

结香纤维素与木素分布的显微激光拉曼光谱研究

张智衡¹, 马建锋¹, 许 凤^{1, 2*}

1. 北京林业大学材料科学与技术学院, 北京 100083
2. 齐齐哈尔大学轻工纺织学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要 显微激光拉曼光谱技术可以实现纤维素与木素在木材细胞壁中原位状态分布规律的观察研究。首先采用透射电子显微镜(TEM)研究了结香细胞壁的超微结构。进而采用显微激光拉曼光谱技术对细胞壁各层中纤维素与木素分布特点进行了原位分析测定, 拉曼图像及光谱分析结果表明, 纤维素与木素在细胞壁各形态区分布不均一, 纤维素的分布情况与木素相反。

关键词 结香; 超微结构; 显微激光拉曼光谱; 纤维素分布; 木素分布

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)04-1002-05

引言

细胞壁在植物生长、细胞分化、水分运输和植物体支撑防护中发挥着重要的作用, 是植物生长发展中心, 也是纺织、造纸、木材、胶片、生物乙醇等工业产品重要的原料^[1]。植物细胞壁由纤维素(占30%~50%)、半纤维素(占20%~35%)和木质素(占15%~25%)三种主要成分组成。纤维素、半纤维素及木素均是高分子化合物, 其中纤维素是由 β -D-葡萄糖基通过1,4-苷键联结而成的线性高分子均聚物, 在自然界中以高度结晶的纤维形式存在。半纤维素由非结晶的复合聚糖组成, 是多分枝的低分子聚合物。而木素是由苯丙烷结构单元通过醚键和碳-碳键联接而成的芳香族高分子化合物。纤维素、半纤维素及木素在细胞壁中分布规律不同, 纤维素构成细胞壁的骨架, 由一层层排列方向不同的微纤丝交错排列组成。半纤维素填充在微纤丝之间。木素是结壳物质, 将纤维素与半纤维素粘结在一起, 形成类似钢筋混泥土式坚实的细胞壁结构。植物细胞壁这种复杂的结构严重阻碍了木质纤维的利用效率, 比如, 木材细胞壁中纤维素化学结构紧密, 本身不易被打散, 且被半纤维素、木素环绕包围, 使得其水解/降解更加困难^[2]。对木质纤维细胞壁中木素与纤维素分布规律的研究, 不仅可为植物生理学提供理论依据, 还可解决生物质细胞壁组分难以高效分离及利用这一瓶颈问题, 对提高细胞壁组分的分离转化效率具有重要现实意义。

纤维素和木素在细胞壁中分布规律的研究主要采用电子显微镜结合能谱仪、荧光显微镜、及紫外显微镜等技术, 这些传统技术的主要缺点是样品制备繁琐、化学处理导致样品受到严重破坏, 无法获得纤维素与木素原位分布的信息。近年来, 随着激光、微信号检测及纳米技术的广泛应用, 显微激光拉曼光谱技术已广泛应用于材料科学、生物医学及药理学等领域。该技术的突出优点是样品制备无特殊要求, 直接通过光纤探头或玻璃、石英、光纤测量, 误差小, 能够提供快速、简单、可重复、且无损伤的定性定量分析^[3]。本研究在国内首次将显微拉曼光谱技术用于植物细胞壁主要组分分布规律的研究, 探讨纤维素和木素在纤维细胞壁中原位分布特点。

1 实验部分

1.1 原料

结香(*Daphne odora* Thunb.), 树高2米, 取自西北农林科技大学植物园, 选择有代表性的试样, 风干后人工切成4 cm长的小段, 煮沸1 h后在真空条件下存放于甘油-酒精(1:3)混合溶液中。

1.2 透射电子显微镜(TEM)法

选取代表性试样, 经脱水、浸透及包埋后, 在LEICA-UC6型超薄切片机上切片(厚度为90 nm), 将切片用高锰酸钾溶液染色1分钟、烘干后在日立H-7650透射电子显微镜

收稿日期: 2011-08-24, 修订日期: 2011-12-20

基金项目: 国家林业局(948)项目(2010-4-16), 教育部博士点基金项目(20100014110005), 北京林业大学创新计划项目(HJ2010-13)和黑龙江省杰出青年基金项目(JC200907)资助

