

P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料酶解性能研究

孙炳新¹, 韩春阳¹, 罗思², 郭迎¹, 揣成智²

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

摘要: **目的** 研究 P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料在脂肪酶溶液中的生物降解性能。**方法** 将 P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料置于脂肪酶溶液中进行酶解实验, 利用质量损失率、扫描电镜(SEM)、X 射线衍射(X-RD)和偏光显微镜(POM)等测试手段或指标, 对材料的生物降解性能进行分析。**结果** 质量损失率与 SEM 结果表明, 实验用脂肪酶对 P(3HB-co-4HB)的降解效果不明显, 而对 PBS 有着较为显著的降解效果。X-RD 分析表明, P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料在 19.9° 和 22.7° 处的结晶衍射峰强度随酶解时间不断下降, 表明主要是 PBS 组分发生了降解。POM 结果表明, P(3HB-co-4HB)酶解前后球晶的形态基本不变。**结论** 实验用脂肪酶对 PBS 酯键的水解相对容易, 而对 P(3HB-co-4HB)酯键的水解难度较大, P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料在酶解时, 存在 PBS 优先降解的情况。脂肪酶酶解对材料的晶区与非晶区并没有选择性。

关键词: P(3HB-co-4HB); PBS; 脂肪酶; 酶解; 生物降解性能

中图分类号: TQ321 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2016)21-0076-05

Biodegradability of P(3HB-co-4HB)/PBS Blends in the Lipase Solution

SUN Bing-xin¹, HAN Chun-yang¹, LUO Si², GUO Ying¹, CHUAI Cheng-zhi²

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

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

ABSTRACT: The work aims to research the biodegradability of P(3HB-co-4HB)/PBS blends in the lipase solution. P(3HB-co-4HB)/PBS blends were placed in the lipase solution for experiments on enzymolysis. Biodegradability of the blends was analyzed by means of weight loss rate, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (X-RD) and polarizing microscope (POM). The weight loss rate and SEM analysis showed that the lipase degradation effect on P(3HB-co-4HB) was not obvious, while such effect on PBS was more significant. XRD analysis showed that the intensity of the blends' crystal diffraction peak at 19.9° and 22.7° decreased with the enzymolysis time, which indicated that the main degraded component was PBS. The POM results showed that the spherulite morphology of P(3HB-co-4HB) before and after enzymolysis was basically unchanged. The enzymic hydrolysis of PBS ester bond is relatively easy, while the hydrolysis of P(3HB-co-4HB) ester bond is difficult. PBS is preferentially degraded in the P(3HB-co-4HB)/PBS blends in the lipase solution. Moreover, there is no selectivity on the crystal area and amorphous area of materials during enzymatic degradation of lipase.

KEY WORDS: P(3HB-co-4HB); PBS; lipase; enzymatic degradation; biodegradability

收稿日期: 2016-04-28

基金项目: 辽宁省教育厅课题(L2014262); 辽宁省博士科研启动基金(201601109)

作者简介: 孙炳新(1981—), 男, 山东五莲人, 博士, 沈阳农业大学讲师, 主要研究方向为包装材料的研发与果蔬贮藏包装等。

传统塑料的大规模应用, 不仅消耗了大量的石油资源, 同时也带来了严重的环境问题和生态问题^[1-2]。为解决传统塑料带来的环境污染以及资源短缺的问题, 生物降解材料的研究正在受到全世界人民的关注。对于生物降解材料来说, 对其生物降解性能的评价有着重要的研究价值。在实际应用中, 材料的生物降解性能决定着其制品的使用范围与使用周期^[3]。例如生物降解材料作为包装材料使用时, 材料的降解速率应与其使用周期匹配, 如果材料降解速率快, 则材料应用后期可能会丧失其应有的作用, 而如果材料降解速率过慢, 则有可能材料在发挥结束应有的作用之后未降解完全, 对环境会造成一定程度的污染。由于生物降解材料在不同的降解环境中其生物降解性能存在显著差异, 探索它们在不同降解体系中的生物降解行为及影响因素就显得尤为重要。自然环境如海洋、湖泊、河流和土壤等含有丰富的微生物群落, 因此生物降解材料的降解主要是微生物作用, 而微生物作用主要是通过其分泌的酶逐渐将大分子聚合物解聚成断链, 并最终被微生物消化吸收^[4-5]。

