

Verhornungserscheinungen an Cellulosefaserstrukturen in elektronenoptischer Sicht*

Von
Georg Jayme und Günther Hunger

Mitteilung aus dem Institut für Cellulosechemie mit Holzforschungsstelle
an der Technischen Hochschule Darmstadt

Mit 12 Abbildungen

(Eingelangt am 4. Januar 1956)

Nach einer Literaturübersicht wird auf Grund eigener Elektronenaufnahmen gezeigt, daß die irreversible Verhornung von Pflanzenfasern in einer Verbänderung (Strangbildung) der ursprünglich individualisiert vorliegenden Mikrofibrillen besteht und damit diese durch chemische Einwirkung vorbereitete, während der Trocknung eintretende, durch Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens meßbar gewordene Erscheinung auch sichtbar gemacht worden ist. Die verwandte Technik wird eingehend beschrieben.

Der Aufbau der verholzten Pflanzenfaser wurde bereits vor der Anwendung der Elektronenmikroskopie licht- und polarisationsoptisch und durch aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen hypothetisch im wesentlichen geklärt. Das daraus resultierende Aufbauschema wurde durch die Elektronenmikroskopie bestätigt. Generelle Gültigkeit für alle verholzten Pflanzenfasern hat mit individuell geringen Abweichungen das von *Kerr* und *Bailey*¹ aufgestellte Schema, das den im folgenden beschriebenen strukturellen Aufbau der Pflanzenzelle vorsieht. Der ligninreichen Mittellamelle *O* schließt sich die Primärwand *I* an und dieser die 3 Lagen der Sekundärwand *II*₁, *II*₂ und *II*₃. Fußend auf Abbauuntersuchungen von Fichten- und Birkenholz mit Holzvermorschungspilzen und vorangegangenen Untersuchungen anderer Autoren kommt *Meier*² zu dem Schluß, daß die Sekundärwand *II*₂, die zugleich

* Herrn Prof. Dr. A. Wacek zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ T. Kerr und I. W. Bailey, J. Arnold Arb. 15, 327 (1954).

² H. Meier, Holz, Roh- u. Werkstoff 13, 323 (1955).

die mächtigste der Zellwänden darstellt, den Hauptanteil der reinen Cellulose der Pflanzenfaser mit einem Anteil an Hemicellulosen enthält und, im Falle von Fichtenholz, auch Lignin. Die Primärwand und die Sekundärwände II_1 und II_3 dürften teilweise aus Hemicellulosen, aus Glukan-Xylan- (Mannan-) Verbindungen oder aus einer chemisch von der Cellulose der Sekundärwand II_2 verschiedenen Cellulose bestehen. Auch *Bucher*³ konnte durch Anfärbe- und Quellungsreaktionen ein verschiedenes Verhalten der Zellwänden zeigen.

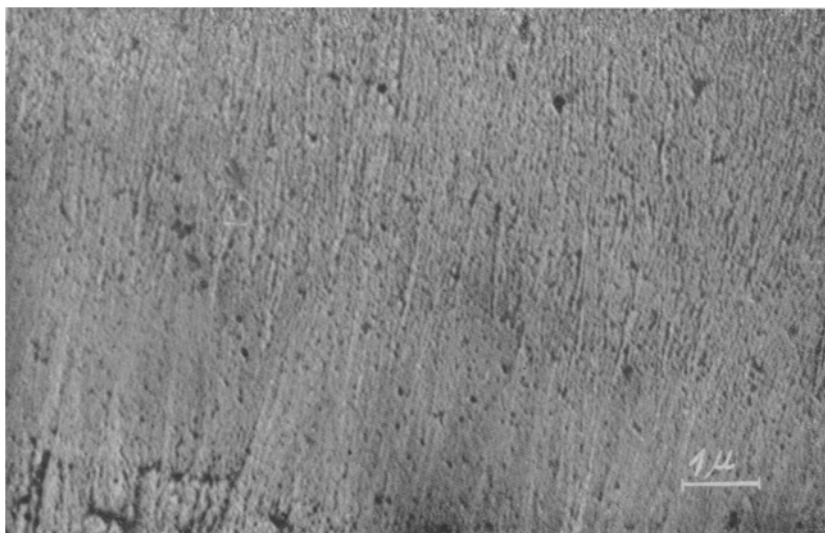


Abb. 1. Fichtenholzradialschnitt, Polystyrolwärmeabdruck, palladiumbeschattet, Kohlefilm.
Vergrößerung: 10500fach

Durch die Elektronenmikroskopie wurde es dem menschlichen Auge ermöglicht, in bis dahin ihm verschlossen gebliebene Größenbereiche vorzustößen und den Feinbau dieser Zellwänden aufzuklären. Es zeigte sich, daß die Zellwandbausteine in Mikrofibrillen einheitlicher Dicke angeordnet sind. *Ruska* und *Kretchmer*⁴ fanden an mit HCl abgebauter Baumwolle Fibrillen von etwa 100 Å Durchmesser, *Kuhn*⁵ an gequetschten Dünnschnitten und an mit Cuoxam gequollener Cellulose Fibrillen von 200 bis 300 Å Durchmesser und *Hess*⁶ an gemahlener Cellulose Fibrillen von 100 bis 750 Å Durchmesser. Für mechanisch

³ ATIP Bull. 95—104 a (1955), Nr. 4/5.

⁴ *H. Ruska* und *M. Kretchmer*, Kolloid-Z. 93, 163 (1940).

⁵ *E. Kuhn*, Melliand Textilber. 22, 249 (1941).

⁶ *K. Hess*, *H. Kiessig* und *J. Gundermann*, Z. physik. Chem. 49, 64 (1941).

unbeschädigte Pflanzencellulose wurde schließlich von *Frey-Wyssling*, *Mühlethaler* und *Wyckoff*⁷ allgemein als Grundbaustein eine Cellulosemikrofibrille von 250 Å Durchmesser gefunden.

