

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2015.07.019

聚 3- 羟基丁酸与 4- 羟基丁酸共聚物薄膜的微生物降解^{*}

孟徐,邢抒华,李琳琳,高兆营,苏婷婷,杨翔华,王战勇

(辽宁石油化工大学化学化工与环境学部,辽宁抚顺 113001)

摘要:以门多萨假单胞菌为降解菌株,研究了聚 3- 羟基丁酸与 4- 羟基丁酸共聚物 [poly(3HB-co-4HB)] 薄膜的微生物降解过程。门多萨假单胞菌对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解可分为慢速降解阶段和快速降解阶段。经 10 d 的降解,薄膜的降解率可达到 94.7%。扫描电子显微镜观察发现,经微生物降解的薄膜表面因降解而形成的孔洞及蚀痕,这些孔洞及蚀痕随着降解时间的增加有着加大和加深的情况。差示扫描量热法分析发现,随微生物降解时间的增加,薄膜的熔点上升,而相对结晶度降低。X 射线衍射分析结果也进一步证实了薄膜经微生物降解后相对结晶度的降低。热重分析法也证明薄膜的热稳定性随降解时间增加而下降。

关键词:微生物降解;聚 3- 羟基丁酸与 4- 羟基丁酸共聚物;门多萨假单胞菌

中图分类号:TQ326.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-3539(2015)07-0091-04

Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Film by *Pseudomonas Mendocina*

Meng Xu, Xing Shuhua, Li Linlin, Gao Zhaoying, Su Tingting, Yang Xianghua, Wang Zhanyong

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Environmental Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China)

Abstract : The biodegradation behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) film in the presence of pseudomonas mendocina was studied. The biodegradation shows two steps degradation mechanism with first slowly and then faster. The degradation rate is nearly 95% after degradation 10 d. The surface of the degraded films at different degradation stages is observed by scanning electron microscopy. It is observed that the surface of the films is eroded and covered with holes, and the erosion and the size of holes increase with the extension of degradation time. The results of differential scanning calorimeter reveal the melting temperature of the degraded films increases and the relative crystallinity decreases with the extension of degradation time respectively. The results of X-ray diffraction further evidence the decrease of the crystallinity. The results of thermo gravimetric analyzer indicate that the thermal stability of the degrade films decreases after degradation.

Keywords : biodegradation ; poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) ; pseudomonas mendocina

石油来源的合成塑料由于其稳定性和不可降解性被废弃后会在环境中堆积而造成环境污染^[1]。人们意识到塑料造成的白色污染问题是塑料替代产品研究开发的重点,因此生物降解塑料应运而生^[2]。聚羟基脂肪酸酯(PHAs)就是生物降解塑料的典型代表。PHAs 是某些微生物在不利的生长条件下储存合成的一类聚酯化合物^[3-4]。PHAs 具有极好的生物降解和生物相容性,同时保留与传统石油来源高分子材料相似的一些性能^[5]。聚 3- 羟基丁酸与 4- 羟基丁酸共聚物 [poly(3HB-co-4HB)] 为新型的一种 PHAs 类高分子材料家族,是由富 3- 羟基丁酸微区的共聚物和富 4- 羟基丁酸微区的共聚物构成的无规共聚物,是一类典型的半结晶高分子材料^[6]。

poly(3HB-co-4HB) 属于完全生物降解塑料,但在实际应用中由于改性或加工成型经常会导致其在环境中降解缓慢。深入解析其降解过程将有助

于其进一步开发利用。笔者采用扫描电子显微镜(SEM)、热重(TG)分析法和差示扫描量热(DSC)法等高分子分析手段对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的微生物降解过程进行了分析研究。这些研究有助于深入解析 poly(3HB-co-4HB) 的微生物降解机制,为未来在其制品废弃物处理中的应用奠定研究基础。

1 实验部分

1.1 原材料

poly(3HB-co-4HB): 4- 羟基丁酸摩尔分数为 12%,天津国韵生物材料有限公司;

其它试剂: 分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

^{*} 国家自然科学基金项目(31100099),辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2014040)

