

# 共聚焦显微拉曼光谱在木质纤维细胞壁预处理中的应用进展

陈夫山<sup>1</sup>, 王高敏<sup>1</sup>, 吴越<sup>1</sup>, 鲁鹏<sup>2</sup>, 吉喆<sup>1, 2\*</sup>

1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266011

2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西清洁化制浆造纸与污染控制重点实验室, 广西 南宁 530004

**摘要** 在能源紧缺和环境恶化的双重压力下, 利用农林生物质替代化石资源生产生物燃料、生物基化学品和材料逐步发展成为世界范围内的研究热点, 而细胞壁中纤维素、半纤维素、木质素以及其他少量组分的空间分布不均一性和化学结构复杂性构成了天然抗降解屏障, 严重阻碍生物质的转化效率, 因此需要对木质纤维原料进行预处理, 以期破坏细胞壁的宏观壁垒, 实现生物质的低成本高效转化。在此过程中, 全面了解木质纤维细胞壁的化学组成、结构特性及其在生物质转化过程中的解构机理是高效利用农林生物质的前提。由于拉曼光谱具有样品制备要求低、灵敏度高、且能在原位状态下对样品进行定性、定量分析等特点, 使得拉曼光谱成为研究木质细胞壁结构的有力工具。尤其与显微技术相结合时, 可以同时获得木质纤维细胞壁主要组分的微区分布与超分子结构信息, 实现生物质转化过程中化学组分动态变化的可视化研究。首先介绍了拉曼光谱成像的工作原理, 并对纤维素、半纤维素和木质素的拉曼特征信号进行了归属。其次, 总结了近几年拉曼光谱在生物质转化领域内的应用与研究进展, 综述了拉曼光谱在未处理状态下以及稀酸、水热、稀碱等不同预处理过程中的分析方法, 对细胞壁主要组分的分布进行表征, 以揭示预处理过程中各组分的溶出过程及迁移规律, 为在细胞及亚细胞水平探究预处理诱导细胞壁主要组分动态溶解机制提供了有效路径。此外, 针对检测中收集的光谱数量过多、分析难等问题, 文章重点介绍了主成分聚类分析法和顶点成分分析法两种拉曼数据分析方法, 用于提取特征信息并对光谱进行分类研究, 以深入探究特定组分的空间分布和分子结构。最后, 根据上述分析展望了拉曼光谱在生物质转化领域的研究趋势, 为相关研究提供技术参考。

**关键词** 拉曼光谱; 细胞壁; 局部化学; 预处理; 光谱分析方法

**中图分类号:** O657.37 **文献标识码:** R **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)01-0015-05

## 引言

随着工业的迅猛发展, 能源紧缺和环境污染问题日益严重, 利用木质纤维生物质开发清洁高效的可再生能源、大宗化学品和功能材料已成为当前许多国家的重要发展战略和研究热点。而细胞壁中纤维素、半纤维素、木质素和少量组分相互交联构成了天然抗降解屏障, 严重阻碍化学药液和微生物的入侵及降解, 限制了木质纤维原料的高效转化。因此, 对木质纤维原料进行预处理, 破除细胞壁的天然屏障, 是实现生物质低成本转化的必要前提。在预处理过程中, 木质纤维细胞壁的超微结构和主要组分的局部化学变化, 是影响底

物转化效率的重要因素。因此, 全面了解木质纤维细胞壁的化学组成、结构特性及其在转化过程中的解构机理是高效利用农林生物质的基础。拉曼光谱作为一种对样品制备无特殊要求、灵敏度极高的原位分析手段, 能快速、无损的对样品进行定性、定量和结构分析。尤其与显微技术相结合, 能同时获得木质纤维细胞壁主要组分的化学结构与微区分布信息, 实现组分动态变化的可视化研究。目前已经成为研究木质纤维细胞壁结构的有力工具, 并取得一系列重要的研究成果。本文在简述拉曼光谱成像原理的基础上, 重点介绍了生物质预处理过程中拉曼光谱在木质纤维细胞壁主要组分结构解析、纤维素和木质素局部化学动态变化等方面的研究进展, 为木质纤维生物质高效转化利用中细胞壁微观结构的原

