

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN PROTEIN CHIẾT TÁCH TỪ HẢI MIÊN *IRGINIA MUTANS***

***ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROTEIN FRACTIONS EXTRACTED FROM MARINE SPONGE *IRGINIA MUTANS****

Huỳnh Nguyễn Duy Bảo<sup>1</sup>, Nguyễn Khắc Bát<sup>1</sup>

Ngày nhận bài: 8/8/2017; Ngày phản biện thông qua: 28/5/2018; Ngày duyệt đăng: 25/6/2018

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu này đã tiến hành tách phân đoạn các protein chiết tách từ hải miên *Ircinia mutans* theo phương pháp kết tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các phân đoạn protein dựa vào hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp kết tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate ở nồng độ từ 20 – 40% bão hòa đã tách được hơn 99% lượng protein có trong dịch chiết hải miên. Thực hiện kết tủa phân đoạn lặp lại đã tách được các protein có hoạt tính chống oxy hóa cao trong 2 phân đoạn kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 20% và 30% bão hòa.

Từ khóa: Hải miên, protein, hoạt tính khử gốc tự do, tổng năng lực khử, kết tủa phân đoạn.

**ABSTRACT**

This study were conducted to separate protein extracted marine sponge *Ircinia mutans* into fractions by a method of fractional precipitation with ammonium sulfate and evaluate antioxidant activity of the fractions through DPPH free radical scavenging activity and total reducing power. The results shown that fractional precipitation with 20 – 40% saturated ammonium sulfate recovered more than 99% of protein in the marine sponge extract. The protein with high antioxidant activity was obtained by reprecipitation of the fractions with 20% and 30% saturated ammonium sulfate.

Keywords: Marine sponge, protein, radical scavenging activity, total reducing power, fractional precipitation.

**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Hải miên là động vật thân lỗ (Porifera) được xếp đầu danh sách các loài động vật chứa các hoạt chất sinh học có khả năng ứng dụng trong y dược do sự đa dạng về cấu trúc hóa học của các chất chuyển hóa có trong chúng. Nhiều nghiên cứu trong những năm gần đây đã phát hiện ra những hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải miên như chất chống oxy hóa, chất kháng viêm, kháng khuẩn, chống lao, chống ung thư, kháng nấm, chống sốt rét, kháng virus và kháng HIV [11]. Nghiên cứu của Shaaban và cộng sự [16] báo cáo rằng dịch chiết từ các loài hải miên ở vùng biển Ai Cập có hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme chuyển hóa carbohydrate. Một số chất chuyển hóa trong hải miên có hoạt tính chống oxy hóa cao như

protein, saponin, sterol, flavonoid, glycoside và các hợp chất phenol [5][7]. Ngoài ra, Sato và cộng sự [15] đã tìm thấy các hợp chất carotenoid, polyphenol, glutathione trong một số loài hải miên, đây cũng là những hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa cao.

Việt Nam có điều kiện rất thuận lợi cho các loài hải miên cùng với các sinh vật ký sinh trên chúng phát triển. Những nghiên cứu trước đây đã công bố có khoảng 201 loài hải miên được tìm thấy ở vùng biển Việt Nam [17], một số loài đã được nghiên cứu chiết xuất và đánh giá hoạt tính sinh học các hợp chất steroid, cerebroside, glycolipid và sesterterpene [3]. Trong các loài hải miên được tìm thấy ở vùng biển Việt Nam, *Ircinia* spp. đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu khai thác hoạt chất sinh học [9]. Nghiên cứu của Orhan và cộng sự [12] cho thấy dịch chiết từ các loài hải miên

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu Hải Sản

*I. spinulosa*, *I. fasciculate* và *I. variabilis* có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, khử gốc tự do 2,2 diphenyl-1picrylhydrazine (DPPH) và ức chế acetylcholinesterase. Nghiên cứu của Huỳnh Nguyễn Duy Bảo và Nguyễn Khắc Bát [1][2] cho thấy dịch chiết từ hải miên *I. mutans* có hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng protein trong dịch chiết có tương quan cao với hoạt tính chống oxy hóa. Vì vậy, nghiên cứu này đã tiến hành tách phân đoạn các protein trong dịch chiết từ hải miên *I. mutans* theo phương pháp kết tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate nhằm sàng lọc các protein có hoạt tính chống oxy hóa cao để ứng dụng trong y dược và thực phẩm chức năng.

