

UNIVERZITET U BEOGRADU
Fakultet za Fizičku hemiju

mr. Daniela Đikanović Golubović

STRUKTURNA ISPITIVANJA
ĆELIJSKOG ZIDA I LIGNINA
RAZLIČITOG POREKLA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
Faculty of Physical Chemistry

mr. Daniela Đikanović Golubović

**STRUCTURAL INVESTIGATION OF
PLANT CELL WALLS AND LIGNINS OF
DIFFERENT ORIGIN**

PhD thesis

Belgrade, 2013.

MENTORI

dr Goran Bačić, profesor,
Fakultet za fizičku hemiju

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik,
Institut za Multidisciplinarna Istraživanja

dr Jasmina Dimitrić-Marković, vanredni profesor
Fakultet za fizičku hemiju

ČLANOVI KOMISIJE

dr. Miloš Mojović, docent
Fakultet za fizičku hemiju

dr. Aleksandra Mitrović, viši naučni saradnik
Institut za Multidisciplinarna Istraživanja

Datum odbrane:

Ovaj rad je u najvećem delu odraden u laboratoriji za Biofiziku Instituta za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu.

Ovom prilikom bih želela da se najiskrenije zahvalim svojim mentorima prof. dr. Goranu Bačiću, dr. Kseniji Radotić-Hadžimanić i dr. Jasmini Dimitrić-Marković, koji su mi bili uzor, inspiracija i velika podrška u izradi ove teze.

Zahvaljujem se dr Rodger Leblanc-u i dr. Lloyd Donaldson-u na divnoj saradnji i ukazanom poverenju.

Zahvaljujem se dr. Aleksandru Kalauziu koji je vodio matematičku obradu podataka u ovoj tezi.

Zahvaljujem se kolegama sa Odseka za inženjering materijala, Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i kolegama iz Instituta Vinča, dr Aleksandru Devečerskom i prof. Branku Matoviću koji su mi pomogli u eksperimentalnom delu ovog rada.

Zahvaljujem se prof. Miloradu Jeremiću na idejama, savetima i podršci u mom dosadašnjem radu.

Zahvaljujem se svim svojim kolegama sa odseka za Biofiziku živih sistema na razumevanju i podršci.

Zahvaljujem se koleginicama dr. Aleksandri Mitrović i dr. Jeleni Bogdanović-Pristov na svim stručnim savetima i iskrenoj prijateljskoj podršci.

Posebno se zahvaljujem mojim najdražima Saši, Veljku i suprugu Vladi na razumevanju, podršci, strpljenju i bezgraničnoj ljubavi.

Mojim divnim roditeljima, zahvalna sam na svemu što su me naučili, na svemu u čemu su me podržali i na ljubavi koju su mi pružili i zbog toga im posvećujem ovaj rad.

Naslov doktorske disertacije:

STRUKTURNA ISPITIVANJA ĆELIJSKOG ZIDA I LIGNINA RAZLIČITOG POREKLA

REZIME

Ćelijski zid biljaka uglavnom se opisuje kao kompozitni materijal koji predstavlja finu mešavinu polisaharida, glikoproteina i polifenola, organizovanih oko kristalnih i amorfnih regiona celulozne mreže, koji se deponuje nakon prestanka širenja primarnog zida. Lignocelulozni sekundarni zid obezbeđuje strukturnu podršku i prolaz vode u biljkama i zadužen je za mehaničke osobine biljke u celini. Struktura i građa ćelijskog zida posledica su kontrolisanog sinergističkog i prostorno-vremenskog međusobnog delovanja biomakromoleka pri čemu se formira takva složena supramolekularna struktura čije su osobine jedinstvene. Još nije dovoljno poznata ni lokalizacija ni funkcija svake ponaosob komponente ćelijskog zida. Samim tim, opisivanje strukture ćelijskog zida postaje složeno jer njegova struktura zavisi od tipa ćelije, sa specifičnim osobinama adaptiranim za odgovarajuću funkciju u zidu.

U ovom radu ispitivali smo uticaja lignin monomera (koniferil alkohola, *p*-kumarične kiseline i ferulične kiseline) i uticaj njihovog masenog odnosa na strukturu i funkciju lignin model polimera na sam ćelijski zid. Na osnovu razlaganja fluorescentnih spektara pomeranje spektra u nisko energetska oblast ukazuje na produženje π -konjugovanih lanaca u strukturi lignina. Ovi rezultati doprinose boljem razumevanju uticaja strukturnih varijacija u lignin polimeru na plastičnost celog ćelijskog zida i modifikacije ligninske strukture unutar zida izazvane dodatnim stresom.

Na osnovu poređenja strukturnih karakteristika ćelijskog zida mekog drvata Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně, Gymnospermae, drvenasta četinarska vrsta), tvrdog drveta javora (*Acer platanoides* L., Angiospermae, Dicotyledones, drvenasta listopadna vrsta), i kukuruza (*Zea Mays* L., Angiospermae, Monocotyledones, žitarica iz familije trava), jasno se vidi prostija struktura ćelijskog zida kukuruza. Struktura ćelijskog zida kukuruza u sebi sadrži manji procenat celuloze i lignina a veći sadržaj

hemiceluloza u odnosu na obe drvenaste vrste. Zbog ovakve strukture veći je i stepen kristaličnosti u kukuruzu za razliku od drvenastih vrsta kod kojih je ustaljen i iznosi 42 %. Vidi se jasna razlika u građi ligninskog molekula a samim tim i celog ćelijskog zida u različitim biljnim vrstama. Kovalentne i fizičke interakcije hemiceluloza sa celulozom i ligninskim molekulom, diriguju različitu strukturu i građu ćelijskih zidova u različitim biljnim vrstama.

Na osnovu odgovarajućeg matematičkog modela primenjenog za obradu mikroskopskih slika, pronađeno je da u biljkama koje su izložene mehaničkom stresu, postoji porast u količini *p*-kumaričnih jedinica što povećava mehaničku krutost u biljkama, preko paralelnog pakovanja dugačkih lanaca naizmeničnih C-C i C=C veza, što je u saglasnosti sa ispitivanim lignin model polimerima. Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da fluorescenciju zajedno sa odgovarajućim matematičkim modelom možemo koristiti kao metodu za merenje jačine kompresije u drvetu.

Kvantne tačke(QDs) su poluprovodne nanočestice koje se široko preimenjuju u biologiji kao fluorescentni obeleživači. Dobijeni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da se CdSe QDs vezuju primarno za celulozu i lignin u ćelijskom zidu *P. omorika*. QDs se vezuju za lignin uglavnom preko interakcije sa C-C i C=C razgranatim lancima. Interakcija QDs sa celulozom ostvaruje se preko OH grupa. Strukturna preraspodela u ćelijskom zidu kao posledica interakcije sa QDs značajno zavisi od prisustva vode u ćelijskom zidu. Prikazani rezultati takođe pokazuju da su QDs pogodne za homogeno obeležavanje celog ćelijskog zida. Ovo je posledica aranžiranja molekula u samom ćelijskom zidu i ekstremno male veličine QDs čestica. Ova osobina omogućava prodiranje ovih nanočestica unutar polimerne kompozitne strukture ćelijskog zida.

Ćelijski zidovi predstavljaju bogat izvor hrane, vlakana i daju spektar različitih biomaterijala. Poslednjih godina, najznačajnija uloga ćelijskog zida i najvažnija oblast njegovog istraživanja je njegova primena kao potencijalnog izvora bioenergije. U ovim istraživanjima objedinjeni su različiti aspekti ispitivanja njegove strukture kako bi se doprinelo fundamentalnim istraživanjima u ovoj oblasti biologije i kako bi se razjasnile njegove fizičke i mehaničke osobine u cilju njegove veće eksploatacije u drvnoj industriji i primeni za biogoriva.

Ključne reči: ćelijski zid, lignin, celuloza, lignin model jedinjenja, meko drvo, tvrdo drvo, monokotile, jačina kompresije, kvantne tačke

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Biofizika živih sistema, Fluorescentne tehnike

Title:

**STRUCTURAL INVESTIGATION OF PLANT CELL WALL
AND LIGNINS OF DIFFERENT ORIGIN
ABSTRACT**

Plant cell wall is mainly described as a composite material that is a fine mixture of polysaccharides, glycoproteins and polyphenols, organized around the crystalline and amorphous regions of a cellulose network, which is deposited after the spread of the primary wall. Lignocellulose secondary wall provides structural support and the passage of water in plants and is responsible for the mechanical properties of the plant as a whole. The structure and composition of the cell wall are due to the controlled synergistic and spatio-temporal interactions of biomacromolecules, whereby a complex supramolecular structure with unique features is formed. Location and function of the each individual cell wall component are still not well known. Therefore, describing the structure of a cell wall becomes complex, as it depends on the cell type with specific characteristics adapted to a corresponding function in the wall.

The object of this study was to investigate the influence of lignin monomers (coniferyl alcohol, *p*-coumaric acid and ferulic acid) and the impact of their mass ratio on the structure and function of lignin model polymers in the cell wall. Based on the deconvolution of fluorescence spectra, the low energy shift in the spectrum indicates the extension of the π -conjugated chains in lignin structure. These results contribute to a better understanding of the influence of structural variation in the lignin polymer on plasticity of the cell wall and modification of lignin structure inside the wall caused by additional stress.

Based on the comparisons of cell wall structural features of softwood (*Picea omorika* (Pančić) purkinye, hardwood (*Acer platanoides* L.), and maize (*Zea mays* L.), it has been clearly shown that maize cell wall is of a simpler structure. Maize cell wall contains smaller percentage of cellulose and lignin and a higher content of hemicellulose than the other two species. Due to this structure, the degree of crystallinity of maize cell wall is higher, as opposed to wood species where this degree is constant and equals 42%.

There is a clear difference in lignin molecular structure, and therefore in the structure of the entire cell wall between different plants. The covalent and physical interactions of hemicelluloses with cellulose and lignin molecule, orchestrate the difference in architecture of cell wall in different plant species.

It was found that in plants exposed to mechanical stress, there is a raise in the amount of *p*-coumaric units, which increases the mechanical rigidity in plants, due to parallel packing of the long chains of alternating C = C bonds, which is consistent with the tested lignin polymer model. Based on these results we can see that the fluorescence spectroscopy together with appropriate mathematical model can be used to measure the compression severity of wood.

Quantum dots (QDs) are semiconducting nanoparticles that are already widely used in biology as fluorescent markers. The results obtained in this study show that the CdSe QDs bind primarily to cellulose and lignin in the cell wall of *P. spruce*. QDs bind with lignin mainly through interaction with the C-C and C = C branched chains. The interaction of QDs with cellulose is accomplished through OH groups. Structural redistribution in the cell wall, as a result of interaction with QDs, is significantly dependent on the presence of water in the cell wall. The presented results also show that the QDs are suitable for homogeneous labeling of the entire cell wall. This is due to the arrangement of molecules within the cell wall and the extremely small size of the QDs particles. This feature allows the penetration of these nanoparticles into the polymer composite structure of the cell wall.

The cell walls are a rich source of food, fiber, and provide a spectrum of different biomaterials. In recent years, the most important role of the cell wall, and the most important area of research is its application as a potential source of bioenergy. In this study, different aspects of investigation are combined in order to contribute to fundamental research in the field of biology and to clarify its physical and mechanical properties to its greater exploitation in the timber industry and its use for biofuels.

Keywords: cell wall, lignin, cellulose, lignin model compound, softwood, hardwood, compression, monocotile, compression severity, quantum dots

Scientific Field: Physical Chemistry

Field of Academic Expertise: Biophysic of living system, Fluorescence techniques

SKRAĆENICE

AFM – Metode mikroskopije atomskom silom

APD – Približna verovatnoća gustine raspodele

BK – Blago izraženo kompresiono drvo

CF – Lignin model polimer sintetisan iz koniferil alkohola i ferulične kiseline

CP – Lignin model polimer sintetisan iz koniferil alkohola i *p*-kumarične kiseline

DHP – Dehidrogenativni polimer, lignin model polimer sintetisan iz čistog koniferil alkohola

EFM – Mikroskopija elektrostatičkom silom

ESEM – Skenirajuća elektronska mikroskopija u uslovima sredine

FAA – Formalin-aceto alkohol

FEMO – Metoda Slobodno- elektronskih Molekulskih Orbitala

FRET – Slobodan elektronski prenos

FT-IR – Infracrvena apsorpciona spektroskopija sa Fourierovom transformacijom

GAK – Galaktoarabinoksilan

G-lignin – Ligninski molekul koji se sastoji iz gvajacil monomera

GS-lignin – Ligninski molekul koji se sastoji iz gvajacil i siringil monomera

GSH-lignin – Lignin koji se sastoji iz gvajacil, siringil i hidroksifenil monomera

GPC – Gel permeaciona hromatografija

HRP – Peroksidaza dobijena iz rena

JK – Jako izraženo kompresiono drvo

LUK – Lignin-ugljenohidratni kompleks

MFA – Mikrofibrilarni ugao

NMR– Nuklearna magnetna rezonancija

NSOM – Metode skenirajuće optičke mikroskopija bliskim poljem

TEM – Transmisionu elektronsku mikroskopiju

PZ – Primarni ćelijski zid

QDs – Kvantne tačke (quantum dots)

RSA – Rendgenska strukturna analiza

SL – Srednja lamela

STEM - Skenirajuća transmisiona elektronska mikroskopija

SZ - Sekundarni ćelijski zid

TEM - Transmisiona Elektronska Mikroskopija

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1. ĆELIJSKI ZID	3
1.2. HIJERARHIJSKA STRUKTURA BILJNOG ĆELIJSKOG ZIDA	3
1.3. HEMIJSKA GRAĐA ĆELIJSKOG ZIDA	5
1.3.1. Celuloza	6
1.3.2. Hemiceluloze	10
1.3.3. Pektini	12
1.3.4. Proteini	14
1.3.5. Lignin	15
Struktura lignina	17
DHP- lignin model polimer	17
1.3.6. Voda	19
1.4. INTERAKCIJE MEĐU MOLEKULIMA ĆELIJSKOG ZIDA	20
1.4.1. Interakcije između celuloznih vlakana i hemiceluloze	20
1.4.2. Interakcija između lignina i polisaharida	22
Interagujuće sile	22
Adsorpcioni procesi	24
Formiranje lignin-ugljenohidratnog kompleksa - LUK	25
1.4.3. Kovalentna glikozidna veza među pektinskim polisaharidima	27
1.5.1. STRUKTURA ĆELIJSKIH ZIDOVA KOD DRVENASTIH VRSTA BILJAKA	27
1.5.1. Tvrdo i meko drvo	27
Hemiceluloze mekog drveta	29
Hemiceluloze tvrdog drveta	30
Lignin u tvrdom i mekom drvetu	30

1.5.2. Kompresiono drvo	31
Lignin u kompresionom drvetu	33
Polisaharidi u kompresionom drvetu	34
1.6. STRUKTURA ĆELIJSKOG ZIDA KUKURUZA	35
1.7. KVANTNE TAČKE I NJIHOVA PRIMENA U BIOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA	36
2. CILJ RADA	38
3. MATERIJALI I METODE	39
Biljni materijal	39
Sinteza lignin model jedinjenja	39
Izolacija ćelijskog zida	40
Priprema biljnog materijala za mikroskopiju	40
Pripremanje uzoraka holoceluloze (dobijanje celuloze bez lignina)	41
Sinteza CdSe kvantnih tačaka	41
Vezivanje QDs za ćelijski zid	42
Fluorescentna spektroskopija	42
Procedura merenja emisionih spektara i matematička obrada podataka	46
Fluorescentna mikroskopija	47
Konfokalna mikroskopija	47
Dobijanje spektralnih slika i podataka	48
Razlaganje spektralnih podataka dobijenih konfokalnom mikroskopijom	49
Rentgenostruktorna analiza	49
Izračunavanje kristaličnosti	50
FT-IR spektroskopija	52
FT-IR intenzitet i izračunavanje koncentracija komponenti	53
Gel propustljiva hromatografija	54

4. REZULTATI I DISKUSIJA	56
4.1. STRUKTURNE RAZLIKE IZMEĐU RAZLIČITIH LIGNIN MODEL POLIMERA	56
REZULTATI	56
DISKUSIJA	63
4.2. POREĐENJE STRUKTURNIH OSOBINA ĆELIJSKIH ZIDOVA RAZLIČITOG POREKLA	68
REZULTATI	68
DISKUSIJA	80
4.3. KVANTIFIKACIJA JAČINE KOMPRESIJE KOD BORA (<i>Pinus radiata</i>)	85
REZULTATI	85
DISKUSIJA	98
4.4. PRIMENA CdSe KVANTNIH TAČAKA U ISPITIVANJU ĆELIJSKOG ZIDA	103
REZULTATI	103
DISKUSIJA	111
5. ZAKLJUČAK	117
6. LITERATURA	120
BIOGRAFIJA	
BIBLIOGRAFIJA	

Prilog 1. Izjava o autorstvu

**Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Prilog 3. Izjava o korišćenju

1. UVOD

Na zemlji je zastupljeno nekoliko stotina hiljada biljnih vrsta koje pokazuju značajnu razliku u obiku, staništu i sposobnosti da se fiziološki adaptiraju. Zajedničko za sve njih je da imaju ćelijske zidove bogate ugljenim hidratima koji mogu da omoguće potporu, deluju kao barijera za odbranu biljke, provodnici su informacija i takođe predstavljaju izvor signalnih molekula (Bačić et al. 1988, O'Neill et al. 1990, Carpita and Gibeaut 1993, Ridley et al. 2001).

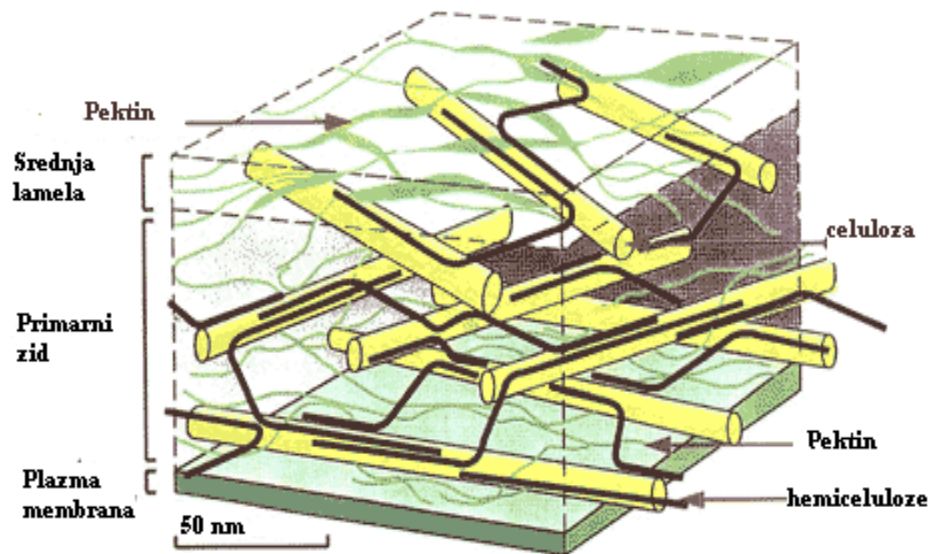
Spoljašnja sredina u kojoj biljke žive može biti vrlo raznolikog i promenljivog sastava. Radi nesmetanog obavljanja ćelijskih funkcija za biljku je, kao i za sva druga živa bića, od najvećeg značaja održavanje stabilne sredine unutar ćelija, ali i komunikacija sa spoljašnjom sredinom.

Opšte je poznato da naseljavanje zemlje biljnim vrstama, njihovo širenje i menjanje, predstavljaju važne etape u razvoju života na zemlji a samim tim može se slobodno tvrditi da je ćelijski zid imao važnu funkciju u ovom procesu (Kenrick and Crane, 1997, Karol et al. 2001, McCourt et al. 2004). Ćelijski zidovi definišu osobine biljaka i čine veliki deo mase biljnog tela. Veliki udeo proizvoda fotosinteze kanalsan je na izgradnju ćelijskog zida a u mnogim vrstama je u njegovu biosintezu uključen veliki broj gena (Reiter 2002, Scheible and Pauly 2004, Pauly and Keegstra 2008). Značaj ćelijskog zida može se videti kroz njegovu evoluciju (Pilling and Hofte 2003).

Struktura ćelijskog zida se može predstaviti kao izuzetno kompleksan kompozitni materijal. On predstavlja heterogeni prirodni polimer izgrađen od celuloze, lignina i hemiceluloza (Fengel and Wagner 1984). Njegova specifična forma i funkcija i interakcija sa okolinom dirigovane su različitim hemijskim sastavom i interakcijama između polimera koji ulaze u njegov sastav. Najznačajnije osobine koje određuju njegovu strukturu su interakcije među polisaharidima, interakcije između lignina i ugljenih hidrata, stepen kristalčnosti celuloze i veličina celuloznih mikrofibrila.

Razvoj analitičkih tehnika u istraživanju ćelijskih zidova bio je zadivljujući u poslednje dve decenije, do te mere da mogućnost da analiziramo ćelijske zidove prevazilazi našu sposobnost da tumačimo dobijene rezultate.

Jasno je da biljke imaju izuzetan gliko kapacitet koji proizvodi jedinstvenu raznovrsnost kompleksa polisaharida tako da globalni glikom ćelijskog zida predstavlja jedan od najbogatijih izvora bioenergije i različitih biomaterijala na planeti. Donedavno je glavni fokus u istraživanju ćelijskog zida bio na semenima različitih biljnih vrsta. Ova istraživanja su nam obezbedila mnogo novih saznanja o sastavu ćelijskog zida u biljnom svetu. Detaljnije razumevanje građe ćelijskog zida i međusobne inercije njegovih komponenti i njihova zastupljenost u zavisnosti od biljne vrste, zahteva mnogo šira spektroskopska, mikroskopska, genetska i biohemijska istraživanja u cilju njegove efikasnije eksploatacije (Sorensen et al. 2010).



Slika 1.1. Struktura biljnog ćelijskog zida

(<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall>)

1.1. ĆELIJSKI ZID

Ćelijski zid je karakteristika biljnih ćelija po kome se one bitno razlikuju od animalnih. On okružuje biljne ćelije i daje im karakterističan izgled, oblik i veličinu. To su kompozitne strukture u kojima se odvijaju složeni fizičko-hemijski i enzimski procesi (McCann and Roberts 1991, Carpita and Gibeaut 1993).

Zidovi svih ćelija grade složenu strukturu koja pruža čvrstinu biljnom telu i koja često ostaje nepromenjena i kad biljka prestane da živi. Ćelijski zidovi čine oko 20-60% suve mase biljnog tela. Ranije se smatralo da ćelijski zidovi predstavljaju inertne („nežive“) delove ćelija, koji imaju prvenstveno mehaničku funkciju. Danas se zna da je ćelijski zid, kao poseban kompartment ćelije, sedište važnih fizioloških procesa a posebno onih vezanih za transport. Rast i diferencijacija se često najjasnije manifestuje u rastenju i diferencijaciji ćelijskog zida. S druge strane, ćelijski zid prima i prenosi informacije o faktorima spoljašnje sredine, i o kontaktu sa drugim ćelijama. Pošto je ćelijski zid izložen, pre svih drugih delova biljke, spoljašnjoj sredini, on štiti biljku od klimatskih, hemijskih i patogenih faktora sredine. Prema tome, osim mehaničke, zid ima vrlo značajnu transportnu i zaštitnu funkciju. Zbog svih ovih funkcija neophodno je poznavati njegov hemijski sastav i strukturu (Magalhaes Silva Moural et al. 2010, Bačić et al. 1988, O’Nill 1990, Carpita and Gibeaut 1993, Ridley et al. 2001).

1.2. HIJERARHIJSKA STRUKTURA BILJNOG ĆELIJSKOG ZIDA

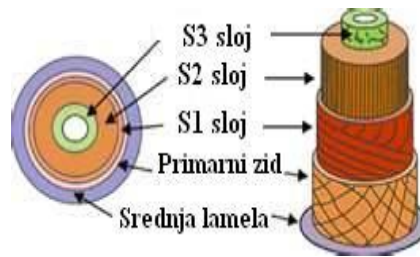
Ćelijski zid se sastoji od tri glavna regiona:

- srednje lamele (SL)
- primarnog ćelijskog zida (PZ) i
- sekundarnog ćelijskog zida (SZ).

Osnovne komponente od kojih su izgrađeni ovi slojevi su: celulozni mikrofibrili sa karakterističnim rasporedom i organizacijom, hemiceluloze, lignin i drugi matrični

polimeri (Panshin and de Zeeuw 1980). Uopšteno, celuloza se može posmatrati kao dug lančani molekul sa visokim stepenom čvrstoće. Molekuli celuloze se pakuju u još duže i jače strukture koje grade celulozne mikrofibrile unutar ćelijskog zida. Lignin je krt gradivni polimerni materijal. Hemiceluloze su manji, razgranati molekuli koji omogućavaju povezivanje lignina i celuloze u jedinstvenu celinu.

Kako bi razumeli ovakvu strukturu ćelijskog zida i međusobnu povezanost slojeva unutar njega, neophodno je imati u vidu da ćelije ne opstaju same za sebe u prirodi, već su međusobno povezane sa hiljadama drugih ćelija, formirajući tkiva, organe i biljni organizam u celini. Ćelije moraju biti povezane tako da obezbede kretanje biomolekula (kao što su proizvodi fotosinteze, hormoni, signalni agensi) i vode. Prisustvo srednje lamele obezbeđuje dobru adheziju između ćelija.



Slika 1.2. Transferzalni presek biljne ćelije drvenastih vrsta gde se vidi raspored slojeva ćelijskog zida (srednja lamela, primarni i sekundarni ćelijski zid) i tri sloja unutar sekundarnog ćelijskog zida (S1,S2 i S3) (<http://www.crc.uga.edu/~mao/intro/outline.htm>)

Srednja lamela (SL) je sloj koji se javlja između dve susedne ćelije, i pripada obema ćelijama. Ovaj sloj je spoljašnji sloj kontinuuma ćelijskog zida i bogat je pektinskim supstancama i kod drvenastih vrsta ligninom.

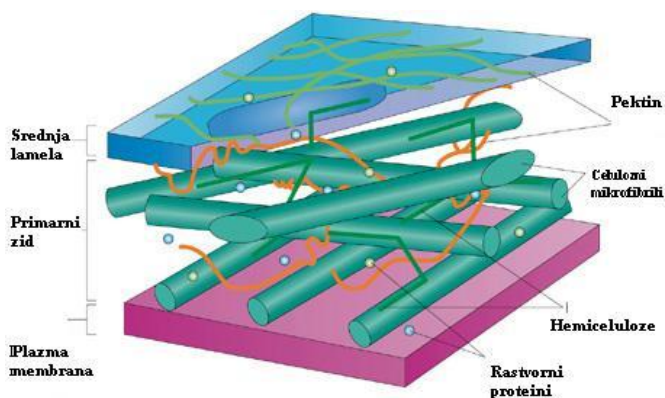
Na unutrašnjoj strani srednje lamele formira se sledeći sloj - primarni zid. U ćelijama drveta, primarni zid je tanak i uglavnom je spojen sa srednjom lamelom. Zato u drvetu pod terminom srednja lamela podrazumevamo srednju lamelu i primarne zidove dve susedne ćelije. Ni pod mikroskopskom se ne može uočiti jasna granica između ova dva sloja. Za njega je specifična neuređena orijentacija celuloznih mikrovlakana.

Primarni ćelijski zid (PZ) nastaje u toku aktivnog rasta ćelije. On je sastavljen od pektinskih polisaharida (30%), međusobno povezanih glukana (hemiceluloze 25%), celuloze (15-30%) i proteina (20%) (Darvill et al. 1980). Komponente primarnog zida variraju sa vrstom biljke i uzrastom. Sve biljke imaju primarni ćelijski zid i srednju lamelu.

Sekundarni ćelijski zid (SZ) nastaje nakon prestanka rastećenja, kada ćelija počne da se diferencira. Sekundarni zid predstavlja glavnu podršku biljci. On u sebi sadrži prvenstveno celulozu i lignin kao gradivne polimere. U njemu mogu da se razlikuju tri sloja: S1, S2 i S3 – koji se razlikuju u hemijskom sastavu i orijentaciji i pravcu celulozних mikrofibrila (Slika 1.2.).

1.3. HEMIJSKA GRAĐA ĆELIJSKOG ZIDA

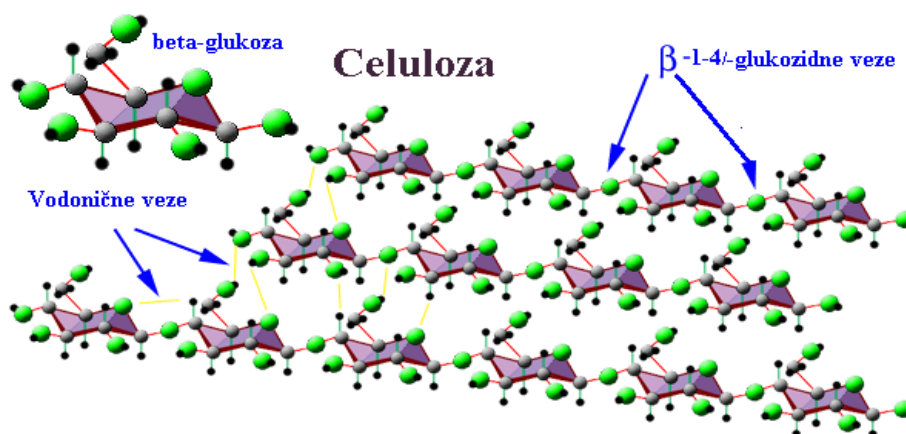
Ćelijski zid se sastoji iz dve faze: mikrofibrilarne i matriksne faze. Mikrofibrilarna faza je izgrađena od molekula celuloze (1,4-glukanskih lanaca). Matriksna faza je raznovrsnija i sastoji se od: hemiceluloza (ksilan, galaktomanan, glukuronomanan, ksiloglukan, kaloz(1,3-glukan), β -1,3- i β -1,4-glukan, arabinogalaktan), pektina (ramnogalakturonan I, arabinan, galaktan, arabinogalaktana, homogalakturonan, ramnogalakturonan II), proteina (ekstenzin, arabinogalaktan-protein i drugi proteini kao što su enzimi), lignina i drugih fenola (ferulicna kiselina i u manjoj količini kumarična kiselina).



Slika 1.3. Ćelijski zid se sastoji od celulozних mikrofibrila, hemiceluloze, pektina, lignina i rastvornih proteina (Sticklen 2008)

1.3.1. Celuloza

Celuloza je polimer izgrađen od molekula glukoze koji se međusobno vezuju u duge lance. Primarnu strukturu celuloze predstavljaju povezani nerazgranati 1,4- β -D-glukani. Celulozni molekuli mogu biti izgrađeni od nekoliko stotina do preko 10 000 glukozidnih jedinica. Celuloza iz drveta sadrži u lancu od 300 do 1700 glukozidnih jedinica, dok molekul celuloze u pamuku i travnatim biljnim vlaknima sadrži preko 10 000 molekula glukoze (Klemm et al. 2005).

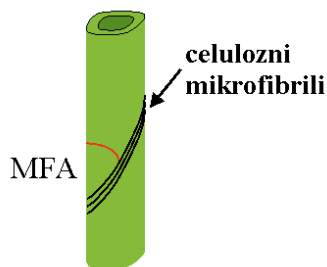


Slika 1.4. Stuktura celuloze i građenje vodoničnih veza

(http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4c/C4c_polysaccharides.html)

Celobioza (glukoza-glukoza disaharid) je osnovni gradivni blok celuloze. Celuloza lako gradi vodonične veze sa samom sobom (intra molekularne vodonične veze) i sa drugim celuloznim vlaknima (inter molekularne vodonične veze). Celulozni lanci formiraju H-veze sa oko 36 drugih lanaca gradeći tako mikrofibrile. Mikrofibrili su dugački od 5-12 nm (McCann et al. 1990, Itoh and Ogawa 1993) i daju zidu mehaničku otpornost, koja je reda veličine otpornosti čelika. Neki regioni mikrofibrila imaju visoku kristalnost dok su drugi amorfne strukture (Nisizawa 1973).

Ćelijski zid koji sadrži semikristalne celulozne mikrofibrile, formira paralelne celulozne lance koji su ugrađeni u amorfnu matricu hemiceluloze i lignina. Mikrofibrili predstavljaju helikoidne strukture umotane oko ose ćelije (slika 1.5.), i formiraju određeni ugao između ose ćelije i mikrofibrila (mikrofibrilni ugao-MFA), kod svakog ćelijskog sloja. U primarnom ćelijskom zidu, mikrofibrili su orjentisani nasumično, dok je srednji MFA u S1 sloju sekundarnog zida 90° (Donaldson 2008). U normalnom drvetu (sa par izuzetaka kao što je kleka) (Hanninen 2012), srednji MFA u S2 sloju je nizak i iznosi između $0-30^\circ$. Mikrofibrilarni ugao u S2 sloju smatra se jednim od najvažnijih faktora koji utiču na mehaničke osobine drveta (Burgert and Fratzl 2009). Poznato je da se MFA menja u funkciji starosti drveta (Donaldson 2008, Barnett and Bonham 2004) i da je takođe drugačiji u reakcionom drvetu u odnosu na normalno drvo kod iste biljne vrste (Donaldson 2008, Barnett and Bonham 2004).



Slika 1.5. Celulozni mikrofibrili se uvrću helikoidno oko ćelijskog zida u S2 sloju.

Shematski prikaz ćelije traheide u drvetu

(<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/1999/materials/PF089.htm>)

Hidroksilne grupe, prisutne u molekulima celuloze, uključene su u formiranje velikog broja intermolekulskih i intramolekulskih vodoničnih veza, i dovode do različitih uređenja kristalne strukture celuloze. Pomoću rendgenske strukturne analize (RSA) i ^{13}C nuklearne magnetne rezonance (NMR) nađene su četiri različite kristalne modifikacije celuloze. Za sada su poznate celuloza I, II, III i IV (Howsmon and Sisson 1963). Celuloza I je najzastupljenija u prirodi i nazvana je “prirodna celuloza”. Celuloza II -“regenerisana celuloza” se može dobiti na dva načina iz celuloze I: mercerizacijom (bazni tretman) ili regeneracijom (rastvaranje i postepena rekristalizacija). Celuloze III_I i III_{II} mogu se dobiti

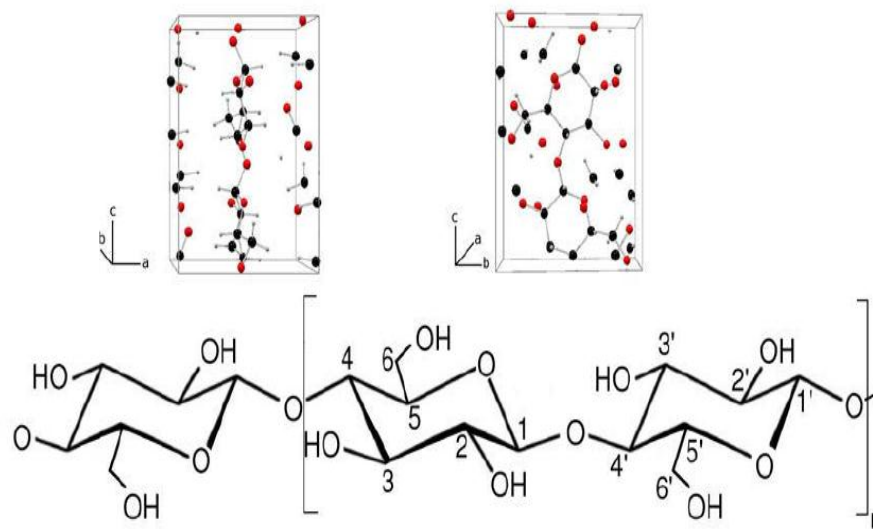
iz celuloze I i II uz pomoć tretmana sa tečnim amonijakom (Hayashi et al. 1975). Celuloze IV_I i IV_{II} dobijaju se zagrevanjem celuloze III_I i III_{II} (Gardiner and Sarko 1985).

Kristalna struktura celuloze otkrivena je još u 19-tom veku i do danas se proučava. Danas su od velikog interesa proučavanja strukture celuloze I, zbog njene potencijalne primene u proizvodnji bioenergije. Kristalnu prirodu celuloze prvi je otkrio Carl von Nageli 1858 godine (Wilkie 1961), čije su pretpostavke kasnije dokazane pomoću kristalografskih tehnika (Meyer and Misch 1937). Bilo je pretpostavljeno nekoliko formi celuloze I, ali je ipak njena struktura i do danas nerazjašnjena zbog njene izuzetne kompleksnosti. Poznato je da je kristalna struktura celuloze I ustvari mešavina dve posebne strukturne forme: celuloza I_α (triklanična) i celuloza I_β (monoklanična). Ove dve forme potvrđene su ¹³C NMR tehnikom (Atalla and Vanderhart 1984). Relativna zastupljenost celuloze I_α i celuloze I_β varira sa poreklom dobijene celuloze, tj biljne vrste. I_β forma celuloze sa monoklaničnom rešetkom je struktura koja dominira u višim biljkama. Veličina kristala celuloze je mala i iznosi oko 5 nm, tako da metoda rendgenske strukturne analize nije u potpunosti dovoljna da se dobiju tačne informacije o kristalnim rešetkama.

Kristaličnost celuloze je parametar koji se koristi da bi se opisao deo celuloze koji se nalazi u kristalnom stanju. Tradicionalno dvofazni celulozni model opisuje celulozne lance koji u sebi sadrže i kristalni (uređeni) i amorfni (neuređeni) region.

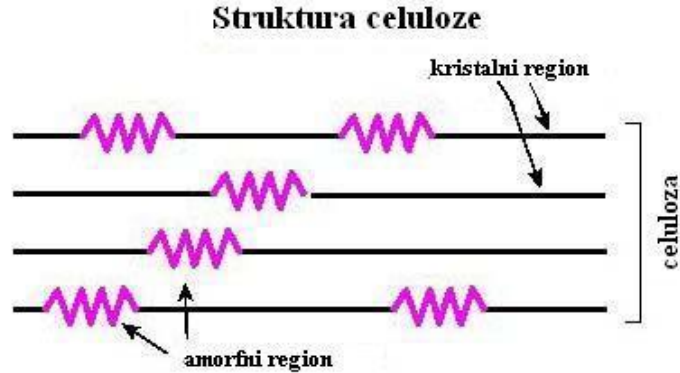
Do sada je pokazano da kristaličnost jako zavisi od metode koja se koristi za njeno određivanje i da sadržaj kristalne celuloze može da varira od 39% do 67% u zavisnosti od korišćene tehnike (Thygesen et al. 2005)

Dostupnost tačnog opisa kristalne strukture I_β celuloze, uz pretpostavljenu strukturu celuloze I_α, pružili su nove uvide o kristalnoj građi prirodne celuloze. Ovi modeli mogu se koristiti za određivanje prisutnih atomskih ravni i njihove zastupljenosti u uzorku. Nezavisno od njihovih finih strukturnih razlika, iste osobine su nađene u obe polimorfne modifikacije tako da očekujemo da će se pojaviti i iste strukturne osobine u prirodnoj celulozi. Na osnovu ovakvog strukturnog rasporeda, mogu biti identifikovani tipovi strukture celuloze u ćelijskom zidu (Perez and Mazeau 2005).



Slika 1.6. Molekul celuloze (donja slika) i jedinične ćelije celuloze I_β iz dva ugla (gornja slika). U jediničnoj ćeliji crne tačke označavaju atome ugljenika, crvene tačke atome kiseonika i sive tačke vodonikove atome. Dimenzije rešetke jedinične ćelije su $a = 7.78^{\circ}\text{A}$, $b = 8.20^{\circ}\text{A}$, $c = 10.38^{\circ}\text{A}$ i ugao $\gamma = 96.5^{\circ}$ (monoklinični ugao između a i b ose) (Nishiyama et al.2002)

U ćelijskim zidovima drvenastih biljnih vrsta, približno jedna polovina celuloze je u amorfnom obliku (Andersson et al. 2003, Andersson et al. 2007). Tačniji proračuni za amorfnu celulozu i njena veza sa njenim kristalnim oblikom nisu još poznati (Kontturi et al. 2011, Sarkar and Pérez 2012). Po najnovijim istraživanjima, mikrofibrili su delimično amorfni (Sarkar and Pérez 2012). Amorfni deo može predstavljati defekte u rešetki i/ili velike regione neuređenih lanaca u rešetki. Defekti rešetke i druge nepravilnosti u lancima mogu se objasniti činjenicom da se celulozni lanci neperiodično stapaju u kristalne strukture (Gomez et al. 2008). Amorfni regioni celuloznih mikrofibrila interaguju sa hemiceluloznim lancima (Cosgrowe 2005).



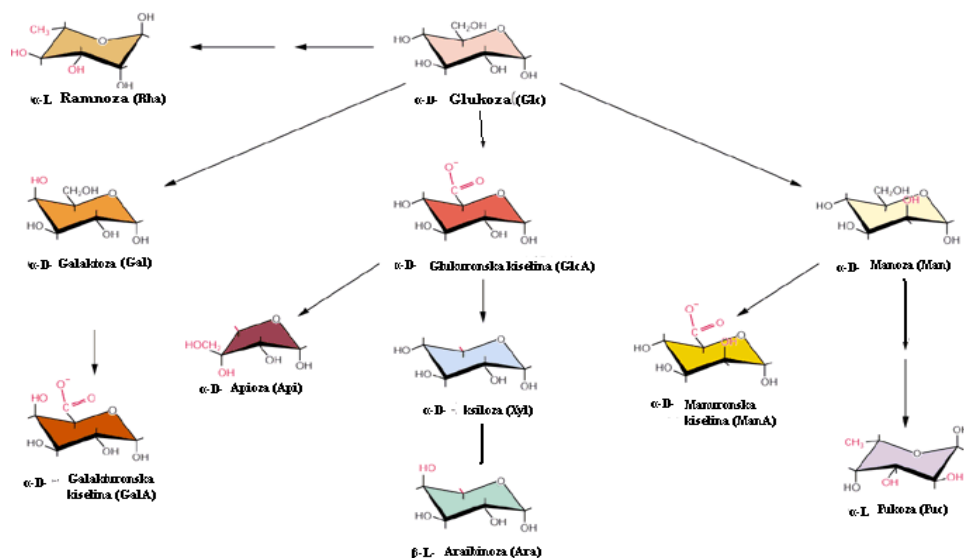
Slika 1.7. Kristalna i amorfnu struktura celuloze
(<http://www.micro.siu.edu/micr302/products.html>)

1.3.2. Hemiceluloze

Hemiceluloze predstavljaju heteropolimerne molekule sačinjene od pentoza (ksiloze i arabinoze) i heksoza (glukoze, galaktoze i manoze). One obuhvataju različite polisaharide sa razgranatim molekulima, za razliku od celuloze.

Hemiceluloze mogu biti klasifikovane u četiri tipa:

1. Ksilani: nalaze se u sekundarnom ćelijskom zidu tvrdog drveta i lišćara
2. Ksiloglukani: nalaze se u primarnom zidu viših biljaka, vezani su za celulozu
3. Manani: nalaze se u sekundarnom zidu konifera (mekog drveta)
4. Mešovito vezani β -glukani: nalaze se u pšenici, kukuruzu, pirinču, ječmu (familije trava Poales) i vaskularnim biljkama koje nemaju cvet ni seme i kod kojih se reprodukcija vrši putem spora (Schadel et al. 2009)



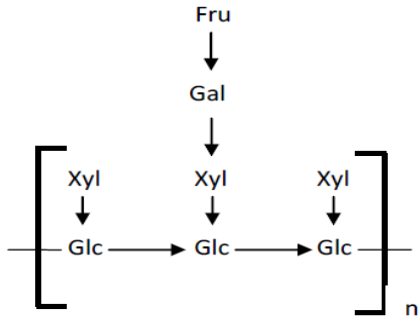
Slika 1.8. Molekuli koji ulaze u sastav hemiceluloza

Kostur hemiceluloze podseća na celulozu. Hemiceluloze se razgranato vezuju za celulozu. Prisutne modifikacije u njenoj strukturi sprečavaju formiranje mikrovlakana unutar njih (Atalla 1993, Uhlin 1995, Hackney 1994). Ksiloglukan i arabinoksilan su dve najzastupljenije hemiceluloze u prirodi.

Ksiloglukan ima kostur koji je sličan celulozi ali je dopunjen ksiloznim granama sa tri do četiri glukozidna ostatka. On predstavlja glavnu hemicelulozu u tvrdom drvetu. Ksilofuran se takođe može povezivati sa galaktoznim i fukoznim ostacima.

Manani su glavne hemiceluloze u mekom drvetu i imaju sličnu funkciju kao ksiloglukani i arabinoksilani u tvrdom drvetu.

Arabinoksilan sadrži (1-4)- β -D-ksilanski lanac sa prisutnim arabinoznim granama. Drugi ostaci, kao što su glukuronska kiselina i estri ferulične kiseline, su takođe povezani na arabinoksilane i najčešće su prisutni u žitaricama.



Slika 1.9. Primer hemiceluloznog kostura, ksiloglukana. Glukozni (Glc) molekuli su vezani preko $\beta(1\rightarrow4)$ -glukozidnih veza, isto kao u celulozi. Ksilozna (Xyl) je vezana za glukozidni kostur preko $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidnih veza preko kojih se grana, i u granama može sadržati galaktozne (Gal) i fruktozne molekule (Fru). Svaka od ovih veza se formira uz pomoć specifičnog enzima namenjenog za spajanje odgovarajućeg šećera za odgovarajući molekul već prisutan u lancu

1.3.3 Pektini

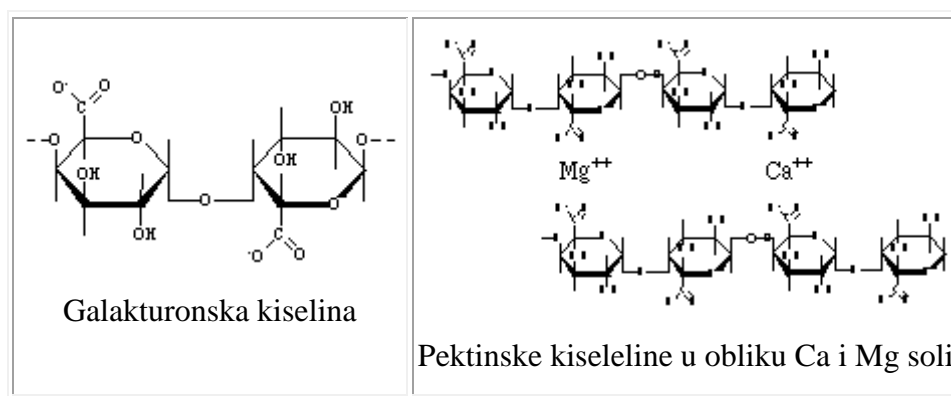
Pektin je ime za grupu amornih polimera koji se nalaze u ćelijskom zidu biljaka, posebno u srednjoj lameli. Pektinski polimeri su bogati galakturonskom kiselinom i strukturno su izuzetno važni naročito tokom formiranja ćelijskog zida. Pektini se javljaju u prirodi kao metilesterifikovani i u obliku slobodnih kiselina. Polimeri pektina takođe mogu da sadrže neutralne šećere, naročito D-galaktoze, L-arabinoze, L-ramnoze, D-ksiloze, L-fukoze i D-apinoze (Aspinall 1980).

