

4-羟基丁酸含量对聚 3-羟基丁酸 与 4-羟基丁酸共聚物性能和结构的影响

郭迎¹, 孙炳新^{1,2}, 冯叙桥¹, 揣成智², 韩春阳^{1,2}, 孙彬¹, 陈彬¹

(1. 沈阳农业大学, 沈阳 110866; 2. 天津科技大学, 天津 300222)

摘要: **目的** 对 3-羟基丁酸 4-羟基丁酸共聚酯 P(3HB-co-4HB) 进行酶解测试。**方法** 通过力学性能测试、失重率分析、热失重分析、X-射线衍射分析、扫描电镜等测试和表征手段对样品的物理性能及生物降解情况进行评价。**结果** P(3HB-co-4HB) 分子中 4HB 单体(文中均用摩尔分数表示)的引入提高了材料的柔韧性, 材料的脆性下降; 失重率方面, 4 种材料的降解速率从高到低依次为 P(3HB) > P(3HB-co-5% 4HB) > (3HB-co-10% 4HB) > P(3HB-co-15% 4HB); 酶解前期, 材料的热稳定性增强, 而酶解后期材料的热稳定性逐渐下降; XRD 结果表明材料降解过程中结晶度的变化不明显; P(3HB-co-4HB) 分子中随着 4HB 单体含量的增加, 材料表面粗糙度降低, 酶解后材料表面被侵蚀, 降解速率与失重率结果一致。**结论** P(3HB-co-4HB) 分子中 4HB 单体的引入显著影响了材料的机械性能, 随着 4HB 含量的增加, 材料的失重率越来越大, 热稳定性呈现先上升后下降的趋势, 材料表面粗糙度逐渐降低, 由于酶解过程属于从表面侵蚀开始, 因此酶解过程中样品的结晶度变化不大。

关键词: 聚 3-羟基丁酸酯 P(3HB); 3-羟基丁酸与 4-羟基丁酸共聚酯 P(3HB-co-4HB); 酶解

中图分类号: TB484.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-3563(2014)07-0066-05

Effect of 4-hydroxybutyrate Content on the Property and Structure of Copolyester Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)

GUO Ying¹, SUN Bing-xin^{1,2}, FENG Xu-qiao¹,
CHUAI Cheng-zhi², HAN Chun-yang^{1,2}, SUN Bin¹, CHEN Bin¹

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the enzymatic degradation processes of P(3HB-co-4HB). **Methods** The physical properties and biodegradability were evaluated by mechanical properties test, weight loss, TGA, XRD and SEM. **Results** The results showed that the presence of 4HB units improved the roughness of the materials, and decreased their brittleness. The degradation rate of 4 materials decreased in the order P(3HB) > P(3HB-co-5% 4HB) > (3HB-co-10% 4HB) > P(3HB-co-15% 4HB). The thermal stability was slightly improved at the beginning of the degradation and then decreased. The results of XRD showed little difference in crystallinity in the process of enzymatic degradation. With the increase of the fraction of 4HB units, the surface of material became rougher, the surface of material was corroded after enzymatic degradation, and the degradation rate was consistent with the results of weight loss rate. **Conclusion** The presence of 4HB units remarkably influenced the mechanical properties of the materials, with the increase of the fraction of 4HB units, the weight loss increased, the thermal stability first increased and then decreased, the surface of materials got rougher, and the crystallinity had no change for the surface erosion in the process of enzymatic degradation.

KEY WORDS: PHB; P(3HB-co-4HB); enzymatic degradation

近些年来,塑料工业发展迅速,塑料的使用已经深入到人们日常生活中的每个角落。由于传统塑料自身降解速度慢,所产生的废弃物会引起严重的环境问题,因此,对于生物降解材料的研究和开发,能够在很大程度上改善这一问题,生物降解材料的研究也因此成为现今材料领域研究的一个热点问题。聚3-羟基丁酸酯(PHB)是一种由微生物发酵产生的聚酯材料^[1],是微生物细胞内一种内源性储藏物质^[2],在微生物体内作为能量和营养的来源,能够被多种细菌完全分解为H₂O和CO₂^[3],具有良好的生物相容性和生物降解性,在医药、工业、农业等领域得到了广泛应用^[4]。

