

УДК 539.25 + 547.992.3

DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.153

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФИБРИЛЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ[□]

К.С. Болотова, канд. техн. наук, доц.

Д.Г. Чухчин, канд. техн. наук, доц.

Л.В. Майер, канд. техн. наук, доц.

А.А. Гурьянова, магистр

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,
наб. Северной Двины, д. 17, г. Архангельск, Россия, 163002;

e-mail: k.bolotova@narfu.ru

Проведено сравнение микроморфологической структуры и получено статистически значимое распределение по размерам микрофибрилл растительной и бактериальной целлюлозы. Морфологические особенности структуры микрофибрилл определяли с применением сканирующего электронного микроскопа Sigma VP ZEISS и атомно-силового микроскопа Multimod 8 Bruker. Информативность снимков с наименьшей степенью деформации микрофибрилл была достигнута за счет скалывания образца древесины, что позволило визуализировать отдельные фибриллы или их пучки. Для раскрытия лигногемицеллюлозной матрицы, искажающей изображение микрофибрилл древесины на снимках, применен гидролиз гемицеллюлоз путем кратковременного нагрева древесины в воде до температуры 235 °С. Снимки бактериальной целлюлозы получены без предварительной пробоподготовки образцов. Показано, что поперечные размеры микрофибрилл не зависят от слоя клеточной стенки, в котором они локализованы, и практически одинаковы для древесных и травянистых однолетних растений (при среднем значении 27 нм для можжевельника). Поперечный размер микрофибрилл бактериальной целлюлозы в среднем составил 34 нм при отсутствии строгой ориентации элементов надмолекулярной структуры, что характерно и для одной из основных структурных частей клеточной стенки растений – первичной стенки. Бимодальный характер кривой распределения размеров микрофибрилл бактериальной целлюлозы показывает способность микрофибрилл к параллельной укладке. Учитывая статистически близкое распределение размеров микрофибрилл целлюлозы растительного и бактериального происхождения, а также аналогичное кристаллическое строение образцов, можно предположить наличие идентичных этапов биосинтеза слоя S₂ в растениях и бактериальной целлюлозе.

* Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» (Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова) при финансовой поддержке, полученной по конкурсу «Молодые ученые Поморья-2016» (проект № 05-2016-03а).

Для цитирования: Болотова К.С., Чухчин Д.Г., Майер Л.В., Гурьянова А.А. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы // Лесн. журн. 2016. № 6. С. 153–165. (Изв. высш. учеб. заведений). DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.153

Ключевые слова: микрофибрилла, бактериальная целлюлоза, *Acetobacter xylinum*, сканирующий электронный микроскоп, атомно-силовой микроскоп.

Введение

Формирование целлюлозного волокна древесины является одним из фундаментальных биологических процессов, представляющих существенный экономический и коммерческий интерес. В процессе формирования древесины большая часть глюкозы из углеводного обмена направлена на образование целлюлозы в структуре клеточной стенки [8].

Надмолекулярная структура относится к основным факторам, определяющим свойства полимеров. Целлюлоза в растительных клеточных стенках находится в виде фибрилл (нитевидных частиц), состоящих из микрофибрилл, которые представляют собой пачки молекул. Таким образом, микрофибриллы, являясь первичными элементами в надмолекулярной структуре целлюлозы, могут собираться в более крупные агрегаты – фибриллы (макрофибриллы), и распадаться на более тонкие элементы (элементарные фибриллы) [3].

Кроме растений, способность к образованию целлюлозы также обнаружена у простейших, животных (оболочники) и некоторых родов бактерий (*Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, цианобактерии и т. д.) [20]. Несмотря на интерес к процессу биосинтеза целлюлозы, остается актуальным вопрос о распределении размеров микрофибрилл, формируемых разными видами организмов.

Растения – основные источники целлюлозы. В структуре растительной целлюлозы, соответствующей полиморфной модификации целлюлозы I, глюкановые цепи формируют микрофибриллу размером в среднем около 3 нм (для большинства растений), но для ряда видов, в частности красных водорослей *Erythrocladia subintegra*, размер микрофибрилл может варьироваться от 10 до 68 нм [19].

Процесс биосинтеза катализируется целлюлозосинтазой, которая совместно с другими ферментами обеспечивает формирование гомополимеров β -1,4-глюкана в микрофибриллы из 36 глюкановых цепей. Синтез целлюлозы обеспечивается большим комплексом ферментов, ассоциированных с плазматической мембраной [10]. Размеры микрофибрилл в зависимости от вида организма могут варьировать от элементарной фибриллы из 36 цепей до очень крупных фибрилл целлюлозы водорослей, которые содержат более 200 цепей [18].