Pektin u obliku kalcijumovih soli formira poprečne veze koje utiču na strukturne osobine amorfne matrice. Tokom lignifikacije ksilemskih ćelija (traheja i traheida), pektin je delimično uklonjen (Westermarck et al. 1986). Količina arabinogalaktana u lignifikovanom mekom i tvrdom drvetu je manja od 1% (Fengel and Wegener 1989).

Pektini imaju veliku gustinu naelektrisanja što im omogućava da vezuju kalcijumove Ca^{2+} jone i da tako lokalizuju jone metala u ćelijskom zidu, što može da dovede do bubrenja ćelijskog zida (Westermarck and Vennigerholz 1995).

Ova kompleksna i heterogena grupa polisaharida sastoji se iz karakterističnih domena, za koje se veruje da su kovalentno povezani medju sobom (Willats et al.2001, Vincken et al. 2003, Ridley et al.2001, Perez 2000).

Pektini uključuju polisaharide koji su kompleksne strukture u kojima su linearne strukture izgrađene od (1-4)- α -D-galakturonana sa regionima (1-4)- α -D-galakturonske kiseline i (1-2)- α -L-ramnospiranozinskim ostacima.



Slika 1.10. Pektini: molekul galakturonske kiseline i pektinske kiseline prikazane u obliku Ca^{2+} i Mg^{2+} soli

Ramnogalakturonan I sadrži ostatke galakturonske kiseline i ramnoze, i pretpostavlja se da ima bočne lance koje sadrže ramnoze a takođe i druge pektinske komponente.

Homogalakturonani su linearni lanci ostataka galakturonske kiseline, dok je ksilogalakturonan modifikovan dodavanjem ksiloznih ostataka. Karboksilne grupe homogalakturonana i ksilogalakturonana su često metil-esterifikovane, tako da blokiraju kiselinske grupe i smanjuju njihovu sposobnost da formiraju gel (Carpita and Gibeaut 1993, O'Neill 2003).

Ramnogalakturonan II je kompleks pektinskih domena koji sadrži 11 različitih ostataka šećera i formira dimere preko boratnih estara.

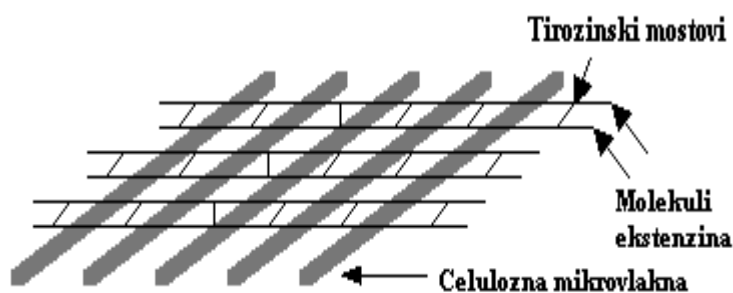
Prirodni arabinani i arabinogalaktani su takodje povezani sa kiselim pektinima i pretpostavlja se da su oni zaduženi za fleksibilnost ćelijskog zida i da se vezuju za površinu celuloze (Jones et al. 2003, Zykwinska et al. 2005).

1.3.4 Proteini

Proteini u ćelijskom zidu se javljaju kao strukturni proteini i kao enzimi. Oni su uključeni u modifikaciju komponenata ćelijskog zida, signalizaciju i interakciju sa proteinima plazma membrane.

Strukturni proteini se grupišu u pet klasa prema dominantnoj aminokiselini:

1. klasa -Ekstenzini - velika familija baznih glukoproteina u čijem sastavu učestvuje oko 30% hidroksiprolina. Kod dikotila veliki broj pentapeptidnih jedinica koje se ponavljaju, se sastoji od 4 molekula hidroksiprolina i 1 molekula serina. Hidroksiprolin gradi glikozidne veze sa arabinozom, a serin sa galaktozom. Jedan deo ovih proteina se akumulira u ćelijama koje rastu i pri kraju tog procesa ograničava dalje rastezanje. Do toga dolazi usled stvaranja tirozinskih veza između dva molekula ekstenzina koji ograničava dalje rastezanje ćelijskog zida.



Slika 1.3.11. Ekstenzin u ćelijskom zidu (Carpita and McCann 2000)

2. klasa - proteini bogati glicinom - sadrže do 70% ove aminokiseline, ali su česti i alanin i serin

3. klasa - proteini bogati prolinom - osim prolin-prolin jedinice sadrže i hidroksiprolin

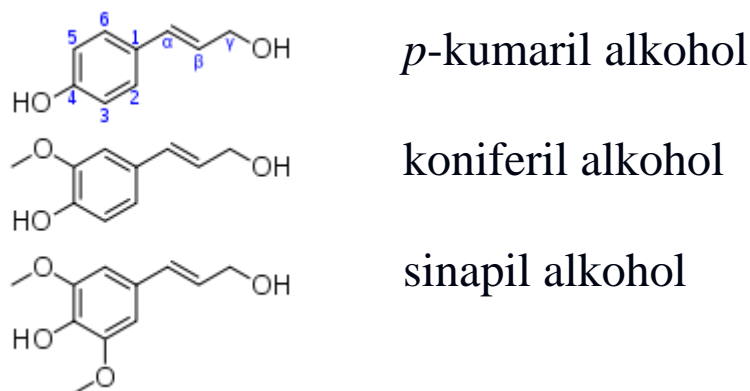
4. klasa - Lektini - glukoproteini bogati hidroksiprolinom i arabinozom. Osnovna funkcija lektina je prepoznavanje ćelija pri kontaktu, što naročito dolazi do izražaja u prepoznavanju patogenih organizama.

5. klasa - proteini sa arabinogalaktanom – sadrže i do 90% polisaharida sastavljenih od lanaca arabinoze i galaktoze, zbog čega su veoma rastvorljivi u vodi. Oni imaju važne funkcije u morfogenezi.

Enzimi ćelijskog zida takođe se mogu podeliti u grupe na osnovu njihove funkcije: 1) peroksidaze koje učestvuju u procesu lignifikacije ćelijskog zida, 2) transglukozidaze koje katalizuju formiranje i razgradnju glukozidnih veza, 3) veliki broj hidrolaza (glukozidaze, glukanaze, celulaze, poligalakturonaze itd.) i podjednako važne esteraze, koje učestvuju u razgradnji ćelijskog zida i 4) „ekspanzin“ protein koji je sposoban za raskidanje vodoničnih veza između celuloznih mikrofibrila i ksiloglukana (MacQueen-Mason et al. 1992)

1.3.5. Lignin

Lignin je glavni strukturni polimer u ćelijskom zidu. On je drugi po zastupljenosti prirodni polimer na Zemlji, posle celuloze. Lignin predstavlja razgranat polimer izgradjen od fenilpropanoidnih jedinica izvedenih iz koniferil, sinapil i *p*-kumaril alkohola kao monomera koji u sebi sadrži aromatične i alifatične konstituente. Kompozicija ligninskih monomera se menja duž različitih biljnih vrsta i takodje u zavisnosti od tipa ćelije u biljci a takodje i duž različitih mesta u samom ćelijskom zidu (Lewis and Yamamoto 1990, Whetten and Sederoff 1995).



Slika 1.12. Struktura tri osnovna monolignola

Na osnovu istraživanja strukture lignina izolovanog iz drveta (Li 1996) i sintetisanog lignina - dobijenog pomoću slobodnoradikalne polimerizacije (Sarkanen et al. 1971, Cathala and Monties 2001, Grabber et al. 2000, Grabber et al. 1995), nađeno je da postoji jedanaest vrsta međumolekulskih veza unutar njegovog molekula. Najzastupljenija je β -O-4 etarska veza, koja čini 40%- 60% od ukupnih veza u polimeru lignina. Pronađene su i α -O-4 etarske veze, 5-5 bifenil (5-10%), 5-O difenil etarske veze (5%) i druge (Li et al. 1996). Različiti tipovi unutrašnjih veza dovode do formiranja različitih tipova substrukture u njemu.

Lignin se uglavnom akumulira u sekundarnom ćelijskom zidu dajući mu čvrstinu i neprobojnost. Akumuliranje lignina je kontrolisan proces. Njegova sinteza takodje može biti indukovana biotskim i abiotskim stresom, povredama, infekcijama patogenima, metaboličkim stresom i perturbacijama u ćelijskom zidu (Cano-Delgado et al. 2003, Tronchet et al. 2010). Raznovrsnost veza u polimeru lignina zavisi od uključenosti ovog polimera u različite tipove stresa (Magalhaes Silva Moural et al. 2010).

Molekul lignina je isprepletan i medjusobno povezan sa drugim molekulima u ćelijskom zidu, uglavnom polisaharidima (celuloze i hemiceluloze) i strukturnim proteinima, tako da daje čvrstinu ćelijskom zidu (Boerjan et al.2003, Anterola et al. 2002, Humphreys and Chapple 2002). Teškoće u izolaciji lignina nastaju zbog njegove jake

međusobne interakcije sa drugim ligninskim molekulima i polisaharidima, tako da će bilo koja metoda izolacije neminovno raskinuti kovalentne veze i promeniti njegovu strukturu.

Lignin doprinosi mnogim fiziološkim funkcijama, kao što su strukturna jačina, ojačavanje polisaharida i povećavanje otpornosti zida na mikroorganizme (Mohanty et al. 2005, Lairez et al. 2005).

Struktura lignina

Do sada su urađena brojna istraživanja vezana za strukturu i morfologiju lignina pomoću direktne vizualizacije ili indirektnim merenjem izolovanih lignina. Rezanowich i saradnici su zapazili sfernu formu izolovanih ligninskih fragmenata (Rezanowich et al. 1964). Košikova sa saradnicima (1978) je predvidela približno sferan oblik lignoceluloze iz familije bukve. Gilardi i Cass (1993) su posmatrali formiranje agregata lignina sa hidrodinamičnim radijusom od 60 nm u dioksan/vodi kao rastvaraču. Oni su dobili da je svaki agregat sastavljen od 256 molekula čija je ukupna površina poprečnog preseka 190 nm².

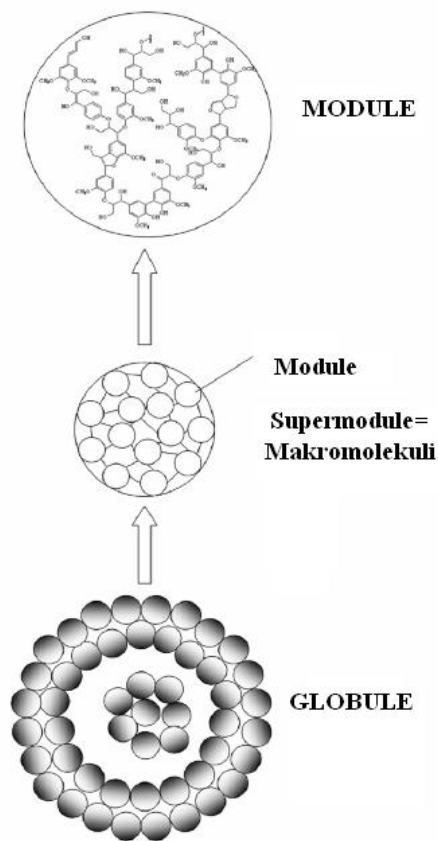
Lignin je prvo posmatran kao amorfni polimer sa razgranatom strukturom. Ipak, novija istraživanja su pokazala da lignin može da poseduje i uređenu strukturu. Atalla i Agarwal (1985) prikazali su orijentaciju molekula lignina u odnosu na površinu celuloze korišćenjem Ramanske mikroskopije kod zida izolovanog iz smrče (*Picea mariana*).

DHP- lignin model polimer

Imajući u vidu potencijalnu destrukciju prirodne strukture lignina tokom tretmana izolacije, *in vitro* sintetizovan model sistem postao je alternativa za proučavanje uloge lignina u ćelijskom zidu biljaka i nekih fizičko-hemijskih procesa tokom njegovog formiranja. Od prvog rada Freudenberga (1964), proučavanja ligninske strukture i funkcije su fokusirana na enzimski polimerisan dehidrogenativni polimer (DHP), dobijen *in vitro*. DHP ili sintetički lignin se obično dobija uz pomoć peroksidaza/peroksid sistema. Tokom polimerizacije, monolignoli se oksiduju u aroksil (aril) radikal, koji može biti

prisutan u četiri mezomerne forme. Reakcija kuplovanja ovih radikala dovodi do stvaranja različitih veza .Tokom kuplovanja, radikali monolignola istovremeno reaguju i sa molekulima šećera, formirajući poprečne veze između lignina i hemiceluloze, pektina i drugih polisaharida (Barakat et al 2007, Cathala et al. 2001, Cathala et al. 2005).

Testirana je reproduktivnost i pouzdanost DHP-a kao lignin model polimera i on je prihvaćen kao dobro model jedinjenje (Lewis et al. 1988). Danas se DHP široko koristi za ispitivanje strukture lignina i njegove hemije. Cathala i saradnici (1998) su potvrdili reproducibilnost sintetisanog DHP-a kao model jedinjenja za istraživanje strukture lignina . FT-IR, GPC tehnike i rezultati tioacidolize su takođe potvrdili DHP kao dobar model sistem ali pod pažljivo kontrolisanim uslovima sinteze. Radotić i saradnici (1994) su prvi postavili četvoro-slojnu supermolekularnu strukturu (module-supermodule-globule-superstrukture) pomoću posmatranja DHP-a STM mikroskopijom. Oni su zaključili da module sadrže 20 molekula i da se formiraju prve, a nakon toga module polimerizuju u supermodule koje se sastoje od oko 500 monomera. Supermodule se postepeno grupišu u agregate zvane globule i konačno formiraju velike superstrukture. Mičić i saradnici (2000) su nastavili ova istraživanja posmatrajući na isti način organizaciju DHP-a korišćenjem Skenirajuće Elektronske Mikroskopije u uslovima sredine (ESEM) i zaključili su da su prva dva nivoa strukturne organizacije dobijena formiranjem kovalentnih veza dok se dva viša nivoa strukture formiraju putem međusobnih fizičkih interakcija. Istom tehnikom, oni su pokazali da je struktura jedinstvena za sintetisani lignin dok fotohemijski polimerizovan lignin pokazuje varijacije u strukturi. Kombinacijom metode Skenirajuće Optičke Mikroskopija bliskim poljem (NSOM- near-field scanning optical microscopy) i metode Mikroskopije Atomskom Silom (AFM -atomic force microscopy), predložen je kompletan model formiranja lignina od module do globule, korak po korak (model je prikazan na slici 1.3.12.) (Radotic et al 1994, Mičić et al. 2004).



Slika 1.13. Organizacija lignina (Radotić et al. 1994, Mičić et al. 2004). Oko 20 lignin molekula formira module. 25 modula formira supermodule, koje se posle udružuju u globule. Konačno se globule dalje udružuju u velike strukture nazvane superstrukture (nisu prikazane). Debele i tanke linije predstavljaju hidrofilne i hidrofobne regione, respektivno

1.3.6. Voda

Najzastupljenija komponenta u zidu je voda. Zid je visoko hidratisan i u zavisnosti od porekla sadrži oko 75-80% vode. Voda se uglavnom nalazi u matriksu, što ukazuje da matriks ima osobine hidrogela. Ona ispunjava sve prostore između krupnih makromolekula izuzev kristalnih regiona celuloznih mikrofibrila. Edelman (1995) je pretpostavio da su ekstenzivne osobine izolovanog ćelijskog zida izuzetno osetljive na dehidraciju.

Dehidracija matriksa može da uspori rast ćelijskog zida (Chazen and Newmann 1994, Passioura 1994). Količina vode u ćelijskom zidu varira, a od nje zavisi čvrstina pektinskog gela i povezanost među polisaharidima. Ona je sredina u kojoj se odvijaju enzimske reakcije u ćelijskom zidu i u kojoj je jedino moguć transport. Detaljnija istraživanja ponašanja vode u ćelijskom zidu mogu da nam daju bolji uvid u reološke osobine ćelijskog zida.

1.4. INTERAKCIJE MEĐU MOLEKULIMA ĆELIJSKOG ZIDA

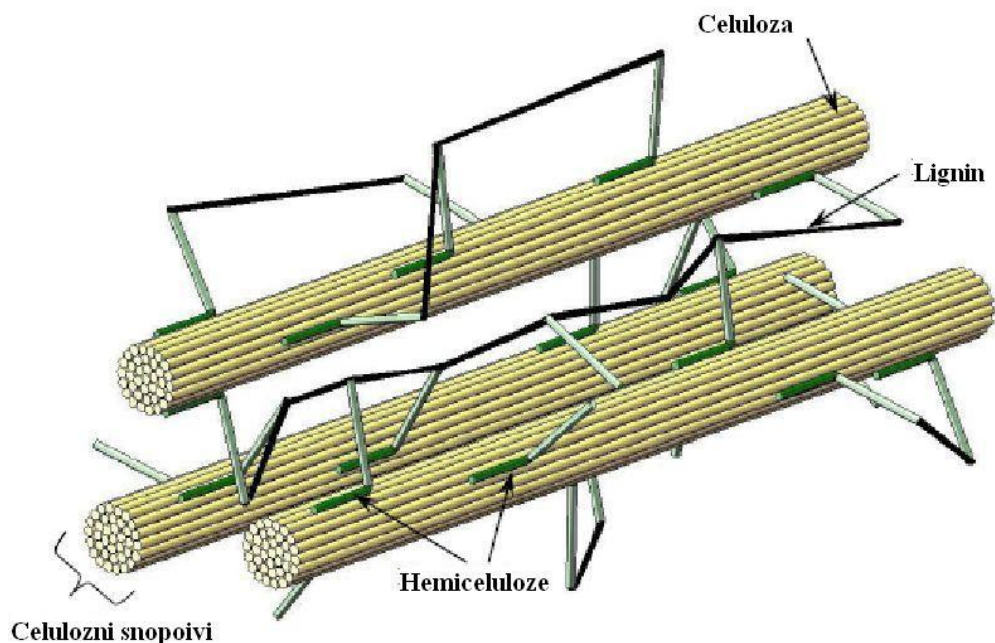
1.4.1. Interakcije između celuloznih vlakana i hemiceluloze

Jedna od glavnih uloga hemiceluloza je ta da utiču na organizaciju celuloze u ćelijskom zidu i da obezbeđuju kontakt između celuloznih mikrofibrila i ostalih matričnih polimera. Višestruke vodonične veze koje stvaraju hemiceluloze sa celulozom predstavljaju glavne nekovalentne veze prisutne u zidu (Atalla et al. 1993, Hackney 1995).

Postoje značajni dokazi koji podržavaju hipotezu da se celulozni mikrofibrili i hemiceluloze vezuju čvrsto međusobno preko višestrukih vodoničnih veza (Levy et al. 1997). Posle sekvencijalne ekstrakcije ćelijskih zidova sa različitim hemijskim tretmanima, utvrđeno je da ostatak zida sadrži celulozu i hemiceluloze, sugerišući na jaku asocijaciju između ovih makromolekula (Perez 2002, 2005).

Konformaciona istraživanja i arabinoksilana i ksiloglukana su pokazala da oni mogu da prilagode strukturu tako da delimično njihova struktura podseća na strukturu celuloznih molekula i tako omogućavaju formiranje vodoničnih veza (Whitney et al. 1995). Što je manje supstituisanih molekula fukoze, veći je potencijal za vezivanje ksiloglukana za celulozu. U mnogim ćelijskim zidovima, hemiceluloze mogu da formiraju kompletne mono-slojeve koji prekrivaju mikrofibrile, mada se veruje da neki od molekula hemiceluloze prodiru, i moguće menjaju mikrokristalni raspored celuloznih molekula u unutrašnjosti (Whitney et al. 2006). Pretpostavlja se da ostale hemiceluloze premošćuju

“prazan” prostor između mikrofibrila, i preko vodoničnih veza stvaraju poprečne veze među mikrofibrilima (slika 1.14.)

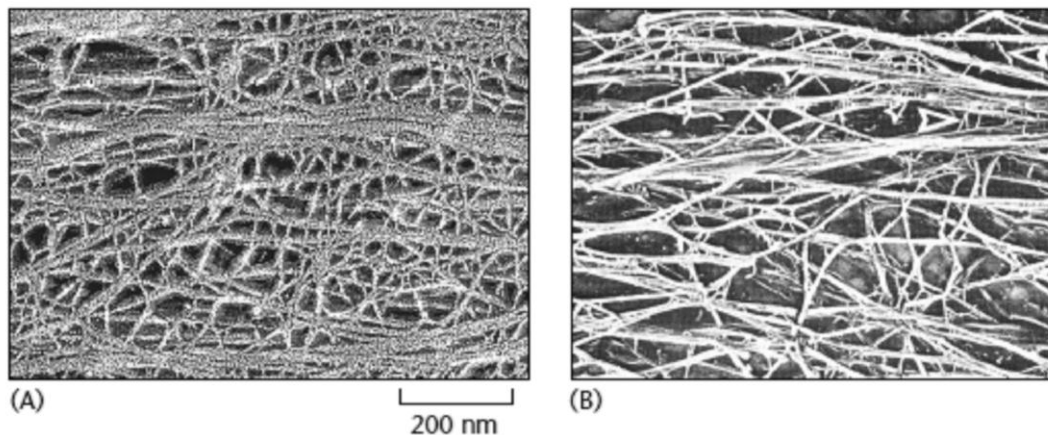


Slika 1.14. Pozicija i raspored celuloznih mikrofibrila u biljnom ćelijskom zidu (Murphy and McCarthy 2005, Shaw 2008)

Činjenica da se hemiceluloze vezuju preko vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija za celulozu, sugerše na to da je njihova funkcija da poprečno povezuju celulozne mikrofibrile i na taj način one odvajaju mikrofibrile jednog od drugog i potencijalno utiču na njihovu sposobnost da klize jedan preko drugog. Iz ovog sledi da one imaju važnu ulogu u kontroli rasta ćelijskog zida. Potvrda poprečnog vezivanja hemiceluloze dobijena je direktnom vizualizacijom ćelijskog zida (Zhou 2007, Hayashi 1984). Korišćenjem elektronske mikroskopije na brzo zamrznutom uzorku primarnog ćelijskog zida, vidi se da ksiloglukan formira poprečne veze, sa rastojanjem 20 nm do 40 nm dužine između celuloznih mikrofibrila (McCann et al. 1990, Fujito et al. 2000). Tretman zida sa bazama (1N KOH) dovodi do uklanjanja poprečnih veza i padanja mikrofibrila jednog preko drugog. Pretpostavlja se da arabinoksilan ima sličnu funkciju

poprečnog vezivanja u ćelijskom zidu (Grabber et al.2000, Lam et al.1992, Ralph et al. 1995).

Dodatna potvrda za poprečne veze koje stvaraju hemiceluloze dolazi od činjenice da veštački formiran kompozit od celuloze, ksiloglukana ili drugih hemiceluloza daje neverovatno sličnu mikroskopsku sliku kao i sam ćelijski zid (slika 1.15.).

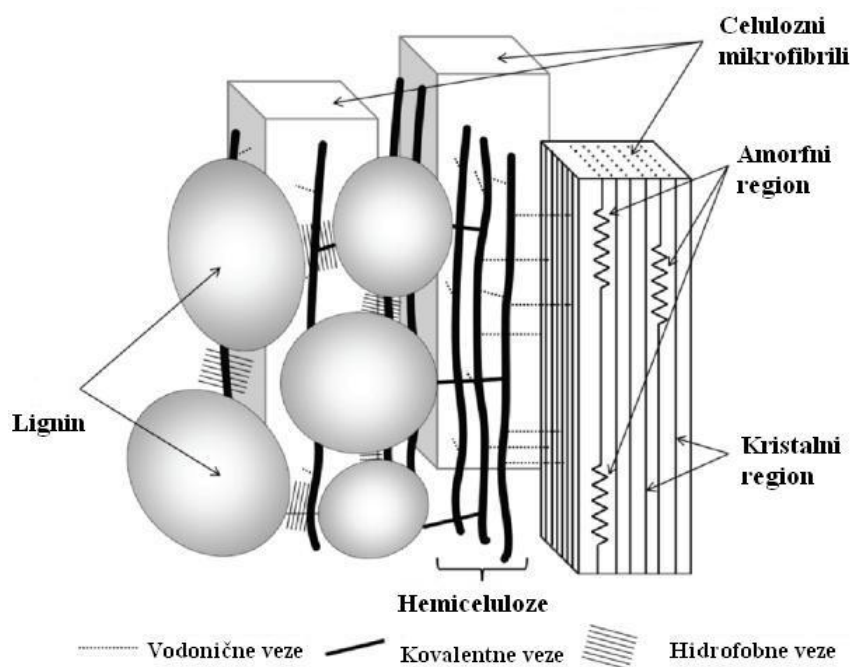


Slika 1.15. Hemicelulozne poprečne veze A) Elektronska mikrografija pokazuje osenčenost primarnog ćelijskog zida gde se vidi da ksiloglukan formira poprečne veze, sa rastojanjem 20 nm do 40 nm dužine između celuloznih mikrofibrila (B) Sličan snimak dobijen od veštačkog kompozita, dobijenog od bakterijski sintetisanih mikrofibrila celuloze rastvorenih u prečišćenom ksiloglukanu (Wilson et al. 2006)

1.4.2. Interakcija između lignina i polisaharida

Interagujuće sile

Iako DHP koristimo kao model jedinjenje za ispitivanje lignina, ipak postoje izvesne razlike u strukturi i interakcijama kod nativnog lignina (Houtman and Atalla 1995). Jedan od razloga je postojanje razlike u okruženju u toku procesa lignifikacije, gde je najznačajnija interakcija lignina sa polisaharidima.



Slika 1.16. Shematski prikaz lignin-polisaharidne mreže (Tsubaki and Azuma 2011)

Kao što je naznačeno ranije, postoji problem u izolaciji lignina jer je on višestruko povezan sa polisaharidnim molekulima u ćelijskom zidu. Veruje se da se ove veze formiraju u procesu lignifikacije, što objašnjava postojanje polisaharidnog efekata na strukturu lignina. Iako ove lignocelulozne interakcije nisu još dovoljno razjašnjene, predpostavlja se da se lignin vezuje za celulozu estarskim vezama koje nastaju između ligninske hidroksilne grupe i karboksilne grupe na uronskim kiselinama hemiceluloze. Postoji i drugi tip veze, a to je veza lignin propanola sa hidroksilnim grupama celuloze i hemiceluloza (Mohanty et al. 2005).

Pored jakih kovalentnih veza koje lignin gradi sa polisaharidima prisutne su i, fizičke interakcije kao što su vodonične veze i Van der Waals-ove interakcije koje on ostvaruje sa celuloznim molekulima. Velika količina hidroksilnih grupa u celulozi stvara privlačne sile, obezbeđujući dobre mehaničke osobine ćelijskog zida (Nishiyama et al. 2002, Nishiyama et al. 2003). Pored celuloze, i lignin po strukturi ima veliki potencijal za formiranje vodoničnih veza sa polisaharidima. Ove interakcije uključuju fenolne i

alkoholne hidroksilne grupe, koje mogu da budu donori ili akceptori. U molekulu lignina su prisutne i karbonilne i metoksi grupe koje mogu da daju svoj doprinos u formiranju vodoničnih veza sa polisaharidima (Fengel 1984).

Veliki broj istraživanja ukazuje da polisaharidna komponenta ćelijskog zida može da modifikuje lignin u toku lignifikacije. Interakcije lignina u ćelijskom zidu, sa ostalim makromolekulima su podeljene na adsorpciju i na kovalentne interakcije formiranja lignin-ugljenohidratnog kompleksa (LUK).

Adsorpcioni procesi

Postoje neke dileme oko sposobnosti lignina za adsorpciju na površinama polisaharida, jer je lignin jako hidrofoban molekul za razliku od polisaharida. Bez obzira što monomer lignina ima aromatičan prsten i alifatičnu granu, postoji mnogo hidroksilnih i metoksi grupa u njegovoj strukturi koje mogu da interaguje preko vodoničnih veza ili putem elektrostatičkih interakcija sa polisaharidima (Fengel 1984, Houtman and Atalla 1995). Pored toga, celulozni mikrofibrili imaju karakterističan prečnik od 3-5 nm (Mohanty et al. 2005), što znači da imaju ogromnu površinu da interaguju sa okolnim molekulima. Postoje i drugi efekti koji mogu da favorizuju elektrostatičku interakciju između polisaharida i lignina.

Zasnovano na gornjem razmatranju, mnoga istraživanja adsorpcije koriste dinamički model koji uzima u obzir molekulsku strukturu celuloze i lignina. Houtman i Atalla (1995) su proračunima pokazali da se koniferil alkohol i oligomer DHP adsorbuju na modelu celuloznih mikrofibrila u oblasti visokih koncentracija hidroksilnih grupa, pokazujući da su dominantne sile elektrostatičke prirode. Besombes i Mazeau (2005) su takođe koristili dinamički model i ispitivali su adsorpciju β -O-4 dimera na celulozna vlakna. I jedni i drugi dobili su slične rezultate i pronašli su da je interakcija između dimera koniferil alkohola i celuloze dovodi do orijentacije ligninskog prstena paralelno ćelijskom zidu, što je u saglasnosti sa posmatranjima nativnog lignina koje su dobili Atalla i Agarwal (1985). Kasnije, merenja su ponovljena sa oligomerima sa 10 i 20 jedinica. Oligomeri sa deset jedinica imaju deo aromatičnih prstenova orijentisanih paralelno sa površinom celuloze, dok kod oligomera sa 20 jedinica adsorpcija je otežana zbog

konformacione krutosti (Besombes and Mazeau 2005). Perez i saradnici (2004) su uradili i kompjuterska i eksperimentalna istraživanja o adsorpciji aromatičnih jedinjenja na površinu celuloze. Pokazali su da površinske osobine celuloze imaju uticaja na adsorpciju i da supstituisane grupe mogu da proizvedu dodatnu adsorpciju.

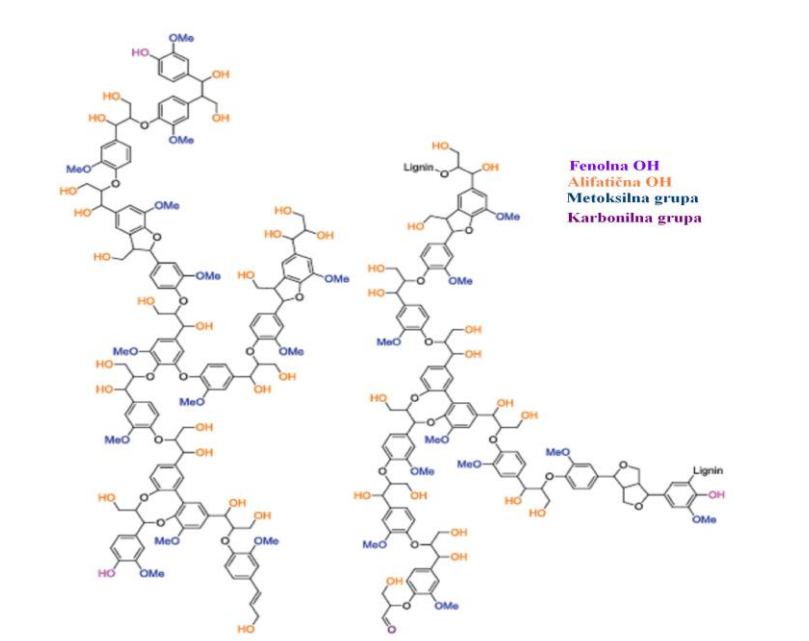
Formiranje lignin-ugljenohidratnog kompleksa - LUK

Formiranje lignin-ugljenohidratnog kompleksa (LUK) je široko prihvaćen koncept koji se dešava tokom lignifikacije i ima veliki uticaj na sam proces. Rana proučavanja ovog kompleksa fokusirana su na traženje direktnih potvrda o postojanju veza između lignina i celuloze, u izolovanom ligninu. Uočena su dva dominantna tipa veza: 1. etarske veze između lignina i hemiceluloznih hidroksilnih grupa i 2. estarske veze između lignina i uronske kiseline ili između celuloze i fenolnih kiselina. Tip veze i pozicija veze razlikuju se od vrste do vrste biljke. Watanabe i saradnici (1989) su izolovali LUK iz bora i pronašli da su manoze, galaktoze i glukoze povezane putem O-6-etarskih veza za lignin, dok su Yaku i saradnici (1981) pokazali da su pozicije O-2 i O-3 manoze i glukoze kod bora (*Pinus densiflora*) vezane za lignin. Takahashi i Koshijima (1988) su pronašli da je lignin vezan za C-2 ili C-3 pozicije ksilana u bukvi. Košikova i saradnici (1979) su pokazali da je učestalost pojavljivanja LUK-a u *in vivo* eksperimentima dva do osam puta veća nego kod izolovanog lignina, pokazujući time da u procesima izolacije dolazi do prekidanja ovih veza i smanjenja broja kovalentnih veza nastalih interakcijom ugljenih hidrata i lignina.

Nedavne studije su fokusirane na ispitivanje formiranja lignin-ugljenohidratnog kompleksa u prisustvu polisaharida. Micić i saradnici (2000) su posmatrali formiranje DHP-a u prisustvu i odsustvu celuloze koristeći ESEM. DHP polimerizovan bez celuloze pokazuje 3-D strukturu sa interakcijama kratkog dometa, dok se DHP formiran u prisustvu celuloze grupiše u kompaktnu jednoslojnu strukturu sa nekoliko domena. Oni sugerišu da celuloza služi kao šablon za polimerizaciju lignina. Barakat i saradnici (2007) su polimerizovali koniferil alkohol u prisustvu glukuronoarabinoksilana (GAK) dobijenog iz zoba i pronašli su da DHP i GAK formiraju hidrofobne agregate. NMR tehnikom otkriveno je formiranje etarskih veza između DHP-a i GAK (Tanahashi et al.1982). Dalja

ispitivanja DHP sintetizovanog u prisustvu ksilana pokazuju da porast koncentracije reaktanata povećava broj β -O-4 veza (Terashima et al.1995).

Uz pomoć ^{13}C -NMR tehnike, Terashima i saradnici (1995, 1996) su pokazali da je struktura DHP sintetisanog u prisustvu pektina, približnija onoj u ligninu iz mlevenog drveta (MWL) nego u čistom DHP-u. Cathala i saradnici (2001) su posmatrali DHP-pektin agregat koji je stabilan u rastvoru. Pronađene su estarske veze unutar agregata koji formiraju DHP i pektin i ovi agregati sprečavaju taloženje nevezanog DHP-a. Dakle, pektin povećava rastvorljivost i molekulsku masu DHP-a (Cathala and Monties 2001). Sva istraživanja pokazuju da prisustvo pektina indukuje bolju disperziju DHP-a na površinu celuloze i povećava broj β -O-4 veza.



Slika 1.17. Strukturni model lignina dobijenog iz mekog drveta po Brunow-u (2001)

Uska strukturna povezanost i veliki broj raznovrsnih interakcija koje su prisutne u ćelijskom zidu otežavaju ekstrakciju celuloze, hemiceluloze i lignina u prirodnom obliku.

Kovalentna glikozidna veza među pektinskim polisaharidima

Pektinski polisaharidi kao što su homogalakturonan, delimično metilesterifikovan homogalakturonan, ramnogalakturonan I i ramnogalakturonan II, čine pektinsku mrežu ćelijskog zida. Veruje se da su pektinski domeni međusobno kovalentno povezani i to glukozidnim vezama (Cosgrove 2005). Pokazano je da se pektin oslobađa iz ćelijskog zida pomoću hemijskih reakcija sa vodom, puferima ili helatorima. Može se odvojiti samo onaj deo pektinske mreže gde su raskinute glukozidne veze.

1.5. STRUKTURA ĆELIJSKIH ZIDOVA KOD DRVENASTIH VRSTA BILJAKA

Termin drvo se koristi za kompleksnu biološku strukturu koja predstavlja kompozit izgrađen od različitih hemijskih supstanci i tipova ćelija koje deluju uzajamno kako bi obezbedili život u biljkama. Ne postoji, fizička, mehanička, biološka, hemijska ili tehnološka osobina drveta koja nije fundamentalno izvedena iz činjenice da su struktura i funkcija drveta takve da obezbeđuje život biljci. Njegove tri glavne funkcije u biljci su provođenje vode od korena do lista, mehanička podrška biljnom telu (stablu) i skladištenje biljnih supstanci. Drvo mora da ima ćelije koje su po svojoj strukturi namenjene i međusobno povezane na takav način da mogu da obezbede funkcionisanje ove tri glavne funkcije. Razumevanje osnovnih potreba koje zahtevaju ove tri funkcije i izučavanje strukture drveta omogućava njegovu veću iskoristljivost u industriji (Hoadlez 2000).

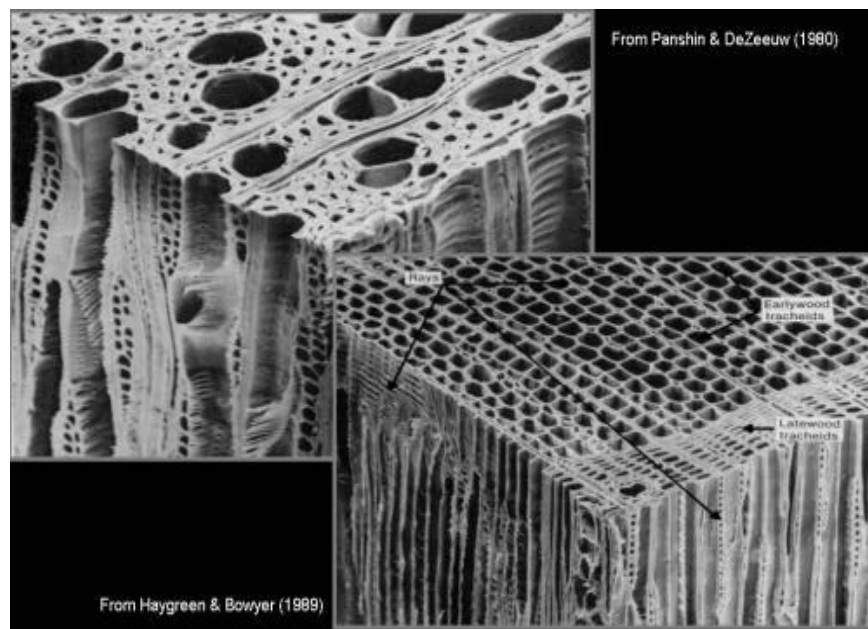
Industrijski gledano, drvo je podeljeno u dve osnovne grupe, na osnovu njegovih strukturnih osobina, i to su tvrdo drvo i meko drvo.

1.5.1. Tvrdo i meko drvo

Tvrdo drvo je karakteristično za listopadne drvenaste vrste (angiosperme, biljke cvetnice). To su biljke koje sporo rastu: orah, mahagoni, hrast, topola, breza i javor. Njihovo drvo je tamnije boje i koristi se u drvnoj industriji, ali ne u tolikoj meri zbog

visoke cene. Ako su izložene mehaničkom stresu one kao reakciono drvo formiraju, tenziono drvo.

Meko drvo je karakteristično za četinare (gimnosperme, konifere). U ovu grupu spadaju: bor, smrča, omorika i drugi četinari. Ove biljke uglavnom brzo rastu, njihovo drvo je svetlije boje, koristi se u drvenoj industriji više od tvrdog drveta.. Kao reakciono drvo, uslovima mehaničkog stresa, formiraju kompresiono drvo.



Slika 1.18. Struktura drveta konifera-mekog drveta (donja slika) i struktura drveta angiospermi -tvrdog drveta (gornja slika)

(http://www.bio.miami.edu/dana/160/160S12_15.html)

Meko i tvrdo drvo se ne razlikuju samo po tome od kojih biljaka potiču, već i po tipu ćelija koje ih izgrađuju. Meko drvo ima jednostavniju strukturu od tvrdog drveta jer ima samo dva tipa ćelija i relativno male varijacije u strukturi unutar njih. Tvrdo drvo je kompleksnije i ima veći broj tipova ćelija i mnogo veći stepen raznovrsnosti unutar njih (slika 1.18.). Osnovne strukturne komponente obe vrste drveta su celuloza, hemiceluloze i lignin, zajedno sa malom količinom pektinskih supstanci (Fengel and Wegener 1989, Alén

2000a). Sadržaj osnovnih komponenti mekog i tvrdog drveta varira kod različitih vrsta i dat je u Tabeli 1.1.

Tabela 1.1.Sadržaj glavnih komponenti drveta (izračunat na suhu masu drveta).(Sun and Cheng 2002)

Tip drveta	Celuloza	Glukomanan	Ksilan	Drugi polisaharidi	Lignin
Meko drvo	33-42%	14-20%	5-11%	3-9%	27-32%
Tvrdo drvo	38-51%	1-4%	14-30%	2-4%	21-31%

Polisaharidi predstavljaju najraznovrsnije i karakteristične komponentu u obe vrste drveta. Ksilan je najzastupljenija hemiceluloza u tvrdom drvetu dok je manan zastupljen u mekom drvetu ali jedan drugog ne isključuju (Puls and Schuseil 1993, Smith and Harris 1999, Saha 2003, Willför et al. 2005b, Dey and Brinson 1984)

Hemiceluloze mekog drveta

Sadržaj i vrsta hemiceluloza u mekom drvetu razlikuju se značajno od hemiceluloza u tvrdom drvetu. Prosečan stepen polimerizacije hemiceluloza je približno 200 jedinica.

Osnovna celuloza mekog drveta je galaktoglukomanan koja čini oko 20% suve mase ćelijskih zidova ovih vrsta. Kostur predstavlja linearni lanac sastavljen od (1-4)-vezane β -D-glukopiranoze i β -D- manopiranoze. α -D-galaktopiranozni ostaci su (1-6)-vezani za manopiranozne jedinice. Glavna karakteristika je da su C-2 i C-3 pozicije u osnovnom lancu delimično O-acetilovane. Ove acetil grupe se lako uklanjaju baznim tretmanima. Galaktoglukomanan u mekom drvetu je podeljen na dva tipa koji se razlikuju u količini galaktoze. Frakcija sa manjom količinom galaktoze ima odnos galaktoza:glukoza:manoza 0.1:1:4, dok frakcija sa većom količinom galaktoze ima odnos 1.1.3. Manja frakcije se obično nazivaju samo glukomanan (Lawoko 2005).

Druga hemiceluloza po zastupljenosti u mekom drvetu je arabinoglukuronoksilan i čini 5-10% suve mase drveta. Sastavljena je od mreže koja sadrži (1-4)- β -D-ksilopiranozne jedinice koje su delimično supstituisane na C-2 atomu sa 4-O-metil- α -D-glukuronskim kiselinskim grupama. Mreža takođe sadrži 1,3 ostatke α -L-arabinofuranoze na svakoj desetoj ksiloznoj jedinici. Zbog ovakve furanozne strukture arabinoznih bočnih lanaca, ona se lako hidrolizuje pomoću kiseline.

Iako se pektinske supstance ne ubrajaju u hemiceluloze, njih je jako teško izdvojiti i međusobno razlikovati. Pektinski polisaharidi se uglavnom sastoje iz D-galaktosiluronske kiseline, D-galaktoze, L-arabinoze i L-ramnoze. Pektinske supstance uglavnom su lokalizovane u primarnom zidu i srednjoj lameli.

Hemiceluloze tvrdog drveta

Glukuronoksilan predstavlja glavnu hemicelulozu u tvrdom drvetu. Glukuronoksilan čini 15-30% suve mase, u zavisnosti od vrste drveta. Njegov kostur je izgrađen od (1-4)-vezanih β -D-ksilopiranoznih jedinica

Glukomanani čini 2-5 % suve mase tvrdog drveta. On je izgrađen od β -D-glukopiranoznih i β -D-manopiranoznih jedinica povezanih (1-4) vezama. Odnos glukoze i manoze varira u zavisnosti od biljne vrste i to od odnosa glukoza:manosa 1:2 do 1:1 (Buckeridge et al. 2000b, Willför et al. 2005b).

Lignin u tvrdom i mekom drvetu

Tvrdo drvo, meko drvo i stablo trava (monokotile) se razlikuju i po količini i po sastavu lignina u njima

Lignin predstavlja 27-30% suve mase mekog drveta i 20-26% suve mase tvrdog drveta.

Struktura lignina iz mekog drveta predstavlja rezultat polimerizacije koniferil alkohola (G-lignin), dok struktura lignina tvrdog drveta sadrži u sebi uglavnom i gvajacil i siringil monomere (GS-lignin) (tabela 1.5.2), za razliku od trava kod kojih polimerizuju sva tri monolignola (GSH-lignin).

Tabela 1.2. Sastav lignina u različitim biljnim vrstama (Saka and Goring 1988)

	G	S	H
Tvrdodrvo (javor)	12	88	-
Meko drvo (omorika)	94	1	5

Razlike u u građi ćelijskih zidova ove dve vrste posledica su i specifičnih međusobnih interakcija polisaharida i interakcija polisaharida i lignina. Dammstrom sa saradnicima je na osnovu proučavanja ćelijskog zida tvrdog drveta (Dammstrom et al. 2009), pokazao da jedan deo ksilana interaguje sa celulozom dok druga frakcija ksilana (razgranat ksilan (Ruel 2005)) interaguje sa ligninom. Na osnovu FT-IR spektroskopskih proučavanja smrče pronađeno je da glukomanani interaguju jako sa celulozom u ćelijskom zidu mekog drveta i da kod njih ne postoje nikakve interakcije između ksilana i celuloze (Akerholm and Salmen 2001).

Usled mehaničkog stresa dolazi do diferencijacije strukture pri čemu se mogu uočiti dve različite strukture u oba drveta, normalno i reakciono drvo (kod mekog drveta, reakciono drvo se označava kao kompresiono, a kod tvrdog drveta nazivamo ga tenziono drvo). Ove dve strukture, normalno i reakciono drvo, pojavljuju se na dve suprotne strane stabla, i to kod mekog drveta sa donje strane grane, a kod tvrdog drveta na gornjoj strani grane (Donaldson 2008).

1.5.2. Kompresiono drvo

Kompresiono drvo je tvrdo, tamno obojeno drvo, koje se obično nalazi na donjoj strani nagnutih stabala i grana konifera. Ovo reakciono drvo je posledica geotropskog odgovora biljke, kao i odgovora biljke na vetar i naslage snega. Kompresiono drvo ima svoje anatomske i kompozicione osobine koje se menjaju kontinualno od normalnog do jako izraženog kompresionog drveta (Nanayakkara et al. 2009). Glavna karakteristika kompresionog drveta su izmene u strukturi ćelijskog zida. U strukturi drveta dolazi do

porasta MFA, povećanja intercelularnog prostora, porasta lignifikacije i povećanja količine (1→4)-β-galaktana u sekundarnom ćelijskom zidu nakon delovanja mehaničkog stresa (Floyd 2005, Nanayakkara et al. 2009, Brennan et al. 2012)

Kompresiono drvo se javlja u sekundarnom ksilemu svih konifera (Yoshizawa et al. 1986b, Yoshizawa and Idei 1987). Jako izraženo kompresiono drvo je od velikog interesa u drvnoj tehnologiji, jer predstavlja problem u industriji prerade drveta i dobijanja papira, celuloze i kompozitnih materijala (Warensjö 2003, Ban et al. 2004, Akbulut and Nadir 2006, Tarmian 2008).