作为热塑性塑料,PHB材料的结晶度很高,且具有较高的硬度和脆性,在加工过程中难度较大,因而限制了其实际应用^[5]。通过向PHB分子中引入4-羟基丁酸共聚单体,形成3-羟基丁酸4-羟基丁酸共聚酯P(3HB-co-4HB),有效降低了聚合物的结晶度,同时材料的力学性能得到大幅提高^[6]。PHB及其共聚酯P(3HB-co-4HB)作为微生物体内的碳源和能源的贮存物,在细胞内是以非晶态存在^[7],但从细胞中分离出来以后,结晶性发生了巨大的变化,其生物降解性能也会随之发生变化^[8]。目前对于P(3HB-co-4HB)的生物降解性能的报道不多,该类材料的生物降解机制与规律还不明确,使得P(3HB-co-4HB)的实际应用受到极大限制,因此研究P(3HB-co-4HB)的生物降解性能对该类材料的推广应用至关重要。文中通过考察不同4HB单体含量的共聚酯P(3HB-co-4HB)(4HB的摩尔分数分别为0%,5%,10%和15%)在脂肪酶溶液中的生物降解情况,为该类材料的生物降解性能的合理评价及应用提供理论基础。

1 实验

1.1 材料

实验材料:P(3HB-co-4HB)树脂颗粒,天津国韵生物技术有限公司,4HB含量分别为0%,5%,10%,15%,经纯化后备用;脂肪酶PS,源自于Burkholderia cepacia,购于Sigma公司;三氯甲烷,分析纯,天津博迪化工股份有限公司;磷酸二氢钠,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;磷酸氢二钠,分析纯,国药集团化

学试剂有限公司。以上试剂均可直接使用。

1.2 方法

1.2.1 P(3HB-co-4HB)样品的纯化^[9]

称取10 g样品溶解于300 mL三氯甲烷中,磁力搅拌至样品完全溶解,抽滤,除去不溶于三氯甲烷的固体杂质。取50 mL过滤后清液加入到分液漏斗中,使其以适当速度分滴滴入盛有300 mL无水乙醇的烧杯中,并用磁力搅拌,纯的P(3HB-co-4HB)样品不溶于乙醇而析出,进而除去有机杂质。将析出的混合物静置10 h,抽滤,得到纯的P(3HB-co-4HB),60℃条件下真空干燥备用。

1.2.2 P(3HB-co-4HB)薄膜的制备^[10]

室温下将纯化过的P(3HB-co-4HB)按一定比例溶于三氯甲烷中,磁力搅拌2 h,待样品完全溶解后,将三氯甲烷溶液倒入置于水平台上的培养皿中,20℃条件下,待溶剂挥发完毕后,得到聚合物薄膜。将薄膜从培养皿上小心剥离后,剪成1.5 cm×3 cm大小的样品,用蒸馏水冲洗3遍,60℃条件下,真空干燥24 h备用。

1.2.3 酶解实验

酶降解实验在含有脂肪酶的磷酸缓冲液(pH=7.4)中进行,酶液质量浓度为1.00 g/L。将P(3HB-co-4HB)膜称量后,放置于含有10 mL酶液的小瓶中,于恒温振荡培养箱(100 r/min)中,37℃条件下恒温降解。每隔1周更换1次酶溶液以保持酶的活性,定期取样,每次取3个样,并用蒸馏水洗涤3次,真空干燥后备测。

1.2.4 力学性能测试

将片材用冲片机从模压片材上裁取哑铃型标准样条进行力学性能测试。拉伸强度及断裂伸长率用深圳新三思材料检测有限公司的CMT4503型万能电子拉力机,分别参照GB/T 1040—1992和GB/T 9341—2000进行测定,拉伸速率为50 mm/min。