Da nun die Holzsubstanz nur zu etwa 45% aus reiner Cellulose (Glukosepolysaccharid) besteht⁸, müssen die übrigen Begleitstoffe Lignin, Hemicellulosen und Pektine entweder zwischen die nur aus Cellulose bestehenden Mikrofibrillen eingelagert sein oder, chemisch an die Cellulose gebunden, gemeinsam mit dieser die Mikrofibrillen formen. Zu letzter

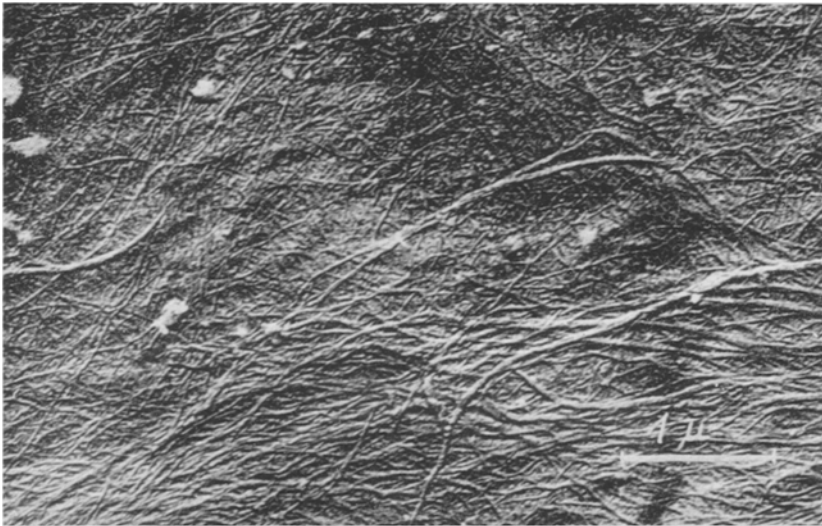


Abb. 2. Fichtensulfitzellstoff, Primärwand, Polystyrolwärmeabdruck, palladiumbeschattet, Kohlefilm. Vergrößerung: 20000fach

Ansicht kommen *Jayme* und *Wettstein*⁹ in dem von ihnen aufgestellten und *Jayme* und *Hanke*¹⁰ in einem aus vorgehendem verfeinerten Einbettungsschema der Cellulose.

Im Holz ist die Cellulose mit Hemicellulosen mehr oder weniger fest gebunden, während das Lignin seinerseits — allerdings nur in einer Grenzschicht — mit den Hemicellulosen in Bindung steht und die äußere Oberfläche des gesamten Systems einnimmt. Damit ist dem Proto-

⁷ *A. Frey-Wyssling*, *K. Mühlethaler* und *R. W. G. Wyckoff*, *Exper.* **4**, 475 (1948).

⁸ Vgl. auch hinsichtlich der Schwankungen des Cellulosegehaltes in verschiedenen Hölzern: *G. Jayme*, *Zellstoff*, 1939—1946, Bd. 24 der Schriften des Vereines Zellcheming, S. 5ff.

⁹ *G. Jayme* und *R. Wettstein*, *Papierfabrikant* **36**, 519 (1938).

¹⁰ *G. Jayme* und *G. Hanke*, *Cellulosechem.* **21**, 127 (1943).

lignin, das sich nach den grundlegenden Arbeiten von *Freudenberg*, *Hibbert* und *v. Wacek* aus substituierten Phenylpropaneinheiten aufbaut, auch im biologischen Sinne die Rolle einer Schutzschicht für die Cellulose zugewiesen, die, wie zuerst *Jayme* und *Groegaard*¹¹ beweisen konnten, auch beim technischen Aufschluß eine große Rolle spielt.

In einer Studie über die Verteilung der Cellulose und Hemicellulosen über die Zellwandungen hinweg können *Asunmaa* und *Lange*¹² zeigen, daß bei Birke und Fichte die Cellulose am dichtesten um das Lumen

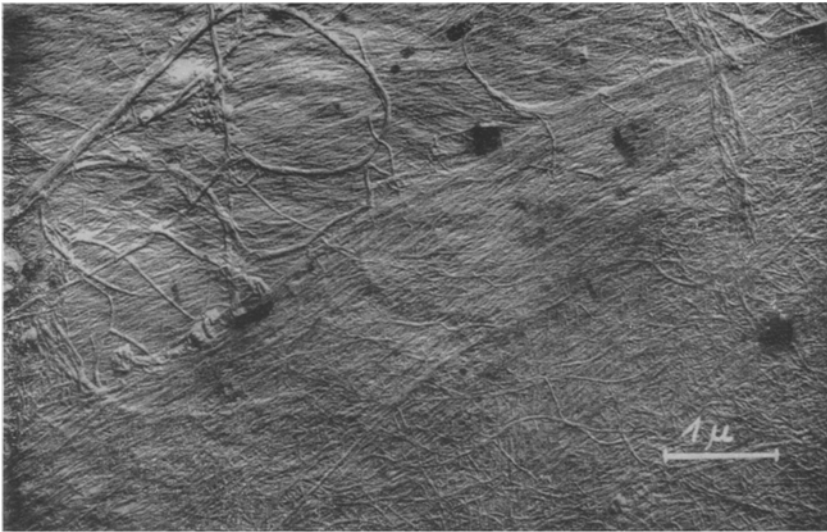


Abb. 3. Kiefersulfatzellstoff, Primärwand, Hochvakuumkohledirektabdruck, palladium-beschattet. Vergrößerung: 15000fach

herum gepackt ist; in den äußersten Schichten ist die Packung der Cellulose nur halb so dicht. Die Hemicellulosen sind ziemlich gleichmäßig über die Zellwandungen verteilt, so daß ihr Anteil wegen des schwankenden Celluloseanteiles der Schichten in Lumennähe 10 bis 20%, in den äußersten Faserschichten zirka 50% der Substanz ausmacht.

Das Protolignin ist nun nicht nur in den Zellen verschiedener Pflanzen in wechselnder Menge vorhanden, sondern seine Konzentration ist auch innerhalb z. B. des Holzes desselben Baumes oder der einzelnen morphologisch verschiedenen Zellen einer Einjahrespflanze beträchtlichen Schwankungen unterworfen; sogar innerhalb der einzelnen Zellwände

¹¹ *G. Jayme* und *L. Groegaard*, *Cellulosechem.* 18, 34, 42 (1940); *Papierfabrikant* 38, 93, 101, 103 (1940).

¹² *S. Asunmaa* und *P. W. Lange*, *Svensk Papperstidn.* 14, 501 (1954).

derselben Holzfaser bestehen große Unterschiede in der Verteilung des Lignins, was beim technischen Aufschluß zu berücksichtigen ist und worauf die von *Jayme* und *Harders-Steinhäuser*¹³ farbenoptisch erfaßten Unterschiede in der Lagerung des Restlignins in Zellstoffasern zum Teil zurückzuführen sind.

