

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2014.02.017

聚乳酸的酶促降解研究^{*}

毛海龙,刘慧芳,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:采用蛋白酶K对聚乳酸(PLA)薄膜进行酶促降解,考察了溶液起始pH值、降解温度、蛋白酶K浓度、降解时间等因素对薄膜降解率的影响,并研究了后3种因素对溶液pH值变化趋势的影响。利用扫描电子显微镜(SEM)和X射线衍射(XRD)仪观察和分析了薄膜降解前后的形态和结晶情况。结果表明,随溶液起始pH值、降解温度、蛋白酶K浓度的增加,PLA薄膜降解率先增大后降低,随着降解时间的增加,PLA薄膜的降解率先逐渐增大,在6h后趋于稳定;获得了最合适的降解工艺参数:溶液起始pH值为9.0、降解温度为160℃、蛋白酶K浓度为0.5 mg/mL、降解时间为6h,在此条件下蛋白酶K对PLA薄膜的降解率可达(94.3±0.8)%。溶液pH值随后3种因素的变化趋势与降解率大体相反,间接反映了PLA薄膜在降解过程中生产了大量单体乳酸。SEM观察到降解后的薄膜表面形成了孔洞及蚀痕。XRD分析结果表明降解后薄膜的相对结晶度降低,晶体区域发生降解。

关键词:聚乳酸;蛋白酶K;生物降解

中图分类号: O631.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3539(2014)02-0070-04

Enzymatic Degradation of Poly (Lactic Acid) Film by Proteinase K

Mao Hailong, Liu Hui Fang, Wang Zhanyong

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

Abstract: Enzymatic degradation of Poly (lactic acid) (PLA) films were done by using proteinase K, then the effects factors, such as original pH of solution, degradation temperature, proteinase K concentration, and degradation time, on degradation rate of the films were studied. The effects of the latter 3 factors on the change conditions of pH of solution in the degradation process of PLA were studied and the morphology and crystallization conditions before and after degrading were also studied by SEM and XRD. The results show that with the increase of the original pH of solution, degradation temperature and proteinase K concentration, the degradation rate increases firstly and decreases lastly, moreover, with the increase of the degradation time, the degradation rate first increases and tends to become stable after 6 h. The optimized degradation process parameters were gained as follows: original pH of solution is 9.0, degradation temperature is 60℃, proteinase K concentration is 0.5 mg/mL, and degradation time is 6 h. Under this condition, the degradation rate of the film reaches (94.3±0.8)%. The change conditions of the pH of solution is opposite comparing with those of the degradation rate in general, which indirectly indicates that numerous lactic acid are generated in the degradation process. The holes and etching marks on the surface of the films after degradation are observed by SEM. XRD analyzing results indicates that relative crystallinity of the films decreases after degradation and the crystal areas are degraded by proteinase K.

Keywords: poly (lactic acid); proteinase K; biodegradation

聚乳酸(PLA)是一种具有优良生物相容性和生物降解性的合成高分子材料。PLA可被自然界中的微生物或酶分解,不污染环境,因而被认为是最有前途的生物可降解高分子材料^[1-2]。PLA现已广泛应用于织物纤维、医用手术缝合线、动物器官支撑弹性材料及药物缓释载体等^[3-4]。此外,PLA还可用作可降解餐盒以取代目前广泛使用的泡沫饭盒。

目前关于PLA的研究主要集中在材料改性和加工,对于PLA生物降解的研究却相对较少,目前

仅有少数降解菌株和降解酶被选育和纯化,而且关于PLA降解机制目前依然不是很清晰。来源于林伯氏白色念珠菌的蛋白酶K是一种被普遍认同的PLA降解酶,经常被用来评价PLA及含有PLA的混合物的降解性能^[5-7]。笔者采用蛋白酶K降解PLA薄膜,研究了溶液起始pH值、降解温度、蛋白酶K浓度及降解时间等因素对PLA薄膜降解率的

