

FTIR 显微成像表征碱处理后玉米秸秆木质素含量及分布

杨增玲, 杜书荣, 梅佳琪, 李骏宝, 刘二伟, 韩鲁佳^{*}

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 探究木质素原位表征方法, 能为研究农作物秸秆去木质化过程中木质素变化规律提供帮助。该研究以玉米秸秆为原料, 碱处理玉米秸秆横切片后进行傅里叶变换红外 (Fourier transform infrared, FTIR) 显微成像, 并结合快速非负最小二乘 (fast non-negativity-constrained least squares, fast NNLS) 拟合算法计算组织中木质素的分布。结果显示: 1) FTIR 显微图像结合 fast NNLS 算法可对组织中的木质素进行定位及定量分析。如拟合计算得到, 原样组织薄壁细胞中木质素质量分数为 7.7%, 碱处理 5、30、60 min 后下降至 6.0%、4.8%、3.5%; 2) 基于 fast NNLS 拟合计算的组织中木质素变化趋势同试验测定的木质素变化趋势一致。研究结果表明, 基于 FTIR 显微成像的表征方法可用于原位分析碱处理过程中秸秆组织的木质素分布及含量变化, 实现介观尺度研究秸秆木质素降解规律。

关键词: 秸秆; 木质素; 图像处理; FTIR 显微成像; 碱处理;

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.08.033

中图分类号: S216.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2019)-08-0280-07

杨增玲, 杜书荣, 梅佳琪, 李骏宝, 刘二伟, 韩鲁佳. FTIR 显微成像表征碱处理后玉米秸秆木质素含量及分布[J]. 农业工程学报, 2019, 35(8): 280—286. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.08.033 http://www.tcsae.org

Yang Zengling, Du Shurong, Mei Jiaqi, Li Junbao, Liu Erwei, Han Lujia. Lignin content and distribution in alkali pretreated corn straw based on Fourier transform infrared microspectroscopic imaging[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, 35(8): 280—286. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.08.033 http://www.tcsae.org

0 引言

木质素是一种非线性芳香族聚合物, 是由羟基或甲氧基取代的苯丙烷单体无序聚合而成的三维复杂结构, 储量仅次于纤维素。木质素是植物细胞壁的主要组成成分之一, 为植物提供足够的强度和硬度, 同时避免生物侵害和水的侵蚀。农作物秸秆等生物质资源的木质素含量及分布直接影响其转化利用效率。因此, 探究木质素原位表征方法, 对研究农作物秸秆去木质化过程中木质素的分布及变化规律有重要意义^[1-5]。

近年来对植物组织的木质化过程和去木质化反应的研究受到学者们广泛关注, 目前已有大量研究采用传统的湿化学分析法对反应后木质素的去除进行了测定^[6-8]。在木质素定位研究中, 使用的方法主要包括组织染色法^[9-10]、荧光显微技术^[11]和共聚焦拉曼显微技术^[12]等。也有学者利用光谱^[5,13-14]、电镜结合能谱^[15-16]等技术对木质素进行半定量分析。随着现代分析仪器的的发展, 已经有学者探索开发了植物不同部位组分分布原位表征手段^[17-18], 傅里叶变换红外 (FTIR) 显微成像技术^[19-20]便是其中之一。

FTIR 显微成像技术将基于红外光谱的秸秆组分原位

分析与基于显微镜技术的直观成像相结合, 不仅能提供具有丰富空间和化学信息的图像, 而且还能提供精确到微米级微区的具有指纹特性的红外光谱信息。Dokken 等^[21]使用 FTIR 显微成像研究了向日葵和玉米根不同部位脂质、蛋白质、纤维素、木质素和碳水化合物空间分布信息。Gorzsás 等^[22]以欧洲山杨树和拟南芥木质部为研究对象, 利用 FTIR 显微红外结合隐变量正交投影判别法对植物器官进行了化学表征。Yang 等^[23]使用 FTIR 显微成像结合快速非负最小二乘 (fast NNLS) 算法探究了表征小麦不同生长期秸秆组分分布及变化规律的可行性。以上研究均取得了较理想的效果。但尚未检索到对预处理过程中秸秆不同组织的木质素变化进行表征的研究。秸秆组分复杂且各组织具有不同的生物特性, 使得木质素在不同组织中的含量不均匀, 预处理过程中各个组织的木质素降解率可能也会存在差异, 但传统湿化学分析方法仅能测定木质素的平均去除率, 如文献^[24]指出, 碱处理可以去除 85% 的木质素, 是一种有效去除木质素的化学预处理方式。研究预处理过程中表皮、维管束及薄壁细胞等不同组织木质素去除过程的差异可以为秸秆转化利用和预处理作用机理探究提供帮助。本文以碱处理为例, 拟探究碱处理过程中秸秆不同组织中木质素变化的表征方法。

本研究以玉米秸秆为对象, 探索 FTIR 显微成像技术表征玉米秸秆碱处理过程中不同组织木质素分布和含量变化的可行性。

1 材料与方法

1.1 样品采集与制备

本试验中使用的玉米秸秆为拔节期新鲜玉米秸秆,

收稿日期: 2019-01-09 修订日期: 2019-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(31471407); 教育部创新团队计划(IRT_17R105)