## II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Nguyên vật liệu và hóa chất

#### 1.1. Nguyên vật liệu

Hải miên *I. mutans* sử dụng trong nghiên cứu này được lấy mẫu ở vùng biển Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang. Ngay sau khi lấy mẫu, hải miên được ướp lạnh trong thùng cách nhiệt bằng túi gel đá (Gel – Ice Pack) và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm Trường Đại học Nha Trang. Tại phòng thí nghiệm, hải miên được bảo quản đông ở nhiệt độ -20°C để sử dụng cho nghiên cứu này. Mẫu hải miên được định danh bởi nhóm nghiên cứu Đề tài độc lập cấp Nhà nước “Khảo sát nguồn lợi hải miên trong hệ sinh thái ven đảo và đánh giá khả năng cung cấp nguồn nguyên liệu cho y dược”, mã số ĐTĐL.2012 – G/10.

#### 1.2. Hóa chất

2,2 diphenyl-1picrylhydrazine (DPPH), Bovine serum albumin (BSA), Folin-Ciocalteu reagent được mua từ công ty Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ. Các hóa chất còn lại là loại đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích hóa học, được mua từ công ty Loba Chemie, Ấn Độ; Công ty Merck, Đức; công ty Wako, Nhật Bản.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Chiết tách protein từ hải miên

Chiết tách protein từ hải miên theo phương pháp được mô tả bởi Huỳnh Nguyễn Duy Bảo và Nguyễn Khắc Bát [2]. Cách tiến hành như sau: Lấy 100g hải miên đông lạnh

ở -20°C đưa đi cắt nhỏ đến kích thước 1 – 2 mm rồi đồng hóa với 200 ml nước cất. Sau đó, bổ sung thêm 400 ml nước cất vào hỗn hợp đồng hóa rồi đưa đi chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 20KHz trong thời gian 15 phút ở 30°C. Sau đó đưa đi ly tâm ở 4°C trong 20 phút với vận tốc 3.000 vòng/phút. Sau khi ly tâm, tách lấy dịch và lọc qua giấy lọc Whatman số 1. Bã lọc được tiến hành chiết lại 2 lần nữa với các thông số và cách chiết như lần đầu. Dịch lọc thu được từ các lần chiết nhập chung lại rồi tiến hành ly tâm ở 4°C trong 10 phút với vận tốc 15.000 vòng/phút. Tách lấy dịch ly tâm và lọc qua giấy lọc Whatman số 1 thu được dịch chiết chứa protein từ hải miên.

#### 2.2. Tách phân đoạn các protein từ dịch chiết hải miên

Tách phân đoạn các protein từ dịch chiết hải miên được tiến hành 2 lần như sau:

- Lần 1: Các protein trong dịch chiết hải miên được tiến hành kết tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate ở các nồng độ 20%, 40%, 60% và 80% bão hòa trong 30 phút. Các phân đoạn protein kết tủa được tách ra bằng cách ly tâm với tốc độ 3.500 vòng/phút trong 40 phút ở 4°C thu được 4 phân đoạn protein bao gồm: phân đoạn 1 (20%), phân đoạn 2 (40%), phân đoạn 3 (60%) và phân đoạn 4 (80%).

- Lần 2: Sau khi phân tích đã xác định được kết tủa protein ở phân đoạn 1 (20%) và phân đoạn 2 (40%) có hoạt tính chống oxy hóa cao nên các mẫu này được đưa đi phân đoạn lần 2 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ 20%, 30%, 40%, 50% và 60% bão hòa trong 30 phút. Các phân đoạn protein kết tủa được tách ra bằng cách ly tâm với tốc độ 3.500 vòng/phút trong 40 phút ở 4°C thu được 10 phân đoạn protein bao gồm: phân đoạn 1-1 (20% - 20%), phân đoạn 1-2 (20% - 30%), phân đoạn 1-3 (20% - 40%), phân đoạn 1-4 (20% - 50%), phân đoạn 1-5 (20% - 60%), phân đoạn 2-1 (40% - 20%), phân đoạn 2-2 (40% - 30%), phân đoạn 2-3 (40% - 40%), phân đoạn 2-4 (40% - 50%), phân đoạn 2-5 (40% - 60%).