Jako izražena kompresija drveta dovodi do pojave karakterističnih osobina ćelijskog zida, ultrastrukturnih i anatomskih, u odnosu na normalno drvo, koje uključuju:

- deblji ćelijski zid
- pojava inter-ćelijskog prostora u srednjoj lameli
- deblji S1 sloj
- S2 sloj je podeljen na dva dela, spoljašnji S2L i unutrašnji S2
- visok MFA u S2 sloju
- odsustvo S3 sloja (Wardrop and Dadswell 1955)

Kompozicija ćelijskog zida kompresionog drveta varira postepeno od velike količine lignina i galaktana u jako izraženom kompresionom drvetu do njihove manje količine u blago izraženom kompresionom drvetu (Nanayakkara et al. 2009). U najblažoj kompresionoj formi drveta količina ove dve komponente je skoro ista kao i u normalnom drvetu. Tako se, preko hemijskog sastava ćelijskog zida može pratiti jačina kompresije (Nanayakkara et al. 2009).

Ranija istraživanja kompresionog drveta bila su usmerena na UV apsorpcionu mikroskopiju gde je posmatrana raspodela lignina u njemu (Parham and Côte 1971, Fukazawa 1974). Novija istraživanja imaju prednost jer koriste fluorecentnu mikroskopiju i transmisivnu elektronsku mikroskopiju (TEM) zasnovanu na autofluorescenciji lignina i bojenju drveta kalijum-permanganatom (Singh 1997, Donaldson et al. 1999, Singh and Donaldson 1999).

Poslednjih nekoliko godina, fokus je stavljen na istraživanje prostorne raspodele komponentata ćelijskog zida. Pored lignina, u jako izraženom kompresionom drvetu je

veoma značajan i galaktan koji je prisutan u velikoj količini, približno 14% masenog udela (Nanayakkara et al. 2009). Imunološka istraživanja su pokazala da se galaktan pretežno nalazi u spoljašnjem sloju sekundarnog ćelijskog zida S2L, koji je i visoko lignifikovan (Schmitt et al. 2006, Altaner et al. 2007, Mast et al. 2009, Kim et al. 2010, Donaldson and Knox 2012). Dolazi se do zaključa da i galaktan može imati značajnu ulogu u lignifikaciji. Galaktan takođe može biti korišćen kao indikator kompresije drveta (Altaner et al. 2009, Nanayakkara et al. 2009).

Lignin u kompresionom drvetu

Kompresiono drvo pokazuje značajne promene u raspodeli lignina unutar ćelijskog zida, sa smanjenom lignifikacijom u srednjoj lameli i porastom lignifikacije u spoljašnjem sekundarnom ćelijskom zidu (S2L) (Lange 1954, Wardrop and Davies 1964, Côté et al. 1966, 1968, Parham and Côté 1971, Wood and Goring 1971, Fukazawa 1974, Donaldson et al. 1999, Singh and Donaldson 1999). Kompresiono drvo sadrži veću količinu *p*-hidroksifenil ligninskih jedinica sintetisanih iz *p*-kumaril alkohola. Proučavanja fluorescentnom spektroskopijom i autoradiografijom pokazuju da je ovaj tip lignina zastupljen i u S2L sloju i u srednjoj lameli (Fukushima and Terashima 1991, Donaldson et al. 2010). U normalnom drvetu *p*-hidroksifenil lignin se može naći isključivo u srednjoj lameli (Fujita and Harada 1979, Whiting and Goring 1982, Westermarck 1985, Saito and Fukushima 2005).

Region S2L je karakterističan i za blago i za jako izraženo kompresiono drvo, što pruža mogućnost da se vrše mikroskopska ispitivanja strukturnih promena izazvanih kompresijom (Donaldson et al. 1999, 2004). Unutrašnji deo sekundarnog zida traheida kompresionog drveta malo je više lignifikovan u odnosu na sekundarni zid traheida normalnog drveta. Donaldson i saradnici (1999) su pronašli porast lignifikacije i unutrašnjeg i spoljašnjeg S2 regiona kod bora (*Pinus radiata*). Unutrašnji S2 region u blago izraženom kompresionom drvetu je više lignifikovan od normalnog drveta gde je lignin zastupljen u masenom odnosu 21% (Donaldson 1985).

Polisaharidi u kompresionom drvetu

Celulozni mikrofibrili

Kompresiono drvo ima uglavnom veći MFA u S2 sloju u poređenju sa normalnim drvetom (Wardrop and Dadswell 1955, Gorišek and Torelli 1999, Donaldson et al. 2004, Yeh et al. 2005, 2006°, Donaldson 2008). U blago izraženom kompresionom drvetu bora, MFA je za oko 5° veći od onog u normalnom drvetu, dok je u jako izraženom kompresionom drvetu veći za oko 8° (Donaldson et al. 2004). Yeh i saradnici (2006a) su pokazali da je MFA kompresionog drveta bora (*P. taeda* L.) veći nego MFA u mladom drvetu i da je MFA u mladom kompresionom drvetu veći nego u zreloom kompresionom drvetu.

Kristalnost celuloze je manja u kompresionom drvetu nego u normalnom drvetu (Lee 1961, Scurfield 1973, Timell 1986). U kompresionom drvetu S1 sloj čini 25-30% širine sekundarnog zida dok u normalnom drvetu obuhvata samo 10% (Timell 1986.). Kod blago izraženog kompresionog drveta traheide mogu da imaju S3 sloj (Singh et al. 2003).

Galaktan

Poznato je da u kompresionom drvetu dolazi do povećanja količine (1→4)-β-galaktana, što je i imunolokalizovano u spoljašnjem S2L sloju korišćenjem ML5 antitela (Jones et al. 1997) i u manjoj količini u S1 sloju (Schmitt et al. 2006, Altaner et al. 2007, Mast et al. 2009, Kim et al. 2010, Donaldson and Knox 2012). Količina ovih polisaharida je povezana sa porastom lignifikacije u spoljašnjem S2L sloju u traheidama i blago i jako izraženog kompresionog drveta. U normalnom drvetu, (1→4)-β-galaktani nisu prisutni u sekundarnom zidu ali se mogu detektovati u maloj količini u primarnom zidu i u srednjoj lameli (Donaldson and Knox 2012).

Drugi polisaharidi

Kod kompresionog drveta je redukovana količina manana i ksilana (Nanayakkara et al. 2009). Uz pomoć imunolokalizacije pokazano je smanjenje količine ova dva polisaharida u S2L regionu traheida jako izraženog kompresionog drveta (Kim et al. 2011,

Donaldson and Knox 2012). Smanjenje količine manana i ksilana je samim tim prostorno povezano sa porastom količine galaktana i lignifikacijom (Donaldson and Knox 2012). U normalnom i kompresionom drvetu bora (*Pinus radiata*), sadržaj lignina, galaktana, manoze i glukoze su linearno povezani jedni sa drugima, dok ksiloza i arabinoza pokazuju nelinearnu korelaciju (Timell 1982).

1.6. STRUKTURA ĆELIJSKOG ZIDA KUKURUZA

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jednogodišnja zeljasta monokotiledona biljka iz familije trava (Poaceae). U monokotiledone biljke spadaju razne vrste trava, lala i palmi.

Kukuruz je jedan od ekonomski najznačajnijih i najpristupačnijih monokotila. Stablo kukuruza je jeftin, široko rasprostranjen, stabilan i netoksičan biomaterijal koji predstavlja veliki deo otpadnog materijala u poljoprivredi. Zbog njegove dostupnosti, kukuruz predstavlja jedan od potencijalno najznačajnijih izvora bioenergije. Stablo kukuruza je, takođe, dobar model sistem za ispitivanje strukturnih osobina ove grupe biljaka. Razvoj biotehnologija je omogućio bolje razumevanje strukture i funkcije stabljike kukuruza, tako da se ova biljka danas uveliko koristi kao izvor biogoriva (Barriere 2007). Glavni cilj svih strukturnih istraživanja ćelijskog zida kukuruza je pronalaženje jeftinije i efikasnije procedure koja će omogućiti laku izolaciju etanola iz ove biljke.

Ćelijski zidovi kukuruza sadrže tri glavna strukturna polimera: linearni i kristalni polisaharid (celulozu), razgranati i nekristalni heteropolisaharid (hemicelulozu) i aromatični biopolimer (lignin).

Kukuruz sadrži približno 30 % celuloze, 24 % hemiceluloza i 24 % lignina mereno na suhu masu stabljike. Za razliku od hemiceluloza drvenastih vrsta, kod monokotila je zastupljena velika raznovrsnost veza i nađena su višestruka grananja u hemiceluloznim polimerima (Puls and Schuseil 1993). Glavna hemiceluloza je glukuronoarabinoksilan.

Oko 15 % suve mase stabljike kukuruza predstavlja lignin. U sastav lignina kukuruza uključena su sva tri monolignola i nazivamo ga GSH lignin. U njemu je prisutno 37 % gvajacil (G) jedinica, 60% siringil (S) jedinica i 3 % p-hidroksifenil (H) jedinica, po čemu se monokotile razlikuju od drvenastih vrsta. Lignin monokotila je takođe

karakterističan po visokom sadržaju slobodnih fenolnih grupa (Lapierre 1993). Više od 60 % lignina u stabljikama kukuruza može biti uklonjeno baznim tretmanom na sobnoj temperaturi. Takođe je prisutna količina od oko 5% ferulčnih monomera i dimera u travama i stabljici kukuruza (Grabber et al. 2004). Ferulčne jedinice se prvenstveno esterifikuju sa neceluloznim polisaharidima, kao što je gluronoarabinoksilan. Ferulati i diferulati obezbeđuju mesto za rast ligninskog polimera, preko etarskih veza koje učvršćuju veze lignina sa polisaharidima ćelijskog zida i tako stvaraju jake poprečne veze u zidu (Ralph et al, 1992, Jacquet et al. 1995, Ralph et al. 1995). Ferulati se etarski vezuju za β poziciju G jedinica lignina (Jacquet et al. 1995). Pored gore navedenog, stvaranje dimera ferulata je dovoljno za kovalentno sprezanje dva polisaharidna lanca (Hatfield et al. 1999a) što obezbeđuje još veću čvrstinu ćelijskog zida kukuruza.

Strukturna ispitivanja ćelijskih zidova iz stabljike kukuruza mogu da obezbede informacije koje bi dovele do idejno novih hemijskih, genetskih i bioloških istraživanja koja bi doprinela da se obezbedi efikasnija ekstrakcija šećera iz kukuruza u cilju dobijanja biogoriva.

1.7 KVANTNE TAČKE I NJIHOVA PRIMENA U ISTRAŽIVANJIMA

Kvantne tačke (quantum dots-QDs) su poluprovodne nanočestice koje se već široko primenjuju u biologiji kao fluorescentni obeleživači. One poseduju nekoliko jedinstvenih optičkih i hemijskih karakteristika koje su prikladnije u odnosu na organske fluorescentne sonde (Jaiswal and Simon 2004). One imaju karakteristične luminiscentne i elektronske osobine, kao što su, široki i intenzivni apsorpcioni spektar, uska emisija u spektrima i visoka fotostabilnost (Yu et al. 2006). Osobina koja je od najveće važnosti za biološka istraživanja je njihova mala veličina (2–10 nm). Primena nanočestica-QDs, kao nove tehnike obeležavanja biosistema je već uvedena u istraživanja animalnih ćelija. QDs predstavljaju jednu od prvih nanotehnologija koje se integrišu sa biološkim naukama (Müller et al. 2006, Wu et al. 2007, Lin et al. 2009, Corredor et al. 2009, Santos et al.

2010, Ravindra et al. 2010) i očekuje se njihova sve šira primena u biljnim istraživanjima kao i njihova komercijalizacija.

Krajem 1970. godine napravljene su prvi put nanostrukture koje su imale odgovarajuće elektronske potencijale, tunel efekat i optičke apsorpcione osobine. Za otkrivanje ovakvih čestica dodeljena je Nobelova nagrada 1973. godine L. Esaki za otkriće ovakvih poluprovodnika i 1985. godine K. von Klitzing-u i saradnicima za otkriće Holovog kvantnog efekta. Nakon toga su se brzo razvijale tehnike tako da je razvijena metoda za dobijanje monoslojnog poluprovodnog kristala a zatim i tehnika kojom je bilo moguće smanjiti njihove dimenzije do nekoliko nanometara. Kasnije, razvojem Transmissionog Elektronskog Mikroskopa (TEM), Skenirajuće Tunelske Mikroskopije (STM) i Mikroskopije Atomskom Silom (AFM) dobijene su informacije o ovim poluprovodnim nanočesticama na atomskom nivou (Sharma et al. 2005, Poole et al. 2004)

Upotreba kvantnih tačaka (QDs) kao obeleživača biljnih ćelija i njihovih ćelijskih zidova kod dobijanja informativnih slika postaje sve popularnija zbog njihove male veličine, svetloće, nezavisnosti emisije od ekscitacije i njihove stabilnosti u različitim stresnim uslovima (Eggenberger et al. 2010, Müller et al. 2006).

Prilikom korišćenja QDs u biološkim istraživanjima, važno je proučiti na koji način se vezuju i kako QDs menjaju strukturu ćelije. Pre primene važno je ispitati i njihovu toksičnost na biljna tkiva. Pored *in vitro* proučavanja QDs, poželjno je naći strukture u biljnim ćelijama koje imaju afinitet da interaguju sa kvantnim tačkama (Lin et al. 2009; Chen et al. 2010). Pošto je u biljnim ćelijama ćelijski zid prva barijera za sve spoljašnje agense postoji veliko interesovanje da se QDs koriste za njegovo obeležavanje (Santos et al. 2010).

2.CILJ RADA

Cilj ovog rada je da objedini različite aspekte i različite metode ispitivanja strukture ćelijskog zida, njegovih fizičkih i mehaničkih osobina, i da doprinose kako fundamentalnim istraživanjima, tako i industrijskoj eksploataciji biljnog lignoceluloznog materijala.

U prvom delu ovog rada biće ispitivan uticaj različitih monomera lignina i njihove količine na strukturu i osobine ćelijskog zida, praćenjem fluorescencije lignin model jedinjenja.

U drugom delu teze poređiće se tri vrse različitih ćelijskih zidova i to ćelijski zid omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) kao primer mekog drveta, javora (*Acer platanoides* L.) kao primer tvrdog drveta i kukuruza (*Zea Mays* L.) kao primer jednogodišnje zeljaste biljke iz familije trava. Cilj nam je da obezbedimo nove podatke o hemijskim i strukturnim karakteristikama ćelijskih zidova različitog porekla, analizom hemijskog uređenja, praćenjem autofluorescencije lignina i praćenjem kristalichnosti celuloze.

Zbog velikog interesovanja da se razvije metoda koja će dati meru kompresije drveta, kako sa stanovišta fiziologije biljaka, tako i industrijske prerade drveta, u trećem delu ovog rada pratićemo sadržaj lignina i promenu u strukturi drveta koji se javljaju u toku kompresije. Korišćenjem fluorescentne mikroskopije i odgovarajućeg matematičkog razlaganja cilj nam je da predložimo metodu za detektovanje jačine kompresije u drvetu.

U četvrtom delu ovog radu biće prikazana potpunija slika o interakciji kvantnih tačaka (QDs) kao nanočestica sa strukturom ćelijskog zida i njegovim komponentama. Ispitivaćemo koja vrsta interakcija postoji između QDs i ćelijskog zida, kao i to da li se one homogeno vezuju za njegovu strukturu u celini. Kvantne tačke se sve više koriste za obeležavanje struktura u biljkama, ali ima još nerazjašnjenih pitanja vezanih za njihove toksične efekte na biljku.

3. MATERIJALI I METODE

Biljni materijal

U ovom radu korišćene su četiri različite biljne vrste. Korišćeni su ćelijski zidovi izolovani iz grana Pančićeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyne, Gymnospermae, drvenasta četinarska vrsta), iz grane javora (*Acer platanoides* L., Angiospermae, Dicotyledones, drvenasta listopadna vrsta) i stabla kukuruza (*Zea Mays* L., Angiospermae, Monocotyledones, žitarica iz familije trava). Za mikroskopska ispitivanja korišćene su transverzalne sekcije dobijene iz drveta bora (*Pinus radiata* D.Don, Gymnospermae, drvenasta četinarska vrsta).

Sinteza lignin model jedinjenja

Sintetisana su tri tipa lignin model polimera označenih sa CF, CP i DHP, iz koniferil alkohola i ferulične kiseline (CF), koniferil alkohola i *p*-kumarične kiseline (CP) i čistog koniferil alkohola (DHP). Sintetisana su dva tipa CF polimera koji se razlikuju u količini koniferil alkohola i ferulične kiseline i to u masenom odnosu 4:1 i 9:1. Koniferil alkohol i *p*-kumarična kiselina su sintetisani u masenom odnosu 9:1. Čist polimer koniferil alkohola - DHP sintetisan je iz čistog koniferil alkohola, po proceduru koju su dali Freudenberg (1956) i Wayman i Obiaga (1974) i dalje opisali Radotić i saradnici (1994, 1998).

Napravljena je reakciona smeša koja sadrži 5×10^{-3} M koniferil alkohola, ferulične kiseline ili *p*-kumarične kiseline, 5×10^{-3} M peroksida (H_2O_2) i 2.5×10^{-8} M peroksidaza dobijena iz rena (HRP) u 50 mM fosfatnom puferu. Rastvor monomera, peroksida i peroksidaze pripremljen je u fosfatnom puferu pH=7.2. Reakciona smeša dobijena je simultanim dodavanjem rastvora peroksida i monomera u rastvor peroksidaze u fosfatnom puferu. Ukupna zapremina svake reakcione smeše bila je 100 ml. Reakciona smeša mešana je 48 h neprekidno kako bi se reakcija odigrala do kraja. Suspenzija dobijenog polimera

centrifugirana je na 1500 x g. Talog je ispran u dejonizovanoj vodi i recentrifugiran dva puta. Dobijeni materijal sušen je na vakuumu 8 h na temperaturi od 20°C.

Izolacija ćelijskog zida

Za sve vrste uzoraka primenjena je ista procedura izolacije ćelijskih zidova. Biljni materijal je sušen 72 h na 80 °C i samleven u fini puder. Uzorak od 400 mg dobijenog materijala homogenizovano je 60 min u 80% metanolu, na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje. Dobijeni ekstrakt je centrifugiran 5 min na 1500 obrtaja/minuti. Uzorak je ekstrahovan dva puta sa 80% metanolom i dalje tretiran nizom rastvarača. Talog je ispiran dva puta 80% metanolom, zatim po jedan put rastvorima 1M NaCl i 0.5% Triton X-100, dva puta destilovanom vodom i 100% metanolom i dva puta 100% acetonom (Chen et al. 2000). Svako ispiranje je bilo u ukupnoj zapremini od 20 ml i trajanju od 30 min. Da bi ekstrakcija ćelijskog zida bila što efikasnija prilikom tretmana određenim rastvaračem korišćen je FastPrep-24 Sistem (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Instrument je prilagođen sa adapterom za tube od 50 ml, BigPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Svaki uzorak je tretiran 30 s, brzinom 4.5 m/s u BigClean tubama od 50 ml napunjenih matricom od inertnih čeličnih kuglica (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA).

FastPrep-24 se već dugo koristi za homogenizaciju biljnih tkiva, i to naročito u molekularnoj biologiji za izolaciju nukleinskih kiselina (Haymes et al. 2004). FastPrep-24 instrument i njegove tube obezbeđuju brzu i efikasnu destrukciju biljnog ćelijskog zida.

Priprema biljnog materijala za mikroskopiju

Za ispitivanje uzoraka metodom konfokalne mikroskopije, korišćena su tri uzorka bora. Uzorkovani su: zrelo normalno drvo, blago izraženo kompresiono i jako izraženo kompresiono drvo. Pre mikroskopskih merenja uzorci su fiksirani u formalin acetoalkoholu (FAA). Fiksativ FAA ne utiče na fluorescentna svojstva drveta. Uzorci su pre mikroskopije isprani u dejonizovanoj vodi i dobijene su transverzalne sekcije debljine 60

μm uz pomoć mikrotoma. (Ovaj deo eksperimenta uradio je dr Lloyd Donaldson, institut Scion, Novi Zeland).

Pripremanje uzoraka holoceluloze (dobijanje celuloze bez lignina)

Iz ćelijskih zidova traheida u normalnom drvetu, pripremljeni su uzorci holoceluloze. Transferenzalne sekcije normalnog drveta debljine $60 \mu\text{m}$ su delignifikovane tj. tretirani parasircetnom kiselinom na 90°C približno 4h, do potpunog gubitka boje (Donaldson et al. 1988). Uzorci holoceluloze ispirani su intenzivno u vodi i pripremljeni za mikroskopiju u glicerolu kao cela vlakna. Snimljeni su FT-IR spektri vlakana kako bi se potvrdilo odsustvo lignina (Faix 1992). Zajedno sa uzorkom holoceluloze ispitivani su i uzorci pamučnih vlakana (Sigma Chemicals), nitroceluloze, pektina (Serva) i galaktomanana (Sigma Chemicals). (Ovaj deo eksperimenta uradio je dr Lloyd Donaldson, institut Scion, Novi Zeland)

Sinteza CdSe kvantnih tačaka

CdSe kvantne tačke pripremljene su po sledećoj proceduri. Kadmijum oksid (CdO) i tetradecil fosforna kiselina (TDPA) su upotrebljeni kao Cd prekursori i trioktilfosfilselenid kao Se prekursor.

CdSe QDs dobijene su pirolizom Cd i Se prekursora u koordinatnom rastvaraču, trioktinfosfil oksidu (TOPO), na visokoj temperaturi ($270\text{--}320^\circ\text{C}$). QDs su sakupljene metodom selektivnog taloženja po veličini u metanolu i sušene su na vakuumu. U svim eksperimentima korišćene su CdSe QDs prosečne veličine 3.5 nm , čija je veličina određena pomoću Transmissionog Elektronskog Mikroskopa (TEM). Određivanje prosečne veličine čestice i raspodela veličina dobijeno je korišćenjem Scion Image softvera (verzija 4.0.4) iz sirovih TEM slika. QDs su rastvorene u hloroformu (HPLC čistoće, Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). (Ovaj deo eksperimenta odrađen na Odseku za hemiju Univerziteta u Majamiju, i ovako pripremljene CdSe QDs dobijene su od dr. Rogera Leblanac-a)

Vezivanje QDs za ćelijski zid

Izolovan ćelijski zid dobijen je iz grana Pančičeve omorike.

Rastvor CdSe QDs (50 mM) i izolovan ćelijski zid mešani su na tri načina, koji se međusobno razlikuju u redosledu dodavanja komponenti (ćelijski zid, CdSe QDs u hloroformu i voda). U prvom eksperimentu pomešan je rastvor QDs u hloroformu (5 μ l) sa suvim izolovanim ćelijskim zidom (5mg). U drugom i trećem eksperimentu suvom ćelijskom zidu (5 mg) su različitim redosledom dodavani voda i QDs rastvorene u hloroformu (5 μ l). Da bi se dobilo bolje kompleksiranje QDs sa biljnim materijalom ćelijskih zidova, mešavina je homogenizovana korišćenjem FastPrep-24 instrumenta (30 s, brzinom 4.5m/s), bez upotrebe matrice.

Fluorescentna spektroskopija

Fluorescencija i fosforescencija su procesi emisije fotona koji se dešavaju u toku relaksacije molekula iz pobuđenog elektronskog stanja. Ovi procesi uključuju fotonske prelaze između elektronskih i vibracionih nivoa poliatomskih fluorescentnih molekula (fluorofora). Jablonski dijagram (slika 3.1) nudi nam detaljan poregled odgovarajućih prelaza koji se dešavaju prilikom relaksacije molekula do osnovnog elektronskog stanja. Razlike između dva susedna elektronska stanja su reda veličine 10000 cm^{-1} . Svaki pojedinačni elektronski nivo podeljen je u više podnivoa, koji predstavljaju vibracione modove molekula i koji se razlikuju u energiji za približno 100 cm^{-1} . Pri delovanju ultraljubičaste ili vidljive svetlosti na neke molekule, dolazi do pojave sekundarne emisije svetlosti veće talasne dužine od pobudne, koja je karakteristična za svaku pojedinačnu supstancu. Sama pojava je poznata kao fotoluminiscencija.

Fluorescentna spektroskopija predstavlja kombinaciju apsorpcione i emisione spektrometrije. Fizički proces se sastoji u apsorpciji fotona $h\nu_1$ i emisije fotona manje

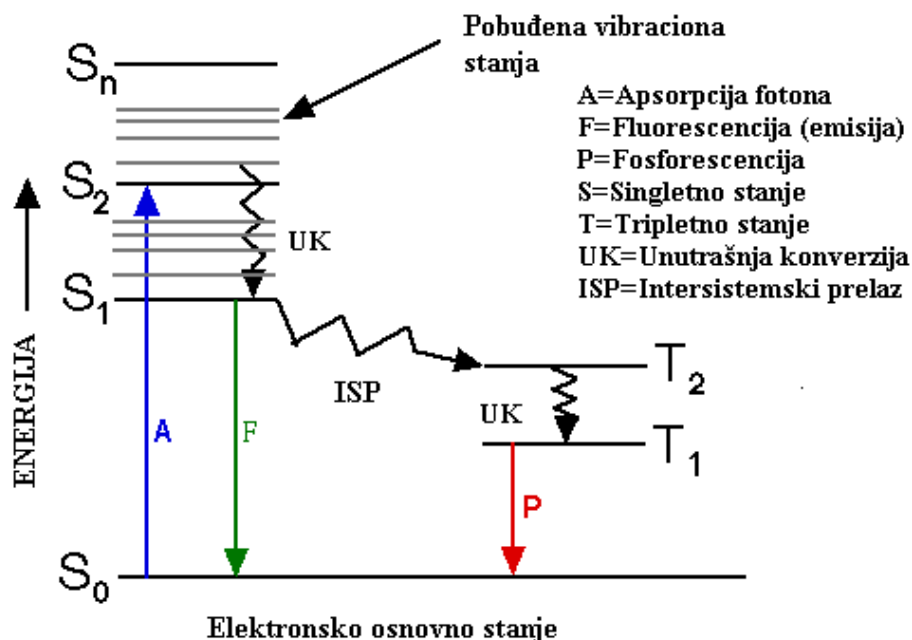
energije $h\nu_2$. Razlika energija se oslobađa dodatnim procesima koji se dešavaju u molekulu. Izgled fluorescentnog spektra zavisi od prirode i agregatnog stanja supstance.

Kod molekula u rastvorima ili u čvrstoj fazi, postoji interakcija između pojedinih molekula, zahvaljujući malim rastojanjima, kod koji su mogući sledeći mehanizmi deekscitacije: vibraciona relaksacija, interna konverzija, fluorescencija, interkombinacioni prelazi i fosforescencija.

Vibraciona relaksacija: Molekul koji se nalazi u nekom od vibracionih stanja pobuđenog elektronskog nivoa može da pređe u osnovno vibraciono stanje istog pobuđenog elektronskog nivoa bilo emisijom infracrvene svetlosti, bilo predajom viška energije u sudaru. Ovaj proces naziva se vibraciona relaksacija i vreme njegovog trajanja je jako 10^{-11} - 10^{-13} s. S obzirom na brzinu ovog procesa on predstavlja dominantan način vibracione relaksacije u rastvoru. Ovaj relaksacioni proces odgovoran je za pojavu Stoksovog pomeraja.

Interna konverzija: Zbog preklapanje ili male energetske razlike između vibracionih nivoa raznih elektronskih pobuđenih stanja, moguće je da dođe do prelaska iz jednog u drugo elektronsko stanje procesom interne konverzije. Verovatnoća interne konverzije zavisi od energetske razlike dva nivoa i sa smanjenjem energetske razlike među nivoima verovatnoća ovog procesa raste.

Fluorescencija: Fluorescencija se kod slobodnih čestica dešava emisijom fotona, prilikom dozvoljenog prelaza između dva elektronska stanja. Kod tečnih i čvrstih stanja prelaz se isključivo dešava sa osnovnog vibracionog nivoa prvog pobuđenog singletnog stanja u osnovno elektronsko stanje. Energija emitovanog kvanta se razlikuje od energije pobudnog zračenja i obično je manja, te je fluorescencija pomerena ka većim talasnim dužinama.



Slika 3.1. Mogući prelazi u molekulima - Jablonski dijagram

Intersistemski prelazi: Intersistemski ili međusistemski prelazi predstavljaju spinski zabranjene prelaze između singletnog i tripletnog nivoa. Dešavaju se između energetski bliskih vibracionih nivoa dva elektronska singlet-triplet nivoa i pri prelazu dolazi do promene spina (fosforescencija).

Fosforescencija: Fosforescencija predstavlja direktnu radijacionu deekscitaciju tripletnog nivoa na singletni osnovni nivo. Proces je spinski zabranjen, što ustvari znači da mu je verovatnoća mala, i to odgovara veoma dugom vremenu života ovog stanja koje je reda veličine $10^{-3} - 10^0$ s. Reč je o metastabilnim nivoima.

Prednosti fluorescentne spektroskopije su u tome što fluorescencija daje signal koji je proporcionalan koncentraciji molekula u uzorku samo u određenom opsegu koncentracija, te je osetljivost proporcionalna intenzitetu upadne svetlosti. Širina spektralne linije u izvoru ne igra bitnu ulogu pošto se posmatra zračenje čiji intenzitet zavisi jedino od intenziteta svetlosti u oblasti u kojoj atom (molekul) apsorbuje.

Ograničenja ove tehnike su vezana za nespecifično rasejanje svetlosti unutar fluorescentnog uzorka, ali se ono može korigovati merenjem rasejanja na različitim talasnim

dužinama. Apsorpcijom svetlosti pobuđuju se samo optički dozvoljeni prelazi, za koje važe određena selekciona pravila.

Instrument za fluorescentnu spektroskopiju uključuje svetlosni izvor (lampa, laser), kućista sa integrisanim optičkim komponentama (monohromatori, filteri) i detektor visoke osetljivosti.

Fluorescentna spektroskopija se može koristiti i za kvalitativnu i za kvantitativnu analizu.

Kvalitativna fluorescencijna analiza se zasniva na činjenici da su položaji maksimuma fluorescentnih traka karakteristični za svaki molekul.

Kvantna efikasnost (Y_F) fluorescencije se definiše kao odnos broja izračenih fotona i broja apsorbovanih fotona. Ona zavisi od prirode rastvarača, koncentracije, temperature i talasne dužine svetlosti kojom se vrši pobuđivanje. Sa povećanjem temperature snižava se intenzitet fluorescencije, jer se povećava verovatnoća neradijativnih procesa deekscitacije.

Kvantitativna analiza se može vršiti u oblasti malih koncentracija. Kod razblaženih rastvora intenzitet fluorescencije raste sa porastom koncentracije do saturacione tačke. Ukupan intenzitet izotropne fluorescencije se može dobiti iz Lamber-Berr-ovog zakona, uz poznavanje kvantne efikasnosti.

$$I_F = Y_F(I_0 - I_0 \exp(-\mu C_x)) \quad 3.1.$$

Ako je ukupan intenzitet apsorbovane svetlosti manji od 5% jednačina se može napisati u prostijem obliku:

$$I_F = 2.303 Y_F I_0 \mu C_x \quad 3.2.$$

gde su Y_F - kvantna efikasnost, I_0 - intenzitet upadne svetlosti, μ - apsorpcioni koeficijent fluorofore na datoj talasnoj dužini i C_x - koncentracija supstance.

Ova jednačina predstavlja osnov za primenu fluorescentne optičke spektroskopije za određivanje koncentracija pojedinih elemenata.

U oblasti velikih koncentracija, dolazi do gašenja fluorescencije usled povećanja broja sudarnih deekscitacija tako da više ne postoji linearnost između koncentracije i intenziteta fluorescencije.

Glavne greške ove metode nastaju usled Rejljevog i Ramanovog rasejanja, odnosno fluorescencije rastvarača.



Slika 3.2. Fluorog-3 spektrofluorimetra (Jobin Yvon Horiba, Paris, France)

Eksperimentalni deo

Fluorescentni spektri dobijeni su uz pomoć Fluorog-3 spektrofluorimetra (Jobin Yvon Horiba, Paris, France) koji ima kao izvor ksenonsku lampu snage 450W i fotomultiplikatorske tube. Lignin model jedinjenja merena su u suvom stanju, bez dodavanja rastvarača, u direktnoj (front-face) konfiguraciji. Otvori za ekscitacione i emisione snopove podešeni su na 4 nm i 2 nm. Spektri su korigovani na tamnu struju. Pri svakom merenju usrednjeno je deset uzastopnih prolaza. Sva merenja su obavljena na temperaturi 25 °C, kontrolisanoj pomoću Peltijeovog elementa.

Procedura merenja emisionih spektara i matematička obrada podataka

Da bi se odredio broj komponenti u integralnom emisionom spektru, koji odgovara broju različitih fluorofora u strukturi, primenjena je specifična procedura prikupljanja podataka. Svaki uzorak je pobuđen različitim talasnim dužinama počevši od 360 nm sa korakom od 5 nm. Sakupljeno je 20 različitih spektara za svaki polimer sa ekscitacionim talasnim dužinama u opsegu od 360 nm do 445 nm. Za svaki uzorak nadjen je optimalan broj Log-normal komponenti (Radotić et al. 2006, Kalauzi et al. 2007, Siano and Metzler 1969, Djikanović et al. 2007) i izabran je optimalan broj komponenti za datu emisionu spektralnu analizu. Nelinearno fitovanje svih fluorescentnih spektara dobijenih za jedan uzorak, urađeno je uz pomoć Nelder-Mead simplex algoritma koji je sastavni deo Matlab

6.5 i koji je dodatno razvijen od strane Kalauzi A.. Za svaki uzorak, pozicije maksimuma komponente, dobijenih za seriju spektara, tretirane su kao slučajne promenljive. Da bi se izračunala približna raspodela gustine verovatnoće za pozicije svih komponenta, konstruisali smo odgovarajući histogram pozicija maksimuma komponenti. Pošto profil histograma tj. pozicije i relativne amplitude histograma zavise od broja intervala na apscisi, iz tog razloga smo izračunavali približnu verovatnoću gustine raspodele (APD), usrednjavanjem histogramskih veličina za set histograma sa promenljivim apscisnim intervalom. Broj intervala variran je od $h_n=2, \dots, h_{max}$ gde h_{max} definiše najfinije rezultat analize (Radotić et al. 2006, Kalauzi et al. 2007).

Za svaki uzorak primenjena je ista procedura kako bi se dobio optimalni broj komponenti za matematičku obradu datih spektralnih podataka.

Fluorescentna mikroskopija

Fluorescentne slike ćelijskog zida dobijene su pomoću Axio Observer Z1 mikroskopa (Carl Zeiss, Jena, Germany). Korišćen je 365/445 nm ekscitaciono/emisioni filter (49 DAPI- (4,9-diamidino-2-fenilindol)). Ova ekscitacija je karakteristična za autofluorescenciju ćelijskog zida koja potiče od lignina kao glavne fluorescirajuće komponente (Albinsson 1999). Uzorci ćelijskog zida (5mg) su postavljeni na staklene mikroskopske pločice. Snimane su dve vrste uzoraka: suv ćelijski zid i ćelijski zid sa dodatim rastvorom QDs rastvorenih u hloroformu (5 μ l). Osvetljenost dobijenih slika je izračunata uz pomoć odgovarajućeg softvera.

Konfokalna mikroskopija

U eksperimentima korišćen je Leica SP2 konfokalni mikroskop sa dve ekscitacione talasne dužine, i to u UV oblasti (350-365 nm) i u oblasti plave ekscitacije na 488 nm. Dobijene su slike 512x512 piksela sa 10 usrednjavanja, i korišćen je objektiv sa uvećanjem 63x1.2. Spektralne slike su analizirane pomoću softvera Digital Optics V++. (Ovaj deo eksperimenta uradio je dr Lloyd Donaldson, institut Scion, Novi Zeland)

Dobijanje spektralnih slika i podataka na konfokalnom mikroskopu

Dobijeni su spektri normalnog, blago izraženog i jako izraženog kompresionog drveta, a takođe i spektri holoceluloze iz pripremljenih uzoraka normalnog drveta. Spektralni interval širine 20 nm daje zadovoljavajući signal, sa dovoljno informacija, u toku datog vremena sakupljanja podataka. Ukupno vreme trajanja snimanja pojedinačnog spektra je oko 35 minuta. Kod konfokalne mikroskopije, sekvence talasnih dužina za svaki uzorak dobijene su usrednjavanjem intenziteta osvetljenosti u punom dinamičkom opsegu (opseg nivoa sivog od 0-255) kako bi se dobio optimalan odnos signal/šum. Da bi se izbegao efekat niske osetljivosti na osvetljenost (sjajnost), kako bi se mogle porediti spektralne razlike između uzoraka, podaci su normalizovani tako što su prevedeni u procenat u odnosu na maksimalnu vrednost.

Efekat pozadine je odzet u svakom snimljenom spektru. Spektralne sekvence su nakon toga analizirane na dva načina. Ukupan spektar je dobijen izračunavanjem srednjeg osvetljenja za svaki pojedinačni piksel (nivo sivog iznad 10), za svaku sliku u nizu (Moëll and Donaldson 2001). Na ovaj način meren je svaki pojedinačni piksel na spektralnoj slici. Veličina površine za delove ćelijskog zida bila je minimum 7 piksela kako bi se dobili reprezentativni i potpuni podaci.

Kako bi se obezbedilo merenje relativne osvetljenosti različitih uzoraka, snimljen je set kalibracionih slika u opsegu talasnih dužina od 480-500 nm (Zwier et al. 2004). Ovo je urađeno tako što je uzet najsvetliji uzorak- jako izraženo kompresiono drvo i pri tom podešen detektor na pun dinamički opseg. Dobijene su slike normalnog drveta i holoceluloze u istom opsegu talasnih dužina i u istim instrumentalnim uslovima tako da osvetljenost uzorka pokazuje razlike u fluorescentnom intenzitetu u poređenju sa kompresionim drvetom. Intenzitet spektara je tada korigovan korišćenjem referentne slike relativne osvetljenosti (Zwier et al. 2004). Osvetljenost je tada merena kao usrednjena osvetljenost piksela za sve piksele čiji je nivo sivog veći od 10 (greja). (Ovaj deo eksperimenta uradio je dr Lloyd Donaldson, Novi Zeland).

Razlaganje spektralnih podataka dobijenih konfokalnom mikroskopijom

Kako bi obezbedili statistički odgovarajuće podatke za matematičko modeliranje, snimano je 10 različitih traheida duž vidnog polja i to na 5 različitih mesta za sva tri regiona u ćelijskom zidu sa deset ponavljanja (srednja lamela SL i S2 sloj za normalno drvo i S2L sloj za kompresiono drvo). Ovi spektri su razlagani na različit broj Log-normal komponenti i to od dve do sedam pri čemu je izabran optimalan broj komponenti koji će dati reprezentativan model (Siano and Metzler 1969, Radotić et al. 2006, Djikanović et al. 2007a,b, Kalauzi et al. 2007).

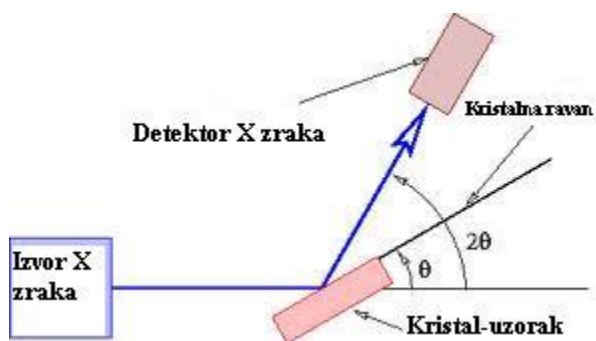
Nelinearno fitovanje svih fluorescentnih spektara izvršeno je pomoću Nelder-Mead algoritma u Matlabu 6.5. Za svaki region u ćeliji (ML, S2 i S2L), pozicija maksimuma komponenti, dobijenih za seriju spektara merenih na 10 traheida, tretirani su kao slučajne promenljive. Primenjena je ista procedura za dobijanje optimalnog broja komponenti kao i kod stacionarne fluorescentne spektroskopije.

Rentgenostrukturalna analiza

Rendgenska strukturalna analiza (RSA) je tehnika za ispitivanje kristalnih supstanci, koja koristi difrakcionu sliku (difraktogram) dobijenu rasejavanjem X-zraka (10^{-9} - 10^{-11} m) na ispitivanom uzorku. Osnovni cilj RSA je određivanje kristalne i molekulske strukture (dužine veza između atoma, uglova među vezama, apsolutne konformacije, tipova rešetke) ispitivanog uzorka.

Osnovni uslov koji treba ispuniti da bi došlo do difrakcije elektromagnetnog zračenja jeste da talasna dužina zračenja i dimenzije rešetke budu bliske. To je zadovoljeno jer je talasna dužina X-zračenja, što je istog reda veličine kao i razmak susednih ravni u kristalnim regionima ćelijskog zida (1-10 Å).

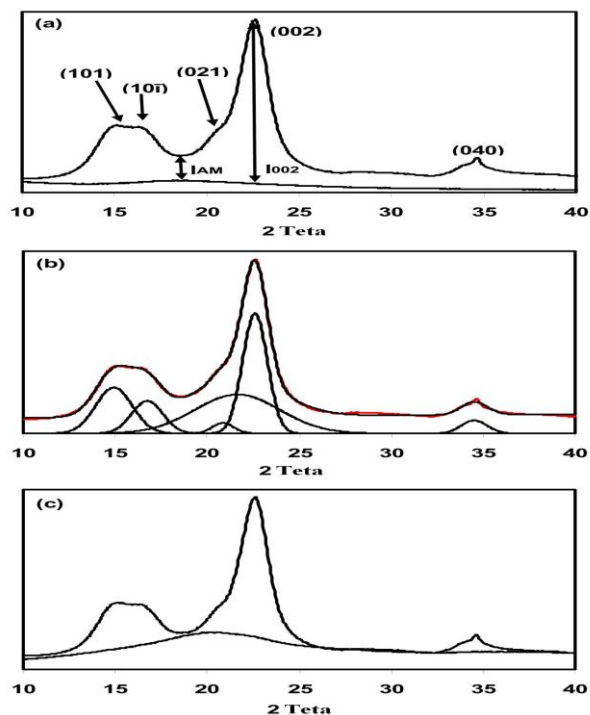
Kada rendgenski zraci padnu na kristal, atomi ili joni počinju da deluju kao novi, sekundarni izvori zračenja (Hajgensov princip), tj. dolazi do rasipanja rendgenskih zraka na elektronskim oblacima atoma. Između rasutih zraka dolazi do interakcije pri čemu se deo talasa pojačava, a deo slabi ili poništava i ta pojava poznata je kao difrakcija.



Slika 3.3. Princip metode rengenostrukturne analize

Izračunavanje kristaličnosti uzorka

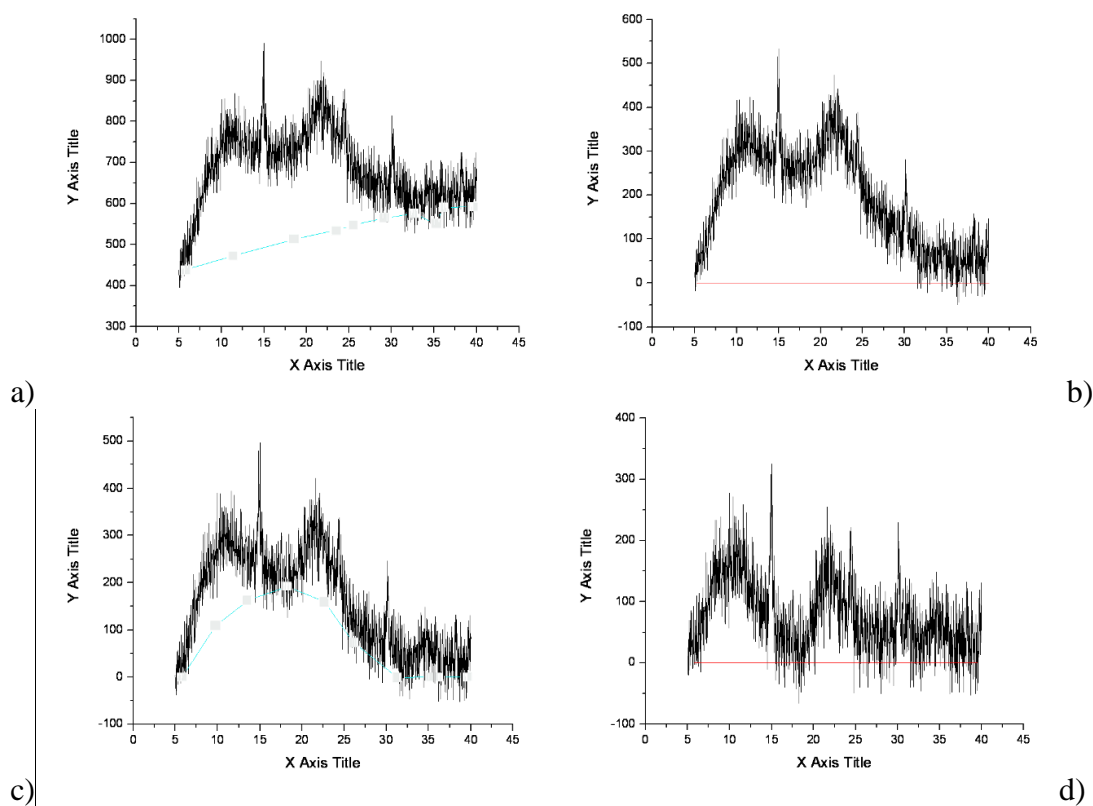
Postoje tri različita metoda određivanja kristaličnosti na osnovu difrakcije X zračenja: metoda visine pika, metod razlaganja spektara i metoda oduzimanja amornog dela celuloze (Nara i Komiya 1983, Nisizawa 1973; Park et al. 2010).



Slika 3.4. Prikazana su tri moguća načina za određivanje kristaličnosti celuloze a)Metod visine pika b)Metod razlaganja spektara c)Metoda oduzimanja amornog regiona.(Park et al. 2010)

U ovom radu stepen kristaličnosti uzorka određen je pomoću metode koju su dali Nara i Komiya (1983), zasnovan na metodi oduzimanju amornog dela.

Dobijeni originalni spektar (slika 3.5.a) prvo je korigovan na baznu liniju (slika 3.5.b). Oduzet je amorfni deo ispod spektralne krive. Oduzimanje je ponovljeno sedam puta i uzeta je srednja vrednost kako bi se dobili što precizniji rezultati (slika 3.5.c). Oduzimanjem amornog dela na difraktogramu ostaje samo kristalni deo uzorka (slika 3.5.d).



Slika 3.5. Određivanje kristaličnosti: a) original difraktogram, b) difraktogram korigovan na baznu liniju, c) određen amorfni deo difraktograma, d) oduzet amorfni deo pri čemu se u difraktogramu vidi samo kristalni deo

Integraljenjem krive d) i krive b) i njihovim deljenjem dobijamo veličinu kristaličnosti celog uzorka.

$$k = \frac{f_{d2\theta}}{f_{b2\theta}} \quad 3.3$$

Eksperimentalni deo

Strukturna analiza uzoraka vršena je metodom difraktometrije praha na uređaju Siemens D500, korišćenjem $\text{CuK}\alpha$ zračenja u kombinaciji sa Ni-filterom za uklanjanje $\text{CuK}\beta$.

Kvalitativna analiza difraktograma, odnosno identifikacija faza, vršena je uz pomoć pratećeg softvera (EVA Diffrac^{Plus}, Bruker) i baza podataka difraktograma (JCPDS-ICDD PDF database).