作者简介: 杨增玲, 教授, 博士生导师, 教育部新世纪优秀人才, 主要从事光谱、显微光谱和光谱成像技术在农业中的应用研究。

Email: yangzengling@cau.edu.cn

*通信作者: 韩鲁佳, 教授, 博士生导师, 长江学者特聘教授, 主要从事农业生物质工程研究资源开发与利用和农产品加工工程方向的研究。

Email: hanlj@cau.edu.cn

于 2018 年 7 月底取自中国农业大学上庄试验站。在每根新鲜秸秆地面以上第 6 节间中部位置连续取厚度约为 0.5 cm 的 2 个茎段, 共取 4 个茎段置于福尔马林-乙酸-乙醇 (formalin-aceto-alcohol, FAA) 固定剂中固定 24 h 以上。其中 1 个茎段直接采用石蜡包埋^[25]作为碱处理前的对照组样品; 另外 3 个使用去离子水清洗后于 100 °C 预热, 然后加入约 3 倍样品体积已预热的 2% NaOH 溶液, 在 100 °C 反应 5、30、60 min 时取出对应样品, 用去离子水清洗, 最后进行石蜡包埋。包埋后的样品用切片机 (ESM-150S, ERMA, 日本) 切取厚度约为 18 μm 的切片, 置于 ZnS 玻片上, 用于 FTIR 显微成像分析。取整株新鲜玉米秸秆地面以上至穗以下部分, 切成 1~2 mm 薄片, 混合均匀并同样固定 24 h 以上。清洗干燥后分成 4 份, 取 1 份原样作为对照组, 将另 3 份进行与茎段一样的碱处理。然后按照石蜡包埋中脱水透明过程对 4 份样品分别进行脱水透明和逆脱水透明, 清洗干燥后粉碎过 0.069 mm 筛, 按照 NREL/TP-510-42618^[26]标准测定木质纤维成分。

此外, 为后续数据分析, 需获得玉米秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的纯组分红外光谱作为参考光谱。将新鲜玉米秸秆自然风干后粉碎并过 0.069 mm 筛, 取筛下样品按照参考文献[27-28]中的方法, 提取玉米秸秆中的纤维素和磨木木质素。半纤维素主要成分为木聚糖, 以购买于 Sigma-Aldrich (美国) 的木聚糖代替半纤维素获取纯组分光谱。

1.2 数据获取

采用傅里叶变换红外显微成像系统 (Spotlight 400, PerkinElmer, 英国) 采集置于 ZnS 玻片上的样品的 FTIR 显微图像。该系统采用液氮冷却的碲镉汞 (MCT) 阵列检测器, 图像采集参数为: 图像空间分辨率 6.25 μm×6.25 μm、波长范围 4 000~750 cm⁻¹、光谱分辨率 4 cm⁻¹、扫描次数 8。

提取的玉米秸秆纤维素、磨木木质素及木聚糖采用傅里叶变换红外光谱仪 (Spectrum 400, PerkinElmer, 英国) 在透射模式下获取光谱。将提取的纤维素、木质素和木聚糖按质量比 1: 100 分别与 KBr 混合, 取大约 1 mg 制作 KBr 压片。红外光谱获取参数为: 光谱范围 4 000~750 cm⁻¹、光谱分辨率 4 cm⁻¹、扫描次数 32。

1.3 数据分析与处理

1.3.1 数据预处理

对 FTIR 显微图像, 首先利用局部阈值法进行二值化, 将前景 (样品图像) 信息赋值为 1, 背景信息赋值为 0, 从而消除背景对后续数据处理的影响; 然后, 选取 1 800~800 cm⁻¹ 光谱范围的矩阵数据进行分析, 并对选取的光谱数据进行 Savitzky-Golay 卷积 5 点平滑、标准正态变换 (SNV) 和 Whittaker 自动滤波基线校正等光谱预处理, 从而消除光谱的基线漂移现象。

相同的, 对玉米秸秆纤维素、木质素及木聚糖的红外光谱, 也是在 1 800~800 cm⁻¹ 光谱范围内进行与 FTIR 显微图像光谱相同的光谱预处理。

1.3.2 快速非负最小二乘拟合

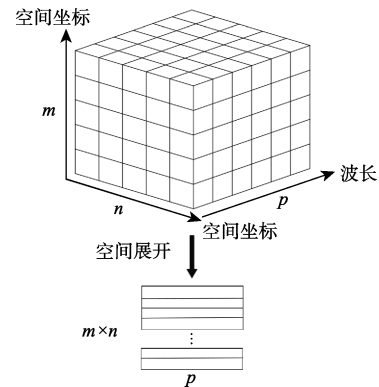
考虑到各组分光谱有重叠, 通过单一特征峰高或

峰面积成像很可能受到其他组分的干扰, 因此本研究采用快速非负最小二乘 (fast NNLS) 拟合算法, 获取木质素的分布信息。

NNLS 算法是一种基于朗伯-比尔定律的多变量计算方法。FTIR 原始图像数据可以视为 $m \times n \times p$ 的立方体, 其中 m 和 n 为空间坐标, p 为波长, 如图 1 所示。其中每个像素点的光谱被记录为一个行向量, 依像素点顺序展开后的 FTIR 图像数据被记作:

$$\begin{aligned} X_{(m \times n) \times p} &= Z_{(m \times n) \times k} S_{k \times p}^T + E_{(m \times n) \times p} \\ X_{m \times n, k} &\geq 0, S_{k, p} \geq 0 \end{aligned} \quad (1)$$

式中 X 为 $(m \times n) \times p$ 原始图像数据矩阵, k 是组分个数, Z 为 $(m \times n) \times k$ 系数矩阵, S^T 是 $k \times p$ 阶纯组分光谱矩阵, E 是 $(m \times n) \times p$ 误差矩阵。



注: m 和 n 为空间坐标, p 为波长。

Note: m and n are spatial positions, p is wavelength.