收稿日期: 2020-11-15, 修订日期: 2021-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001277), 山东省自然科学基金项目(ZR2018BC043), 广西清洁化制浆造纸与污染控制重点实验室开放基金项目(KF201809-4), 山东省重点研发计划项目(2019JZZY020213)资助

作者简介: 陈夫山, 1963年生, 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院教授 e-mail: chenfushan@qust.edu.cn

\* 通讯作者 e-mail: jizhe@qust.edu.cn

位分析提供了借鉴。

## 1 拉曼光谱成像原理

拉曼光谱是当分子受到激发光的照射后,分子与入射光子碰撞发生能级跃迁,进而产生的一种非弹性散射光谱。由于分子的振动和转动能级不同,拉曼光谱的谱线数目、位移大小和特征峰强度也会发生改变。通过分析拉曼特征峰的高度、宽度、面积、频移和形状,可以获得样品中元素、成分、分子取向、结晶状态以及应力、应变状态等重要信息。

随着研究技术的进一步发展,拉曼光谱还可以与显微技术相结合,以达到对样品进行同步结构分析和空间定位的目的,该技术即为共聚焦显微拉曼成像(CRM)。CRM成像时,显微镜会将激发光聚焦在数微米的样品表面,设定采集时间和扫描步距,通过精准的马达带动定位平台对样品进行光栅扫描,在特定的样品范围内就会获得一系列拉曼光谱。CRM则会以被研究区域的拉曼特征谱峰为基础,基于特定拉曼峰的位移、强度和半峰宽等信息绘制成一幅伪彩色图像,实现样品的微区成分和空间分布分析。CRM成像的本质是一种基于指纹谱学数据分析的物质结构和组分成像技术,该技术可进一步结合数学分析算法,实现样品微区分子结构、化学成分、结晶度和应变应力等更深层次的信息的挖掘。

## 2 木质纤维细胞壁主要组分拉曼信号归属

木质纤维细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。纤维素是由 $\beta$ -D-吡喃型葡萄糖通过 $\beta$ -1,4糖苷键连接的线型高分子化合物,具有结晶型和无定型两种结构(表1)。根据已有报道,纤维素的三个典型特征峰位于380, 1 098和 $2\ 890\text{ cm}^{-1}$ ,分别对应吡喃环CCC的对称弯曲振动、糖苷键COC伸缩振动、主链葡萄糖环和侧链亚甲基上的CH及 $\text{CH}_2$ 的伸缩振动<sup>[1]</sup>。归属于纤维素分子的拉曼特征峰的强度多数与入射激光偏振方向有关,在 $1\ 098\text{ cm}^{-1}$ 处尤为显著。因此,采用偏振入射光扫描,可以同时测定纤维素的空间分布和分子取向特征。

半纤维素是由木糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖等多种糖基单元构成的带有支链的异质性多糖。由于半纤维素和纤维素的化学键型类似,因此二者的特征峰多数相互重叠,难以区分。但已有研究证实,半纤维素的HCC、HCO伸缩振动在 $890\text{ cm}^{-1}$ 处信号显著,可以作为半纤维素的典型拉曼特征峰。此外,Hemmelsbach等对亚麻纤维的拉曼光谱进行了详细分析,发现 $475\sim 515$ 和 $800\sim 870\text{ cm}^{-1}$ 谱带可以用于识别半纤维素木聚糖<sup>[2]</sup>。

木质素是由苯基丙烷结构单元通过碳碳键和醚键连接构成的三维空间网状芳香族化合物。木质素的典型拉曼特征峰位于 $1\ 600$ 和 $1\ 660\text{ cm}^{-1}$ ,分别归属于芳香环骨架的弯曲振动和与苯环共轭的酮羰基伸缩振动,来源于松柏醇/紫丁香醇或松柏醛/紫丁香醛结构单元<sup>[3]</sup>。

表 1 细胞壁主要组分拉曼特征峰归属  
Table 1 Assignment of Raman bands for the main components in cell walls

