điều kiện này hàm mục tiêu Y_1 dự đoán đạt 22,86% theo trọng lượng rong khô.

Từ khóa: Ulvan, rong lục, *Ulva lactuca*, Box-Behnken.

1. Mở đầu

Trong thời gian gần đây, rong lục ngày càng được quan tâm nghiên cứu phục vụ đời sống con người trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là dược phẩm và mỹ phẩm. Rong lục chi *Ulva* được cho là rất giàu protein, polysaccharide, các vitamine và khoáng chất, trong đó, polysaccharide ngày càng được quan tâm nhiều do có những tính chất lý, hóa đáng chú ý và có nhiều tiềm năng ứng dụng trong y sinh học. Ulvan là sulfate polysaccharide được chiết tách từ rong lục chi *Ulva*, được biết đến là các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên với nhiều hoạt tính sinh học quý báu như điều hòa hệ miễn dịch, kháng viêm, chống oxy hóa, chống đông tụ và kháng vi sinh vật kiểm định [1-3].

Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của ulvan phụ thuộc rất lớn vào loài rong, thời

điểm thu hái, vị trí địa lý và đặc biệt là điều kiện chiết tách. Ulvan thường được chiết bằng dung dịch nước ở nhiệt độ 85-90 °C, hiệu suất chiết tách từ 8% đến 29% theo trọng lượng rong khô tùy thuộc loài rong, phương pháp và điều kiện chiết tách. Chiết polysaccharide bằng nước là một phương pháp truyền thống và phổ biến, tuy nhiên, nó cũng có nhiều hạn chế như thời gian chiết thường kéo dài (5 h) ở nhiệt độ khá cao 85-90 °C [4-6]. Ngoài chiết polysaccharide bằng nước nói trên còn có thể chiết bằng cách sử dụng enzyme hay có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, vi sóng. So với các phương pháp thông thường, sự kết hợp giữa siêu âm và chiết xuất dung môi truyền thống tạo điều kiện thuận lợi cho việc chiết xuất thông qua việc khuấy ở tần số thấp, do đó, nâng cao hiệu quả khai thác, rút ngắn thời gian khai thác và giảm năng lượng tiêu thụ cùng với lợi thế chính là thu được nguyên vẹn trạng thái polymer của polysaccharide [7, 8]. Gần đây, chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đã được đánh giá là

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: thuyttt@ich.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5371>

một phương pháp thay thế để phân lập polysaccharide từ thực vật [9, 10].

Hiện nay, phương pháp đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Methodology) được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện thực nghiệm, phương pháp này bao gồm một nhóm các kỹ thuật toán học và thống kê dựa trên sự phù hợp của mô hình thực nghiệm với các dữ liệu thực nghiệm thu được liên quan đến thiết kế thí nghiệm. Theo hướng mục tiêu này, các hàm đa thức bậc hai hay bậc nhất được sử dụng để mô tả hệ nghiên cứu đó và khảo sát các điều kiện thực nghiệm nhằm tìm ra điều kiện tối ưu [11, 12].

Trong bài báo này, chúng tôi khảo sát phương pháp chiết tách ulvan từ rong lục *Ulva lactuca* bằng nước với sự hỗ trợ của sóng siêu âm UAE (Ultrasound-Assisted Extraction), các thông số nhiệt độ, thời gian chiết và tỉ lệ dung môi với lượng mẫu được tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt RSM với mô hình thí nghiệm Box-Behnken nhằm thu được ulvan với hiệu suất cao nhất.

2. Thực nghiệm

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Rong lục *Ulva lactuca* được thu hái ở vịnh Nha Trang - Khánh Hoà vào tháng 3/2020 và định danh bởi TS. Võ Thành Trung (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang). Tiêu bản rong ký hiệu TD20 được lưu giữ ở Viện Hoá học, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam.

Mẫu rong biển sau khi thu thập về được rửa sạch bằng nước rồi đem phơi khô trong bóng râm, sau đó nghiền nhỏ và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2. Chiết tách ulvan từ rong biển