3-羟基丁酸与 4-羟基丁酸共聚酯[P(3HB-co-4HB)]和聚丁二酸丁二醇酯(PBS)是目前广泛研究且已经在国内外得到商业化应用的 2 种重要的脂肪族生物聚酯材料^[6-7]。2 种生物降解材料均具有完全生物降解特性, 同时具备良好的物理性能与加工特性, 可用于包装薄膜、软包装袋、包装容器以及热成型制品的生产, 在食品包装、医药产品包装、电子产品和日用品包装等不同包装领域应用潜力巨大^[8-11]。PBS 结晶速率快, 有助于缩短共混材料的成型周期, 同时 P(3HB-co-4HB)可以明显改善 PBS 的韧性^[12], 因此 P(3HB-co-4HB)与 PBS 两者的共混复合材料是一种具备优良力学性能的新型生物降解材料。文中将针对 P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料在脂肪酶溶液中的生物降解性能展开研究, 考察材料在酶解环境下的生物降解行为及降解机理, 为开发理想稳定性与可控性降解的新型生物降解材料提供重要的理论与应用基础。

1 实验

1.1 原料

原料: P(3HB-co-4HB)(4HB 质量分数为 10%, 重均分子量 $M_w=4.06\times10^5$, $M_w/M_n=1.15$), 天津国

韵生物材料有限公司;PBS(数均分子量 $M_n=50738$; 重均分子量 $M_w=116505$), 安徽省安庆和兴化工有限责任公司;脂肪酶(Lipase PS[®])源自 *Burkholderia cepacia*, Sigma 上海贸易有限责任公司。

1.2 材料的制备

将干燥好的 P(3HB-co-4HB)与 PBS 粒料按照一定的质量比搅拌混合均匀。将混好的料通过布拉本德塑化仪共混挤出。布拉本德的 4 段温度和转速设定: 加料段温度为 150 ℃, 压缩段温度为 165 ℃, 塑化段温度为 175 ℃, 机头温度为 170 ℃, 转速为 30 r/min。P(3HB-co-4HB)/PBS 共混物的质量比见表 1。

表 1 P(3HB-co-4HB)/PBS 共混物质量比
Tab.1 The ratio of P(3HB-co-4HB) and PBS in blends

样品序号	P(3HB-co-4HB) 质量分数/%	PBS质量 分数/%	简写
1	100	0	P34
2	95	5	B5
3	90	10	B10
4	80	20	B20
5	70	30	B30
6	50	50	B50

将共混挤出的样条通过造粒机切割造粒。将粒料放置一段时间后进行压片。压片过程分为热压和冷压, 采用 45 t 平板硫化机, 进行热压成片; 冷压过程是在热压成型后马上使用 25 t 平板硫化机在 125 MPa 的压力下冷压 5 min, 进行冷压成型。成型过程是在 10 MPa 的压力下, 在 175 ℃下进行的塑化压制成型的, 热压前需要预热处理。最终压制成约 0.1 mm 厚的薄片用于拉伸性能及降解性能的测定。

1.3 脂肪酶降解

将样品放入到含有脂肪酶(1 mg/mL)与磷酸缓冲液(pH=7.4, 0.2 mol/L)的小玻璃瓶中, 于 37 ℃下恒温振荡培养箱(100 r/min)中培养, 缓冲液每 5 d 更换 1 次, 以保持酶的活力。定期取样, 将样品用蒸馏水冲洗 3 次, 置于真空干燥箱中干燥备测。

1.4 测试与表征

1) 质量损失率测定。样品的质量损失率(W_l)按式(1)计算:

$$W_1 = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_i 为样品初始质量; m_f 为降解后样品的质量。

2) 扫描电镜分析(SEM)。将样品在液氮中冷冻脆断,断面经喷金后,用日本 JEOL 的 JMS-6380LV 型扫描电镜观察材料断面的微观形貌。

3) X 射线衍射测试(X-RD)。采用丹东通达科技有限公司生产的 X 射线衍射仪(X-RD),参数设置为:以 Cu, $K\alpha(\lambda=0.154 \text{ nm})$ 作为放射源,管压为 30 kV,管流为 20 mA,在室温下扫描范围 $5^\circ \sim 55^\circ$ 记录扫描图像。用以研究 P(3HB-co-4HB)材料及其在实验过程制备的材料的晶体结构和结晶性能。