Фибриллы растительной целлюлозы – неотъемлемая часть комплекса полисахаридов клеточной стенки. Формирование клеточной стенки остается актуальной темой многих исследований в связи со сложностью такой надмолекулярной структуры. В ее состав входят полимеры, имеющие свои особенности строения и неравномерную локализацию. Синтез полимеров клеточной стенки локализован в нескольких компартментах клетки. При этом полисахариды не синтезируются в самой клеточной стенке. Ферменты синтеза целлю-

лозы встроены в плазмалемму. Матриксные полисахариды синтезируются в аппарате Гольджи, везикулы которого доставляют их к плазматической мембране, затем сливаются с ней, выбрасывая содержимое в апопласт [6].

Традиционным представлением о строении клеточной стенки растительной клетки является выделение двух основных структурных частей – первичной Р и вторичной S стенок. Первичная стенка – тонкий слой, состоящий из целлюлозы, гемицеллюлоз, пектиновых веществ, белков и лигнина, откладывающегося в период одревеснения. В период утолщения клеточной стенки образуется вторичная стенка, состоящая из трех слоев: наружного S₁, среднего S₂ и внутреннего S₃. Слой S₂, образующий основную часть клеточной стенки с наиболее высокой степенью ориентации, состоит из тонких ламелл. Микрофибриллы в этих ламеллах идут по крутым спиральям (право направленным) под углом к оси волокна [1].

Непосредственный предшественник биосинтеза целлюлозы – уридиндифосфоглюкоза, продукт метаболизма многих организмов, в том числе и растений. Метаболизм включает фосфорилирование глюкозы до глюкозы-6-фосфата, катализируемое глюкокиназой, с последующей изомеризацией промежуточного продукта до глюкозы-1-фосфата, катализируемой фосфоглюкомутазой, и конверсию метаболита до уридиндифосфоглюкозы соответствующей пиррофосфорилазой. Под действием целлюлозосинтазы уридиндифосфоглюкоза полимеризуется до целлюлозы [18]. Сходные клеточные механизмы биосинтеза целлюлозы отмечают у разных видов организмов.

Несмотря на широкое практическое применение растительной целлюлозы в хозяйственной деятельности человека, при изучении механизма биосинтеза целлюлозы часто используемым модельным организмом служат бактерии вида *Acetobacter xylinum*. Бактериальная целлюлоза является новым наноматериалом для изучения, который наравне с растительной целлюлозой нашел широкое применение в медицине, производстве косметики и пищевой промышленности. Ее получают в виде пленки, синтезируемой бактериями *A. xylinum*, которые производят внеклеточный материал (или пелликулу), включающий структурированные случайным образом целлюлозные пучки, состоящие из микрофибрилл. Полагают [15], что бактерии *A. xylinum* способны полимеризовать посредством целлюлозосинтазы – комплекса, расположенного в мембране клетки, до 200 тыс. молекул глюкозы в секунду. На поверхности клетки обнаружено порядка 50–80 таких сайтов биосинтеза. Выделение ферментов в среду приводит к образованию пучков глюкановых цепей длиной 1...9 мкм, которые объединяются по 10–15 цепей в фибриллы толщиной около 1,5 нм. Такие фибриллы затем собираются в микрофибриллы, которые агрегируют в пучки размером 50...80 нм. Пучки удлиняются при непосредственном контакте с клеточной оболочкой и остаются ассоциированными с клеткой при ее делении [18].

Новыми направлениями исследований в этой области можно считать получение новых данных по геномике и протеомике, позволивших значитель-

но обогатить понимание метаболизма клеточной стенки, а также биосинтез целлюлозы *in vitro*. На основании гомологии растительных и бактериальных консервативных мотивов в растениях были идентифицированы гены, кодирующие целлюлозосинтазу [17, 20]. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии и рентгеновского анализа исследован механизм образования целлюлозных микрофибрилл с использованием нерастворимых дисперсных ферментных препаратов, выделенных из клеток *A. xylinum*, и уридиндифосфоглюкозы в бесклеточной системе при отсутствии в среде «затравок» целлюлозы [12].

По мере разработки методических подходов особенности строения микрофибрилл рассматривались более детально. Однако длину цепочки целлюлозных микрофибрилл достаточно трудно измерить. Длина была определена путем взвешивания выделенных разными методами целлюлозных молекул и составила около 35...50 тыс. Å в зависимости от степени полимеризации. Результаты рентгеновского анализа показали, что в зависимости от образца размеры кристаллита составляют 20... 200 Å в ширину и 20...170 Å в толщину [3].

Несмотря на актуальность исследований в области химии и физиологии древесины, вопросы биосинтеза и формирования надмолекулярной структуры целлюлозы, в частности микрофибрилл, остаются дискуссионными.

Цель данной работы – сравнение микроморфологической структуры и получение статистически значимого распределения по размерам микрофибрилл растительной и бактериальной видов целлюлозы.

Объект и методы исследований

Исследования ультраструктуры клеточной стенки слоя S₂ проводили на образце древесины можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.f. *typica*), отобранного в Приморском районе Архангельской области. Образцы предварительно были подвергнуты автогидролизу путем кратковременного (3 мин) нагревания в воде до температуры 235 °С [9].