FT-IR spektroskopija

FT-IR spektroskopija je brz, neinvarzivni spektroskopski metod koji može kvalitativno i kvantivno da otkrije veliki broj funkcionalnih grupa kao što su karboksilni estri, fenolni estri, proteinski amidi i karboksilne kiseline, i može da obezbedi kompleksni „otisak prsta“ ugljenohidratnih i fenilpropanoidnih konstituenata ćelijskog zida i donekle da predvidi njihovu organizaciju (McCann et al. 1992, 1997, Sene et al. 1994)

Infracrvena spektroskopija se zasniva na činjenici da molekuli apsorbuju na specifičnim frekvencijama, koje su karakteristika njegove strukture. Oni apsorbuju na rezonantnim frekvencijama tj kada je frekvencija apsorbovanog zračenja jednaka frekvenciji veze ili grupe koja vibrira. Energije su određene oblikom molekulske potencijalne energije, masom atoma i vibracionim sprezanjem.

U Born-Openhajmerovoj aproksimaciji tj kada se molekulski Hamiltonijan koji odgovara elektronskom osnovnom stanju može aproksimirati harmonijskim oscilatorom u blizini ravnotežne molekulske geometrije, tada su rezonantne frekvencije određene normalnim modovima koji odgovaraju molekulskom elektronskom stanju površine potencijalne energije. Rezonantne frekvencije zavise od jačine veze i atomskih masa i na taj način se vibracione frekvencije mogu pridružiti određenim tipovima veza.

Molekul može da vibrira na mnogo načina i svaki od njih se naziva vibracioni mod. Za molekule sa N atoma, linearni molekuli imaju $3N-5$ stepeni slobode, dok nelinearni imaju $3N-6$ vibracionih stepeni slobode tj vibracionih modova. Kompleksni molekuli imaju veliki broj vibracionih modova povezanih sa specifičnim vrstama veza i funkcionalnim grupama, koje uključuju simetrično i antisimetrično istežanje, savijanje, ljuljanje, previjanje i uvijanje.

Kako bi vibracioni mod molekula bio "IR aktivan", on mora biti povezan sa promenom dipola. Permanentni dipol nije neophodan, već samo promena dipolnog momenta. Infracrveno zračenje će se apsorbovati kada oscilujući dipolni moment koji odgovara određenoj molekulskoj vibraciji interaguje sa električnim vektorom ovog zračenja. Veza mora biti asimetrična (Williams and Fleming 1980).

Interferogram i odgovarajući spektar su međusobno matematički povezani preko Furijeove transformacije. Pomoću FT dobijamo spektar koji direktno prikazuje intenzitet apsorpcije u funkciji talasnog broja.

FT-IR intenzitet i izračunavanje koncentracija komponenti

Intenzitet FT-IR traka za izotropne uzorke može biti opisana sledećom jednačinom

$$I = K\nu^4 \sigma I_0 \exp(-E_i/kT) C_a V \quad 3.4$$

Gde je K konstanta, ν je apsolutna frekvencija FT-IR trake, σ je površina preseka, I_0 intenzitet upadnog snopa, $\exp(-E_i/kT)$ je Bolcmanov faktor za traku i, C_a je analitička koncentracija, V je zapremina ozračenog uzorka. Bez obzira što intenzitet dat u gornjoj jednačini zavisi od mnogo faktora, za dati eksperiment, ako se uzorci nalaze u fiksnoj geometriji i pri konstantnom pobudnom I_0 intenzitetu, gornja jednačina se redukuje na:

$$I = K' V C_a \quad 3.5$$

U jednačini 3.5., K' je nova konstanta za svaku traku ili interval talasnih brojeva. Ako je konstantna zapremina uzorka onda se gornja jednačina može dodatno uprostiti:

$$I = K'' C_a \quad 3.6$$

pokazujući da je intenzitet trake u direktnoj proporcionalnosti sa koncentracijom, pri čemu se ovaj rezultat može smatrati prihvatljiv za kvantitativnu analizu. Ovi svi uslovi su

ispunjeni u našem merenjima pomoću ATR tehnike tako da intenziteti ligninske i celulozne trake mogu biti pokazatelji njihove koncentracije (Agarwal 2006).

Kvalitativna analiza vrši se pomoću identifikacijom položaja (talasnih brojeva) apsorpcionih traka.

U ovom radu prikazana je kvalitativna i kvantitativno proučavanje FT-IR spektara.

Eksperimentalni deo

FT-IR spektri suvog ćelijskog zida snimljeni su pomoću Nicolet 6700 spektrometra tehnikom smanjenja totalne refleksije (ATR).

Gel propustljiva hromatografija

Gel propustljiva hromatografija (GPC) predstavlja hromatografsku metodu koja odvaja analite na osnovu njihove veličine. Često se koristi za analizu polimera. Za razliku od drugih hromatografskih tehnika koje su zasnovane na fizičkim ili hemijskim interakcijama, ova metoda odvaja komponente u smeši na osnovu veličine čestica korišćenjem materijala koji u sebi sadrže pore različitih dimenzija upakovane u kolone (stacionarnu fazu).

Postoji ograničen opseg molekulskih masa koje se mogu odvojiti pojedinačnom kolonom i zato veličina pora za odvajanje treba da bude izabrana u skladu sa opsegom molekulskih masa koje želimo da razdvojimo. Ponekad je neophodno koristiti nekoliko GPC kolona koje su usklađene jedna sa drugom kako bi se dobilo potpuno razdvajanje ispitivanog uzorka.

Instrumentalni deo

GPC hromatografija se ne razlikuje od drugih tečnih hromatografija. Uzorak se rastvara u odgovarajućem rastvaraču, obično organskom i nakon filtriranja rastvor se ubrizgava u kolonu.

Razdvajanje višekomponentne smeše se odigrava u koloni. Uz pomoć pumpe se omogućava kontinualno dodavanje svežeg eluenta. Često se koristi višestruki detektor kako bi dobili što kvalitetnije informacije o uzorku.

Rezultujući difraktogram predstavlja raspodelu mase polimera u funkciji retencione zapremine.

Osnovni pojmovi u gasnoj hromatografiji su:

1) Gel koji se koristi kao stacionarna faza za GPC. Veličina pora u gelu mora biti pažljivo kontrolisana kako bi se omogućilo dobro odvajanje komponenti. Poželjno je da su u gelu odsutne jonizujuće grupe.

2) Eluent je mobilna faza i treba da bude dobar rastvarač za polimer, i da omogući dobro kvašenje gela i da obezbedi dobar signal detektoru. Najčešće korišćeni eluenti su tetrahidrofuran (THF), *O*-dihlorbenzen i trihlorbenzen na 130-150°C za kristalne polialkine, i *m*-krezol i *O*-hlorfenol na 90°C za kristalne kondenzovane polimere kao što su poliamidi i poliestri.

3) Pumpe: Postoje dva tipa pumpi koje se koriste kod GPC tehnike: klipne i peristaltičke.

4) Detektori: Koncentracija polimera može kontinualno da se prati uz pomoć detektora. Detektore možemo podeliti u dve klase: koncentraciono osetljivi detektori i detektori osetljivi na molekulske mase. Za tačno određivanje sastava polimera najbolje je koristiti oba detektora u nizu.

Eksperimentalni deo

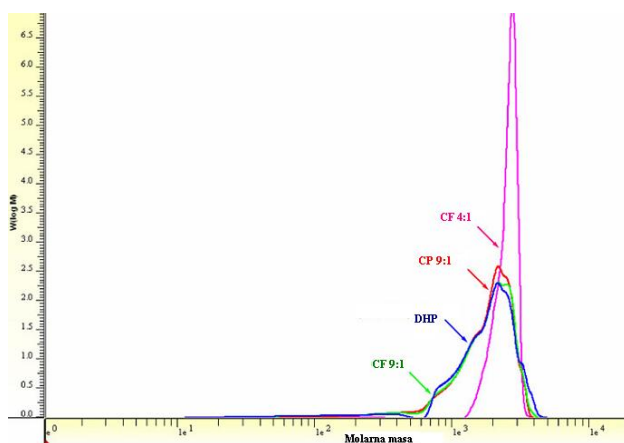
Molekulske mase polimera i njihova raspodela određeni su GPC-gel propustljivom hromatografijom korišćenjem Agilent 1100 Series sistema sa refraktivnim indeksom i diodnim detektorom. Korišćena je kolona ZORBAX PSM 300, 250 x 6,2mm, 5µm sa opsegom molekulskih masa od 3×10^2 do 3×10^5 g mol⁻¹. Radna temperatura bila je 25 °C. Kao eluent korišćen je tetrahidrofuran (brzina eluiranja 1 cm³ min⁻¹). Prosečne molekulske mase M_w i M_n i polidisperzni indeks Q određeni su uz pomoć softvera Agilent ChemStation. Za dobijanje kalibracione krive korišćen je polistiren standard. (Ova merenja su rađena na Odseku za inženjering materijala, Tehnološki fakultet Univ. u Novom Sadu).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. STRUKTURNE RAZLIKE IZMEĐU RAZLIČITIH LIGNIN MODEL POLIMERA

REZULTATI

Raspodela molekulskih masa sintetisanih polimera pokazana je na slici 4.1.1. Razlike u raspodeli molekulskih masa posmatrane su kao posledica različitih odnosa monomera u različitim polimerima.



Slika 4.1.1. Raspodela molekulske mase polimera sintetisanih različitom kombinacijom polaznih monomera: CF 4:1 (koniferil alkohol i ferulična kiselina u masenom odnosu 4:1), CF 9:1 (koniferil alkohol i feruličnakiselina u masenom odnosu 9:1), CP 9:1 (koniferil alkohol i *p*-kumarična kiselina u masenom odnosu 9:1) i DHP (čist koniferil alkohol)

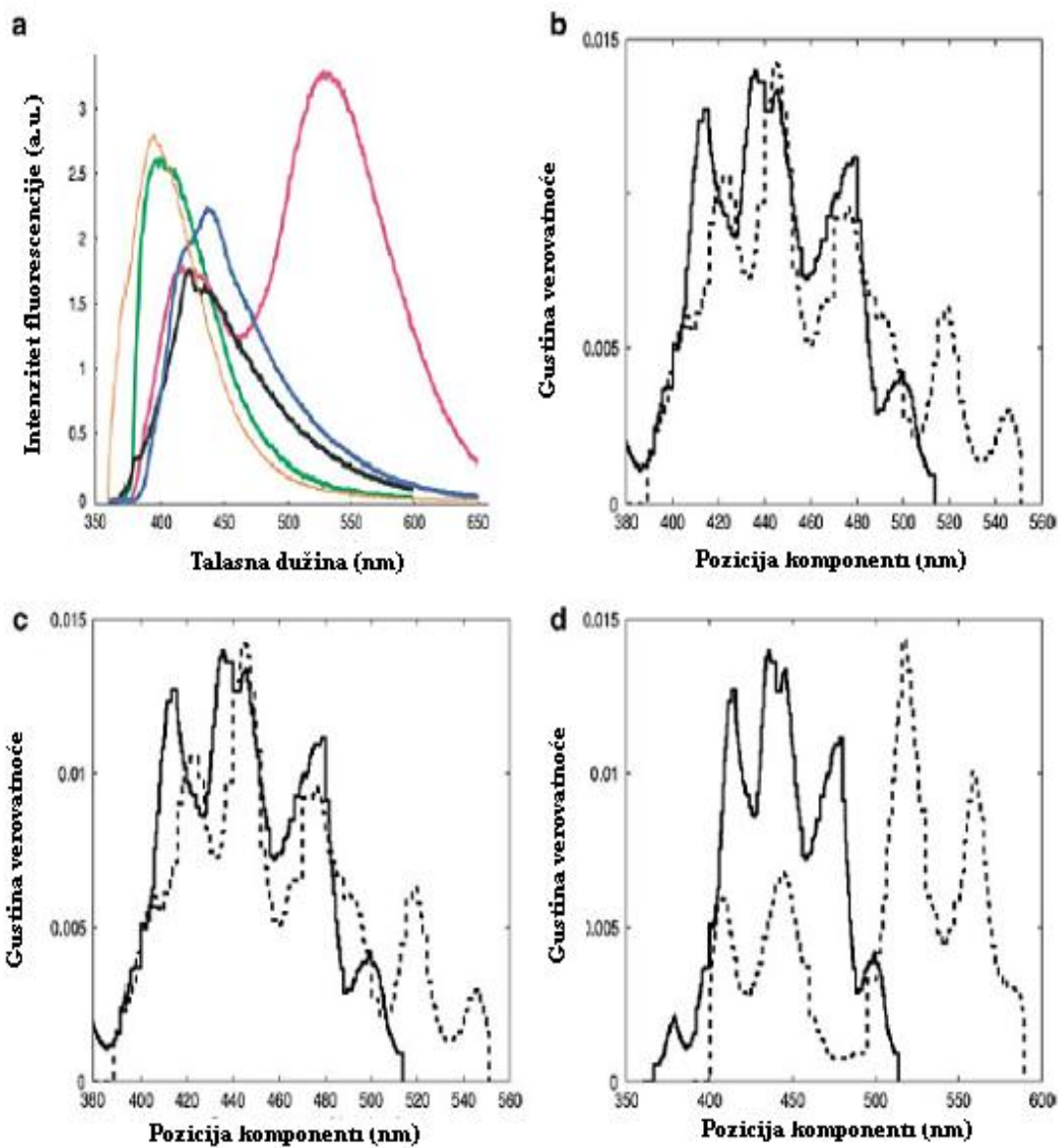
CF polimer sa masenim odnosom komponenti 9:1 pokazuje pomeraj pika raspodele molekulskih masa u odnosu na čist polimer DHP. Veličine prosečnih molekulskih masa M_w i M_n i polidisperznost Q za sva četiri lignin model polimera, baziranih na koniferil alkoholu, feruličnoj kiselini i *p*-kumaril alkoholu prikazana su u tabeli 4.1.1. Uzorci

pokazuju znatne razlike u molekulskoj masi M_n , od 1459 do 2432 g mol^{-1} i M_w u opsegu od 1893 g mol^{-1} do 2516 g mol^{-1} . Ovi rezultati pokazuju da, količina i vrsta monomera u reakcionoj smeši ima direktan uticaj na molekulsku masu dobijenih lignin model jedinjenja. Pored toga, rezultati pokazuju da postoje razlike i u polidisperznosti i kreću se u opsegu 1.034 do 1.297. Polidisperznost je najviša u polimeru CF 9:1 i CP 9:1 u kojima se i vidi da postoje najmanje dve različite frakcije. Ovo odgovara rezultatima GPC hromatografije ovih uzoraka gde kod CF 9:1 polimera se pojavljuju dva pika sa različitim retencionim vremenima i to od 5.70 i 5.87 minuta. Zamenom ferulične kiseline sa *p*-kumaričnom, pomera se hromatografska kriva za dobijeni polimer ka nižim molekulskim masama i pokazuje širu raspodelu molekulskih masa. Suprotno CF 9:1 polimeru, malo veća prosečna molekulska masa i niža polidisperznost javlja se kod polimera CF 4:1, u kome je prisutna veća količina ferulične kiseline.

Na osnovu GPC rezultata, polimeri mogu biti podeljeni u dve grupe, na osnovu broja frakcija i sličnosti u molekulskoj masi. Prva grupa uključuje DHP, CF 9:1 i CP 9:1 dok se u drugoj grupi nalazi CF 4:1.

Tabela 4.1.1: Molekulske mase (M_w i M_n) i polidisperznost (Q) date za proučavane polimere zasnovane na različitim odnosima CF 4:1 i CF 9:1 – polimeri sintetisani od koniferil alkohola i ferulične kiseline u masenim odnosima 4:1 i 9:1, DHP – polimer sintetisan od čistog koniferil alkohola i CP 9:1 polimer od koniferil alkohola i *p*-kumarične kiseline u masenom odnosu 9:1

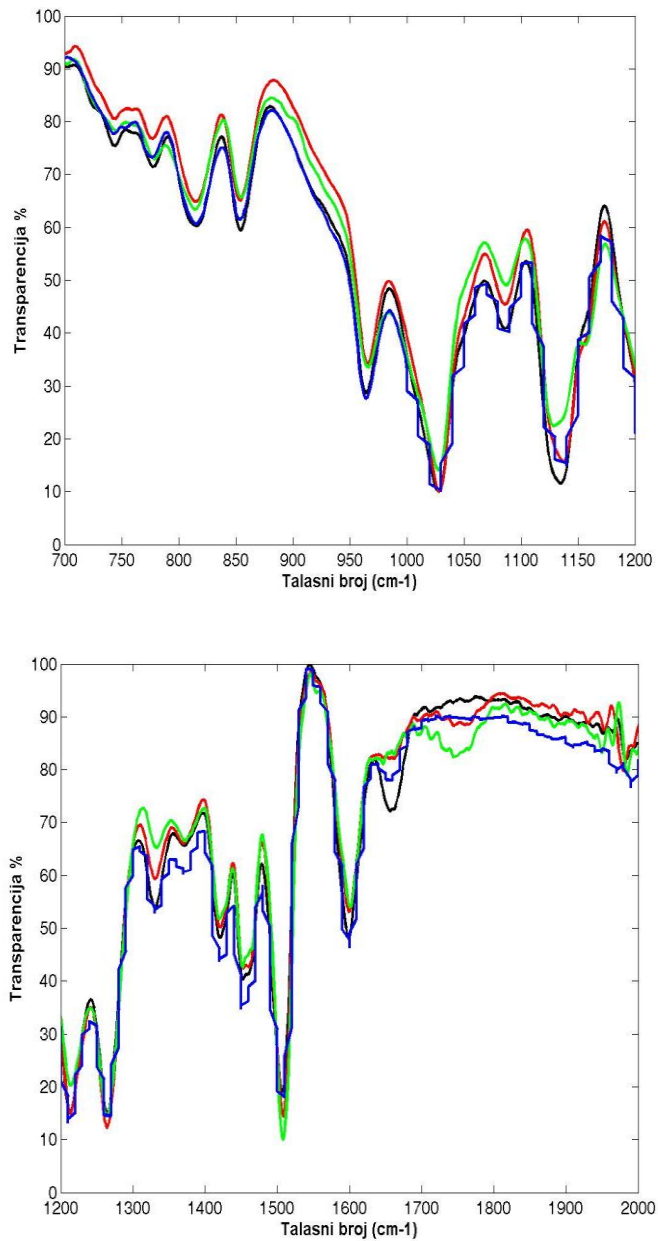
	CF 4:1	CF 9:1	CP 9:1	DHP
M_n	2.432	1.563	1.459	1.685
M_w	2.516	1.935	1.893	1.981
Q	1.034	1.237	1.297	1.175



Slika 4.1.2. Preklapljeni emisijski spektri polimera 4:1 CF (ljubičast), 9:1 CF (zelen), 9:1 CP (plav) i DHP (crn) (a) i preklapljeni APD komponente DHP i 9:1CF polimera (b), i DHP i 9:1 CP (c) i DHP i 4:1 CF (d) APD komponente DHP su prikazane punom linijom na svim slikama

Slika 4.1.2.a pokazuje preklopljene emisijske spektre polimera dobijenih sintezom polimera različitih masenih odnosa monomera. Svi spektri različitih uzoraka pobuđeni su na 360 nm (slika 4.1.2.a). Polimer CF 9:1 pokazuje visokoenergetski (plavi) pomerač emisijskog maksimuma, dok prisustvo *p*-kumarične kiseline u masenom odnosu 9:1 (CP 9:1) pokazuje niskoenergetski (crveni) pomerač. Emisijski spektri CF 4:1 pokazuju kvalitativnu razliku u odnosu na CF 9:1 polimer.

Slika 4.1.2.b-d) pokazuje razlaganje integralnih spektara (prikazanih na slici 4.1.2.a) sa približnom raspodelom gustine verovatnoće (APD) pozicije komponenti. U matematičkom razlaganju korišćene su četiri Log-normal komponente. Svaki pik odgovara pojedinačnoj fluoroforu. Sve pozicije APD komponenti CF 9:1 u poređenju sa DHP su pomerene ka visokoenergetskom delu (slika 4.1.2.d). Polimer CP 9:1, pored APD pikova u zelenom regionu, koji su dominantni i uglavnom na istoj poziciji kao i DHP, ima dve dodatne komponente na 520 nm i 545 nm (slika 4.1.2.c). Spektar polimera CF 4:1 i njegove komponente značajno se razlikuju od spektra DHP polimera (slika 4.1.2.d). Sem dva pika u plavom regionu koja se kompletno poklapaju sa DHP polimernim pikovima, glavne spektralne osobine su pomerene u žuti i narandžasti deo spektra, sa komponentama na 518 nm i 560 nm (slika 4.1.2.a, ,d).



Slika 4.1.3. Preklapljeni FT-IR spektri polimera a) oblast od 1200-700 cm^{-1} i b) oblast 2000-1200 cm^{-1} (DHP-crna linija, CF 9:1– crvena linija, CF 4:1 - zelena linija, CP 9:1 plava linija)

Odgovarajuće FT-IR trake, njihove pozicije i relativni intenziteti dati su u tabeli 4.1.2. Relativni intenzitet traka računat je u odnosu na intenzitet trake na 1599 cm^{-1} - 1601 cm^{-1} kao jedinične za FT-IR spekre lignin model jedinjenja. Ova karakteristična ligninska traka izabrana je za procenu odnosa intenziteta pojedinih traka u različitim polimerima. U FT-IR spektrima nema značajne promene u traci na 854 cm^{-1} , u odnosu na traku 1599 cm^{-1} - 1601 cm^{-1} u CP i oba CF polimera (4:1 i 9:1). Intenzitet trake na 966 cm^{-1} se ne menja osetno kod CP 9:1 i CF 9:1 polimera ali raste značajno u CF 4:1 polimeru. Traka na 1028 cm^{-1} se ne menja u CP polimeru u odnosu na čist polimer koniferil alkohola - DHP, ali je ipak viši kod CF 9:1 polimera i niži u CF 4:1 polimeru. U FT-IR spektrima postoji značajan porast trake na 1263 cm^{-1} - 1270 cm^{-1} u CF 4:1 polimeru u odnosu na DHP. Traka na 1325 cm^{-1} - 1330 cm^{-1} u CF 9:1 polimeru opada u poređenju sa DHP. Traka na 1419 cm^{-1} - 1421 cm^{-1} raste u CF 4:1 polimeru i opada u CP 9:1 polimeru, dok se ne menja značajno u CF 9:1 polimeru u odnosu na DHP. Traka 1506 cm^{-1} - 1510 cm^{-1} značajno raste u CP 9:1 polimeru, dok se neznatno menja u oba CF polimera. Nema promene u intenzitetu trake na 1651 cm^{-1} - 1660 cm^{-1} u CP polimeru u odnosu na DHP polimer.

U preklapljenim FT-IR spektrima, u oblasti od 1200 cm^{-1} - 700 cm^{-1} i 2000 cm^{-1} - 1200 cm^{-1} vide se male razlike u hemijskom sastavu i organizaciji (kompoziciji) ova četiri polimera. Zbog izuzetnog preklapanja FT-IR traka računat je relativni intenzitet pojedinačnih traka u odnosu na glavnu ligninsku traku na 1599 cm^{-1} - 1601 cm^{-1} , kako bi se mogle uporediti razlike koje su nastale zbog različite količine i vrste polaznih monomera.

Tabela 4.1.2. Pozicija FT-IR komponenti, njihovo označavanje i intenzitet proračunat u odnosu na traku 1599 cm⁻¹ -1601 cm⁻¹ (pozicija #)

Talasni broj cm⁻¹	854	966	1028	1086	1263-1270	1325-1330
Oznaka trake	C-H van ravni u poziciji 2,5 i 6 G jedinica	HC=CH- van ravni, deformaciona	arom. C-H u ravni G>S, i C-O deform	C-O def u sekundarnim alkoholima i alif etrima	G prsten plus, C-O istežuće	G prsten, deformacione
DHP	0.21	1.55	2.77	0.72	2.12 1265[#]	0.76 1331[#]
CP 9:1	0.23	1.51	2.93	0.82	2.32 1265[#]	0.79 1330[#]
CF 9:1	0.22	2.63	1.38	0.91	3.24 1263[#]	0.66 1333[#]
CF 4:1	0.27	1.27	3.1	0.71	2.44 1265[#]	0.52 1331[#]

Talasni broj cm⁻¹	1369-1375	1419-1421	1506-1510	1599-1601	1651-1660
Oznaka trake	alifatične C-H istežuće u CH3	arom. skeletne vib. i C-H deformacija u ravni	aromatične skeletne vib	aromat skeletne plus C=O istežuće	C=C u bočnom lancu, C=O istežuće
DHP	0.44 1371[#]	0.73 1421[#]	1.41 1506[#]	1.00 1599[#]	0.48 1657[#]
CP 9:1	0.63 1371[#]	0.83 1419[#]	2.86 1508[#]	1.00 1600[#]	0.41 1660[#]
CF 9:1	0.75 1375[#]	0.94 1419[#]	1.85 1508[#]	1.00 1599[#]	/
CF 4:1	0.38 1369[#]	0.57 1421[#]	1.85 1508[#]	1.00 1599[#]	/

DISKUSIJA

Uveliko je prihvaćeno da DHP polimer, tj. polimer dobijen enzimskom polimerizacijom čistog koniferil alkohola, predstavlja odgovarajuće model jedinjenje za ispitivanje lignina (Lewis and Yamamoto 1990, Lewis et al. 1988). Poznato je da su u biljkama, pored koniferil alkohola u molekulu lignina prisutni *p*-kumaril i sinapil alkohol kao prekursori u njegovoj sintezi, ali u mnogo manjoj količini (Lewis and Yamamoto 1990, Whetten and Sederoff 1995). Pripremljeni su polimeri sa *p*-kumaričnom i feruličnom kiselinom u manjem i većem masenom odnosu, za koje se može pretpostaviti da se javljaju u prirodi (Glasser et al. 1981).

Fluorescentni spektri lignin model jedinjenja se razlikuju znatno (slika 4.1.2.a). Razlike su posmatrane u odnosu na polimer koji je sintetisan iz čistog koniferil alkohola DHP, kao referentnog i ostalih mešanih polimera CF 4:1, CF 9:1 i CP 9:1. Fluorescentni spektar polimera CP 9:1 je pomeren u niskoenergetski deo (crveni) spektralni deo u odnosu na DHP (slika 4.1.2.a). Ovo dovodi do crvenog pomeraja i kod APD komponenti, sa nastajanjem dve nove komponente na 520 nm i 545 nm (slika 4.1.2.c). Ova dva polimera imaju slične molekulske mase i raspodelu molekulskih masa (slika 4.1.1.; tabela 4.1.1).

Pretpostavljamo da je neznatno manja molekulska masa CP polimera u odnosu na DHP polimer posledica manjeg broja metoksi grupa u *p*-kumaril alkoholu. Ovo nam ukazuje da molekulska struktura DHP polimera nije znatno promenjena prisustvom *p*-kumarične kiseline. Vidimo da, analizom fluorescentnih spektara, manjak metoksi grupa u *p*-kumaričnim jedinicama, uklanja sterne faktore i omogućava bolje pakovanje unutar polimera, što obezbeđuje viši stepen konjugacije i formiranje molekulske strukture sa širim domenima konjugovanih veza. Crveni pomeraj APD komponenti u zelenom delu spektra polimera CP 9:1 u poređenju sa DHP, ukazuje na veće prisustvo naizmeničnih dugih lanaca C=C veza u ligninskoj strukturi, što je skoro objavljeno u radovima Donaldsa i saradnika (Donaldson et al. 2010). Njihova proučavanja su pokazala da niskoenergetski deo spektra fluorescencije lignina unutar ćelijskog zida, može biti uspešno objašnjen

prisustvom konjugovanih polimernih struktura (domena) koje sadrže gvajacil ili *p*-hidroksilne jedinice ili njihove derivate. Ove strukture obezbeđuju postojanje lanaca naizmeničnih C-C i C=C veza. Energetski nivoi konjugovanih molekula mogu biti izračunati pomoću semikvantitativne metode Slobodno-elektronskih Molekulskih Orbitala (FEMO) (Levine 1988). Prema ovoj metodi, pozicije talasnih dužina absorpcionih i emisionih traka konjugovanih struktura su direktno proporcionalni kvadratu njihove dužine, a obrnuto proporcionalni broju π -elektrona u njihovoj strukturi. U biljkama koje su izložene mehaničkom stresu dolazi do povećanja količine *p*-kumaričnih jedinica što može da poveća mehaničku krutost u biljkama, preko paralelnog pakovanja dugačkih lanaca naizmeničnih C-C i C=C veza (Donaldson et al. 2010). Pokazano je da lignin izolovan iz kukuruza sadrži veliku količinu esterifikovanih *p*-kumaričnih kiselina (Ralph et al. 1994), što ima za posledicu povećanje krutosti samog zida. Pri proučavanju napada gljiva *Puccinia graminis f.sp. tritici*, na stabljiku pšenice (*Triticum aestivum*) uz pomoć fluorescentne spektroskopije i spektralne analize, kombinovano sa biohemijskim metodama, pokazano je da se javlja porast siringil jedinica, kao posledica odgovora biljke na stres (Menden et al. 2007).

Fluorescentni spektri polimera koniferil alkohola i ferulične kiseline su pokazali da zavise od masenog udela ovih supstanci. Spektri CF 9:1 polimera pokazuju značajan plavi pomeraj u odnosu na čist DHP polimer (slika 4.1.2.a), i očekivano je da su njihove APD komponente pomerene u visokoenergetski spektralni deo u odnosu na DHP polimer (slika 4.1.2.b). Molekulske mase ova dva polimera su slične (tabela 4.1.1.), ali ipak polidisperznost CF 9:1 polimera je mnogo viša i pokazuje dva bliska pika na dijagramu raspodele molekulskih masa (slika 4.1.1.), pokazujući da sadrži dve frakcije sličnih molekulskih masa. Sve gore spomenuto pokazuje da CF 9:1 polimer ima u sebi kraće domene konjugovanih veza. Ovo može biti objašnjeno prisustvom dve metoksi grupe na prstenu ferulične kiseline koje sterno sprečavaju pakovanje prstena a samim tim i konjugaciju.

Polimer CF 4:1, koji ima najmanji udeo koniferil alkohola u sebi, pokazuje znatno različite osobine u odnosu na CF 9:1 polimer. On ima najveću molekulsku masu od svih polimera proučavanih ovde. Njegov fluorescentni spektar je uglavnom pomeren ka

crvenom delu spektra. Dve najkratkotalasnije komponente na 410 nm i 445 nm, se dobro preklapaju sa komponentama DHP-a, dok im je glavni pik u žutoj oblasti 525 nm i narandzastoj 570 nm (slika 4.1.2.d). Ovi podaci dobijeni fluorescentnom spektroskopijom i raspodelom molekulskih masa, pokazuju da polimer CF 4:1 ima u sebi najduže polimerne lance i najduže domene konjugovanih C=C veza. Bez obzira na prisustvo veće količine ferulične kiseline u odnosu na CF 9:1 polimer, mehanizam sinteze je promenjen tako da omogućava pakovanje velikih molekula na pogodan način.

Promena odnosa intenziteta traka u FT-IR spektrima je najizražajnije kod polimera CF 9:1. (tabela 4.1.2.). Traka u oblasti 1646–1649 cm^{-1} predstavlja C=C istežuće vibracije u monomernom bočnom lancu unutar polimera, dok traka na 1321–1328 cm^{-1} predstavlja vibracije kondenzovanog G prstena (koniferil alkohola supstituisanog u poziciji 5). Tako dobijeni rezultati potvrđuju povećanje količine C=C veza i istovremeno smanjenje količine kondenzovanih struktura u polimerima dobijenim mešanjem ferulične kiseline sa koniferil alkoholom (CF) u poređenju sa polimerom dobijenim od čistog koniferil alkohola (DHP). Činjenica da polimer CF 9:1 ne pokazuje crveni tj niskoenergetski pomeraj u odnosu na emisionie komponente DHP-a, ukazuje da u ovakvom tipu strukture C=C veze nisu primarno konjugovane već odvojene sa više od jedne proste veze koje sprečavaju formiranje širokih konjugovanih domena, bez obzira na porast broja C=C veza. Različiti odnos FT-IR aktivnih traka na 966 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 1263–1270 cm^{-1} i 1419–1421 cm^{-1} u odnosu na 1599-1601 cm^{-1} u CF 4:1 polimeru u odnosu na DHP polimer, ukazuje da ovaj polimer ima u sebi najveći sadržaj ferulične kiseline i ima jasnije strukturne razlike od polimera DHP. Porast u trakama 1263 cm^{-1} -1270 cm^{-1} u FT-IR spektru u odnosu na čist koniferil alkohol (tabela 4.1.2.) može biti objašnjen porastom u broju C-O veza u prisustvu ferulične kiseline u polimeru.

Krive raspodele molekulskih masa za CF 9:1 i CP 9:1 polimer se razlikuju u odnosu na referentni polimer DHP i to u opsegu niskih molekulskih masa (slika 4.1.1.), što potiče od prisutnosti dimera/trimera u polimerima. U čistom DHP polimeru, dimeri i trimeri su prisutni u znatno manjoj količini nego u polimerima CF 9:1 i CP 9:1. Ova razlika u regionu malih molekulskih masa može biti povezana sa porastom udela C=C veza i opadanjem količine kondenzovane strukture u 9:1 polimerima u odnosu na čist DHP, kao

što je dobijeno u FT-IR spektrima (tabela 4.1.2). APD komponente dobijene analizom emisionih fluorescentnih spektara u polimeru CF 9:1 pokazuju dve fluorofore koje emituju u plavoj i plavo-zelenoj oblasti (slika 4.1.2.b), što je u saglasnosti sa njihovom raspodelom molekulskih masa, koje su šire i imaju nekoliko frakcija različitih veličina. APD komponente dobijene matematičkom analizom za DHP i CP 9:1 polimere se uglavnom preklapaju (slika 4.1.2.c). Profil raspodele molekulskih masa za ova dva polimera, su takođe slični i pokazuju prisustvo nekoliko frakcija.

Oblik krive raspodele molekulskih masa za CF 4:1 je jednostavniji u poređenju sa CF 9:1 i CP 9:1 polimerima, pokazujući samo jedan pik, povezan sa jednom frakcijom veće molekulske mase nego obe frakcije kod druga dva mešana polimera 9:1 (slika 4.1.1.). Ova razlika je u saglasnosti sa FT-IR podacima (tabela 4.1.2). Emisioni spektri i odgovarajuće APD komponente CF 4:1 polimera pokazuju pretežno prisutnu zelenu fluorescenciju, zbog prisustva dve fluorofore koje emituju na 520 nm i 560 nm, koje zajedno daju emisioni maksimum na 530 nm u integralnom spektru (slika 4.1.2.a). Njegova raspodela molekulske mase pokazuje jednu dominantnu frakciju.

U biljkama, ferulična kiselina je prisutna znatno manje od koniferil alkohola, otprilike u odnosu 9:1 u normalnim fiziološkim uslovima (Lewis and Yamamoto 1990, Sun et al 2002) i ima ulogu u stvaranju kovalentnih veza u ligninskim strukturama što omogućava neophodnu čvrstinu ćelijskog zida (Anterola and Lewis 2002, Humphreys and Chapple 2002, Lam et al 1992a, Iiyama et al. 1994). Polimer koji sadrži veći maseni udeo ferulične kiseline CF 4:1 sadrži drugačiji tip strukture u odnosu na polimer CF 9:1. Ova razlika se ogleda u nastajanju potpuno nove komponente u emisionom spektru i paralelnim nestajanjem komponente na 480 nm (slike 4.1.4a i d). Viši procenat C=C veza u CF 4:1 polimeru vidi se takođe i nastajanjem (prisutnošću) dve APD komponente na dužim talasnim dužinama što je dokaz postojanja dugačkih konjugovanih domena. Ovaj tip polimera razlikuje se u FT-IR spektrima od čistog polimera DHP-a i ima različitu raspodelu molekulske mase (slika 4.1.6.), što je dodatni dokaz za njegovu drugačiju strukturu.

Ovaj odnos monomera koniferil alkohol:ferulična kiselina 4:1 nije pronađen u polimeru lignina u biljakama, gde je maseni odnos 9:1 fiziološki favorizovan. Razlog

nedostatka ovog polimera sa većom količinom ferulične kiseline tj malom količinom koniferil alkohola u odnosu na CF 9:1 polimer je prisustvo neodgovarajućeg visokog sadržaja C=C veza i odgovarajućih širokih polimernih lanaca, što se vidi u FT-IR spektrima i spektrima fluorescencije. Odgovarajuća količina domena konjugovanih veza, gde su C=C veze iz bočnih lanaca veoma blizu, je jako važno za energetski transport unutar ćelijskog zida i između ćelijskih zidova i interagujućih vrsta (Djikanović et al. 2011).

Biosinteza lignina ima fundamentalnu ulogu u adaptaciji biljaka na okruženje na Zemlji (Weng and Chapple 2010). Poznato je da je ekološka i fiziološka adaptacija tokom evolucije biljaka, praćena specifičnim promenama u strukturi lignina (Vanholme et al. 2010).

Rezultati dobijeni na lignin model jedinjenjima, pokazuju uticaj vrste monomera i samim tim i njihovih količina na strukturne karakteristike lignina. Ovi podaci su važni kako bi dobili bolji uvid o učešću ovih polimera u ćelijskom zidu pri njegovom odgovoru na stres. Pored toga, metode koje su korišćene u ovom istraživanju mogu biti korisno sredstvo za praćenje uticaja promena u sastavu lignina tj količine različitih monomera u njemu, u kontekstu ekologije i evolucije biljnih vrsta.

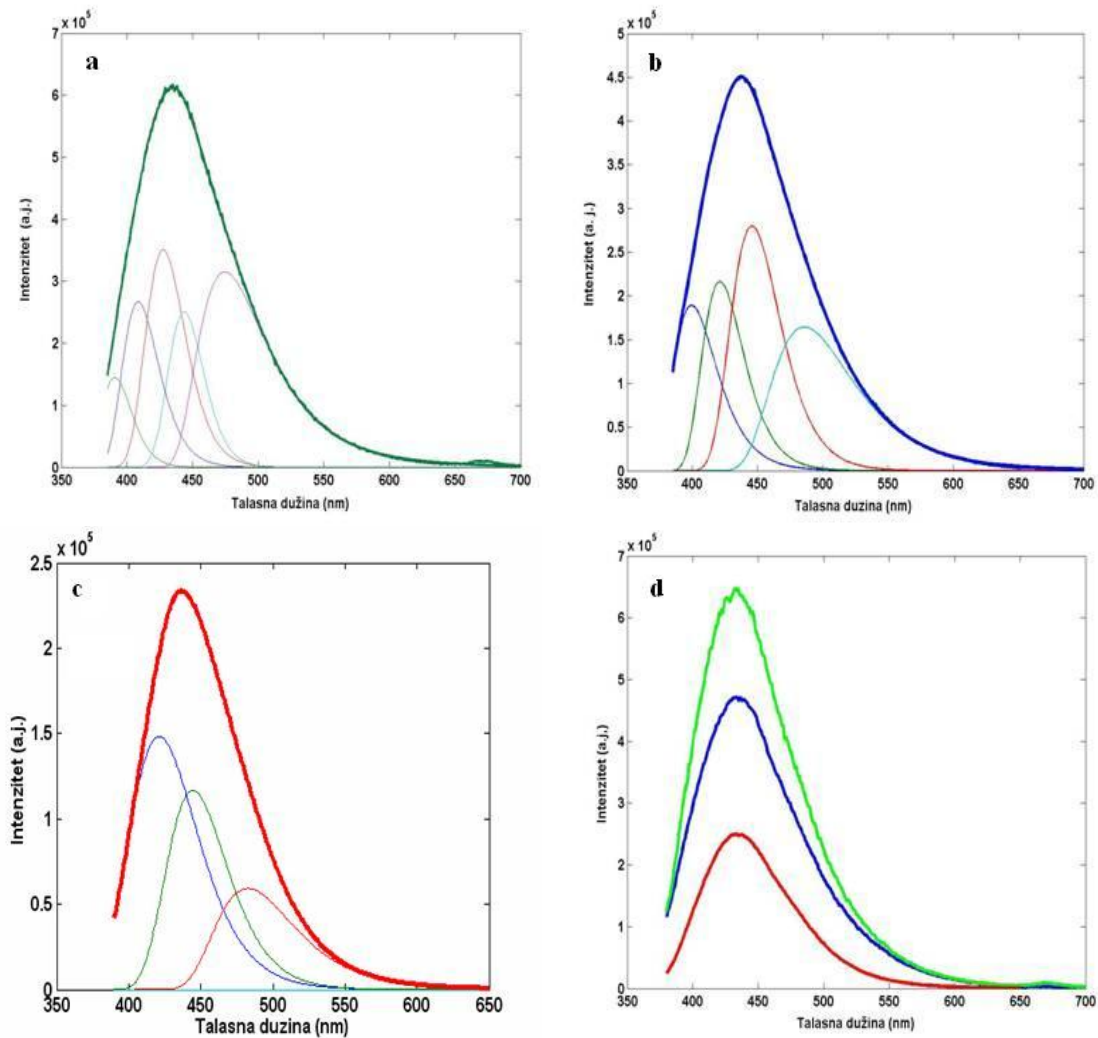
4.2. POREĐENJE STRUKTURNIH OSOBINA ĆELIJSKIH ZIDOVA RAZLIČITOG POREKLA

REZULTATI

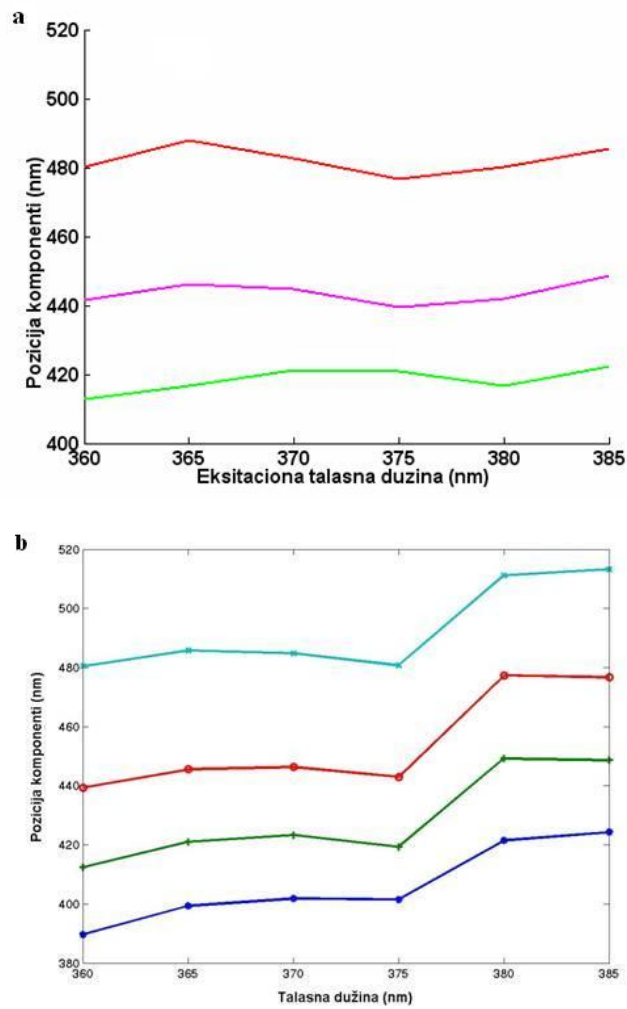
Spektrofluorimetrijski rezultati

Na slici 4.2.1. prikazano je matematičko razlaganje fluorescentnih spektara ćelijskih zidova javora, omorike i kukuruza. Za uzorak ćelijskog zida javora prikazano je optimalno peto-komponentno razlaganje spektara (slika 4.2.1.a). Kod uzorka izolovanog ćelijskog zida Pančičeve omorike prikazano je četvero-komponentno razlaganje (slika 4.2.1.b), a kod uzorka kukuruza tro-komponentno razlaganje emisionih fluorescentnih spektara (slika 4.2.1.c). Kod tvrdog drveta (javor) metoda matematičkog razlaganja spektara zahteva jednu komponentu više u odnosu na uzorak mekog drveta (Pančičeva omorika), dok kod kukuruza zahteva jednu komponentu manje u odnosu na meko drvo. Iz preklapljenih spektara sva tri uzorka (slika 4.2.1.d) pobuđenih na talasnom dužinom od 360 nm nema razlike između spektara sem u intenzitetu fluorescencije u uzorcima.

Kada dobijeni set spektara za svaki uzorak razložimo na optimalan broj komponenti dobijamo krajnji položaj maksimuma i njihovo grupisanje na odgovarajućim talasnim dužinama. Na slici 4.2.2. prikazano je na koji način je izabran broj komponenti koje će se uzeti za razlaganje. Kod uzorka ćelijskog zida kukuruza (slika 4.2.2.a) vidi se grupisanje talasnih dužina na tri pozicije dok kod omorike (slika 4.2.2.b) vidi se da je četvero-komponentno razlaganje stabilizuje pozicije komponenti.



Slika 4.2.1 Spektralno razlaganje: a) Peto-komponentno Log-normal razlaganje emisionog spektra izolovanog ćelijskog zida iz grane javora pobuđenog na 365 nm b) Četvoro-komponentno Log-normal razlaganje emisionog spektra ćelijskog zida izolovanog iz grane omorike ekscitovanog na 365 nm c) Tro-komponentno Log-normal razlaganje emisionog spektra ćelijskog zida izolovanog iz stabla kukuruza ekscitovanog na 365 nm d) preklapljeni emisioni spektri javora, omorike i kukuruza ekscitovani na 360 nm (javor-zeleno, omorika-plavo, kukuruz-crveno)

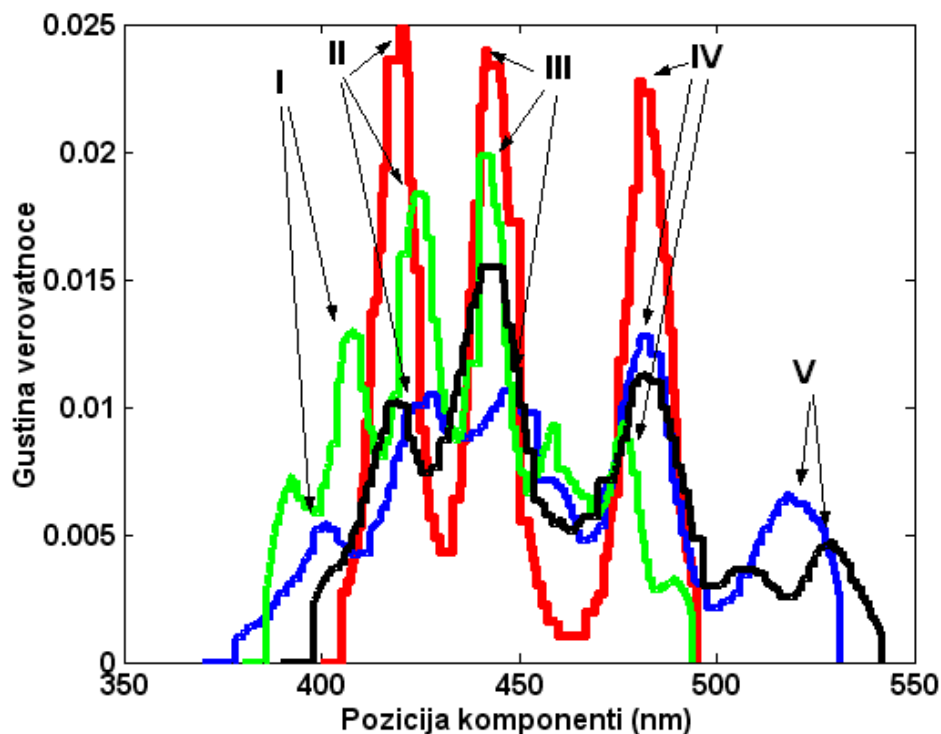


Slika 4.2.2. a) Prikazane su pozicije razlaganih komponenti kod ćelijskog zida izolovanog iz stabla kukuruza dobijene pomoću tro-komponentne analize spektra b) Prikazane su pozicije razlaganih komponenti kod ćelijskog zida izolovanog iz grane omorike dobijene pomoću četvoro-komponentne analize

Iz gornje analize na osnovu grupisanja maksimuma dobijena je najverovatnija gustina raspodele komponenti tj, APD dijagram. Iz analize APD komponenti posmatranih ćelijskih zidova i njihovim preklapanjem (slika 4.2.3.) vidi se da i javor (zelen) i omorika (plava) imaju pet različitih struktura a da se kod kukuruza matematičkim razlaganjem

dobijaju tri značajne komponente što nam ukazuje na jednostavniju strukturnu kompoziciju molekula lignina u monokotilama.

