

辣根过氧化物酶催化改性二元接枝淀粉的 制备及性能研究

徐少军 范雪荣* 王 强 徐 进

(江南大学纺织服装学院,生态纺织教育部重点实验室,无锡 214122)

摘 要 以玉米淀粉、丙烯酸(AA)和丙烯酸甲酯(MA)为原料,利用辣根过氧化物酶/乙酰丙酮/过氧化氢(HRP/ACAC/H₂O₂)引发体系制备二元接枝淀粉。研究了接枝反应条件对接枝效果及接枝产物性能的影响。结果表明:AA与MA成功接枝到淀粉上;当反应时间为4h、HRP酶浓度为12U/mL、总单体/淀粉比为4:6、AA/MA投料摩尔比为3:7时,淀粉接枝AA/MA效果最佳,接枝率为39.16%,接枝效率为30.26%;经过酶促改性后的淀粉溶液黏度与黏弹性增加,提升了其成膜性;且随着丙烯酸投料比的增加,接枝淀粉的亲水性和断裂强度均提高,而断裂伸长率降低,且接枝产物有一定的抑菌性。

关键词 辣根过氧化物酶,淀粉,乙烯基单体,流变性,亲水性

Research on preparation and property of binary grafted starch slurry based on HRP system

Xu Shaojun Fan Xuerong Wang Qiang Xu Jin

(School of Textile and Clothing, Key Laboratory of Science and Technology of Eco-Textile,
Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract Binary grafted starch was prepared with corn starch, acrylic acid (AA) and methacrylate (MA) by using horseradish peroxidase (HRP)/acetyl acetone (ACAC)/hydrogen peroxide (H₂O₂). The effects of grafting reaction conditions on grafting and grafting properties were studied. The results showed that AA and MA successfully grafted onto starch. The best reaction condition was $t = 4\text{h}$, HRP enzyme concentration 12U/mL, monomer/starch ratio = 4:6, AA/MA feeding molar ratio of 3:7. The graft rate was 39.16% and graft efficiency was 30.26%. The viscosity and viscoelasticity of starch solution were increased after enzymatic modification. In addition, with the increase of acrylic feeding ratio, the hydrophilicity and fracture strength of grafted starch were increased, while the elongation of fracture was decreased, and the grafting products had certain bacteriostatic properties.

Key words HRP, starch, vinyl monomer, rheological property, hydrophilily

淀粉是一种广泛存在于植物组织中的天然高分子材料,然而,由于分子结构上的缺陷导致其成膜性差、易腐败,影响了其储存及应用效果^[1]。为改善淀粉的性能缺陷,常用化学^[2]或物理法^[3]对其结构进行改性,但该方法存在成本高、能耗大等不足。最近研究表明,接枝淀粉生物酶法制备具有高效率催化功能、作用条件温和、生态友好、活性可调节等特点^[4-5]。这使其在接枝淀粉材料领域有着广泛的应用前景,其接枝产物可用做皮革^[6]、制备高性能絮凝剂^[7]及浆料^[8]等。

辣根过氧化物酶(HRP)作为一种高活性酶,受到了国内外研究人员的关注,且常被应用于乙烯基单体与淀粉的接枝聚合反应中。然而,目前HRP催化的接枝淀粉多为一元单体接枝共聚,但单体种类限制了接枝淀粉的性能^[9-10]。如:刘岗等^[9]通过HRP酶催化淀粉接枝丙烯酸酯。虽增加了接枝产物的吸水性,但单体丙烯酸酯具有硬脆的特点而难以提升接枝产物的断裂伸长率。Wang等^[10]通过HRP酶催化淀粉接枝柔性单体丙烯酸丁酯从而增加淀粉材料的韧性,但仍存在接枝率过高而难溶于

基金项目:国家自然科学基金(21674043)