作者简介: 张智衡, 1987年生, 北京林业大学材料科学与技术学院硕士研究生 e-mail: omentwdj@sina.com

* 通讯联系人 e-mail: xfx315@bjfu.edu.cn

上观察,加速电压 60 kV。

1.3 显微激光拉曼光谱测定

采用 Horiba Jobin Yvon 公司 XploRA 精巧型全自动显微共焦拉曼光谱仪,配备 Olympus BX51 共聚焦显微镜及三维微动平台,平台精度为 XY 轴(横向)扫描步长为 $0.1\ \mu\text{m}$, Z 轴(纵向)扫描步长为 $1\ \mu\text{m}$,激发波长为 532 nm,功率 8 mw,由 CCD 多通道探测。采用 100 倍物镜($\text{NA}=1.25$),拉曼光谱仪的空间分辨率理论计算值为 $0.26\ \mu\text{m}(0.61\lambda/\text{NA})$ 。将存放在甘油-酒精(1:3)混合溶液中的结香样品取出,用滑动式切片机将样品横切面切成厚度 $10\ \mu\text{m}$ 的切片,固定在载玻片上,置于拉曼显微镜下观察、测定。拉曼光谱测试范围为 $3\ 200\sim 300\ \text{cm}^{-1}$,用单晶硅的拉曼图谱($520.7\ \text{cm}^{-1}$)进行谱线校准。采用逐点扫描显微探针成像方法获取光谱数据集,扫描步长为 $0.4\ \mu\text{m}$,单点采集时间 6 s,狭缝宽度 $100\ \mu\text{m}$,孔隙大小为 $300\ \mu\text{m}$ 。计算机控制平台的同步移动、数据采集和数据处理。

2 结果与讨论

2.1 结香的超微结构

结香,别名“黄花结香”,系瑞香科结香属植物,高 1~2

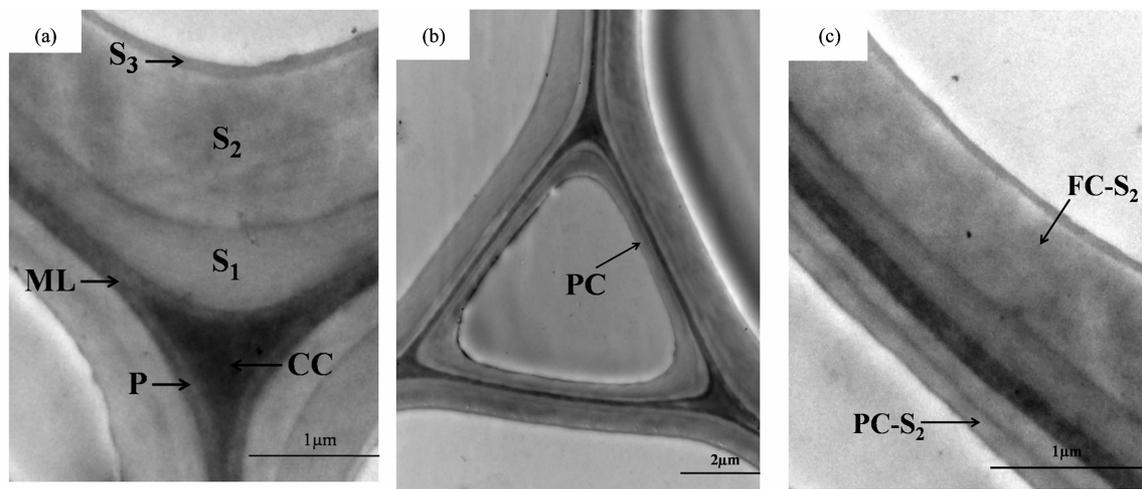


Fig. 1 TEM images of fiber and parenchyma cells

(a): Transverse section through a corner region between adjoining fibers; (b): Transverse section of a parenchyma cell; (c): Transverse section of parenchyma and fiber cell walls. This high magnification micrograph shows the thickness of the S_2 layer of parenchyma and fiber cell walls to be distinctly different (PC is for parenchyma cells and FC is for fiber cells)