1.2.5 失重率的测定

精确称量样品膜降解前后的质量,计算试样降解后的失重率。样品的失重率按下式计算:

$$\text{失重率} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

式中: m_1 为样品膜降解前的质量; m_2 为样品膜降解后的质量。

1.2.6 热失重分析(TGA)

采用 MERRLER TOLEDO TG/SDTA85e 的热失重分析仪对降解前后的试样进行测定。取样约 5 mg,在氮气气氛下,将样品以 10 ℃/min 的速度从 25 ℃升至 500 ℃,记录失重曲线。氮气流量为 100 mL/min。

1.2.7 X-射线衍射(XRD)测试

采用日本 Rigaku 公司的 D/max 2500 PC 型 X 射线衍射仪,以铜 Cu K α ($\lambda = 0.154\text{ nm}$)作为放射源,管压为 40 kV,管流为 20 mA,在室温下扫描范围为 5°~55°,记录扫描图像用以研究 P(3HB-co-4HB)样品降解前后结晶性能的变化。

1.2.8 扫描电镜观察(SEM)

采用 JEOL 公司的 JSM-6380LV 型扫描电子显微镜。分别取不同降解时间的样品薄膜,真空干燥后,将样品表面喷金后置于扫描电镜下观察,放大倍数为 1000 倍,观察样品降解前后表面形态的变化。

2 结果与分析

2.1 力学性能分析

力学性能是评价材料性能的一个常用指标,它决定了材料的使用范围以及使用寿命。P(3HB-co-4HB)共聚酯力学性能见表 1。

表 1 共聚酯 P(3HB-co-4HB) 的力学性能

Tab.1 Mechanical properties of P(3HB-co-4HB)

4HB 的摩尔分数/%	拉伸强度 /MPa	断裂伸长率 /%	弹性模量 /GPa
0	34.53±4.95	2.88±1.96	1.44±0.23
5	33.31±2.17	8.08±4.09	1.23±0.11
10	16.90±1.8	211.16±28.78	0.58±0.10
15	14.60±4.42	393.22±43.63	0.42±0.22

表 1 为不同 4HB 单体含量的 P(3HB-co-4HB)薄膜力学性能测试结果。P(3HB)材料的拉伸强度为 34.53 MPa,随着 4HB 含量的增加,材料的拉伸强度呈现下降的趋势,P(3HB-co-15% 4HB)材料的拉伸强度仅为 14.60 MPa。由表 1 可知,P(3HB)材料的断裂伸长率较小,仅为 2.88%,而随着 4HB 含量的增加,材料的断裂伸长率逐渐加大,P(3HB-co-15% 4HB)材料断裂伸长率为 393.22%,表明引入 4HB 单元后材料的柔韧性得到很大提升。从表 1 中还可以看出,P(3HB)材料的弹性模量最大,为 1.44 GPa,随

着 4HB 含量的增大,材料的弹性模量逐渐减小,P(3HB-co-15% 4HB)材料的弹性模量仅为 0.42 GPa。弹性模量的大小表示材料的刚性大小,弹性模量越大,材料的刚性越强。以上数据显示,随着聚合物分子中 4HB 结构单元含量的增加,材料的拉伸强度下降,断裂伸长率增大,弹性模量下降,表明材料刚性下降,韧性增加。

2.2 失重率分析

失重率是分析材料降解性能的一种重要的表征方法,失重率越高表明材料的降解越明显。不同 4HB 含量的 P(3HB-co-4HB)样品经脂肪酶降解后的失重率随降解时间的变化关系见图 1。

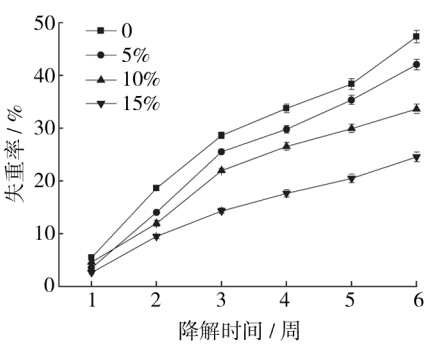


图 1 P(3HB-co-4HB)酶解失重率
Fig.1 Weight loss of P(3HB-co-4HB) by enzymatic degradation