作者简介:徐少军(1993-),男,硕士研究生,主要从事纺织生物技术的研究。

联系人:范雪荣,教授,博士生导师,主要从事纺织材料与纺织生物技术的研究。

水的缺点。单一接枝柔性单体或亲水性单体难以满足对淀粉材料的性能要求。因而,探求一种新方法以进一步改善接枝淀粉性能具有重要意义。

本研究选取性能相互弥补的疏水性柔性单体丙烯酸甲酯及亲水性单体丙烯酸作为接枝物,利用 HRP/乙酰丙酮(ACAC)/H₂O₂ 酶催化体系,催化单体同时接枝至淀粉。制备黏度高、可塑性强、亲水性好,且具有一定抑菌性、不易腐败的二元接枝产物。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

玉米淀粉,沂水大地玉米开发有限公司;辣根过氧化物酶(HRP,酶活,332.49U/mg),阿拉丁试剂有限公司;丙烯酸(AA)、丙烯酸甲酯(MA)、双氧水(H₂O₂,质量分数为30%)、乙酰丙酮(ACAC)、氢氧化钠、盐酸,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

红外光谱仪(FT-IR,360 Nicolet AVATAR 型),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;旋转流变仪(Physica MCR301 型),奥地利 Anton Paar 有限公司;接触角仪(JC2000C 型),上海中晨数字技术设备有限公司;电子万能材料试验机(3385H 型),美国 Instron 公司。

1.2 接枝淀粉的制备

将总质量为4g、摩尔比分别为1:9、3:7、5:5、7:3、9:1的丙烯酸(中和度为95%)和丙烯酸甲酯加入到装有搅拌转子的三口烧瓶中,再依次加入质量分数为6%的100g糊化淀粉、96mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7),0.6mL ACAC,置于35℃恒温水浴中。通氮气排出空气30min后,加入8mg HRP并逐滴滴加完0.1mL H₂O₂。在氮气保护下于35℃的恒温水浴中反应3h后,用400mL乙醇沉淀,并依次用乙醇与甲醇反复洗涤,离心,去除未反应的单体、聚丙烯酸(PAA,溶于甲醇)及其他试剂。丙烯酸/丙烯酸甲酯共聚物分子量较小,经参考文献[11]及实验测定,可用65℃温水反复洗涤除去,得到接枝初产物。将初产物用丙酮于索氏提取器中抽提24h,去除聚丙烯酸甲酯(PMA),得到纯净的接枝共聚物,将其置于105℃烘箱中烘至绝干^[8]。

1.3 测试与表征

采用KBr压片法对淀粉、均聚物和接枝淀粉进行FT-IR测试,波数范围4000~500cm⁻¹,分辨率4cm⁻¹。

二元接枝淀粉的接枝率(GP)为接枝支链质量占淀粉质量的百分比,其接枝效率(GE)则为接枝单体的利用率,按式(1)和式(2)计算^[10]。

$$GP = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$GE = \frac{M_1 - M_0}{M_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中, M_0 为原淀粉的质量,g; M_1 为接枝淀粉的总质量,g; M_2 单体在接枝反应中加入的总量,g。

制备8mL质量分数为6%的溶液,用旋转流变仪测试其流变行为。剪切速率的测量范围为0~100s⁻¹,动态为0~10s⁻¹,间隙为0.5cm,流变仪的测定温度为25℃^[12]。

1.4 淀粉膜的制备及性能分析

配制质量分数为6%的淀粉及接枝淀粉水溶液。将溶液倾倒在聚四氟乙烯模具中,在20℃、相对湿度62%的条件下自然风干成膜,剪裁备用。

亲水性测试:将淀粉膜置于接触角仪平台上,于10cm高处滴下3μL去离子水,10s时进行拍照,测量接触角。每个样品测3次,取平均值。

机械性能测试:参照GB/T 3923.1—2013测定膜的断裂强力和断裂伸长率,膜长为80mm,宽为5mm,平均厚度0.45mm。每组样品测10样,取平均值。

1.5 抑菌实验

将实验器材及150mL去离子水等置于灭菌器灭菌,冷至室温。将培养基均匀倒入24个培养皿。吸取原菌液1mL稀释50倍备用。待培养基凝结成凝胶状时,每个培养皿中加50μL稀释菌液,用涂菌棒涂匀。取0.1mL 0.1g/m样品放入对应的培养皿,用涂菌棒涂匀。放入37℃培养箱中培养,24h后,取出培养皿记录各培养皿菌落数,进行对比^[13]。