图 1 FTIR 数据结构示意图^[23]

Fig.1 Data structure of FTIR microspectroscopic image^[23]

在 NNLS 算法基础上, Bro 等^[29]于 1997 年提出了基于三线平行因子分解模型 (three-way PARAFAC model) 的快速非负最小二乘算法 (fast NNLS), 以解决 NNLS 因计算量大故而耗时的缺陷。其算法公式如下:

$$\begin{aligned} x_{mnp} &= \sum_{i=1}^k a_{mi} b_{ni} c_{pi} + e_{mnp} \\ a_{mi} &\geq 0, b_{ni} \geq 0, c_{pi} \geq 0 \end{aligned} \quad (2)$$

式中 x_{mnp} 表示矩阵 X 的第 m 行, 第 n 列, 第 p 层元素。载荷矩阵 A 的第 m 行, 第 i 列记为 a_{mi} 。同理, 第 2 和第 3 载荷矩阵 B 、 C 的元素被记作 b_{ni} 和 c_{pi} 。 e_{mnp} 是矩阵 X 第 $m \times n \times p$ 个元素的残差。在上式分解中, 须令待分析组分个数等于 k 。计算中, 载荷矩阵 A 、 B 和 C 的计算参照条件最小二乘问题, 迭代而得。

目标组分在每个像素点的浓度占比 $Z_a\%$ 由公式 (3) 计算得到

$$Z_a\% = \frac{Z_a}{\sum_{i=1}^k Z_i} \quad (3)$$

式中 $Z_a\%$ 为像素点目标组分的浓度占比, Z_a 为公式 (1)、

(2) 计算出的像素点目标组分浓度, $\sum_{i=1}^k Z_i$ 为像素点 k 个组分浓度的总和。

为使碱处理不同时间后的样品间具有可比性, 对 $Z_a\%$

进行校正。 $w\%$ 是样品纤维素、半纤维素和木质素 3 种组分的化学校正值总和（等于试验测定的样品 3 种组分总和与对应碱处理固体回收率的乘积）。按公式（4）计算

$$(Z_a \%)_{cal} = Z_a \% \times w\% \tag{4}$$

1.3.3 组织提取

为表征碱处理前后各组织中木质素的变化，本研究结合可见光图像及其RGB/HSV/Lab多空间分量与光谱预处理后的显微红外平均吸光度图像，利用K均值聚类算法提取表皮、维管束和薄壁细胞等组织。

1.3.4 数据处理软件

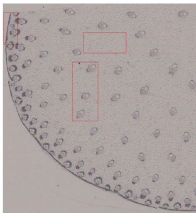
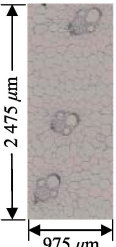
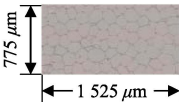
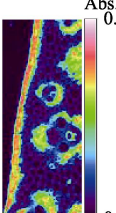
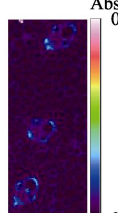
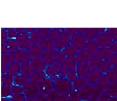
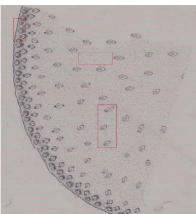
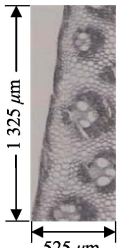
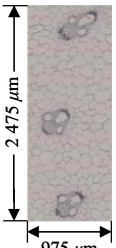
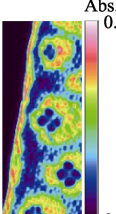
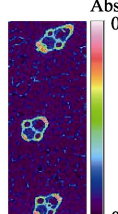
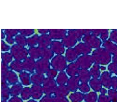
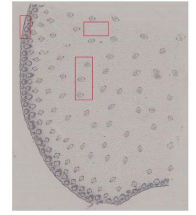
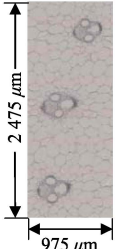
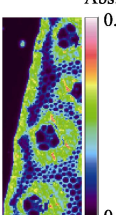
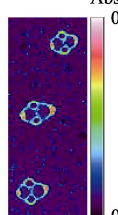
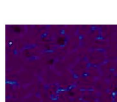
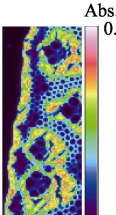
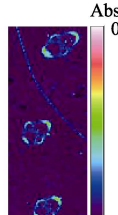
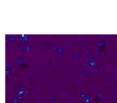
上述除对 $Z_a \%$ 的校正外所有数据处理均在试验室自编的MATLAB GUI软件^[30]中实现。为便于比较，将上述处理得到的FTIR显微图像矩阵进行最大最小值归一化，将图像矩阵调整至[0,1]。