2.2 拉曼光谱分析

2.2.1 结香纤维细胞 S_2 层平均拉曼光谱

图 2 为纤维细胞 S_2 层的平均拉曼光谱,信号峰的归属见表 1^[5-9]。图 2 中纤维素的主要特征峰为 $2\ 897, 1\ 121, 1\ 098, 378\ \text{cm}^{-1}$;木素的主要特征峰为 $1\ 650$ 和 $1\ 605\ \text{cm}^{-1}$ 。拉曼位移 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 归属为松柏醇/紫丁香醇和松柏醛/紫丁香醛结构, $1\ 605\ \text{cm}^{-1}$ 处木素峰最强,归属于苯环的对称伸缩振动。 $2\ 897\ \text{cm}^{-1}$ 峰产生于纤维素 C—H 及 CH_2 的伸缩振动。 $1\ 121\ \text{cm}^{-1}$ 峰归属于纤维素 C—O—C 糖苷键的对称伸缩振动和 C—O—C 环呼吸振动,而 $1\ 098\ \text{cm}^{-1}$ 是纤维素 C—

m,其花蕾、茎皮和根皮均可入药,具有良好的经济价值。结香茎皮中含有大量纤维(含量约 46.45%),国内外对结香的研究主要集中于制浆造纸、纤维素生产、及制备活性炭等^[4],而对其纤维细胞壁超微结构的研究未见报道。

在透射电子显微镜下观察发现,结香纤维细胞的细胞壁较薄,早晚材无明显界限。图 1(a)是结香纤维横切面的 TEM 图像,由图可知,结香纤维细胞壁为层状结构,分层现象明显,由外至内分为胞间层(ML)、初生壁(P)及次生壁(S)三层。在相邻两个细胞之间存在一个共同的胞间层,壁层很薄并且与两个细胞的初生壁紧密连接,由于初生壁也很薄,很难将其分开,相邻两个细胞的 P 层及共有的 ML 层构成了复合胞间层(CML)。在 3 个或 4 个细胞之间存在一个共有的区域—细胞角隅区(CC)。次生壁在 P 层内侧,由外至内又可分为次生壁外层(S_1)、次生壁中层(S_2)及次生壁内层(S_3)。与 P 层相比, S_1 层较厚,而 S_2 层最厚,占据了细胞壁大部分的体积。 S_3 层很薄,且与细胞腔相连。图 1(b)比较了纤维细胞与薄壁细胞的超微结构特点,从图中可以看出,中间三角形的细胞为薄壁细胞,其细胞体积比邻近的纤维细胞小,在高分辨率的 TEM 图 1(c)中可以明显看出,与薄壁细胞 S_2 层相比,纤维细胞 S_2 层厚很多,约为薄壁细胞 S_2 层厚度的 4 倍。

O—C 糖苷键的非对称伸缩振动峰。 $378\ \text{cm}^{-1}$ 归属于纤维素 β -D 葡萄糖苷键。

2.2.2 纤维素分布的显微拉曼成像

在显微镜下选择结香纤维横切面上有代表性的区域,对选定区域中每一点进行扫描获取拉曼光谱,以获得纤维素与木素分布的拉曼图像。由于在 $2\ 897\ \text{cm}^{-1}$ 纤维素的拉曼光谱图信噪比大,可以获得清晰的纤维素分布图像^[10],因此本研究以波数 $2\ 897\ \text{cm}^{-1}$ ($3\ 045\sim 2\ 773\ \text{cm}^{-1}$) 峰强变化分布作图,用 C—H 及 C— H_2 伸缩振动的空间分布规律,来表明纤维细胞中纤维素的化学分布。

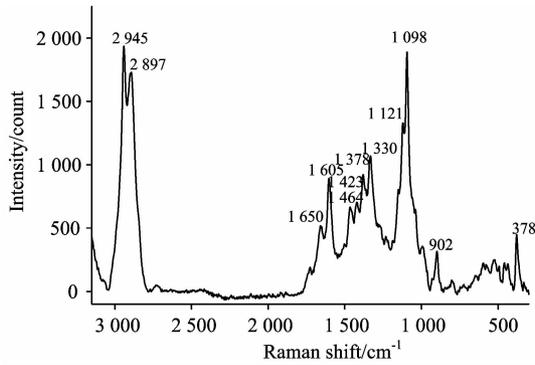


Fig. 2 Raman spectrum of S_2 in cross section of *Daphne odora* Thunb. fiber cells

图 3 是结香纤维细胞中纤维素的分布图像, 图中可以清晰的观察到纤维素在 S_2 层的分布拉曼信号强度最强, 表明次生壁 S_2 层纤维素浓度最高. CC 处纤维素拉曼信号最弱,