2 结果与讨论

2.1 FT-IR 分析

图1为玉米淀粉、均聚物与接枝淀粉的FT-IR谱图。由图可见,玉米淀粉在3120~3752cm⁻¹和2925cm⁻¹处的吸收峰为淀粉—OH和C—H的伸缩振动吸收峰;在1154cm⁻¹、1076cm⁻¹和1024cm⁻¹处出现了淀粉中葡萄糖环的特征吸收峰^[14]。接枝淀粉除了保持淀粉特征峰,还在1732cm⁻¹处出现聚丙烯酸甲酯中C=O的特征吸收峰、1434cm⁻¹处出现—CH₂—的弯曲振动吸收峰。由于AA与MA的游离共聚物已经除去,C=O特征吸收峰应为淀粉分子链上所接枝的丙烯酸甲

酯。而聚丙烯酸中的 $-\text{COO}^-$ 基团伸缩振动峰在 1584cm^{-1} 处也出现在接枝淀粉的红外峰上^[15]。这表明在 HRP 的催化下,淀粉与丙烯酸及丙烯酸甲酯发生了接枝共聚反应。

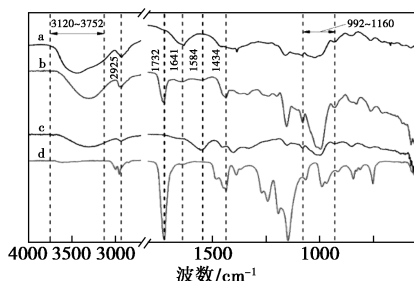


图1 玉米淀粉(a)、丙烯酸/丙烯酸甲酯接枝淀粉(b)、聚丙烯酸(c)和聚丙烯酸甲酯(d)的 FT-IR 谱图

2.2 反应条件对接枝率的影响

分别对不同反应时间、HRP 酶浓度、单体总用量及单体投料比条件下的接枝实验进行单体总接枝率及接枝效率测试(反应温度及 pH 采用 HRP 酶的最适条件,且控制单一变量时,其他条件均为最优值),结果见图 2—图 5。

由图 2 可知,随着反应时间的延长,总接枝率和接枝效率呈现出先增后减的趋势,且反应时间为 4h,接枝率和接枝效率均达到最高。在反应初期,酶促引发体系引发 ACAC 产生大量的自由基,接枝率和接枝效率迅速提高。随着反应时间延长,接枝共聚和均聚反应在中后期时接枝参数下降,这可能由于聚丙烯酸与聚丙烯酸甲酯接枝支链因高聚合度而不稳定脱落。

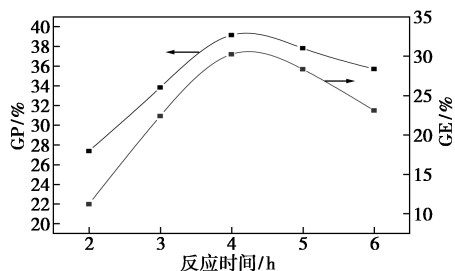


图2 反应时间对接枝淀粉总接枝率及接枝效率的影响

由图 3 可见,随着 HRP 酶浓度增大,单体总接枝率和接枝效率逐步增加并于 12U/mL 时达到最大;这是因为 HRP 酶浓度的增加能够催化更多的淀粉分子上羟基自由基与单体进行接枝共聚反应,接枝率和接枝效率随之增大。但当 HRP 酶浓度超过 12U/mL 时,接枝效果开始下降。这是由于酶用量过大使引发速率过快,加剧了单体间均聚、共聚反应,这两种反应方式与接枝共聚反应竞争抑制了接

