化学合成聚 3-羟基丁酸酯薄膜的生物降解性

王 竞 周集体 阎永红 刘 炼 宿 波

(大连理工大学环境工程系, 大连 116012 E-mail: ajiti@zingko.dlut.edu.cn) (大连理工大学高分子材料系, 大连 116012)

摘要 利用土壤埋藏、海水降解、活性污泥及高等真菌降解实验对化学法合成的聚 3-羟基丁酸酯(PHB)薄膜进行了生物降解性研究. 结果表明, 降解 PHB 薄膜的微生物分布比较广泛; 水解作用和酸解作用在 PHB 生物降解过程中对其失重率影响很小(3.5% 以下); 液态摇动培养不利于木素降解菌云芝 5.48 对 PHB 薄膜的降解(培养至第 20d, PHB12 和 PHB27 仅降解 17.8% 和 13.5%); PHB 薄膜的结晶度比分子量对其生物降解性影响更大, 结晶度增加则生物降解性降低.

关键词 化学合成, 聚 3-羟基丁酸酯, 生物降解性, 降解塑料, 担子菌.

The Biodegradation of Chemically Synthesized Poly (3-hydroxybutyrate) Films

Wang Jing Zhou Jiti Yan Yonghong

(Dept. of Environmental Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012 E-mail: zjiti@gingko.dlut.edu.cn)

Liu Lian Su Bo

(Dept. of Polymeric Materials, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract The biodegradation of chemically synthesized poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) films was studied by the basidiomycetes, activated sludge, soil, and seawater experiments. It was found that PHB-degrading microorganisms are widely distributed in natural environments; hydrolytic and acidic degradation shows little influence on biodegradation rate of PHB film (below 3.5%); the shake culture is unfavourable to the biodegradation of PHB12 and PHB27 for *Coriolus versicolor* 5.48 (degraded 17.8% and 13.5% at the 20th day respectively); the biodegradability of PHB film decreases with an increase in its crystallinity, which has a stronger influence over its biodegradation than the molecular weight.

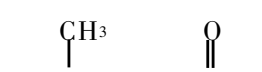
Keywords chemical synthesis, poly(3-hydroxybutyrate), biodegradation, degradable plastics, basidiomycetes.

有关完全生物降解塑料的开发, 对聚 3-羟基丁酸酯 PHB、聚 ε-己内酯 PCL 及其共聚物的研究最为深入, 并已商品化[1-5]. 国外的许多研究表明, PHB 无论在好氧、厌氧环境中, 均可完全被降解. 据统计, 环境中 PHB 分解菌可占 0.8%—11.0%[6,7]. 但目前对 PHB 的研究一般均集中在其发酵工艺和发酵产物 PHB 的酶或微生物降解方面[8-15], 而化学合成 PHB 的生物降解研究则甚少. 近年来国外采用改进的化学法合成 PHB[16,17]. 本研究的目的是考察化学法合成的 PHB 薄膜在不同环境条件下的生物降解情况, 以期对它的生物降解性作以正确评价并对其合成工艺的改进提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) PHB 薄膜 PHB12 和 PHB27 膜均采用 $ALEt_3/H_2O$ 引发体系聚合 β-丁内酯制备, 通过 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱及 IR 谱确定其结构为:



PHB12 和 PHB27 的物理参数如表 1 所示.

(2) 活性污泥及其培养基 活性污泥取自大连春柳污水处理厂, 其培养基组成为(g/L):

王竞: 男, 30 岁, 博士, 讲师

收稿日期: 1997-12-27

葡萄糖 20, NH_4Cl 5.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, 酵母浸汁液 0.6.

(3) 真菌及其培养基 树舌 5.624, 灰管层孔菌 5.132, 杂色云芝 5.48, 粗皮侧耳 5.42, 裂褶菌 5.53, 贝壳状草耳 5.154, 均购自中科院北京微生物研究所菌种保藏中心. 斜面培养基为葡萄糖马铃薯培养基[18], 降解培养基参见文献[21].

表 1 2种 PHB 薄膜的物理参数

薄膜	粒度/ml·g^{-1}	相对分子质量	全同含量/%	熔化温度/℃	担伸强度/MPa	断裂伸长率/%
PHB12	71.2	68686	22	165	2.9	157
PHB27	44.6		30	167	4.2	38

1.2 方法

(1) 土壤埋藏实验 土壤取自大连理工大学化工学院花园土. 将剪成长方形(2.0×8.0cm^2)的 PHB 薄膜和土壤(湿度 20% 左右)装入 1000ml 烧杯中, 置于 28℃的恒温箱中并保持其湿度在 90% 以上, 定期取样(每次 3 片)测定失重率.