Iz slike 4.2.3. mogu se videti razlike u strukturi izolovanih ćelijskih zidova mekog, tvrdog drveta i kukuruza u odnosu na strukturu DHP-a kao lignin model jedinjenja.



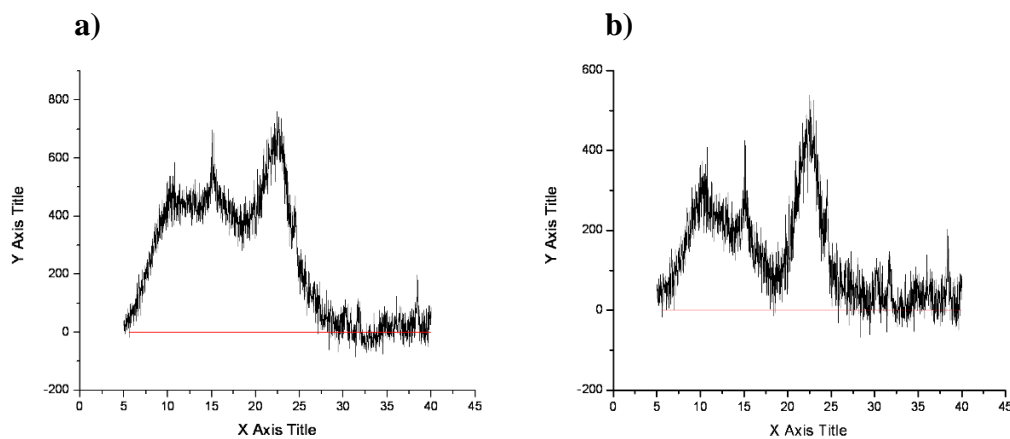
Slika 4.2.3. Preklopljena APD rezultati za sva tri uzorku odnosu na DHP (omorika-plavo, javor-zeleno, kukuruz-crveno, DHP-crno)

Smatra se da je lignin glavna komponenta ćelijskog zida koja je odgovorna za njegovu fluorescenciju i zato su svi spektri poređeni sa DHP-om. Iz slike preklopljenih APD-ova vidi se da je struktura kukuruza, kao monokotile najbližnja strukturi DHP-a, s tim što DHP pokazuje jednu komponentu više. Posmatrajući komponentu I (≈ 400 nm) vidimo da se ona pojavljuje u visokoenergetskom delu spektra i to samo kod drvenastih biljaka. Komponenta II (≈ 420 nm) pokazuje crveni pomeraj i kod javora i kod omorike,

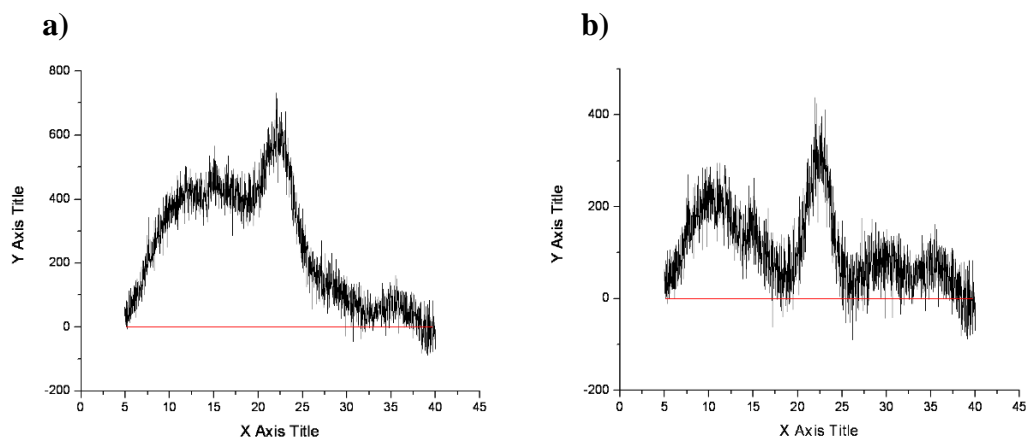
dok je kod kukuruza na istoj poziciji kao kod DHP-a. Komponenta III, kao glavna ligninska komponenta, je uglavnom na istoj poziciju kod javora, kukuruza i DHP-a dok kod omorike, kao mekog drveta pokazuje crveni pomeraj. Plavi pomeraj se dešava kod komponente IV (≈ 480 nm) kod javora u odnosu na sva ostala tri uzorka i vidi se da je preklapanje ove komponente odlično u svim ostalim biljnim uzorcima. Komponenta V (≈ 520 nm), se pojavljuje jedino kod omorike (meko drvo) kao i kod DHP-a ukazujući da ovde postoje prisutne konjugovane strukture.

Rezultati rendgenostrukturalne analize

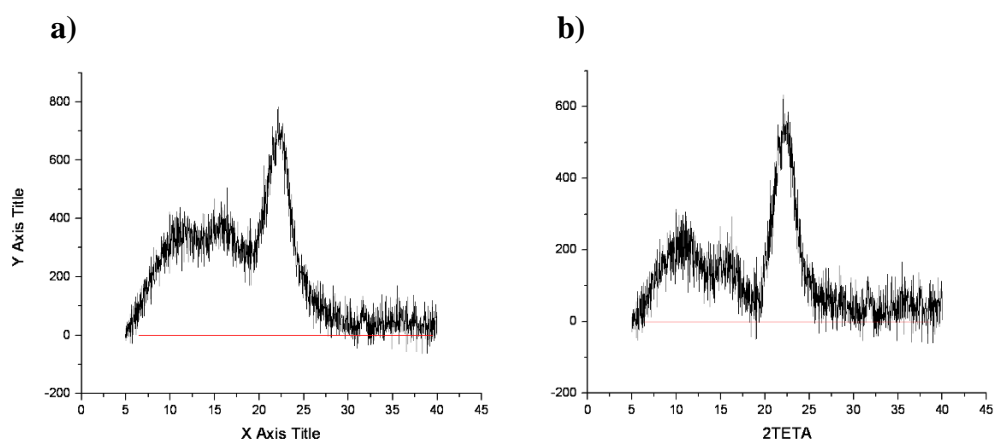
Na osnovu ispitivanja parametara dobijenih difraktograma iz uzoraka ćelijskog zida javora, omorike i kukuruza možemo videti da postoji razlika u ukupnoj kristaličnosti uzorka i vrsti prisutnih kristalnih rešetki.



Slika 4.2.4 Difraktogrami ćelijskog zida izolovanog iz grane javora a) originalan difraktogram b) difraktogram sa oduzetom baznom linijom i amorfnim delom celuloze



Slika 4.2.5. Difraktogrami ćelijskog zida izolovanog iz grane Pančičeve omorike a) originalan difraktogram b) difraktogram sa oduzetom baznom linijom i amorfnim delom celuloze



Slika 4.2.6. Difraktogrami ćelijskog zida izolovanog iz stabla kukuruza a) originalan difraktogram b) difraktogram sa oduzetom baznom linijom i amorfnim delom celuloze

Iz tabele 4.2.1. mozemo viditi da je kristaličnost obe vrste drveta približno ista, tj. malo je veća u tvrdom drvetu (javor), gde je i prisutna malo veća količina celuloze (40-55 %) u odnosu na meko drvo (45-50%). Kristaličnost kukuruza je znatno viša jer sadrži manji udeo lignin u odnosu na drvenaste vrste što ima za posledicu bolje pakovanje i pravilniji raspored celuloznih mikrofibrila. Pikovi dobijeni na difraktogramu

karakteristični su za celulozu I i nalaze se na $2\theta \approx 14.9, 16.49, 22.84$ (Marchessault and Sundararajan 1983) i kristalne ravni difrakcije 101, 101 i 002. Pik na $2\theta = 20.64$ je karakterističan za celulozu II i vidljiv je samo kod uzorka ćelijskog zida dobijenog iz omorike. Za oba drveta nađen je procenat kristalnosti približno 42%, koja odgovara onoj koju je Hulleman sa saradnicima (1994) izračunao za celulozu u pamuku i drvetu od 40-48%.

Tabela 4.2.1. Prikazana izračunata kristaličnost uzorka u sva tri uzorka ćelijskog zida (1998 ICPDS- International Centre for Diffraction Data)

Javor grana CW %	42.39
Omorika grana %	42.08
Kukuruz stablo %	57.8

Ning i saradnici (1991) su našli veću kristaličnost uzorka kukuruza tj viši stepen kristalnog uređenja celuloze u uzorku, što je u saglasnosti i sa našim rezultatima. Pik posmatran na oko 23° uglavnom se opisuje kao “visoko-kristalni” region celuloze, dok široki pik na $2\theta \approx 16^\circ$ je proporcionalan manje organizovanoj polisaharidnoj strukturi. Goto i Yokoe (1996) su pretpostavili da hemicelulozni materijal prisutan u ćelijskom zidu može da doprinosi ovom “amorfnom” piku.

Tabela 4.2.2. Tipovi kristalnih rešetki celuloze nađeni u uzorcima određenih na osnovu literaturnih podataka

2θ	h k l	d (Å)	Omorika grana	Javor grana	Kukuruz stablo
14.9	1 0 1	5.94	da	da	da
16.49	1 1 1	5.37	da		da
17.34	1 0 1	5.11	da	da	
20.64	0 2 1	4.3		da	
22.84	0 0 2	3.89	da	da	da
28.22	1 3 0	3.16			da

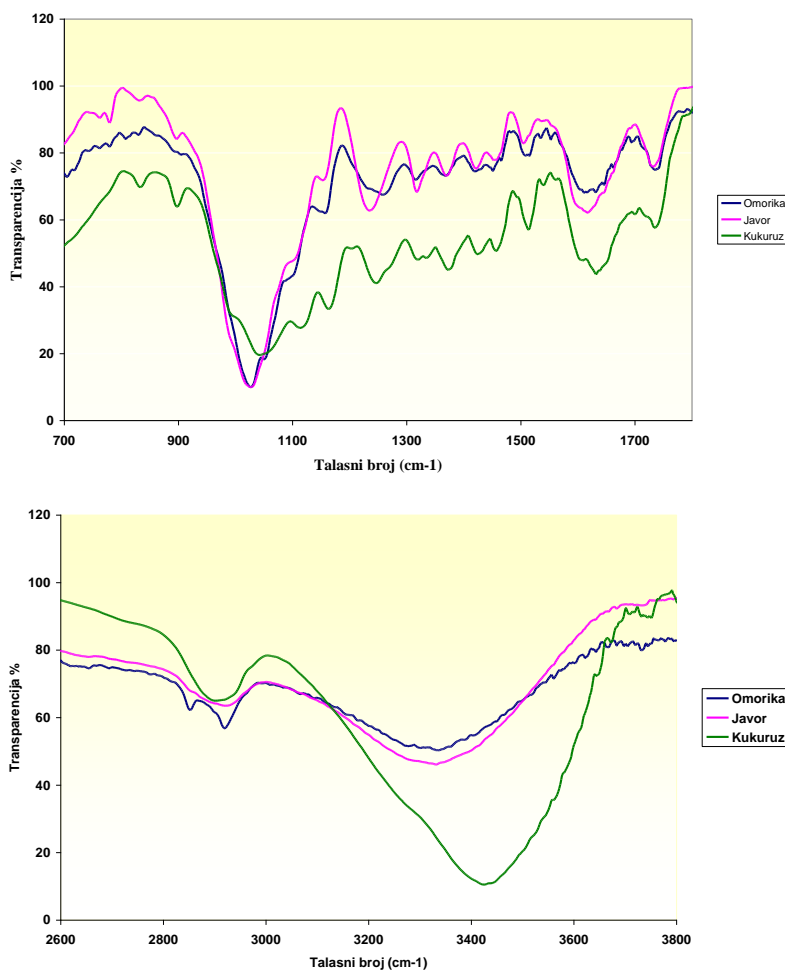
Kada poredimo difraktograme različitih uzoraka ćelijskog zida, veličina i tipovi rešetke variraju među uzorcima. U sva tri uzorka primećujemo prisustvo ravni 101 i 002 sa dimenzijama 5.94 nm i 3.89 nm respektivno. Tip rešetke 111 ($d=5.37$ nm) pojavljuje se u mekom drvetu i kukuružu, dok se u oba drveta javlja 101 ravan ($d=5.11$ nm). Struktura sa kristalografskom ravni 021 i dimenzijama $d=4.3$ nm pojavljuje se samo u izolovanom ćelijskom zidu iz tvrdog drveta, dok se struktura sa indeksima 1 3 0 ($d=3.16$ nm) nalazi samo u ćelijskom zidu kukuruža. U sve tri vrste ćelijskog zida imamo prisutne po četiri vrste kristalnih ravni opisanih Miller-ovim indeksima hkl. Prisutne različite kristalografske ravni u različitim biljnim vrstama su očekivan rezultat, jer različiti hemijski sastav ćelijskog zida diktira različito pakovanje celuloze a samim tim utiče i na njenu kristaličnost.

Iz tabele 4.2.2 se vidi da su ravni 101 i 002 prisutne u svim uzorcima a da se različitost u samim uzorcima i pakovanju celuloze može primetiti prisustvom novih kristalografskih ravni.

FT-IR rezultati

U preklopljenim FT-IR spektrima, u oblasti od 2000 cm^{-1} - 700 cm^{-1} vide se fine razlike u hemijskoj kompoziciji ova tri izolovana ćelijska zida različitog biljnog porekla

(sl.4.2.7.a). Zbog izuzetnog preklapanja FT-IR traka računat je intenzitet pojedinačnih traka na osnovu kojeg se može proceniti zastupljenost određene strukture/hemijske veze u uzorcima, kako bi se mogle uporediti razlike među biljnim vrstama. Na slici 4.2.7.b poredili smo količinu C-H i O-H veza u uzorcima. Odgovarajuće FT-IR trake, njihove pozicije i intenziteti dati su u tabeli 4.2.3



Slika 4.3.7. Preklapljeni FT-IR spektri sva tri uzorka; Plavo-omorika grane, ljubičasta-javor grane i žuto- kukuruz stablo; a) spektralni region od 700-2000cm-1 b) spektralni region od 2000-4000 cm-1

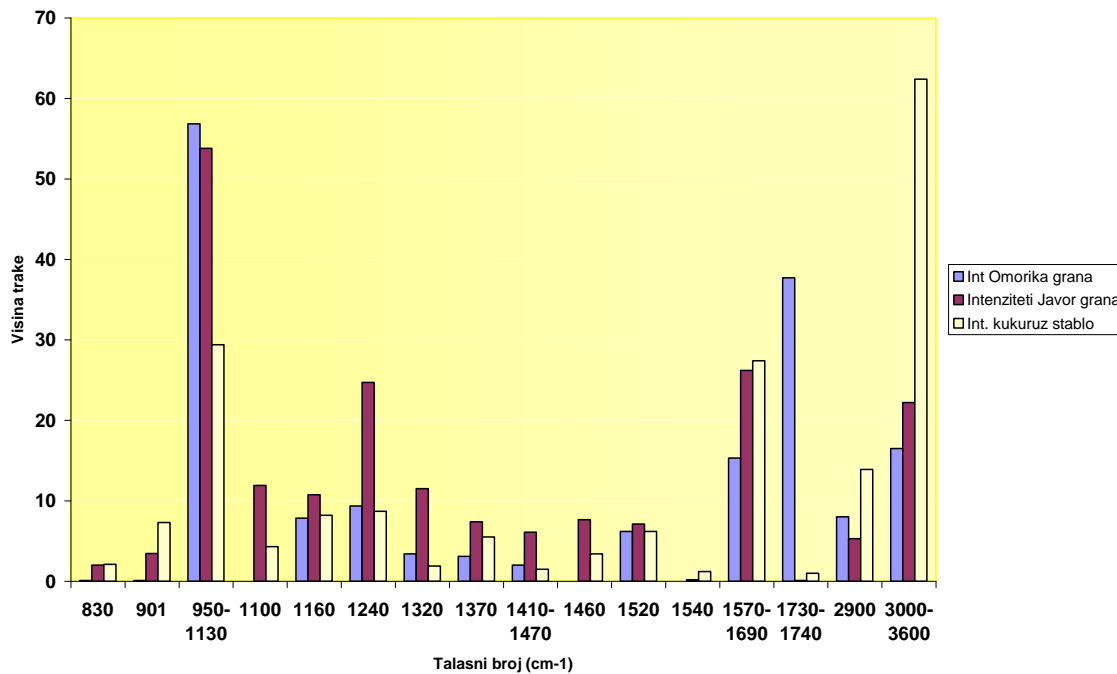
U FT-IR spektrima traka na 834 cm^{-1} koja je karakteristična za anomerne α -veze glukoze javlja se samo u ćelijskom zidu kukuruza. Traka na 898 cm^{-1} i 901 cm^{-1} kod javora i omorike, respektivno, i obe trake 898 cm^{-1} i 991 cm^{-1} kod kukuruza, karakteristične su za anomerne β -veze glukoze (Kačurakova et al. 2000). Intenzitet široke trake koja je karakteristična za polisaharide od 900 cm^{-1} - 1100 cm^{-1} daje dobro preklapanje kod uzoraka ćelijskog zida iz drvenastih vrsta dok se uočava njena finija struktura u spektru ćelijskog zida kukuruza, pri čemu je i maksimum trake pomeren sa 1030 cm^{-1} na 1052 cm^{-1} (prevoj na 991 cm^{-1}). U FT-IR spektrima postoji značajan porast trake na 1235 cm^{-1} - 1250 cm^{-1} u uzorku javora a pri tom kod ostala dva uzorka javlja se široka traka u intervalu od 1235 cm^{-1} - 1270 cm^{-1} . Ove trake karakterišu različite vibracije estarske grupe celuloze i u korelaciji su sa kristaličnošću celuloze (Salmen et al. 2001). FT-IR trake koje su vezane za prisustvo ksiloglukana u ćelijskom zidu na 1371 cm^{-1} i 1317 cm^{-1} i odgovaraju kristaličnosti celuloze, javljaju se u sva tri uzorka i rastu značajno u spektru kukuruza i javora a malo manje su izražene kod omorike. Traka na 1423 cm^{-1} - 1427 cm^{-1} mogu se takođe koristiti za određivanje kristaličnosti (Nelson et al. 1964) i raste u uzorku kukuruza dok je najmanja kod uzorka omorike, a traka na 1450 cm^{-1} - 1460 cm^{-1} se javlja u sva tri uzorka. Traka 1506 cm^{-1} - 1515 cm^{-1} značajno raste u uzorku ćelijskog zida kukuruza, bez obzira na manju količinu lignina, a približno je istog intenziteta u uzorcima ćelijskih zidova omorike i javora.

Trake u oblasti 1600 cm^{-1} - 1660 cm^{-1} su široke jer je to region u kome se preklapaju fenolne, amidne i vibracije karboksilne grupe. Struktura trake je drugačija kod uzorka kukuruza gde se jasno vidi pik na 1608 cm^{-1} koji je karakteristična za ligninske konjugovane prstene.

FTIR spektar u oblasti 2000 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} je karakterističan za celulozu i prisustvo vodoničnih veza. Trake od 2820 cm^{-1} - 2980 cm^{-1} karakteristične su za C-H istežuće vibracije i najviše su u korelaciji sa prisutnom celulozom u uzorku tako da se mogu koristiti za njenu kvantifikaciju. Široka traka između 3000 cm^{-1} i 3600 cm^{-1} karakteristična je za vibracije O-H grupe i njene elektrostatičke interakcije u strukturi ćelijskog zida. Ova apsorpciona traka u sebi sadrži dve vibracije i to na 3285 cm^{-1} koja je karakteristična za intermolekulske vodonične veze i traka na 3335 cm^{-1} koja odgovara intramolekulskim

vodoničnim vezama (Liang and Marchessault 1959). Na osnovu dobijenih FT-IR spektara ove dve trake, C-H celulozne i trake OH- vibracija, su najintenzivnije kod kukuruza dok je kod javora (tvrdo drvo) prisutna manja količina celuloze, a veća količina OH-veza. U mekom drevtu prisutna je veća količina celuloze i manja količina vodoničnih veza i slabija elektrostatička interakcija između polimera.

Na osnovu izračunavanja visine pikova odredili smo zastupljenost određenih veza i komponenti u različitim uzorcima tj. njihovu relativnu zastupljenost (koncentraciju). Uzorak kukuruza sadrži najveći udeo celuloze i naročito veliku količinu vodoničnih veza u odnosu na ćelijske zidove omorike i javora. Iz histograma se vidi da je u uzorku kukuruza takođe najviši intenzitet traka na 1540 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} - 1690 cm^{-1} , koje su karakteristične za lignin.



Slika 4.2.8. Odnos intenziteta traka za uzorke omorike (plavo), javor (ljubičasto) i kukuruz (žuto).

Tabela 4.2.3. Intenziteti FT-IR traka na odgovarajućim talasnim brojevima za sva tri uzorka ćelijskih zidova (javor, omorika i kukuruz)

Talasni br. (cm⁻¹)	Int Omorika grana	Talasni br. (cm⁻¹)	Int. Javor grana	Talasni br. (cm⁻¹)	Int. kukuruz stablo
779	0.1	780	5.6	833	2.1
812	0.1	830	2	901	7.3
901	0.1	901	3.45	930-1110	29.4
950-1130	56.85	1030	53.8	1120	4.3
		1100	11.9	1170	8.2
1160	7.85	1150-1160	10.75	1245	8.7
1240-1260	9.35	1240	24.7	1310-1350	1.9
1320	3.4	1320	11.5	1380	5.5
1370	3.1	1370	7.4	1430	1.5
1410-1470	2	1430	6.1	1460	3.4
		1450-1460	7.65	1510	6.2
1520	6.2	1510/1520	7.1	1540	1.2
		1540	0.2	1570-1650	27.4
		1610-1620-		1740	1
1570-1690	15.3	1660	26.2		
1730-1740	37.7	1730-1740	13.9		
2900	8.02	2900	5.3	2900	13.9
3000-3600	16.5	3000-3600	22.2	3000-3600	62.4

Kod uzoraka omorika vidimo najveću količinu estarskih veza (1730 cm^{-1} - 1740 cm^{-1}) i količinu ukupnih ugljenih hidrata (950 cm^{-1} - 1130 cm^{-1}). Kod javora su prisutne najveće količine celuloznih C-O-H veza u regionu 1410 cm^{-1} - 1470 cm^{-1} i celuloznih CH_2 oscilujućih vibracija na 1320 cm^{-1} . Javor, takođe sadrži najveću količinu ligninskih vibracija i to $\text{C}_{\text{aril}}\text{-O}$ istežuće metoksi vibracije na fenolnom prstenu (1240 cm^{-1}) i ligninske C=C aromatične vibracije u prstenu na 1520 cm^{-1} .

DISKUSIJA

Ćelijski zidovi su heterogeni prirodni nanokompoziti izgrađeni od celuloze, hemiceluloze, lignina, pektina i minerala (Fengel and Wegner 1984).

Na osnovu rezultata RSA metode pokazali smo razliku u kristaličnosti ćelijskih zidova iz različitih biljnih vrsta.

Kada posmatramo kristaličnost ćelijskih zidova omorike i javora može se primetiti da su približno iste (42%), s tim što je malo veća u tvrdom nego u mekom drvetu gde je i količina prisutne celuloze veća (tabela 4.2.1.). Uglavnom se u uzorcima izračunava ukupna kristaličnost ćelijskog zida a ne same celuloze.

Kristaličnost ćelijskog zida kukuruza je mnogo viša u odnosu na ćelijski zid omorike i javora i ovi rezultati su u saglasnosti sa FT-IR spektrima gde se vidi prisutna intenzivna traka karakteristična za OH- vibracije i intenzivna C-H traka karakteristična za celulozu. Velika količina vodoničnih veza u ovom uzorku i velika količina celuloze omogućavaju da glukozidni linearni lanaci celuloze lako kristališu preko vodoničnih veza međusobom.

Prilikom poređenja difraktograma uzoraka ćelijskih zidova koji potiču iz različitih biljnih vrsta javlja se varijacija u parametrima ćelija i veličini kristala i vrsti prisutnih kristalografskih ravni u njima. Kada ispitujeemo celulozu u biljnim uzorcima mi određujemo I_{β} formu celuloze koja je najzastupljenija forma. Njene se kristalografske ravni

moгу identifikovati preko pikova koji se pojavljuju u difraktogramu, gde je najizraženija kristalografska struktura sa indeksima 002, koja je prisutna u svim uzorcima. Prisutne strukture 101 i 101 delimično su maskirane strukturama koje su povezane sa hemiceluloznim lancima i daju široke pikove na difraktogramu. Ovakva slabije uređena struktura celuloze naziva se „amorfna celuloza“ i javlja se i u mekom i tvrdom drvetu i u kukuruзу. Kristalografska struktura sa indeksima 130 javlja se samo kod kukuruза. Međusobne interakcije molekula celulozi kao i višestruke interakcije njenih molekula sa ostalim makromolekulima ćelijskog zida, dovode do različitih prostornih uređivanja tokom kojih nastaju najmanje četiri različite kristalografske ravni rešetke. Kristalna rešetka sa indeksima 021 nađena je samo kod tvrdog drveta, dok je rešetka sa indeksima 111 prisutna samo u mekom drvetu. Možemo da zaključimo da i ostale komponente u ćelijskom zidu koje variraju u sastavu u različitim biljnim vrstama diktiraju uslove koji će omogućiti formiranje određenih kristalografskih ravni, i da najveći doprinos daje interakcija sa hemicelulozama.

Pored celuloze i lignina veliku grupu razgranatih molekula čine hemiceluloze. One zajedno sa ligninom čine matičnu fazu u ćelijskom zidu. Gradeći sa ligninom lignin-ugljenohidratne komplekse, oni direktno utiču na strukturu lignina, što se vidi u fluorescentnim razloženim spektrima, a i na kompoziciju celog ćelijskog zida.

Fluorescentnom spektroskopijom pratili smo kompleksnost ligninske strukture i njeno umrežavanje u ćelijski zid, pošto je lignin komponenta od koje potiče ukupna fluorescencija ćelijskog zida. Posmatranjem fluorescentnih spektara za tri različita uzorka ne može se uočiti razlika u fluorescenciji koja potiče od različitih struktura ćelijskih zidova bez upotrebe matematičkog modela. Kao što se vidi na slici 4.2.1., za svaku biljnu vrstu u zavisnosti od kompleksnosti strukture njenog ćelijskog zida koristimo različiti broj komponenti za spektralno razlaganje. Nalaženjem odgovarajuće gustine verovatnoće za poziciju komponenti APD i njihovim preklapanjem jasno vidimo razlike u strukturi lignina. Možemo videti koji su monomeri i na koji način uključeni u formiranje polimera lignina kod određene biljne vrste i do kakvih je strukturnih promena došlo usled prisustva različitih hemiceluloznih komponenti u ćelijskom zidu. U dobijenim rezultatima vidimo da kukuruz (slika 4.2.1), kao monokotila pokazuje najjednostavniju strukturu i da u sebi ima

tri karakteristične fluorescirajuće strukture. Uzorak ćelijskog zida omorike, kao predstavnika mekog drveta, pokazuje najraznovrsniju strukturu sa pet emitujućih vrsta, dok uzorak javora tj tvrdog drveta ima četiri značajne strukture koje fluoresciraju. Ovi rezultati su u saglasnosti sa količinom lignina prisutnog u različitim vrstama (Sun and Cheng 2002). Bez obzira što ćelijski zid kukuruza ima najraznovrsniji hemijski sastav lignina (GSH), putem fluorescentne spektroskopije i odgovarajućeg matematičkog razlaganja možemo da primetimo da njegova organizacija najjednostavnija unutar polimera lignina.

Preklapanjem ovih ligninskih struktura sa APD komponentama lignin model jedinjenjem, vidi se da struktura mekog drveta pokazuje najbližnju građu ligninskog polimera sa DHP-om. Od ispitivanih uzoraka, jedino meko drvo pokazuje sklonost ka formiranju konjugovanih C=C veza i produženju konjugacije u strukturi, što je potvrđeno prisustvom dugotalasne komponente na 520 nm. U odnosu na tvrdo drvo, meko drvo ima manju količinu metoksi grupa što smanjuje sterne efekte i povećava verovatnoću za pojavu konjugovanih struktura. Kod izolovanog ćelijskog zida kukuruza, prisutna je mnogo manja količina lignina. Usled prisustva veće količine metoksi grupa koje potiču od prisutnih siringil jedinica i ferulične kiseline može se pretpostaviti da su u ćelijskom zidu kukuruza prisutni jaki sterna efekti koji povećavaju međumolekulska rastojanja i onemogućavaju pojavu konjugovanih struktura. APD trake ćelijskog zida dobijenog iz kukuruza u visokoenergetskoj oblasti pokazuje dobro preklapanje sa visokoenergetskim strukturama u DHP-u. U ligninskim strukturama poreklom od drveta (mekog ili tvrdog) javlja se nova fluorofora na 410 nm koja verovatno govori o prisustvu jačih veza među lignin monomerima koja je posledica verovatno uspostavljanja određenih LUK-a. I u tvrdom i mekom drvetu, u odnosu na kukuruz i DHP dolazi do pomeranja komponenti u srednjem delu spektra ka nižim energijama (crveni pomeraj) u oblasti od 420-460 nm. Ovo je verovatno posledica prisutnosti različitih hemiceluloza u tvrdom i mekom drvetu (Fry 1986, Newman et al. 1992) i najizraženija promena se vidi u položaju trake na 480 nm gde tvrdo drvo pokazuje plavi pomeraj u odnosu na meko drvo i DHP. Svi ovi fluorescentni podaci ukazuju na prisustvo lignin-ugljenohidratnih kompleksa koji su naročito prisutni u tvrdom drvetu. Prisustvo hemiceluloza u nekim biljnim vrstama slabi ligninske strukture (crveni pomeraj) dok ih u drugim vrstama pojačava (plavi pomeraj).

Iz FT-IR spektara na osnovu položaja i intenziteta pikova u ugljenhidratnom delu od 900 cm^{-1} - 1100 cm^{-1} , može se takođe videti jednostavnija struktura u ćelijskom zidu kukuruza. Udeo i raznovrsnost komponenti nije tako velika da dovodi do potpunog preklapanja vibracionih traka hemiceluloza i celuloze u uzorku kukuruza za razliku od uzoraka ćelijskih zidova obe ispitivane drvenaste vrste. Iz prostijih FT-IR spektara vidi se manji stepen interakcije među komponentama ćelijskog zida (celuloze, hemiceluloze, lignin) u zidu kukuruza. Ovaj podatak, dobijen iz FT-IR spektra, daje nam mogućnost da pretpostavimo da je proces dobijanja šećera iz kukuruza mnogo jednostavniji nego kod drvenastih vrsta, jer je lakše raskidanje međumolekulskih veza unutar ćelijskog zida, u pravcu dobijanja biogoriva.

Sve FT-IR trake koje su povezane sa kristaličnošću celuloze: 1235 cm^{-1} - 1270 cm^{-1} i 1317 cm^{-1} i 1371 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} i 1427 cm^{-1} , su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim RSA metodom. Intenzitet pika je proporcionalan količini kristalne celuloze u uzorku i oni su najizraženiji kod kukuruza. Ovi rezultati ukazuju na veći stepen kristaličnosti kod kukuruza i da glukuronoarabinoksilan, kao glavna hemiceluloza, diriguje kristalnu formu celuloze u ćelijskom zidu kukuruza. Zasićene estarske veze absorbuju na 1740 cm^{-1} i najizraženije je njihovo prisustvo kod mekog drveta, dok karboksilne kiselinske grupe apsorbuju na 1600 cm^{-1} i 1414 cm^{-1} i njihov intenzitet je najveći kod tvrdog drveta (Morikawa et al. 1978). Količina fenola, povezanih sa količinom lignina, na 1515 cm^{-1} slična je kod oba uzoraka drveta mada je vidljiva i kod monokotila (Williams and Fleming 1980). FT-IR traka između 1200 cm^{-1} i 900 cm^{-1} je karakteristična za ugljene hidrate i najsloženija i najintenzivnija u mekom drvetu što je u saglasnosti sa analizom fluorescentnih spektara i njihovom zastupljenošću u ovim biljnim vrstama.

U regionu od 2000 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} , kod uzorka omorike povećan je sadržaj C-H vibracija celuloze a smanjen sadržaj O-H veza, dok je u uzorku javora smanjen sadržaj C-H vibracija celuloze ali povećan intenzitet OH vibracija koje dovode do većeg stepena umrežavanja u uzorku. Ovi rezultati mogu da objasne sličnu kristaličnost drvenastih uzoraka bez obzira na različit udeo C-H vibracija celuloze u njima. Smanjen udeo C-H vibracija celuloze kompenzovan je prisustvom veće količine vodoničnih veza i obrnuto. U uzorku kukuruza povećan je i intenzitet i C-H traka i količina O-H veza što se moglo i

pretpostaviti jer je izračunata kristaličnost u kukuruzu znatno veća od one izračunate za ćelijske zidove kod oba uzoraka drveta. Možemo zaključiti da u izolovanom ćelijskom zidu kukuruza postoje intenzivne elektrostatičke interakcije i mnogobrojne vodonične veze koje dovode do pravilnijeg rasporeda molekula celuloze što dovodi i do veće kristaličnosti ovih ćelijskih zidova u odnosu na ćelijske zidove uzoraka drveta. Ovi rezultati takođe ukazuju na veliki značaj nekovalentnih interakcija na ukupnu organizaciju ćelijskog zida koje su posledica prisustva velike količine hemiceluloza u ćelijskom zidu kukuruza.

Dobijeni rezultati na osnovu primenjene sve tri fizičko-hemijske metode upućuju nas na dalja istraživanja poprečnih veza i intramolekulskih veza među gradivnim polimerima ćelijskog zida. Ovi eksperimenti ukazuju na to da količina vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija u datoj strukturi određuje u velikoj meri njenu kompleksnost i način na koji će se međusobno povezivati komponente ćelijskog zida.

Možemo zaključiti da je prisustvo fizičkih interakcija u strukturi podjednako važno kao i prisustvo kovalentnih veza, jer zajednički dovode do prostornih preraspodela komponenti ćelijskog zida. One diriguju rastojanja između makromolekula tako da utiču na kristalnost uzorka i ukupnu kompoziciju ćelijskog zida a samim tim i na njegove fizičke i mehaničke osobine.

S druge strane, hemiceluloze diriguju stvaranje kompleksa i umrežavanje lignina u celuloznu mrežu (Ruel et al. 1978, Ruel et al.1979, Burlat 2000). Različite hemiceluloze dovešće do različitih kompozicija lignina a samim tim i celuloze i samog ćelijskog zida (Aterola and Lewis 2002, Ha et al 2002). Čak i mala varijabilnost u hemiceluloznom sastavu indukuje veliku razliku u kompoziciji ćelijskih zidova različitih biljnih vrsta.

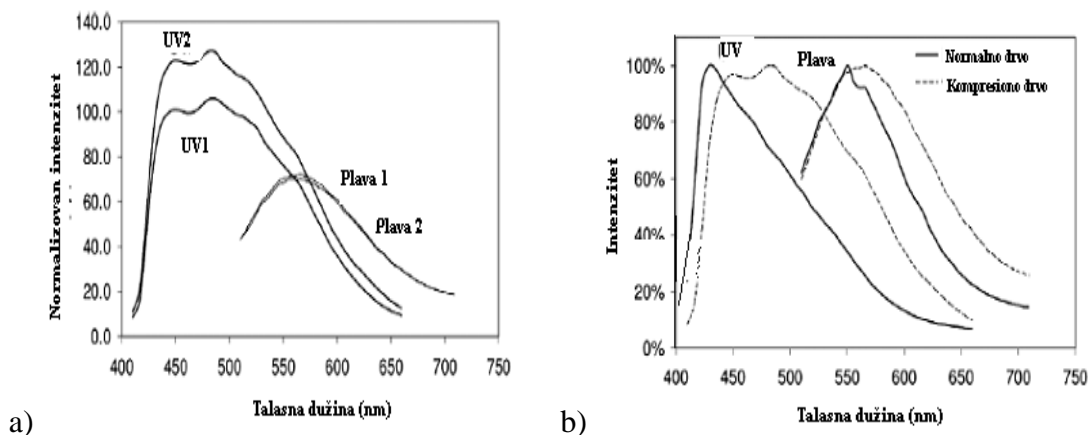
Međusobna interakcija lignina sa hemicelulozom i prisustvo odgovarajuće količine vodoničnih veza i određene količine elektrostatičkih interakcija diktira strukturnu kompoziciju lignina, celuloze i celokupnog sekundarnog ćelijskog zida što pokazuju dobijeni rezultati u ovom radu.

4.3. KVANTIFIKACIJA JAČINE KOMPRESIJE KOD BORA (*Pinus radiata*)

REZULTATI

Procena odgovarajućih talasnih dužina i njihov uticaj na oštećenje uzorka

Na početku eksperimenta praćeno je kako ozračivanje utiče na fluorescenciju uzorka i da li je menja. Kako bi se ispitalo da li dolazi do oštećenja uzorka pri UV ozračivanju, poređeno je nekoliko uzastopno snimljenih spektara pri istoj pobudi UV i plave svetlosti da bi se pratile spektralne promene u uzorku. Pronađeno je da se spektri ne menjaju pri pobudi sa plavom svetlošću, dok pri pobudi uzorka sa UV svetlošću dolazi do primetnog porasta fluorescencije za 20%, što nam ukazuje da u daljim eksperimentima pri korišćenju UV zraka treba voditi računa o ovoj pojavi.



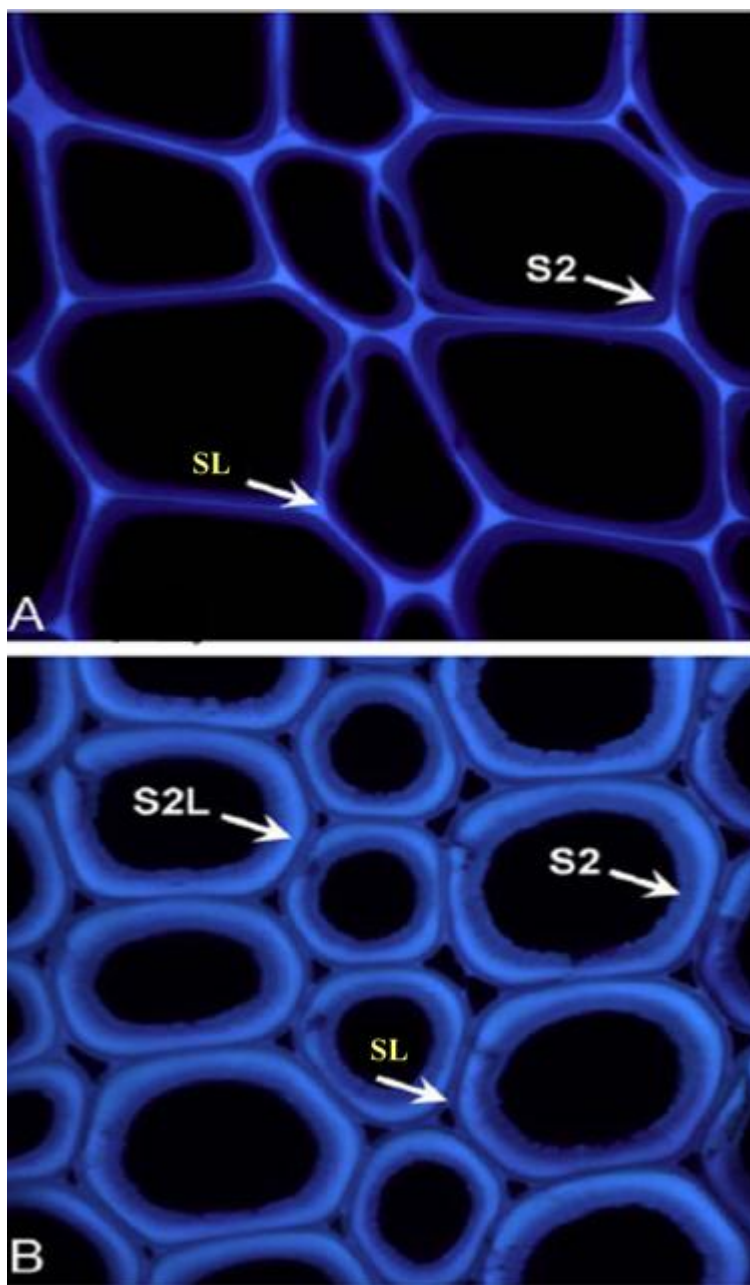
Slika 4.3.1 (a) Ponovljeno ozračivanje istog regiona uzorka jako kompresionog drveta UV svetlošću rezultuje u znatnom povećanju fluorescencije dok plava svetlost nema nikakav efekat (b) UV i plava svetlost kod normalnog i jako kompresionog drveta pokazuje veće razlike između ove dve vrste drveta prilikom upotrebe UV ozračivanja u poredjenju sa plavim ozračivanjem

Mikroskopske slike

Da bi dobili što tačnije mikroskopske slike uzoraka normalnog i kompresionog drveta, prikupljeni su podaci iz tri spektralne oblasti: ljubičaste (420-460 nm), plave (460-520nm) i zelene (520-580nm) i konstruisana je integralna preklopljena slika. Ove slike su dobijene u optimiziranim uslovima tako da se ne može koristiti njihov intenzitet, već samo spektralne informacije. Normalno drvo je znatno tamnije po intenzitetu od kompresionog drveta. Na prikazanim slikama (slika 4.3.2.) dominira ljubičasta fluorescencija normalnog drveta dok na slikama kompresionog drveta dominira plava fluorescencija, ali finese koje otkriva spektralna analiza nisu vidljive na slikama, ukazujući na prednosti spektralne analize.

Razlika u intenzitetu slika u različitim regionima ćelijskog zida, pokazuje razlike u količini lignina, broju fluorofora i njihovom kvantnom prinosu što se ne može odrediti ovom mikroskopijom, ali se može uopšteno posmatrati pojava da osvetljenost može da odgovara količini lignina što je već ispitivano (Donaldson et al. 2001). Na primer, u normalnom drvetu, poznato je da je srednja lamela (SL) više lignifikovana od sekundarnog ćelijskog zida i tako ima veću osvetljenost tj. jaču fluorescenciju.

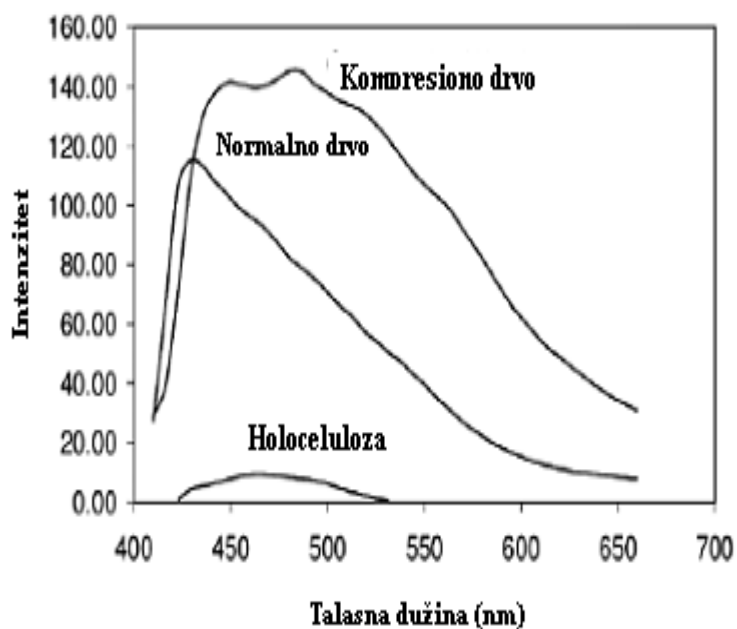
U kompresionom drvetu, srednja lamela je manje lignifikovana od spoljašnjeg sekundarnog ćelijskog zida i tako je i na slikama tamnija. Iz ovih istraživanja sledi da su regioni S2 i S2L sekundarnog ćelijskog zida u kompresionom drvetu više lignifikovani od S2 regiona kod normalnog drveta, što pokazuju svetliji regioni na mikroskopskim slikama(slika 4.3.2).



Slika 4.3.2. Konfokalne fluorescentne slike normalnog (A) i jako izraženog kompresionog drveta (B). Slike su dobijene u spektralnim opsezima 420-460 nm, 460-520 nm i 520-580 nm. Prikazane su preklopljene slike ova tri opsega. Veličina slike je 79x79 μm .(Donaldson et al. 2010)

Fluorescencija lignina i holoceluloze

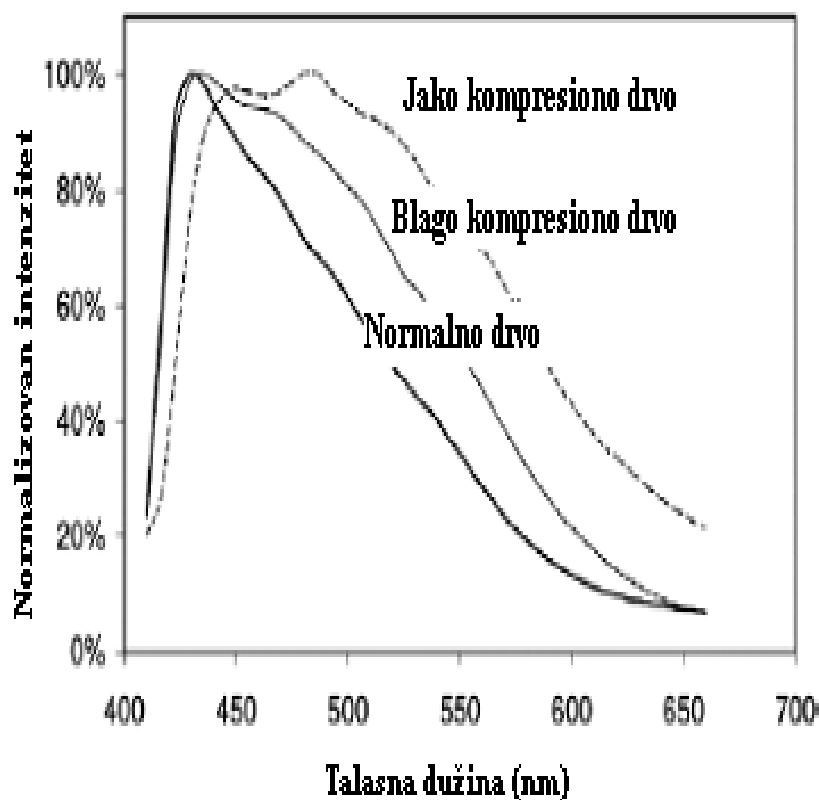
Kao što je i očekivano, uzorci drveta i holoceluloze pobuđeni UV svetlošću pokazuju znatne razlike u fluorescentnim spektrima (slika 4.3.3.), gde je fluorescencija holoceluloze skoro neprimetna u odnosu na drvo. Rastući ksilem pokazuje zanemarljivu fluorescenciju u primarnom i sekundarnom zidu. Ispitivanja vlakna pamuka takođe pokazuju jako slabu fluorescenciju. Nije pronađena fluorescencija kod pektina (iz limuna), galaktomanana (iz bagrema) i nitroceluloze (rezultati nisu prikazani). Ovi rezultati nam potvrđuju da je lignin u ćelijskom zidu odgovoran za autofluorescenciju prisutnu kod drveta, i da polisaharidne komponente zida traheida sasvim malo ili nimalo utiču na fluorescenciju. Pretpostavljamo da je postojeći veoma mali fluorescentni intenziteti u holoceluloznim uzorcima, samo posledica prisustva malih količina degradacionih proizvoda lignina ili je posledica hemijskog tretmana kome je uzorak izložen.