Trước khi phân tích hoạt tính chống oxy hóa, các phân đoạn protein kết tủa được tiến hành tách muối và các tạp chất hòa tan có khối

lượng phân tử thấp bằng thiết bị lọc – ly tâm siêu tốc qua màng Amicon® Ultra-15 (PLBC Ultracel-PL membrane, 3 kDa, Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) với vận tốc 13.000 vòng/phút trong vòng 20 phút ở 4°C.

**3. Phương pháp phân tích**

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ hải miên được đánh giá dựa vào khả năng khử gốc tự do DPPH được phân tích theo phương pháp của Fu và cộng sự [6] và dựa vào tổng năng lực khử được phân tích theo phương pháp của Oyaizu [13]. Hàm lượng protein được phân tích theo phương pháp Lowry và cộng sự [10].

**4. Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu trình bày trong bài báo này là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Tính giá trị trung bình và vẽ đồ thị sử dụng phần mềm

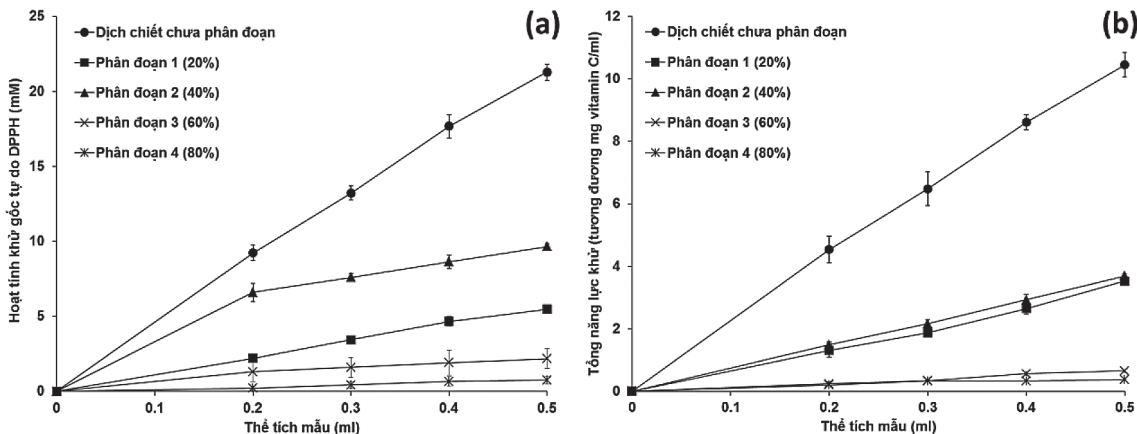
Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ) của các giá trị trung bình được phân tích trên phần mềm thống kê R phiên bản 2.13.1.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**1. Hoạt tính chống oxy và hàm lượng protein của dịch chiết hải miên và các phân đoạn kết tủa lần 1**

Hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết hải miên và các phân đoạn kết tủa lần 1 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau từ 20 – 80% được thể hiện trên Hình 1.

Kết quả ở Hình 1a cho thấy rằng các protein thu được từ dịch chiết hải miên bằng phương pháp kết tủa phân đoạn bởi ammonium