组分	拉曼位移/ $\text{cm}^{-1}$	归属
纤维素	380	吡喃环 CCC 对称弯曲振动
	437~459	环(CCO)伸缩振动
	520	糖苷键 COC 伸缩振动
	902	重原子 CC 和 CO 伸缩振动
	913	C6 上 HCC 和 HCO 弯曲振动
	968~997	$\text{CH}_2$ 面内摇摆振动
	1 098*	糖苷键 COC 不对称伸缩振动
	1 122	糖苷键 COC 对称伸缩振动
	1 149	重原子 CC 和 CO 伸缩振动加 HCC 和 HCO 弯曲振动
	1 292	重原子伸缩振动加 HCC 和 HCO 弯曲振动
	1 337	HCC 和 HCO 弯曲振动
	1 406	HCC, HCO 和 HOC 弯曲振动
	1 455	HCH 和 HOC 弯曲振动
	2 848	CH 和 $\text{CH}_2$ 伸缩振动
2 889~2 965*	CH 和 $\text{CH}_2$ 伸缩振动	
3 291~3 395	OH 伸缩振动	
半纤维素	503~553	CCO 伸缩振动
	870~940*	COC 面内对称伸缩振动
	1 000~1 026	COH, CC 伸缩振动
	1 125	COC, CC 伸缩振动
	1 312	CH, COH 弯曲振动
	1 365~1 376	CH, OH 面内弯曲振动
	2 917	CH 伸缩振动
	2 933	OH 伸缩振动
木质素	704~792	芳香环骨架对称伸缩振动
	1 155~1 158	酚羟基 O—H 弯曲振动
	1 185~1 187	
	1 214~1 217	甲氧基 O— $\text{CH}_3$ 伸缩振动
	1 285~1 289	芳香环醚键伸缩振动
	1 330~1 333	酚羟基 O—H 弯曲振动
	1 506~1 514	芳香环骨架不对称伸缩振动
	1 600*	芳香环骨架弯曲振动
	1 660*	与苯环共轭的酮羰基伸缩振动

注: \* 主要组分典型特征峰,常用拉曼成像积分

## 3 预处理过程中细胞壁主要组分分布变化研究

木质纤维细胞壁是以纤维素微纤丝为骨架,半纤维素和木质素为胶黏剂的多层同心圆环结构,由外到内依次分为细胞角隅(cell corner, CC)、复合胞间层(compound middle lamellar, CML)、初生壁(primary wall, PW)和次生壁(secondary wall, SW; 包括 S1, S2 和 S3)。学者们<sup>[4]</sup>借助 CRM 研究发现纤维素和木质素在细胞壁中的分布呈不均一性,木质素的浓度分布规律为:  $\text{CC} > \text{CML} > \text{S2}$ ,而纤维素的分布特征与木质素恰好相反。

由于细胞壁复杂的超微结构和组分分布不均一,形成了天然的抗降解屏障阻碍了生物质各组分的高效利用,因此需

要选择经济、高效、环保的预处理方法对生物质进行预处理以实现组分清洁分离和高效转化。而全面解析预处理过程中细胞壁微观结构和主要组分微区分布变化,是解译生物质转化机制的重要课题。CRM 的迅猛发展,为研究学者从细胞及亚细胞水平探究预处理诱导细胞壁主要组分动态溶解机制提供了有效路径,并在生物质转化领域取得了一系列重要的研究成果。

### 3.1 稀酸预处理

稀酸预处理主要通过溶解半纤维素和少量木质素来打破细胞壁的致密结构,从而增加纤维素的酶水解效率。在预处理过程中组分的降解和新聚合物的生成,导致拉曼特征峰发生偏移或重叠,难以准确归属, Jin 等<sup>[5]</sup>通过模型物参比确认 1 330 和 1 272  $\text{cm}^{-1}$  特征峰分别对应 G 型和 S 型木质素,结合拉曼信号强度变化和积分成像,实时监测了酸性亚氯酸钠预处理过程中不同分子结构木质素的溶出机制。在奇岗表皮和髓心组织稀酸预处理过程中, Ji 等<sup>[6]</sup>通过对比 2 886, 1 599 和 1 173  $\text{cm}^{-1}$  拉曼信号变化规律,发现髓心中木质素和羟基肉桂酸的溶出能力较外皮更强,且两组分溶出速率呈正相关,拉曼成像进一步证实木质素会凝聚为球状颗粒在细胞壁内发生迁移、重分布,影响纤维素酶水解效率。这些研究多采用二维成像技术,为更精准地呈现稀酸预处理过程中杨木细胞壁三维结构变化, Zoghlami 等<sup>[7]</sup>在拉曼成像分析中引入了 3D 分割技术,为研究细胞壁主要组分连接键的断裂和溶出机制提供了新的方法。

