

# 溶剂对脂肪酶降解高分子量 PBS 及改性共聚物的影响

张敏<sup>1,2</sup>, 丁明亮<sup>1</sup>, 张婷<sup>1</sup>, 杨金明<sup>1</sup>

(1. 陕西科技大学教育部轻化工助剂化学与技术重点实验室, 西安 710021;  
2. 浙江温州轻工研究院, 温州 325003)

**摘要** 采用固定化脂肪酶分别在四氢呋喃(THF)、甲苯及 THF 和甲苯的混合溶剂体系中, 对高分子量的 PBS 及 PBS/CHDM 共聚物进行了催化降解, 用 GPC 测定了降解产物的分子量, 用质谱(MS)对降解产物进行了分析, 用 FTIR 表征了产物化学结构. 研究表明, 在脂肪酶的作用下, 对  $M_n$  在  $10^5$  以上的 PBS, 在 THF 体系中可降解到  $1.4 \times 10^4$ , 而在甲苯体系中可降解到  $4 \times 10^4$ ; 但在 THF 和甲苯的混合体系中, 可将  $M_n$   $10^5$  以上的 PBS 和 PBS/CHDM 共聚物都可降解为  $0.1 \times 10^4$  以下的原料单体、一至四环状低聚物及少量线型低聚物. 分析了水含量对酶解反应的影响.

**关键词** 脂肪酶降解; PBS 改性共聚物; 原料单体; 环状低聚物; 线型低聚物

**中图分类号** O631      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2010)03-0612-04

脂肪族聚酯因其主链柔顺且含有易水解的酯键, 在微生物的作用下或通过酶的催化能够发生降解反应, 作为可生物降解材料已成为开发研究的热点<sup>[1,2]</sup>. 其中聚丁二酸丁二醇酯(PBS)具有良好的生物相容性和生物降解性而受到更多的关注<sup>[3,4]</sup>. 高分子材料在微生物的作用下进行生物降解是由多种因素控制的, 反应过程比较复杂, 特别是自然环境中微生物的种类、土壤的成分、酸碱度、温度和湿度等因素都影响降解效果<sup>[5,6]</sup>. 因此, 自然环境中的生物降解过程难以控制. 相对于自然环境中微生物的作用, 脂肪酶催化降解脂肪族聚酯具有许多突出的优点: (1) 可以在不同介质及温和条件下进行反应; (2) 可以控制降解环境, 针对某个已知化学结构的聚合物进行系统的降解速度研究; (3) 反应简单, 过程单一, 影响因素少, 有利于研究降解机理; (4) 脂肪酶本身来源于生物资源, 可循环利用, 为阐明生物降解材料的降解机理开辟了一条全新的道路, 并且对同类生物降解材料的研究具有重要意义. Lenglet 等<sup>[7]</sup>采用酶降解聚  $\epsilon$ -己内酯与聚乳酸(PCL/PLA)的共聚物, 在 5 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中长时间降解, 得到了低聚酯; Okajima 等<sup>[8]</sup>在超低压甲苯体系中或超临界  $\text{CO}_2$  流体中利用酶促降解分子量为  $2.2 \times 10^4$  的 PBA 得到环状低聚物. 但对高分子量共聚物的酶降解研究及得到线型产物或单体的研究还未见报道. 本文采用不同溶剂体系, 使用丙烯酸树脂固定化脂肪酶, 对高分子量的 PBS 及 1,4-CHDM 改性的 PBS 共聚物进行了酶降解反应, 研究了不同极性的有机溶剂和水含量对其反应的影响, 以求得到降解产物为原料单体, 实现资源循环再利用.

## 1 实 验

### 1.1 试剂和仪器

聚丁二酸丁二醇酯(PBS)和 1,4-环己二醇(CHDM)聚丁二酸丁二醇酯 PBS/CHDM 参照文献[9]方法自制; 甲苯、四氢呋喃(THF)和氯仿( $\text{CHCl}_3$ )均为分析纯, 西安化学试剂有限公司; 固定化假丝酵

收稿日期: 2009-05-31.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50673056)、温州科技计划项目(批准号: H20080045)和陕西省重大科技创新项目(批准号: 2009ZKC08-09)资助.