2 结果与讨论

2.1 样品可见光图像和FTIR显微图像

由傅里叶变换红外（FTIR）显微成像系统获取的碱处理前后样品的可见光图像和FTIR平均吸光度显微图像（原始图像）如表 1 所示。为防止扫描位置影响试验结果，扫描前选取位置相似的切片，并在切片上选取相近位置和相同面积（表皮 1 325 $\mu\text{m} \times 525 \mu\text{m}$ 、维管束 2 475 $\mu\text{m} \times 975 \mu\text{m}$ 、薄壁细胞 1 525 $\mu\text{m} \times 775 \mu\text{m}$ ）的区域采集红外显微图像。受样品中杂质的影响，样品显微图像中存在异常点，当有些异常点红外响应值较大时，局部阈值法提取的前景中会包括异常点，需手动去除非样品部分或样品因受污染而出现的异常点。选取的扫描区域中样品结构应清晰可辨，以保证提取前景时完整保留所有结构信息。

表 1 样品可见光图像及 FTIR 平均吸光度显微图像
Table 1 Visible images and FTIR average absorbance microspectroscopic images

样品 Sample	扫描区域 Scanning area	样品可见光图像 Visible image of sample			FTIR平均吸光度显微图像 FTIR average absorbance microspectroscopic images		
原样 Origin		 1 325 μm 525 μm	 2 475 μm 975 μm	 775 μm 1 525 μm	 Abs. 0.544 0	 Abs. 0.893 0	 Abs. 0.288 0
			 1 325 μm 525 μm	 2 475 μm 975 μm	 Abs. 0.597 0	 Abs. 0.476 0	 Abs. 0.214 0
			 1 325 μm 525 μm	 2 475 μm 975 μm	 Abs. 0.611 0	 Abs. 0.387 0	 Abs. 0.443 0
			 1 325 μm 525 μm	 2 475 μm 975 μm	 Abs. 0.568 0	 Abs. 0.489 0	 Abs. 0.289 0

注：样品可见光图像从左到右依次为含表皮区域、维管束区域和薄壁细胞区域，平均吸光度显微图像与可见光图像对应；由上至下依次为玉米秸秆原样、碱处理 5 min、碱处理 30 min 和碱处理 60 min。Abs. 为吸光度。
Note: The visible images of the samples contain the epidermis area, vascular bundle and parenchyma cell from left to right. The average absorbance microscopic images correspond to the visible image. From top to bottom, they are raw samples of corn stover, alkali pretreated by 5 min, alkali pretreated by 30 min and alkali pretreated by 60 min. Abs. is absorbance.

2.2 3 组分傅里叶变换红外光谱图

图 2 是截取的纤维素、木聚糖代表的半纤维素和木质素 3 种组分在 1 800~800 cm⁻¹ 范围的傅里叶变换红外光谱图, 3 种组分在此范围内的红外光谱主要吸收峰如图 2 所示。表 2 所示是纤维素、半纤维素和木质素红外光谱图中不同位置的吸收峰对应的官能团归属。由图 2 可知, 纤维素、半纤维素和木质素很多谱带相互重叠, 仅 1 432 和 1 514 cm⁻¹ 处的吸收峰受其他物质吸收峰的干扰较小, 可分别作为纤维素和木质素的特征峰, 而半纤维素不存在不受干扰的特征峰, 本文采用快速非负最小二乘 (fast NNLS) 拟合算法避免了各组分光谱特征峰相互影响的问题。

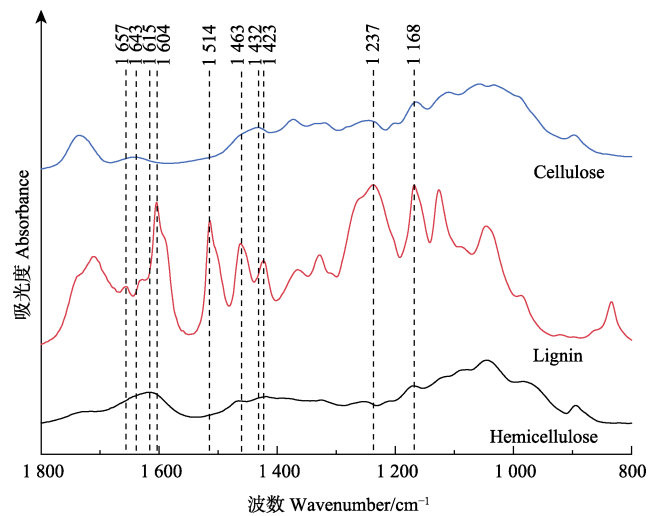


图 2 纤维素、半纤维素和木质素傅里叶变换红外光谱图
Fig.2 Fourier transform infrared absorbance spectra for cellulose, heimicellulose and lignin

表 2 1 800~800 cm⁻¹ 傅里叶变换红外光谱特征峰归属
Table 2 Characteristics bands of Fourier transform infrared absorbance spectra in range of 1 800-800 cm⁻¹