^{*} 辽宁省教育厅科学研究项目(L2011060)

联系人:王战勇,博士,副教授,主要从事生物降解塑料的研究

收稿日期:2013-11-20

影响,优化了降解工艺,并比较分析了 PLA 薄膜降解前后的差异,这些研究有助于实现 PLA 废弃物快速完全降解和可控降解,进一步促进生物可降解塑料替代现有塑料。

1 实验部分

1.1 主要原材料

PLA: 相对分子质量为 60 000~70 000, 浙江海正生物材料股份有限公司;

蛋白酶 K: 美国 Genview 公司。

1.2 主要设备及仪器

数字式酸度计: MODEL868 型, 美国 Thermo 公司;

扫描电子显微镜 (SEM): XL30 ESEM-FEG 型, 荷兰 FEI 公司;

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

热重分析 (TG) 仪: Pyris-1 型, 美国 Perkin-Elmer 公司。

1.3 PLA 薄膜的制备及降解

将 PLA 粉末在 180 °C 热压机上预热 2 min, 保压 1 min 后转移到冷压机上 (室温) 冷却至室温, 获得厚度为 0.1 mm 的 PLA 薄膜, 将其裁剪为 3 cm × 1 cm, 干燥称重后备用。

将蛋白酶 K 溶解于去离子水中, 使用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调节至适当的 pH 值后, 加入上述 PLA 薄膜, 保温一段时间后取出, 将降解后的薄膜用去离子水清洗后干燥称重。

1.4 降解前后 PLA 薄膜的表征

PLA 薄膜降解率依据式 (1) 计算:

$$\text{降解率} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 ——降解前 PLA 薄膜的质量, g;

m_2 ——降解后 PLA 薄膜的质量, g。

使用酸度计检测降解后溶液的 pH 值变化情况;

采用 SEM 观察降解前后的 PLA 薄膜, 加速电压为 20 kV;

采用 XRD 表征 PLA 薄膜降解前后相对结晶度的变化, 检测条件为 Cu K_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°(2 θ)/min;

采用 TG 分析降解前后 PLA 薄膜的热分解, 检测条件为氮气流速速率 30 mL/min, 加热速率为 10 °C/min, 扫描范围 100 ~ 600 °C。

2 结果与讨论

2.1 降解工艺因素对 PLA 薄膜降解率的影响

(1) 起始 pH 值的影响。

在蛋白酶 K 浓度为 0.2 mg/mL、降解温度为 50 °C 的条件下, 对 PLA 薄膜降解 12 h, 考察溶液的起始 pH 值对 PLA 薄膜降解率的影响, 结果如图 1 所示。

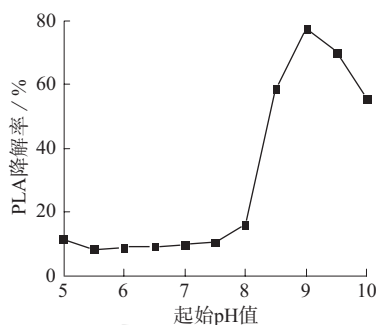


图 1 起始 pH 值对 PLA 薄膜降解率的影响

由图 1 可以看出, 起始 pH 值为 5.0~8.0 的范围内, PLA 薄膜降解率很低, 说明蛋白酶 K 在酸性条件下几乎不显示降解活性。当溶液起始 pH 值达到 8.5 后 PLA 薄膜的降解率显著提高, 当起始 pH 值为 9.0 时 PLA 薄膜的降解率最高。此后随起始 pH 值的继续增大, PLA 薄膜降解率呈现下降趋势, 因此可确定 9.0 为较适宜的降解起始 pH 值, 高于或低于这个 pH 值都会影响酶活性, 从而降低 PLA 薄膜的降解率。

