

УДК 547.99:577.11

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ МИКРОПОРОШКА ИЗ ТУНИКИ АСЦИДИИ ПУРПУРНОЙ

¹Пивненко Т.Н., ¹Позднякова Ю.М., ¹Есипенко Р.В., ²Петрова Е.С.

¹ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет»,
Владивосток, e-mail: tnpivnenko@mail.ru;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины»
(НИИТПМ), Новосибирск, e-mail: ekamo9@yandex.ru

Проведено сравнительное исследование методов обработки жестко структурированного экзоскелета (туники) асцидии пурпурной. Показано, что ее основой является целлюлозо-полисахаридный комплекс. При использовании щелочного гидролиза, ультразвуковой обработки и ферментализации происходит разрушение растворимых полисахаридов и удаление хитозана. Полученный продукт представляет собой крупнодисперсный порошок с размером частиц 0,5–1 мм, содержащий преимущественно целлюлозу. При использовании метода сверхтонкого измельчения образуется микропорошок с размером частиц 1–100 мкм. Кислоторастворимые полисахариды микропорошка составляют до 17% от общей массы, в их состав входят глюкоза, галактоза, фукоза, манноза и ксилоза. С использованием рекомбинантной эндо-1,3-β-D-глюкоказы показано наличие в кислоторастворимой фракции ламинарибиозы и ламинартриозы, как структурных составляющих 1,3-β-D-глюкана. Щелочерастворимые полисахариды микропорошка туники составляют 35% от его массы, их моносахаридный состав представлен только глюкозамином. ИК-спектроскопия свидетельствует о наличии хитозана и сульфатных групп.

Ключевые слова: асцидия, целлюлоза, хитозан, β-D-глюкан, сверхтонкое измельчение

THE RESEARCH OF THE COMPOSITION AND PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES FROM MICROPOWDER OF THE TUNICS OF PURPLE ASCIDIAN

¹Pivnenko T.N., ¹Pozdnyakova Yu.M., ¹Esipenko R.V., ²Petrova E.S.

¹Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, e-mail: tnpivnenko@mail.ru;

²Scientific Research Institute of Therapy and Preventive Medicine, Novosibirsk, e-mail: ekamo9@yandex.ru

A comparative study of methods of processing of rigidly structured exoskeleton (tunic) purple ascidian was provided. It was shown that it is based on cellulose-polysaccharide complex. After using alkaline hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis the destruction of soluble polysaccharides and chitosan removal were observed. The obtained product is a coarse powder with a particle size of 0,5–1 mm, containing predominantly cellulose. When using the method of superfine grinding micropowder with a particle size of 1–100 μm was produced. Acid polysaccharides from micropowder make up to 17% of the total weight; it is composed from glucose, galactose, fukoza, mannose and xylose. With the use of the recombinant endo-1,3-β-D-glucanase there was shown presence of laminaribiose and laminaribiose as structural components of 1,3-β-D-glucan. Alkaline soluble polysaccharides was 35% of tunic micropowder weight, their monosaccharide composition represented only by the glucosamine. Infrared spectroscopy indicates the presence of chitosan and sulfate groups.

Keywords: ascidian, cellulose, chitosan, β-D-glucan, ultrafine grinding

В последние десятилетия большие усилия ученых были направлены на выделение и изучение биологически активных природных компонентов морских организмов. Относительно небольшое количество изученных до сих пор морских организмов позволило получить тысячи новых химических соединений. Необычные условия морской среды, связанные с ее химическим разнообразием, обеспечивают возможности выявления новых активных веществ, используемых для создания биоактивных препаратов [1].

Полисахариды морского происхождения находятся в настоящее время на пике исследовательской активности мировых научных центров. Тем не менее они остаются недостаточно используемыми и требуют

дальнейшего изучения для установления перспектив их потенциального применения. Имеются многочисленные данные о биологической активности полисахаридов морского происхождения, включая противоопухолевую, противовирусную, антикоагулянтную, антиоксидантную и противовоспалительную. Получение высококачественных препаратов непосредственно из морских объектов может быть сложным по своему технологическому воплощению. Для того чтобы использовать эти углеводы в БАД к пище, косметике и тем более в лекарственных средствах необходимы активные исследования [2].