由图 1 可知,随着降解时间的延长,P(3HB-co-4HB)样品的失重率均在逐渐增大,呈线性增长趋势。在酶解过程中,P(3HB)样品降解速率最快,降解 6 周后,失重率达到 47.36%。P(3HB-co-15% 4HB)样品降解速率最慢,降解 6 周后,失重率仅为 24.56%。结果表明,4HB 含量与材料的生物降解性能有着密切的关联^[11],4HB 单元的引入降低了材料的降解性能,失重率由高到低依次为 P(3HB)>P(3HB-co-5% 4HB)>(3HB-co-10% 4HB)>P(3HB-co-15% 4HB)。

2.3 热失重分析

热失重分析研究在升温过程中,样品的质量随着温度的变化,用以研究材料的热稳定性、分解过程和组分等。

P(3HB-co-10% 4HB)材料经脂肪酶降解后的热失重曲线见图 2。酶解前和酶解后的样品在 200 ℃之内失重率几乎没有变化,200 ℃之后样品质量开始逐渐下降。P(3HB-co-10% 4HB)原样热失重达到 5%

的温度为 229 ℃,随着降解时间的延长,酶解 5 周的 P(3HB-co-10% 4HB) 热失重在 5% 时的温度为 240 ℃,而酶解 9 周之后 P(3HB-co-10% 4HB) 热失重在 5% 时的温度为 224 ℃。表明在整个酶解过程中,酶解前期材料的热稳定性增强,而在酶解后期热稳定性逐渐下降。分析原因可能是在酶解初期,由于非晶区的优先降解^[12],导致材料的结晶度出现轻微的提高,而在降解后期由于分子链的逐渐断裂导致分子量大幅下降,材料的热稳定性也随之下降。

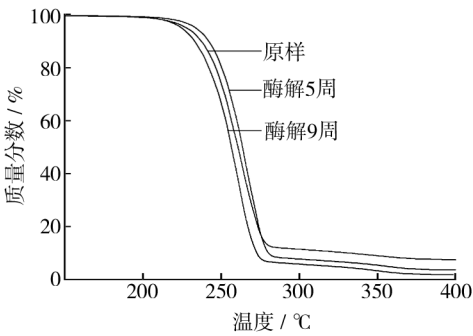


图 2 P(3HB-co-10% 4HB) 材料酶解前后热失重曲线
Fig. 2 Thermal gravity analysis curves of P(3HB-co-4HB) films before and after enzymatic degradation

2.4 X 射线衍射分析

X 射线衍射分析是利用晶体对 X 射线的衍射作用,对物质的内部结构以及物质的组成进行研究的一种分析方法。

P(3HB-co-10% 4HB) 材料酶解后的 X 射线衍射图谱见图 3。酶解前后所有样品均在 $2\theta = 13.5^\circ$ 和 $2\theta = 17^\circ$ 左右出现了特征衍射峰^[13],降解前后材料的特征衍射峰位置及强度略微发生变化,表明材料在降解过程中结晶度变化不明显。 $2\theta = 13.5^\circ$ 与 $2\theta = 17^\circ$ 处特征

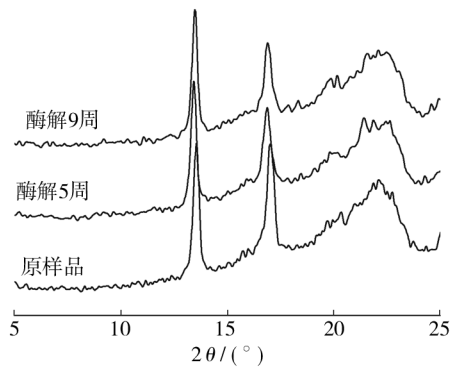


图 3 P(3HB-co-10% 4HB) 酶解前后 X 射线衍射图谱
Fig. 3 X-ray diffraction graphs of P(3HB-co-10% 4HB) before and after enzymatic degradation