吸收峰位置 Absorption peak band/cm ⁻¹	特征峰归属 Band interpretation
1 657	共轭羰基 C=O 伸缩振动 (木质素)
1 643	O-H 弯曲振动 (纤维素)
1 615	O-H 弯曲振动 (半纤维素)
1 604	芳香环骨架振动与 C=O 伸缩振动 (木质素)
1 514	芳香环骨架伸缩振动 (木质素)
1 463	甲基和亚甲基中 C-H 的反对称弯曲振动 (木质素)、纤维素肩峰
1 432	C-H 反对称变形振动 (纤维素)
1 423	芳香环骨架振动结合 C-H 面内变形振动 (木质素) C-H 变形 (半纤维素)
1 237	C-C C-O C=O 伸缩振动 (木质素)
1 168	β-1,4 糖苷键上 C-O-C 反对称伸缩振动 (纤维素) 酯键 C-O-C 不对称伸缩振动 (木质素)

2.3 组织提取结果

由 *K* 均值聚类算法提取的原样及碱处理样品的表皮、维管束和薄壁细胞等组织如图 3 所示。表皮、维管束和薄壁细胞 3 种组织分别由表 1 中 3 列样品可见光图像及其对应的 FTIR 平均吸光度显微图像从左至右依次对应提取得到。组织提取时先将可见光图像分解成 RGB/HSV/Lab 多空间分量, 选取组织结构明晰、冗杂信息少的分量与可见光图像和光谱预处理后的 FTIR 显微图像进行融合, 从而突显不同组织的结构特征, 继而利用 *K* 均值聚类算法提取图像中的表皮、维管束和薄壁细胞 3 种组织。从图 3 中可以看出, 随预处理时间增加, 样品组织形态的完整度逐渐减小, 碱处理 60 min 的样品最不完整, 且薄壁细胞完整度减小最明显。

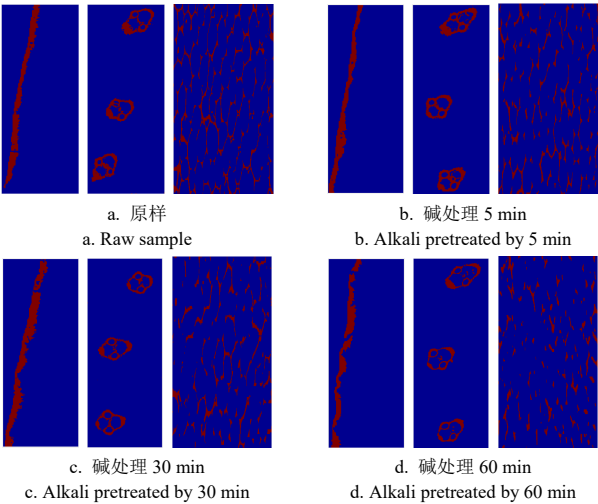
2.4 FTIR 显微成像及 fast NNLS 拟合计算结果

基于试验分析的木质素含量 (化学校正值) 和基于 fast NNLS 拟合的 3 个组织 (表皮、维管束和薄壁细胞) 中木质素含量随碱处理时间的变化, 如图 4 所示。化学校正值是试验测定的木质素含量与对应碱处理固体回收率的乘积。将试验测定的木质素含量转化为木质素绝对含量, 使试验测定的碱处理不同时间的样品木质素含量具有可比性。化学校正值随碱处理时间增加不断下降, 且反应初始阶段, 木质素降解速率最大, 随后木质素降解速率逐渐减小。这可能是由样品中木质素含量减少, 反应困难程度增大而引起的。

由图 4 中基于 fast NNLS 拟合计算的 3 个组织 (表皮、维管束和薄壁细胞) 中木质素含量可知, 玉米秸秆表皮中的木质素含量高于维管束中的含量, 而薄壁细胞中木质素含量最少。这一计算结果与植物学研究结果一致, 表皮和维管束中木质素大量沉积有利于巩固和支持植物体、保护植物体及物质输导。拟合计算得到, 原样组织薄壁细胞中木质素质量分数为 7.7%, 碱处理 5、30、60 min 后下降至 6.0%、4.8%、3.5%, 图中结果显示, 除原样 (图中第 1 个点) 外, 碱处理样的表皮、维管束和薄壁细胞 3 个组织中木质素含量均呈现随着碱处理时间增加而不断减少的趋势; 并且 3 个组织中木质素变化趋势均与化学校正值的变化趋势一致。表皮中木质素降解速率快于其他 3 个组织, 这可能与表皮中木质素含量较高有关, 另外 2 个组织中木质素降解速率则相当; 组织中木质素降解速率逐渐减小, 与化学校正值速率的变化一致。

图 5 是基于 fast NNLS 拟合计算的表皮、维管束和薄壁细胞等 3 个组织中木质素分布的 FTIR 显微图像。FTIR 显微图像可以直观看到图 5 中的计算结果: 表皮中木质素含量大于维管束和薄壁细胞中的, 随着碱处理时间增加, 各个组织中木质素含量逐渐减少。同时, 各组织形态也出现了不同程度的破坏, 维管束和薄壁细胞的破坏程度比较明显。

图 5 中薄壁细胞的 FTIR 显微图像显示细胞形状随碱处理时间的增加愈加不完整, 一方面是由于所选区域的薄壁细胞经碱处理原有形态被严重破坏; 另一方面, 由于薄壁细胞细胞壁较表皮部分和维管束薄, 导致红外吸收光程短, 所以薄壁细胞的红外响应值较低, 引起细胞形态部分缺失。



注：每个小标题对应的 3 个小图分别为表皮、维管束和薄壁细胞组织。
Note: The figure shows corn stover tissues including epidermis, vascular bundle and parenchyma cell, respectively, in every subtitle.