Снимки микрофибрилл целлюлозных образцов получали на сканирующем электронном микроскопе (SEM) Sigma VP ZEISS (ускоряющее напряжение 10 кВ, детектор InLens). Для повышения контрастности снимков на поверхность сколов древесины наносили золото-палладиевое покрытие, используя для этого устройство для напыления Q150TES (компания QUORUM).

Бактериальную целлюлозу получали, культивируя симбиоз бактерий рода *Acetobacter* и дрожжей на синтетической глюкозной среде в статических условиях при температуре 25 °С в течение 5 сут, микроскопирование снимков бактериальной целлюлозы проведено на SEM Sigma VP ZEISS и атомно-силовом микроскопе (АСМ) Multimod 8 Bruker без предварительной пробоподготовки образцов и отделения массы клеток.

Экспериментальная часть

Растительная клеточная стенка была первой субклеточной структурой, увиденной исследователями [6]. Только у растительных клеток матрикс, в который они погружены, высоко структурирован, его называют стенкой. Растительная клеточная стенка отличается разнообразием компонентов, у которых детерминированы детали строения и локализации.

Электронная микроскопия позволила выявить, что основным элементом надмолекулярной структуры целлюлозы является микрофибрилла. Целлюлозные микрофибриллы в клеточной стенке образуют каркас, заключенный в лигноуглеводной (лигнин-гемицеллюлозной) матрице.

Для получения максимально информативных снимков с наименьшей степенью деформации поперечных размеров микрофибрилл целесообразно проводить не срезание, а скалывание образца. В отличие от традиционно применяемого метода, когда нож микротомы деформирует микрофибриллы в плоскости среза, на сколе наблюдаются отдельные вытянутые фибриллы или их пучки. Основная масса микрофибрилл древесины «утоплена» в лигногемицеллюлозной матрице, что при традиционном методе пробоподготовки приводит к получению нечеткого изображения отдельных микрофибрилл (рис. 1, а).

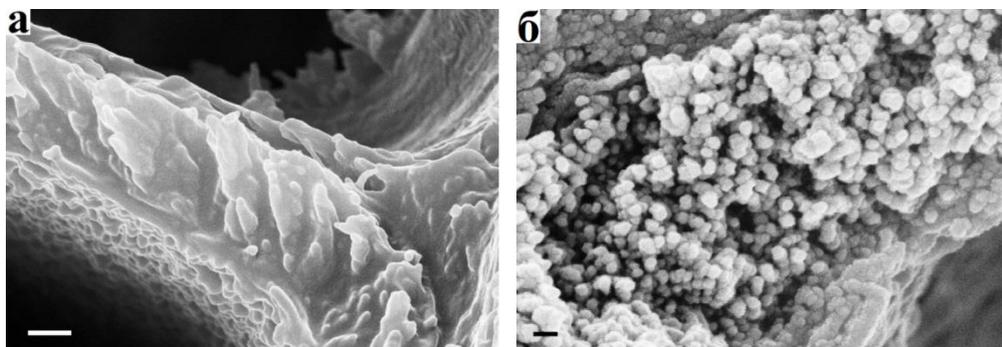


Рис. 1. Микрофибриллы целлюлозы на поперечном сколе клеточной стенки (слой S₂) древесины можжевельника до (а) и после (б) автогидролиза (масштабная линейка: а – 500 нм, б – 50 нм)

Для определения статистически значимого распределения размеров древесных микрофибрилл перспективным методом дальнейшего раскрытия структуры является гидролиз гемицеллюлоз. Кратковременный (3 мин) нагрев древесины в воде до температуры 235 °С [9] приводит к деструкции гемицеллюлоз по месту их нахождения в клеточной стенке и не осложняется топомическими факторами. В результате чего обеспечивается визуализация микрофибрилл на сколах клеточной стенки (рис. 1, б).

Слои клеточной стенки и отдельные ламеллы отличаются ориентацией целлюлозных микрофибрилл и хорошо различимы на микрофотографиях. У трахеид и волокон либриформа характер ориентации микрофибрилл примерно одинаков (рис. 2).

В соответствии с ранее полученными результатами [4] при исследовании надмолекулярной структуры древесины можжевельника на торцовом сколе показано (рис. 2, а), что ориентация микрофибрилл определяется слоем вторичной стенки, в которой они локализованы. Несмотря на различную ориентацию, поперечные размеры микрофибрилл во всех слоях вторичной стенки практически одинаковы.

Аналогичная ситуация отмечена и для лиственных пород дерева. На фотографии тангенциального скола древесины березы (рис. 2, б) изображен наружный слой S_1 , в котором наблюдается спиральная ориентация микрофибрилл. Угол наклона микрофибрилл к оси волокна составляет для волокон либриформа и трахеид $50...70^\circ$ [1].