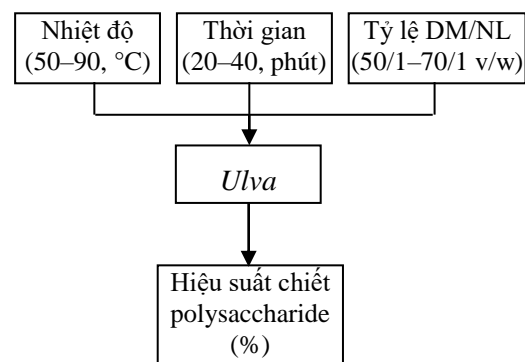
Chiết tách ulvan từ rong được thực hiện theo phương pháp của Rahimi và CS [13], với một số thay đổi nhỏ. 10 g bột rong được xử lý bằng hỗn hợp dung môi MeOH:CHCl₃:H₂O (4:2:1,...) để loại các hợp chất màu và các chất có trọng lượng phân tử thấp. Mẫu được tiến hành chiết trong hệ chiết siêu âm ở điều kiện: Tỷ lệ DM/NL: 50/1–70/1, v/w; nhiệt độ chiết: 50–90 °C; thời gian chiết: 20–40 phút với sóng

siêu âm (Pulse on 30 sec, Pulse off 5sec, Ampl 100%). Sau khi chiết, hỗn hợp được lọc hút chân không 3 lần thu dịch trong. Dịch chiết được cô quay chân không để loại bớt nước sau đó kết tủa bằng ethanol 96% với tỷ lệ V dịch: V ethanol = 1:3. Hỗn hợp được để qua đêm ở nhiệt độ 4 °C, ly tâm lấy kết tủa, rửa lại bằng ethanol, sau đó rửa bằng acetone và sấy ở nhiệt độ 50 °C đến khối lượng không đổi thu được ulvan. Kết quả hiệu suất chiết tách ulvan theo khối lượng rong khô ở các điều kiện thí nghiệm khác nhau được đưa ra trên Bảng 1.

2.3. Phương pháp tối ưu

Bố trí thí nghiệm: các yếu tố tác động được nghiên cứu bao gồm: Nhiệt độ (50–90 °C), thời gian (20–40, phút) và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (DM/NL) (50/1–70/1, v/w), với hàm mục tiêu là hiệu suất chiết (sơ đồ 1).

Phân tích dữ liệu: dữ liệu được phân tích ANOVA (phép toán Fisher), hồi quy và thống kê bằng phần mềm Design Expert 11.0. Các giá trị bất thường được loại bỏ bằng phép toán Dulcan.



Sơ đồ 1. Mô hình tác động và hàm mục tiêu trong quá trình chiết polysaccharide từ *Ulva lactuca*.

2.4. Phổ NMR

Phổ NMR đo trên máy Bruker AVANCE Neo 600MHz ở nhiệt độ 70 °C, sử dụng D₂O + 1% CD₃COOD làm dung môi và DSS làm chất chuẩn nội với kỹ thuật đo khử tín hiệu nước.

3. Kết quả và thảo luận

Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng hiệu suất chiết trong miền khảo sát: nhiệt độ (50–90 °C),

thời gian (20–40 phút) và tỷ lệ DM/NL (50/1–70/1, v/w) dao động từ 4,3% đến 21,8%. Kết quả cũng cho thấy sự tương tác giữa nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ DM/NL đã hình thành ma trận tương quan mạnh, thể hiện sự tương tác chéo để phá hủy cấu trúc thành tế bào rong và đưa ra hiệu suất chiết khác nhau với giá trị cực đại của hiệu suất chiết là 21,8% (Bảng 1).

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm và kết quả hiệu suất theo mô hình Box-Behnken

STT	X_1 (°C)	X_2 (phút)	X_3 (v/w)	Y (%)
1	50,00	20,00	60,00	4,30
2	90,00	20,00	60,00	12,20
3	50,00	40,00	60,00	11,26
4	90,00	40,00	60,00	15,95
5	50,00	30,00	50,00	7,40
6	90,00	30,00	50,00	16,21
7	50,00	30,00	70,00	7,40
8	90,00	30,00	70,00	20,07
9	70,00	20,00	50,00	10,85
10	70,00	40,00	50,00	9,38
11	70,00	20,00	70,00	5,10
12	70,00	40,00	70,00	7,20
13	70,00	30,00	60,00	20,18
14	70,00	30,00	60,00	21,80
15	70,00	30,00	60,00	21,70

Phân tích dữ liệu hồi quy đa nhân tố, biến đáp ứng và biến 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 [11, 12].

$$Y = 486.86 + 145.10X_1 + 16.07X_2 + 2.07X_3 + 2.58X_1X_2 + 3.72X_2X_3 + 3.19X_1X_3 + 29.59X_1^2 + 205.94X_2^2 + 116.86X_3^2 \quad (1)$$