联系人简介: 张敏, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事环境友好型高分子材料的合成、应用及基础理论研究.

E-mail: zhangmin@sust.edu.cn

母菌脂肪酶[CA: Novozym435] 10000 plu/g, 日本诺维有限公司. 所有试剂均直接使用, 固定化酶和溶剂均可循环利用. Nicolet NEXUS-470 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); HT3-515 GPC 仪(美国 Waters 公司); MALDI-TOF-MS 质谱仪(英国 Micromass 公司).

### 1.2 四氢呋喃体系中酶降解 PBS

在 50 mL THF 中加入 5 mL 蒸馏水、0.1 g CA 酶和 0.5 g PBS, 水浴加热至 60 °C, 反应 30 h, 过滤回收酶, 蒸发回收溶剂, 得到降解产物.

### 1.3 甲苯体系中酶降解 PBS

在 150 mL 甲苯中加入 5 mL 蒸馏水、0.4 g CA 酶和 0.5 g PBS, 水浴恒温 80 °C, 匀速搅拌, 反应 30 h 后, 过滤回收脂肪酶, 蒸发回收溶剂, 得到降解产物.

### 1.4 混合溶剂体系中酶降解 PBS 和 PBS/CHDM 共聚物

在 20 mL THF 中, 加入少量蒸馏水、0.08 g CA 酶和 0.5 g PBS 或 PBS/CHDM, 在常压于 60 °C, 反应 12 h 后, 加入一定体积甲苯(THF 与甲苯体积比为 2:1), 继续反应 12 h, 过滤回收 CA 酶, 蒸发回收溶剂, 得到降解产物, 用 THF 进一步纯化产物.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同溶剂体系对 PBS 酶降解的影响

表 1 为在 CA 酶的作用下, 不同溶剂体系中降解 PBS 产物的 GPC 分析结果. 在 THF 体系中, PBS 的  $M_n$  从  $1 \times 10^5$  降到  $1.4 \times 10^4$ , 在甲苯体系中, PBS 的  $M_n$  从  $1 \times 10^5$  降到  $4.0 \times 10^4$ , 在 THF 和甲苯混合体系中, PBS 的  $M_n$  从  $1 \times 10^5$  降到  $1.0 \times 10^3$  以下. 研究表明, PBS 在 THF 中的降解性比在甲苯中好, 在混合溶剂体系中降解性能最好. 这可能是少量水的存在对酶解反应起着一定的影响作用, 水在 THF 中能够均匀分散, 有利于提高酶的活性, 而在甲苯体系中, 水不能和甲苯很好地相溶, 影响了酶的活性, 导致降解性能不高, 但在 THF 和甲苯混合体系中, PBS 在降解过程中产生的降解产物在甲苯中比在 THF 中能更好地溶解, 有利于酶的进攻, 产生了较好的降解效果.

Table 1 GPC results of PBS in different solvents

Solvent system	PBS		Product	
	$M_n$	$M_w$	$M_n$	$M_w$
THF	$10.00 \times 10^4$	$17.80 \times 10^4$	$1.40 \times 10^4$	$2.702 \times 10^4$
Toluene	$10.00 \times 10^4$	$17.80 \times 10^4$	$4.00 \times 10^4$	$9.303 \times 10^4$
THF/toluene mixed solvent	$10.00 \times 10^4$	$17.80 \times 10^4$	$0.08 \times 10^4$	$0.150 \times 10^4$