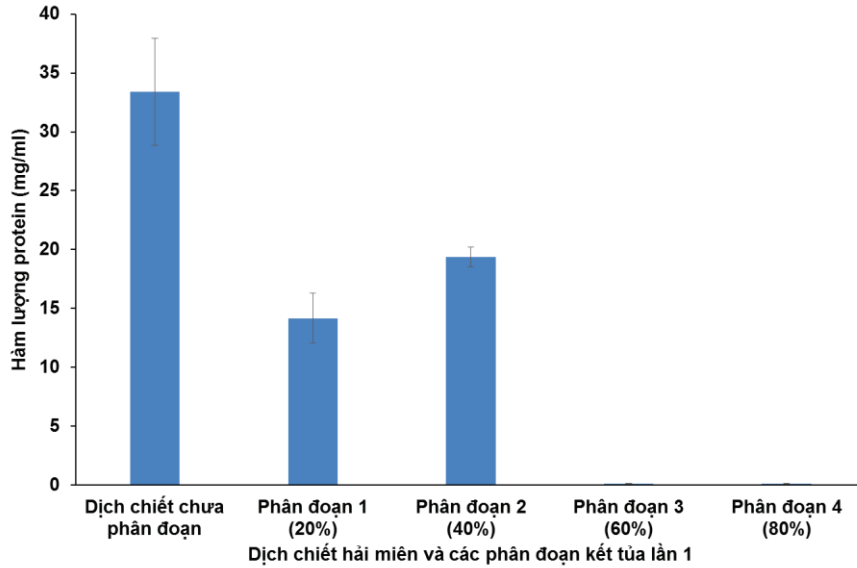


**Hình 1. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b) của dịch chiết hải miên và các phân đoạn kết tủa lần 1.**

sulfate ở các nồng độ khác nhau từ 20 – 80% đều có hoạt tính khử gốc tự do DPPH. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn protein được sắp xếp theo thứ tự như sau: phân đoạn 2 (40%) > Tủa phân đoạn 1 (20%) > Tủa phân đoạn 3 (60%) > Tủa phân đoạn 4 (80%). Trong đó, các protein phân đoạn 1 (20%) và phân đoạn 2 (40%) có hoạt tính khử gốc tự do DPPH cao hơn gấp 3 lần so với phân đoạn 3 (60%) và cao hơn gấp 8 lần so với phân đoạn 4 (80%). Tương tự như hoạt tính khử gốc tự do DPPH, Hình 1b cũng cho thấy tổng năng lực khử của các protein phân đoạn 1 (20%) và phân đoạn 2 (40%) cao hơn gấp 5 lần so với phân đoạn 3 (60%) và cao hơn gấp 10 lần so

với phân đoạn 4 (80%). Những nghiên cứu trước đây báo cáo rằng protein từ thủy sản có hoạt tính chống oxy hóa [8], các phân đoạn kết tủa protein bởi ammonium sulfate ở nồng độ từ 20 – 40% bão hòa có hoạt tính chống oxy hóa cao [4]. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy các phân đoạn kết tủa protein từ hải miên *I. mutans* bởi ammonium sulfate ở nồng độ 20% và 40% bão hòa có hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử cao.

Kết quả phân tích hàm lượng protein của dịch chiết hải miên và các phân đoạn kết tủa lần 1 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau từ 20 – 80% được thể hiện trên Hình 2.



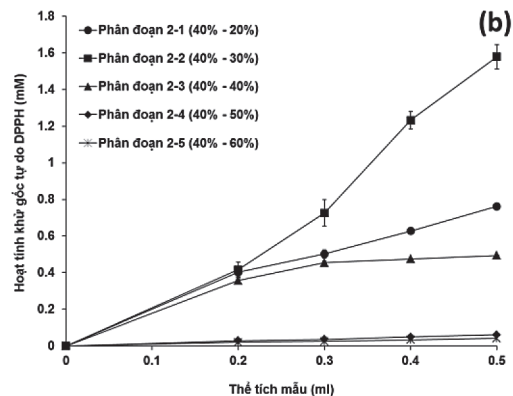
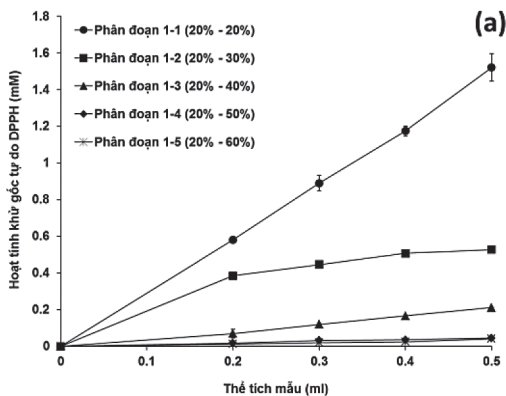
Hình 2. Hàm lượng protein của dịch chiết hải miên và các phân đoạn kết tủa lần 1.