Unter Berücksichtigung des Einbettungsschemas von *Jayme* und *Hanke*¹⁰ müssen mithin die Cellulosemikrofibrillen der äußeren Wandungen stärker mit Hemicellulosen und Lignin verkleidet sein als die der Sekundär-

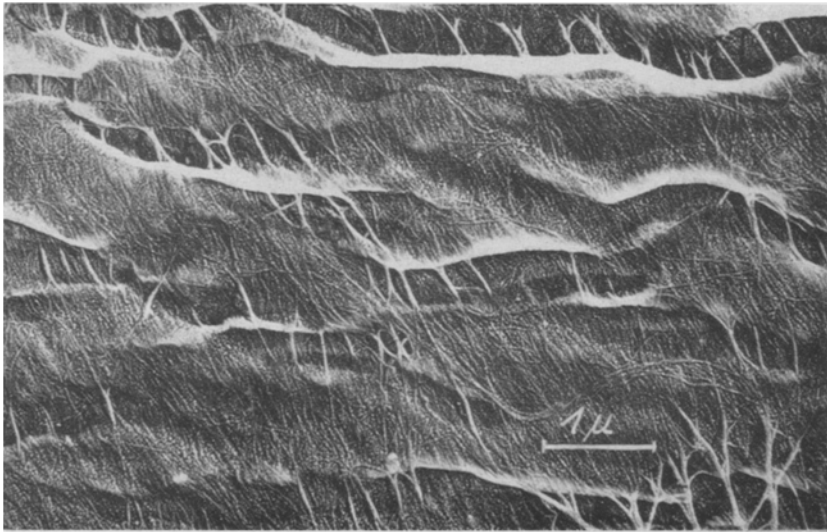


Abb. 4. Fichtensulfatzellstoff, Primärwand, Polystyrolwärmeabdruck, palladiumbeschattet, Kohlefilm. Vergrößerung: 15000fach

wand II_2 , womit auch die von *Meier*² beobachtete größere Resistenz dieser Wandungen gegenüber Pilzcellulasen erklärt werden kann.

Der chemische Holzaufschluß zielt auf die Herauslösung des Lignins aus der Holzsubstanz hin und führt damit zu einer Auflösung des geordneten Faserverbandes. Die beiden Hauptaufschlußverfahren, die schwach saure Bisulfitkochung und die alkalische Sulfatkochung führen das Lignin in wasserlösliche Form über, haben aber auf die verbleibenden Holzsubstanzen sehr verschiedene Wirkungen.

Bei der alkalischen Kochung erfährt die Faser eine stärkere *Quellung*, die Aufschlußtemperatur liegt um 30 bis 40° C höher und Sulfid- und OH-Ionen können rascher durch die Fibrillenlagen permeieren als das größere

¹³ G. Jayme und M. Harders-Steinhäuser, Das Papier 8, 509, Nr. 23/24 (1954).

Sulfition. Die Sulfatkochung wirkt also auf das Pflanzenmaterial im ganzen gesehen intensiver ein. Die β -glukosidischen Bindungen der Cellulose werden von ihr zwar wenig angegriffen, wohl aber das gesamte über die Faser verteilte Lignin und ein Großteil der Hemicellulosen, die von der alkalischen Aufschlußflüssigkeit herausgelöst werden.

Demgegenüber geht die Sulfitkochung topochemisch vom Lumen aus vor. Sie dringt durch Tüpfelsysteme auch in die ligninreiche Mittellamelle ein und holt stellenweise von außen her das Lignin aus der Faser,

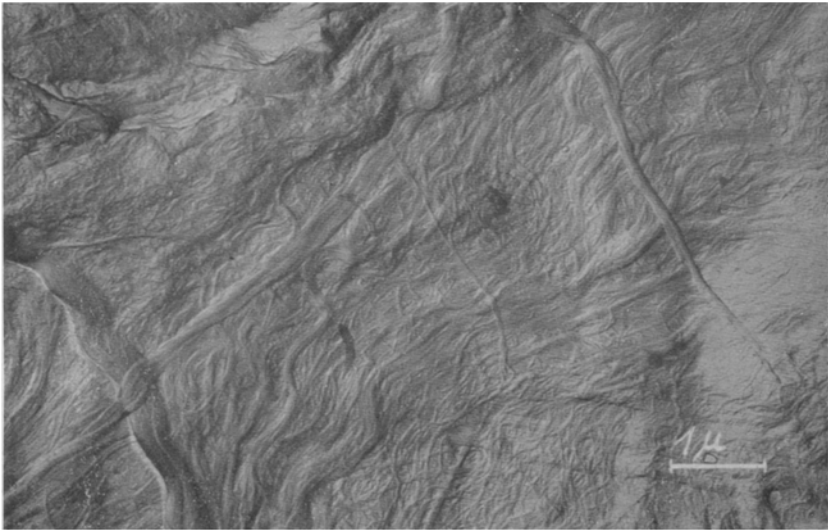


Abb. 5. Fichtensulfitzellstoff, $\frac{1}{2}$ Std. gemahlen, Mahigrad 58° SR. Hochvakuumkohle-
direktabdruck, palladiumbeschattet. Vergrößerung: 12500fach

die ihrerseits dabei nur schwach zusätzlich gequollen wird und der Diffusion einen stärkeren Widerstand entgegensetzt.

Die Verteilung des Restlignins wird also in einem Sulfit- und einem Sulfatzellstoff unterschiedlich sein müssen. Dies haben *Jayme* und *von Köppen*¹⁴ in einer entsprechenden Untersuchung bestätigt gefunden. Nach Verzuckern der Cellulosesubstanz stellten sie lichtoptisch fest, daß die Ligninskelette der Sulfitzellstoffe noch die Faserstruktur erkennen ließen. Dies wird dadurch erklärt, daß das Restlignin in den äußeren Zellschichten in hoher Konzentration vorlag und seine Struktur offenbar ziemlich unverändert war, da die Faser keinen zusätzlichen Quellungsreaktionen ausgesetzt war. Demgegenüber erweist sich das Sulfatzellstofflignin als lichtoptisch amorph. Hierfür ist zunächst seine

¹⁴ *G. Jayme* und *A. v. Köppen*, *Das Papier* 4, 373, 415, 455 (1950).

gleichmäßigere Verteilung innerhalb der Zellwände verantwortlich zu machen; außerdem ist aber auch anzunehmen, daß das innere Gefüge dieses Restlignins durch die vorausgegangenen Quellungsreaktionen stark gelockert wurde; aus diesen Gründen zerfällt es bei der Verzuckerung des Zellstoffes zu einem lichtoptisch amorphen Pulver.