图 3 K 均值聚类算法提取的样品组织

Fig.3 Sample tissues extracted by K -means clustering algorithm

2.5 讨论

图 4 中原样的 (第 1 个点) 基于 fast NNLS 拟合计算值与整体趋势不符, 推测是拟合计算值出现偏差。NNLS

拟合计算时须令待分析组分等于 k , 本试验中取 3, 即假定每个像素点仅由纤维素、半纤维素和木质素 3 种组分组成, 组分占比总和越接近 1, 拟合值越准确。但实际上, 如表 3 所示, 玉米秸秆原样中纤维素、半纤维素和木质素三者总和仅为 83.36%, 原样中还存在淀粉、果胶、灰分等多种成分, 因而拟合值出现偏差。而碱处理不同时间的样品中, 纤维素、半纤维素和木质素三者总和均在 90% 以上, 所以拟合值更准确。为解决原样拟合值出现偏差的问题, 在后续研究中可以通过增加参与 fast NNLS 计算的组分数, 使组分总和尽量接近于 1。

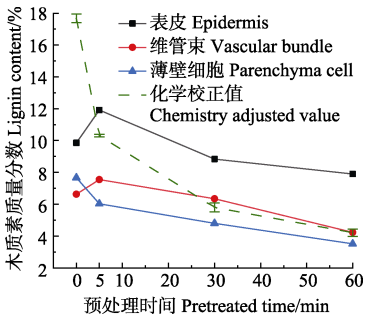
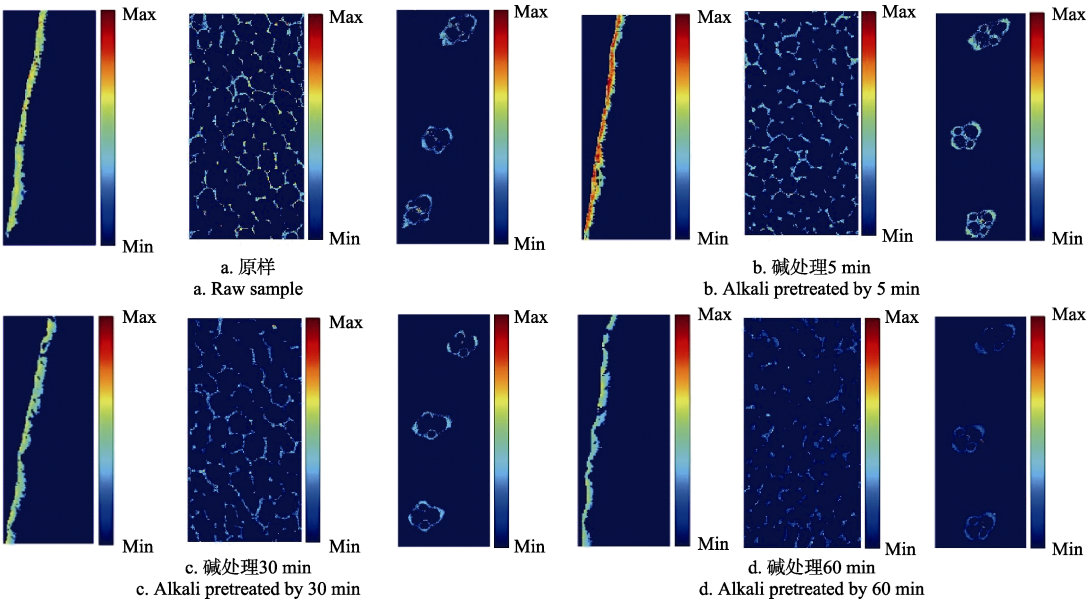


图 4 木质素含量随预处理时间的变化
Fig.4 Lignin content at various pretreated time



注：每个小标题对应的 3 个小图分别为表皮、维管束和薄壁细胞组织。组织越接近红色表明木质素含量越高, 越接近蓝色, 表明木质素含量越低。
Note: The figure shows corn stover tissues including epidermis, vascular bundle and parenchyma cell respectively in every subtitle. The color of tissue is closer to red, indicating the higher the lignin content is; and the color of tissue is closer to blue, indicating the lower the lignin content is.

图 5 Fast NNLS 拟合计算各组织中木质素分布的 FTIR 显微图像

Fig.5 FTIR microspectroscopic images of lignin distribution in tissues based on fast non-negativity-constrained least squares fitting

表 3 样品中木质纤维成分的含量
Table 3 Structure carbohydrates composition of samples

样品 Samples	纤维素 Cellulose/%	半纤维素 Hemicellulose/%	木质素 Lignin/%	总和 Sum/%
原样 Raw sample	42.00±0.29	23.69±0.17	17.68±0.27	83.36
预处理 5 min Pretreatment by 5 min	41.81±0.10	21.61±0.02	10.30±0.09	90.34
预处理 30 min Pretreatment by 30 min	41.85±0.20	17.90±0.01	5.79±0.28	91.88
预处理 60 min Pretreatment by 60 min	40.78±0.25	16.16±0.20	4.21±0.23	92.15