枝共聚反应的进行。

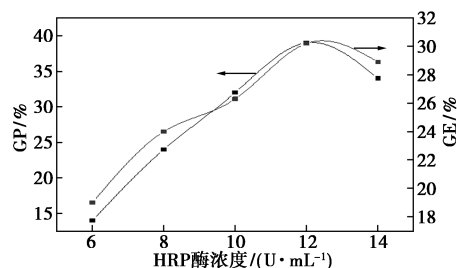


图3 HRP 酶浓度对接枝淀粉总接枝率及接枝效率的影响

由图 4 可见,随着单体总量的增加,其接枝率和接枝效率于总单体/淀粉为 4:6 时达到最大值。这是由于单体用量增加提高了单体与淀粉分子上羟基自由基的反应机率,因而接枝率和接枝效率增大。而过量的单体会加剧单体间的反应,不利于接枝共聚反应的进行,使得接枝率和接枝效率略有下降。

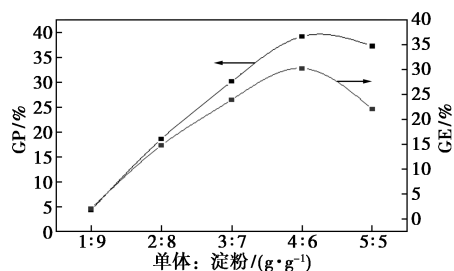


图4 单体总用量对接枝淀粉总接枝率及接枝效率的影响

由图 5 可见,总接枝率和接枝效率均高于 28%,且随着 AA/MA 投料比的增加先猛然增加而后缓慢减少;当 AA/MA 投料比为 3:7 时,接枝率和接枝效率达到最大值。这是因为丙烯酸是亲水性单体,随着丙烯酸的增加,提高了亲水性单体与淀粉分子上羟基自由基的反应机率,故而接枝率和接枝效率增大。过量的丙烯酸会加剧均聚反应,倾向于生成更多的均聚物不利于接枝共聚反应的进行,使接枝率和接枝效率略有下降。

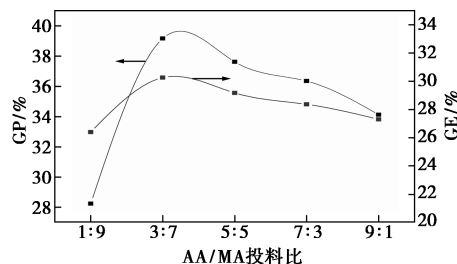


图5 AA/MA 投料比对接枝淀粉总接枝率及接枝效率的影响

综上分析,当反应时间 4h、HRP 酶浓度 12U/mL、总单体/淀粉比=4:6、AA/MA 投料摩尔比为 3:7 时,淀粉接枝丙烯酸及丙烯酸甲酯效果最佳,接枝率为 39.16%,接枝效率为 30.26%,接枝效果明显强于仅接枝丙烯酸甲酯^[8]。

2.3 流变性能分析

2.3.1 静态流变性能分析

流变仪对其静态流变特性的分析结果见图 6 (注:图 6—图 8 中,a 为原淀粉,b、c、d 分别为总接枝率为 10%,AA/MA 投料比分别为 3:7、5:5、7:3 的二元接枝淀粉)。

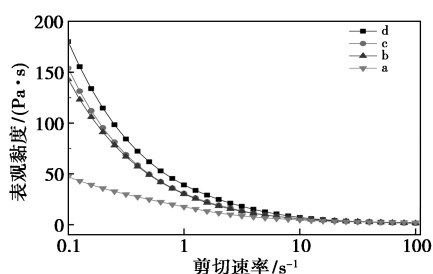


图 6 淀粉溶液表观黏度随剪切速率的变化曲线图

由图可知,随着剪切速率的增大,接枝淀粉溶液中淀粉分子沿剪切方向的定向排列越整齐,表观黏度逐渐下降,最终趋于稳定。而淀粉接枝改性后,溶液的初始表观黏度均有所增大,且丙烯酸投料比越高,初始表观黏度越大,这是因为接枝改性后淀粉分子支链增多,分子链缠结,且丙烯酸含量的增加致使分子链之间的氢键增加,使得初始表观黏度有所增大。