4) 偏光显微镜(POM)分析。采用重庆奥特光学产的透反射偏光显微镜,将 P(3HB-co-4HB)以及 P(3HB-co-4HB)/PBS 共混物薄片样品置于盖玻片(上下两层)内,在室温下观察降解前后样品晶体形态的变化情况。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶酶解对材料的质量损失率的影响

对于生物降解来说,诱导聚合物发生降解需要有 3 个基本条件,是聚合物链上必须含有易于发生酶解和氧化的化学键,其次是有合适的微生物或特定的酶,最后是要有适于微生物繁衍或酶作用的适宜的环境条件^[13]。研究中,由于 P(3HB-co-4HB)与 PBS 均含有容易水解或酶解的酯键,因此这 2 种材料在自然环境中的生物降解速率主要取决于是否有理想的微生物及其分泌的降解酶。关于 P(3HB-co-4HB)脂肪酶酶解的研究不多,Rodríguez-Contrera 等人利用一种从 *Pseudomonas fluorescens* 菌株筛选出来的脂肪酶 Lipase AK 对 P(3HB-co-4HB) (4HB 质量分数为 8.4%) 进行了酶解研究,研究发现该脂肪酶可以同时降解 P(3HB)和 P(4HB),并通过酶解的方法将 P(3HB-co-4HB) (4HB 质量分数为 8.4%) 的相对分子质量由 400 000 水解为 1000 ~ 5000^[14]。Tokiwa 等^[15]的研究表明,脂肪酶可以水解脂肪族聚酯的酯键,但是难以水解 PHB 的酯键。

P(3HB-co-4HB)与 PBS 及两者的共混物在脂肪酶溶液的降解质量损失率见图 1。从图 1 可以看出,实验用脂肪酶对 PBS 以及 P(3HB-co-4HB)均有不

同程度的降解效果,但是脂肪酶对 P(3HB-co-4HB)的酶解质量损失率要大大低于 PBS,表明该脂肪酶虽然可以对 PHB 的酯键进行水解但是水解难度要超过 PBS 等聚酯的难度,该结论与 Tokiwa 等人的结论略有出入^[15]。原因可能是由于脂肪酶的来源不同,由于很多微生物都可以分类提纯出脂肪酶,不同微生物种类的脂肪酶活性与专一性也不尽相同。实验采用的脂肪酶(Lipase PS[®])是由 *Burkholderia cepacia* 分离提纯而来的。通过观察共混材料的质量损失率可以发现,B5 和 B10 的酶解速率最低,比 P(3HB-co-4HB)的酶解速率还低,可能与 PBS 在 P(3HB-co-4HB)中的相容性和分布有关。而 B20, B30 和 B50 的酶解速率与 PBS 的质量分数紧密相关,均随着 PBS 质量分数的增大而逐渐增大。并且这 3 种材料在酶解的前 3 周内,酶解速率要高于纯的 PBS。猜测原因可能是由于 PBS 的优先降解使得 P(3HB-co-4HB)颗粒逐渐暴露出来并从基体脱落,从而使质量损失率变大。该猜测也在的电镜结果中得到验证,从图 2 电镜照片可以明显看出,B50 在降解 4 周后复合材料的表面聚集了很多细小的 P(3HB-co-4HB)颗粒。另外一个值得注意的情况是,在酶解 4 周后 PBS 的酶解速率远远超过了其他材料,酶解 5 周后质量损失率达到 34%以上。出现该现象的原因可能是由于酶解 4 周以后材料表面的孔洞逐渐加深并扩大,使得材料的表面积逐渐增加,从而能够吸附更多的脂肪酶,并最终导致 PBS 的酶解速率显著上升。

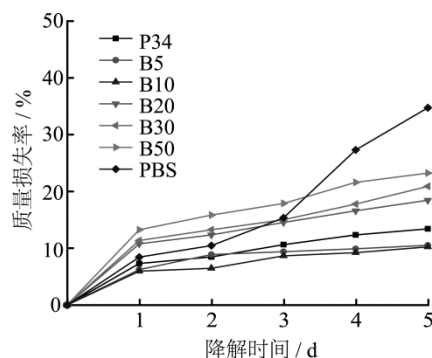


图1 P(3HB-co-4HB)及共混物在脂肪酶溶液中的质量损失
Fig.1 Weight loss of P(3HB-co-4HB) and blends biodegraded in lipase solution