表明该区域纤维素浓度最低. 纤维素在选定区域中相邻的两个 CC 处分布规律相似. CML 中纤维素的拉曼信号强度有明显的差异, 可能是由于结香的细胞壁很薄, CML 的厚度只有 $0.5 \mu\text{m}$, 而拉曼光谱仪的横向分辨率为 $1 \mu\text{m}$, 导致 ML 中纤维素的部分拉曼信号被 S_2 层中较强的纤维素拉曼信号所覆盖, 所以产生了信号强度的差异. 另外, 纤维素分子在不同细胞层中分子取向不同, 也会使纤维素的拉曼信号强度产生差异. 图 3 中处于水平方向的 S_2 层中纤维素的拉曼信号强度明显高于垂直方向, 根据推测可能是由于纤维细胞 S_2 层中, 微纤丝的方向主要平行于纤维细胞轴的方向, 在 2897 cm^{-1} 峰是纤维素分子中亚甲基的 C—H 键伸缩振动所引起的, 而且 C—H 键的振动方向与纤维素分子链的方向垂直, 与入射光的电矢量方向平行, 从而使拉曼信号强度增强^[11]. 图 3 中星号标记区域纤维素拉曼信号强度与其下方标记箭头处拉曼信号强度有明显差异, 可能是样品制备过程中切片表面不平整引起的^[10].

Table 1 Assignment of Raman bands in the average spectra of the fiber S_2

Frequency/ cm^{-1}	Component	Assignment
2 945	Lignin and Glucomannan	C—H stretching in OCH_3 asymmetric
2 897	Cellulose	C—H and CH_2 stretching
1 650	Lignin	Ring conjugated C=C stretching of coniferyl/sinapyl alcohol; C=O stretching of coniferaldehyde/sinapaldehyde
1 605	Lignin	Aryl ring stretching symmetric.
1 464	Lignin and Cellulose	HCH and HOC bending
1 423	Lignin	O— CH_3 deformation; CH_2 scissoring; guaiacyl ring vibration
1 378	Cellulose	HCC, HCO and HOC bending
1 330	Lignin	Aryl-OH or aryl-O— CH_3 vibration
1 121	Cellulose, Xylan, and Glucomannan	Heavy atom (CC and CO) stretching
1 098	Cellulose, Xylan, and Glucomannan	Heavy atom (CC and CO) stretching
902	Cellulose	Heavy atom (CC and CO) stretching
378	Cellulose	β -D-glucosides

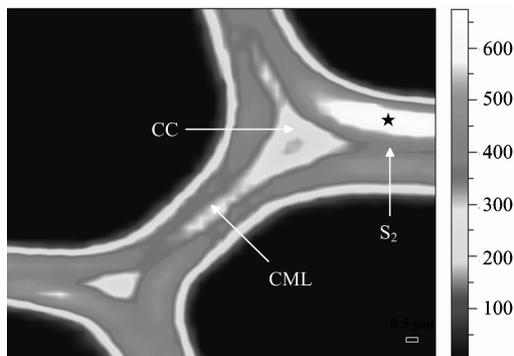


Fig. 3 Raman image showing the cellulose distribution in fibers (scale bar: $0.5 \mu\text{m}$). Cellulose distribution in morphologically distinct regions of fibers, $3045 \sim 2773 \text{ cm}^{-1}$

2.2.3 木素分布的显微拉曼成像

木素拉曼光谱中最强的两个特征峰分别为 1650 和 1605 cm^{-1} , 因此可选择谱线范围 $1712 \sim 1519 \text{ cm}^{-1}$ 进行拉

曼成像. 由图 4 可见, CC 处拉曼信号最强, 表明该层中木素浓度最高. CML 木素拉曼信号强度略低于 CC, 由于拉曼光谱仪的横向分辨率 $1 \mu\text{m}$, 而结香的细胞壁很薄, CML 厚度