2.3.2 动态黏弹性分析

改性前后淀粉溶液动态黏弹性中的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 变化趋势见图 7。

从图可见,支链引入淀粉后,溶液储能模量和损耗模量均有明显增大且随着 AA 投料比的增加而增大,表现出整体的黏弹性增加^[12];储能模量'随角频率的增加而增加;损耗模量随角频率的增加也逐渐增大,且随着 AA 投料比的增加这种趋势略微增加,这是因为随着剪切作用的进行,被转变的剪切热量越多,不可逆损耗有所增加。这说明支链的引入使得接枝淀粉分子三维网状结构缠结点增加,具有更强的网状结构。且丙烯酸支链的加入增加接枝淀粉中氢键缔结,使其网状结构更加稳固。支链的引入提升了产物溶液的黏度与黏弹性,增强了淀粉溶液的成膜性。

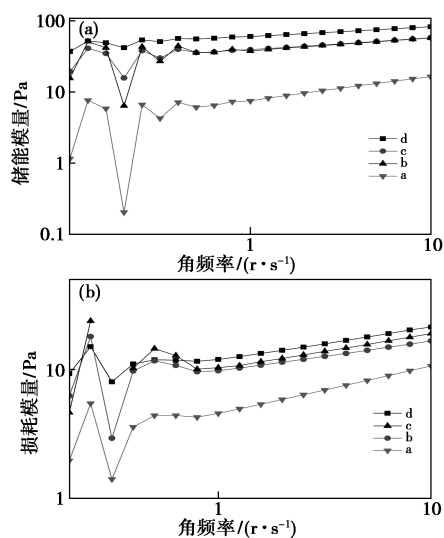


图 7 改性前后淀粉溶液动态黏弹性中的储能模量(a)和损耗模量(b)变化趋势图

2.4 膜的亲水性分析

在单体总接枝率为 10% 的条件下,考察 AA/MA 投料比对丙烯酸/丙烯酸甲酯接枝淀粉接触角的影响,结果见图 8。

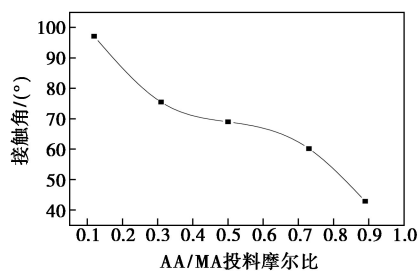


图 8 AA/MA 投料比对丙烯酸/丙烯酸甲酯接枝淀粉接触角的影响

由图可知,二元接枝淀粉膜的接触角范围在 42.6~97.1°之间,接触角的变化较为缓和。随着 AA/MA 投料比的增加,接枝淀粉的接触角逐渐变小,表明其亲水性得到了提高,这由于产物侧链中亲水性单体 AA 增加提升了膜的亲水性。

2.5 膜的机械性能分析

为考察单体对接枝淀粉性能的影响,测试单体总接枝率 10%,不同投料比下接枝淀粉膜的断裂强度和断裂伸长率,结果见表 1。

由表 1 可知。经过接枝后,二元接枝淀粉成膜性良好,且机械性能有较好地改善,均优于原淀粉。随着 AA/MA 投料比的增加,淀粉膜断裂强度增加而断裂伸长率降低。这主要是由于聚丙烯酸甲酯是柔性高分子,且聚丙烯酸含有大量羧基与淀粉形成氢键,因而当支链中丙烯酸增加时,其分子间作用

表 1 淀粉膜的拉伸强度和断裂伸长率

样品名称	拉伸强度/MPa	断裂伸长率/%
原淀粉	28.29	1.23
接枝淀粉(1:9)	30.12	4.12
接枝淀粉(3:7)	30.85	3.75
接枝淀粉(5:5)	31.92	3.11
接枝淀粉(7:3)	30.91	2.80
接枝淀粉(9:1)	31.07	2.74

注:表中比值为接枝淀粉中 AA/MA 的投料比。

力较强。但改性膜的柔韧性及抗拉强度均得到显著提高。

2.6 接枝淀粉的抑菌作用

丙烯酸/丙烯酸甲酯接枝淀粉的抑菌性见表 2。由表 2 可知,二元接枝淀粉对大肠杆菌有一定的抑制效果,并随着 AA/MA 投料比的增加,二元接枝物的抑菌效果更加明显^[13],主要原因可能是支链中聚丙烯酸及丙烯酸甲酯的结构主要是 C—C 键,其难以被大肠杆菌所利用,且丙烯酸中和后含有较多的 Na⁺,亦不利于细菌生长。因此,接枝产物具有一定的抑菌性。