### 3.2 水热预处理

水热预处理一般在 130~220  $^{\circ}\text{C}$  范围内进行,在反应过程中不添加任何化学试剂和催化剂就可以有效脱除半纤维素。由于绝大多数的半纤维素特征峰与纤维素重叠,所以很难利用 CRM 直接定位半纤维素的分布,因此已有报道多数利用 2 889  $\text{cm}^{-1}$  碳水化合物信号峰,结合化学或免疫标记技术间接探究半纤维素的微区分布特征。但是, Ma 等<sup>[8]</sup>利用 CRM 对 874~934  $\text{cm}^{-1}$  积分成像得到了杨木半纤维素动态分布图,分析发现水热预处理过程中 CML 和 S2 层的聚木糖率先溶出,而聚甘露糖却相对稳定;延长预处理至 40 min, CC, CML 和 S2 层中木质素的溶出率分别为 22.5%, 45.9% 和 71.0%,表明木质素由细胞壁各亚层的脱除速率呈不均一性。

### 3.3 碱性预处理

碱性预处理主要通过断裂木质素和半纤维素之间的化学键,脱除大量木质素和部分半纤维素以增大纤维素底物的可及性,进而提高生物质转化效率的方法。在稻秆的 NaOH 预处理过程中, Li 等<sup>[9]</sup>利用主成分分析法对 CRM 全光谱数据实现了指纹谱带的定性定量分类,又结合全约束最小二乘法(FCLS)对光谱进行解混分析,得到了主要组分的分布成像,与单光谱成像技术相比,该方法从定性、定量和定位等多角度更精准地揭示了碱预处理提高稻秆厌氧发酵甲烷产率的机理。Huang 等<sup>[10]</sup>利用 CRM 研究了水热和稀碱两段预处理过程中竹材纤维的变化,发现纤维素、木质素和羟基肉桂酸在不同类型细胞壁的不同形态学区域的溶出速率呈不均一性,三者协同影响纤维素的酶水解效率。

### 3.4 其他

除酸性、碱性处理外, CRM 也被广泛应用于有机溶剂、离子液体、低共熔体系预处理过程的监测。Li 等<sup>[11]</sup>用  $\gamma$ -戊内酯/水/酸体系对桉树进行预处理,通过化学组分拉曼分布变化研究,证实提高  $\text{H}_2\text{SO}_4$  浓度可以促进 CML 中木质素和半纤维素的脱除。Li 等<sup>[12]</sup>在微波辅助低共熔溶剂降解生物质细胞壁过程中,分析各形态学区域的拉曼信号发现木质素的溶出速率为: SW>CML>CC。综上所述,利用 CRM 可以快速、原位获取预处理过程中细胞壁各形态学区域的组分(纤维素、半纤维素、木质素和羟基肉桂酸)分布特征,从细胞及亚细胞水平揭示预处理解构细胞壁的机制。

## 4 拉曼光谱的分析方法

木质纤维细胞壁是由多种高分子聚合物构成的一种多层纳米复合材料。通过共聚焦拉曼扫描可获得海量光谱数据,而传统的光谱分析方法主要根据研究人员经验,抽取特定空间区域的平均光谱后,进行单光谱成像或仅选择需要的特征峰进行分析。该方法存在以下显著缺陷:(1)数据处理结果人为误差较大,且费力费时;(2)大量有效信息被遗漏;(3)分析结果精准性、可重复性差。因此,结合生物质细胞壁的结构特征,构建海量光谱数据全自动分类分析方法至关重要。本文主要介绍了主成分聚类分析法和顶点成分分析法。