3 结 论

本研究采用傅里叶变换红外 (FTIR) 显微成像系统获取玉米秸秆原样切片和碱处理不同时间的切片的显微图像, 然后基于快速非负最小二乘 (fast NNLS) 拟合算法计算样品各个组织 (表皮、维管束和薄壁细胞) 中木质素含量并在 FTIR 显微图像中直观表达木质素含量的变化。对比基于 fast NNLS 拟合所得的 3 个组织 (表皮、维管束和薄壁细胞) 中木质素含量和基于试验分析的木质素含量 (化学校正值) 随碱处理时间的变化发现, 各个组织中木质素含量逐渐下降, 且与化学校正值变化趋势一致; 木质素降解速率呈现先快后慢; 表皮中木质素含量高于其他 2 个组织, 降解速率也大于其他 2 个组织; 受算法原理的限制, 原样各组织中木质素拟合计算含量存在偏差, 需进一步研究。由本文研究结果可知, FTIR 显微成像结合 fast NNLS 算法可以实现木质素的定位和定量分析, 能用于表征玉米秸秆碱处理过程中不同组织的木质素分布和含量变化。

[参 考 文 献]

- [1] 杨增玲, 梅佳琪, 曹聪, 等. 基于红外光谱的不同农作物秸秆磨木木质素差异表征[J]. 农业工程学报, 2018, 34(19): 219—224.
Yang Zengling, Mei Jiaqi, Cao Cong, et al. Traits of milled wood lignin isolated from different crop straw based on FT-IR[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(19): 219—224. (in Chinese with English abstract)
- [2] 李雅丽, 高锦红, 王丽. 碱处理对农作物秸秆中木质素含量的影响[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(10): 58—60.
Li Yali, Gao Jinhong, Wang Li. Effect of alkali treatment on lignin content in crop straw[J]. Chemistry & Bioengineering, 2017, 34(10): 58—60. (in Chinese with English abstract)
- [3] Cesarino I, Araújo Pedro, Domingues Júnior Adilson Pereira, et al. An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance[J]. Brazilian Journal of Botany, 2012, 35(4): 303—311.
- [4] 路瑶, 魏贤勇, 宗志敏, 等. 木质素的结构研究与应用[J]. 化学进展, 2013, 25(5): 838—858.
Lu Yao, Wei Xianrong, Zong Zhimin, et al. Structural investigation and application of lignins[J]. Progress in Chemistry, 2013, 25(5): 838—858. (in Chinese with English abstract)
- [5] 马建锋, 杨淑敏, 田根林, 等. 植物细胞壁木质素区域化学紫外显微光谱研究进展[J]. 林产化学与工业, 2016, 36(1): 147—154.
Ma Jianfeng, Yang Shumin, Tian Genlin, et al. Application of UV-microspectrophotometry on lignin topochemistry in plant cell wall[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2016, 36(1): 147—154. (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhu Shengdong, Wu Yuanxin, Yu Ziniu, et al. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(9): 3082—3086.
- [7] Hu Zhenhu, Wen Zhiyou. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(3): 369—378.
- [8] Li Junbao, Lu Mingsheng, Guo Xiaomiao, et al. Insights into the improvement of alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corn stover: chemical and microstructural analyses[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 2—7.
- [9] Micco V D, Aronne G. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls[J]. Biotechnic & Histochemistry, 2007, 82(4/5): 209—216.
- [10] Liljegen S. Phloroglucinol stain for lignin[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2010(1): pdb.prot4954. Doi: 10.1101/pdb.prot4954
- [11] Coletta V C, Rezende C A, Da Conceição F R, et al. Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 43—43.
- [12] Ji Zhe, Ma Jianfeng, Zhang Zhiheng, et al. Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of *Pinus yunnanensis* determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 47: 212—217.
- [13] 刘苍伟, 苏明垒, 周贤武, 等. FTIR 及 CLSM 对转基因杨木细胞壁木质素含量及微区分布研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2017(11): 89—93.
Liu Cangwei, Su Minglei, Zhou Xianwu, et al. Analysis of content and distribution of lignin in cell wall of transgenic poplar with Fourier infrared spectrun (FTIR) and confocal laser scanning microscopy (CLSM)[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017(11): 89—93. (in Chinese with English abstract)
- [14] Miyafuji H, Komai K, Kanbayashi T. Development of quantification method for lignin content in woody biomass by Raman micro-spectroscopy[J]. Vibrational Spectroscopy, 2017, 88: 9—13.
- [15] Singh A, Daniel G, Nilsson T. Ultrastructure of the S2 layer in relation to lignin distribution in *Pinus radiata* tracheids[J]. Journal of Wood Science, 2002, 48(2): 95—98.
- [16] Westermark U, Lidbrandt O, Eriksson I. Lignin distribution in spruce (*Picea abies*) determined by mercurization with SEM-EDXA technique[J]. Wood Science & Technology, 1988, 22(3): 243—250.
- [17] Lan Sun, Li Chenlin, Xue Zhengjun, et al. Unveiling high-resolution, tissue specific dynamic changes in corn stover during ionic liquid pretreatment[J]. RSC Advances, 2013, 3: 2017—2027.
- [18] Ma Jianfeng, Ji Zhe, Zhou Xia, et al. Transmission electron microscopy, fluorescence microscopy, and confocal raman microscopic analysis of ultrastructural and compositional heterogeneity of *Cornus alba* L. wood cell wall[J]. Microscopy and Microanalysis, 2013, 19(1): 243—253.
- [19] Pelletier M J, Pelletier C C. Spectroscopic Theory for Chemical Imaging[M]// Raman, Infrared, and Near-Infrared Chemical Imaging. John Wiley & Sons Inc, 2010.
- [20] Türker-Kaya S, Huck C W. A review of mid-infrared and near-infrared imaging: Principles, concepts and applications in plant tissue analysis[J]. Molecules, 2017, 22(1): 168—187.
- [21] Dokken K M, Davis L C. Infrared imaging of sunflower and maize root anatomy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(26): 10517—10530.
- [22] Gorzsás A, Stenlund H, Persson P, et al. Cell-specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem[J]. The Plant Journal, 2011, 66(5): 12.