随着 PLA 的降解, 会有降解产物——乳酸单体及其寡聚体产生, 而其中乳酸会对溶液 pH 值有较大的影响, 故可通过研究溶液 pH 值随各因素的变化来间接反映降解时乳酸单体生成的情况。

(2) 降解温度的影响。

在溶液起始 pH 值为 9.0、蛋白酶 K 浓度为 0.2 mg/mL 的条件下, 对 PLA 薄膜降解 12 h, 考察降解温度对 PLA 薄膜降解率和溶液 pH 值的影响, 结果如图 2 所示。

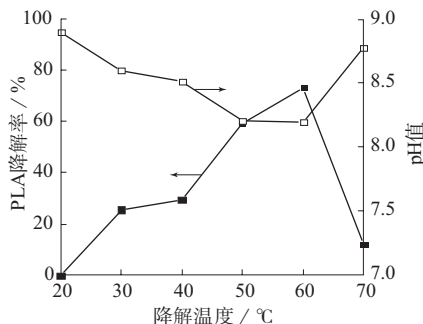


图 2 降解温度对 PLA 薄膜降解率和溶液 pH 值的影响

由图2可知,PLA薄膜的降解率随降解温度升高呈现先上升后下降的趋势,当降解温度为60℃时PLA薄膜的降解率最高。另一方面,降解12 h后的溶液pH值随降解温度的变化趋势与降解率正好相反,这说明降解率越高,生成的降解单体乳酸就越多,进而导致溶液pH值降低,所以当降解温度为60℃时,溶液pH值的降低最为明显。

(3) 蛋白酶K浓度的影响。

在溶液起始pH值为9.0、降解温度为60℃的条件下,对PLA薄膜降解12 h,考察不同蛋白酶K浓度对PLA薄膜降解率和溶液pH值的影响,结果如图3所示。

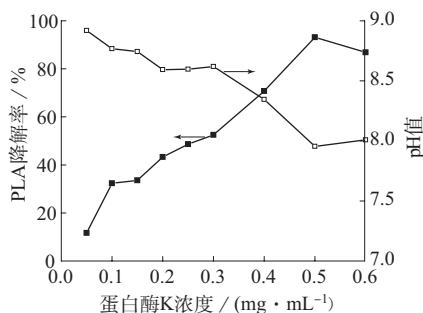


图3 蛋白酶K浓度对PLA薄膜降解率和溶液pH值的影响

由图3可以看出,随着蛋白酶K浓度的不断增加,PLA薄膜降解率也不断升高。当蛋白酶K浓度提高至0.5 mg/mL时PLA薄膜降解率已接近100%,此后继续增加蛋白酶K浓度,降解率反而有所下降。酶解12 h后溶液pH值随蛋白酶K浓度变化的趋势也表明了蛋白酶K浓度为0.5 mg/mL时PLA薄膜降解生成的乳酸最多。