### 2.2 在混合溶剂体系中 PBS 和 PBS/CHDM 共聚物的酶降解

GPC 结果(表 2)表明, 在 THF 和甲苯混合溶剂体系中, 在 CA 酶的作用下, PBS 和 PBS/CHDM 共聚物都具有较好的降解行为,  $M_n$  从  $1 \times 10^5$  降到  $1.0 \times 10^3$  以下. PBS 和 PBS/CHDM 共聚物的 MS 结果[图 1(A)]表明, PBS 降解后 290 ( $m/z$ ) 为丁二酸丁二醇酯/丁二酸低聚物 ( $BS_1 SA_1$ ) 的离子峰, 362 ( $m/z$ ) 为线型丁二酸丁二醇酯二聚体 ( $BS_2$ ) 的离子峰, 518 ( $m/z$ ) 为线型丁二酸丁二醇酯三聚体 ( $BS_3$ ) 的离子峰, 714 ( $m/z$ ) 为线型丁二酸丁二醇酯四聚体 ( $BS_4$ ) 的离子峰. PBS/CHDM 共聚物降解后[图 1(B), (C), (D)], 出现 90 ( $m/z$ ) 的丁二醇(BDO)离子峰, 144 ( $m/z$ ) 的 CHDM 离子峰, 190 ( $m/z$ ) 的线型  $BS_1$  的离子峰, 300 ( $m/z$ ) 的环状  $BS_1 CHDM_1$  的离子峰, 346 ( $m/z$ ) 的线型  $BS_2$  的离子峰; 484 ( $m/z$ ) 的环状  $BS_3$  的离子峰. 结果表明, PBS 降解后得到的多为线型低聚物, 其分子量略高于共聚物的降解产物, 并且不存在单体; 但所有的 PBS/CHDM 共聚物的降解产物中都含有 BDO 单体; 当共聚物的质量

Table 2 Molecular weight of PBS and PBS/CHDM in THF and toluene mixed solvent

Feed mass ratio of PBS/CHDM	Polymer		Product	
	$M_n$	$M_w$	$M_n$	$M_w$
100:0	$10.00 \times 10^4$	$17.80 \times 10^4$	800	1470
95:5	$10.46 \times 10^4$	$21.74 \times 10^4$	600	1132
90:10	$13.80 \times 10^4$	$37.50 \times 10^4$	500	1230
80:20	$12.50 \times 10^4$	$26.10 \times 10^4$	484	960

比为80:20时,其降解产物中还含有 CHDM 单体,同时不仅有线型的低聚物而且还有环状低聚物存在.这是因为 CHDM 的加入破坏了 PBS 主链的螺旋结构,降低了结晶性<sup>[9]</sup>,使共聚物比 PBS 更容易降解.另外,产物中存在其它低分子量物质,可能是由于降解得到的低聚物和单体都有一定的活性,在酶的作用下低聚物和单体之间有可能发生反应,也可能发生分子内环化.

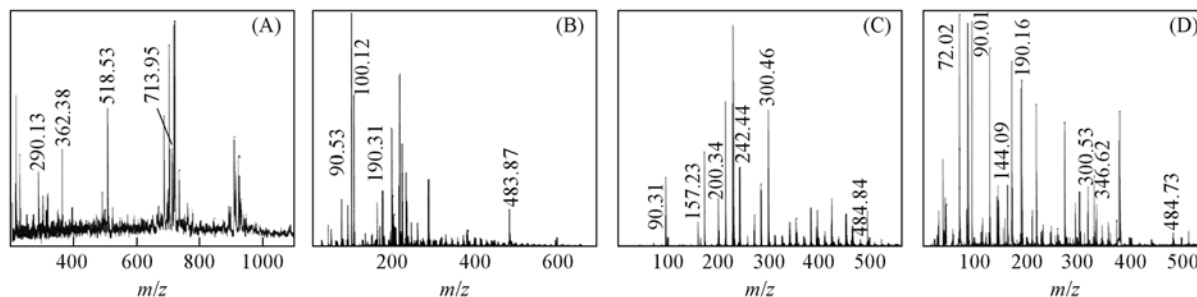


Fig. 1 MS spectra of biodegradation products of PBS and PBS/CHDM catalyzed by lipase

Mass ratio of PBS/CHDM: (A) 100:0; (B) 95:5; (C) 90:10; (D) 80:20.