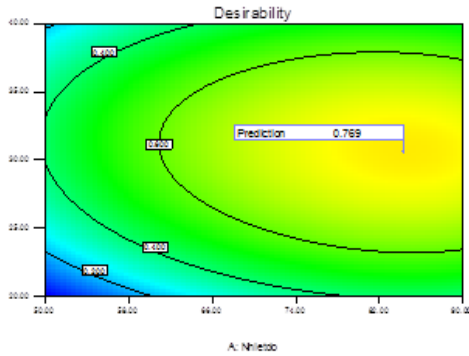
Kiểm định sự không phù hợp của mô hình thông qua ANOVA (Bảng 2) cho thấy, xác suất

mô hình đáp ứng cầu với ma trận tương quan các phương trình bậc 2 với đỉnh cực đại không phù hợp là không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,0588 > 0,05$).

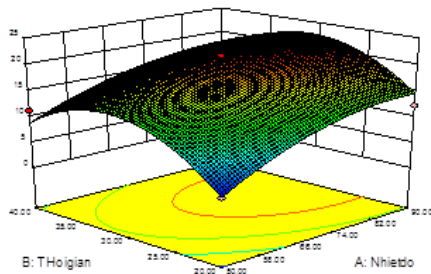
Kiểm định sự không phù hợp của mô hình thông qua ANOVA (Bảng 2) cho thấy, xác suất mô hình đáp ứng cầu với ma trận tương quan các phương trình bậc 2 với đỉnh cực đại không phù hợp là không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,0588 > 0,05$).

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 ($p = 0,0265 < 0,05$) (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 X_1 , X_2 , X_3 lên hiệu suất chiết Y là được thể hiện ở bảng 3. Phân tích đơn lẻ các yếu tố tác động như X_1 , X_2 , và X_3 cho thấy, nếu không có sự tác động của nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ DM/NL (v/w) 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 ($p = 0,0087 < 0,05$). Tất cả hệ số trong phương trình đáp ứng chứa điểm tối ưu về hiệu suất chiết Y đều dương, đồng nghĩa với sự gia tăng của các yếu tố tác động đều làm tăng hiệu suất chiết.

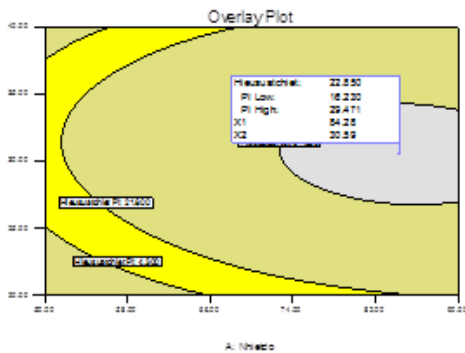
Phân tích mô hình tối ưu cho thấy điểm cực đại tiên đoán đạt được khi nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ DM/NL tương ứng là 84,28 °C; 30,59 phút và 60,2/1 v/w. Tại điểm cực đại tiên đoán hiệu suất chiết cực đại là $22,86 \pm 2,89\%$ (trung bình \pm độ lệch chuẩn) với sai số trung bình 1,58. Mức ý nghĩa 5% hiệu suất chiết cực đại dao động từ 18,81 đến 26,89 với sai số tiên đoán là 3,29 (Bảng 4). Dựa vào bề mặt đáp ứng 2D, 3D và bề mặt đáp ứng trùng lặp (Hình 1, 2 và 3) cho thấy đỉnh tối ưu sẽ cân xứng hơn và phù hợp mô hình phân phối chuẩn hơn khi nhiệt độ tiếp tục tăng lên. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng lên dẫn đến sự phá vỡ thành tế bào rong nhiều hơn có thể cho hiệu suất cao hơn, nhưng sự tăng nhiệt độ quá cao có thể dẫn tới sự cắt mạch polysaccharide, thực nghiệm và các công bố trước đây cũng chỉ ra điều này [6, 8].



Hình 1. Bề mặt đáp ứng 2D đối với hiệu suất chiết.



Hình 2. Bề mặt đáp ứng 3D đối với hiệu suất chiết.

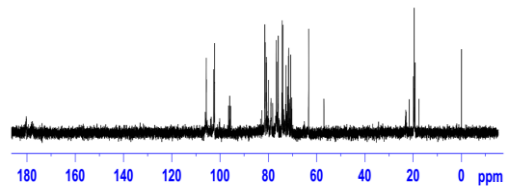
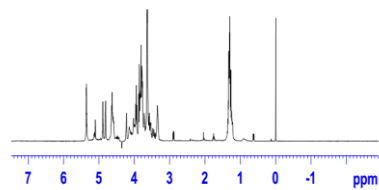


Hình 3. Bề mặt đáp ứng tối ưu trùng lặp 2D.