Примером объектов подобных исследований могут служить морские животные, принадлежащие к семейству оболочников

Tunicates. Интерес к их изучению связан с решением проблем фармакологии, рынка функциональных пищевых продуктов (ФПП) и даже производства целлюлозных наноматериалов. Это определяется разнообразием состава полисахаридов и их производных, таких как целлюлоза, аминсахара, белково-полисахаридные комплексы, гликозаминогликаны, хитин и хитозан, склеропротеин [3–5]. Взрослые особи оболочников имеют целлюлозо-полисахаридную ткань, образующую экзоскелет, называемый туникой. Оболочники – единственные животные, которые синтезируют целлюлозу. До сих пор не существует единого мнения о структуре и составе туники оболочников. Большинство исследователей считают, что основой их жестко структурированного экзоскелета является целлюлоза (более 60% массы), имеющая высокую степень кристалличности [4]. По данным других авторов туника взрослой асцидии содержит в основном сульфатированный L-галактан, синтезируемый эпидермальными клетками [5].

В дальневосточных морях имеются значительные запасы асцидии пурпурной *Halocynthia aurantium*. Используемые части тела асцидии: мышечный мешок (мантия) – пищевой продукт в странах Юго-Восточной Азии, и внешняя защитная оболочка (туника) – источник БАВ. Туника содержит высокие концентрации каротиноидов – ксантофиллов, которые используются в виде БАД к пище, обладающей антиоксидантной, мембранотропной и иммуномодулирующей активностями [6]. После экстракции каротиноидов остается около 20% отходов, представляющих собой обезжиренную и обезвоженную тунику. Основными компонентами этого вторичного сырья являются полисахариды. При этом жесткая структура полученного полуфабриката не позволяет использовать его без дальнейшей обработки. Предлагаемые способы использования его в качестве нерастворимых пищевых волокон представляются недостаточно эффективными (из-за невысокой сорбционной емкости) и рациональными (из-за ограниченных возможностей проявления биологической активности материала, содержащего комплекс биоактивных полисахаридов).

В связи с вышеизложенным целью представленной работы явилась разработка способов переработки туники асцидии пурпурной, обеспечивающих возможности ее эффективного использования в пищевой промышленности, а также изучение состава и свойств полученного продукта.

Материалы и методы исследования

Материалом исследований служила туника асцидии пурпурной *Halocynthia aurantium*. Сырую тунику измельчали, обрабатывали ацетоном в соотношении 1:5, после удаления экстрагента высушивали. Определение воды и белка проводили по общепринятым методикам [7]. Содержание углеводов определяли антроновым методом. Содержание гексозаминов, хитина и целлюлозы, определяли стандартными методами, описанными в работе [6]. Выделение и количественное определение растворимых глюканов проводили согласно методу, предложенному Anno [8]. Определение содержания растворенных веществ проводили на рефрактометре «ИРФ-454Б № 821058». Содержание сульфат-ионов определяли турбидиметрически после гидролиза образцов в 4 н HCl, п осаждения ионов сульфата BaCl₂ и регистрации степени помутнения раствора при 405 нм.

Частичный кислотный гидролиз образцов проводили с помощью 0,5 н трифторуксусной кислоты (ТФУ) при 37 °С в течение 5 час. Полный кислотный гидролиз проводили 2 н ТФУ при 100 °С в течение 7 час. Щелочную экстракцию полисахаридов проводили 0,1 н NaOH при 37 °С в течение 14 час. Моносахаридный состав определяли на углеводном анализаторе «Biotronik IC-5000» (Германия), на колонке «Shim-pack ISA-07/S2504». Обнаружение проводили бицинхониатным методом. ИК-спектры полисахаридов регистрировали для КВг-таблеток образцов на спектрометре «Vector (Bruker) 22» (Германия). Для определения типа гликозидной связи между остатками глюкозы на образцы полисахаридов, действовали рекомбинантной эндо-1,3-β-D-глюкоказой из морской бактерии *Formosa algae* [9]. Анализ продуктов гидролиза проводили на колонке Zorbax-NH2 (4,6×250 мм, Германия) и хроматографе Agilent 1100. Детектирование осуществляли с помощью рефрактометра.