衍射峰为共聚物中羟基丁酸产生的特征衍射峰^[14],材料的酶解过程从表面开始侵蚀,对材料的整体结构的影响不大,因此材料在降解过程中其结晶度变化不大。

2.5 扫描电镜结果分析

扫描电镜分析是对样品表面物质的微观形貌进行观察的一种检测方法,用来鉴定样品的表面结构,实验中应用扫描电镜观察样品表面经脂肪酶降解后被腐蚀的情况。PHB 酶解之后扫描电镜结果见图 4。

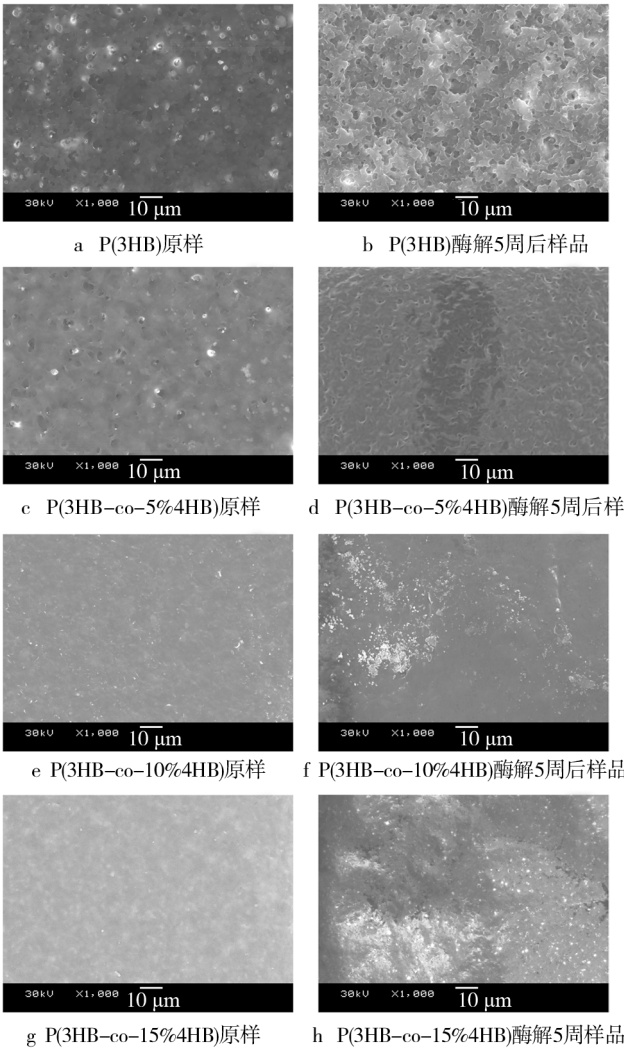


图 4 酶解前后 P(3HB-co-4HB) 样品的表面电镜图
Fig. 4 SEM of P(3HB-co-4HB) films before and after 5 weeks of enzymatic degradation

图 4 为 4 种 P(3HB-co-4HB) 材料在脂肪酶溶液中降解的 SEM 图。P(3HB) 和 P(3HB-co-5% 4HB) 的酶降解 5 周后薄膜表面形态变粗糙,并且出现大量孔洞,说明薄膜的降解程度加大。P(3HB-co-10%

4HB), P(3HB-co-15% 4HB) 降解前后, 薄膜表面的孔洞并没有 P(3HB) 和 P(3HB-co-5% 4HB) 明显。但是在 Yoshiharu Doi 等^[15]的研究中发现, P(3HB-co-4HB) 较 P(3HB) 降解速率快, 由此可以推断出, 薄膜的表面状态对材料的酶解速率有着显著的影响, P(3HB) 有着较为粗糙的表面, 使得其更加容易吸附大分子酶, 从而加速了薄膜的酶解过程, 这在失重率指标中也得到了充分验证。