联系人: 王战勇,博士,副教授,主要从事可生物降解塑料的研究

收稿日期: 2015-05-17

实验菌株为门多萨假单胞菌。基本培养基:
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.2%, KH_2PO_4 0.45%, NH_4Cl 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%,
 pH 6.5^[7]。

1.2 仪器

SEM: XL30 ESEM FEG 型, 荷兰 FEI 公司;

TG 分析仪: Pyris-1 型, 美国 Perkin-Elmer 公司;

DSC 仪: Diamond, 美国 Perkin-Elmer 公司;

X 射线衍射 (XRD) 仪: D/max-RB X 型, 日本 Rigaku 公司。

1.3 薄膜的制备与降解

将 poly(3HB-co-4HB) 粉末在 180 °C 热压机上预热 2 min, 保压 (5 MPa) 1 min 后转移到冷压机上 (室温) 冷却, 获得厚度约为 0.5 mm 的薄膜, 将其裁剪为 3 cm × 1 cm 的规则形状, 真空干燥待用。

将制备好的薄膜加入基本培养基中作为碳源, 接入实验菌株后 30 °C 振荡 (150 r/min) 培养, 定期取出薄膜, 去离子水反复清洗后 50 °C 真空干燥至恒重, 称重测定薄膜失重情况并计算薄膜的降解率。

1.4 降解薄膜的表征分析

SEM: 加速电压为 20 kV;

TG: 60 mL/min 氮气氛围, 室温升温至 500 °C, 升温速率 10 °C/min;

DSC: 40 mL/min 氮气氛围, 室温升温至 230 °C, 升温速率 10 °C/min;

XRD: CuK_α 辐射, 闪烁计数器前加石墨弯晶单色器, 管压 40 kV, 管流 100 mA, 步长 0.02 mm, 扫描速度 4 mm/min。

2 结果与讨论

2.1 薄膜的降解情况

图 1 为门多萨假单胞菌对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解曲线。由图 1 可知, 门多萨假单胞菌对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解过程可大致分为两个阶段, 即慢速降解阶段 (0 ~ 1.5 d) 和快速降解阶段 (1.5 ~ 10 d)。慢速降解阶段, 即降解的起始阶段, 新接入的微生物需时间适应新的生长环境, 并积累相应的降解酶, 因而在此阶段表现为薄膜的降解缓慢。快速降解阶段的薄膜降解率较慢速降解阶段明显增加, 这一方面与微生物的降解特性有关, 另一方面则是由于薄膜后表面积的增加有利于菌株分泌的降解酶发挥作用, 比表面积的增加在后续的 SEM 表征中得到了验证。薄膜经微生物降解 10 d 后, 其降解率达到了 94.7 %。

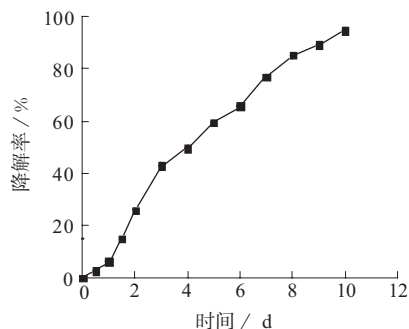
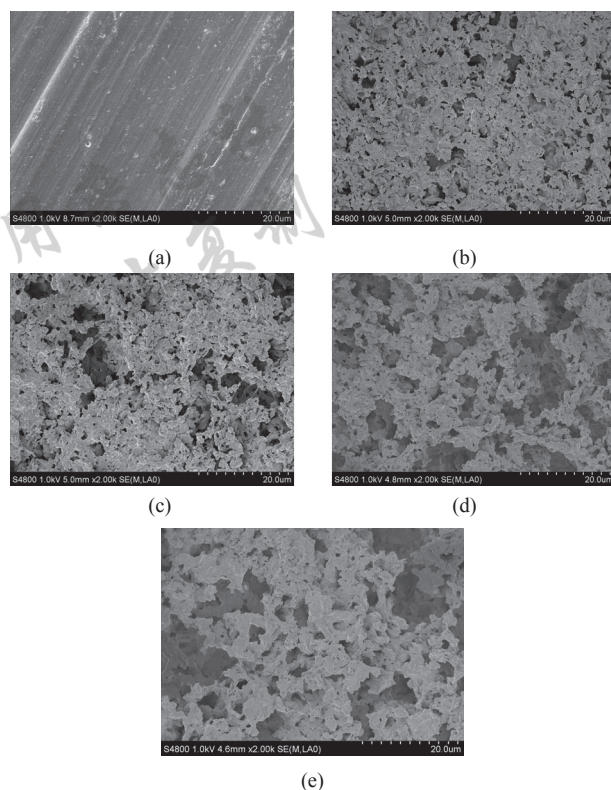