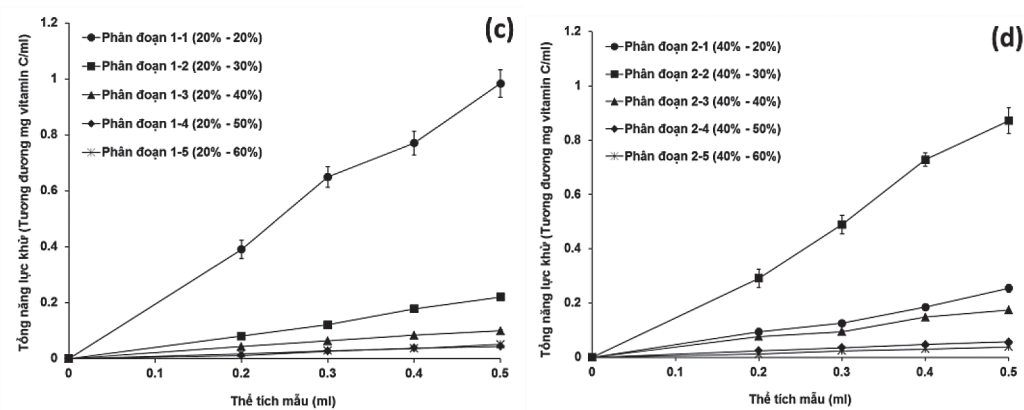
Hàm lượng protein trong phân đoạn 1 (20%) thu được là  $14,17 \pm 2,12$  mg/ml, chiếm khoảng 42,43% lượng protein có trong dịch chiết hải miên lúc ban đầu (chưa phân đoạn). Hàm lượng protein trong phân đoạn 2 (40%) thu được là  $19,36 \pm 0,84$  mg/ml, chiếm khoảng 57,96% lượng protein có trong dịch chiết hải miên lúc ban đầu. Phân đoạn 3 (60%) và phân đoạn 4 (80%) có hàm lượng protein rất thấp, tương ứng là  $0,10 \pm 0,02$  mg/ml và  $0,09 \pm 0,02$  mg/ml. Kết quả này đã khẳng định phương pháp kết tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau có thể tách được hơn 99% các protein có hoạt tính chống oxy hóa trong dịch chiết hải miên và các protein này tập trung chủ yếu trong 2 phân đoạn kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 20% và 40%

bão hòa. Nghiên cứu của Salehi và cộng sự [14] cũng cho thấy dịch chiết bằng nước từ 4 loài hải miên ở vùng biển Indonesia có hàm lượng protein dao động từ 4.0 – 1.4 mg/ml, tương ứng 1,7 – 4,4 g protein/g hải miên và các protein có hoạt tính sinh học cao tập trung chủ yếu trong phân đoạn kết tủa ở nồng độ ammonium sulfate từ 20 – 40% bão hòa.

**2. Hoạt tính chống oxy và hàm lượng protein của các phân đoạn kết tủa lần 2**

Hai phân đoạn protein có hoạt tính chống oxy hóa cao thu được từ kết tủa phân đoạn lần 1 là phân đoạn 1 (20%) và phân đoạn 2 (40%) được tiến hành kết tủa phân đoạn lần 2 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau từ 20 – 60% thu được 10 phân đoạn protein có hoạt tính khử gốc tự do DPPH





**Hình 3. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau từ 20 – 60%: (a) Hoạt tính khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn lần 2 từ phân đoạn 1 (20%) lần 1; (b) Hoạt tính khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn lần 2 từ phân đoạn 2 (40%) lần 1; (c) Tổng năng lực khử của các phân đoạn lần 2 từ phân đoạn 1 (20%) lần 1; (d) Tổng năng lực khử của các phân đoạn lần 2 từ phân đoạn 2 (40%) lần 1.**

và tổng năng lực khử như trên Hình 3.