Will man die *Reaktionsfähigkeit* der gewonnenen Zellstoffe überprüfen, so muß man feststellen, welche Menge eines chemischen Reagens von einer bestimmten Menge Zellstoff gebunden wird. Das einfachste zur

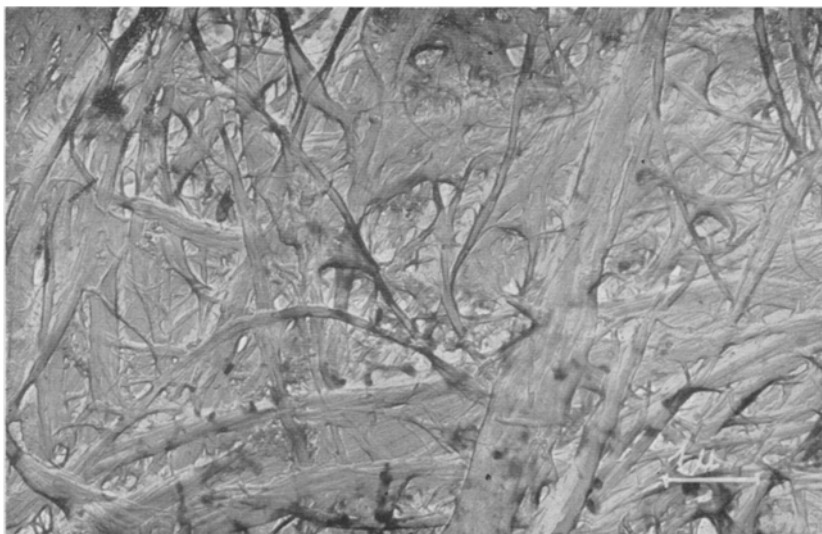


Abb. 6. Kiefernulfatzellstoff, 70 Min. gemahlen, Mahlgrad 59° SR. Hochvakuumkohle-
direktabdruck, palladiumbeschattet. Vergrößerung: 12500fach

Verfügung stehende Reagens ist Wasser, und *Jayme*¹⁵ bestimmt den *Quellwert* eines Zellstoffes als Maß für seine Reaktionsfähigkeit gegenüber Wasser. Von *Höpner*, *Jayme* und *Ulrich*¹⁶ ist dieses Verfahren inzwischen zum Vorschlag einer Einheitsmethode zur Bestimmung des Wasser-rückhaltevermögens ausgearbeitet worden. *Jayme*¹⁷ fand bei einer Delignifizierungsreihe eines ungebleichten Sulfat- und eines ungebleichten Sulfitzellstoffes mittels Natriumchlorit, daß der Quellwert beider Stoffe mit abnehmendem Ligningehalt ansteigt, daß er aber absolut gesehen und bei annähernd gleichem Ligningehalt beim Sulfitzellstoff stets höher

¹⁵ *G. Jayme*, Papierfabrikant, Wochenbl. f. Papierf. 1944, 187, Nr. 6. — Vgl. auch *G. Jayme* und *L. Rothamel*, Das Papier 2, 7, Nr. 1/2 (1948).

¹⁶ *T. Höpner*, *G. Jayme* und *C. Ulrich*, Das Papier 9, 476 (1955).

¹⁷ *G. Jayme*, Svensk Papperstidn. 50, 117 (1947).

liegt als beim Sulfatzellstoff. Bei letzterem müssen also wasserbindende Zentren in der Cellulosesubstanz abgesättigt sein. Werden Zellstoffe getrocknet, so erreichen sie beim Wiederbefeuchten nie mehr das ursprüngliche Wasserrückhaltevermögen. Dieser Fehlbetrag in der Wiederaufnahme von Wasser getrockneter Zellstoffe wird von *Jayme*^{15, 17} als „*irreversible Verhornung*“ bezeichnet. Das aus den Zwischenräumen zwischen den Mikrofibrillen beim Trocknen des Stoffes verdunstende Wasser nähert durch seine Oberflächenspannung vor dem völligen Ver-



Abb. 7. Fichtensulfitzellstoff, Hoftüpfel, Polystyrolwärmeabdruck, palladiumbeschattet, Kohlefilm. Vergrößerung: 15 000fach

dunsten die wasserbindenden Zentren an inneren Oberflächen, die sich nun durch Wasserstoffbrücken untereinander binden und hinter dem entweichenden Wasser den Kapillarraum schließen.

Corte und *Schaschek*¹⁸ konnten zeigen, daß die Bindungskräfte zwischen den Cellulosefibrillen im Papier auf diese Wasserstoffbrückenbindung zurückzuführen sind, und es liegt nahe, diese Wasserstoffbrückenbindung für die Verhornung ebenfalls als Begründung heranzuziehen.

Wird ein Holzpulver oder eine Holzoberfläche mit Natriumchlorit delignifiziert, wie es von *Jayme*¹⁹ und von *Wise*²⁰ beschrieben worden ist, so quillt die Faser in dem schwach sauren Gebiete der Reaktion zunächst zusätzlich wenig. Mit fortschreitender Delignifizierung tritt

¹⁸ *H. Corte* und *H. Schaschek*, *Das Papier* 9, 519 (1955).

¹⁹ *G. Jayme*, *Cellulosechem.* 20, 43 (1942).

²⁰ *E. L. Wise* u. a., *Techn. Assoc. Papers*, Ser. 29, 210 (1946).

jedoch in Zellstoffen eine bedeutende Steigerung des Wasserrückhaltevermögens ein^{14, 15}, die besonders deutlich an den ungetrockneten Zellstoffen erkennbar bleibt.

Auch bei der Entfernung von Hemicellulosen bei der Kaltveredlung mit nachfolgender Trocknung des gewaschenen Zellstoffes tritt eine dichtere Packung der Mikrofibrillen ein, wie kürzlich *Jayme* und *Harders-Steinhäuser*²¹ durch gleichzeitige Färbung mit zwei Farbstoffen verschiedener Affinität zu Cellulose gezeigt haben.