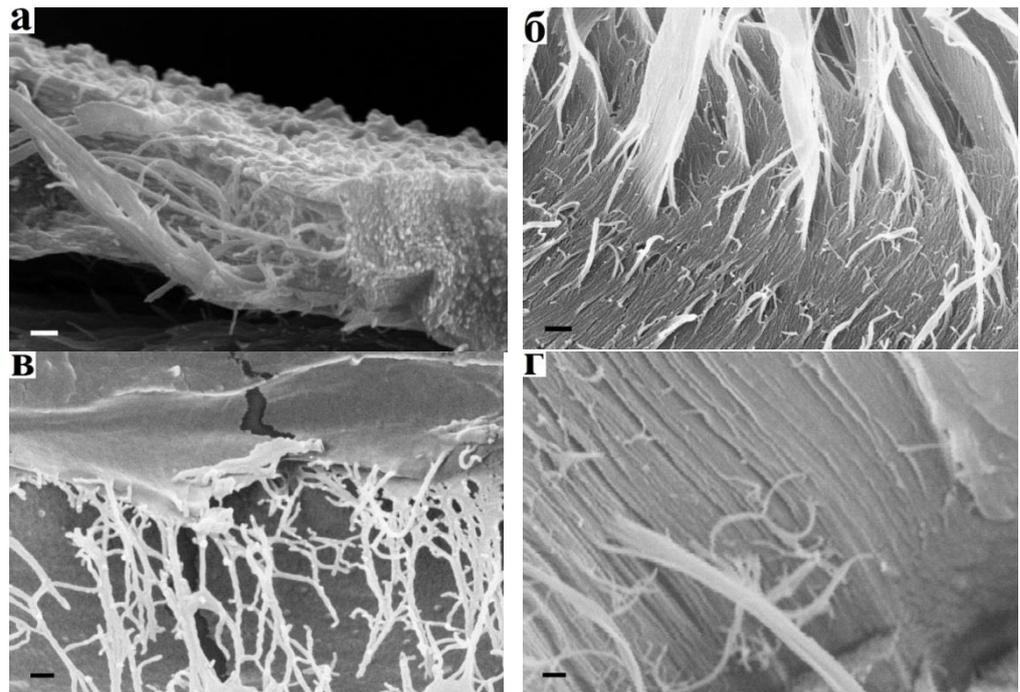


Рис. 2. Микрофибриллы целлюлозы растительного происхождения: а – скол клеточной стенки можжевельника; б – скол слоя S_1 клеточной стенки березы; в – микрофибриллы слоя Р клеточной стенки ели; г – скол слоя S_2 клеточной стенки соломы пшеницы (масштабная линейка: а, б, г – 200 нм, в – 100 нм)

В первичной стенке Р доля целлюлозы мала, и ее микрофибриллы образуют беспорядочную сетку. На радиальном сколе образца древесины ели (рис. 2, в) показаны микрофибриллы в местах образования пор (в первичной стенке Р) при формировании структуры волокна. Укладка микрофибрилл не имеет четкой ориентации, их поперечный размер составляет в среднем 30 нм. Существует мнение [14], что размеры микрофибрилл в первичной стенке растений несколько меньше, чем во вторичной, а результаты определения существенно зависят от вида организма и методики определения.

В сравнении с древесными породами травянистые однолетние растения (в качестве примера на микрофотографиях (рис. 2, г) показан слой S_2 на радиальном сколе в структуре соломы пшеницы), также имеют аналогичную локализацию слоев вторичной стенки, при которой внутренний слой S_2 отличается высокой степенью ориентации микрофибрилл. Поперечный размер микрофибрилл травянистых растений идентичен размеру микрофибрилл древесных пород.

В отличие от растительной бактериальная целлюлоза имеет уникальный механизм синтеза цепей с последующей самосборкой. Авторы [15, 16] отмечают, что отдельная клетка *A. xylinum* обеспечивает биосинтез целлюлозы за счет 50–80 сайтов терминального комплекса целлюлозосинтазы, расположенных в цитоплазматической мембране клетки. Такие структуры липополисахаридного слоя предположительно являются сайтами выделения целлюлозных полимеров из примерно 10–15 цепей, которые при ассоциации друг с другом формируют фибриллы толщиной 1,5 нм. Последующая агрегация приводит к образованию фибриллярной структуры толщиной примерно 50...80 нм, что в 200 раз тоньше хлопкового волокна.

Микроскопирование пленки, образовавшейся в 5-суточной культуре уксуснокислых бактерий *A. xylinum* в симбиотическом комплексе с дрожжевыми микроорганизмами, проведенное на электронном растровом микроскопе Zeiss SIGMA VP, показало наличие однородных микрофибрилл целлюлозы с клетками микроорганизмов. На микрофотографии (рис. 3, а и б) хорошо видна рыхлая сетчатая структура бактериальной целлюлозы, которую составляют микрофибриллы и бактериальные клетки-продуценты.

Биосинтез целлюлозы в бактериальных клетках протекает с участием ферментных систем, интегрированных в липопротеиновый слой цитоплазматической мембраны клетки. На снимке (рис. 3, в и г) показана поверхность слоя бактериальной целлюлозы, синтезируемой клеткой-продуцентом. В результате каталитического процесса, инициируемого интегральными белками-ферментами в мембране клетки, микрофибриллы синтезируются и формируют внеклеточную целлюлозную структуру.