Từ kết quả ở Hình 3a và 3b nhận thấy các phân đoạn có hoạt tính khử gốc tự do DPPH đáng kể gồm: phân đoạn 1-1 (20% - 20%), phân đoạn 1-2 (20% - 30%), phân đoạn 1-3 (20% - 40%), phân đoạn 2-1 (40% - 20%), phân đoạn 2-2 (40% - 30%) và phân đoạn 2-3 (40% - 40%). Trong đó, phân đoạn 1-1 (20% - 20%) và phân đoạn 2-2 (40% - 30%) có hoạt tính khử gốc tự do DPPH cao nhất.

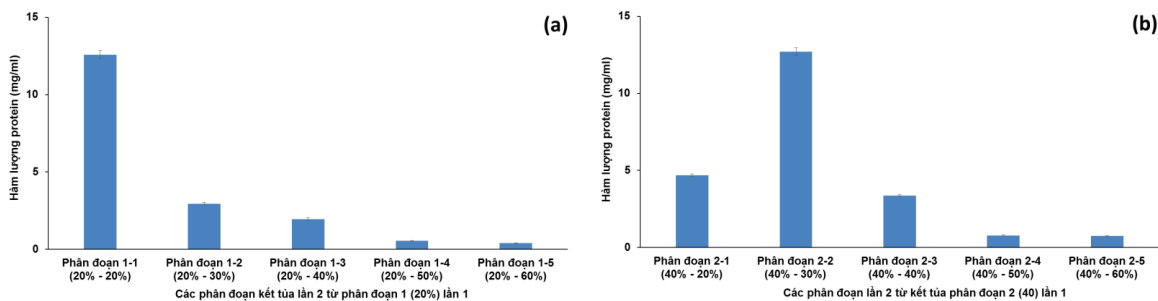
Tương tự như hoạt tính khử gốc tự do DPPH, các phân đoạn có tổng năng lực khử bao gồm: phân đoạn 1-1 (20% - 20%), phân đoạn 1-2 (20% - 30%), phân đoạn 1-3 (20% - 40%), phân đoạn 2-1 (40% - 20%), phân đoạn 2-2 (40% - 30%) và phân đoạn 2-3 (40% - 40%). Hai phân đoạn có tổng năng lực khử cao nhất là phân đoạn 1-1 (20% - 20%) và phân

đoạn 2-2 (40% - 30%).

Kết quả phân tích hàm lượng protein của các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau từ 20 – 60% được thể hiện trên Hình 4.

Từ kết quả ở Hình 4 nhận thấy hàm lượng protein của phân đoạn 1-1 (20% - 20%) thu được là  $12,59 \pm 0,25$  mg/ml, chiếm khoảng 88,85% lượng protein có trong phân đoạn 1 (20%) lần 1. Hàm lượng protein của phân đoạn 2-2 (40% - 30%) thu được là  $12,71 \pm 0,29$  mg/ml, chiếm khoảng 65,65% lượng protein có trong phân đoạn 2 (40%) lần 1.

Kết quả ở Hình 3 và 4 cũng cho thấy các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ 50% và 60% bão hòa có hàm lượng protein nhỏ hơn 1mg/ml, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử rất thấp.