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее было показано, что туницин, нерастворимая в щелочи волокнистая фракция, содержит не менее 60% целлюлозы от сухой массы туники, а высокая степень устойчивости туники к химическому и ферментативному гидролизу связана с высокой степенью кристалличности присутствующей в ней целлюлозы

и значительного количества протеогликанов, прочно с ней связанных [3]. Соответственно этому жесткая структура туники не позволяет выделить ее компоненты относительно мягкими способами, позволяющими сохранить нативную структуру и свойства, что является препятствием для их дальнейшего использования в качестве биоактивного ингредиента. В ряде работ приводится сравнение структурных образований туники с хитинглюкановым комплексом (ХГК) грибов и для их выделения применяют аналогичные приемы. Исходное сырье подвергают гидробаротермической обработке, варьируя давление, гидромодуль, температуру и концентрацию реагентов (NaOH, HCl, H₂O₂, Na₂CO₃) [10]. Это позволяет экстрагировать хитозан, но одновременно приводит к разрушению глюканов. Среди современных методов рекомендуют ультразвуковую (УЗ) обработку как способ снижения молекулярной массы полимеров путем расщепления отдельных химических связей [10]. Для удаления белковой составляющей ХГК используют ферментные препараты протеолитического и целлюлолитического действия [11]. Однако использование физико-химических и ферментативных методов, как по отдельности, так и при их комбинировании не позволяет существенно изменить свойства получаемых препаратов. Показана возможность применения таких препаратов в составе ФПП. Однако потенциал их биологической активности остается нераскрытым.

На первом этапе обработки туники обязательным условием является выделение концентрата каротиноидов органическими растворителями. В дальнейшем обезжиренную тунику подвергали последовательной обработке: 1 н NaOH при температуре 50 °С; УЗ обработке с помощью прибора Vibra-Cell при мощности излучения 130 ватт, частоте 20 кГц в течение 10 минут; гидролизу препа-

ратом «ЦеллоЛюкс» (содержит целлюлазу, ксиланазу и глюканазу).

Физико-химические свойства полученного таким способом препарата представлены в табл. 1. Несмотря на определенные изменения свойств, считать эти препараты, последовательно обработанные щелочью, УЗ и ферментами, удобными и усвояемыми организмом нельзя. Поэтому для механической активации сырья был использован метод сверхтонкого измельчения. Для этого использовали центробежную мельницу непрерывного типа «ТМ» (совместная разработка ИХТТМ СО РАН и ООО «Новиц»), которая позволяет достичь тонкого измельчения мягких веществ и сухого сырья, механической активации материалов в высокодисперсном состоянии. Размер частиц полученного порошка составил 1–100 мкм. Результаты исследований микропорошка из туники асцидии также представлены в табл. 1.

Как показывают результаты, представленные в табл. 1, после обработки щелочью, УЗ и ферментализации полученный препарат сохраняет в своем составе в основном (~ 80%) целлюлозу. Различия между крупноразмерным порошком и микропорошком туники свидетельствуют о сохранении соотношения природных компонентов, но обеспечивают в последнем случае более легкое извлечение и хитина, и глюканов. Известно, что ударно-истирающее воздействие, даже без добавок твердофазных химических реагентов, сопровождается изменением химического состава компонентов в результате разрыва ряда химических связей (даже таких прочных, как 3-гликозидные). Результатом механохимической обработки сырья является увеличение биологической доступности (в частности, водорастворимости) компонентов без участия растворителей в одну технологическую стадию [12].