С использованием полуавтоматического метода измерения, предоставляемого программой SmartTiff («Zeiss»), на снимках были определены поперечные размеры около 2 тыс. микрофибрилл слоя S_2 клеточной стенки древесины можжевельника обыкновенного и бактериальной целлюлозы [5].

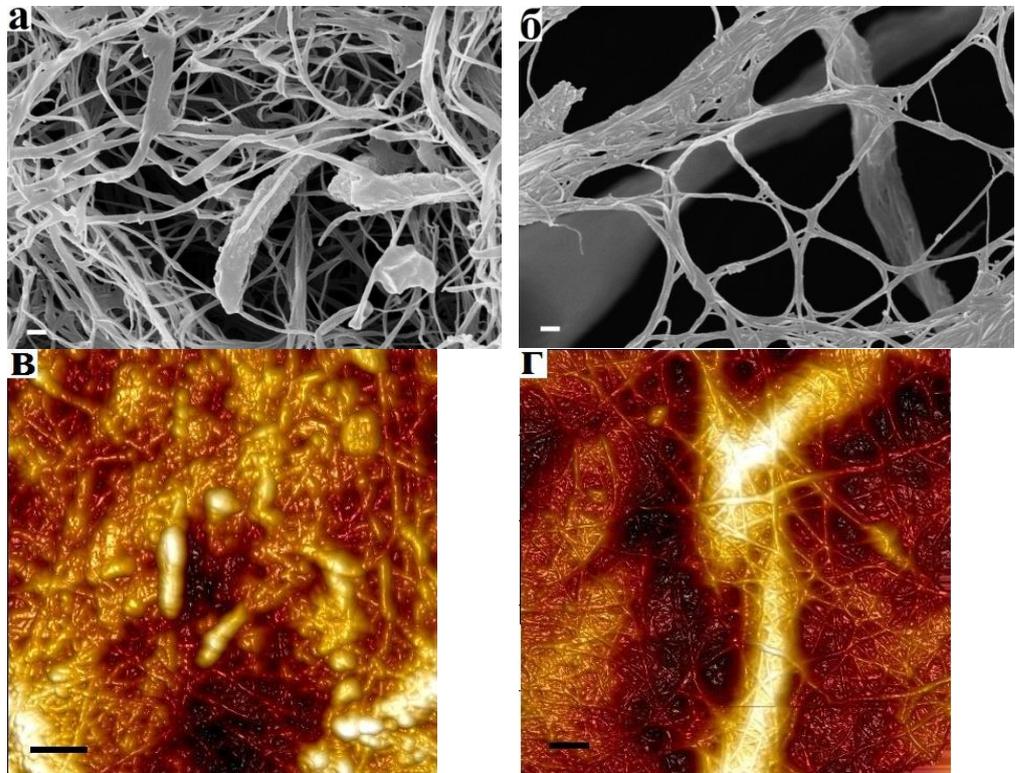


Рис. 3. Микрофибриллы бактериальной целлюлозы, полученные с помощью SEM Sigma VP ZEISS (а, б) и ACM Multimod 8 Bruker (в, г) (масштабная линейка: а, б – 200 нм; в, г – 2 мкм)

При построении гистограммы распределения микрофибрилл слоя S_2 древесины можжевельника обыкновенного обнаружено, что размер микрофибрилл варьирует от 10 до 63 нм, средний размер – 27 нм (рис. 4).

Исследование частоты встречаемости микрофибрилл бактериальной целлюлозы в исследуемом образце показало, что среднее значение их размера составляет 34 нм (рис. 4). Полученное значение близко к среднему размеру микрофибрилл 35...40 нм, установленному для бактериальной целлюлозы, синтезированной на гидролизатах растительного сырья [11].

В отличие от древесной, распределение микрофибрилл бактериальной целлюлозы имеет два пика на гистограмме в диапазонах 35...40 и 45...50 нм. Кривая целлюлозы распределения размеров микрофибрилл бактериальной целлюлозы носит бимодальный характер. Пик в диапазоне размеров 45...50 нм отвечает поперечным размерам «сдвоенных» микрофибрилл, которые были определены при статистическом анализе. Бимодальный характер кривой показывает способность микрофибрилл к параллельной укладке и парной самоорганизации.