图 1 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解曲线

2.2 SEM 分析

图 2 为 poly(3HB-co-4HB) 薄膜在不同降解天数下的 SEM 照片。



a—降解 0 d; b—降解 1 d; c—降解 2 d; d—降解 6 d; e—降解 9 d

图 2 不同降解时间的 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的 SEM 照片

由图 2 可知, 降解前 poly(3HB-co-4HB) 薄膜表面 (图 2a) 相对光滑。而随着薄膜被微生物降解时间的延长, 薄膜表面由于微生物侵蚀而变得粗糙, 经微生物降解 1 d (图 2b) 的薄膜表面明显出现了蚀刻现象。降解 2 d (图 2c) 的薄膜表面粗糙度进一步增加, 而且开始出现了孔洞。粗糙的材料表面进一步增加了比表面积, 微生物分泌的降解酶可以更好地与底物接触, 从而加速降解过程^[8]。微生物降解 6 d (图 2 d) 后, 薄膜已经被严重侵蚀, 开始出现更大的孔洞。而经 9 d (图 2e) 降解的薄膜表面蚀

刻得更加严重。

2.3 DSC 分析

DSC 的表征结果及分析结果见图 3 和表 1。由图 3 和表 1 可看出,随着降解时间增加,降解后的薄膜材料的熔点有增加的现象。产生这种现象的原因是 4-羟基丁酸共聚物比 3-羟基丁酸共聚物更容易被相应的降解酶所降解^[9],而 4-羟基丁酸共聚物的优先降解,直接导致了 3-羟基丁酸共聚物单元含量的相对增加,从而使样品整体的熔点升高(3-羟基丁酸共聚物熔点 171~182℃,4-羟基丁酸共聚物熔点约 60℃)。H.Abe 等^[10]认为 PHB 均聚物由于具有规整结构结晶,微生物降解时其解聚酶易于吸附在材料表面发挥降解功能,先降解材料中的非晶部分,再降解材料中的结晶部分,因此随着降解时间的增加材料的相对结晶度表现出上升趋势,这一点在此前的研究中也得到了证实^[11]。本研究中 poly(3HB-co-4HB) 薄膜降解后的相对结晶度随着降解时间的增加总体表现出了降低的趋势。降解明显区别于 PHB 的降解过程,这与 poly(3HB-co-4HB) 中 4-羟基丁酸的植入直接相关。作为无规共聚物的 poly(3HB-co-4HB) 晶体结构要比均聚物复杂,且聚合物结晶度受共聚组成影响。在等温结晶条件下,3-羟基丁酸共聚物排斥共聚物链中的 4-羟基丁酸共聚物单元。而相关共聚物中排除在结晶组分外的无规组分区域的研究尚不清楚,因此难以依靠 DSC 分析结果进一步解释产生此现象的机制。