(4) 降解时间的影响。

在降解温度为60℃、溶液起始pH值为9.0,蛋白酶K浓度为0.5 mg/mL的条件下,考察降解时间对PLA薄膜降解率和溶液pH值的影响,结果如图4所示。

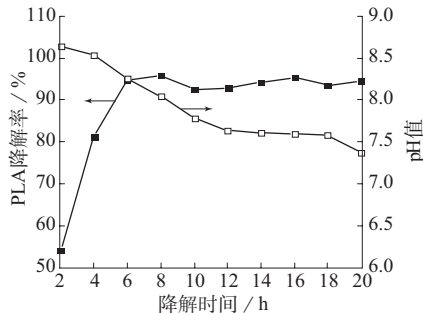


图4 降解时间对PLA薄膜降解率和溶液pH值的影响

根据图4可以看出,降解时间在2~6 h时,PLA薄膜降解率随降解时间呈现上升趋势,而后随着降

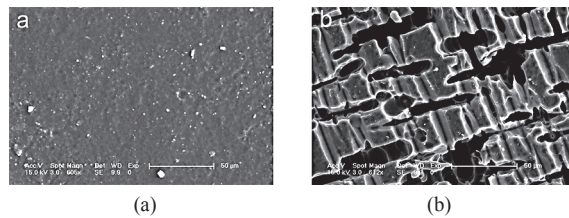
解时间继续增加,酶活性不断下降,导致PLA薄膜降解率基本保持不变;另外溶液pH值随着降解时间的增加而下降,说明在此时间段内PLA薄膜降解速度较快,生成较多的乳酸单体,因此溶液pH值下降显著。而在降解时间6~10 h内,降解率基本保持恒定的情况下,pH值下降速度仍较快,这种现象应该是由部分乳酸寡聚体随着时间的增加进一步分解为乳酸而造成的。之后随着时间的延长,导致PLA薄膜降解率和pH值的变化不再明显。

综上所述,选定了溶液起始pH值为9.0、降解温度为60℃、蛋白酶K浓度为0.5 mg/mL、降解时间为6 h的降解工艺参数,在此工艺参数下PLA薄膜的降解率可达(94.3 ± 0.8)%。

另外,通过溶液pH值的变化也可以间接反映出PLA薄膜在酶促降解过程中生产了大量的单体——乳酸。因而在后续的研究中,将开展以乳酸生成为监控指标的PLA可控降解研究,以实现在PLA废弃制品的可控降解,回收乳酸,实现PLA循环利用,这将有助于PLA制品使用成本的降低,促进PLA相关制品的推广应用。

2.2 PLA薄膜降解前后的SEM分析

采用SEM观察降解前后PLA薄膜的微观表面形态,结果如图5所示。



a—降解前; b—降解后

图5 PLA薄膜经蛋白酶K降解前后的SEM照片比较

由图5a可见,未降解的PLA薄膜表面相对比较光滑;而经蛋白酶K降解后的PLA薄膜表面被侵蚀,薄膜表面粗糙度增加,出现类似水流蚀刻痕迹,且有狭长孔洞出现。粗糙和多孔的材料表面可使得酶和水分子更好地接触聚合物分子链,从而加速薄膜材料的降解。

2.3 PLA薄膜降解前后的XRD分析

PLA薄膜降解前后的XRD分析如图6所示。由图6可见,PLA薄膜的XRD谱图由两部分叠加而成,一部分是晶态产生的尖锐峰(衍射峰),另一部分出现隆起即非晶态产生的弥散隆峰,表明此无规共聚物材料的晶态与非晶态“两相”差别明显。衍射峰的强度和结晶度有一定的关系,可根据峰的

尖锐程度来衡量材料的结晶程度。一般来说,结晶度高的晶体的衍射峰相对要尖些,图6所示经蛋白酶K降解后PLA薄膜的衍射峰发生峰尖降低和减少的情况,反应了相对结晶度的降低,进而说明酶的作用使得PLA薄膜晶体区域转为不规则的非晶态区域。相对结晶度与材料的分子规整性有关,相对结晶度的降低表明薄膜发生了降解,且薄膜的分子规整性降低。

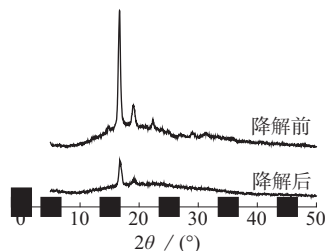


图6 降解前后的PLA薄膜的XRD分析

3 结论

(1) 随溶液起始pH值、降解温度和蛋白酶K浓度的增加,PLA薄膜的降解率均先增大后减小;随着降解时间的增加,PLA薄膜的降解率先逐渐增大,在6h后趋于稳定。

(2) 确定了适于蛋白酶K降解PLA薄膜的降解反应工艺参数:溶液起始pH值为9.0、降解温度为60℃、蛋白酶K浓度为0.5 mg/mL、降解时间为6h。此工艺参数下PLA薄膜的实际降解率可达 $(94.3 \pm 0.8)\%$ 。