(2) 海水降解实验 海水分别取自大连东海头海域、星海公园和北大桥海域. 将剪成长方形(2.0×5.0) 的 PHB 薄膜与海水(200ml) 装入 500ml 三角瓶中, 放入恒温(20℃) 恒湿(湿度 90% 以上) 培养箱中, 定期取样(每次 3 片) 测定薄膜失重率.

(3) 平皿培养实验 参考美国 ASTM 生长分级法, 将灭菌后的降解培养基倒入平皿, 凝固后在其表面铺一片 2.0×2.0cm^2 酒精灭菌的 PHB 薄膜, 每个平皿接种 0.2ml 真菌种子液, 28℃恒温培养 30d, 观察真菌在薄膜表面的生长情况.

(4) 真菌种子液制备 用接种刀取 3 小块真菌斜面, 放入装有葡萄糖马铃薯液体培养基(75ml) 的 250ml 三角瓶中, 28℃摇床培养 72h, 加无菌玻璃球摇动后, 取培养液至无菌离心管中, 3000r/min 离心 15min, 无菌条件下倾去上清液, 以磷酸盐缓冲溶液(pH7.2) 取代, 再离心一次, 倾去上清液以磷酸盐缓冲溶液取代之, 即为真菌种子液.

(5) 活性污泥降解实验 将灭菌后的活性污泥培养基(75ml) 和长方形 PHB 薄膜放入 250ml 三角瓶中, 加入 5ml 活性污泥, 30℃、180r/min 摇床培养, 定期取样(每次 3 片) 测定失重率.

(6) 真菌降解实验 将加入 1.0% 葡萄糖的降解培养基 75ml 置于 250ml 三角瓶中, 灭菌后加入酒精灭菌的 PHB 薄膜, 接种 5ml 种子液, 八层纱布封口, 28℃、160r/min 摇床培养, 定期取样(每次 3 片) 测定薄膜失重率.

(7) PHB 薄膜失重率测定 用水反复冲洗降解后的 PHB 薄膜表面, 干净后置于烘箱 80℃干燥至恒重后称量, 与膜降解前重量差值即为失重量, 再除以膜降解前重量即为失重率.

2 结果与讨论

2.1 高等真菌对化学合成 PHB 薄膜的降解

目前已分离到降解 PHB(发酵生产的) 的微生物大部分是细菌, 如产碱杆菌 *Alcaligens faecalis*、假单胞菌 *Pseudomonas lemoignei* 等[7,8], 而真菌较少, 其中主要是曲霉属和青霉属[7]. 担子菌能够产生降解木素、变性木素、纤维素等的酶系, 已应用到纸浆漂白废水脱色、多环芳烃降解、五氯酚降解等许多研究中[19,20]. 但尚未见用于分解生物降解性塑料的报道. 本研究考察了 6 种担子菌对化学合成 PHB 薄膜的降解情况, 结果如表 2 所示.

表 2 担子菌在化学合成 PHB 薄膜表面的生长情况/%

薄膜	树舌 5.624	杂色云芝 5.48	灰管层孔菌 5.132	粗皮侧耳 5.42	裂褶菌 5.53	贝壳状草耳 5.154
PHB12	10—30	30—60	0—10	10—30	不生长	0—10
PHB27	1—10	10—30	0—10	0—10	不生长	10—30

由表 2 可见, 除裂褶菌 5.53 外, 其它 5 种担子菌均可在 PHB 表面生长, 其中云芝 5.48 长势最好, 这说明裂褶菌 5.53 不能分泌 PHB 降解酶, 无法以 PHB 为唯一碳源生长, 而其它菌则可以. 杂色云芝(*Coriolus versicolor*) 是木素降解能力较强的一种白腐菌, 本实验证实它对 PHB 亦有一定的降解能力. 云芝在摇瓶条件下降解 PHB 随培养时间的变化如图 1 所示.