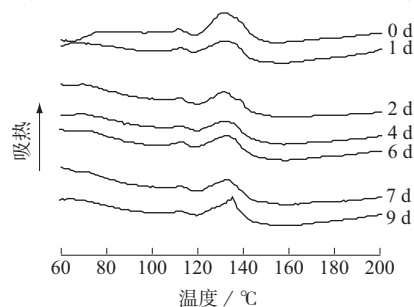


图 3 降解前后的 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的 DSC 分析

表 1 降解前后的 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的热力学参数

降解时间 / d	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{J} \cdot \text{g}^{-1})$	相对结晶度 ¹⁾ / %
0	131.42	26.126	17.77
1	132.96	19.488	13.26
2	130.98	18.195	12.38
4	133.19	15.710	10.69
6	133.38	17.514	11.91
7	134.05	17.476	11.89
9	135.23	17.962	12.22

注:1) 相对结晶度的计算是以 PHB 标准焓为参比的, PHB 标准焓为 147 J/g。

2.4 降解薄膜的 TG 分析

降解前后的 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的 TG 分析如图 4 所示。由图 4 结果显示,随着薄膜降解时间的增加,薄膜的热分解温度呈现降低的趋势。热分解温度的变化是由于随着降解过程的发生产生了聚合物分子链的断裂。而分子链的裂解则会导致聚合物分子量下降,进一步引起了分子量分布变宽,进而降低了热分解温度^[12]。

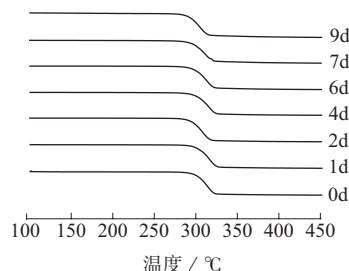


图 4 降解前后的 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的 TG 分析

2.5 XRD 分析

图 5 为未降解和降解 9 d 的薄膜的 XRD 分析图。由图 5 可见,经微生物降解 9 d 薄膜的相对结晶度降低,这进一步验证了上述 DSC 的分析。材料相对结晶度与材料的规整性有关,相对结晶度的降低表明菌株对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜发生降解作用,材料的规整性也进一步降低。

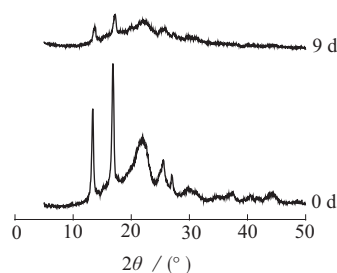


图 5 降解前后的 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的 XRD 分析

3 结论

采用高分子化学手段研究了门多萨假单胞菌对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解过程。研究发现 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解呈现慢速降解和快速降解两个阶段,实验条件下 10 d 基本可实现薄膜的完全降解。poly(3HB-co-4HB) 薄膜经微生物降解后的结晶度和热稳定性均发生了降低的现象。后续将从降解单体组成以及降解过程中降解单体的生成的角度去分析微生物对 poly(3HB-co-4HB) 薄膜的降解过程,以期进一步完整地掌握 poly(3HB-co-4HB) 的微生物降解机制,进一步促进 PHAs 类材料的推广应用,从根本上解决塑料废弃物带来的环境污染问题。

参考文献

- [1] Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(6):621-632.
- [2] Kunasundari B, Sudesh K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates[J]. Express Polymer Letters, 2011, 5(7):620-634.
- [3] Taran M. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from different carbon sources by Haloarcula sp. IRU1[J]. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2011, 50(5):530-532.
- [4] Gumel A M, Annuar MSM, Chisti Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2013, 21(2):580-605.
- [5] Khorasani M T, Mirmohammadi S A, Irani S. Polyhydroxybutyrate (PHB) scaffolds as a model for nerve tissue engineering application: fabrication and in vitro assay[J]. International Journal of Polymeric Materials, 2011, 60(8):562-575.
- [6] 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.
- [7] Wang Zhanyong, Wang Yan, Guo Ziqi, et al. Purification and characterization of poly(L-lactic acid) depolymerase from pseudomonas sp. strain DS04-T[J]. Polymer Engineering & Science, 2011, 51(3):454-459.
- [8] Wang Yawu, Mo Weike, Yao Huilan, et al. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)[J]. Polymer Degradation and Stability, 2004, 85(2):815-821.
- [9] 周琴, 陈金春, 陈国强. 高效启动子在微生物生产 4-羟基丁酸中的应用[J]. 生物工程学报, 2012, 28(1):48-55.
- [10] Abe H, Matsubara I, Doi Y. Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly[(R)3-hydroxybutyrate] and poly[(R, S)3-hydroxybutyrate] stereoisomers[J]. Macromolecules, 1995, 28(4):844-853.
- [11] Zhou Qin, Chen Jinchun, Chen Guoqiang. Application of high efficiency promoters in microbial production of 4-hydroxybutyric acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(1):48-55.
- [12] Wang Zhanyong, Lin Xiaodong, An Jing, et al. Biodegradation of polyhydroxybutyrate film by pseudomonas mendocina DS04-T[J]. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2013, 52(2):195-199.
- [13] García de María C, Hueso Domínguez K B. Simultaneous kinetic determination of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in biopolymer degradation processes[J]. Talanta, 2010, 80(3):1436-1440.