Để kiểm định kết quả, thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 10 g bột rong tại điều kiện tối ưu đã được làm tròn (nhiệt độ: 84 °C, thời gian: 31 phút và tỷ lệ DM/NL: 60/1 v/w). Ở điều kiện này, hiệu suất chiết đạt được là 22,5% cao hơn hiệu suất đạt được ở các điều kiện thí nghiệm chưa được tối ưu (Bảng 1) và

rất gần với hiệu suất tiên đoán (Bảng 4). Điều này cho thấy mô hình phù hợp với dữ liệu thực nghiệm và điều kiện chiết ulvan từ rong lục *Ulva lactuca* đã được tối ưu hóa.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của mẫu chiết tách theo điều kiện tối ưu (Hình 4 a và b), điển hình cho polysaccharide dạng ulvan, thành phần chính của nó bao gồm rhamnose và acid uronic [4, 14]. Phổ $^1\text{H-NMR}$, các peak trong khoảng 3,5-5,5 ppm là của proton anomer, peak ở vùng trường cao 1,3 ppm được gán cho proton nhóm CH_3 của rhamnose và các peak ở vùng 3,4-4,3 ppm là các proton của vòng pyranose. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$, các peak ở vùng trường thấp 100 - 103 ppm là đặc trưng cho các carbon anomer, các carbon còn lại trong vòng sẽ ở vùng 60-80 ppm. Tín hiệu ở khoảng 20 ppm đặc trưng cho nhóm C-CH_3 của rhamnose và tín hiệu ở 180 ppm chứng tỏ sự có mặt của acid uronic trong phân tử ulvan. So sánh với ulvan chiết tách cũng từ rong lục *Ulva lactuca* bằng phương pháp chiết nước thông thường trong một nghiên cứu khác của chúng tôi [14] cho thấy phổ NMR của 2 mẫu ulvan là khác nhau. Điều này cho phép một lần nữa khẳng định cấu trúc đa dạng và phức tạp của polysaccharide có nguồn gốc rong biển, cùng 1 loài rong tại 1 địa điểm thu hái nhưng với phương pháp chiết tách khác nhau sẽ thu được polysaccharide có cấu trúc khác nhau.



Hình 4. Phổ ^1H (a) và ^{13}C (b)-NMR của mẫu ulvan chiết tách theo điều kiện tối ưu hóa.

Bảng 2. Tóm tắt kiểm định sự không phù hợp của mô hình đáp ứng

Mô hình	Xác xuất chuỗi dữ liệu	Xác xuất không phù hợp	R ² Hiệu chỉnh	R ² Tiên đoán
Bề mặt cầu	0,0091	0,0588	-0,2167	Đề nghị

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

Nhân tố	Giá trị bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương			Ý nghĩa thống kê
				F	p	
Mô hình	486,86	9	54,10	6,50	0,0265	Có ý nghĩa
A-Nhiệt độ	145,10	1	145,10	17,44	0,0087	
B-Thời gian	16,07	1	16,07	1,93	0,2233	
C-Tỷ lệ DM/NL	2,07	1	2,07	0,25	0,6391	
AB	2,58	1	2,58	0,31	0,6019	
AC	3,72	1	3,72	0,45	0,5331	
BC	3,19	1	3,19	0,38	0,5631	
A ²	29,59	1	29,59	3,56	0,1180	
B ²	205,94	1	205,94	24,75	0,0042	
C ²	116,86	1	116,86	14,04	0,0133	
Độ vênh giữa dữ liệu tiên đoán và thực nghiệm	41,60	5	8,32			
Độ không phù hợp	39,96	3	13,32	16,16	0,0588	Không có ý
Sai số	1,65	2	0,82			
Tổng cộng	528,46	14				

Bảng 4. Hiệu suất chiết tiên đoán, độ lệch chuẩn và sai số chuẩn ý nghĩa

Hàm mục tiêu	Tiên đoán	Độ lệch chuẩn	Sai số trung bình	95% cận dưới	95% cận trên	Sai số tiên đoán	95% cận dưới	95% cận trên
Hiệu suất (%)	22,86	2,89	1,58	18,81	26,89	3,29	14,41	31,3

4. Kết luận

Trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu điều kiện tối ưu chiết ulvan từ rong lục *Ulva lactuca* bằng phương pháp chiết với dung môi nước có hỗ trợ của sóng siêu âm để thu

được ulvan với hiệu suất cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy: điều kiện tối ưu để chiết ulvan từ rong lục là ở nhiệt độ 84,28 °C, thời gian 30,59 phút với tỷ lệ DM/NL là 60,21/1 (v/w). Tại điều kiện thực nghiệm này hiệu suất ulvan đạt 22,5% theo trọng lượng rong khô.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đề tài mã số NĐT.89.JPN/20.