Таблица 1

Физико-химические свойства препаратов из туники асцидии

Показатель	Обезжиренная туника	Обработка щелочью, УЗ, ферментализ	Микропорошок
Внешний вид	Чешуйки размером 1–3 мм	Крупнозернистый порошок, размер частиц 0,5–1 мм	Аморфный порошок, размер частиц 1–100 мкм
Белок, %	3,7 ± 0,7	2,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5
Хитин, %	4,8 ± 0,5	1,5 ± 0,5	7,4 ± 0,6
Целлюлоза, %	61,3 ± 1,6	80,6 ± 4,3	62,6 ± 2,2
Глюканы, %	12,5 ± 1,1	2,2 ± 0,2	17,2 ± 1,9
Сульфат-ионы, %	3,7 ± 0,4	2,4 ± 0,7	4,6 ± 0,3

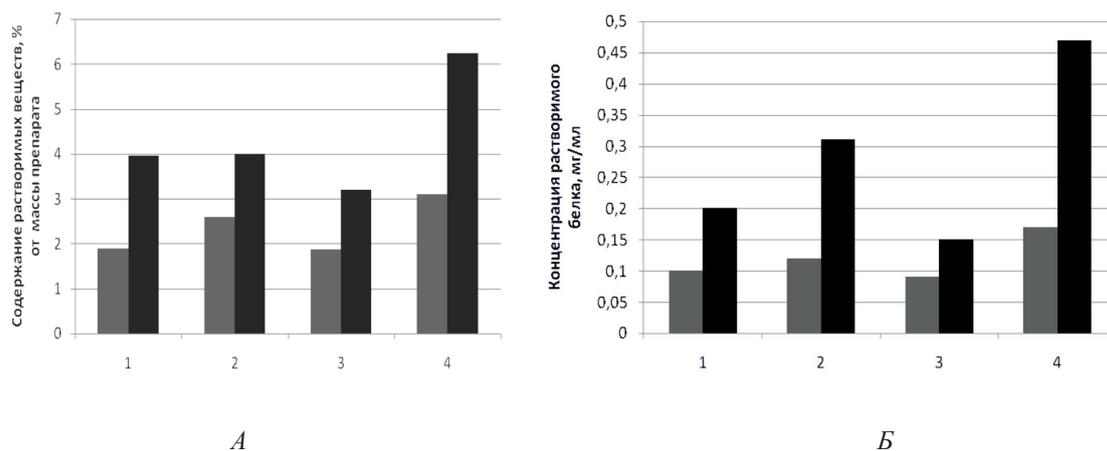


Рис. 1. Изменение растворимости препаратов из туники асцидии в разных средах после микроизмельчения. А – всех компонентов, Б – белка (1 – H₂O; 2 – 1 М NaCl; 3 – 0,2 н HCl; 4 – 1 н NaOH). Серый – после обработки щелочью, УЗ, ферментализа, черный – микропорошок

При исследовании растворимости полученного микропорошка из туники асцидии (рис. 1) было показано повышение концентрации компонентов в жидкой фазе после экспозиции в различных средах по сравнению с измельченной обезжиренной туникой, полученной обычным путем. При этом рассматривали в растворе общее содержание сухих веществ и белка, которые возрастали в 1,5–2 и 2–3 раза соответственно. Наибольшую растворимость микропорошка наблюдали в щелочной среде, наименьшую – в кислой. При этом накопление в жидкой фазе как общего числа растворенных веществ, так и белка имело общую тенденцию.