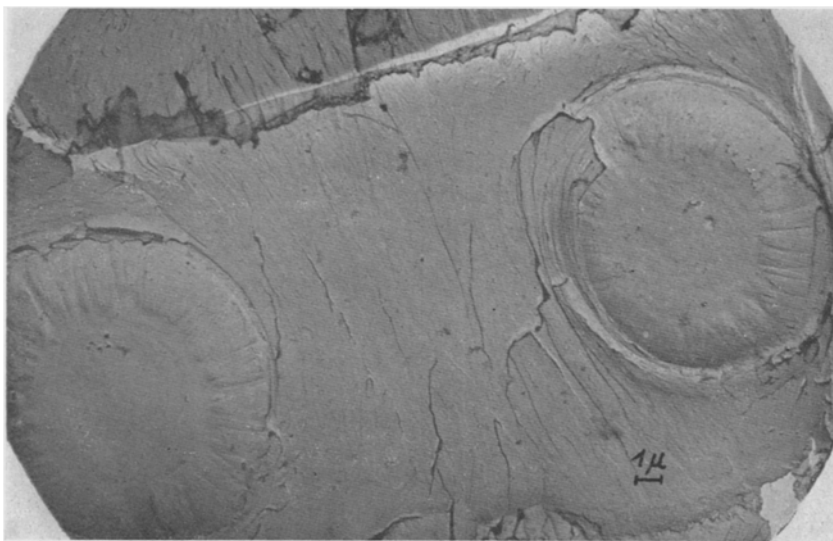


Abb. 8. Fichtenholzradialschnitt, 2 Hoftüpfel, Polystyrolwärmeabdruck, palladiumbeschattet, Kohlefilm. Vergrößerung: 3000fach

Die Schließung der Kapillarzweischenräume muß zu einer Zusammenlagerung von zwei oder mehreren Mikrofibrillen führen, einer Erscheinung, die *Frey-Wyssling*²² an Mesophyllzellwänden der Tulpenzwiebel beobachtet hat und als „Mikrofibrillenverbänderung“ bezeichnete. Den Grund, daß eine solche Verbänderung in der primären Wandung der Pflanzenzelle selten zu beobachten ist, sieht er darin, daß diese Wandung nur zu 2,5 Gew.-% aus Cellulose besteht und die Mikrofibrillen den ihnen zur Verfügung stehenden Raum nur als ein sehr lockeres Gerüst mit einem mittleren Abstand von $0,3 \mu$ durchziehen. Nach seinen Untersuchungen erfolgt die Verbänderung der Mikrofibrillen derart, daß die hydrophilste Fläche (101) des Cellulosekettengitters der Bandfläche

²¹ G. Jayme und M. Harders-Steinhäuser, Das Papier 9, 507 (1955).

²² A. Frey-Wyssling, Holz, Roh- u. Werkstoff 9, 333 (1951).

entspricht, denn die Kristallisationstendenz senkrecht zur Kettenrichtung ist in der Ebene (101) am größten. In der gleichen Arbeit schreibt *Frey-Wyssling*: „Insbesondere sollte man erwarten, daß in den Sekundärwänden der pflanzlichen Faserzellen, in denen die Mikrofibrillen mit nur sehr geringen interfibrillaren kapillaren Zwischenräumen sehr dicht gepackt sind, die Verbänderung als Regel auftreten sollte.“ Es ist nun nicht leicht, an Elektronenbildern parallel laufender, dicht gepackter Mikrofibrillen zu entscheiden, ob diese verbändert sind, oder ob sie durch

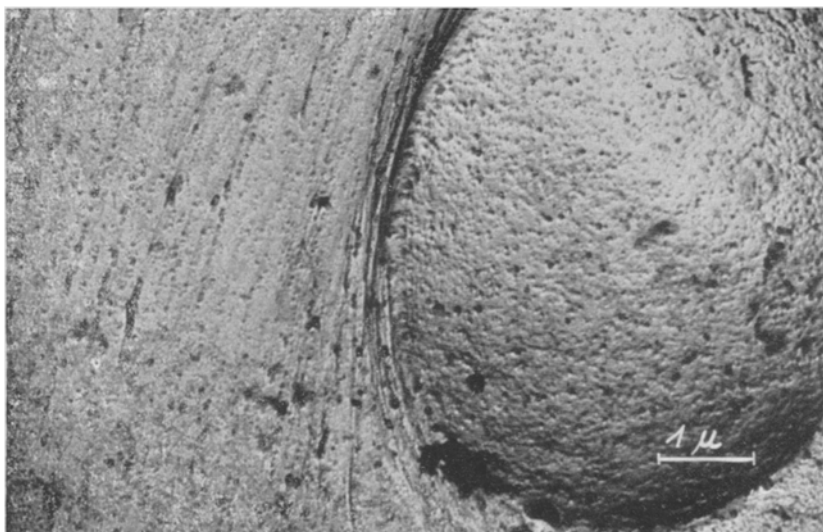


Abb. 9. Fichtenholzradialschnitt, Hoftüpfel, lumenseitig, Polystyrolwärmeabdruck, palladiumbeschattet, Kohlefilm. Vergrößerung: 12500fach

inkrustierende Substanzen miteinander verklebt sind, wofür Abb. 1 ein Beispiel bietet. Vermutlich handelt es sich dort um eine der Sekundärwandschichten, worauf die parallele Lagerung der stark inkrustierten Mikrofibrillen hindeutet.

Die inkrustierende Substanz zeigt sich hier als eine sehr poröse Masse von offenbar größerer innerer Oberfläche.

Trifft aber das von *Jayme* und Mitarbeitern^{9, 10} aufgestellte Einbettungsschema zu, so sollten auch die Fibrillen der Sekundärwand II individuell sein, da die wasserstoffbrückenbildenden —OH-Gruppen der Cellulose nicht in direkten Kontakt kommen können. Werden die sie einbettenden Substanzen entfernt, wie es z. B. bei der Sulfatkochung oder einer längeren Delignifizierung mit Natriumchlorit der Fall ist, so sollte eine mehr oder weniger ausgedehnte Mikrofibrillenverbänderung stattfinden, das heißt, der Zellstoff verhornen können.