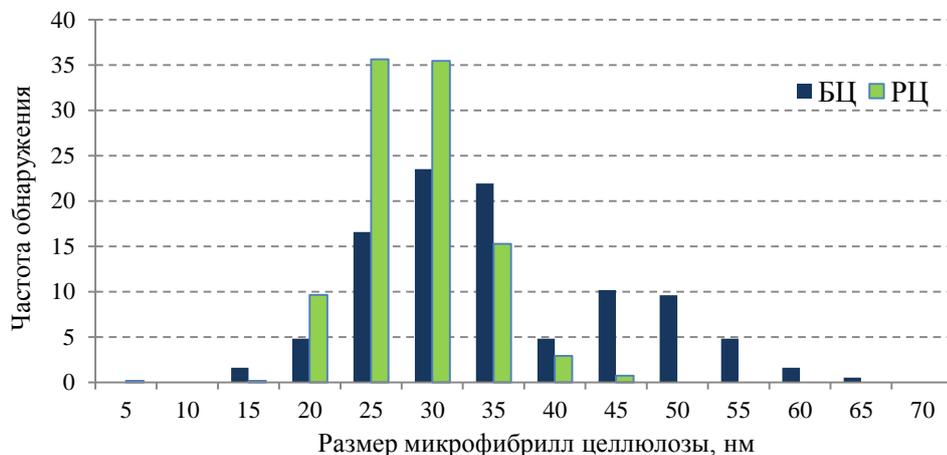


Рис. 4. Распределение по размеру микрофибрилл целлюлозы слоя S_2 древесины можжевельника обыкновенного (РЦ) и бактериальной целлюлозы (БЦ)

Учитывая статистически близкое распределение размеров микрофибрилл целлюлозы растительного и бактериального происхождения, а также аналогичное кристаллическое строение образцов [7, 13], можно предположить наличие идентичных этапов биосинтеза слоя S_2 в растениях и бактериальной целлюлозе.

Заключение

Ориентация целлюлозных микрофибрилл играет важную роль в определении формы и других морфологических особенностей растительных клеток. На ориентацию и укладку микрофибрилл растительных организмов существенное влияние оказывают такие факторы, как сложный компонентный состав клеточной стенки (наличие лигнина и гемицеллюлоз); наличие подвижных розетт, интегрированных в липопротеиновую мембрану и ферментативно регулирующих биосинтез целлюлозы; положение микротрубочек, так как большинство микротрубочек в кортикальном (околомембранном) слое цитоплазмы ориентировано подобно целлюлозным микрофибриллам [2, 6].

Поперечные размеры микрофибрилл древесных растений не зависят от слоя клеточной стенки, в котором они локализованы, и практически одинаковы. Травянистые однолетние растения имеют аналогичную локализацию слоев вторичной стенки, поперечный размер их микрофибрилл идентичен размеру микрофибрилл древесных пород. Размер микрофибрилл целлюлозы растительного происхождения, измеренный для слоя S_2 древесины можжевельника, варьирует от 10 до 63 нм при среднем значении 27 нм.

Бактериальные клетки при глубинном способе культивирования также синтезируют целлюлозу в виде микрофибрилл, однако в этом случае структурирования целлюлозной матрицы и параллельной укладки микрофибрилл не

происходит. Отсутствие пространственных ограничений для передвижения бактериальной клетки-продуцента в объеме культуральной среды приводит к формированию сетчатой целлюлозной матрицы, у которой отсутствует строгая ориентация элементов надмолекулярной структуры, что характерно и для слоя Р клеточной стенки растений. Микрофибриллы располагаются хаотично и выполняют защитные функции по отношению к клеткам. Поперечный размер микрофибрилл бактериальной целлюлозы в среднем составляет 34 нм. Бимодальный характер кривой распределения размеров микрофибрилл бактериальной целлюлозы показывает способность микрофибрилл к параллельной укладке, при этом наиболее распространенным случаем такой ориентации является образование «сдвоенных» микрофибрилл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азаров В.И., Буров А.В., Оболенская А.В. Химия древесины и синтетических полимеров. СПб.: СПбЛТА, 1999. 628 с.
2. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: в 3 т. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Мир, 1994. Т. 3. 504 с.
3. Алешина Л.А., Глазкова С.В., Луговская Л.А., Подойникова М.В., Фофанов А.Д., Силина Е.В. Современные представления о строении целлюлоз (обзор) // Химия растит. сырья. 2001. № 1. С. 5–36.
4. Боголицын К.Г., Чухчин Д.Г., Зубов И.Н., Гусакова М.А. Ультрамикростроение и надмолекулярная структура древесной матрицы // Химия растит. сырья. 2012. № 3. С. 37–44.
5. Болотова К.С., Чухчин Д.Г., Манахова С.В., Майер Л.В., Виноградова В.Р. Сравнительная характеристика распределения размера микрофибрилл растительной и бактериальной целлюлозы // Физикохимия растительных полимеров: материалы VI Междунар. конф., Архангельск, 2-3 июня 2015 г. Архангельск: САФУ, 2015. С. 55–58.
6. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 426 с.
7. Малков А.В., Чухчин Д.Г., Болотова К.С., Тышкунова И.В., Новожилев Е.В. Новый подход к дифрактометрическому определению степени кристалличности целлюлозы // Физикохимия растит. полимеров: материалы VI Междунар. конф., Архангельск, 2-3 июня 2015 г. Архангельск: САФУ, 2015. С. 201–205.
8. Роговин З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972. 520 с.
9. Чухчин Д.Г., Майер Л.В., Манахова С.В., Иванченко Н.Л. Оценка поперечных размеров микрофибрилл целлюлозы в слое S₂ клеточной стенки древесины // Биотехнологии в химико-лесном комплексе: тез. докл. Междунар. науч. конф., Архангельск, 11-12 сент. 2014 г. Архангельск: САФУ, 2014. С. 321–324.
10. Savka A., Guo X., Tang S.-J., Winstrand S., Jonsson L.J., Hong F. Production of Bacterial Cellulose and Enzyme from Waste Fiber Sludge. *Biotechnol. Biofuels*, 2013, vol. 6, no. 25, pp. 1–10.
11. Colvin J.R. The Mechanism of Formation of Cellulose-Like Microfibrils in a Cell-Free System from *Acetobacter xylinum*. *Planta*, 1980, vol. 149, no. 2, pp. 97–107.
12. Evert R.F. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. USA, NJ, Hoboken, 2006. 601 p.