При проведении сравнительного анализа количественного и качественного состава полисахаридов и их моносахаридных составляющих в качестве пробоподготовки использовали кислотный и щелочной гидролиз. Полученные результаты представлены в табл. 2. Неполный кислотный гидролиз проводили с помощью 0,5 н ТФУ, в заданных условиях происходит отщепление молекул гликопротеинов и других комплексов легкогидролизуемых полисахаридов с выделением молекул полисахаридов. Увеличение концентрации ТФУ и температуры приводит к расщеплению полисахаридов до моносахаров. При мягком щелочном гидролизе 0,1 н NaOH происходит расщепление О-гликозидных связей, что позволяет выделить фракцию щелочерастворимых полисахаридов и также проанализировать их состав. Содержание кислоторастворимых полисахаридов в микропорошке туники составило 17,2%, среди входящих в их состав моносахаров преобла-

дала глюкоза, в значительно меньшем количестве обнаружены галактоза, фукоза, манноза и ксилоза. После экстракции микропорошка 0,1 н NaOH общее количество выделенных полисахаридов составило 34,8% от массы образца. При анализе их моносахаридного состава был обнаружен только один пик, соответствующий глюкозамину. Наиболее вероятно, что, при щелочной экстракции происходит высвобождение хитина.

Для определения типа гликозидной связи между остатками глюкозы, на полисахариды, полученные частичным кислотным гидролизом, подействовали рекомбинантной эндо-1,3-β-D-глюкоканазой из морской бактерии *Formosa algae*. Этот фермент предложено использовать для определения структуры β-1,3-глюканов [9]. В составе микропорошка туники асцидии обнаружен 1,3-β-D-глюкан в количестве 1,2%. На рис. 2 представлена хроматограмма разделения продуктов исчерпывающего гидролиза кислоторастворимых полисахаридов. При гидролизе эндо-1,3-β-D-глюкоканазой происходит резкое падение молекулярной массы полисахарида на начальных стадиях реакции, а конечными продуктами реакции являются олигосахариды с различной степенью полимеризации. Анализ продуктов исчерпывающего ферментализа этой фракции позволил обнаружить дисахарид ламинарибиоза и трисахарид ламинаритриоза, которые входят в состав 1,3-β-D-глюкана. Количественный расчет продуктов реакции показал, что они составляют 8,7% от фракции полисахаридов, взятой в ферментативную реакцию, или 1,2% от исходного образца.

Таблица 2

Состав и содержание полисахаридов и их мономеров в микропорошке туники асцидии пурпурной

Полисахариды, % массы образца	Моносахариды, % от суммы					
	Кислотный гидролиз					
17,2 ± 1,9	Фукоза	Ксилоза	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Глюкозамин
	3,6	0,7	3,9	6,3	85,6	0
Щелочной гидролиз						
34,8 ± 3,2	0	0	0	0	0	100