Tài liệu tham khảo

- [1] A. Alves, R. A. Sousa, R. L. Reis, In Vitro Cytotoxicity Assessment of Ulvan, A Polysaccharide Extracted from Green Algae, *Phytother, Res*, Vol. 27, 2013, pp. 1143-1148.
- [2] J. M. Leiro, R. Castro, J. A. Arranz, J. Lamas, Immunomodulating Activities of Acidic Sulphated Polysaccharides Obtained from the Seaweed *Ulva rigida* C. Agardh, *Int, Immunopharmacol*, Vol. 7, 2007, pp. 879-888.
- [3] M. Tabarsa, S. J. Lee, S. You, Structural Analysis of Immunostimulating Sulfated Polysaccharides from *Ulva pertusa*, *Carbohydr, Res*, 2012, Vol. 361, pp. 141-147.
- [4] Hela Yaich, Haikel Garna, Souhail Besbes, Michel Paquot, Christophe Blecker, Hamadi Attia, Chemical Composition and Functional Properties of *Ulva Lactuca* Seaweed Collected in Tunisia, *Food Chemistry*, Vol. 128, 2011, pp. 895-901.
- [5] M. Lahaye, A. Robic, Structure and Functional Properties of Ulvan- a Polysaccharide from Green Seaweeds, *Biomacromolecules*, Vol. 8, No. 6, 2007, pp. 1765-1774.
- [6] A. Alves, S.G.Caridade, J.F. Mano, R.A. Sousa, R.L. Reis, Extraction and Physico-Chemical Characterization of a Versatile Biodegradable Polysaccharide Obtained from Green Algae, *Carbohydr., Res*, Vol. 345, 2010, pp. 2194-2200.
- [7] T. Maricela, V. Mircea, M. Timothy, Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Plants and Their Constituents, 1999, [http://doi.org/10.1016/S1569-2868\(99\)80007-2](http://doi.org/10.1016/S1569-2868(99)80007-2).
- [8] C. Chen, Q. Huang, J. C. K. Rengasamy, C. Wan, Extraction Optimization of Antifungal Compounds from *Thalictrum Foliosum* DC, Roots, Outh, *African Journal of Botany*, Vol. 138, 2021, pp. 328-336.
- [9] Y. Zou, X. Chen, W. Yang, S. Liu, Response Surface Methodology for Optimization of the Ultrasonic Extraction of Polysaccharides from *Codonopsis Pilosula* Nannf, Var, *Modesta L. T. Shen, Carbohydr Polym*, Vol. 84, 2011, pp. 503-508.
- [10] M. G. Vaquero, G. Rajauria, B. Tiwari, Torres Sweeney and John O'Doherty, Extraction and Yield Optimisation of Fucose, Glucans and Associated Antioxidant Activities from *Laminaria Digitata* by Applying Response Surface Methodology to High Intensity Ultrasound-Assisted Extraction, *Mar, Drugs*, Vol. 16, 2018, pp. 257-172.
- [11] C. Y. Gan, A. A. Latiff, Optimisation of the Solvent Extraction of Bioactive Compounds from *Parkia Speciosa* Pod Using Response Surface Methodology, *Food Chem*, Vol. 124, 2011, pp. 1277-1283.
- [12] W. H. Mao, L. J. Han, B. Shi, Optimization of Microwave-assisted Extraction of Flavonoid from *Radix Astragali* Using Response Surface Methodology, *Sep, Sci. Technol*, Vol. 43, 2008, pp. 671-681.
- [13] F. Rahimi, M. Tabarsa, M. Rezaei, Ulvan from Green Algae *Ulva intestinalis*: Optimization of Ultrasound-assisted Extraction and Antioxidant Activity, *Journal of Applied Phycology*, Vol. 28, 2016, pp. 2979-2990.
- [14] T. T. T. Thuy, Q. T. M Thu, N. T. Nu, D. V. Luong, B. M. Ly, T. T.T. Van, Structure and Cytotoxic Activity of Ulvan Extracted from Green Seaweed *Ulva lactuca*, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 93, 2016, pp. 695-702.