Slika 4.3.3. Fluorescentni emisijski spektri, normalnog, kompresionog drveta i holoceluloze *P. radiata*

Fluorescencija normalnog, blago i jako komprimovanog drveta *P. radiata*

Korišćenjem UV ekscitacije, pokazali smo da postoji progresivni crveni pomeraj u fluorescentnoj emisiji od blago izraženog kompresionog do jako izraženog kompresionog drveta (slika 4.3.4). I blago i jako izraženo kompresiono drvo pokazuje veću fluorescenciju u poređenju sa normalnim drvetom i pri UV i pri plavoj ekscitaciji. Oblik fluorescentnog emisionog spektra u blago i jako izraženom kompresionom drvetu ukazuje na prisustvo više fluorofora na osnovu očiglednog odstupanja krive od normalne Log-normal raspodele (slika 4.3.4.)



Slika 4.3.4. Razlike u fluorescenciji normalnog, blago i jako izraženog kompresionog drveta *P. radiata* pobuđenih UV svetlošću

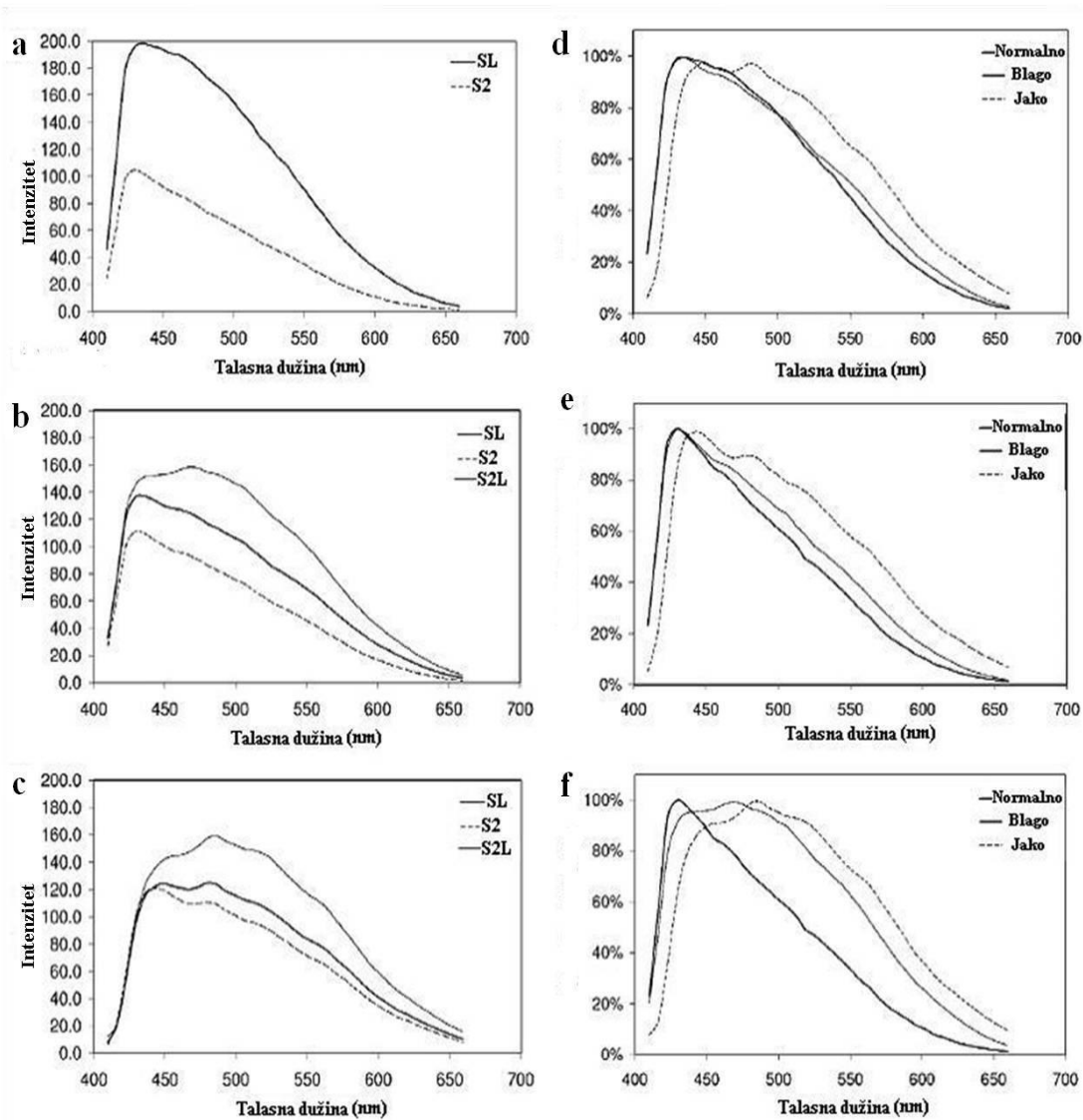
Pojedinačni regioni u ćelijskom zidu takođe pokazuju razlike u fluorescentnoj emisiji (slika 4.3.5.).

U normalnom drvetu, srednja lamela (SL) i S2 region pokazuju slične spektre sa maksimumom oko 430 nm, mada srednja lamela pokazuje neznatno veće rame i ima mnogo veći ukupni intenzitet fluorescencije (slika 4.3.5.a).

U blago izraženom kompresovanom drvetu, S2 region i srednja lamela pokazuju slične emisione spektre u odnosu na normalno drvo i smanjenje intenziteta fluorescencije u regionu srednje lamele (slika 4.3.5.b). Region S2L u ovom uzorku pokazuje značajno izraženo rame sa pomerajem u emisionom maksimumu na 470 nm, i povećanjem fluorescencije u odnosu na srednju lamelu i S2 region. U jako izraženom kompresionom drvetu promene se dešavaju u sva tri sloja, pokazujući rame na 470 nm u sva tri regiona i dodatno rame na približno 600 nm. Intenzitet fluorescencije srednje lamele opada tako da mu je intenzitet približan intenzitetu fluorescencije u S2 sloju (slika 4.3.5c).

Svi spektri su usrednjeni. Ovi grafici (slika 4.3.5.a,b,c) pokazuju razlike u emisionim intenzitetima u regionima ćelijskih zidova u sva tri tipa drveta *P. radiata*. Prikazane su razlike u normalizovanim fluorescentnim spektrima u različitim regionima ćelijskog zida uključujući srednju lamelu SL (d), S2 (e) i S2L (f) regione. Ovi grafici prikazuju spektralne razlike u pojedinačnim regionima u zavisnosti od tipa drveta (Donaldson et al. 2010).

Neophodno je ispitati ponovljivost merenja za individualne ćelijske regione kako bi se moglo primeniti matematičko razlaganje spektara. Iz tog razloga snimano je pet tačaka na krugu, na svakom od deset uzoraka traheida. Ispitano je F-statistikom da je varijacija među traheidama/lokacijama bila značajno veća od varijacija duž tačaka u ćelijskom zidu jedne traheide.

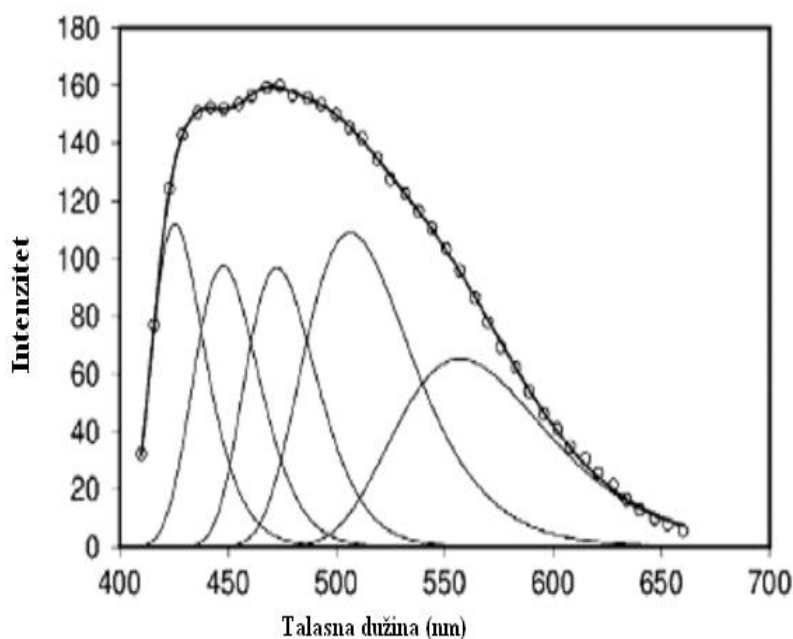


Slika 4.3.5. Varijacije u fluorescentnim spektrima duž regiona u ćelijskom zidu u normalnom drvetu (a), blago kompresionom drvetu (b) i jako kompresionom drvetu (c) Svi spektri su usrednjeni. Ovi grafici pokazuju razlike u emisionim intenzitetima u regionima ćelijskih zidova u sva tri tipa drveta *P. radiata*. Prikazane su razlike u normalizovanim fluorescentnim spektrima u različitim regionima ćelijskog zida uključujući srednju lamelu SL (d), S2 (e) i S2L (f) regione. Ovi grafici prikazuju spektralne razlike u pojedinačnim regionima u zavisnosti od tipa drveta. (Donaldson et al. 2010)

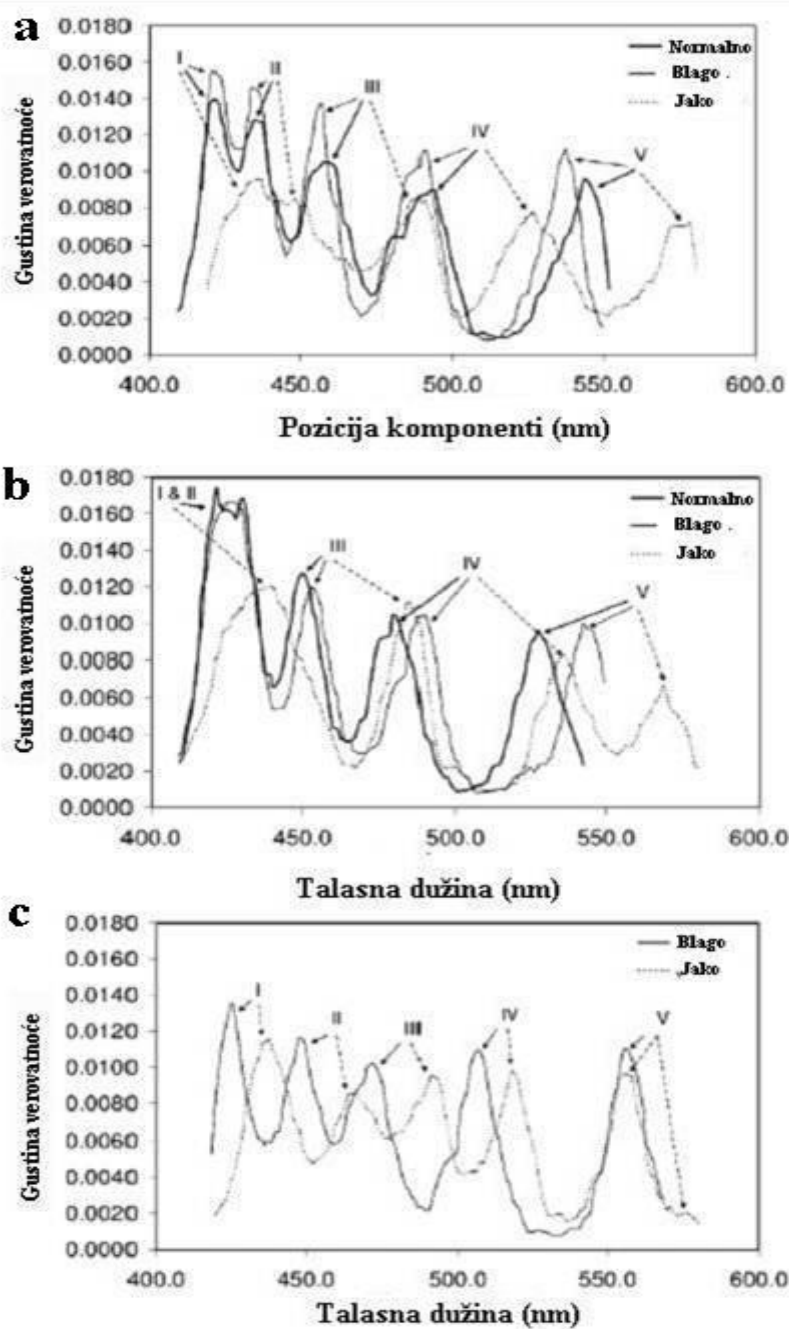
Razlaganje fluorescentnih spektara

Razlaganje fluorescentnih spektara normalnog, blago izraženog kompresionog i jako izraženog kompresionog drveta, za svaki pojedinačni region (SL, S2, S2L), je urađen za svih deset spektara dobijenih iz različitih delova slike istog regiona.

Svaki spektar je razlagan na više Log-normal komponenti (od 2-7) kako bi se pronašao optimalan broj komponenti koji će se usvojiti za razlaganje ovih uzoraka (slike 4.3.6. i 4.3.7.)



Slika 4.3.6. Emisioni spektar S2L regiona ćelijskog zida jako kompresionog drveta traheida (krugovi) *P. radiata*, sumarni spektar (podebljana linija), razložene komponente, pokazuju kako se razloženi spektri uklapaju u dobijene spektralne krive. Peto-komponentno razlaganje pokazuje optimalno razlaganje ukupnog emisionog spektra.



Slika 4.3.7. Razlaganje fluorescentnih spektara pokazuje komponente za SL (a), S2 (b) i S2L (c) regione za normalno i oba kompresiona drveta *P. radiata*. Pozicije pet pikova (I, II, III, IV, V) označene su strelicama. Trake I i II u S2 regionu ćelijskog zida kompresionog drveta su integrisane

Slika 4.3.7. pokazuje preklapljene približne verovatnoće gustine raspodele (APD) pozicija komponenata dobijenih razlaganjem emisionih spektara SL (a), S2 (b) i S2L (c) regiona ćelijskog zida, za normalno i kompresiono drvo. Svi spektri su razlagani na pet komponenti korišćenjem Log-normal modela (Siano and Metzler 1969, Radotić et al. 2006, Djikanović et al. 2007a,b, Kalauzi et al. 2007), jer ovaj broj komponenti pokazuje najbolje matematičko slaganje. Razlaganje sa više komponenti ne daje nikakvu manju grešku analize. Mi pretpostavljamo da ligninski fluorescentni spektri svih ispitivanih uzoraka ne sadrže više od pet komponenti, što je dobijeno statističkom APD analizom. Jedini izuzetak može se primetiti u S2 sloju jako izraženog kompresionog drveta, gde se pozicije prve dve komponente preklapaju. Zanimljivo je naglasiti da APD analiza, kao krajnji rezultat, daje četiri komponente u ovom slučaju, bez obzira što korišćeno petokomponentno razlaganje. APD analiza integriše prve dve komponente, što podržava opravdanost i osetljivost metode.

Posle ekscitacije na 488 nm, komponente normalnog i kompresionog drveta su na istim pozicijama, sugerišući da su elektronska stanja emitujućih struktura (zelene fluorescencije) veoma slična, što znači da su i njihove molekulske strukture takođe slične. Postoji razlika u poziciji komponenti normalnog i kompresionog drveta u slučaju ekscitacije u UV oblasti (360 nm). Pozicije talasnih dužina razloženih komponenti (označenih od I do V, tabela 4.3.1.) preračunate su u talasne brojeve, kako bi bile direktno proporcionalne energijama i u korelaciji sa dužinom makromolekulskog lanca koji se sastoji iz konjugovanih veza u saglasnosti sa metodom Slobodno-elektronskih Molekulskih Orbitala (FEMO). Deo ligninskog makromolekula koji nije konjugovan, i odgovara aromatičnim prstenovima, koji emituje na manjim talasnim dužinama, nije uzet u obzir ovom metodom.

Tabela 4.3.1 Pozicije APD pikova izražene su u nanometrима i cm^{-1} , za tri regiona ćelijskog zida *P.radiata*: srednje lamele (SL), S2 i S2L, i u normalnom drvetu (N), blago izraženom kompresionom (BK) i jako izraženom kompresionom (JK) drvetu.

		I nm (cm^{-1})	II nm (cm^{-1})	III nm (cm^{-1})	IV nm (cm^{-1})	V nm (cm^{-1})
SL	Normalno	422 (23697)	436 (22936)	458 (21834)	90 (20480)	538 (18587)
	Blago	422 (23697)	436 (22936)	460 (21739)	494 (20243)	546 (18315)
	Jako	436 (22936)	450 (22222)	488 (20492)	527 (18975)	576 (17361)
S2	Normalno	422 (23697)	430 (23256)	452 (22124)	482 (20749)	528 (18940)
	Blago	422 (23697)	428 (23364)	456 (21930)	490 (20408)	544 (18382)
	Jako	435 (22988)		487 (20534)	538 (18587)	570 (17544)
S2L	Normalno					
	Blago	424 (23585)	429 (23310)	472 (21186)	506 (19763)	556 (17986)
	Jako	438 (22831)	464 (21552)	493 (20284)	520 (19231)	558 (17921) i 574 (17422)

Razlike/pomeraji traka između normalnog i kompresionog drveta izračunati su za svaku komponentu u svim regionima ćelijskog zida i dati u Tabeli 4.3.2. Razlike/pomeraji

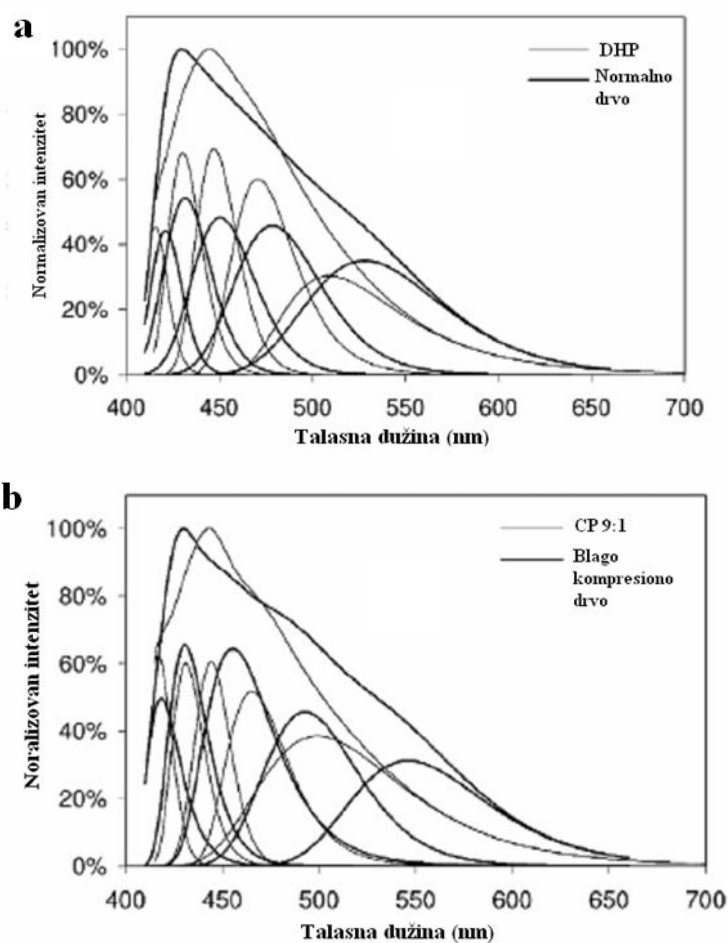
traka između normalnog i blago izraženog kompresionog drveta su mnogo manje nego između blago i jako izraženog kompresionog drveta. Pomeraji su nula za trake I i II, i rastu sa porastom talasne dužine trake. Najveća razlika/pomeraj trake zapažen je kod komponente sa najvećom talasnom dužinom (komponenta V). Pomeraji su približno $750 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ ili je pomeraj umnožak ove vrednosti (tabela 4.3.2). Ovi postupni pomeraji pozicija komponenti jako izraženog kompresionog drveta prema većim talasnim dužinama/manjim talasnim brojevima, u poređenju sa blago izraženim kompresionim drvetom ili normalnim drvetom, može se tumačiti kao porast dužine ligninskih konjugovanih struktura dodavanjem jedne ili više subjedinica, slične strukture. Ovo nam pokazuje da su u jako izraženom kompresionom drvetu konjugovani lanci znatno duži nego oni u normalnom drvetu ili blago izraženom kompresionom drvetu.

Tabela 4.3.2. Pomeraj trake/razlike odgovarajućih APD pikova između normalnog (N) i blago izraženog kompresionog drveta (BK) i između blago i jako izraženog kompresionog drveta (JK) za SL, S2 i S2L regione ćelijskog zida, kao i između DHP i CP lignin model jedinjenja. DHP je polimer sintetisan od čistog koniferil alkohola, CP je mešavina koniferil alkohola i p-kumarične kiseline u masenom odnosu 9:1.

		I (cm^{-1})	II (cm^{-1})	III (cm^{-1})	IV (cm^{-1})	V (cm^{-1})
SL	N-BK	0	0	95	237	272
	JK-BK	761	714	1247	1268	954
S2	N-BK	0	≤100	194	341	558
	JK-BK	709		1396	1821	838
S2L	JK-BK	754	1758	902	532	65 i 564
Lignin model						
jedinjenja	DHP-CP	0	620	639	1150	1050

Razlaganje spektara lignin model jedinjenja

Da bi nam bilo lakše i da bi objasnili razlike u gore dobijenim emisionim spektrima, poredjena je dugotalasna fluorescencija lignina i njegovih lignin model jedinjenja baziranih na koniferil alkoholu (DHP) i sa polimerom dobijenim mešanjem koniferil alkohola sa *p*-kumarične kiseline u njihovom prirodnom masenom odnosu (9:1) koji je karakterističan za kompresiono drvo (Nanayakkara et al. 2005, 2009).



Slika 4.3.8. Preklopljeni razloženi emisioni spektri DHP-a i razloženi spektri normalnog drveta (a), i preklopljeni razloženi spektri lignin model polimera CP i blago izraženog kompresionog drveta (b).

Preklopljeni emisioni spektri DHP-a i njegove razložene komponente sa emisionim spektrima normalnog drveta, kao i preklopljeni razloženi spektri CP 9:1 polimera i blago izraženog kompresionog drveta pokazani su na slici 4.3.8. Maksimumi i pozicije spektralnih komponenti pokazuju dobro slaganje na oba grafika, imajući u vidu različite uslove tokom sinteze u slučaju lignin model jedinjenja, kao čistog polimera i drveta, kao složenijog sistema nastalog interakcijom biopolimera koji utiču na strukturu lignina. Ovi rezultati objašnjavaju, da crveni pomak prisutan u kompresiji, barem delimično nastaje zbog povećane količine *p*-hidroksi lignina u ovakvom drvetu.

Nakon razlaganja, vidi se značajan crveni pomak dugotalasnih traka tj. APD komponenti za uzorke koji sadrže *p*-hidroksifenil jedinice (tabela 4.3.2., poslednji red) u poređenju sa čistim koniferil alkoholom tj. DHP. Ovaj crveni pomak bar delimično objašnjava sličan crveni pomak u emisionim spektrima kompresionog drveta, koji sadrži veću količinu *p*-hidroksi lignina baziranog na *p*-kumaril alkoholu (Nanayakkara et al. 2009).

DISKUSIJA

Prirodna fluorescencija ćelijskog zida uglavnom je pripisana ligninskim komponentama zida (Olmstead and Gray 1997). Pretpostavlja se da neznatna fluorescencija izolovane celuloze potiče od nerazgrađenog lignina u toku hemijskih procedura izolacije celuloze, kao i drugim prisutnim primesama kao što su proteini i hemiceluloze usled njihovih jakih kovalentnih i ne-kovalentnih interakcija (Olmstead and Gray 1997, Castellan et al. 2007). Iz tog razloga smo istraživali fluorescenciju holoceluloze, i uz pomoć FT-IR tehnike potvrdili odsustvo lignina u ovom materijalu. Lignin ima apsorpcioni maksimum na 280 nm a samim tim je i njegova fluorescencija najintenzivnija u UV oblasti (Olmstead and Gray 1997), mada značajna fluorescencija postoji i pri plavoj i zelenoj ekscitaciji (Donaldson and Bond 2005). Apsorpcioni maksimum celuloznih uzoraka javlja se na 265 nm sa fluorescentnim maksimumom na 420

nm nakon ekscitacije na 320 nm (Olmstead and Gray 1993). Naši rezultati pokazuju da je lignin glavni emiter fluorescencije u ćelijskim zidovima drvenastih biljaka.

Pokazali smo da UV ekscitacija pokazuje značajne razlike u emisionim fluorescentnim spektrima kod normalnog i kompresionog drveta. Ekscitacija plavom svetlošću proizvodi manje razlike koje se mogu uočiti samo između normalnog i jako izraženog kompresionog drveta, dok je blago izraženo kompresiono drvo spektralno slično normalnom drvetu. Sličnost fluorescencije u plavom delu talasnih dužina posledica je nestajanja glavne fluorofore koja emituje na 470 nm u kompresionom drvetu, i ne može se videti ekscitacijom na 488 nm.

Eksperimenti su pokazali da kod pobude u UV oblasti (365 nm) fluorescentna emisija raste pri ponovnom ozračivanju, za razliku od pobude u plavoj oblasti (488 nm). Ovo može biti posledica UV indukovane razgradnje veza u ligninu i polisaharidnim komponentama unutar ćelijskog zida, što dovodi do smanjenja neradijativnog gubitka energije.

Normalno i kompresiono drvo pokazuju sličan efekat pri ponovnom ozračivanju ali ne postoji nikakva promena u emisionim spektrima tako da se ovaj efekat ne može iskoristiti za poređenje razlika njihovih fluorescentnih spektara. Sličan porast emisije fluorescencije pri produženom izlaganju UV zračenju primećen je već ranije kod lignina dobijenog iz samlevenog drveta umreženog u hidroksi-propil celulozni film i kod uzorka filter papira (Castellan et al. 1992, Choudhury et al. 1992).

Jako kompresiono drvo

Blago izraženo kompresiono drvo prisutno je kod četinara i to brzo rastućih, gajenih u plantažama (Donaldson et al. 2004). Ono nije zapaženo u sporo rastućim vrstama četinara iako je ovo još suštinski neistraženo. Blago izraženo kompresiono drvo pokazuje osobine koje su na prelazu između osobina normalnog drveta i jako izraženog kompresionog drveta (Donaldson et al. 2004). Makroskopske osobine ovog drveta slične su normalnom drvetu i teško ih je detektovati sem fluorescentnom mikroskopijom ili hemijskom analizom prateći promenu količine lignina ili galaktana u njima (Mast et

al.2009, Altaner et al. 2010). Iz navedenog sledi da fluorescentna spektroskopija nudi veliki potencijal za praćenje kompresije drveta bez potrebe za velikom količinom uzorka i komplikovanim hemijskim analizama.

Na osnovu naših rezultata, možemo predložiti metodu za merenje jačine kompresije drveta korišćenjem fluorescentnih emisionih podataka u spektralnoj oblasti 435-485 nm, nakon ekstitacije na 350-365 nm. Pri korišćenju konfokalne mikroskopije neophodno je da šitina spektralnog intervala bude oko 20 nm kako bi se prikupio dovoljan broj fotona za merenje, mada bi bilo mnogo bolje koristiti fluorescenciju na većim površinama ili konvencionalnu mikroskopiju, sa tom manom da imaju malo spektralno razlaganje.

Metod za određivanje jačine kompresije kod drveta se dobija snimanjem spektara iz različitih ćelijskih regiona, razlaganjem spektara, u ovom slučaju, na pet komponenti i primenom APD analize. Crveni (niskoenergetski) pomeraj traka IV i V u opsegu 400- 600 cm^{-1} u poređenju sa normalnim drvetom jeste dokaz blago izražene kompresije (slika 4.3.6; tabela 4.3.2). Pomeraj dugotalasnih komponenti od $750 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ ili za njihov umnožak, potvrda je prisustva jako izražene kompresije u drvetu.

Nekoliko novijih radova pokazalo je opravdanost primene spektroskopskih metoda za merenje jačine kompresije drveta. Altaner i sardnici (2009) su koristili FT-IR mikro-spektroskopiju za merenje kompresije, baziranu na odnosu intenziteta aromatičnih i karboksilnih traka. Duncker i Spiecker (2009) su koristili reflektovanu svetlost i hiperspektralno snimanje za otkrivanje i klasifikaciju kompresionog drveta kod bele smrče (*Picea abies*). Međutim nijedna od gore spomenutih metoda ne pruža informacije na nivou pojedinačne ćelije.

Razlaganje i model jedinjenja

Bilo je mnogo pokušaja da se objasni elektronski spektar lignina u smislu otkrivanja različitih benzenovih jedinjenja koja postoje u ligninskoj strukturi (Falkehag et al. 1966, Korschin and Sundholm 1974, Lundquist et al. 1978, Albinsson et al. 1999). Ipak, nije moguće objasniti dugotalasnu fluorescenciju koja se javlja u narandžastoj oblasti spektra na osnovu emisije benzenske strukture (slika 4.3.1). Mi predlažemo da se ova

pojava može objasniti postojanjem konjugovanih polimernih struktura formiranih od gvajacil i *p*-hidroksifenil jedinica ili njihovih derivata, koji se stvaraju u toku polimerizacije. Konjugovane strukture formiraju dugačke lance naizmeničnih C-C i C=C veza. Energetski nivoi konjugovanih veza mogu se proračunati semikvantitativnom metodom FEMO koja pokazuje da su talasne dužine traka koje odgovaraju konjugovanim struktura proporcionalne kvadratu njihove dužine a obrnuto proporcionalne broju π -elektrona u strukturi. Postojanje pet određenih komponenti u svim spektrima, sem izuzetka za S2 region kompresionog drveta, sugerišu nam da postoji pet nezavisnih konjugovanih struktura koje emituju na različitim talasnim dužinama, u zavisnosti od dužine strukture koja se sastoji od oligomera koniferil alkohola, ili smeše gvajacil i *p*-hidroksifenil jedinica.

Posmatrani crveni pomak dugotalasnih APD komponenti kompresionog drveta, i još više izražen pomak u slučaju jako izraženog kompresionog drveta, u odnosu na normalno drvo (slika 4.3.5., tabele. 4.3.1 i 4.3.2.), pokazuje da su konjugovane strukture duže u kompresionom nego u normalnom drvetu. Crveni pomeraj sa korakom od $750 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ (tabela 4.3.2.) dobijen je za jako izraženo kompresiono drvo u odnosu na blago izraženo kompresiono drvo. Pomeraj raste za istu vrednost ili njegov umnožak (energija je proporcionalna talasnom broju). Ovo, ustvari, znači da su iste ili slične gradivne jedinice pripojene na postojeću konjugovanu strukturu, tokom sinteze lignina u kompresionom drvetu, kako bi se povećala njegova čvrstina.

Fina odstupanja od ovih rezultata mogu biti objašnjena varijacijama u stepenu konjugacije. Porast π karaktera prostih C-C veza dovodi do crvenog pomeraja i obrnuto. Mnogo manji, ali ne beznačajan, crveni pomeraj traka IV i V kod blago izraženog kompresionog drveta u odnosu na normalno drvo, znači da postoji porast konjugovanih struktura dodavanjem novih π veza ali da proces nije tako potpun i pravilan kao kod jako izraženog kompresionog drveta.

Fiziološka posledica porasta veličine konjugacije strukture je značajna. Porast π karaktera veza daje jačinu drvetu i potrebne su veće energije za raskidanje veza. Takođe, ovakve veze sprečavaju slobodnu rotaciju dajući veću krutost čitavoj strukturi. Ovo znači da drvo reaguje na kompresivni stres tako što proizvodi složenije mreže konjugovanih struktura koje u sebi sadrže gvajacil i *p*-hidroksifenil jedinice. Kao razlog mogu biti sterna

faktori, dok velike metoksi grupe u koniferil alkoholu mogu da spreče postavljanje strukture u odgovarajući položaj koji može da dovede do konjugacije. Dokazi za ovakav zaključak dolaze iz ranijih istraživanja koja su pokazala da izloženost biljaka azotnom ili ozon/suša stresu, njihovo lišće emituje žutu fluorescenciju. Spekulisano je ali nikad dokazano, da ova fluorescencija potiče od ligninskih struktura (Paakkonen et al. 1998, Corp et al. 2003). Poređenje dugotalasne fluorescencije sintetisanog DHP polimera, sintetisanog iz čistog koniferil alkohola, sa polimerom CP 9:1 dobijenog mešanjem gvajacil i *p*-hidroksifenil monomera (tabela 4.3.2) pokazuje značajan crveni pomeraj za uzorke koji sadrže *p*-hidroksifenil monomerne jedinice. Odnos gvajacil/*p*-hidroksifenil jedinica u polimeru je sličan kao kod kompresionog drveta. Iz ovoga sledi, da možemo da napravimo širi zaključak da biljke pod stresom proizvode lignin sa dužim konjugovanim strukturama da bi povećale jačinu i krutost ćelijskih zidova. Ovaj zaključak je dodatno podržan činjenicom da su slične spektralne krive i pozicije komponenata normalnog drveta u odnosu na sintetisan polimer DHP, i kod blago izraženog kompresionog drveta sa polimerom CP 9:1 tj gvajacil/*p*-hidroksil polimerom (slika 4.3.6.). Ovo nam ukazuje da lignin u normalnom drvetu i polimer DHP imaju slične strukture. Lignin u blago izraženom kompresionom drvetu takođe ima strukture slične gvajacil/*p*-hidroksifenil polimeru (CP).

Analizom apsorpcionih spektara, normalnog, blago izraženog kompresionog i jako izraženog kompresionog drveta je u saglasnosti sa gornjim zaključcima (podaci nisu prikazani). Varijacije u pozicijama apsorpcionih komponenti imaju isti trend koji je posmatran u fluorescentnim spektrima, tj. jako izraženo kompresiono drvo ima veću talasnu dužinu apsorpcije. Pošto je apsorpcija direktno proporcionalna koncentraciji apsorbujućih vrsta, znatno veći intenzitet dugotalasne komponente u apsorpcionim spektrima ćelijskog zida jako izraženog kompresionog drveta u poređenju sa normalnim drvetom (podaci nisu prikazani), pokazuju da ćelijski zid jako izraženog kompresionog drveta sadrži značajno veću količinu ligninskih struktura sa dužim lancima u odnosu na normalno drvo. Već je ranije pokazano da u jako izraženom kompresionom drvetu dolazi do porasta količine lignina i do 10% od ukupne količine prisutne u ćelijskom zidu (Altaner et al. 2009).

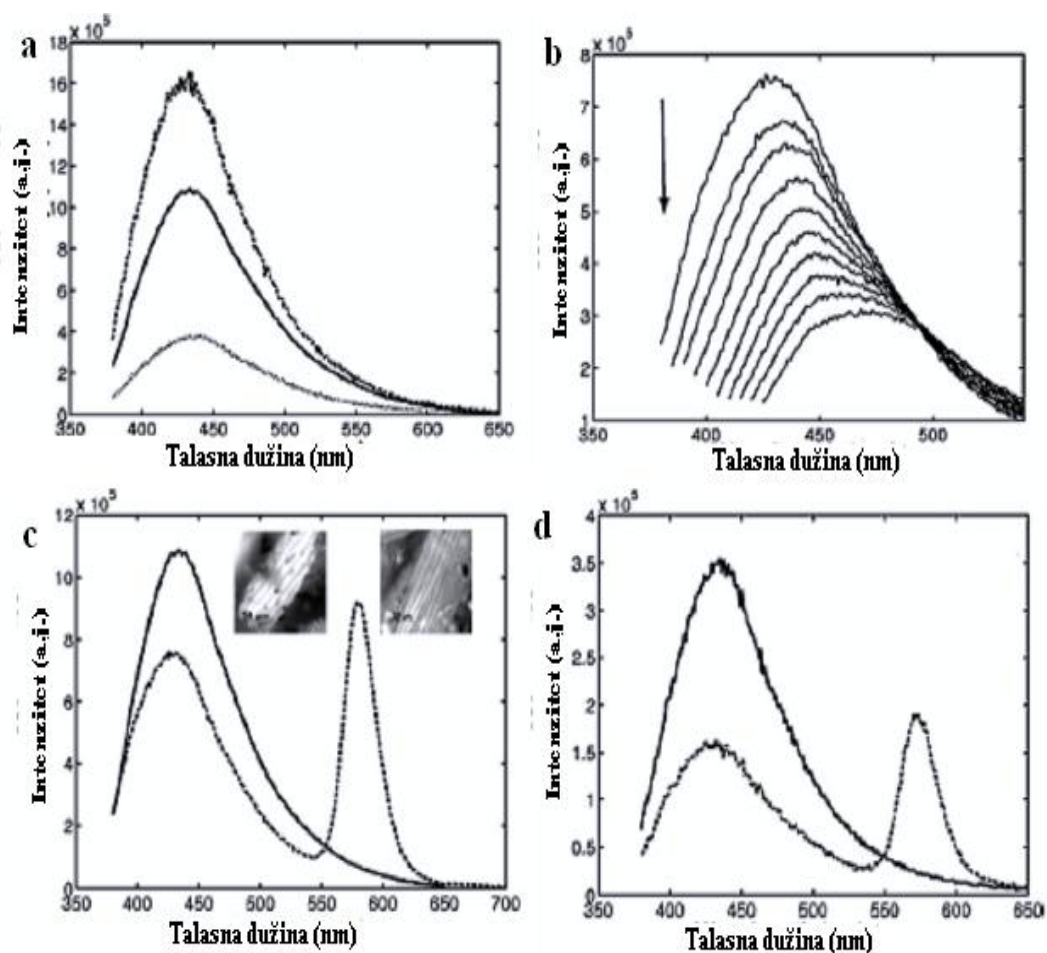
4.4. PRIMENA CdSe KVANTNIH TAČAKA U ISPITIVANJU ĆELIJSKOG ZIDA

REZULTATI

Slika 4.4.1. prikazuje emisione spektre uzoraka ćelijskog zida izolovanog iz grana Pančičeve omorike u prisustvu i u odsustvu CdSe QDs. Spektri prikazani na slici 4.4.1.a, c i d su pobuđeni na 360 nm. Kvantne tačke rastvorene u hloroformu (CdSe/hloroform), mogu da interaguju sa hidrofobnim domenima ćelijskog zida. Ispitali smo uticaj rastvarača na fluorescenciju ćelijskog zida. Kao hidrofilni rastvarač korišćena je voda a kao hidrofobni korišćen je hloroform.

Poređenje intenziteta emisije suvog zida, sa intenzitetom emisije prilikom dodavanja hloroforma i vode dat je na slici 4.4.1.a. Dodavanje hloroforma na suv ćelijski zid omorike dovodi do porasta fluorescencije za faktor 1.5, ali ne menja oblik spektralne krive, ni broj APD komponenti (podaci nisu prikazani). Dodavanje vode na suv ćelijski zid omorike dovodi do opadanja intenziteta emisije 2.5 puta, ali takođe ne menja oblik spektralne krive ni broj APD komponent (podaci nisu prikazani).

Na slici 4.4.1.b prikazan je primer preklopljenih spektara dobijenih na različitim talasnim dužinama (od 360 nm do 405 nm). Očigledno je da se spektri međusobno razlikuju i po intenzitetu i po obliku spektralne krive nakon dodavanja QDs. Nakon dodavanja CdSe/hloroform u oba uzorka, suvom izolovanom ćelijskom zidu i ćelijskom zidu tretiranom hloroformom dolazi do opadanja intenziteta emisije fluorescencije (slika 6.3.1.c i d). Ova pojava je takodje prikazana na umetnutim mikroskopskim slikama (slika 4.4.1.c) suvog ćelijskog zida izolovanog iz grana omorike, u prisustvu (desna slika) i odsustvu CdSe QDs (leva slika).



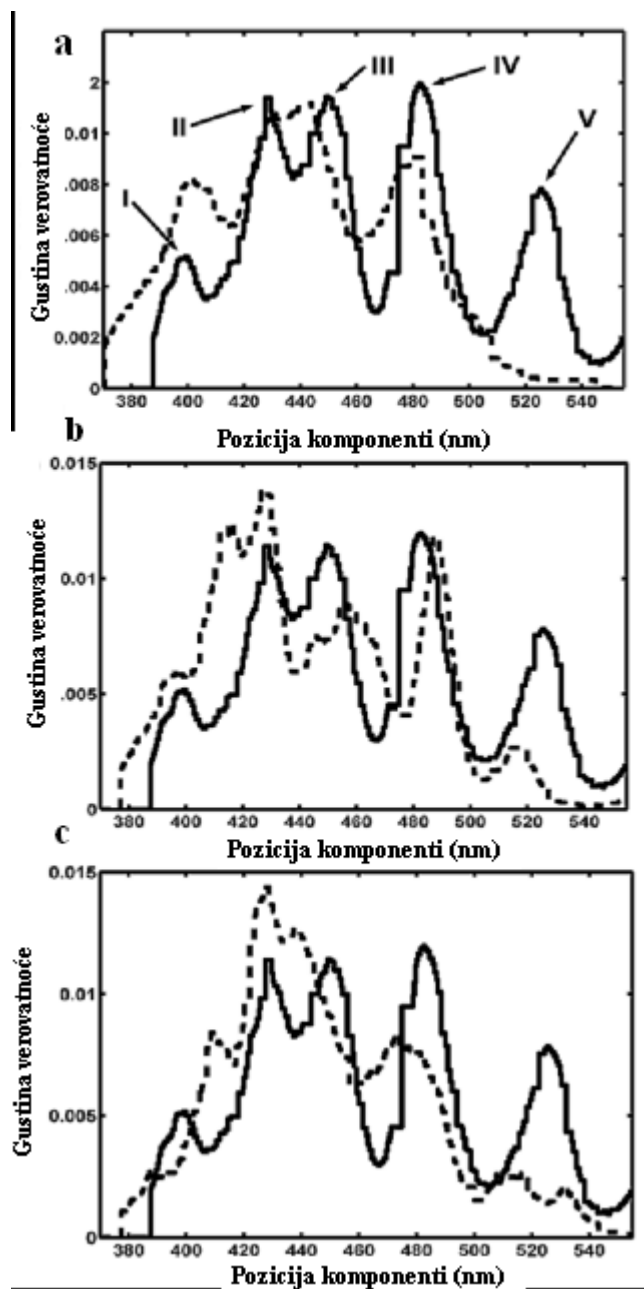
Slika 4.4.1. Emisioni spektri ćelijskog zida izolovanog iz grane *P. omorika* bez i sa 3.5 nm CdSe QDs ekscitovanim na 360 nm (a) Preklopljeni spektri suvog zida (puna linija), suv zid sa QDs/hloroform (isprekidana linija) i suv zid sa vodom (tačkasta linija) (b) primer preklopljenih emisionih spektara ćelijskog zida nakon ekscitacije na različitim talasnim dužinama (od 360 - 405 nm) sa korakom od 5 nm (c) preklopljeni spektri suvog zida (puna linija) i suvog zida + QDs/hloroform (isprekidana linija). Na sliku su ubačene mikroskopske slike: izolovan ćelijski zid bez (levo) i sa 3.5 nm CdSe QDs rastvorene u hloroformu(desno); (d) suv ćelijski zid + hloroform (puna linija) i suv ćelijski zid + QDs/hloroform (isprekidana linija).

Slike dobijene fluorescentnom mikroskopijom su korišćene kako bi se videlo da li QDs homogeno obeležavaju strukturu ćelijskog zida. Deo slike prikazuje vlaknastu

strukturu koja se sastoji od paralelnih vlakana. Evidentno je da je na obe slike, sa i bez QDs, fluorescentni intenzitet uniforman sa cele površine. Može se primetiti opadanje u osvetljenosti slike nakon dodavanja QDs (114.09) u odnosu na osvetljenost čistog ćelijskog zida (146.98). Ovi podaci dobijeni su na osnovu računanja osvetljenosti cele površine slike, tj uzorka.

Kada se u uzorak koji je tretiran QDs/hloroform doda voda dolazi do pojave opadanja fluorescentne emisije u odnosu na fluorescenciju uzorka pre dodavanja vode. U obrnutoj proceduri, tj ako se na suv ćelijski zid doda prvo voda a zatim QDs/hloroform dolazi do neznatnog povećanja emisije u odnosu na uzorak ćelijskog zida tretiranog samo QDs/hloroformom (rezultati nisu prikazani).