Daß dies tatsächlich der Fall ist, konnten wir nun mittels elektronenoptischer Untersuchungen beweisen.

Abb. 2 zeigt die lose verflochtene Primärwand eines Fichtensulfatzellstoffes mit individuellen Einzelfibrillen, die locker miteinander verwoben sind. Abb. 3 gibt bei etwas geringerer Vergrößerung die Oberfläche eines technisch hochgebleichten Kiefersulfatzellstoffes wieder. Durch die beim alkalischen Aufschluß erfolgte Quellung der Faser wurde die Primärwand zerrissen. Andere Aufnahmen der geschädigten Primär-

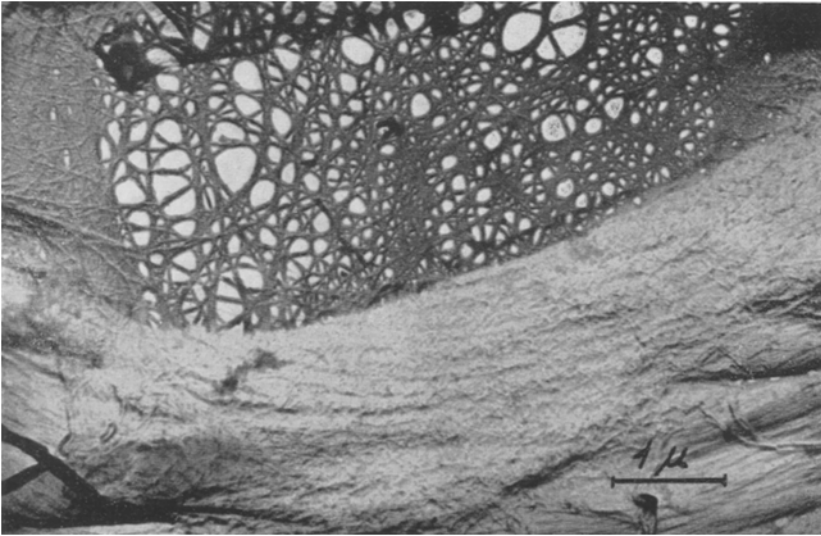


Abb. 10. Kiefersulfatzellstoff, technisch ungebleicht, Hoftüpfel mit Schließhaut, Hochvakuumkohledirektabdruck, palladiumbeschattet. Vergrößerung: 15000fach

wand von Sulfatzellstoffen wurden von uns bereits an anderer Stelle veröffentlicht²³. Die Randfibrillen an den Reißstellen haben sich zum Teil stark verbändert. Aber auch auf dem intakt gebliebenen Primärwandteil kann man bei aufmerksamer Betrachtung zahlreiche verbänderte Mikrofibrillen erkennen.

Sehr deutlich aber wird die Mikrofibrillenverbänderung (Verhornung) an Abb. 4, die die Oberfläche eines Fichtensulfatzellstoffes zeigt. Die quellende Faser dehnte sich und zerriß an mehreren Stellen die Primärwand, wobei sich die Restfibrillen gleich den Maschen eines überbeschwertem, zerreißenen Netzes zusammenschoben. Nach dem Trocknen des Stoffes und der Rückschrumpfung der Faser blieben diese Stränge

²³ G. Jayme und G. Hunger, Holz, Roh- u. Werkstoff **13**, 212 (1955).

irreversibel verhornt, da die die wasserbindenden Zentren abschützenden Begleitstoffe entfernt worden waren.

Diese an der Oberfläche sichtbar gewordenen Verhornungserscheinungen würden wohl nicht ausreichen, um die großen Rückgänge des Wasserrückhaltevermögens beim Trocknen zu erklären. Es war vielmehr anzunehmen, daß sich die Verbänderungen auch in den tiefer gelegenen Wandschichten finden würden. Um hier Klarheit zu schaffen, wurden ein Fichtensulfit- und ein Kiefernulfatzellstoff in der Jokromühle ge-

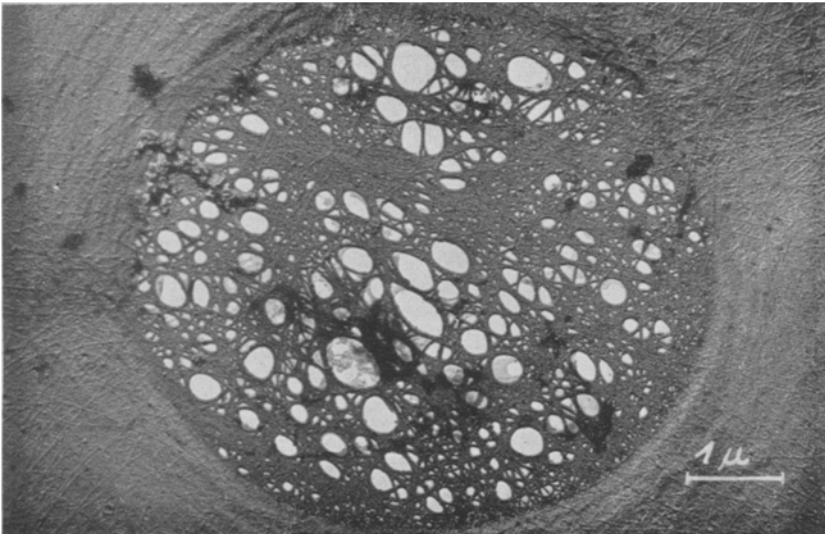


Abb. 11. Kiefernholzradialschnitt, 1 Std. mit Natriumchlorit delignifiziert, Hochvakuumkohledirektabdruck, palladiumbeschattet. Vergrößerung: 12500fach

mahlen. Abb. 5 zeigt einen $\frac{1}{2}$ Stunde lang gemahlten Fichtensulfitzellstoff mit 58° SR. Die Sekundärwand ist locker aufgeschüttelt, teilweise kommen Mikrofibrillenverbänderungen vor, jedoch überwiegt die individualisierte Mikrofibrille. Abb. 6 dagegen, die die Oberfläche eines 70 Min. lang gemahlten Kiefernulfatzellstoffes mit 59° SR wiedergibt, läßt gänzlich andere Verhältnisse erkennen. Durch die Seithaftung der verbänderten Mikrofibrillen mußte unter dem Druck des Mahlkörpers die Sekundärwand in viele Stränge in sich zusammenhaftender Mikrofibrillen aufgespalten werden. Dies erklärt in eindringlicher Weise die höhere Röschheit von Sulfatzellstoffen und die daraus resultierende längere Mahldauer zur Erreichung des gleichen Mahlgrades oder, anders ausgedrückt, die gegenüber Sulfitzellstoffen viel höhere Mahlresistenz der alkalisch aufgeschlossenen Zellstoffe. Der Sulfit-

zellstoff (Abb. 5) zeigte ein Wasserrückhaltevermögen (vgl. Höpner und andere¹⁶) von 346%, der Sulfatzellstoff (Abb. 6) bei praktisch gleichem Mahlgrad einen solchen von 210%.