英国开发新颖焊接技术实现热塑性塑料焊缝世界最小

英国焊接研究所与剑桥大学合作开发了新颖的焊接技术,新技术将电子束光刻与激光焊接技术相结合,用于热塑性材料,形成世界最小的焊缝,带来了其在更小型生物学分析芯片、微化学反应器和微电子产品中的应用。

激光焊接的优势使其在多个行业的塑料连接中得到应用。激光焊接非常适用于复杂产品的制造,如微流体装置,其通道和结构分辨率通常低于 100 μm 。

当工业界寻求生产甚至更小型的复杂塑料零部件时,就需要新的研究来使塑料中的焊缝 $\leq 10 \mu\text{m}$ 。直到最近,最小的激光焊缝宽度测量值可能在 10~20 μm 。然而,这已达到红外激光器的分辨率极限,不可能通过单独控制激光焦点光斑大小来实现更小的焊缝。

英国焊接研究所与剑桥大学卡文迪什实验室合作,将激光吸收器精确图样着色于塑料表面,来确定焊接位置。该项目团队研究采用电子束光刻来制作吸收器图样,使得焊缝宽度小于 10 μm ,采用模制方法建造了微电子电路。主要的技术挑战是在微电子电路的边界同时生成微通道及红外吸收器痕迹,并密封通道。

研究团队以聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 热塑性塑料为基材,进行了尝试,遵循透射激光焊接的原理,在结合界面采用红外吸收性材料膜。采用电子束光刻将膜以可复制的方式模制到需要的分辨率,这样在焊接后就可以保留。采用大

量样本进行实验,连接强度得到了认可。研究团队成功验证了一系列 5 μm 通道及宽度为 1 μm 的激光焊接接头。验证了 0.5 μm 的更小焊缝,得出的结论是:制造分辨率低于 1 μm 的高密度塑料结构件是可能的;可在焊缝线外无极端加热的区域实施焊接。(中国国防科技信息网)

新材料可反射大部分阳光使建筑保持凉爽

由悉尼科技大学 (UTS) 的科学家们开发的一种新材料可以大大减少建筑物吸收的热量。

该材料由聚合物和银层制造,其用于房屋建筑中,可使屋顶周围的空气温度更低,与其它冷却屋面材料相比,该材料可进一步使温度降低 11℃。

该新材料由来自 UTS 的 Angus Gentle 和 Geoff Smith 领导的研究小组开发,其只吸收 3% 的入射光,同时也在红外波段辐射热量。即使在夏天最热的条件下,该材料的冷却效果同样有效。研究人员还发现,即使覆盖着灰尘和污垢,由该材料制备的涂层仍保持着相同的冷却效率。

Smith 说道,世界大部分人口生活在温暖的气候中。保持屋顶凉爽可以节省能源,并使建筑内部在夏天变得舒适。如果一个地区有足够多保持凉爽的屋顶,对当地气候也会产生有益的影响。

该工作已被澳大利亚研究理事会发现并列为资助项目。题目为“A Subambient Open Roof Surface under the Mid-Summer Sun”的相关论文已在《Advanced Science》上发表。

(中国聚合物网)