13. Hafren J., Fujino T., Itoh T. Changes in Cell Wall Architecture of Differentiating Tracheids of *Pinus thunbergii* during Lignification. *Plant Cell Physiol.*, 1999, vol. 40, no. 5, pp. 532–541.

14. Huang Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C., Sun D. Recent Advances in Bacterial Cellulose. *Cellulose*, 2014, no. 21, pp. 1–30.

15. Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. *Macromol. Biosci.*, 2014, no. 14, pp. 10–32.

16. Malcolm R., Brown Jr., Saxena I.M. *Cellulose: Molecular and Structural Biology. Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose*. Netherlands, 2007. 379 p.

17. Pear J.R., Kawagoe Y., Schreckengost W.E., Delmer D.P., Stalker D.M. Higher Plants Contain Homologs of the Bacterial CelA Genes Encoding the Catalytic Subunit of Cellulose Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, no. 93, pp. 12637–12642.

18. Pokalwar S.U., Mishra M.K., Manwar A.V. Production of Cellulose by *Gluconacetobacter Sp.* *Recent Research in Science and Technology*, 2010, no. 2(7), pp. 14–19.

19. Saxena I.M., Brown R.M. Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. *Ann. Bot.*, 2005, no. 96, pp. 9–21.

20. Römling U. Molecular Biology of Cellulose Production in Bacteria. *Research in Microbiology*, 2002, no. 153, pp. 205–212.

Поступила 07.07.16

UDC 539.25 + 547.992.3

DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.153

Morphological Features of the Fibrillar Structure of Plant and Bacterial Cellulose

K.S. Bolotova, Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor

D.G. Chukhchin, Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor

L.V. Mayer, Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor

A.A. Gur'yanova, Master

Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Naberezhnaya

Severnoy Dviny, 17, Arkhangelsk, 163002, Russian Federation,

e-mail: k.bolotova@narfu.ru

The authors made a comparison of the micromorphological structure and obtained a statistically significant size distribution of plant and bacterial cellulose microfibrils. Morphological features of the microfibrils structure were studied using a SEM Sigma VP ZEISS scanning electron microscope and an ACM Multimod 8 Bruker atomic-force microscope. The image informativity of the least degree of the microfibrils deformation was achieved by cleaving of the timber sample, which detected the individual fibrils or their bundles. We applied the hemicellulose hydrolysis by briefly heating the wood in the water up to temperature

For citation: Bolotova K.S., Chukhchin D.G., Mayer L.V., Gur'yanova A.A. Morphological Features of the Fibrillar Structure of Plant and Bacterial Cellulose, *Lesnoy zhurnal*, 2016, no. 6, pp. 153–165. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.153

of 235 °C to disclose the ligno-hemicellulosic matrix, distorting the image of wood microfibrils in the pictures. Bacterial cellulose images were obtained without a prior sample preparation. The cross-sectional dimensions of microfibrils did not depend on the cell wall layer, where they were localized, and were virtually the same for woody and herbaceous annual plants (with a mean of 27 nm for juniper). The cross-sectional size of microfibrils of bacterial cellulose was 34 nm at an average without a strict orientation of elements of the supra-molecular structure. It was also typical for one of the main structural parts of the plant cell wall – a primary wall. The bimodal nature of the size distribution curve of bacterial cellulose microfibrils demonstrated the microfibrils ability to the parallel placing. Taking into consideration the statistically close size distribution of cellulose microfibrils of plant and bacterial origin, and a similar crystal structure of the samples, we can assume the presence of identical stages of biosynthesis of the S₂ layer in plants and bacterial cellulose.

Keywords: microfibril, bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, scanning electron microscope, atomic-force microscope.