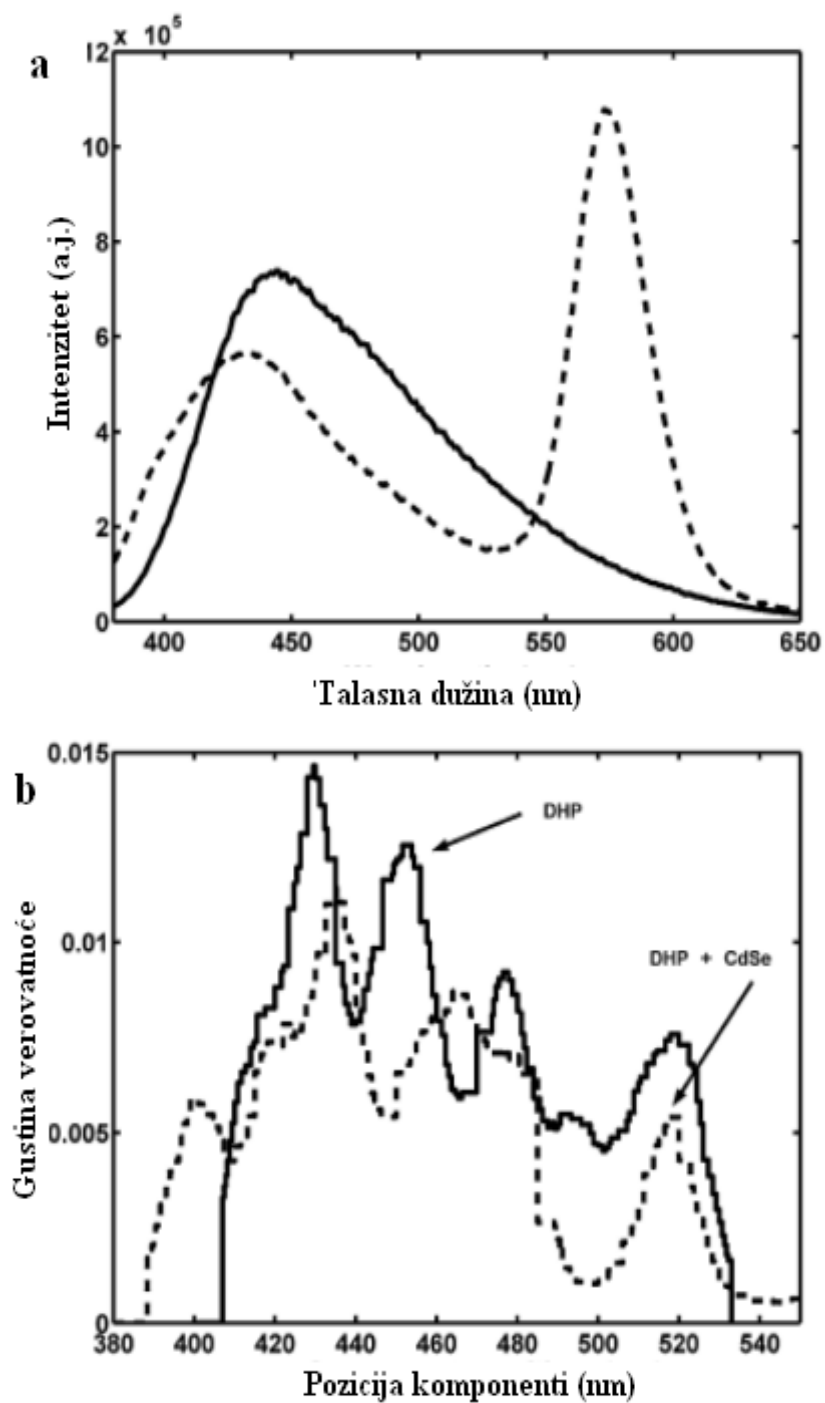
Matematička analiza grupe spektara, kao što su prikazani na slici 4.4.1.b, daje približnu gustinu raspodele (APD) tj. pozicije spektralnih komponenti ćelijskog zida. Pozicija APD maksimuma odgovara poziciji spektralnih komponenti uzorka. Spektri izolovanog suvog ćelijskog zida iz grana omorike daje pet APD pikova (maksimuma) (slika 4.4.2, puna linija) pokazujući da se njegovi spektri sastoje od pet komponenti, od kojih svaki pik odgovara nezavisnoj fluorofori, obeleženoj oznakama od I do V (slika 4.4.2.a). Kada se CdSe kvantne tačke rastvorene u hloroformu dodaju na uzorak suvog ćelijskog zida, najdugotalasnija APD komponenta u spektru nestaje (slika 4.4.2.a, isprekidana linija). Ako je u uzorku ćelijskog zida prisutna voda, broj komponenti ostaje isti nakon dodavanja CdSe QDs rastvoreno u hloroformu, zahvaljujući redosledu dodavanja komponenti (tj vode i QDs/hloroform) (slika 4.4.2.b i 4.4.2.c). U prisustvu vode najdugotalasnija komponenta (V) ne nestaje potpuno, ali značajno opada njen intenzitet (slika 4.4.2.b i 4.4.2.c). U slučaju kada se uzorku suvog ćelijskog zida prvo dodaje QDs/hloroform pre vode, druga dugotalasna APD komponenta (IV) pomeren je u crveni (niskoenergetski) deo spektra, dok se ova komponenta pomera u plavi deo spektra kada je voda već prisutna u uzorku ćelijskog zida pre dodavanja QDs.



Slika 4.4.2. Preklapljene APD komponente ćelijskog zida *Picea omorika* (a) suv ćelijski zid (puna linija) i suv ćelijski zid + QDs/hloroform (isprekidana linija) (b) suv ćelijski zid (puna linija) i suv ćelijski zid + QDs/hloroform+ voda (isprekidana linija) * (c) suv ćelijski zid i suv ćelijski zid + voda+ QDs/hloroform (isprekidana linija)*, * raspored dodavanja komponenti u uzorku

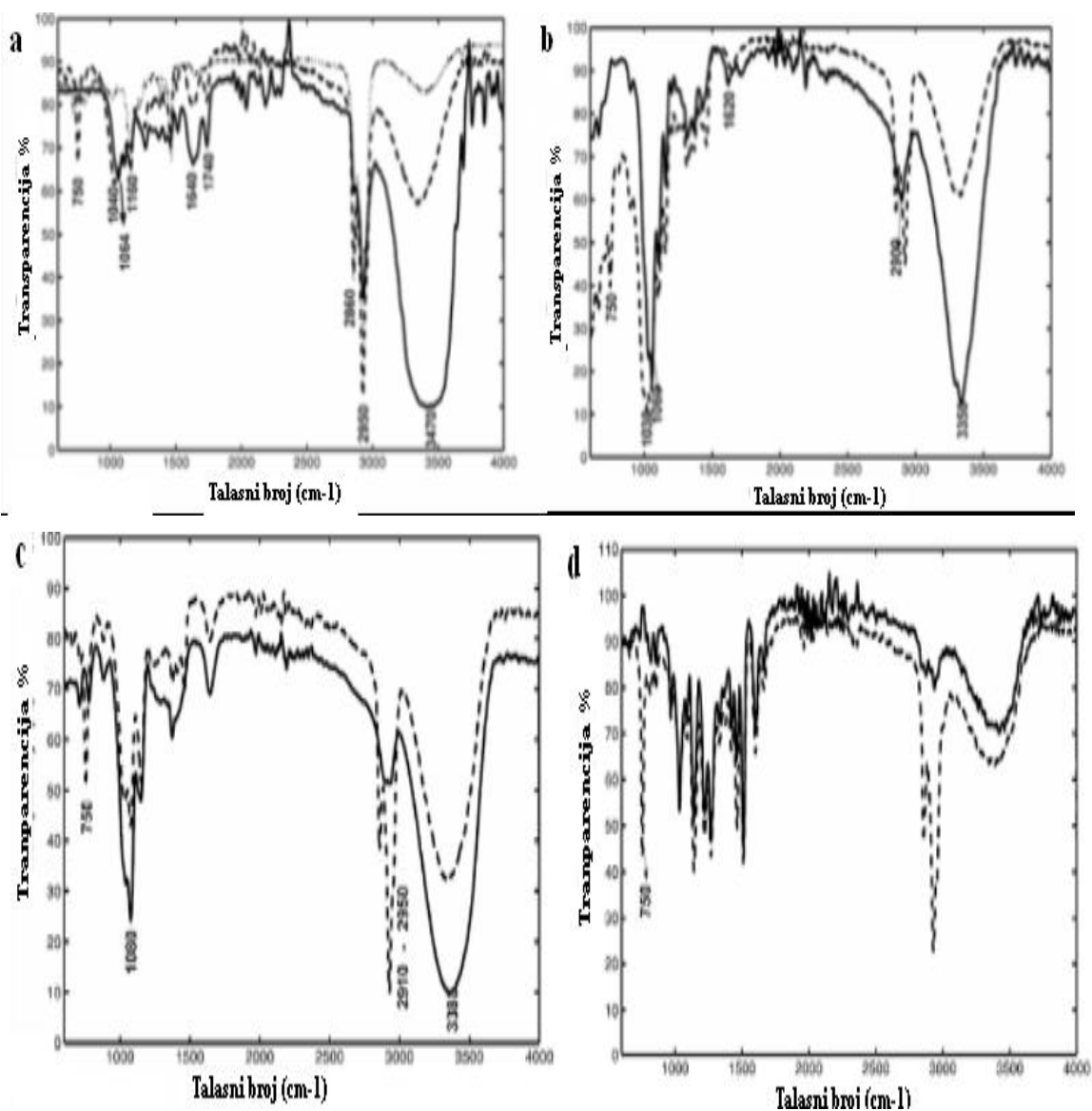
U ovom istraživanju takođe je posvećena pažnja interakciji QDs sa pojedinačnim polimerima ćelijskog zida. Lignin je glavni polimer kome se prepisuje autofluorescencija ćelijskog zida (Olmstead and Gray 1997, Donaldson et al. 2010). Njegova interakciju sa QDs ispitivana je merenjem emisionih spektara lignin model jedinjenja DHP, kao adekvatne zamenu za prirodni lignin (Lewis et al. 1987), sa i bez vezanih QDs (slika 4.4.3.).

Lignin model polimer sintetisan je iz koniferil alkohola, pošto je u ćelijskom zidu omorike on glavni lignin prekursor. Postoji promena u obliku DHP emisionog maksimuma, a takođe dolazi i do opadanja intenziteta fluorescencije u prisustvu QDs u ovom polimeru. u odnosu na čist polimer DHP (slika 4.4.3.a). Najdugotalasnija APD komponenta opada u prisustvu vezanih QDs, dok su ostale komponente pomerene u plavu (visokoenergetsku) spektralnu oblast (slika 4.4.3.b). Kao indikacija promena na nivou molekulskih grupa, snimljeni su FT-IR spektri lignin model jedinjenja. Uporedo su snimljeni i FT-IR spektri čiste celuloze i arabinogalaktana kao predstavnika hemiceluloza, u svim slučajevima sa i bez dodavanja QDs (slika 4.4.4.b-d). Ovi FT-IR spektri pojedinačnih polimera i njihova interakcija sa QDs poređeni su sa spektrima izolovanog ćelijskog zida (slika 4.4.4.a).



Slika 4.4.3. (a) Emisioni spektri lignin model jedinjenja (DHP) sintetisani iz koniferila alkohola kao prekursora, bez (puna linija) i sa 3.5 nm veličine CdSe Qds (isprekidana linija), ekscitovani na 360 nm; (b) Preklapljene APD komponente koje odgovaraju spektrima u (a).

U FT-IR spektrima ćelijskog zida izolovanog iz grane *P. omorika* posle dodavanja QDs (slika 4.4.4a) traka na 1060 cm^{-1} , koja predstavlja C–O, C–C, O–C–H vibracije u glukozidnim polisaharidnim lancima (Kačuráková et al. 2000, Wilson et al. 2000), pomerena je na 1040 cm^{-1} u prisustvu QDs (slika 4.4.4.a). Traka na 1160 cm^{-1} , koja predstavlja C–O–C vibracije glukozidnog lanca celuloze, opada u prisustvu QDs. Kad su u uzorcima prisutne QDs takodje dolazi do opadanja intenziteta traka na 1640 cm^{-1} koja predstavlja C–C vibracije i u prstenu i u bočnom lancu fenilpropanoidnog monomera u ligninu (Pretsch et al. 1981, Faix 1991, Faix 1992), kao i trake na 1740 cm^{-1} , koja predstavlja C–O vibracije estara (Kačuráková et al. 2000, Wilson et al. 2000, Faix 1991, Faix 1992) uglavnom karakteristične za polisaharide. Vibracija na 2900 cm^{-1} karakteristična je za C–H vibracione modove. Intenzitet traka koje karakterišu OH veze na 3400 cm^{-1} , značajno opadaju u prisustvu QDs u uzorku izolovanog ćelijskog zida. U FT-IR spektru celuloze, vibracija na 1060 cm^{-1} pomerena je na 1030 cm^{-1} u prisustvu QDs (slika 4.4.4.b), a takodje postoji značajno opadanje intenziteta traka koje su povezane sa vibracijama OH grupe oko 3350 cm^{-1} . U spektrima arabinogalaktana (slika 4.4.4.c) ili DHP-a (slika 4.4.4.d) ne postoji značajna promena FT-IR spektra kada su u uzorcima prisutne QDs.



Slika 4.4.4. FT-IR spektri (a) suv ćelijski zid iz grane *P. omorike*, (b) celuloza (puna linija bez QDs, isprekidana sa QDs), (c) arabinoksilan, (d) lignin model jedinjenja. Puna, isprekidana i tačkasta linija označavaju spektre struktura, bez QDs ili sa QDs ili čiste QDs, respektivno. Spektri samih QDs (tačkasta linija) dati su samo na slici (4.4.4a).

DISKUSIJA

Hidrofobne i hidrofilne interakcije QDs sa ćelijskim zidom

Podaci iz dosadašnjih radova potvrđuju da fluorescencija ćelijskog zida potiče od lignina i sličnih struktura, kao što su hidrocinamični interpolimerni mostovi (Olmstead and Gray 1997, Donaldson et al. 2010). Takođe je pokazano da fluorescencija lignina u samom ćelijskom zidu potiče od konjugovanih polimernih struktura (domena), različitih dužina, formiranih od gvajacil i *p*-hidroksifenil jedinica ili njihovih derivata nastalih u toku polimerizacije (Donaldson et al. 2009).

Konjugovane strukture formiraju dugačke lance C-C i C=C veza. Fluorescentne slike ćelijskog zida sa i bez QDs (slika 4.4.1c, dodatak) pokazuju da je intenzitet autofluorescencije uniforman u različitim regionima površine ćelijskog zida. Ovo predstavlja potvrdu da su molekulske vrste koje emituju, raspoređene ravnomerno u fragmentima ćelijskog zida, i takođe da su QDs raspoređene relativno ujednačeno u uzorku. Ovaj dokaz je važan zbog potrebe za većom primenom QDs kao potencijalnog obeleživača u biološkim ispitivanjima. Nedavno je rađeno istraživanje na TiO₂-ZnO kvantnim česticama koje su dodavane u semena *Vigna radiata*, kako bi se proučila njihova primena kao obeleživača u dobijanju slika bioloških uzoraka umesto fluorescentnih boja (Wu et al 2007).

Razlaganje emisionih spektara ćelijskog zida izolovanog iz grana Pančićeve omorike (slika 4.4.2.) pokazuje da je u ćelijskom zidu prisutno pet glavnih komponenti (fluorescirajućih struktura). Interakcija QDs sa ćelijskim zidom zavisi od toga da li je ćelijski zid suv ili je tretiran vodom pre dodavanja QDs (slika 4.4.2.b i c). Ovim smo pokazali da hidrofobne i hidrofilne interakcije imaju značajnu ulogu pri interakciji QDs sa ćelijskim zidom. Ćelijski zid sam po sebi sadrži oba tipa interakcija. Hidrofobni domenu uglavnom sadrže lignin polimere, ali postoje indikacije da polisaharidi, mada u manjoj meri, mogu da se ponašaju hidrofobno tj. da učestvuju u hidrofobnim interakcijama. Hidrofilni region ćelijskog zida uglavnom se sastoji od polisaharidnih blokova (celuloze i hemiceluloze) (Sarkanen et al. 1971, Hatakeyama and Hatakeyama 1998, Boukari et al.

2009). Kombinujući tretmane sa dva različita rastvarača, hidrofobnim-hloroformom i hidrofilnom-vodom i simultanim dodavanjem QDs, možemo proučavati obe vrste interakcija u strukturi ćelijskog zida. Takođe, kroz promenu intenziteta autofluorescencije, možemo videti afinitet QDs prema određenim strukturama u ćelijskom zidu.

Hloroform ili voda kao rastvarači, interaguju sa polimerima u ćelijskom zidu menjajući intenzitet fluorescentnih spektara (slika 4.4.1.a). Oni ipak ne mogu da utiču na dužinu C-C i C=C konjugovanih lanaca, ali mogu preko elektrostatičkih interakcija promeniti raspodelu gustine naelektrisanja unutar konjugovanih struktura. Voda interaguje putem vodoničnih veza sa hidrofilnim domenima u ćelijskom zidu, dok hloroform utiče na hidrofobne domene. Hidrofobna interakcija povećava krutost strukture uglavnom preko ligninskog makromolekula, što zauzvrat, povećava intenzitet fluorescencije (slika 4.4.1.a).

Nasuprot ovome, makromolekuli koji su tretirani vodom postaju fleksibilniji, obezbeđujući lakši transfer energije okruženju, što izaziva znatno opadanje intenziteta fluorescencije u odnosu na suv izolovan ćelijski zid (slika 4.4.1.a). Iz ovog možemo da zaključimo da polimeri ćelijskog zida imaju izraženu dinamičku elektronsku strukturu, što im omogućava da lako reaguju na elektrostimuluse. Pomoću ovog možemo da objasnimo i pojavu da interakcija QDs sa ćelijskim zidom zavisi od toga da li je u ćelijskom zidu prisutna voda ili ne, pre dodavanja QDs.

CdSe QDs su nanočestice male veličine (3.5 nm). Njihova veličina omogućava lako prodiranje u strukturu ćelijskog zida. Ranije je pretpostavljeno da male čestice bilo hidrofilne ili hidrofobne mogu da se vežu za strukture u ćelijskom zidu. Štaviše, pri njihovim visokim koncentracijama apsorpcija hidrofobnih nanočestica, posebno onih veće veličine, na ćelijski zid i njihovo prodiranje u strukturu, imaju ozbiljne posledice na fiziološko stanje biljne ćelije (Chen et al. 2010). CdSe nanočestice imaju hidrofobne osobine zbog rastvarača TOPO, tako da u interakciji sa uzorkom suvog ćelijskog zida, hidrofobne interakcije dominiraju. Smanjenje intenziteta fluorescencije ćelijskog zida u prisustvu QDs (slika 4.4.1.), kao i opadanje osvetljenosti (slika 4.4.1), pokazuju da se dešava transfer energije sa ćelijskog zida na QDs. Ovakve strukturne promene mogu se zapaziti i u fluorescentnim spektrima, jer nestaje odgovarajuća fluorofora tj. najdugotalasnija APD komponenta (slika 4.4.2.a). Nestajanje ove fluorofore može biti

povezano sa opadanjem dužine konjugovanih C-C i C=C lanaca u polimeru lignina u prisustvu QDs (Donaldson et al. 2010).

Jasno se vide razlike između interakcija suvog zida i zida tretiranog vodom, sa QDs preko pozicija APD komponenti na slici 4.4.2. Kada se doda voda posle tretmana ćelijskog zida sa QDs/hloroform, omogućena je delimična rekonstrukcija C-C i C=C konjugovanih lanaca, što se vidi ponovnim nastajanjem dugotalasne APD komponente V i pomerajem ostalih APD komponenti ka dugotalasnom delu spektra (slika 4.4.2.b). Ako se ćelijski zid tretira vodom a zatim QDs/hloroformom, delimično je sprečena potpuna interakcija zida sa QDs, što se vidi iz činjenice da APD komponenta V ne nestaje potpuno (slika 4.4.2.c). Promene u ligninskoj strukturi pri interakciji sa QDs nisu kompletne zbog prisustva vode u ćelijskom zidu i zato dugotalasna APD komponenta ne nestaje upotpunosti (slike 4.4.2.b i c). Ovim pokazujemo da hidrofilne interakcije makromolekula ćelijskog zida sa vodom smanjuju interakcije QDs/hloroform sa ćelijskim zidom. Ove interakcije su takođe praćene malim promenama u drugim delovima molekulske strukture, što pratimo crvenim (slika 4.4.2.b) i plavim (slika 4.4.2.c) pomerajima većine APD komponenti, pokazujući da su ove strukture prostorno povezane tj. zatvorene. Ovo znači da strukturne promene u jednom delu zida izazivaju strukturne promene i kod drugih komponenata što dovodi do preraspodele naelektrisanja unutar svake komponente, a što se vidi u pomeranju spektralnih maksimuma odgovarajućih traka. Pravac pomeraja zavisi od redosleda dodavanja vode, pre ili posle interakcije sa QDs. Ako su prisutne hidrofilne interakcije u vlažnom ćelijskom zidu, strukturna pregrupisanja su različita posle dodavanja QDs, za razliku od onih koje se dešavaju kada QDs interaguju sa suvim ćelijskim zidom. Neophodan uslov za interakciju QDs sa ćelijskim zidom i za slobodan elektronski transfer (FRET) je njihovo međusobno rastojanje tj blizina.

Hloroform kao rastvarač omogućava pravilnu konfiguraciju strukture ćelijskog zida za interakciju njegovih hidrofobnih grupa sa QDs u procesu transfera energije. Ako se voda dodaje nakon interakcije ćelijskog zida sa QDs, hidrofilna interakcija se superponira na već postojeću hidrofobnu interakciju. Ovakve promene pokazuju da su se desile odgovarajuće konformacione promene u ćelijskom zidu. U ćelijskom zidu u prisustvu vode, hidrofilne i dipol-dipol interakcije između molekula vode i polimernih grupa

ćelijskog zida dovode do pojave konformacionih promena u strukturi zida. Posle dodavanja QDs na uzorak ćelijskog zida koji je već interagovao sa vodom, suprotno prethodnom slučaju, javljaju se hidrofobne interakcije QDs sa dostupnim grupama tj domenima. U ovakvim okolnostima, dolazi do plavog pomeraja dugotalasnih APD komponenti (slika 4.4.2.c), što može da ukazuje na smanjenje stepena konjugacije i što znači da veze postaju lokalizovane. Ove promene ne moraju znatno da utiču na strukturu ćelijskog zida na makroskopskom nivou, što se vidi preko uniformne raspodele osvetljenosti ćelijskog zida pre i posle dodavanja QDs (slika 4.4.1.c, dodatak).

Interakcija QDs sa polimerima ćelijskog zida

Kao što je već rečeno, fluorescencija lignina unutar ćelijskog zida delom može da se tumači preko postojanja konjugovanih polimernih struktura tj. razgranatih C-C i C=C veza. Energetski nivoi konjugovanih molekula mogu se izračunati semikvantitativnom metodom FEMO (Levine 1988). Postojanje pet diskretnih komponenata u svim spektrima izrazito sugerise da postoji pet nezavisnih konjugovanih struktura koje emituju na različitim talasnim dužinama i koje zavise od njihove dužine. Nestajanje najdugotalasnije APD komponente posle dodavanja QDs na suv ćelijski zid sugerise da su prekinute konjugovane strukture koje emituju na 530 nm, i da je dužina njihovih konjugovanih lanaca smanjena. Simultano opadanje FT-IR traka na 1630 cm^{-1} i 1740 cm^{-1} , u ćelijskom zidu kod koga su prisutne QDs (slika 4.4.4.a), dobro podržava ovo tumačenje. Ove veze karakterišu vibracije C=C u ligninskim bočnim lancima konjugovanih sa prstenom (1630 cm^{-1}) i estarske veze (1740 cm^{-1}) (Faix 1991, Faix 1992). Pretpostavljamo da su ovakve lignin konjugovane strukture prisutne u ćelijskom zidu kao celini, jer prisustvo QDs ne menja FT-IR spektar DHP-a kao lignin model jedinjenja (slika 4.4.4 d) i njihovo prisustvo ne uklanja najdugotalasniju APD komponentu (520 nm) u DHP emisionom spektru već samo na određen način smanjuje njen intenzitet (slika 4.4.3.b). Ove činjenice pokazuju da je interakcija QDs sa ligninom bolja, kada su konjugovane ligninske C-C i C=C strukture deo strukture samog ćelijskog zida. Kraus i Brus (Krauss and Brus 1999) su merili elektrostatičke osobine CdSe nanočestica pomoću Mikroskopije elektrostatičkom silom

(EFM-Electron Force Microscopy). Kao rezultat su dobili da je polovina nanokristala neutralna a da druga polovina ima permanentno pozitivno naelektrisanje. Fotoekscitacija nanočestica, koja se dešava u toku fluorescentnih merenja, dovodi do pojave dodatnog pozitivnog naelektrisanja nanočestica (Krauss and Brus 1999). U jakim elektrostatičkim interakcijama, pozitivne QDs privlače negativno naelektrisanje (elektrone) iz ligninskih C=C veza, umanjujući konjugaciju u određenim delovima konjugovanih lanaca i tako smanjuju njihovu dužinu. Ovako može da se obezbedi put za transfer energije sa lignina na druge strukturne komponente, što objašnjava opadanje intenziteta fluorescencije nakon dodavanja QDs (slika 4.4.3.a). Ove interakcije dovode do konformacionih promena u strukturi lignina a samim tim i do promene u spektrima ćelijskog zida. Može se pretpostaviti da sterna faktori sprečavaju interakciju QDs sa dvostrukim C=C vezama u DHP-u, što nam ukazuje na to da je struktura lignina mnogo pristupačnija tj. otvorenija u ćelijskom zidu kao celini nego u lignin model jedinjenju (DHP).

U FT-IR spektrima, u prisustvu QDs dolazi do pomeranja traka na 1060 cm^{-1} i u spektru ćelijskog zida i u spektru čiste celuloze na 1040 cm^{-1} (u zidu) i na 1030 cm^{-1} (u celulozi) i sa paralelnim opadanjem u intenzitetu OH traka na 3400 cm^{-1} (slika 4.4.4.a i b). Ove činjenice pokazuju da su promene u FT-IR spektrima čiste celuloze slične sa promenama u ćelijskom zidu. FT-IR spektar arabinogalaktana (hemiceluloze) se ne menja značajno (slika 4.4.4.c), pokazujući da se QDs u ćelijskom zidu vezuju za celulozu. Ovim je pokazano, da prilikom vezivanja QDs za ćelijski zid, pored hidrofobnih interakcija sa ligninom, važna je i raspodela hidrofilnih reakcija QDs sa celulozom. Značajno smanjenje intenziteta OH vibracija u prisustvu QDs, oba FT-IR spektra i celuloze i ćelijskog zida, ukazuje da se interakcija verovatno odigrava preko OH grupa celuloze putem jake elektrostatičke interakcije pozitivno naelektrisanih QDs sa elektronegativnim kiseonikom OH grupe. Ova interakcija je veoma jaka i razgrađuje ne samo mrežu vodoničnih veza već dovodi do preraspodele elektronske gustine unutar celuloznih makromolekula, što pokazuje pomeraj trake ka nižim talasnim brojevima u FT-IR spektru celuloze ukazujući na slabljenje odgovarajuće veze.

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da se CdSe QDs vezuju prvenstveno za celulozu i za lignin u ćelijskom zidu *P. omorika*. QDs se vezuju za lignin

uglavnom preko interakcije sa C-C i C=C razgranatim lancima. Interakcija QDs sa celulozom ostvaruje se preko elektrostatičkih interakcija sa njenim OH grupama. Strukturna preraspodela u ćelijskom zidu kao posledica interakcije sa QDs značajno zavisi od prisustva vode.

Prikazani rezultati takođe pokazuju da su QDs pogodne za homogeno obeležavanje celog ćelijskog zida. Ovo je posledica rasporeda molekula u samom ćelijskom zidu i ekstremno male veličine kvantnih tačaka. Ekstremno mala veličina kvantnih tačaka (2-10 nm) omogućava prodiranje ovih nanočestica u složenu polimernu kompozitnu strukturu ćelijskog zida i njihovu interakciju sa njegovim pojedinačnim makromolekulima.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivali smo uticaj različitih lignin monomera (koniferil alkohola, *p*-kumarične kiseline) i ferulične kiseline i uticaj njihovog masenog udela na strukturu i funkciju ligninskog makromolekula. Na osnovu razlaganja fluorescentnih spektara sintetisanih različitih lignin polimera, dobijena spektralna pomeranja u niskoenergetsku oblast i pojava dugotalasnih APD komponenti sugerišu nam da je došlo do formiranja novih i produženja već postojećih π -konjugovanih lanaca u ligninskom makromolekulu. Ovi rezultati doprinose boljem razumevanju uticaja strukturnih varijacija u lignin polimeru na plastičnost celog ćelijskog zida. Na osnovu ovih istraživanja možemo predvideti na koji će se način modifikovati struktura lignina unutar ćelijskog zida u uslovima kad je biljka izložena stresu.

Na osnovu poređenja strukturnih karakteristika ćelijskog zida mekog drveta Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně, Gymnospermae, drvenasta četinarska vrsta), tvrdog drveta javora (*Acer platanoides* L., Angiospermae, Dicotyledones, drvenasta listopadna vrsta), i kukuruza (*Zea Mays* L., Angiospermae, Monocotyledones, žitarica iz familije trava), jasno se vidi prostija struktura ćelijskog zida kukuruza. Struktura ćelijskog zida kukuruza, koja u sebi sadrži manji procenat i celuloze i lignina a veći sadržaj hemiceluloza u odnosu na obe drvenaste vrste, pokazuje veći stepen kristaličnosti. Indirektno pokazujemo da vrsta i količina hemiceluloznih komponenti ima veliki uticaj na umrežavanje celuloznih vlakana, a samim tim direktno utiče na količinu kristalne forme celuloze u ćelijskim zidovima odgovarajuće biljne vrste. Zbog ovakve specifične interakcije hemiceluloza sa celulozom, koja je uglavnom elektrostatičke prirode ili se ostvaruje putem vodoničnih veza, gradivne hemiceluloze (arabinoglukuronoksilan) u ćelijskom zidu kukuruza dovode do njegove veće kristaličnosti. Kod obe vrste drveta stepen kristaličnosti je ustaljen i iznosi 42% bez obzira na vrstu. Vidi se jasna razlika u građi ligninskog molekula, koji u sebi sadrži različite vrste monolignola (G-lignin, GH-lignin, GSH-lignin) što dovodi do jasnih razlika u kompoziciji ćelijskog zida kod različitih

biljnih vrsta. Sa fizičko-hemijskog aspekta, prisustvo različitih kovalentnih i fizičkih interakcija koje zavise od ukupnog hemijskog sastava, diriguje finu strukturu čitave kompozicije ćelijskih zidova. Ovde smo podržali hipotezu da se celulozni mikrofibrili i hemiceluloze čvrsto vezuju preko višestrukih vodoničnih veza što pretpostavljamo ima direktan uticaj na formiranje određene ligninske strukture i uticaj na kristalichnost ćelijskog zida (Perez 2005).

Na osnovu odgovarajućeg matematičkog modela primenjenog za obradu fluorescentnih mikroskopskih slika, pronađeno je da u biljkama koje su izložene mehaničkom stresu, postoji porast u količini *p*-kumaričnih jedinica što povećava mehaničku krutost, preko paralelnog pakovanja dugačkih lanaca naizmeničnih C-C i C=C veza. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ispitivanjem lignin model polimerima u ovom radu. Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da fluorescenciju zajedno sa odgovarajućim matematičkim modelom možemo koristiti kao metodu za merenje jačine kompresije u drvetu.

Kvantne tačke (QDs) su poluprovodne nanočestice koje se široko preimenjuju u biologiji kao fluorescentni obeleživači. Dobijeni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da se CdSe QDs primarno vezuju za celulozu i lignin u ćelijskom zidu *Picea omorika*. QDs se vezuju za lignin uglavnom preko interakcije sa C-C i C=C razgranatim lancima dok se njihova interakcija sa celulozom ostvaruje se preko bočnih OH grupa celuloze. Strukturna preraspodela u ćelijskom zidu kao posledica interakcije sa QDs značajno zavisi od prisustva vode u ćelijskom zidu. Pokazali smo značajan uticaj hidrofobnih i hidrofilnih interakcija u zidu. Hidrofobna interakcija u ćelijskom zidu povećava krutost strukture uglavnom preko ligninskog makromolekula. U ćelijskom zidu u prisustvu vode, hidrofilne i dipol-dipol interakcije između molekula vode i polimernih grupa ćelijskog zida dovode do pojave konformacionih promena u strukturi zida. Prikazani rezultati takođe pokazuju da su QDs pogodne za homogeno obeležavanje celog ćelijskog zida. Ovo je posledica aranžiranja molekula u samom ćelijskom zidu. Ekstremno male veličine QDs čestica omogućavaju njihovo lako prodiranje unutar polimerne kompozitne strukture ćelijskog zida, što nam otvara mogućnosti za njihovu sve veću primenu u istraživanjima na molekulskom nivou.

U ovoj tezi dat je početni doprinos za dalja istraživanja strukture ćelijskog zida jer je on sa svojim lignoceluloznim sastavom „dobra“ sirovina za dobijanje novih materijala i energije.

LITERATURA

- 1) Agarwal, U.P. (2006) Raman Imaging to Investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). *Planta*, 224: 1114-1153
- 2) Akbult, A. and Nadir, A. (2006) Effect of Compression Wood on Surface Roughness and Surface Absorption of Medium Density Fiberboard. *Silva Fennica*, 40(1): 161-167
- 3) Akerholm, M. and Salmen, L. (2001) Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer*, 42: 963–969
- 4) Albinsson, B., Li, S., Lundquist, K., Stromberg, R. (1999) The origin of lignin fluorescence. *J. Mol. Struct.*, 508: 19–27
- 5) Alén, R. (2000a) Structure and chemical composition of wood. in: Forest Products Chemistry, Eds. J. Gullichsen, H. Paulapuro, P. Stenius, Papermaking Science and Technology 3, Fapet, Jyväskylä, Finland, 11-57
- 6) Altaner, C., Hapca, A.I., Knox, J.P. and Jarvis, M.C. (2007a) Detection of b-1-4-galactan in compression wood of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) *Carrière*) by immunofluorescence. *Holzforschung*, 61: 311–31
- 7) Altaner, C.M., Tokareva, E.N., Wong, J.C.T., Hapca, A.I., McLean, J.P., Jarvis, M.C. (2009) Measuring compression wood severity in spruce. *Wood Sci. Technol.*, 43: 279– 290
- 8) Altaner, C.M., Tokareva, E.N., Jarvis, M.C. and Harris, P.J. (2010) Distribution of (1→4)-β-galactans, arabinogalactan proteins, xylans and (1→3)-β-glucans in tracheid cell walls of softwoods. *Tree Physiology*, 30: 782-793
- 9) Andersson, S. (2007) A study of the nanostructure of the cell wall of the tracheids of conifer xylem by x-ray scattering. Phd Thesis, University of Helsinki

- 10) Andersson, S., Serimaa, R., Paakkari, T., Saranpaa, P. and Pesonen, E. (2003) Crystallinity of wood and the size of cellulose crystallites in Norway spruce (*Picea abies*). *J Wood Sci.*, 49: 531–537
- 11) Anterola, A.M., Jeon, J.H., Davin, L.B., Lewis, N.G. (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem*, 277: 18272–18280
- 12) Aspinall, G.O. (1980) Chemistry of cell wall polysaccharides. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Volume 3 (Strumpf, P.K. and Conn, E.E., eds.). New York: Academic Press: 473-500
- 13) Atalla, R.H. and Agarwal, U.P. (1985) Raman Microprobe Evidence for Lignin Orientation in the Cell-Walls of Native Woody Tissue. *Science*, 227(4687): 636-638
- 14) Atalla, R.H. and Vanderhart, D.L. (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223: 283-285
- 15) Atalla, R.H., Hackney, J.M., Ulhin, I., Thompson, N.S. (1993) Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15: 109-112
- 16) Bacić, A., Harris, P.J., Stone, B.A. (1988) Structure and function of plant cell walls. In J Preiss, ed, *The Biochemistry of Plants*. Vol 14. Academic Press, New York, pp 297–371
- 17) Ban, W., Mancosky, D. and Lucia, L. (2004) Evaluation of the pulping response of juvenile and mature black spruce compression wood. *Cellulose Chemistry and Technology*, 38(1-2): 79-85
- 18) Barakat, A., Winter, H., Rondeau-Mouro, C., Saake, B., Chabbert, B., Cathala, B. (2007) Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed

- by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation. *Planta*, 226(1): 267-281
- 19) Barnett, J.R. and Bonham, V.A. (2004) Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. *Biol Rev*, 79: 461–472
- 20) Barriere, Y., Riboulet, V., Mechin, M., Pichon, A.J., Cardinal, T., Lubberstedt, C. and Lapierre, C. (2007) Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as a model system. *Genes Genomes Genomics*, 1: 133-156
- 21) Baskin, T.I., Meeke, H.T.H.M., Liang, B.M., Sharp, R.E. (1999.) Regulation of growth anisotropy in well watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant Physiol.*, 119: 681–92
- 22) Besombes, S. and Mazeau, K. (2005) The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 1: adsorption of a threo guaiacyl beta-O-4 dimer onto a I beta cellulose whisker. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3): p.299-308
- 23) Boerjan, W., Ralph, J and Baucher, M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol.*, 54: 519-46
- 24) Boukari, I., Putaux, J.L., Cathala, B., Barakat, A., Saake, B., Rémond, C., O'Donohue, M. and Chabbert, B. (2009) Influence of aggregation and lignin-carbohydrates interactions on enzymatic conversion of xylan: use of lignin-carbohydrates model systems. *Biomacromolecules*, 10: 2489-2498
- 25) Brennan, M., McLean, J.P., Altaner, C., Ralph, J. and Harris, P.J (2012). Cellulose microfibril angles and cell-wall polymers in different wood types of *Pinus radiata*. *Cellulose* 19(4): 1385-1404
- 26) Brunow, G. (2001) Methods to Reveal the Structure of Lignin. In: Hofrichter M and Steinbüchel A (eds) Lignin, Humic Substances and Coal vol. 1, pp. 89–116. Weinheim: Wiley-VHC.

- 27) Buckeridge, M.S., Dietrich, S.M.C., Lima, D.U. (2000b) Galactomannans as the reserve carbohydrate of legume seeds *In* Gupta AK, Kaur N, eds, *Developments in Crop Science*, Vol 26. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 283–316
- 28) Burgert, I., Keckers, J. and Fratzl, P. (2006) Mechanics of the wood cell wall. In D. D. Stokke and L. H. Groom [eds.], *Characterization of the cellulosic cell wall*, 30–37. Blackwell, Oxford, UK.
- 29) Burgert, I. and Fratzl, P. (2009) Plants control the properties and actuation of their or- gans through the orientation of cellulose fibrils in their cell walls. *Integr Comp Biol.*, : 69-79
- 30) Burlat, V., Joseleau, J.P. and Ruel, K. (2000) Topochemistry and microdiversity of lignin in plant cell walls. In *New horizons in Wood anatomy* (Y.S. Kim, ed.) Chonnam National University Press, Kwangju, Korea, pp181-188.
- 31) Cano-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., Bevan, M. (2003) Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 34: 351–362
- 32) Carpita, N. and Gibeaut, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls of flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, 3: 1-30
- 33) Carpita, N and McCann, M. (2000) Cell Walls. Chapter 2. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*. Buchanan, BB, Gruissem W, Jones, RL. eds. American Society of Plant Biology, Beltsville, MD.
- 34) Castellan, A., Nourmamode, A., Fournier De Violet, P., Colombo, N., Jaeger, C. (1992) Photoyellowing of milled wood lignin and peroxide-bleached milled wood lignin in solid 2-hydroxypropylcellulose films after sodium borohydride reduction and catalytic hydrogenation in solution: An UV/VIS absorption spectroscopic study. *J. Wood Chem. Technol.*, 12: 1–18

- 35) Castellan, A., Ruggiero, R., Frollini, E., Ramos, L.A., Chirat, C. (2007) Studies on fluorescence of cellulose. *Holzforschung*, 61: 504–508
- 36) Cathala, B., Chabbert, B., Joly, C., Dole, P. and Monties, B. (2001) Synthesis, characterisation and water sorption properties of pectin-dehydrogenation polymer (lignin model compound) complex. *Phytochemistry*, 56(2): 195-202
- 37) Cathala, B., Rondeau-Mouro, C., Lairez, D., Belval, F., Durand, H., Gorrichon, L.; Touzel, JP, Chabbert, B, Monties, B. (2005) Model systems for the understanding of lignified plant cell wall formation. *Plant Biosystems*, 139(1): 93-97
- 38) Cathala, B. and Monties, B. (2001) Influence of pectins on the solubility and the molar mass distribution of dehydrogenative polymers (DHPs, lignin model compounds). *Int J Biol Macromol.*, 29(1): 45-51
- 39) Cathala, B., Saake, B., Faix, O., Monties, B. (1998) Evaluation of the reproducibility of the synthesis of dehydrogenation polymer models of lignin. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3): 65-69
- 40) Chazen, O. and Neumann, P.M. (1994) Hydraulic signals from the roots and rapid cell wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiol* 104: 1385–1392
- 41) Chen, M., Sommer, A.J. and McClure, J.W. (2000) Fourier Transform-IR Determination of Protein Contamination in Thioglycolic Acid Lignin from Radish Seedlings, and Improved Methods for Extractive-free Cell Wall Preparation. *Phytochem. Anal.* 11: 153-159
- 42) Chen, R., Ratnikova, T.A., Stone, M., Lin, B, Lard, M., Huang, G., Hudson, J.S. and Ke, P.C. (2010) Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells. *Small*, Volume 6, Issue 5: 612–617

- 43) Choudhury, H., Collins, S., Davidson, R.S. (1992) The colour reversion of papers made from high yield pulp—a photochromic process. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 69: 109–119
- 44) Corp, L.A., McMurtrey, J.E., Middleton, E.M., Mulchi, C.L., Chappelle, E.W., Daughtry, C.S.T. (2003) Fluorescence sensing systems: In vivo detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply. *Remote Sens. Environ.*, 86: 470–479
- 45) Corredor, E., Testillano, P.S., Coronado, M.J., González-Melendi, P., Fernández-Pacheco, R., Marquina, C., Ibarra, M.R., de la Fuente, J.M., Rubiales, D., PérezdeLuque, A., Risueno, M.C. (2009) Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: *in situ* subcellular identification. *BMC Plant Biol.*, 9: 45
- 46) Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews*, 6:850–861
- 47) Côté, W.A., Day, A.C., Timell, T.E. (1968) Studies on compression wood VII. Distribution of lignin in normal and compression wood of tamarack *Larix laricina* (Du Roi, K. Koch). *Wood Sci. Technol.*, 2: 13–37
- 48) Côté, W.A., Timell, T.E. and Zabel, R.A. (1966) Studies on compression wood. I. Distribution of lignin in compression wood of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Holz Roh- Werkstoff*, 24: 432–438
- 49) Dammstrom, S., Salmen, L. and Gatenholm, P. (2009) On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. *BioRes.*, 4: 3–14
- 50) Darvill, J.E., McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1980b) Structure of plant cell walls. XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, 66: 1135-1139
- 51) Dey, P.M. and Brinson, K. (1984) Plant cell-walls. *Adv. Carbohydrate Chem. Bioche.*, 42: 265-382

- 52) Djikanovic, D., Kalauzi, A., Jeremic, M., Micic, M., Radotic, K., (2007a) Deconvolution of fluorescence spectra: contribution to the structural analysis of complex molecules. *Coll. Surf. B Biointerface*, 54: 188–192.
- 53) Djikanović, D., Kalauzi, A., Radotić, K., Jeremić, M. (2007b) Deconvolution of lignin fluorescent spectra: a contribution to the comparative structural studies of lignins. *Russ. J. Phys. Chem.*, A 81: 1425–1428
- 54) Djikanovic, D., Kalauzi, A., Jeremic, M., Xu, J., Micic, M., Whyte, J.D., Leblanc, R.M., Radotic, K. (2011) Interaction of the CdSe quantum dots with plant cell walls. *Coll Surf B Biointerface*, 91: 41
- 55) Donaldson, L.A. (1988) Ultrastructure of wood cellulose substrates during enzymatic hydrolysis. *Wood Sci. Technol.*, 22: 33–41.
- 56) Donaldson, L.A. (2001) Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view. *Phytochemistry*, 57, 859–873
- 57) Donaldson, L.A., Grace, J.C., Downes, G. (2004) Within tree variation in anatomical properties of compression wood in radiata pine. *IAWA J.*, 25: 253– 271
- 58) Donaldson, L., Radotic, K., Kalauzi, A., Djikanovic, D., Jeremic M. (2010) Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *J Struct Biol.*, 169: 106
- 59) Donaldson, L.A., Singh, A.P., Yoshinaga, A., Takabe, K. (1999) Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata* D. Don.. *Can. J. Bot.*, 77: 41–50
- 60) Donaldson, L.A. and Turner, J.C.P. (2001) The influence of compression wood and microfibril angle on the occurrence of distortion in window frames made from radiata pine (*Pinus radiata*). *Holz Roh Werkst.*, 59: 163–168.