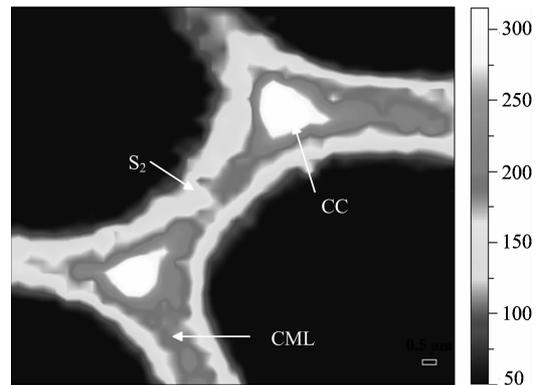


Fig. 4 Raman image showing the lignin distribution in fibers (scale bar: $0.5 \mu\text{m}$). Lignin distribution in morphologically distinct regions of fibers, $1712 \sim 1519 \text{ cm}^{-1}$

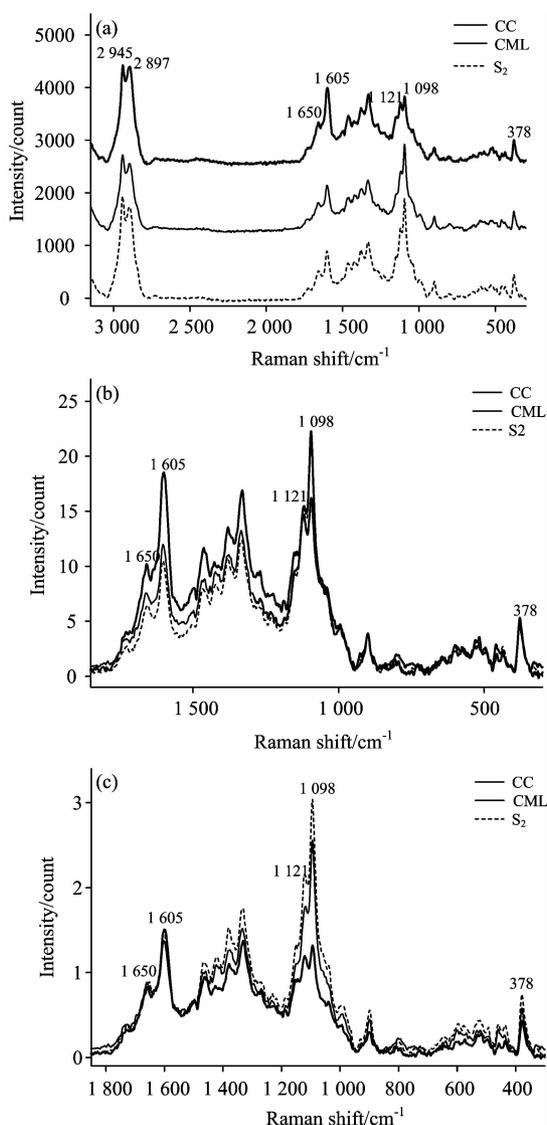


Fig. 5 Average Raman spectra of *Daphne odora* Thunb. after baseline correction

(a): Average Raman spectra of the CC, CML and S_2 of fiber cells;
 (b) and (c): Comparison of the average Raman spectra of the CC, CML and S_2 and zoom into the dominating bands

References

- [1] WU Fen, ZOU Ye-mao, LONG Song-hua(吴芬, 邹叶茂, 龙松华). Hunan Agricultural Sciences(湖南农业科学), 2010, (5): 14.
- [2] LOU Hong-ming, QIU Xue-qing, YANG Dong-jie, et al(楼宏铭, 邱学青, 杨东杰, 等). Journal of South China University of Technology(华南理工大学学报), 2002, 30(1): 48.
- [3] Schmitt M, Popp J. Journal of Raman Spectroscopy, 2006, 37(1-3): 20.
- [4] YAN Ji-zhong, TONG Sheng-qiang, CHU Jian-jun, et al(颜继忠, 童胜强, 褚建军, 等). Zhejiang Chemical Industry(浙江化工), 2003, 34(8): 1.
- [5] Agarwal U P. Advances in Lignocellulosics Characterization. Atlanta: TAPPI Press, 1999, 209.
- [6] Agarwal U P, Ralph S A. Holzforschung, 2008, 62(6): 667.
- [7] Agarwal U P, Ralph S A. Applied Spectroscopy, 1997, 51(11): 1648.
- [8] Edwards H G, Farwell M D W, Webster D. Spectrochim. Acta Part A, 1997, 53(13): 2383.
- [9] Wiley J H, Atalla R H. Carbohydrate Research, 1987, 160(15): 113.
- [10] Agarwal U P. Planta, 2006, 224(5): 1141.