REFERENCES

1. Azarov V.I., Burov A.V., Obolenskaya A.V. *Khimiya drevesiny i sinteticheskikh polimerov* [Chemistry of Wood and Synthetic Polymers]. St. Petersburg, 1999. 628 p.
2. Aleshina L.A., Glazkova S.V., Lugovskaya L.A., Podoynikova M.V., Fofanov A.D., Silina E.V. Sovremennye predstavleniya o stroenii tsellyuloz (obzor) [Current Ideas about the Cellulose Structure]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of Plant Raw Material], 2001, no. 1, pp. 5–36.
3. Bogolitsyn K.G., Chukhchin D.G., Zubov I.N., Gusakova M.A. Ul'tramikrostroenie i nadmolekulyarnaya struktura drevesnoy matritsy [Ultra-Microstructure and Submolecular Structure of the Wood Matrix]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of Plant Raw Material], 2012, no. 3, pp. 37–44.
4. Bolotova K.S., Chukhchin D.G., Manakhova S.V., Mayer L.V., Vinogradova V.R. Sravnitel'naya kharakteristika raspredeleniya razmera mikro fibrill rastitel'noy i bakterial'noy tsellyulozy [Comparative Characteristics of the Microfibrils Size Distribution of Plant and Bacterial Cellulose]. *Fizikokhimiya rastitel'nykh polimerov: materialy VI Mezhdunar. konf., Arkhangel'sk, 2-3 iyunya 2015 g.* [Physical Chemistry of Plant Polymers: Proc. 6th Intern. Conf. Arkhangelsk, 2-3 June, 2015]. Arkhangelsk, 2015, pp. 55–58.
5. Gorshkova T.A. *Rastitel'naya kletochnaya stenka kak dinamichnaya sistema* [The Plant Cell Wall as a Dynamic System]. Moscow, 2007. 426 p.
6. Malkov A.V., Chukhchin D.G., Bolotova K.S., Tyshkunova I.V., Novozhilov E.V. Novyy podkhod k difraktometricheskomu opredeleniyu stepeni kristallichnosti tsellyulozy [New Approach to the Diffractometric Cellulose Crystallinity Determination]. *Fizikokhimiya rastitel'nykh polimerov: materialy VI Mezhdunar. konf., Arkhangel'sk, 2-3 iyunya 2015 g.* [Physical Chemistry of Plant Polymers: Proc. 6th Intern. Conf. Arkhangelsk, 2-3 June, 2015]. Arkhangelsk, 2015, pp. 201–205.
7. Rogovin Z.A. *Khimiya tsellyulozy* [Cellulose Chemistry]. Moscow, 1972. 520 p.
8. Chukhchin D.G., Mayer L.V., Manakhova S.V., Ivanchenko N.L. Otsenka poperechnykh razmerov mikro fibrill tsellyulozy v sloe S₂ kletochnoy stenki drevesiny [Estimation of the Cross-Sectional Dimensions of Cellulose Microfibrils in the S₂ Cell Wall Layer of Wood]. *Biotekhnologii v khimiko-lesnom komplekse: tez. dokl. Mezhdunar. nauch. konf., Arkhangel'sk, 11-12 sent. 2014 g.* [Biotecnologies in Chemical and Timber Complex:

Proc. Int. Sci. Conf. Arkhangelsk, 11-12 September, 2014]. Arkhangelsk, 2014, pp. 321–324.

9. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*. New York, 1986, vol. 3. 311 p.

10. Cavka A., Guo X., Tang S.-J., Winestrand S., Jonsson L.J., Hong F. Production of Bacterial Cellulose and Enzyme from Waste Fiber Sludge. *Biotechnol. Biofuels*, 2013, vol. 6, no. 25, pp. 1–10.

11. Colvin J.R. The Mechanism of Formation of Cellulose-Like Microfibrils in a Cell-Free System from *Acetobacter xylinum*. *Planta*, 1980, vol. 149, no. 2, pp. 97–107.

12. Evert R.F. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. USA, NJ, Hoboken, 2006. 601 p.

13. Hafren J., Fujino T., Itoh T. Changes in Cell Wall Architecture of Differentiating Tracheids of *Pinus thunbergii* during Lignification. *Plant Cell Physiol.*, 1999, vol. 40, no. 5, pp. 532–541.

14. Huang Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C., Sun D. Recent Advances in Bacterial Cellulose. *Cellulose*, 2014, no. 21, pp. 1–30.

15. Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. *Macromol. Biosci.*, 2014, no. 14, pp.10–32.

16. Malcolm R., Brown Jr., Saxena I.M. *Cellulose: Molecular and Structural Biology. Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose*. Netherlands, 2007. 379 p.

17. Pear J.R., Kawagoe Y., Schreckengost W.E., Delmer D.P., Stalker D.M. Higher Plants Contain Homologs of the Bacterial CelA Genes Encoding the Catalytic Subunit of Cellulose Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, no. 93, pp. 12637–12642.

18. Pokalwar S.U., Mishra M.K., Manwar A.V. Production of Cellulose by *Gluconacetobacter Sp.* *Recent Research in Science and Technology*, 2010, no. 2(7), pp. 14–19.

19. Saxena I.M., Brown R.M. Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. *Ann. Bot.*, 2005, no. 96, pp. 9–21.

20. Römling U. Molecular Biology of Cellulose Production in Bacteria. *Research in Microbiology*, 2002, no. 153, pp. 205–212.

Received on July 07, 2016