2.2 脂肪酶溶液中材料表面形貌的变化

不同共混比例的 P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-4HB)/PBS 以及 PBS 在脂肪酶溶液中降解前后的表

面 SEM 照片见图 2。从图 2 可以看出, 纯 P(3HB-co-4HB)在降解前后的表面形貌变化不大, 酶解 7 d 后表面依旧光滑平整, 酶解 28 d 后表面才开始出现一些微小的孔洞或斑点。与纯 P(3HB-co-4HB)完全不同, PBS 在酶解前后表面形态变化明显, 酶解 7 d 后原先光滑的表面逐渐变得凹凸不平, 酶解 28 d 后原有的平整表面已经完全被降解, 并逐渐变为更深的、孔径更大的孔洞。电镜结果表明, 实验用脂肪酶对 P(3HB-co-4HB)的降解效果不明显, 而对 PBS 有着较为显著的降解效果。由于两者酶解速率上的较大差异, 添加 PBS 后的共混材料随 PBS 质量分数的不同发生不同程度的降解。对比 P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-4HB)/PBS 以及 PBS 酶解前后的电镜照片可以直观地看到 PBS 质量分数越高材料的降解速率越快。通过观察 B50 酶解 28 d 后的照片可以看到, 随着降解的进行, 材料表面的 PBS 组分基本降解完毕, 而对该脂肪酶不太敏感的 P(3HB-co-4HB)由于降解速率较慢被保留下来, 从而出现了不同粒径大小的 P(3HB-co-4HB)颗粒。

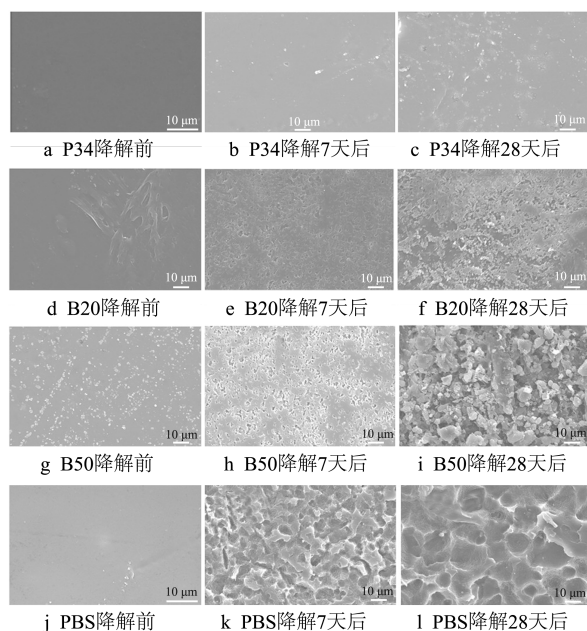


图 2 P(3HB-co-4HB)及共混物在脂肪酶溶液中降解前后的表面形态

Fig.2 SEM photographs of P(3HB-co-4HB) and blends before and after enzymatic biodegradation

2.3 脂肪酶溶液中材料降解前后 X 射线衍射分析

通过对质量损失率和电镜观察可以得到, PBS 在实验用脂肪酶溶液中存在优先降解的现象, P(3HB-co-4HB)由于对该脂肪酶不太敏感而降解速

率偏慢。P(3HB-co-4HB)/PBS(50:50)即 B50 在酶解前后的 X 射线衍射图谱见图 3, 从图 3 中可以看出随着酶解的进行, 2θ 为 19.9° 和 22.7° 处的结晶衍射峰强度逐渐降低, 而 2θ 为 13.7° 和 17.2° 处的结晶峰强度基本不变。从前期 P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料的 XRD 分析中可知, P(3HB-co-4HB)的特征衍射峰出现在 2θ 为 13.5° 和 17.1° 处, 而 PBS 的结晶衍射峰则出现在 2θ 为 19.6° 和 22.6° 处^[16-17]。酶解前后的衍射图谱表明, P(3HB-co-4HB)/PBS 共混材料中主要是 PBS 组分发生了降解, 从而使得 19.9° 和 22.7° 处的结晶衍射峰强度随酶解时间不断下降。P(3HB-co-4HB)由于对该脂肪酶不太敏感故酶解较难, 因此该组分酶解实验周期内质量损失不大, 这应该是 2θ 为 13.7° 和 17.2° 处的衍射峰强度维持不变的主要原因。