- 61) Donaldson, L.A. and Bond, J. (2005) Fluorescence Microscopy of Wood. Scion, Rotorua, New Zealand (CD-ROM).
- 62) Donaldson, L. (2008) Microfibril angle: measurement, variation and relationships - a review. *IAWA J.*, 29: 345–386
- 63) Donaldson, L.A. (1985) Whitin- and between-tree variation in lignin concentration in the tracheid cell wall of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 15: 361-369
- 64) Donaldson, L. and Knox, J.P. (2012) Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiol.*, 158(2): 642-53
- 65) Duncker, P. and Spiecker, H. (2009) Detection and classification of Norway spruce compression wood in reflecte reflected light by means of hyperspectral image analysis. *IAWA J.*, 30: 59–70
- 66) Edelmann, H.G. (1995) Wall extensibility during hypocotyl growth: a hypothesis to explain elastic-induced wall loosening. *Physiol Plant.*, 95: 296–303
- 67) Eggenberger, K., Frey, N., Zienicke, B., Siebenbrock, J., Schunck, T., Fischer, R., Brase, S., Birtalan, E., Nann, T. and Nick, P. (2010) Use of Nanoparticles to Study and Manipulate Plant cells. *Advance Engineering Materials*, 9999
- 68) Faix, O., Bremer, J., Schmidit, O., Stevanovic, T. (1991) Monitoring of chemical changes in white-rot degraded beech wood by pyrolysis-gas chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 21: 147–162
- 69) Faix, O. (1992) Fourier transform infrared spectroscopy. In: Lin, Y., Dence, C.W. (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry*. Springer-Verlag, New York, pp. 83–109

- 70) Falkehag, S.I., Marton, J., Adler, E. (1966) Chromophores in Kraft lignin. Lignin structure and reactions. *Adv. Chem. Ser.*, 59: 75–89
- 71) Fengel, D.W. (1984) Wood - Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin:Walter de Gruyter& Co., Berlin.
- 72) Fengel, D. and Wegener, G. (1989) Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- 73) Floyd, S. (2005) Effect of hemicellulose on longitudinal shrinkage in wood. In KM Entwistle, JCFWalker, eds, The Hemicellulose Workshop. The Wood Technology Research Center, Christchurch, New Zealand, pp 115–120
- 74) Freudenberg, K. (1956) Lignin im Rahmen der polymeren Naturstoffe. *Angew. Chem.*, 68: 84–92
- 75) Freudenberg, K. (1964) The formation of lignin in the tissue and in vitro. The formation of wood in forest trees, ed. H. M, Zimmermann., Springer- Verlag: New York. pp:203-218
- 76) Fry, S.C. (1986) Cross linking of matrix polymer in the growing walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37: 165-186
- 77) Fujino, T., Sone, Y., Mitsuishi, Y., Itoh, T. (2000) Characterization of cross-links between cellulose microfibrils, and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl. *Plant Cell Physiol.*, 41: 486–494
- 78) Fujita, M. and Harada, H. (1979) Autoradiographic investigations of cell wall development. II. Tritiated phenylalanine and ferulic acid assimilation in relation to lignification. *Mokuzai Gakkaish*, 25: 89–94
- 79) Fukushima, K. and Terashima, N. (1991) Heterogeneity in formation of lignin. Part XIV: formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Gingko biloba*. *Holzforschung*, 45: 87–94

- 80) Fukazawa, K. (1974) The distribution of lignin in compression- and lateral-wood of *Abies sachalinensis* using ultraviolet microscopy. *Res. Bull. Coll. Exp. For. Hokkaido Univ.* 31: 87–114
- 81) Gardiner, E.S. and Sarko, A. (1985) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 16. The crystal-structures of cellulose IV₁ and cellulose IV₁₁. *Can J Chem*, 63: 173-180
- 82) Gilardi, G. and Cass, A.E.G. (1993) Associative and Colloidal Behavior of Lignin and Implications for Its Biodegradation in-Vitro. *Langmuir*, 9(7): 1721-1726
- 83) Gomez, L.D., Steele-King, C.G. and McQueen-Mason, S.J. (2008) Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol.*, 178(3): 473-485
- 84) Gorišek, Z. and Torelli, N. (1999) Microfibril Angle in Juvenil, Adult and Compressive Wood of Spruce and Silver fir Phyton (Austria). *Special Issue; Plant Physiology*, Vol 39: 129-132
- 85) Goto, M. and Yokoe, Y. (1996) Ammoniation of barley straw: Effect of cellulose crystallinity and water-holding capacity. *Feed Sci. Technol*; 58: 239-247
- 86) Grabber, J.H., Ralph, J. and Hatfield, R.D. (2000) Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12): 6106-6113
- 87) Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J., Zo, J., Amrhei, N. (1995) Ferulate Cross-Linking in Cell-Walls Isolated from Maize Cell-Suspensions. *Phytochemistry*, 40(4): 1077-1082
- 88) Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C., Barriere, Y. (2004) Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignincell wall matrix interactions. *C. R. Biol.*, 327: 455-465

- 89) Ha, M.A., MacKinnon, I.M., Sturcova, A., Apperley, D.C., McCann, M.C., Turner, S.R., and Jarvis M.C. (2002) Structure of cellulose-deficient secondary cell walls from the *irx3* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 61: 7–1
- 90) Hackney, J.M., Atalla, R.H. and VanderHart, D.L. (1994) Modification of crystallinity and crystalline structure of *Acetobacter xylinum* cellulose in the presence of water-soluble β -1,4-linked polysaccharides:¹³C-NMR evidence. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16: 215-218
- 91) Hanninen, T., Tukiainen, P., Svedstrom, K., Serimaa, R., Saranpaa, P., Kontturi, E., Hughes, M. and Vuorinen, T. (2012) Ultrastructural evaluation of compression wood-like properties of common juniper (*Juniperus communis*). *Holzforschung*, 166:
- 92) Hatakeyama, H. and Hatakeyama, T. (1998) Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochim. Acta*, 308:3-22
- 93) Hatfield, R.D., Ralph, J. and Grabber, J.H. (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.*, 79(3): 403–407
- 94) Hatfield, R. and Vermeris, W. (2001) Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*, 126: 1351–1357
- 95) Hayashi, T. (2006) *The Science and Lore of the Plant Cell Wall. Biosynthesis, Structure and Function*, BrownWalker Press, Boca Raton
- 96) Hayashi, J., Sufoka, A., Ohkita, J., Watanabe, S. (1975) Confirmation of existence of cellulose III(I), III(II), IV(I), and IV(II) by x-ray method. *J Polym Sci Polym Lett.*, 13: 23-27
- 97) Hayashi, T. and Maclachlan, G. (1984) Pea xyloglucan and cellulose I. Macromolecular organization. *Plant physiology*, 75: 596-604

- 98) Haymes, K.M., Ibrahim, I.A., Mischke, S., Scott, D.L., Saunders, J.A. (2004) Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree crops. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5456
- 99) Hoadlez, R.B. (2000) *Understanding Wood: A Craftsman's Guide to Wood Technology*. Taunton Press, Incorporated
- 100) Houtman, C.J. and Atalla, R.H. (1995) Cellulose-Lignin Interactions - a Computational Study. *Plant Physiology*, 107(3): 977-984
- 101) Howsmon, J.A. and Sisson, W.A. (1963) High polymers, structure and properties of cellulose fibers: B. Submicroscopic structure. In *Cellulose and Cellulose Derivatives, Part I*; Ott, E., Spurlin, H.M., Eds.; Interscience: New York; 1963 Vol. V:231–346
- 102) Hulleman, S.H.D., Van Hazendonk, J.M., Van Dam, J.E.G. (1994) Determination of crystallinity in native cellulose from higher plants with diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate. Res.*, 261:163-172
- 103) Humphreys, J.M. and Chapple, C. (2002) Rewriting the lignin road map. *Curr Opin Plant Biol.*, 5: 224
- 104) Iiyama, K., Lam, T.B.T. and Stone, B. A. (1994) Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol.*, 104: 315-320
- 105) Itoh, T. and Ogawa, T. (1993) Molecular architecture of the cell wall of poplar cells in suspension culture, as revealed by rapid-freezing and deep-etching techniques. *Plant Cell Physiol.*, 34: 1187-1196
- 106) Jacquet, G., Pollet, B., Lapierre, C., Mhamdi, F. and Rolando, C. (1995) New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J. Agric. Food Chem.*, 43(10): 2746–2751

- 107) Jaiswal, J.K. and Simon, S.M. (2004) Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol.*, 14: 497
- 108) Jones, L., Seymour, G.B., Knox, J.P. (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1 \rightarrow 4)-[beta]-D-galactan. *Plant Physiology*, 113: 1405-1412
- 109) Jones, L., Milne, J.L., Ashford, D. and McQueen-Mason, S.J. (2003) Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 11783–11788
- 110) Kačurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., and Ebringerova, A. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.*, 43: 195–203
- 111) Karol, K.G., McCourt, R.M., Cimino, M.T., Delwiche, C.F. (2001) The closest living relatives of land plants. *Science*, 294: 2351–2353
- 112) Kalauzi, A., Mutavdzic, D., Djikanovic, D., Radotic, K., Jeremic, M. (2007) Application of asymmetric model in analysis of fluorescence spectra of biologically important molecules. *J. Fluoresc.*, 17: 319–329
- 113) Kenrick, P. and Crane, P.R. (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389: 33–39
- 114) Kim, J.S., Awano, T., Yoshinaga, A., Takabe, K. (2010) Immunolocalization and structural variations of xylan in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 232: 817–824
- 115) Kim, J.S., Awano, T., Yoshinaga, A., Takabe, K. (2011) Occurrence of xylan and mannan polysaccharides and their spatial relationship with other cell wall components in differentiating compression wood tracheids of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 233: 721–735

- 116) Klemm, D., Heublein B., Fink, H.P., Bohn, A. (2005) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew Chem Int Ed* 44: 3358-3393
- 117) Konschin, H. and Sundholm, F. (1974) Protolytic dissociation of electronically excited phenols related to lignin. II. Isoeugenol and coniferyl alcohol. *Finn. Chem. Lett.*, 1: 46–49
- 118) Kontturi, E., Suchy, M., Penttila, P., Jean, B., Pirkkalainen, K., Torkkeli, M. and Serimaa, R. (2011) Amorphous characteristics of an ultrathin cellulose film. *Biomacromolecules*, 12: 770–777
- 119) Kosikova, B., Zakutna, L., Joniak, D. (1978) Investigation of the lignin-sacharidic complex by electron microscopy. *Holzforschung*, 32: 15-18
- 120) Kosikova, B., Joniak, D., and Kosakova, L. (1979) Properties of Benzyl Ether Bonds in the Lignin-Saccharidic Complex Isolated from Spruce. *Holzforschung*, 33(1): 11-14
- 121) Krauss, T.M. and Brus, L.E. (1999) Charge, Polarizability, and Photoionization of Single Semiconductor Nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.*, 83: 4840
- 122) Lairez, D., Cathala, B., Monties, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Gorrichon, L. (2005) Aggregation during coniferyl alcohol polymerization in pectin solution: A biomimetic approach of the first steps of lignification. *Biomacromolecules*, 6(2): 763-774
- 123) Lam, T.B.T, Iiyama, K., Stone, B.A. (1992a) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris intemodes. *Phytochemistry*, 31: 1179-1183
- 124) Lange, P.W. (1954) The distribution of lignin in the cell wall of normal and reaction wood from spruce and a few hardwoods. *Svensk Papperstidning*, 57: 525-532

- 125) Lapiere, C. (1993) Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, editors. Forage cell wall structure and digestibility. *Madison, WI: ASA, CSCA, SSSA*; pp. 133–166
- 126) Lawoko, M. (2005) Lignin Polysaccharide Networks in Softwood and Chemical Pulps: Characterisation, Structure and Reactivity”. Doctor Thesis, Royal Institute of Technology Department of Fibre and Polymer Technology Division of Wood Chemistry Stockholm
- 127) Lee, C.L. (1961) Crystallinity of wood cellulose fibers studies by X-ray methods. *Forest Prod J.*, 11:108–112
- 128) Levine, I. (1988) Physical Chemistry. McGraw Hill Book Company, New York, pp:688–689.
- 129) Levy, R., Wang, Z.X., Duchesne, L., Doty, R.C., Cooper, A.I., Brust, M., Fernig, D.G. (2006) A generic approach to monofunctionalized protein-like gold nanoparticles based on immobilized metal ion affinity chromatography. *ChemBioChem.*, 7: 592–594
- 130) Lewis, S.M., Montgomery, L., Garleb, K.A., Berger, L.L, and Fahey, G.C. (1988) Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on in vitro degradation of cellulosic substrates by mixed ruminal microorganisms and *Bacteroides succinogenes* 85. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 p: 1163
- 131) Lewis, N.G., Yamamoto E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 41: 455
- 132) Li, K. (1996) *Synthesis of lignin-carbohydrate model compounds and neolignans*, in *Department of Wood science and forestry products*. Virginia Polytechnic Institute and State University: Blacksburg, VA

- 133) Lin, S., Reppert, J, Hu, Q., Hudson, J.S., Reid, M.L., Ratnikova, T.A., Rao, A.M, Luo, H., Ke, P.C. (2009) Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 5: 1128
- 134) Lundquist, K., Josefsson, B., Nyquist, G. (1978) Analysis of lignin products by fluorescence spectroscopy. *Holzforschung*, 32: 27–32
- 135) Liang, C.Y. and Marchessault, R.H. (1959) Infrared spectra of crystalline polysaccharides. 2. Native celluloses in the region from 640 to 1700 cm⁻¹. *J. Polym. Sci.*, 39: 269–278
- 136) Magalhaes Silva Moura, J.C., Valencise Bonine, C.A., JdO FV, Dornelas, M.C., Mazzafera, P. (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J Integr Plant Biol.*, 52: 360–376
- 137) Marchessault, R.H and Sundararajan, PR. (1983) Cellulose. In: Aspinall GO, editor. The Polysaccharides. Vol. 2. London: Academic Press Inc pp:11–95
- 138) Mast, S.W., Donaldson, L., Torr, K., Phillips, L., Flint, H., West, M., Strabala, T.J., Wagner, A. (2009) Exploring the ultrastructural localization and biosynthesis of $\beta(1,4)$ -galactan in *Pinus radiata* compression wood. *Plant Physiol.*, 150: 573-583
- 139) McCann, M.C., Wells, B., Roberts, K. (1990) Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J Cell Sci.*, 96: 323–334
- 140) McCann, M.C. and Roberts, K., 1991. Architecture of the primary cell wall. In: Lloyd, C.W. (Ed.), The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Academic Press, London, pp. 109–129
- 141) McCann, M.C., Wells, B. and Roberts, K. (1992b) Complexity in the spatial localization and length distribution of plant cell-wall matrix polysaccharides. *J. Microsc.*, 166: 123-136

- 142) McCann, M.C., Chen, L., Roberts, K., Kemsley, E.K., Sene, C, Carpita, N.C., Stacey, N.J., Wilson, R.H. (1997) Infrared microspectroscopy: Sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiologia Plantarum*, 100: 729-738
- 143) McCourt, R.M., Delwiche, C.F. and Karol, K.G. (2004) Charophyte algae and land plant origin. *Trends Ecol. Evol.*, 19: 661–666
- 144) McQueen-Mason, S.J., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 4: 1425-1433
- 145) Menden, B., Kohlhoff, M., Moersch, B.M. (2007) Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry*, 68: 513–520
- 146) Meyer, K.H. and Misch, L. (1937) Positions des atomes dans le nouveau modele spatial de la cellulose. *Helv Chim Acta*, 20: 232-244
- 147) Micić, M., Jeremic, M., Radotic, K., Mavers, M., Leblanc, R.M. (2000) Visualization of artificial lignin supramolecular structures. *Scanning*, 22(5): 288-294
- 148) Moëll, M. and Donaldson, L.A. (2001) Comparison of segmentation methods for digital image analysis of confocal microscope images to measure tracheid cell dimensions. *IAWA J.*, 22: 267–288
- 149) Mohanty, A.K.M., Drzal, L.T., Selke, S.E., Harte, B.R., Hinrichsen, G. (2005) ed. *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites: An introduction. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, ed. A.K.M. Mohanty, M.; Drzal, L. T., Eds. 2005, Taylor and Francis Group. 1-36
- 150) Morikawa, H., Hayashi, R., Senda, M. (1978) Infrared analysis of pea stem cell walls and oriented structure of matrix polysaccharides in them. *Plant Cell Physiol.*, 19: 1151–1159

- 151) Müller, F., Houben, A., Barker, P.E., Xiao, Y., Kas, J.A, Melzer, M. (2006) Quantum dots - a versatile tool in plant science. *Nanobiotechnol.*, 4: 5
- 152) Murphy, J.D. and McCarthy, K. (2005) Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*, 82:148-156
- 153) Nanayakkara, B., Manley-Harris, M., Suckling, I.D., Donaldson, L.A. (2005) Chemical characterisation of compression wood in *Pinus radiata*. In: 13th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Auckland, New Zealand.
- 154) Nanayakkara, B., Manley-Harris, M., Suckling, I.D., Donaldson, L.A. (2009) A quantitative chemical indicator of compression wood severity. *Holzforschung*, 63: 431–439
- 155) Nara, S. and Komiya, T. (1983) Studied on the relationship between water-saturated state and cristallinity by the diffraction method for moistened potato starch. *Starch-Starke*, 40: 1-7
- 156) Nelson, M.L. and O'Connor, R.T. (1964) Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 8, 3: 1325–1341
- 157) Newmann, R.H. (1992) Nuclear magnetic resonance study of spatial relationships between chemical components in wood cell walls. *Holzforschung*, 46: 205-210
- 158) Ning, L., Villota, R. and Artz, W.E. (1991) Modification of corn fiber through chemical treatments in combination with twin-screw extruder. *Cereal Chem.*, 68 :63
- 159) Nishiyama, Y., Langan, P. and Chanzy, H. (2002) Crystal structure and hydrogenbonding system in cellulose Ibeta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc*, 124(31): 9074-82

- 160) Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H. and Langan, P. (2003) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I(alpha) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc.*, 125(47): 14300-6
- 161) Nisizawa, K. (1973) Mode of action of cellulases. *J Ferment Technol*, 51: 267
- 162) Olmstead, J.A. and Gray, D.G. (1993) Fluorescence emission from mechanical pulp sheets. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 73:59–65
- 163) Olmstead, J.A. and Gray, D.G. (1997) Fluorescence spectroscopy of cellulose, lignin and mechanical pulps: a review. *J. Pulp Paper Sci.*, 23: 571–581
- 164) O'Neill, M, Albersheim, P, Darvill, A. (1990) The pectic polysaccharides of primary cell walls. Dey PM, editor. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 2 Academic Press, London, pp: 415–441
- 165) O'Neill, M.A. and York, W.S. (2003) *The Plant Cell Wall* (ed. Rose, J. K. C.) 1–54 (Blackwell, Oxford)
- 166) Paakkonen, E., Gunthardt-Goerg, M.S., Holopainen, T. (1998) Responses of leaf processes in a sensitive Birch (*Betula pendula* Roth) clone to ozone combined with drought. *Ann. Bot.*, 82: 49–59
- 167) Panshin, A.J. and de Zeeuw, C. (1980) Textbook of wood technology. 4ed. NY: McGraw-Hill. pp:722
- 168) Parham, R.A. and Côte, W.A. (1971) Distribution of lignin in normal and compression wood of *Pinus taeda* L. *Wood Sci. Technol.*, 5: 49-62
- 169) Park, S., Baker, J.O, Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010) Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol Biofuels*, 3: 10
- 170) Passioura, J.B. (1994) The physical chemistry of the primary cell wall: implications for control of expansion rate. *J Exp Bot.*, 45: 1675–1682

- 171) Pauly, M., Keegstra, K. (2008a) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.*, 54: 559–568
- 172) Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2): 53-63
- 173) Perez, S. and Mazeau, K. (2005) Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses Chapter 2
- 174) Pilling, E. and Hofte, H. (2003) Feedback from the wall. *Curr Opin Plant Biol.*, 6: 611–616
- 175) Poole, K., Meder, D., Simons, K. Muller, D. (2004) The effect of raft lipid depletion on microvilli formation in MDCK cells, visualized by atomic force microscopy. *FEBS Lett.*, 565 (1-3): 53-58
- 176) Puls, J. and Schuseil, J (1993) Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: Coughlan MP and Hazlewood GP (eds) *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, London: pp:1-27
- 177) Radotic, K., Kalauzi, A., Đikanovic, D., Jeremic, M., Leblanc, R.M., Cerovic, Z.G. (2006) Component analysis of the fluorescence spectra of a lignin model compound. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 83: 1–10
- 178) Radotic, K., Simic´-Krstic, J., Jeremic, M., Trifunovic, M. (1994) A study of lignin formation at the molecular level by scanning tunneling microscopy. *Biophys. J.*, 66: 1763–1767
- 179) Radotic, K., Todorovic, S., Zakrzewska, J., Jeremic, M. (1998) Study of photochemical reactions of coniferyl alcohol. II. Comparative structural study of a photochemical and enzymatic polymer of coniferyl alcohol. *Photochem. Photobiol.*, 68: 703–709

- 180) Ralph, J., Helm, R.F., Quideau, S. and Hatfield, R.D. (1992) Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 1* (21): 2961–2969
- 181) Ralph, J., Hatfield, R.D., Quideau, S., Helm, R.F., Grabber, J.H., Jung, H.J. (1994) Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 9448–9456
- 182) Ralph, J., Grabber, J.G., Hatfield, R.D. (1995) Lignin–ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into reygrass lignins. *Carbohydrate Research.*, 275: 167–178
- 183) Ravindra, S., Mohan, M.Y., Reddy, N.N. and Raju, K.M. (2010). Fabrication of antibacterial cotton fibres loaded with silver nanoparticles via Green Approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 367: 31-40
- 184) Reiter, W.D. (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol.*, 5: 536–542
- 185) Rezanowich, A., Yean, W.Q. and Goring, D.A.I. (1964) High resolution electron microscopy of sodium lignin sulfonate. *J Apply Polymer Sci.*, 8: 1801-1812
- 186) Ridley, B.L., O'Neill, M.A. and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.*, 57: 929–967
- 187) Ruel, K., Barnoud, F. and Goring, D.A.I. (1978) Lamellation in the S2 layer of softwood tracheids as demonstrated by scanning transmission electron microscopy. *Wood Sci. Technol.*, 12: 287-291
- 188) Ruel, K., Barnoud, F. and Goring, D.A.I. (1979) Ultrastructural lamellation in the S2 layer of two hardwoods and a reed. *Cell. Chem. Technol.*, 13: 429-432

- 189) Ruel, K. and Joseleau, J.P. (2005) Deposition of hemicelluloses and lignins during secondary wood cell wall assembly. The Hemicelluloses Workshop 2005, p:103–113
- 190) Saha, B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*,:279-291
- 191) Saito, K. and Fukushima, K. (2005) Distribution of lignin interunit bonds in the differentiating xylem of compression and normal woods of *Pinus thunbergii*. *J Wood Sci.*, 51: 246–251
- 192) Saka, S and Goring, D.A.I (1988) The distribution of lignin in white birch wood as as determined by bromination with TEM-EDXA. *Holzforschung*, 42(3): 149-53
- 193) Saka, S. and Goring, D.A.I. (1988.) Localization of lignins in wood cell walls. In: Higuchi, T., ed. *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. Academic Press, New York: pp:51-62
- 194) Salmen, L. and Olsson, A.M. (1998) Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: structure-property relationships. *J. Pulp Paper Sci.*, 24: 99–103
- 195) Salmen, L. (2001) Micromechanics of the wood cell wall: a tool for a better understanding of its structure. In P. Navi [ed.], Proceedings of 1st International Conference of the European Society for Wood Mechanics, 385–398, EPFL, Lausanne, Switzerland.
- 196) Santos, A.R., Miguel, A.S. Tomaz, L., Malhó, R. Maycock, C. Vaz Patto, M.C. Fevereiro, P. and Oliva, A. (2010) The impact of CdSe/ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture. *Journal of Nanobiotechnology*, 8: 24
- 197) Sarkanen, K.V., Hergert, H. L. in Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. (1971) Lignins, occurrence, formation, structure and reactions. New York: Wiley Interscience, 55

- 198) Sarkar, A. and Pérez, S. (2012) PolySac3DB: an annotated data base of 3 dimensional structures of polysaccharides. *BMC Bioinformatics*, 13: 302
- 199) Schädel, C., Blöchl, A., Richter, A. and Hoch, G. (2009) Short-term dynamics of nonstructural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. *Tree Physiol.*, 29: 901–911
- 200) Scheible, W.R. and Pauly, M. (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr Opin Plant Biol.*, 7: 285–295
- 201) Schmitt, U., Singh, A., Frankenstein, C. and Möller, R. (2006) Cell wall modifications in woody stems induced by mechanical stress. *N.Z. J. For. Sci.*, 36: 72–86
- 202) Schopfer, P. (2006) Biomechanics of plant growth. *Am J Bot.*, 93: 1415–1425
- 203) Scurfield, G. (1973) Reaction wood: Its structure and function. *Science*, 179: 647–655
- 204) Séné, C.F.B., McCann, M.C., Wilson, R.H. and Grinter, R. (1994) Fourier-transform Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy: an investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiol.*, 106: 1623–1631
- 205) Sharma, A., Anderson, K.I., Muller, D.J. (2005) Actin microridges characterized by laser scanning confocal and atomic force microscopy. *FEBS Lett.*, 579 (9): 2000–2008
- 206) Shaw, M. (2008.) Feedstock and Process Variables Influencing Biomass Densification. M.Sc. Thesis, Department of Agricultural and Bioresource Engineering, University of Saskatchewan.
- 207) Siano, D.B. and Metzler, D.E. (1969) Band shapes of electronic spectra of complex molecules. *J. Chem. Phys.*, 51: 1856–1861

- 208) Singh, A.P. and Donaldson, L.A. (1999) Ultrastructure of tracheid cell walls in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) mild compression wood. *Can. J. Bot.*, 77: 32–40
- 209) Singh, A.P (1997) Initial pit borders in *Pinus radiata* are resistant to degradation by soft root fungi and erosion bacteria but not tunneling bacteria. *Holzforschung*, 51: 15-18
- 210) Singh, A.P., Kim, Y.S., Chung, G.C., Park, B.D. and Wong, A.H.H. (2003.) TEM examination of surface characteristics of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) HTMP fibers. *Holzforschung*, 57: 579–584
- 211) Smith, B.G. and Harris, P.J. (1999) The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae are not unique. *Biochem. Systems Ecol.*, 27: 33-53
- 212) Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Vorwerk S., Youngs H. (2004) Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306: 2206-2211
- 213) Sørensen, I., Domozych, D., Willats, W.G.T. (2010) How have plant cell walls evolved?. *Plant Physiol.*, 153: 366–372
- 214) Sticklen, M.B. (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*, 9: 433-443
- 215) Sun, Y. and Cheng, J.Y. (2002.) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1): 1-11
- 216) Sun, R.C., Sun, X.F., Wang S.Q., Zhu, W., Wang, X.Y. (2002) Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Ind. Crops Prod.*, 15: 179–188

- 217) Takahashi, N. and Koshijima, T. (1988) Molecular-Properties of Lignin-Carbohydrate Complexes from Beech (*Fagus-Crenata*) and Pine (*Pinus-Densiflora*) Woods. *Wood Science and Technology*, 22(2): 177-189
- 218) Tanahashi, M., Aoki, T. and Higuchi, T. (1982) Dehydrogenative Polymerization of Monolignols by Peroxidase and H₂O₂ in a Dialysis Tube .2. Estimation of Molecular-Weights by Thermal Softening Method. *Holzforschung*, 36(3): 117-122
- 219) Tarmian, A. (2008) Reaction wood drying kinetics: tension wood in *Fagus silvatica* and compression wood in *Picea abies*. University of Tehran, Iran, PhD Diss. p:110
- 220) Terashima, N., Atalla, R.H., Ralph, S.A., Landucci, L.L.,Lapierre, C.and Monties, B. (1995) New Preparations of Lignin Polymer Models under Conditions That Approximate Cell-Wall Lignification .1. Synthesis of Novel Lignin Polymer Models and Their Structural Characterization by C-13 NMR. *Holzforschung*, 49(6): 521-527
- 221) Terashima, N., Atalla, R.H., Ralph, S.A., Landucci, L.L, Litpierre, C. and Monties, B. (1996) New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate cell wall lignification .2. Structural characterization of the models by thioacidolysis. *Holzforschung*, 50(1): 9-14
- 222) Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A.B., Stahl, K. (2005) On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose*, 12: 563-576
- 223) Timell, T.E. (1986) Compression Wood in Gymnosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- 224) Timell, T.E. (1982) Recent progress in the chemistry and topochemistry of compression wood. *Wood Science and Technology*, 16: 83-122

- 225) Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L., Roby, D. (2010) Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.*, 11: 83–92
- 226) Tsubaki, S and Azuma, J.I. (2011) Application of microwave technology for utilization of recalcitrant biomass. In: Grundas S (ed) Advances in induction and microwave heating of mineral and organic materials. *InTech.*, p:697–722
- 227) Uhlin, K.I., Atalla, R.H. and Thompson, N.S. (1995) Influence of hemicelluloses on the aggregation patterns of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2: 129-144
- 228) Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010) Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.*, 153: 895
- 229) Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J. and Visser, R.G.F. (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.*, 132: 1781–1789
- 230) Wayman, M. and Obiaga, T.I. (1974) The modular structure of lignin. *Can. J. Chem.*, 52: 2102–2110
- 231) Watanabe, T., Ohnishi, J., Yamasaki, Y., Kaizu, S. Koshijima, T. (1989) Binding-Site Analysis of the Ether Linkages between Lignin and Hemicelluloses in Lignin Carbohydrate Complexes by DQD-Oxidation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(8): 2233-2252
- 232) Wardrop, A. and Dadswell, B. (1955) The nature of reaction wood. IV. Variations in the cell wall organization on tension wood fiber *Aust. J. Bot.*, 3: 177-189
- 233) Wardrop, A.B and Davies, G.V. (1964) The nature of reaction wood. VIII The structure and differentiation of compression wood. *Aust. J. Bot.*, 3: 24-38

- 234) Warensjo, M. (2003) Compression wood in Scots pine and Norway spruce. Doctoral thesis. Upsala, Department of Forest Products and Markets
- 235) Weng, J. and Chapple, C. (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.*, 187: 273
- 236) Westermark, U., Hardell, H.L. and Iversen, T. (1986) The content of protein and pectin in the middle lamella /primary wall from spruce fibers. *Holzforschung*, 40: 65–68.
- 237) Westermark, U. and Vennigerholz, F. (1995) Morphological distribution of acidic and methylesterified pectin in the wood cell wall. *Proc. 8th Intern. Symp. on Wood and Pulping Chemistry*, 1: 101–106
- 238) Westermark, U. (1985) The occurrence of p-hydroxyphenylpropane units in the middle lamella lignin of spruce (*Pice abias*). *Wood Sci and Technology*, 19: 223-232
- 239) Whetten, R. and Sederoff, R. (1995) Lignin Biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1001
- 240) Whiting, P. and Goring, D.A.I. (1982a) Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids. *Wood. Sci. Technol.*, 16: 261–267
- 241) Whitney, S.E.C., Wilson, E., Webster, J., Bacic, A., Grant, R.J.S. and Gidley, M.J. (2006) Effects of structural variation in xyloglucan polymers on interaction with bacterial cellulose. *Amer.J. Bot.*, 93: 1402–1414
- 242) Whitney, S.E.C., Brigham, J.E., Darke, A., Reid, J.S.G., Gidley, M.J. (1995) In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. *Plant Journal.*, 8: 491-504

- 243) Willför, S., Sundberg, A., Pranovich, A. and Holmbom, B. (2005b) Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Science and Technology*, 39: 601-617
- 244) Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W. and Knox, J.P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.*, 47: 9–27
- 245) Williams, D.H. and Fleming, I. (1980) Infrared spectroscopy. In *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Edn 3. New York: McGraw Hill, p:35-73
- 246) Wilson, S.M., Burton, R.A., Doblin, M.S., Stone, B.A., Newbigin, E., Fincher, G.B., Bacic, A. (2006) Temporal and spatial appearance of wall polysaccharides during cellularization of barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. *Planta*, 224: 655–667
- 247) Wilson, R.H., Smith, A.C., Kačuráková, M., Saunders, P.K, Wellner, N. and Waldron, K.W. (2000) The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by FT-IR spectroscopy *Plant Physiol.*, 124: 397-406
- 248) Wilkie, J.S. (1961) Carl Nageli and the fine structure of living matter. *Nature*, 190: 1145-1150
- 249) Wood, J.R. and Goring, D.A.I. (1971) The distribution of lignin in stem and branch wood of Douglas fir. *Pulp Paper Mag. Can.*, 72: 95–102
- 250) Wu, Y.L., Lim, C.S., Fu, S., Tok, A.I.Y., Lau, H.M, Boey, F.Y.C., Zeng, X.T. (2007) Surface Modifications of ZnO Quantum Dots for Bio-Imaging. *Nanotechnology*, 18: 215604-215612.
- 251) Yaku, F., Tanaka, R. and Koshijima, T. (1981) Lignin Carbohydrate Complex .4. Lignin as Side-Chain of the Carbohydrate in Bjorkman Lcc. *Holzforschung*, 35(4): 177-181

- 252) Yamamoto, H. (1998) Generation mechanism of growth stresses in wood cell walls: role of lignin deposition and cellulose microfibril during cell wall maturation. *Wood Sci. Technol.*, 32: 171–182
- 253) Yeh, H.C., Ho, Y.P., Shih, I.M. and Wang, TH. (2006) Homogeneous point mutation detection by quantum dot-mediated two-color fluorescence coincidence analysis. *Nucleic Acids Res.*,: p:34.
- 254) Yeh, T.F., Goldfarb, B., Chang, H.M., Peszlen, I., Braun, J.L., Kadla, J.F. (2005) Comparison of morphological and chemical properties between juvenile wood and compression wood of loblolly pine. *Holzforschung*, 59: 669–674
- 255) Yoshizawa, N., Okamoto, Y. and Idei, T. (1986.) Righting movement and xylem development in tilted young conifer trees. *Wood and Fiber Sciences*, 18: 579-589
- 256) Yoshizawa, N. and Idei, T. (1987) Some structural and evolutionary aspects of compression wood tracheids. *Wood and Fiber Science*, 19: 343-352
- 257) Yu, W.W., Chgang, E., Drezek, R., Colvin, V.L. (2006) Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biophys. Res. Commun.*, p:348 781
- 258) Zhou, M., Qiu, X., Yang, D., Lou, H., Ouyang, X. (2007) High-performance dispersant of coal–water slurry synthesized from wheat straw alkali lignin. *Fuel Processing Technology*, 88: 375-382
- 259) Zwier, J.M., van Rooij, G.J., Hofstraat, J.W. (2004) Image calibration in fluorescence microscopy. *J. Microsc.*, 216: 15–24
- 260) Zykwinska, A.W., Ralet, M.C., Garnier, C.D. and Thibault, J.F. (2005) Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol.*, 139: 397–407
- 261) <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/1999/materials/PF089.htm>
- 262) <http://www.crc.uga.edu/~mao/intro/outline.htm>

263) http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4c/C4c_polysaccharides.html

264) <http://www.micro.siu.edu/micr302/products.html>

265) http://www.bio.miami.edu/dana/160/160S12_15.html

BIOGRAFIJA

Kandidat Daniela B. Đikanović Golubović, rođena je u Beogradu 15.12.1970 godine. Trenutno je zaposlena u Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu.

Završila je „Četnaestu beogradsku gimnaziju“ 1989. godine u Beogradu, diplomirala je 2000. godine na Fakultetu za Fizičku hemiju, i magistrirala na Fakultetu za fizičku hemiju 2006. godine.

U periodu od 2000- 2002. godine radila je kao asistent na katedri za Fizičku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i od 2003. godine je zaposlena u Institutu za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu.

Projekti na kojima je bila i jeste angažovana

2006-2010- OI-143043 “Ispitivanja novih biosenzora za monitoring i dijagnostiku biljaka”

2011.-2014.- OI 173017 “Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom”

2011.-2014.- III 45012 „Sinteza, procesiranje i karakterizacija nanostrukturnih materijala za primenu u energetici, mehaničkom inženjerstvu, zaštiti životne sredine i biomedicini. – PODPROJEKAT: Proučavanje i izmene strukture biljnog ćelijekog zida kao osnove za nove materijale za primenu u nanotehnologiji”

Posenbne aktivnosti:

Tokom 2004. i 2005 godine, kao učesnik projekta „Nove metode ispitivanja biljnih ćelijskih zidova,, boravila je u Francuskoj, Versaj, na istitutu INRA, u okviru bilateralnog projekta „Pavle Savić“ Srbija/Francuska.

2008 godine je dobila sertifikat za bavljenje Fluorescentnim tehnikama „Principle of fluorescence techniques“ u Đenovi, Italija (koordinator kursa Matthew Pava)

Od 2010-2012. godine uključena je u projekat bilateralne saradnje sa Mađarskom. 2011.godine provela je dva meseca radeći na DP-LSM mikroskopu u Segedinu, Mađarska u Institutu za Biološka Istraživanja (BRC).

Od 2008-2012. godine uključena je u COST akciju FP0208 “Experimental and computational micro-characterization techniques in wood mechanics”

Član je društva Fizikohemičara Srbije.i Biofizicara Srbije

Naučna oblast: Fizička-hemija, Biofizika živih sistema, instrumentalne metode i nanotehnologije

Uža naučna oblast: Fizičko-hemijske metode analize, Primena spektroskopskih i mikroskopskih tehnika i matematičko modeliranje biološkim istraživanjima; Fluorescentne tehnike i njihova primena u biološkim i farmaceutskim istraživanjima

BIBLIOGRAFIJA

B.1. Publikovani naučni i stručni radovi iz uže naučne oblasti

1. Micic, M., Radotic, K., Jeremic, M., **Djikanovic, D.**, Kammer, S.B. (2004) Study of the lignin model compound supramolecular structure by combination of near-field scanning optical microscopy and atomic force microscopy. *Colloid and Surface B:Biointerface*, vol. 34 (1): 33-40
2. Radotić, K., Kalauzi, A., **Dikanović, D.**, Jeremić, M., Leblanc, R., Cerović, Z. (2006) Component analysis of the fluorescence spectra of a lignin model compound. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, Vol. 83(1): 1-10
3. Bogdanovic-Pristov, J., **Djikanovic, D.**, Maksimovic, V., Tufegdžić, S., Djokovic, D., Isajev, V., Radotic, K. (2006) Phenolics, lignin content and peroxidase activity in *Picea omorika* lines. *Biologia Plantarum*, vol. 50 (3): 461-464
4. **Djikanović, D.**, Kalauzi, A., Jeremić, M., Mičić, M., Radotić, K. (2007) Deconvolution of fluorescence spectra: Contribution to the structural analysis of complex molecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54 (2): 188-192.
5. Kalauzi, A., Mutavdžić, D., **Djikanović, D.**, Radotić, K., Jeremić, K. (2007) Application of asymmetric model in analysis of fluorescence spectra of biologically important molecules. *J. Fluorescence.*, 17(3): 319-329.
6. **Djikanović, D.**, Kalauzi, A., Radotić, K., Lapierre, C., Jeremić, M. (2007) Deconvolution of lignin fluorescence spectra: a contribution to the comparative structural studies of lignins. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 81 (9): 1425-1428

7. Radotic, K., **Djikanovic, D.**, Bogdanovic-Pristov, J., Vasiljevic-Radovic, D. (2008) Levels of plant cell wall structural organization revealed by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford*, 232 (3): 508-510
8. Pavun, L., **Djikanovic, D.**, Djurdjevic, P., Jelikic-Stankov, M., Malesev, D., Ciric, A. (2009) Spectrofluorimetric and HPLC Determination of Morin in Human Serum (Article). *Acta Chimica Slovenica* , 56 (4): 967-972
9. Donaldson, L., Radotić K., Kalauzi, A., **Djikanović, D.**, Jeremić ,M. (2010) Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *Journal of Structural Biology*, 169(1):106-115.
10. **Djikanovic, D.**, Kalauzi, A., Jeremic, M., Xu, J., Micic, M., Whyte, J. D.,Leblanc, R. M., Radotic, K. (2012) Interaction of the CdSe quantum dots with plant cell walls. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91: 41-47
11. **Djikanovic, D.**, Simonovic, J., Savic, A., Ristic, I.S., Bajuk-Bogdanovic, D.V., Kalauzi, A., Cakic, S.M., Budinski-Simendic, J.K., Jeremic, M., Radotic, K. (2012) Structural Differences Between Lignin Model Polymers Synthesized from Various Monomers. *Journal of Polymers and The Environment* , 20(2): 607-617
12. Pavun, L., Dimitrić Marković, J., Đurđević, P., Jekić-Stankov, M., **Djikanović, D.**, Ćirić, A. and Malešev, D (2012) Development and validation of a fluorometric method for the determination of hesperidin in human plasma and pharmaceutical forms. *J. Serb. Chem. Soc.*, 77 (11): 1625–1640
13. Simonović, J., Stevanic, J., **Djikanović, D.**, Salmén, L., Radotić, K. (2011) Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. *Cellulose*, Volume 18(6): 1433-1440

B.2. Radovi na medjunarodnim konferencijama stampani u celini i štampani u izvodu

1. Bogdanović J., **Dikanović D.**, Isajev V., Radotić K. (2005) Lignin content and peroxidase activity in the needles of three omorika lines *XVI Symposium Society of Plant Physiology SCG 2005,7*
2. Radotić K., **Dikanović D.**, Bogdanović J., Kalauzi A. Jeremić M. (2004) Fluorescence spectra of synthetic and isolated lignins from omorika (*Picea omorika* Panč purkinye). In: Polyphenols communications 2004, Eds: Antti Hoikkala, Otto Soidinsalo, XXII *International Conference on Polyphenols, 25-28 August 2004, Helsinki, 681-682.*
3. **Djikanović D.**, Bogdanović J., Kalauzi A., Micić M., Jeremić M., Radotić K. (2004) Component analysis of fluorescence spectra of lignin isolated from omorika (*Picea Omorika* L.) needles. *Physical Chemistry 2004,E-5-P*
4. **Dikanović D.**, Bogdanović J., Kalauzi A., Jeremić M., Radotić K.: (2004) Spectrofluorimetric analysis of synthetic and isolated lignins from omorika (*Picea omorika*(PANC) purkinye). *22 International Symposium on Biophysics, Sv. Stefan 2005, Book of Abstracts 12, S4*
5. **Dikanović D.**, Bogdanović J., Kalauzi A., Jeremić M., Radotić K. (2005) Analysis of fluorescence spectra of synthetic and isolated lignins. *Book of abstracts, Regional Biophysics Meeting 2005, Slovenija, Zreče 43, S7-P1*
6. **Djikanović D.**, Bogdanović J., Maksimović V. , Tufegdžić S., Djoković D., Isajev V. and Radotić K. (2005) Low molecular mass phenolics in different omorika lines, *XVI Symposium Society of Plant Physiology SCG,8*
7. Radotić K., **Dikanović D.**, Bogdanović J., Kalauzi A. Jeremić M. (2004) Fluorescence spectra of synthetic and isolated lignins from omorika (*Picea omorika* Panč purkinye). In:

Polyphenols communications 2004, Eds: Antti Hoikkala, Otto Soidinsalo, *XXII International Conference on Polyphenols*, 25-28 August 2004, Helsinki, 681-682

8. **Dikanović D.**, Kalauzi A., Tufegdžić S., Radotić K., Jeremić M., (2005) Component analysis of the fluorescence spectra of simple and polymeric phenolic compound. *International Biophysics Congress, Montpellier, France, P-61*

9. Radotić K., Mouille G., **Djikanović D.**, Mutavdžić D., Thevenin J., Jouanin L. (2007) Combination of FTIR Microscopy and Excitation of Arabidopsis Thaliana Stem Cell Wall by Specific Solvents. Differences in Cell Wall Nanoarchitecture Between Wild Type and Cad C, Cad D and Double mutant. *12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules*, 1-6 september 2007, Bobigny, France, 277

10. **Dikanović D.**, Kalauzi A., Radotić K., Lapierre C., Jeremić M. (2006) Comparison of different mathematical models in deconvolution of lignin fluorescence spectra. In: *Physical Chemistry 2006, Proceedings of the 8th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Vol. I, 105-107

11. Radotić K., Kalauzi A., **Djikanović D.**, Jeremić M., Micic M. (2006) Deconvolution of fluorescence spectra: contribution to the structural analysis of complex molecules. *40th Western Regional Meeting, American Chemical Society, January 22-25, Anaheim/Orange, CA*, p 309

12. Jeremić M., Radotić K., Kalauzi A., **Djikanović D.**, Micic M. (2006) Time and wavelength resolved spectra of lignin and lignin model compounds; possibility of spectra – structure correlation. *40th Western Regional Meeting, American Chemical Society, January 22-25, Anaheim/Orange, CA*, p333

13. **Djikanović D.**, Kalauzi A., Radotić K., Jeremić M., Lapierre C. (2007) Application of mathematical models in deconvolution of lignin fluorescence spectra. *The 8th ILI Forum - Rome 10-12 May, Proceedings*, 25-28

14. Radotić K., **Djikanović D.**, Kalauzi A., Jeremić M., Lapierre C. (2007) Deconvolution of lignin fluorescence spectra. *Contribution to the comparative structural studies of lignin. The 8th ILI Forum - Rome 10-12 May, Proceedings*, 29-34.
15. **Djikanović D.**, Radotić K., Kalauzi A., Jeremić M. (2007) Investigation of cell wall and its components by steady-state fluorescent spectroscopy. *Regional Biophysics Conference 2007, 21st-25th August, Balatonfüred, Hungary, Book of Abstracts*, p75
16. **Djikanović D.**, Radotić K., Kalauzi A., Jeremić M. (2007) Mathematical approach in analysis of fluorescence spectra of simple and complex biological molecules. *12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, From molecules to tissues, 1-6 September, Bobigny, France*, 161
17. Donaldson L., Radotić K., Kalauzi A., Jeremić M., **Djikanović D.** (2008) Spectral imaging of UV and blue light induced fluorescence in radiata pine normal and compression wood. *The 3rd New Zealand – German Symposium on Primary and Secondary Plant Cell Walls. Plant Cell Walls: Diversity and Approaches to Understanding their Function, 13-15 February 2008, Auckland, New Zealand*.
18. **Djikanović D.**, Kalauzi A., Jeremić M., Radotić K. (2008) Analysis of fluorescent spectra of different lignin model compounds. In: *Physical Chemistry 2008, Ed.: Antić-Jovanović A., Proceedings of the 9th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Vol. I*, 111-113.
19. Radotić K., Kalauzi A., **Djikanović D.**, Donaldson L., Jeremić M. (2008) A new measuring approach and mathematical analysis of fluorescence spectra of lignin and lignin model compounds. Possibility of spectra - structure correlation. *COST Action E50: Cell wall macromolecules and reaction wood. Abstracts of Workshop Characterisation and application of cell wall macromolecules. October 27th-29th, Dubendorf, Switzerland*, p. 34.

20. Radotić K., Kalauzi A., Mutavdžić D., **Đikanović D.**, Donaldson L., Jeremić M. (2008) Application of mathematical models in analysis of fluorescence spectra of biological molecules in solution and in microscopic imaging. *International Conference "From Solid State To BioPhysics IV"*, June 6 - 13, 2008, Cavtat, Dubrovnik, Croatia. *Book of abstracts*.
21. Radotić K., Mutavdžić D., Kalauzi A., **Đikanović D.**, Jeremić M. (2009) Mathematical and statistical models in analysis of steady-state fluorescence spectra of a protein. A new approach in following conformation transitions. *Regional Biophysics Conference 2009, 10-14 February, Linz, Austria. Abstract Book*, p50.
22. Simonović J., **Đikanović D.**, Kalauzi A., Bajuk-Bogdanović D., Radotić K. (2009) Micro Raman and fluorescence spectroscopy of lignin model compounds. *18th Symposium of the Serbian Society for Plant Physiology, Vršac, 25-27 May 2009. Programme and Abstracts*, p88.
23. **Đikanović D.**, Simonović J., Bogdanović-Pristov J., Kalauzi A., Radotić K. (2009) Structure analysis of *Arabidopsis thaliana* and spruce cell wall by FTIR and fluorescence spectroscopy. *18th Symposium of the Serbian Society for Plant Physiology, Vršac, 25-27 May 2009. Programme and Abstracts*, p98.
24. **Djikanovic D.**, Kalauzi A., Drakulic B., Vannoy C., Radotic K. (2009) Labeling of the isolated plant cell walls with CdSe Quantum dots. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 7th EBSA European Biophysics Congress, July 11-15, Genova, Italy. Abstracts*, S72.
25. Bogdanović Pristov J., Mitrović A., **Djikanović D.**, Mutavdžić D., Simonović J., Radotić R. and Spasojević I. (2010) Hydroxyl radical-scavenging capacity of cell wall from needles of serbian spruce (*Picea omorika*(Pančić) Purkyně). *Workshop on "wood structure/function relationships" October 5-8, 2010 Hamburg, Germany*

26. Simonović J., Stevanic J., **Djikanović D.**, Bogdanović Pristov J., Salmén L., Radotić K. (2010) Polarized FT-IR study of cell walls of a hardwood and softwood. *Workshop on "wood structure/function relationships" October 5-8, 2010 / Hamburg, Germany*
27. Radotić K., Roduit C., Kasas S., Simonović J., Bogdanović J., **Djikanović D.**, Dietler G. (2010) Stiffness of the isolated arabidopsis cell wall during soaking. *Workshop on "wood structure/function relationships" October 5-8, 2010 / Hamburg, Germany*
28. Pristov J., Mitrović A., Maksimović V., **Djikanović D.**, Mutavdžić D., Simonović J. and Radotić K. (2009) Variability and relation of lignin, low molecular mass phenolics and cell wall bound peroxidases in the needles of Serbian spruce (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) during four seasons. *Workshop on single fiber testing and modeling November 4-5, 2009 / Stockholm, Sweden*
29. Radotić K., **Djikanović D.**, Simonović J., Pristov J., Kalauzi A., Bajuk-Bogdanović D. and Jeremić M. (2009) Cell wall structural differences between hardwood and softwood studied by FT-IR, Raman and fluorescence spectroscopy. *Workshop on single fiber testing and modeling November 4-5, 2009 / Stockholm, Sweden*
30. **Djikanović D.**, Kalauzi A., Jeremić J., Xu J., Mičić M., Leblanc R., Radotić K., (2011) Fluorescence spectroscopy and spectral modeling as a tool for study of interaction of nanoparticles with biomacromolecules. Plant cell walls. *12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes 11-14th September 2011 - Strasbourg FRANCE, P 82*

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: Daniela B. Đikanović Golubović

broj upisa:

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom i lignina različitog porekla

“Strukturalna ispitivanja ćelijskog zida i lignina različitog porekla“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica

Potpis doktoranta

U Beogradu 12.03. 2013. god.

Daniela B. Đikanović Golubović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Daniela B. Đikanović Golubović

Broj upisa:

Studijski program

Naslov rada:

“ Strukturalna ispitivanja ćelijskog zida i lignina različitog porekla“

Mentori:

dr.Goran Bačić profesor

dr. Ksenija Radotić Hadžimanić , naučni savetnik

dr Jasmina Dimitrić-Marković, docent, vanredni profesor

Potpisani Daniela B. Đikanović Golubović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predo/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu 12. 03. 2013. god.

Daniela B. Đikanović Golubović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

" Strukturalna ispitivanja ćelijskog zida i lignina različitog porekla"

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo –nekomercijalno
3. Autorstvo –nekomercijalno –bez prerade
4. Autorstvo –nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
- 5. Autorstvo – bez prerade**
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista)

Potpis doktoranta

U Beogradu 12. 03. 2013. god.

Daniela B. Đikanović Golubović

1. **Autorstvo** – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo- nekomercijalno** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo- nekomercijalno- bez prerade** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo- nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerade** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.