3 结语

P(3HB-co-4HB) 分子中 4HB 单元的引入有效地改善了 PHB 的脆性, 材料的柔韧性得到提高, 但也给生物降解性能带来了巨大的变化。通过酶解试验表明, 随着降解时间的延长, 4 种材料的失重率均呈线性增长趋势。随着 4HB 含量的增加, P(3HB-co-4HB) 的失重率逐渐降低。此外, 在酶解前期由于非晶区的优先降解使得材料的热稳定性呈略微提高趋势, 而在降解后期随着酶解的逐渐进行, 材料的热稳定性又呈现出下降的趋势, 从 XRD 结果可以看出, 整个降解过程中材料的结晶度变化不大。通过材料表面的状态可以看出, P(3HB-co-4HB) 分子中 4HB 含量的增加, 材料表面粗糙度下降, 酶解后材料表面出现侵蚀现象, 侵蚀速率的快慢与失重率的结果一致。

参考文献:

- [1] CALABIA B P, TOKIWA Y. Biodegradability and Biodegradation of Polyesters[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2007, 15(4): 259—267.
- [2] 王建清, 李飞, 李政伟, 等. PHA/PLA 生物降解共混膜的制备[J]. 包装工程, 2011, 32(1): 36—39.
WANG Jian-qing, LI Fei, LI Zheng-wei, et al. Preparation of Biodegradable PHA/PLA Blend Film[J]. Packaging Engineering, 2011, 32(1): 36—39.
- [3] LENZ R W, MARCHESSAULT R H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastic and Biotechnology[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(1): 1—8.
- [4] HOLMES P. Application of PHB: A Microbially Produced Biodegradable Thermoplastic[J]. Physics in Technology, 1985, 16(1): 32—36.
- [5] 郭子耕, 苑静. 完全生物降解塑料的发展[J]. 包装工程, 2010, 31(9): 126—130.
- GUO Zi-geng, YUAN Jing. Development of Completely Biodegradable Plastics[J]. Packaging Engineering, 2010, 31(9): 126—130.
- [6] VERHOOGT H, RAW SAY B A, FAVIS B D. Polymer Blends Containing Polys(3-hydroxyalkanoate)[J]. Polymer, 1994, 35(24): 5155—5169.
- [7] HOROWITZ D M, CLAUS J, UNTER B K, et al. Amorphous Polymer Granules[J]. Nature, 1993, 363(6): 23.
- [8] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 生物降解过程的研究[J]. 生物化学与生物物理研究进展, 2002, 29(1): 110—113.
CHEN Shan, LIU Dong-bo, XIA Hong-mei, et al. Study on the Biodegradability of PHB[J]. Progress of Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(1): 110—113.
- [9] IWATA T, DOI Y, NAKAYAMA S, et al. Structure and Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) Copolymer Single Crystals with an Extracellular PHB Depolymerase from *Alcaligenes Faecalis* T1[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25(3): 169—176.
- [10] BARHAM P J, KELLER A, OTUN E L. Crystallization and Morphology of a Bacterial Thermoplastic: Poly-3-hydroxybutyrate[J]. Journal of Materials Science, 1984, 19(9): 2781—2794.
- [11] ABE H, DOI Y. Solid-state Structure and Enzymatic Degradabilities for Melt-crystallized Films of Copolymers of (R)-3-hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Acid[J]. Macromolecules, 1998, 31(6): 1791—1797.
- [12] KUMAGAI Y, KANESAWA Y, DOI Y. Enzymatic Degradation of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Films[J]. Chemistry and Physics, 1992, 193(1): 53—57.
- [13] TANADCHANGSAENG N, TSUGE T, ABE H. Comonomer Composition Distribution, Physical Properties, and Enzymatic Degradability of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) Copolyesters[J]. Biomacromolecules, 2010, 11(6): 1615—1622.
- [14] ZHAO Qiang, CHENG Guo-xiang, SONG Cun-jiang, et al. Crystallization Behavior and Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(Ethylene Glycol) Multiblock Copolymers[J]. Polymer Degradation and Stability, 2006, 91(6): 1240—1246.
- [15] YOSHIHARU D, YOUKO K, MASAO K. Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)[J]. Macromolecules, 1990, 23(1): 26—31.