### 2.3 混合溶剂体系中水的含量和降解率的关系

图2为混合溶剂体系中酶解反应体系中水的含量和降解率的关系.降解产物是低分子量物质,极性强,不溶于 $\text{CHCl}_3$ ,可溶于THF,降解后的产物用 $\text{CHCl}_3$ 洗涤后,除去分子量较大的产物后称重,用降解前后的质量比来计算聚合物消耗量.用 $\text{CHCl}_3$ 洗涤降解产物后,回收洗液,蒸发回收 $\text{CHCl}_3$ ,得到未完全降解的聚合物并称重.水的含量直接影响酶的活性和PBS或共聚物在体系中的溶解性,少量水的存在可以保持酶的高活性;水量过多,大量水包裹在酶表面,使酶很难与聚合物分子链接触,同时水含量过多也会导致聚合物在体系中的溶解度下降.研究结果还表明,当水含量为1~3 mL时,PBS的酶降解率急剧增加,最大值为85%;水含量为3~8 mL时,随着水量的增加,PBS酶降解率下降,最低值为22%;水含量为1~5 mL时,共聚物的酶降解率急剧增加,最大值超过85%;水含量为5~8 mL时,随着水含量的增加,PBS酶降解率下降,最低值约为50%.其中PBS/CHDM共聚物亲水性比PBS好,水含量的增加在一定范围内不影响底物浓度,所以最佳水含量比PBS体系高;共聚物中PBS/CHDM(质量比80:20)亲水性更好,有利于酶催化酯键水解反应,所以在水含量为5 mL时可完全降解.在各体系中水含量与底物降解率的关系基本一致,只是在单一溶剂中水的含量相应放大.

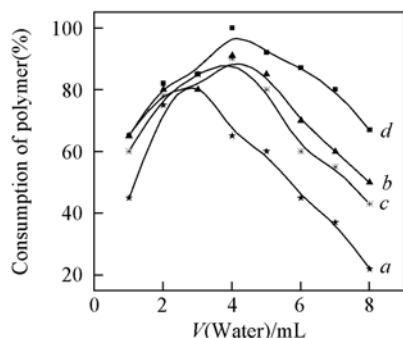


Fig. 2 Relationship of water quantity and consumption of polymer catalyzed by lipase

Mass ratio of PBS/CHDM: a. 100:0; b. 95:5; c. 90:10; d. 80:20.

### 2.4 酶的回收率

图3为酶的利用次数与酶回收率的关系.在实验的溶剂体系中脂肪酶均可多次回收利用,第一次反应后,酶的回收率为95%,随着反应次数的增加,酶的回收率依次为80%,65%和40%,呈下降趋势.这是由于溶剂的溶胀、高转速机械力和温度等因素的影响,破坏了酶的载体,导致了酶的流失.

### 2.5 混合溶剂体系中酶降解PBS产物的红外光谱分析

图4为PBS与PBS共聚物酶解后低聚物的FTIR谱图.在图4谱线a中,1850~1650  $\text{cm}^{-1}$ 为PBS的酯键峰,但在低聚物中只有弱的吸收,表明羰基含量减少,说明PBS在降解过程中酯键大量被破坏.

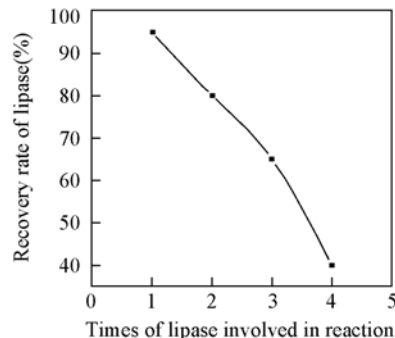


Fig. 3 Recovery utilization rate immobilized lipase

2925  $\text{cm}^{-1}$  为甲基和亚甲基的 C—H 峰, 降解产物的 C—H 峰比 PBS 的峰要尖锐, 这是由于 PBS 分子链中形成的分子间氢键所致, 而降解产物为低分子量物质, 没有氢键作用, 因此 C—H 峰很尖锐; PBS 的—OH 峰强度弱, 低聚物的—OH 峰感应强, 峰面积大, 表明低聚物中端基—OH 增多, 也证明了 PBS 酶降解后得到了低聚物。