- [23] Yang Zengling, Mei Jiaqi, Liu Zhiqiang, et al. Visualization and semiquantitative study of the distribution of major components in wheat straw in mesoscopic scale using fourier transform infrared microspectroscopic imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(12): 7332—7340.
- [24] Shih C J, Lupoi J S, Smith E A. Raman spectroscopy measurements of glucose and xylose in hydrolysate: Role of corn stover pretreatment and enzyme composition[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(8): 5169—5176.
- [25] Rossi S, Menardi R, Anfodillo T. Trephor: A new tool for sampling microcores from tree stems[J]. *IAWA Journal*, 2006, 27(1): 89—97.
- [26] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: NREL/TP-510-42618 [S]. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co, 2011: 1—15.
- [27] Sun Xiaofeng, Sun Runcang, Fowler P, et al. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(4): 860—870.
- [28] Fang J M, Sun R C, Tomkinson J. Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction[J]. *Cellulose*, 2000, 7(1): 87—107.
- [29] Bro R, Jong S D. A fast non-negativity-constrained least squares algorithm[J]. *Journal of Chemometrics*, 1997, 11(5): 393—401.
- [30] 杨增玲, 梅佳琪, 韩鲁佳, 等. 茎秆切片显微红外“组织-组分”同步分析软件 V1.0[Z]. 证书号: 软著登字第 B144059 号. 登记号: 2018SRBJ0229.

Lignin content and distribution in alkali pretreated corn straw based on Fourier transform infrared microspectroscopic imaging

Yang Zengling, Du Shurong, Mei Jiaqi, Li Junbao, Liu Erwei, Han Lujia^{*}

(College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Lignin is one of the major components of plant cell wall, and it can provide sufficient strength and hardness to plant cells while avoiding biological damage and water erosion. In recent years, studies on the lignification process and delignification of plant tissues have received extensive attention from scholars. A large number of studies have been carried out to determine the removal of lignin after pretreatment by conventional wet chemical analysis. The lignin content and distribution of biomass resources such as crop straw directly affect its conversion and utilization efficiency. It's meaningful to develop multi-scale and in situ analysis to identify lignin distribution and quantification on delignified plant cell wall for bio-resource commercial utilization. In this paper, we studied an in situ analysis method to visualize changing of lignin distribution in the alkali pretreated corn straw internodal transverse section based on Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopic imaging, with a fast non-negativity-constrained least squares (fast NNLS) fitting. We collected the middle of the 6th node of fresh jointing stage corn straw. Corn straws were pretreated for series of times (0, 5, 30, 60 min) by 2% NaOH solution at 100°C. A paraffin embedding method was used to produce 18 μm-thick transverse sections for each sample. Then, the sections were transferred onto ZnS windows for FTIR microspectroscopic imaging. We acquired FTIR spectra of major components of corn straw for fast NNLS fitting. We also milled whole straws to 0.069 mm and pretreated in the same condition as sections to determine structure carbohydrate. The data of FTIR microspectroscopic images and FTIR spectra were processed by Savitzky-Golay smoothing within 5 points, SNV, and automatic Whittaker filter baseline to correct baseline and offset. K-means cluster algorithm was used to distinguish various tissues including epidermis, vascular bundles and parenchyma cells. Fast NNLS fitting was carried out to calculate the lignin concentrations in pixels. For comparison between different pretreated times, lignin concentration in pixels was calibrated according to the sum of content of all components based on laboratory analysis. The lignin content by laboratory analysis decreased with the increasing of the pretreated time, and the lignin degradation rate was larger at the initial stage of the reaction. The lignin content in the epidermis, vascular bundle and parenchyma cells of the samples showed a decreasing trend with the increasing of pretreatment time, and the trends of lignin changing in the three tissues were consistent with the trend of laboratory analysis. By comparing laboratory analysis with fast NNLS fitting results, the results show that the FTIR microspectroscopic imaging combined with fast NNLS could locate and quantify the distribution of lignin in various tissues, and the trend of lignin changing calculated by fast NNLS fitting is the same as the laboratory chemical analysis results. The study demonstrated that FTIR microspectroscopic imaging combined with fast NNLS fitting could be successfully applied to in situ visualize lignin distribution within corn straw pretreatment. The characterization method provides reference for the lignin research of corn stover pretreatment and the study of lignin degradation during straw pretreatment.

Keywords: straw; lignin; image processing; FTIR microspectroscopic imaging; alkali pretreatment