表 2 丙烯酸/丙烯酸甲酯接枝淀粉的抑菌性

测试样品 (AA/MA 投料比)	直径 9cm 培养基中菌落数				
	1	2	3	4	平均值
0:0	150	142	137	154	146
1:9	105	98	111	102	104
3:7	98	91	104	101	99
5:5	86	83	81	79	82
7:3	83	79	75	85	81
9:1	74	78	75	77	76

3 结语

经实验分析可知,利用 HRP 酶催化体系可以催化淀粉同时接枝丙烯酸及丙烯酸甲酯,其较优反应条件为:当反应时间 4h、HRP 酶浓度 12U/mL、总单体/淀粉比=4:6、AA/MA 投料摩尔比为 3:7 时,淀粉接枝丙烯酸及丙烯酸甲酯效果最佳,接枝率为 39.16%,接枝效率为 30.26%。经过酶促改性后的淀粉溶液黏度与黏弹性增大;且随着丙烯酸投料

比的增加,接枝淀粉的亲水性与断裂强度均提高,而断裂伸长率降低;接枝产物有一定的抑菌性,利于材料的长期储存。该材料在食品、医疗、土木建筑和纺织等领域应用前景良好。

参考文献

- [1] Tester R F, Karkalas J, Qi X. Starch-composition, fine structure and architecture[J]. Journal of Cereal Science, 2004, 39(2):151-165.
- [2] 陈密峰,朱琳晖,吉彦.引发剂在淀粉接枝反应中的研究与应用[J].化学世界,2001,42(3):153-156.
- [3] Zhang H, Wang J K, Wang R, et al. Microwave irradiated synthesis of grafted cationic starch: synthesis, characterization, application, and biodegradation[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2013, 130(3):1645-1652.
- [4] 徐玲,杨成,段彬,等.脂肪酶催化合成淀粉/聚己内酯接枝共聚物[J].高分子材料科学与工程,2009,25(7):34-37.
- [5] 陈凤.酶催化羟乙基淀粉的接枝改性[D].无锡:江南大学,2009.
- [6] 吕生华,马艳芬,刘岗,等.HRP 催化聚合对羟基苯磺酸钠的 pH 控制方法及其应用研究[J].中国皮革,2011,40(5):32-35.
- [7] Lv S, Sun T, Zhou Q, et al. Synthesis of starch-g-p (DM-DAAC) using HRP initiation and the correlation of its structure and sludge dewaterability[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 103(1):285-293.
- [8] 王苏,王强,徐进,等.辣根过氧化物酶催化淀粉接枝丙烯酸甲酯浆料制备及其上浆性能[J].纺织学报,2017,38(6):69-74.
- [9] 刘岗,吕生华,马艳芬.HRP 催化淀粉与丙烯酰胺接枝共聚物的制备及性能研究[J].中国皮革,2010,39(5):19-23.
- [10] Wang S, Xu J, Wang Q, et al. Preparation and rheological properties of starch-g-poly (butyl acrylate) catalyzed by horseradish peroxidase[J]. Process Biochemistry, 2017, 59: 104-110.
- [11] 刘珍元,姜宏伟.水溶性丙烯酸钠和丙烯酸甲酯共聚物的合成及其分散性能研究[J].应用化工,2009,38(3):349.
- [12] Yoo D, Yoo B. Rheology of rice starch-sucrose composites[J]. Starch-Stärke, 2005, 57(6):254-261.
- [13] 游文莉,许文耀.杀细菌剂毒力测定方法的研究[J].农药科学与管理,2002,23(2):21-22.
- [14] 任静,刘刚,欧全宏,等.淀粉的红外光谱及其二维相关红外光谱的分析鉴定[J].中国农学通报,2015,31(17):58.
- [15] Zhang Z, Chen P R, Du X F, et al. Effects of amylose content on property and microstructure of starch-graft-sodium crylate copolymers[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1):453-459.

收稿日期:2018-03-29