Nach unserer Auffassung findet auch beim Schließen der Schließhaut eines Hoftüpfels eine Mikrofibrillenverbänderung statt. Abb. 7, aus der Veröffentlichung Jayme und Hunger²³ entnommen, zeigt einen unverschlossenen Hoftüpfel in einem weitgehend delignifizierten Fichtensulfatzellstoff. In Abb. 8 sind dagegen zwei geschlossene Hoftüpfel einer Fichtenholztracheide aus einem Fichtenholzradialschnitt wiedergegeben. Die inkrustierende Substanz, in die die Mikrofibrillen eingebettet sind, läßt wie in Abb. 1 die Lage dieser kleinsten Struktureinheiten kaum erkennen. Trotzdem läßt sich beim rechten Tüpfel die Zirkularstruktur der den Porus bildenden Mikrofibrillen ahnen.

Beim Schließen wird aus der Schließhautscheibe, die die Mikrofibrillen bilden, die Oberfläche einer Kalotte, das heißt, das in den Porus hineingerissene Fasergeflecht muß sich dehnen. Dieser Beanspruchung halten die radial einlaufenden Fibrillen meist stand, lagern sich jedoch zusammen und werden geradlinig gestreckt. Die zirkular verlaufenden Fibrillen, die augenscheinlich durch inkrustierende Substanzen miteinander verklebt sind (Abb. 8), reißen am Rande des Wulstes ab und werden in den Porus gedrängt.

Wie fest die Mikrofibrillen dort hineingedrückt werden, zeigt Abb. 9, die einen Blick vom Lumen her auf einen hereingedrückten Porus einer Fichtenholztracheide zeigt. Die von Meier² beschriebene warzig-glatte Struktur der Fichtenholztertiärlamelle ist zu erkennen. (Wiederum ist hier die große Porosität der inkrustierenden Schicht deutlich sichtbar.) Werden diese inkrustierenden Substanzen entfernt, wie z. B. bei Abb. 10 (in stärkerer Vergrößerung gezeigt) durch eine Sulfatkoehung (Kiefern-sulfatzellstoff, ungebleicht), so wird die über dem Wulst zusammengesobene Schließhaut sichtbar; über dem Porus jedoch ist sie durch die starke Dehnung der Fibrillen und der daraus resultierenden Ausrichtung dieser Fibrillen nach den Kraftkomponenten stark verbändert, wobei die netzartige und schon früher von uns²³ gezeigte Struktur auftritt. Schließlich zeigt Abb. 11 noch den geschlossenen Hoftüpfel einer Kiefernholztracheide, deren Lignin mit Natriumchlorit entfernt wurde. Auf dem Wulst hat diese Schließhaut die Schließung ohne bemerkenswerte Neuorientierung der Fibrillen überstanden, über dem Porus haben jedoch auch hier die Zugkräfte die Mikrofibrillen zusammengesoben und verbändert. Die durch die Entfernung der Begleitsubstanzen während des Aufschlusses *vorbereitete*, nach der Trocknung *eingetretene*, durch das Wasserrückhaltevermögen *meßbar* gewordene irreversible Verhornung ist hiermit auch *sichtbar* gemacht worden. Es handelt sich um eine *nachträgliche*, in der Pflanzenzelle ursprünglich nicht vorhandene Erscheinung.

Auffallend bei den Bildern der Hoftüpfelschließhäute ist noch das *Fehlen* eines bislang in der Zellmorphologie der Tracheiden als sicher angenommenen *Torus*, dessen Cellulose aus der Sekundärwand stammen soll. Das hier angewandte und im folgenden näher beschriebene Kohle-direktabdruckverfahren schließt einen Artefakt aus. Es soll vorläufig hier nur die Möglichkeit angedeutet werden, daß der Torus vielleicht nur den zentral zusammengezogenen, sehr stark mit Lignin inkrustierten Teil der Schließhaut darstellt, wofür obige Bilder und andere bisher



Abb. 12. Messingapparatur zur Abdrucknahme von Polystyrolabdrücken unter Vakuum.
Die Apparatur hat einen Durchmesser von 7 cm

unveröffentlichte unserer Untersuchungen sprechen. Ein endgültiges Urteil darüber aber möchten wir einer späteren Veröffentlichung vorbehalten.

Die Untersuchungsmethodik

Zur Objektpräparation für die Betrachtung im Zeißelektronenmikroskop EM 8/II kamen mehrere Verfahren zur Anwendung, die bei den Bildern jeweils vermerkt sind.

1. Der Polystyrol-Kohle-Doppelabdruck ohne Vakuum

$\frac{1}{2}$ mm dicke Polystyrolfolien, durch Ausgießen einer viskosen Lösung von Polystyrol in Trichloräthylen auf saubere Glasplatten — 1 Vol.-Teil Polystyrol III BASF mit 2 Vol.-Teilen Trichloräthylen in Lösung gebracht — und Verdunsten des Lösungsmittels erhalten, wurden auf den Zellstoff oder Holzschnitt mit 2 Metallplättchen und einer Schraubzwinde aufgepreßt und so bei 120° C im Trockenschrank der Abdruck auf Polystyrol gewonnen. Am Polystyrolabdruck haftende Fasern wurden in einer Mischung von 50 ml 38gew.-%iger Salzsäure und 5 ml konz. Schwefelsäure oder einfacher in 72gew.-%iger Schwefelsäure binnen 4 Stdn. abhydrolysiert und der Abdruck dann mit einem scharfen Wasserstrahl sauber gespült. Der Abdruck

wurde dann im Hochvakuum mit Platin oder Palladium schräg beschattet und anschließend nach der von *Bradley*²⁴ beschriebenen Methode mit Kohle senkrecht bedampft. Anschließend wurden Polystyrol und Aufdampffilme in kleine Stücke geschnitten, auf den Objektträger gebracht und diese auf einen flachen Metallkühler gelegt, der in ein Becherglas mit siedendem Benzol eingehängt wurde. Nach 1stünd. Extrahieren waren die Objekte frei von Polystyrol.