### 4.1 主成分聚类分析法

主成分分析法是一种统计方法,可以在尽可能保留原有信息的基础上将高维空间的样本映射到低维的主成分空间中,使数据矩阵简化,降低维数,被降低维数后的数据又可以

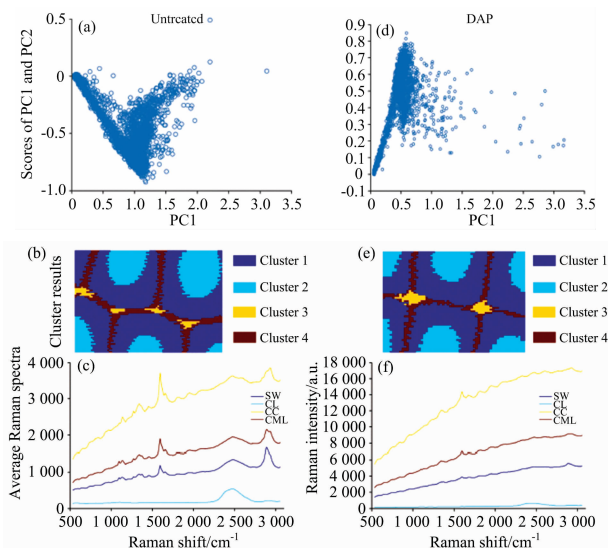


图 1 未处理和稀酸预处理马尾松细胞壁拉曼光谱主成分得分图(a, d); 聚类分析结果(b, e); 各壁层平均拉曼光谱(c, f)

Fig. 1 PCA scores plot of Raman spectra of Pinus cell wall untreated and pretreated by dilute acid (a, d); The cluster results (b, e); Average Raman spectra of each layers before preprocessing (c, f)

进行聚类分析,将研究对象按照诸多特性的相似程度进行逐渐聚合,最终按照类别的综合性质归类,从而完成聚类分析的过程。陈胜等<sup>[13]</sup>利用主成分分析法对马尾松多种组分进行了分类识别,其中木质素( $1\ 597\ \text{cm}^{-1}$ )和碳水化合物( $2\ 890\ \text{cm}^{-1}$ )两大主成分累计贡献率高达 94.61%。通过聚类分析可以将拉曼光谱分为四类,分别对应细胞壁的 CC, CML, SW 和细胞腔(CL),经算数平均后可以得到细胞壁各形态学区域的平均拉曼光谱(图 1)。并利用该方法分析了杨木稀酸和离子液体预处理过程中主要组分的分布变化<sup>[14]</sup>,这比传统的手动选定细胞区域获得少量光谱平均数据的方法更加准确。主成分聚类分析法可以压缩数据、准确提取出不同形态区域的平均拉曼光谱,并揭示细胞壁超微结构和化学组分之间的内在联系,为进一步地精细区分不同细胞壁层之间的化学差异奠定了良好的基础。

#### 4.2 顶点成分分析法

顶点成分分析是一种多元曲线分解方法,它以交互的方式将数据投影到所识别的正交空间中,通过反复迭代从存在混合像元的高光谱图像中提取出场景的基本组成成分,即

提取端元。它具有光谱分析全自动以及端元提取速度快的优点,是目前分析木质纤维细胞壁拉曼光谱的有效方法之一。Notburga Gierlinger<sup>[15]</sup>在分析云杉细胞壁的拉曼谱图时,根据细胞壁各层中主要成分分子结构的差异性,采用顶点成分分析算法将细胞壁分为四个端元,分别对应:CC 和 CML、S3 和纹孔膜、S2、CL[图 2(a)],每个端元的丰度图均详细呈现了主要组分的空间分布特征[图 2(b-e)],通过提取四个端元的平均拉曼光谱可以进一步获取不同形态学区域中成分含量和分子结构信息[图 2(f-g)]。该方法较传统光谱分析法,开创性地发现 S3 和纹孔膜的微观结构特征明显区别于 S2 和 CML 层:1)纤维素微纤丝与细胞轴趋于垂直,与 S2 层中较小的微纤丝角差异较大;2)该层的木质素特征峰由  $1\ 599\ \text{cm}^{-1}$  偏移至  $1\ 603\ \text{cm}^{-1}$ ,说明 S3 和纹孔膜具有类似的木质素分子结构,但与 S2 和 CML 层显著不同。此外,作者借助顶点成分分析法解析拉曼光谱,进一步证实 S2 层由于木质化不均一性形成了连续薄层状结构。顶点成分分析法为深入解析拉曼光谱,研究木质纤维细胞壁的精微结构提供了新的途径。