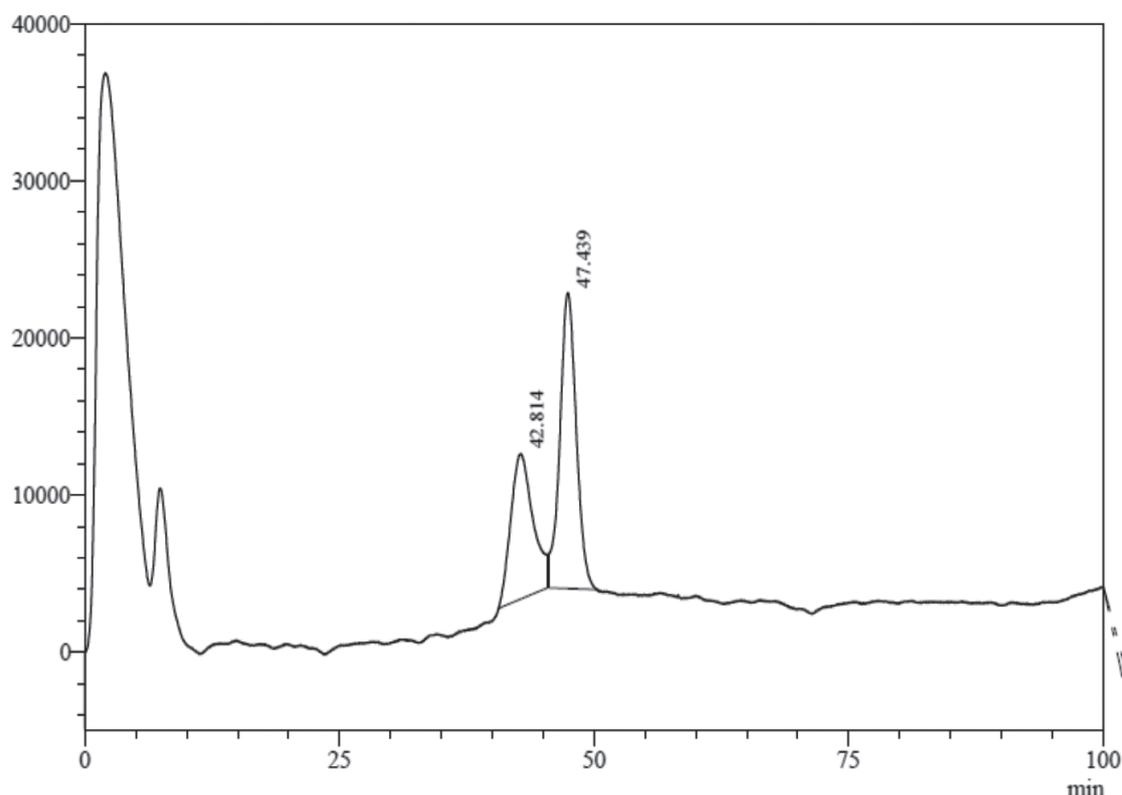


Рис. 2. ВЭЖХ продуктов исчерпывающего гидролиза кислоторастворимой фракции полисахаридов из туники асцидии пурпурной 1→3-*b*-D-глюкогалактозидазой из морской бактерии *Formosa algae*. Пик 1 – ламинарибиоза, пик 2 – ламинаритриоза

Ранее в тканях животных β-D-глюканы не были обнаружены. Содержание β-D-глюкана в зернах злаковых культур колеблется от 0,4 до 0,8%. Известно, что β-D-глюканы активируют местный иммунитет, защищая организм от вторжений антигенов, и системный иммунитет, уничтожая уже проникший внутрь организма чужеродный генетический материал, восстанавливая иммунный гомеостаз. Помимо выраженной

иммуномодуляции β-D-глюканы обладают антиоксидантной, противоопухолевой, противовоспалительной, противоаллергической активностью [13].

Для анализа компонентов щелочерастворимой фракции использовали ИК-спектроскопию, в исследуемом образце показано наличие специфических для хитозана полос в областях: 1384 см⁻¹ и более сглаженной структуры спектра при 1250 см⁻¹ (рис. 3).