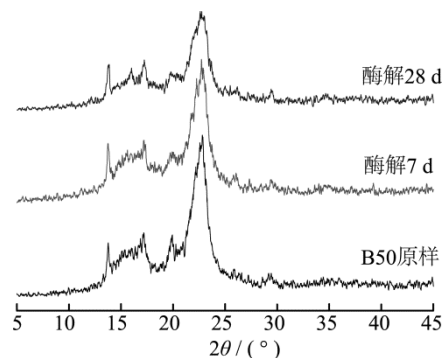


图 3 P(3HB-co-4HB)/PBS(50:50)酶解前后 X 射线衍射图谱
Fig.3 X-RD diagrams of P(3HB-co-4HB)/PBS (50:50) before and after enzymatic degradation

在 PBS 的水解和酶解实验中, 已经发现材料的水解主要以整体侵蚀的方式, 而酶解则主要以表面侵蚀的方式不断进行^[18]。尽管晶区与非晶区的致密程度不同, 但是酶降解并未表现出明显的非晶区优先降解的情形。研究中, B50 复合材料的结晶度随酶降解时间的延长而不断降低也表明, 脂肪酶酶解时并没有优先降解非晶区。该实验结果也再次验证了之前提到的脂肪酶酶解对材料的晶区与非晶区没有选择性的结论。

2.4 脂肪酶溶液中材料降解前后球晶的变化

纯 P(3HB-co-4HB)在脂肪酶溶液中降解前、降解 7 d 与 28 d 后的偏光照片见图 4。从图 4 可以看到, P(3HB-co-4HB)在酶解 28 d 后依然有着明显的黑十字消光图像, 与降解前样品相比酶解后球晶的形态基本不变。偏光照片进一步表明材料在脂肪酶

溶液中的降解属于表面侵蚀,随着降解的延长材料的厚度和质量呈现规律性的减小,因此酶解是以一种均匀的表面降解方式,逐渐由表及里的完成。由于表面的降解并不会影响到材料内部的结构,因此位于材料内部的球晶并不会受到降解作用的影响,从而使得材料在酶解前后球晶的形态基本不变。

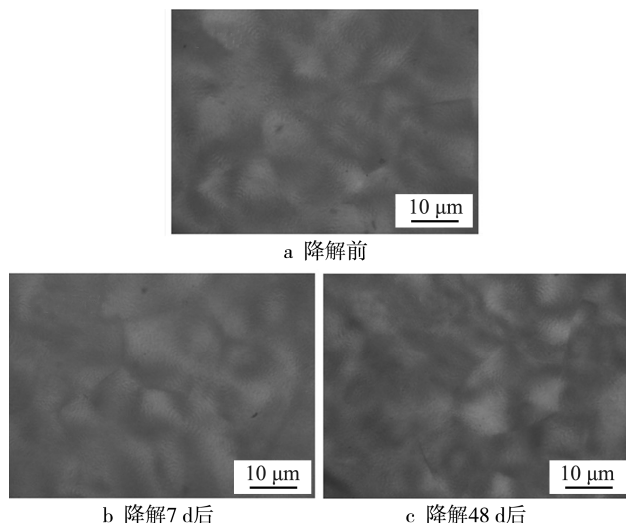


图4 P(3HB-co-4HB)在脂肪酶溶液中降解前后的球晶形态
Fig.4 Optical photographs of P(3HB-co-4HB) before and after enzymatic biodegradation

4 结语

实验用脂肪酶对 PBS 以及 P(3HB-co-4HB)均有不同程度的降解效果,其中脂肪酶对 PBS 酯键的水解相对容易,而对 P(3HB-co-4HB)酯键的水解难度较大。电镜结果与 X 射线衍射图谱表明,共混材料中存在 PBS 优先降解的情况。复合材料的结晶度随酶降解时间的延长而不断降低也表明,脂肪酶酶解时并没有优先降解非晶区。此外,偏光结果显示降解前后 P(3HB-co-4HB)材料的球晶尺寸和形状并没有出现变化,进一步验证了脂肪酶酶解对材料的晶区与非晶区并没有选择性。