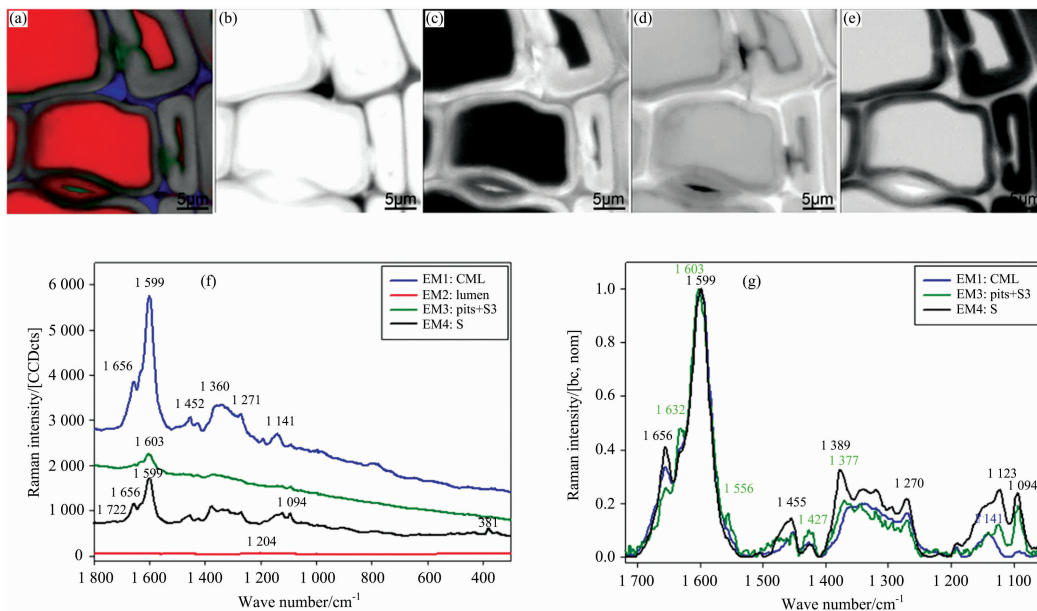


图 2 基于顶点成分分析的云杉横切面( $38\ \mu\text{m} \times 38\ \mu\text{m}$ )的拉曼端元图像与光谱( $1\ 800 \sim 300\ \text{cm}^{-1}$ )

Fig. 2 Raman images of spruce wood cross sections ( $38\ \mu\text{m} \times 38\ \mu\text{m}$ ) based on VCA analysis with four endmembers using the wavenumber region from  $1\ 800$  to  $300\ \text{cm}^{-1}$

## 5 展望

拉曼光谱显微成像技术具有制样简单、扫描快速、空间分辨率高等优点,目前已发展为木质纤维细胞壁研究领域的重要工具,它可以在原位状态下获得细胞壁聚合物大分子的结构组成、空间分布和分子取向等信息,尤其在生物质转化过程中细胞壁微观结构变化的动态监测展现出独特的优势,并取得了丰硕的研究成果。然而,拉曼光谱作为一种新兴技

术,还存在一定的局限性,比如大部分拉曼光谱仪采用背散射采集方式获取拉曼信号,一般只能获得样品表面的信息,而且光谱信号噪声大。此外,木质纤维生物质样品大多具有自发荧光性,会干扰拉曼信号的采集从而降低光谱质量与数据分析,因此需要借助多种光谱分析方法对拉曼光谱进行深度剖析以提取更有价值的信息。近年来,拉曼光谱技术迅猛发展,与多种光谱和光谱成像技术相辅相成,在生物炼制、生物质化工等领域展现出巨大的应用潜能。