2. Der Polystyrol-Kohle-Doppelabdruck unter Vakuum

Wie schon von *Hunger* und *Jayme*²⁵ beschrieben, wird die Bildausbeute im Elektronenmikroskop beträchtlich erhöht und verfeinert, wenn der Polystyrolabdruck unter dem Vakuum einer Rotationsölpumpe vorgenommen wird. Abb. 12 zeigt die vom Werkmeister *H. Kunz* im Institut für Cellulosechemie dazu hergestellte Apparatur. Eine kurze, zentral durchbohrte und innen mit einem Gewinde versehene Messinghülse nimmt in einer Vertiefung von $\frac{1}{2}$ cm Tiefe und 4 cm Durchmesser eine entsprechende feinporige Glasfritte auf. Hinter der Glasfritte sitzt die Bohrung, in die ein Messingrohr eingelötet ist, das in den Vakuumschlauch geschoben wird. Das Objekt wird auf das gefrittete Glas aufgelegt, darauf kommt das Polystyrolscheibchen, darüber eine glatte Gummimembran aus Paragummi, darauf der Auflagering, der mit dem in die Hülse zu schraubenden Verschuß gegen die Gummimembran und den Hülsenboden drückt. Die zentrale Verschußscheibe kann in einem Gewinde mit einer Rändelmutter noch auf das Objekt aufgedrückt werden, wenn man den Abdruck unter mehr als einer Atmosphäre Überdruck vornehmen will. Über einen Dreiweghahn zum Lufteinlaß wird der Vakuumschlauch an eine mit Glycerin beschickte Waschflasche und von da zum Saugstutzen der Ölrotationspumpe geführt. Nachdem die Pumpe 5 Min. Luft und Dämpfe abgesaugt hat, wird die verschlossene Messingapparatur in 140° C heißes Glycerin getaucht und dort bis 5 Min. nach dem Aufhören des Durchganges von Blasen durch die Waschflasche belassen. Dann wird die Apparatur in kaltes Wasser eingehängt und nach weiteren 5 Min. das Vakuum aufgehoben. Die weitere Präparation erfolgt wie oben beschrieben.

3. Der Kohlehochvakuum-Direktabdruck

Die Umgehung des Doppelabdruckes und die Ersparung eines Abdruckes in eine hochpolymere Substanz (Polystyrol) mit der dieser anhaftenden Abdruckunschärfe muß die besten und artefaktfreiesten Objekte liefern. Auf diesem Gedanken fußend, entwickelten wir ein Verfahren, über das von dem einen von uns²⁶ bereits mündlich berichtet wurde. Der Zellstoff oder der Holzschnitt wurde im Hochvakuum wie unter 1 beschrieben, mit Schwermetall und Kohle bedampft, dann in dem unter 2 beschriebenen Apparat eine Polystyrolfolie unter Vakuum zur Stützung des Kohle-Metallfilmes auf die Kohleschicht aufgedrückt, die cellulosische Substanz in

²⁴ *D. E. Bradley*, Brit. J. Appl. Physics **5**, 60, 96 (1954).

²⁵ *G. Hunger* und *G. Jayme*, Naturwiss. **42**, 209 (1955).

²⁶ *G. Jayme*, Vortrag bei „Bleaching Symposium“, gehalten am 16. September 1955 in Appleton, Wisc.; ebenfalls erwähnt in Vorträgen am 3. Oktober 1955 in Shelton, Wash., und am 6. Oktober 1955 in Madison, Wisc., USA.

72gew.-%iger Schwefelsäure hydrolysiert, Ligninreste mit einem scharfen Wasserstrahl abgespritzt und dann wie unter 1 weiter verfahren. Ein sehr ähnliches Verfahren wurde gleichzeitig in Amerika von *Comer* und Mitarbeitern²⁷ entwickelt und beschrieben.

Die Aufnahmen wurden am Elektronenmikroskop EM 8/II der Fa. Carl Zeiß, Oberkochen, teils an dem hier im *Eduard-Zintl*-Institut befindlichen Gerät, teils mit freundlicher Erlaubnis der Fa. Carl Zeiß in deren Gastlabor in Oberkochen — wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken — angefertigt.

Zusammenfassung

Die im qualitativen Sinne schon lange bekannte, durch die Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens meßbar gewordene, beim Trocknen eintretende, von *Jayme* als irreversible Verhornung bezeichnete Veränderung von Zellstoffen ist nun elektronenoptisch sichtbar gemacht worden. Sie besteht in einer Verbänderung, also einer Zusammenlagerung der ursprünglich individualisierten kleinsten Strukturelemente der Cellulose, der Mikrofibrillen, zu größeren Einheiten, wodurch die dem Wasser zugängliche innere und äußere Oberfläche verringert wird.

In der verholzten pflanzlichen Zelle können sich die Mikrofibrillen, die im Innern aus nahezu reiner Cellulose bestehen, außen jedoch mit einer Schicht von Hemicellulosen überzogen sind, dort wo sie in ein ligninreiches inkrustierendes System eingebettet sind, nicht zu dickeren Strängen vereinigen. Man erkennt hier eine weitere Aufgabe, die der schützenden Ligninschicht im biologischen Sinne zufällt, nämlich die Verhinderung der Strangbildung. Diese kann jedoch dann eintreten, wenn die inkrustierenden Schichten ganz oder teilweise weggeräumt werden, z. B. beim chemischen Aufschluß oder bei der Bleiche. Von Dehnung und Schrumpfung begleitete Quellungs- und Entquellungs Vorgänge begünstigen ebenfalls die Bildung von Strängen und Bändern; hierauf beruht auch teilweise der bekannte große Unterschied im Verhalten von Sulfit- und Sulfatzellstoffen. Die viel höhere Mahlresistenz letzterer konnte ebenfalls elektronenoptisch als eine sich bis in die innersten Zellwandschichten hinein erstreckende Verbänderung der Mikrofibrillen sichtbar gemacht werden.

²⁷ *J. J. Comer, H. W. Stetson und S. C. Lyons, Tappi* 38, 620 (1955).