只有 $0.5 \mu\text{m}$, 因此 CML 中木素的浓度可能包括了多个细胞壁层: ML, P, S_1 和 S_2 。 S_2 层及 $S_2 \sim S_3$ 层木素拉曼信号强度相对于 CML 低, 表明其木素浓度低。木素在各形态区的拉曼成像表明, 木素浓度分布具有明显的不均一性, CC 处木素浓度最高, 其次是 CML, 而 S_2 层木素浓度最低。

2.2.4 不同形态区拉曼光谱分析

图 5(a) 为三个不同形态区: CC, CML 及 S_2 的平均光谱图, 谱线范围为 $3200 \sim 300 \text{ cm}^{-1}$ 。图中, $2975 \sim 2840 \text{ cm}^{-1}$ 峰归属于 C—H 和 CH_2 伸缩振动, 在 CC 和 CML 中, 特征峰 2945 cm^{-1} 主要是木素中甲氧基的 C—H 键的伸缩振动, 而在 S_2 层中, 特征峰 2945 cm^{-1} 主要是纤维素中 C—H 键和 CH_2 的伸缩振动。图 5(a) 经谱线分析处理得到图 5(b) 和图 5(c)。比较图 5(b) 中 1650 和 1605 cm^{-1} 峰强, 可以发现 CC 处木素的拉曼信号最强, 而 S_2 层木素的拉曼信号最弱, 表明在 CC 处木素浓度最高, 而 S_2 层中木素的浓度最低。 1121 和 1098 cm^{-1} 处的特征峰分别由纤维素糖苷键 C—O—C 的对称伸缩振动和非对称伸缩振动产生, 在 CML 和 S_2 层中这两个特征峰强度均高于 CC 处[图 5(c)], 说明在 CC 处纤维素的浓度最低。

3 结论

采用透射电子显微技术确定了结香纤维细胞壁的超微结构, 结果表明结香纤维细胞壁分层明显, 由外至内分为胞间层(ML)、初生壁(P)及次生壁(S)三层, 次生壁又分为次生壁外层(S_1)、次生壁中层(S_2)及次生壁内层(S_3)。采用显微激光拉曼光谱技术研究表明, 结香纤维细胞壁不同形态区中纤维素及木素的分布具有不均一性。拉曼光谱及显微拉曼图像显示, CC 处木素浓度最高, CML 中浓度较低, S_2 层中浓度最低。纤维素的分布情况与木素相反, S_2 层中纤维素浓度最高, 其次是 CML, CC 中浓度最低。研究表明激光显微拉曼光谱能够提供植物细胞壁中主要组分纤维素与木素的原位分布信息, 在脱木素化学及生物乙醇转化等研究领域具有重要的应用前景。

[11] Agarwal U P. *Planta*, 1986, 169(3): 325.

Confocal Raman Microspectroscopy Study on the Distribution of Cellulose and Lignin in *Daphne odora* Thunb.

ZHANG Zhi-heng¹, MA Jian-feng¹, XU Feng^{1, 2*}

1. School of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. School of Light and Textile Industry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

Abstract Confocal Raman microspectroscopy is well suited to investigating cellulose and lignin distribution *in-situ* in the native cell walls of woody tissue. In this study, transmission electron microscopy (TEM) was used to determine the ultrastructure of *Daphne odora* Thunb.. In the TEM images, cell wall of *Daphne odora* Thunb. is typically divided into three layers: middle lamellar (ML), primary wall (P) and secondary wall (S₁, S₂ and S₃). More detailed information about cellulose and lignin distribution in different cell wall layers was analyzed in situ by confocal Raman microspectroscopy. Raman spectra and images reveal that the distribution of cellulose and lignin in the cell wall layers is not uniform. Lignin concentration in different morphological areas follows the decreasing order: the cell corner (CC) > the middle lamellar (CML) > the secondary wall (S₂). In contrast, cellulose distribution shows the opposite pattern—low concentration in CC and CML and high in S₂ regions.

Keywords *Daphne odora* Thunb. ; Ultrastructure; Raman microspectroscopy; Cellulose distribution; Lignin distribution

(Received Aug. 24, 2011; accepted Dec. 20, 2011)

* Corresponding author