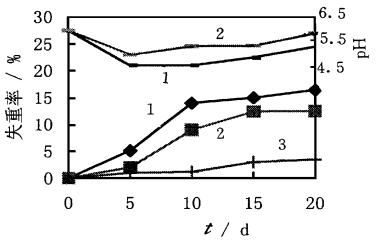


图 1 云芝对 PHB 薄膜的降解率随培养时间的变化

1. PHB12 2. PHB27 3. 对照

从图 1 可以看到, 在不接种微生物且控制 pH= 5 的条件下(对照) 摇动 20d, PHB 的失重率在 3.5%以下, 说明 PHB 的降解主要由云芝产生的胞外降解酶所致, 而酸解作用很小. 云芝在摇床培养过程中, PHB 降解率随培养时间延长而提高, PHB12 降解率略高于 PHB27, 培养至第 20d, 二者分别降解 17.8% 和 13.5%, 这可能是由于在该培养条件下不适于云芝 5.48PHB 降解酶的产生, 或其降解酶在 pH5—5.5 范围内活性不高, 固态培养可能更有利于 PHB 薄膜的降解.

2.2 PHB 薄膜的活性污泥降解

本实验考察的化学合成 PHB 薄膜在好氧

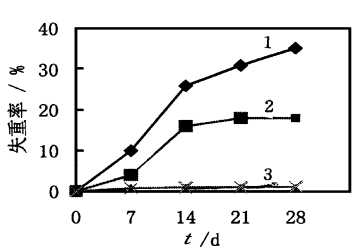


图 2 2 种 PHB 薄膜在活性污泥中的降解

1. PHB12 2. PHB27 3. 对照

活性污泥中的降解情况如图 2 所示. 由图 2 可知, 在无菌水对照条件下, 水解作用对 PHB 薄膜的降解影响非常小[7,9], 而活性污泥经第一周的适应期后, 进入快速降解阶段, 14d 后, PHB12 降解速率开始下降, 而 PHB27 难以进一步降解, PHB12 膜降解速率高于 PHB27. 这主要是由于 PHB27 结晶度高所致, 大量研究表明, 聚合物的生物降解性随着其结晶度和相对分子质量的增加而降低[10,17]. 但从本实验结果可知, 虽然 PHB12 的相对分子质量高于 PHB27, 但前者更易降解, 这可能是由于 PHB 结晶度比相对分子质量对其生物降解性影响更大[8].

2.3 海水对 PHB 薄膜的降解

PHB12 薄膜在海水中的降解情况如图 3

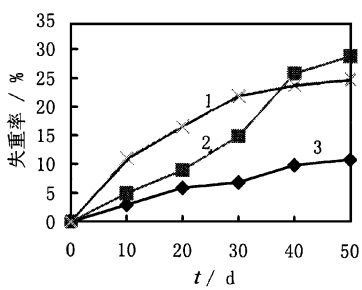


图 3 PHB12 薄膜在海水中的降解

1. 东海头海水 2. 星海公园海水 3. 北大桥海水

所示. 由图 3 可知, 不同海域的海水对 PHB 薄膜的降解能力有一定差别, 其中北大桥海水降解能力最差, 其原因除与海水污染程度较轻有关外, 还可能是其中的菌群分布不同所致. 实验中还发现随着培养时间的延长, PHB 薄膜逐渐变脆. PHB 降解酶首先从 PHB 表面的非结晶区开始降解, 然后再降解结晶区[10]. 因此, 随着非结晶区的不断降解, PHB 薄膜结晶度开始上升, 膜逐渐变脆, 降解速率减慢.

2.4 PHB 薄膜在土壤中的降解

表 3 显示了化学合成 PHB12 薄膜在土壤中的降解结果. 由表 3 可知, 随着埋藏时间的增加, PHB 膜降解率增加, 膜表面也出现明显的菌落生长痕迹. 一般认为, PHB 薄膜的生物降解是表面降解, 其分解机理包括: 微生物在表面形成菌落的半球状分解(不区别结晶部分和非

结晶部分)和微生物分泌的酶的选择性分解(更快分解非结晶部分)[5]. 因此, 当培养至60d时, PHB薄膜失重率可达60%以上. 另外, 本实验结果与细菌PHB土壤降解相比较可知[9], 后者降解速率更快, 降解率更高, 其原因可能在于细菌PHB是由单一的R型单体构成, PHB12是由R型和S型混合单体构成, 而R-3-羟基丁酸的三聚体是PHB降解酶最小的底物, PHB降解酶对R型立体块活性最高, 对S型立体块则无活性[17], 所以S型单体的存在将明显降低PHB的生物降解性.