参考文献:

- [1] TOKIWA Y, CALABIA B. Biodegradability and Biodegradation of Polyesters[J]. Journal of Polymers and The Environment, 2007, 15(4): 259—267.
- [2] CHEN G Q. Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP[M]. Springer: Plastics from Bacteria, 2010.
- [3] MARTIN D P, SKRALY F, WILLIAMS S F. Polyhydroxyalkanoate Compositions Having Controlled Degradation Rates[M]. Google Patents, 2003.
- [4] BASTIOLI C. Handbook of Biodegradable Polymers [M]. Smithers Rapra Technology, 2005.
- [5] 孙炳新, 揣成智, 韩春阳, 等. 水生环境下脂肪族聚酯生物降解性能研究进展[J]. 包装工程, 2012, 33(11): 129—134.
- [6] SUN Bing-xin, CHUAI Cheng-zhi, HAN Chun-yang, et al. Research Progress in Biodegradation Research of Aliphatic Polyesters under Aquatic Environment[J]. Packaging Engineering, 2012, 33(11): 129—134.
- [7] RHIM J W, PARK H M, HA C S. Bio-nanocomposites for Food Packaging Applications[J]. Progress in Polymer Science, 2013, 38(10/11): 1629—1652.
- [8] KENNOUCHE S, MOIGNE N L, KACI M, et al. Morphological Characterization and Thermal Properties of Compatibilized Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)/Poly(Butylene Succinate) (PBS)/halloysite Ternary Nanocomposites[J]. European Polymer Journal, 2016, 75: 142—162.
- [9] REDDY M M, VIVEKANANDHAN S, MISRA M, et al. Biobased Plastics and Bionanocomposites: Current Status and Future Opportunities[J]. Progress in Polymer Science, 2013, 38(10/11): 1653—1689.
- [10] KHALIL F, GALLAND S, COTTAZ A, et al. Polybutylene Succinate Adipate/Starch Blends: A Morphological Study for the Design of Controlled Release Films[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 108: 272—280.
- [11] FROLLINI E, BARTOLUCCI N, SISTI L, et al. Biocomposites Based on Poly(Butylene Succinate) and Curaua: Mechanical and Morphological Properties[J]. Polymer Testing, 2015, 45: 168—173.
- [12] CHARLON S, FOLLAIN N, CHAPPEY C, et al. Improvement of Barrier Properties of Bio-based Polyester Nanocomposite Membranes by Water-assisted Extrusion[J]. Journal of Membrane Science, 2015, 496: 185—198.
- [13] 李志庭, 郭绍强, 秦江雷. PBS/PHAs 的熔融行为和等温结晶动力学[J]. 塑料, 2008, 37(6): 54—56.
- [14] LI Zhi-ting, GUO Shao-qiang, QIN Jiang-lei. Melting Behavior and Non-isothermal Crystallization Kinetics of PHAs/PBS Blends[J]. Plastics, 2008, 37(6): 54—56.
- [15] SMITH R. Biodegradable Polymers for Industrial Applications[M]. CRC Press, 2005.
- [16] RODRÍGUEZ-CONTRERAS A, CALAFELL-MONFORT M, MARQUÉS-CALVO M S. Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Commercial Lipases[J]. Polymer Degradation And Stability, 2012, 97(4): 597—604.
- [17] TOKIWA Y, CALABIA B P. Review Degradation of Microbial Polyesters[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(15): 1181—1189.
- [18] LU X, WEN X, YANG D. Isothermal Crystallization Kinetics and Morphology of Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)[J]. Journal of Materials Science, 2011, 46(5): 1281—1288.
- [19] ZHU W, WANG X, CHEN X, et al. Miscibility, Crystallization, and Mechanical Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/Poly(Butylene Succinate) Blends[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2009, 114(6): 3923—3931.
- [20] 孙炳新, 揣成智, 韩春阳, 等. 聚丁二酸丁二醇酯生物降解性能研究[J]. 包装工程, 2014, 35(5): 83—87.
- [21] SUN Bing-xin, CHUAI Cheng-zhi, HAN Chun-yang, et al. Biodegradability of Poly(Butylene Succinate)[J]. Packaging Engineering, 2014, 35(5): 83—87.