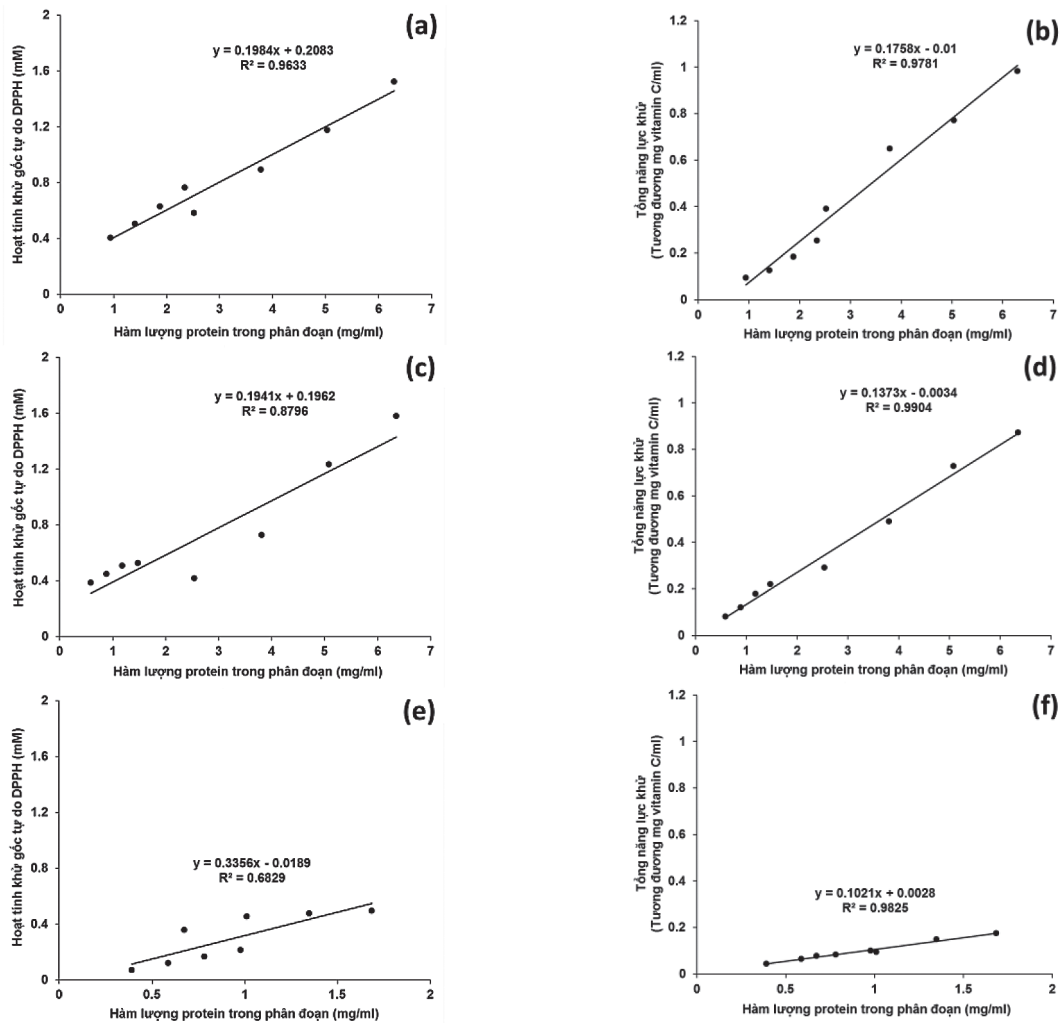


**Hình 4. Hàm lượng protein của các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau từ 20 – 60%: (a) Hàm lượng protein của các phân đoạn lần 2 từ phân đoạn 1 (20%) lần 1; (b) Hàm lượng protein của các phân đoạn lần 2 từ phân đoạn 2 (40%) lần 1.**

Kết quả phân tích tương quan giữa hàm lượng protein với hoạt tính khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn kết tủa lần 2 được thể hiện trên Hình 5.

Kết quả ở Hình 5 cho thấy hàm lượng protein có tương quan cao với hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở nồng độ 20%, 30% và 40% bão hòa. Kết quả này đã xác định được các protein của phân đoạn kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 20% bão hòa có hoạt tính chống oxy hóa

cao nhất, 1 mg protein của phân đoạn này có khả năng khử được 0,41 mM gốc tự do DPPH và có tổng năng lực khử tương đương 0,17 mg vitamin C. Các protein của phân đoạn kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 30% bão hòa có hoạt tính chống oxy hóa thấp hơn, 1 mg protein của phân đoạn này có khả năng khử được 0,39 mM gốc tự do DPPH và có tổng năng lực khử tương đương 0,14 mg vitamin C. Các protein của phân đoạn kết tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 40% bão hòa có hoạt tính chống oxy hóa thấp nhất, 1 mg protein



Hình 5. Tương quan giữa hàm lượng protein với hoạt tính khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở nồng độ 20% bão hòa (a), 30% bão hòa (c), 40% bão hòa (e), và với tổng năng lực khử của các phân đoạn kết tủa lần 2 bằng ammonium sulfate ở nồng độ 20% bão hòa (b), 30% bão hòa (d), 40% bão hòa (f).

của phân đoạn này có khả năng khử được 0,32 mM gốc tự do DPPH và có tổng năng lực khử tương đương 0,11 mg vitamin C.

#### IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Phương pháp kết tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau có thể sàng lọc được các nhóm protein có hoạt tính chống oxy hóa cao từ dịch chiết hải miên. Nghiên cứu này đã

sàng lọc được 2 phân đoạn protein có hoạt tính chống oxy hóa cao là phân đoạn 1-1 (20% - 20%) và phân đoạn 2-2 (40% - 30%). Tuy nhiên, phương pháp này vẫn chưa phân tách được triệt để các nhóm protein có hoạt tính chống oxy hóa khác nhau trong dịch chiết hải miên. Vì vậy, cần nghiên cứu xác định khối lượng phân tử của protein trong các phân đoạn để có cơ sở thiết lập phương pháp tinh sạch thu protein có hoạt tính chống oxy hóa cao.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### Tiếng Việt:

1. Huỳnh Nguyễn Duy Bảo, Nguyễn Khắc Bát, 2015. Ảnh hưởng của loại dung môi chiết và siêu âm đến hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng protein của dịch chiết từ hải miên (*Ircinia mutans*). Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản, số 4/2015: 11–17.
2. Huỳnh Nguyễn Duy Bảo, Nguyễn Khắc Bát, 2016. Ảnh hưởng của điều kiện chiết xuất bằng nước với sự hỗ trợ siêu âm đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ hải miên *Ircinia mutans*. Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản, số 2/2016: 3–10.
3. Châu Văn Minh, Nguyễn Xuân Cường, Nguyễn Hải Đăng, Nguyễn Phương Thảo, Trần Hồng Quang, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Hoài Nam, Nguyễn Văn Hùng, Phan Văn Kiệt, 2012. Điềm lại các nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học một số loài sinh vật biển việt nam trong giai đoạn 2006-2012. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 50(6): 825–837.

##### Tiếng Anh:

4. Ahmad, A., Usman, H., Natsir, H., Karim, A., 2014. Isolation and characterization of bioactive protein from green algae *Halimeda macrobala* acting as antioxidant and anticancer agent. American Journal of Biomedical and Life Sciences, 2(5): 134–140.
5. Chairman, K., Singh, A. J. A. R., Alagumuthu, G., 2012. Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2(3): 234–238.
6. Fu, H., Shieh D., Ho C., 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. Food Lipids, 9: 35–46.
7. Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?. The Lancet, 344: 721–724.
8. Kim, S. K., 2013. Marine proteins and peptides: Biological activities and applications. Wiley-Blackwell, Pp. 792.
9. Kumar, M. S., Pal, A. K., 2012. Investigation of bioactivity of extracts of Marine Sponge, *Spongosorites halichondrioides* (Dendy, 1905) from western coastal areas of India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S1784–S1789.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193: 265–275.
11. Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C., Zhang, W., 2014. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. Marine Drugs, 12(8): 4539–4577.
12. Orhan, I. E., Ozcelik, B., Konuklugil, B., Putz, A., Kaban, U. G., Proksch, P., 2012. Bioactivity screening of the selected turkish marine sponges and three compounds from *Agelas oroides*. Record of Natural Products, 6(4): 356–367.
13. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44: 307–315.
14. Salehi, A., Patong, R., Ahmad, A., 2014. Isolation and characterization of some kind bioactive proteins sponge as antibacterial agent. International Journal of Scientific & Technology Research, 3(2): 233–236.
15. Sato, S., Kuramoto, M., Ono, N., Ircinamine, B., 2006. Bioactive alkaloid from marine sponge. *Dactylia sp.* Tetrahedron Letters, 47: 7871–7873.
16. Shaaban, M., Abd-Alla, H. I., Hassan, A. Z., Aly, H. F., Ghani, M. A., 2012. Chemical characterization, antioxidant and inhibitory effects of some marine sponges against carbohydrate metabolizing enzymes. Organic and Medicinal Chemistry Letters, 2:30.
17. Thai Minh Quang, 2013. A review of the diversity of sponges (porifera) in Vietnam. The 2<sup>nd</sup> international workshop on marine bioresources of Vietnam, Hanoi 5–6/6/2013, 109–115.