(3) 在PLA薄膜的降解过程中,随降解温度、蛋白酶K浓度和降解时间的增加,溶液pH值的变化趋势与降解率大体上相反,这间接反映了PLA薄膜在酶促降解过程中生成了大量的降解单体——乳酸。

(4) SEM直观地观察到了因降解而在PLA薄

膜表面形成的孔洞及蚀痕。

(5) XRD的分析结果表明降解后PLA薄膜的相对结晶度降低,晶体区域发生降解。

参考文献

- [1] 张宁,张俊杰.生物高分子材料聚乳酸研究新进展[J].河北理工大学学报:自然科学版,2010,32(3):116-119.
Zhang Ning, Zhang Junjie. Recent progress in study of biomacromolecular material polylactide[J]. Journal of Hebei Polytechnic University: Social Science Edition, 2010, 32(3): 116-119.
- [2] 刘佳,张薇.新型生物降解材料聚乳酸综述[J].贵州化工,2008,3(3):18-20.
Liu Jia, Zhang Wei. Comprehension of biodegradable polymer materials polylactic acid[J]. Guizhou Chemical Industry, 2008, 3(3): 18-20.
- [3] 董奇伟.聚乳酸降解性能研究进展[J].塑料制造,2011(3):66-69.
Dong Qiwei. Research progress of degradation of PLA[J]. Plastics Manufacture, 2011(3): 66-69.
- [4] 翁云宣.聚乳酸合成、生产、加工及应用研究综述[J].塑料工业,2007,35(6):69-73.
Weng Yunxua. Review of study of synthesis, production, process and application of PLA[J]. China Plastics Industry, 2007, 35(6): 69-73.
- [5] Tokiwa Y, Calabia B P, Ugwu C U, et al. Biodegradability of plastics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(9): 3722-3742.
- [6] 李凡,王莎,刘巍峰,等.聚乳酸(PLA)生物降解的研究进展[J].微生物学报,2008,48(2):262-268.
Li Fan, Wang Sha, Liu Weifeng, et al. Progress on biodegradation of polylactic acid—A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(2): 262-268.
- [7] Li Suming, Tcnnon M, Garrcau H, et al. Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, DL- and meso-lactides[J]. Polymer Degradation and Stability, 2000, 67(1): 85-90.

有序地发展。

(雅式)

珠海聚碳酸酯项目总承包合同签订

日前,南京工程公司与中海油能源发展股份有限公司正式签订珠海精细化工项目主装置聚碳酸酯总承包合同。

该公司表示将严格执行该合同,严抓安全质量,在标准化、规范化管理上树标杆,秉承“一家人、一条心、一个目标、一股劲”的合作精神和理念,努力执行好珠海项目,实现双方共赢。

中海油表示,南京工程在项目前期做了大量细致的准备工作,体现了对珠海项目的高度重视。双方在中海油丙烯酸及酯项目中建立了良好的合作基础,相信今后能够合作得更好。他们希望公司要特别重视安全管理,保证质量、进度可控,把珠海项目打造成精品工程。

(中环网)

《塑料门窗设计及组装技术规程》将出台

建筑行业为积极响应国家节能降耗的号召而开发的塑料门窗凭借其优良性能获得市场认可,但市场上仍存在一些质量低劣的塑料门窗,对此国家已采取相应措施。工程建设行业标准《塑料门窗设计及组装技术规程》目前已经形成送审稿,正准备上报住建部审批。

目前来看,尽管塑料门窗的生产和应用发展较快,但仍存在一些不良现象,如质量低劣,制作安装人员专业技术水平不高,价格恶性竞争等损害了塑料门窗市场的整体形象,也给塑料门窗行业的发展带来不利影响。

《塑料门窗设计及组装技术规程》的制定与实施,让塑料门窗的设计与组装技术有章可循,并进一步保证产品的性能,有望提高塑料门窗的质量水平,促进塑料门窗行业健康、