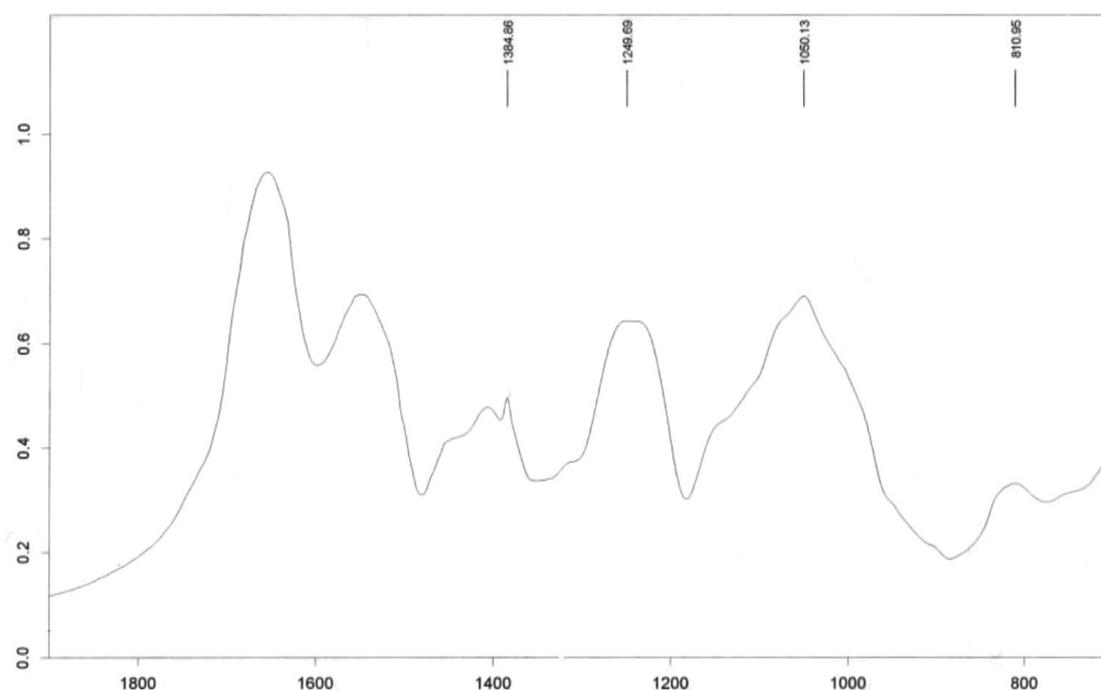


Рис. 3. ИК-спектр щелочерастворимой фракции углеводов микропорошка туники асцидии пурпурной

Аналогичные пики установлены для хитозана беспозвоночных и грибов. В ИК-спектрах исследуемого образца наблюдали поглощение при $1590\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ (сопряжённые $\text{C}=\text{O}$ группы, валентные колебания), а пик поглощения при 1650 см^{-1} характерен для валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ в амидах. В областях поглощения 1249 см^{-1} ($\text{S}=\text{O}$ валентные колебания) и 810 см^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{S}$ деформационные колебания), относящихся к области поглощения эфиров сульфата, наблюдали характеристические полосы. Области поглощения 1249 см^{-1} и 810 см^{-1} свидетельствуют о содержании сульфатных групп в образце.

Таким образом, результаты проведенных исследований полисахаридов туники *Halocynthia aurantium* согласуются с литературными сведениями о наличии в данной ткани уникальных по своему строению хитиноподобных сульфатированных полисахаридов, а также содержании целлюлозной составляющей, характерной для растительных организмов. Препараты из туники асцидии, прошедшие обработку методами щелочного гидролиза, УЗ и ферментативного гидролиза, содержат преимущественно целлюлозную составляющую, которую можно рассматривать в качестве нераство-

римых пищевых волокон. Наиболее целесообразно применение в составе БАД к пище и ФПП микропорошка из обезжиренной туники асцидии, содержащего в своем составе растворимые полисахариды, сульфатированный хитозан и бета-глюканы, обладающие широким спектром биологической активности.

Список литературы

1. Blunt J., Copp B., Munso M., Marine natural products // Nat. Prod. Rep. – 2011. – V. 28. – P. 196–268.
2. Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview // Mar. Drugs. – 2010. – V. 8. – P. 2435–2465.
3. Masoumeh H. Unique marine organism: identification of same methods for biomaterial production // Chemical engineering transactions. – 2014. – V. 37. – P. 385–390.
4. Zhang D., Zhang Q., Gao X., Piao G. A nanocellulose polypyrrole composite based on tunicate cellulose // International Journal Polymer Science. – 2013. – V. 2013. – P. 1–7.
5. Belmiro C.L., Castelo-Branco M.T., Melim L.M., Schanaider, A. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – P. 11267–11278.
6. Распределение, свойства и перспективы использования азотистых и углеводных соединений различных тканей дальневосточных асцидий / Т.Н. Пивненко [и др.] // Вестник биотехнол. и физ.-хим. биол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2014. – Т. 10 (1). – С. 29–37.
7. Лазаревский А.А. Техно-химический контроль в рыбообработывающей промышленности / А.А. Лазаревский. – М.: Пищепромиздат, 1955. – 518 с.