## References

- [ 1 ] Ling Z, Wang T, Makarem M, et al. *Cellulose*, 2019, 26: 305.
- [ 2 ] Himmelsbach D S, Khahili S, Akin D E. *Vibrational Spectroscopy*, 1999, 19(2): 361.
- [ 3 ] Gierlinger N. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2018, 53(7): 517.
- [ 4 ] Xiao M Z, Chen W J, Cao X F, et al. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 238: 116212.
- [ 5 ] Jin K X, Liu X, Jiang Z H, et al. *Industrial Crops & Products*, 2019, 136: 87.
- [ 6 ] Ji Z, Zhang X, Ling Z, et al. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 154: 247.
- [ 7 ] Zoghalmi A, Refahi Y, Terry C, et al. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122015.
- [ 8 ] Ma J, Zhang X, Zhou X, et al. *BioEnergy Research*, 2014, 7(4): 1358.
- [ 9 ] Li X L, Sha J J, Xia Y H, et al. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 8.
- [10] Huang C, Fang G, Zhou Y, et al. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(19): 7380.
- [11] Li Y J, Li H Y, Sun S N, et al. *Renewable Energy*, 2019, 134: 228.
- [12] Li P, Zhang Q, Zhang X, et al. *Bioresource Technology*, 2019, 288: 121475.
- [13] CHEN Sheng, ZHANG Xun, XU Feng(陈 胜, 张 逊, 许 凤). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2018, 38(7): 2136.
- [14] Chen S, Ling Z, Zhang X, et al. *Industrial Crops & Products*, 2018, 114: 123.
- [15] Gierlinger N. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 306.

# Advances in the Application of Confocal Raman Spectroscopy in Lignocellulosic Cell Walls Pretreatment

CHEN Fu-shan<sup>1</sup>, WANG Gao-min<sup>1</sup>, WU Yue<sup>1</sup>, LU Peng<sup>2</sup>, JI Zhe<sup>1, 2\*</sup>

1. College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266011, China

2. Guangxi Key Laboratory of Clean Pulp & Papermaking and Pollution Control, School of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China

**Abstract** In light of the gradual depletion of fossil fuels and emerging environmental concerns, there is a hot topic to make use of lignocellulosic biomass to produce biobased value-added fuels, chemicals, and materials worldwide. However, bioconversion is normally hindered by the complex structure and heterogeneous components (cellulose, hemicelluloses, lignin and pectin) distribution in the cell wall assembly. Therefore, to overcome the recalcitrance, biomass pretreatment became an essential step towards low-cost biomass conversion. In this process, it is greatly importance to have a comprehensive understanding of the chemical composition, structural characteristics of cell walls and their deconstruction mechanism in biomass conversion for efficient utilization of agroforestry biomass. Raman spectroscopy has been used to investigate the structure of cell walls at a multi-scale due to its simple sample preparation, high sensitivity, and quantitative and qualitative analysis of the characteristics of samples in situ. Moreover, the chemical structure of the main components of cell walls and micro-zone distribution information can be provided by Raman spectroscopy combined with microtechnique to realize the dynamic change of composition of visualization research. Firstly, it introduces the working principle of Raman spectroscopy. On account that cellulose, hemicellulose and lignin have different Raman characteristic signals. The concentration and distribution of different components in a certain region can be calculated by integrating the characteristic Raman bands. Secondly, the research progress of Raman spectroscopy application in the field of biomass conversion was summarized. It is especially reviewed that the analysis methods for revealing the spatial distribution pattern and migration regularity of main components within cell walls during dilute acid, hydrothermal and alkali pretreatment processes. It provides an effective way to explore the dynamic dissolution mechanism of cell wall components induced by biomass pretreatments at cellular and subcellular levels. In addition, to solve the problems of excessive number of collected spectra and difficult analysis, this work mainly introduces two Raman data analysis methods, namely principal component clustering analysis and vertex component analysis, which are used to extract characteristic information and perform spectral classification, so as to further explore the spatial distribution and molecular structure of specific components. Finally, based on the above analysis, we also discuss the future challenges and prospects of Raman spectroscopy in the field of biomass conversion, which will provide technical reference for related research.

**Keywords** Raman spectroscopy; Cell wall; Topochemistry; Pretreatment; Spectra analytical method

\* Corresponding author

(Received Nov. 15, 2020; accepted Feb. 21, 2021)