表3 PHB12薄膜在土壤中的降解

薄膜编号	埋藏时间/d	平均失重率/%
1—3	15	8.1
4—6	30	10.3
7—9	45	39.5
10—12	60	61.8

3 结论

(1) PHB薄膜在土壤、活性污泥、海水中, 都有不同程度的降解.

(2) 水解作用和酸解作用在PHB薄膜的生物降解中对其失重率影响很小.

(3) 液态摇动培养不利于木素降解菌(云芝5.48)对PHB薄膜的降解.

(4) 在PHB薄膜化学合成工艺中, 调节S型单体含量及结晶度可以有效控制PHB薄膜的生物降解性.

参 考 文 献

1 Anderson A L, Dawes E A. Occurrence, metabolism, metablic Role, and Industrial Uses of Bacterial Poly(3-hydroxyalkanoates). Microbiol. Rev., 1990, **54**(4): 450—472

2 Kita K, Ishimaru K, M Teraoka M et al.. Properties of Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from a Marine Bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**(5): 1727—1730

3 Iwamoto A, Tokiwa Y. Effect of the Phase Structure on Biodegradation of Polypropylene/Poly(ϵ-caprolactone) Blends. J. Appl. Polym. Sci., 1994, **52**: 1357—1360

4 Benedict C V, Cameron J A, Samuel J. Polycaprolactone Degradation by Mixed and Pure Cultures of Bacteria and a Yeast. J. Appl. Polym. Sci., 1983, **28**: 335—342

5 杨惠娣. 生物降解塑料的现在和将来. 国外塑料, 1996, **14**(3): 11—21

6 Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H. Micro-bial Degradation of an Aliphatic Polyester with a High Melting Point, Poly(Tetramethylene Succinate). Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**(5): 1828—1832

7 Mergaert J, Webb A, Anaderson C et al.. Microbial Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Soils. Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59**(10): 3233—3238

8 Doi Y, Kanesawa Y, M Kunioka. Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-Co-4-hydroxybutyrate). Macromolecules, 1990, **23**: 26—31

9 高海军, 陈坚, 褚国成等. 不同环境条件下聚羟基烷酸(PHAs)薄膜生物降解性研究. 中国环境科学, 1997, **17**(4): 330—334

10 Kumagai Y, Kanesawa Y, Doi Y. Enzymatic Degradation of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Film. Makromol. Chem., 1992, **193**: 53—57

11 Budwill K, Fedorak P M, Page W J. Methanogenic Degradation of Poly(3-hydroxyalkanoates). Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**(4): 1398—1401

12 Vrmeneta J. Castella J M, Guerrero R. Biodegradation of Poly(3-hydroxyalkanoates) in a Lake Sediment Sample Increases Bacterial Sulfate Reduction. Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**(5): 2046—2048

13 Nishida H, Tokiwa Y. Effects of Higher-order Structure of Poly(3-hydroxybutyrate) on Its Biodegradation. J. Appl. Polym. Sci., 1992, **46**: 1467—1476

14 Ramsay B A, Langlade V, Carreall P J et al.. Biodegradability and Mechanical Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate)-Starch Blends. Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59**(4): 1242—1246

15 高海军, 陈坚, 吴玉娴等. 聚-β-羟基烷酸薄膜的好氧和厌氧降解. 环境科学, 1997, **18**(4): 17—20

16 Kumagai Y, Doi Y. Physical Properties and Biodegradability of Blends of Isotactic and Atactic Poly(3-hydroxybutyrate). Makromol. Chem. Rap. Commun., 1992, **13**: 179—183

17 Jesudason J J, Marchessult R H, Saito T. Enzymatic Degradation of Poly([R,S]β-hydroxybutyrate). J. Environ. Polym. Degrad., 1993, **1**(2): 89—98

18 白毓谦, 方善康, 高东等. 微生物实验技术. 济南: 山东大学出版社, 1987

19 Haimann R A. Fungal Technologies for the Treatment of Hazardous Waste. Environ. Progress, 1995, **14**(3): 201—203

20 林鹿, 王双飞, 陈嘉翔. 白腐菌对蔗渣浆CEH漂白废水的脱色. 工业水处理, 1996, **16**(3): 25—26

21 Araki T, Hayase S. Biodegradability of Synthetic β-Substituted Poly-β-Esters. J. Polym. Sci. (Polym. Chem. Edit.), 1979, **17**: 1877—1881