综上所述, 在脂肪酶的作用下, 在不同溶剂体系中对  $M_n$  达  $10^5$  以上的 PBS 和 PBS/CHDM 共聚物都有一定的降解效果, 对于 PBS, 在甲苯中可降解到  $4 \times 10^4$ ; 在 THF 中可降解到  $1.4 \times 10^4$ ; 但在 THF 和甲苯混合溶剂中, 可将 PBS 和 PBS/CHDM 共聚物都降解到  $0.1 \times 10^4$  以下, PBS 的降解产物多为线型低聚物; 而共聚物的降解产物可以得到原料单体及一至四环状低聚物, 并伴有少量线型低聚物。

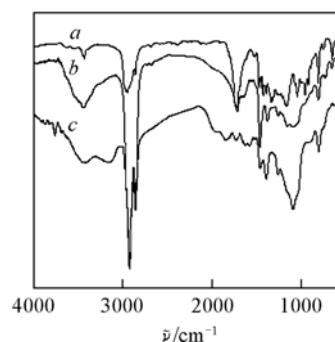


Fig. 4 FTIR spectra of PBS (a) and oligomer from enzyme catalysis biodegradation of PBS (b) and PBS/CHDM (c)

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Yutaka T., Calabia B. P. J. Polym. Environ. [J], 2007, **15**: 259—267
- [ 2 ] Massardier-Nageotte C., Pestre V., Cruard-Pradet T. Polym. Degrad. Stab. [J], 2006, **91**(3): 620—627
- [ 3 ] ZHANG Min(张敏), WANG Xiao-Xia( 王晓霞), LIU Bao-Jian(刘保健). Polymer Materials Science & Engineering( 高分子材料与工程)[J], 2008, **24**(1): 91—93
- [ 4 ] ZHANG Min(张敏), WANG He-Ping(王和平), CUI Chun-Na(崔春娜). China Synthetic Resin and Plastics(合成树脂及塑料)[J], 2008, **25**(4): 23—26
- [ 5 ] Soledad Marqués-Calvo M., Cerdà-Cuéllar M., Kint D. P. R. Polym. Degrad. Stab. [J], 2006, **91**(4): 663—671
- [ 6 ] Vidal R., Martinez P., Mulet E. J. Polym. Environ. [J], 2007, **15**: 159—168
- [ 7 ] Lenglet S., Li Suming, Vert M. Polym. Degrad. Stab. [J], 2009, **94**(4): 688—692
- [ 8 ] Sachiko O., Reiko K., Kazunobu T. Biomacromolecules[J], 2003, **4**:1514—1519
- [ 9 ] ZHANG Min(张敏), LAI Shui-Li(来水利), SONG Jie(宋洁), Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(6): 1246—1249

## Effect of Solvent on the Enzyme Catalysis Biodegradation of PBS with High Molecular Weight and Its Modified Copolymer

ZHANG Min<sup>1,2\*</sup>, DING Ming-Liang<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, YANG Jin-Ming<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Auxiliary Chemistry and Technology for Chemical Industry, Ministry of Education,

Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;

2. Zhejiang Wenzhou Research Institute of Light Industry, Wenzhou 325003, China)

**Abstract** PBS and PBS/CHDM copolymers with high molecular weight were degraded *via* immobilized lipase in different polar solvents, such as toluene, tetrahydrofuran, and mixed solvent of toluene and tetrahydrofuran, respectively. The degradation products were analyzed by mass spectrometry (MS). The chemical structure was characterized by FTIR. And the molecular weight was determined by GPC. Under the function of immobilized lipase, PBS with  $M_n = 100000$  can be degraded to  $M_n = 40000$  in toluene and to  $M_n = 14000$  in tetrahydrofuran system. While in mixed solvent of toluene and tetrahydrofuran, PBS and PBS/CHDM with  $M_n$  more than 100000 can be degraded to below  $M_n = 1000$ . The products almost are monomer, 1—4 cyclic oligomer, linear oligomer and a small amount of linear oligomer. The existence of a small amount of water has a certain impact on enzymatic reaction.

**Keywords** Lipase degradation; Modified copolymer of PBS; Monomer; Cyclic oligomer; Linear oligomer  
(Ed.: W, Z)