8. Anno K., Otsuka K., Seno N. A chitin sulfite-like polysaccharide from the test of the tunicate *Halocynthia roretzi* // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1974. – V. 362. – P. 215–219.
9. Kusaykin M.I., Belik A.A., Kovalchuk S.N., Dmitrenok P.S. A new recombinant endo-1,3- β -D-glucanase from the marine bacterium *Formosa algae* KMM 3553: enzyme characteristics and transglycosylation products analysis // *World J. Microbiol Biotechnol.* – 2017. – V. 33(2). – P. 40–49.
10. Machova E., Kogan G., Soltes L. Ultrasonic depolymerization of the chitin-glucan isolated from *Aspergillus niger* // *Reactive & Functional Polymers.* – 1999. – V. 42. – P. 265–271.
11. Nwe N., Stevens W.F., Tokura S., Tamura H. Characterization of chitin and chitosan-glucan complex extracted from cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2008. – V.42. – P. 242–251.
12. Душкин А.В. Возможности механохимической технологии органического синтеза и получения новых материалов / А.В. Душкин // *Химия в интересах устойчивого развития.* – 2004. – Т. 12. – С. 251–274.
13. Petravić-Tominac V., Zechner-Krpan V., Grba S., Srečec S. Biological effects of yeast β -glucans // *Agriculturae Conspectus Scientificus.* – 2010. – V. 75(4). – P. 149–158.
5. Belmiro C.L., Castelo-Branco M.T., Melim L.M., Schanider, A. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. pp. 11267–11278.
6. Raspredelenie, svojstva i perspektivy ispolzovanija azotistyh i uglevodnyh soedinenij razlichnyh tkanej dalnevostochnyh ascidij / T.N. Pivnenko [i dr.] // *Vestnik biotehnol. i fiz.-him. biol. im. Ju.A. Ovchinnikova.* 2014. T. 10 (1). pp. 29–37.
7. Lazarevskij A.A. Tehno-himicheskij kontrol v rybobrabatvyvajushhej promyshlennosti / A.A. Lazarevskij. M.: Pishhepromizdat, 1955. 518 p.
8. Anno K., Otsuka K., Seno N. A chitin sulfite-like polysaccharide from the test of the tunicate *Halo-cynthia roretzi* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1974. V. 362. pp. 215–219.
9. Kusaykin M.I., Belik A.A., Kovalchuk S.N., Dmitrenok P.S. A new recombinant endo-1,3- β -D-glucanase from the marine bacterium *Formosa algae* KMM 3553: enzyme characteristics and transglycosylation products analysis // *World J. Microbiol Biotechnol.* 2017. V. 33(2). pp. 40–49.
10. Machova E., Kogan G., Soltes L. Ultrasonic depolymerization of the chitin-glucan isolated from *Aspergillus niger* // *Reactive & Functional Polymers.* 1999. V. 42. pp. 265–271.
11. Nwe N., Stevens W.F., Tokura S., Tamura H. Characterization of chitin and chitosan-glucan complex extracted from cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method // *Enzyme and Microbial Technology.* 2008. V. 42. pp. 242–251.
12. Dushkin A.V. Vozmozhnosti mehanohimicheskoy tehnologii organicheskogo sinteza i poluchenija novyh materialov / A.V. Dushkin // *Himija v interesah ustojchivogo razvitija.* 2004. T. 12. pp. 251–274.
13. Petravić-Tominac V., Zechner-Krpan V., Grba S., Srečec S. Biological effects of yeast β -glucans // *Agriculturae Conspectus Scientificus.* 2010. V. 75(4). pp. 149–158.

References

1. Blunt J., Copp B., Munso M., *Marine natural products* // *Nat. Prod. Rep.* 2011. V. 28. pp. 196–268.
2. Laurienzo P. *Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview* // *Mar. Drugs.* 2010. V. 8. pp. 2435–2465.
3. Masoumeh H. *Unique marine organism: identification of same methods for biomaterial production* // *Chemical engineering transactions.* 2014. V. 37. pp. 385–390.
4. Zhang D., Zhang Q., Gao X., Piao G. *A nanocellulose polypyrrole composite based on tunicate cel-lulose* // *International Journal Polymer Science.* 2013. V. 2013. pp. 1–7.